

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Irena M. Marjanović

**IDENTIFIKACIJA MOLEKULARNO-  
-GENETIČKIH MARKERA PATOGENEZE AKUTNE  
MIJELOIDNE LEUKEMIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Irena M. Marjanović

**IDENTIFICATION OF MOLECULAR GENETIC  
MARKERS OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA  
PATHOGENESIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

Mentori:

**dr Nataša Tošić**, Viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**dr Sonja Pavlović**, Naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Komisija:

**dr Nataša Tošić**, Viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**dr Sonja Pavlović**, Naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**prof dr Dušanka Savić Pavićević**, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_2018. godine

*Ovaj doktorat je realizovan u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.*

*Zahvaljujem se mentorki dr Sonji Pavlović što me je primila u Laboratoriju u vreme kada je izuzetno teško bilo naći posao, pružila mi priliku da radim, da izradim doktorsku disertaciju, steknem iskustvo i naučim sve što sada znam . Duboko i iskreno hvala Sonji na tome što je veliki čovek, divan šef i uzor. Hvala na svim savetima, na divnim rečima i nezamenljivoj podršci koja mi je neizmerno značila. Smatram da se šef kao što ste Vi, retko nalazi.*

*Posebno se zahvaljujem mojoj neposrednoj mentorki dr Nataši Tošić na svemu što me je naučila. Hvala na velikom uloženom trudu, na podršci, nesebičnoj pomoći, ogromoj volji, na svim razgovorima, savetima i što si uvek bila puna razumevanja. Izuzetno sam zahvalna i privilegovana što sam tebe imala za mentora. Hvala za mnogo mnogo smeha i lepih trenutaka koje smo provele zajedno.*

*Prof dr Dušanki Savić Pavićević se zahvaljujem na konstruktivnim i dobronamernim sugestijama koje sam dobila tokom doktorskih studija i tokom pisanja doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se Bojani, Nadji, drugoj Bojani i posebno Jeleni na velikoj stručnoj pomoći, volji, strpljenju i savetima.*

*Zahvaljujem se Goci, Maji, Branki, Vesni, Milevi, Dori i Tanji za podršku, razumevanje i volju da uvek pomognu, pruže iskren savet i angažuju se u slučaju problema ili nedoumica.*

*Zahvaljujem se mlađima Marini, Miši, Aniti, Ani, Jovani, Vladi i Bojanu na druženju, volji da uvek pomognu i iskreno posavetuju.*

*Veliko hvala Nikoli, Biljani, Kris i Sanji za druženje, razumevanje, strpljenje i pomoć. Hvala neizmerno na velikoj podršci.*

*Još jednom iskreno hvala svim mojim kolegama iz laboratorije i instituta koji su se veliki broj puta poneli ne samo kao dobre kolege, već i kao prijatelji.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj porodici i prijateljima koji su mi nezamenljiv oslonac i podrška.*

## Identifikacija molekularno-genetičkih markera patogeneze akutne mijeloidne leukemije

### Rezime

Akutna mijeloidna leukemija (AML) predstavlja grupu hematoloških malignih oboljenja koju karakteriše heterogeni genetički i epigenetički profil. AML sa normalnim kariotipom (AML-NK) predstavlja najveću podgrupu u okviru AML, koju odlikuje intermedijarni rizik. Međutim, samo 40% obolelih od AML-NK preživljava duže od 5 godina, pa je neophodno otkriti molekularno-genetičke markere značajne za prognozu i praćenje toka bolesti, rano otkrivanje minimalne rezidualne bolesti (MRB) i izbor odgovarajuće terapije, kako bi bila omogućena bolja stratifikacija pacijenata sa AML-NK.

Prvi cilj ove studije je analiza mutacionog profila dečje (dAML) i adultne (aAML) koja će doprineti rasvetljenju patogeneze mijeloidnih leukemija. Drugi cilj predstavlja određivanje nivoa ekspresije *WT1*, *EVII*, *BAALC* i *MNI* gena, kao potencijalnih molekularno-genetičkih markera značajnih za AML-NK.

Analizirani su neselektovani DNK uzorci 20 dAML i 20 aAML pacijenata, primenom metode targetovanog sekvenciranja nove generacije (eng. „targeted next generation sequencing“ – NGS), TruSeq Amplicon - Cancer Panel (TSACP) esejem, koji omogućava detekciju somatskih mutacija u 48 gena uključenih u kancerogenezu. U drugom delu ove studije nivo ekspresije gena *WT1* (104 pacijenta), *EVII* (104 pacijenta), *BAALC* (111 pacijenata) i *MNI* (111 pacijenata) u mononuklearnim ćelijama koštane srži AML-NK pacijenata i zdravih pojedinaca analiziran je real-time PCR metodom.

Rezultati su pokazali da AML sadrži relativno mali broj genetičkih promena, u proseku samo 3 mutacije po pacijentu kod aAML i dAML grupe pacijenata. Zastupljenost najčešćih mutacija u pojedinačnim genima, koji su povezani sa patogenezom AML, razlikovala se kod dAML i aAML: *IDH1* (0% kod dAML, 5% kod aAML), *IDH2* (0% kod dAML, 10% kod aAML), *NPM1* (10% kod dAML, 35% kod aAML). Takođe, prisustvo mutacija u 4 gena (*JAK3*, *ABL1*, *GNAQ* i *EGFR*) koji kodiraju tirozin kinaze ili proteine koji su udruženi sa tirozin kinazama detektovano je isključivo kod dAML pacijenata, dok je kod 5 gena (*IDH1*, *APC*, *HNFI1A*, *GNAS* i *SMARCB1*) koji su uključeni u metilaciju i modifikaciju histona prisustvo mutacija utvrđeno isključivo kod

aAML pacijenata. Grupe pacijenata sa visokim nivoom ekspresije *WT1* ili *BAALC* ili *MNI* gena imale su kraće trajanje kompletne remisije (KR) i kraće ukupno preživljavanje (UP). Stoga se zaključuje da visok nivo *WT1*, visok nivo *BAALC* i visok nivo *MNI* ekspresije, svaki za sebe, predstavlja nepovoljan prognostički faktor. Pokazano je da pacijenti sa povišenim nivoom ekspresije *EVII* imaju povećan rizik od pojave relapsa bolesti, ali bez uticaja na dužinu trajanja KR i UP.

Razlika u mutacionom profilu između dAML i aAML pacijenata ističe postojanje razlike u patogenezi AML kod ove dve grupe bolesnika, a nalaz da AML kod obe grupe pacijenata sadrži relativno mali broj mutacija u odnosu na druge malignitete čini ovu bolest pogodnom za primenu molekularne ciljane terapije. Naši rezultati govore u prilog da ekspresija *WT1* predstavlja dobar molekularni marker za praćenje MRB, odgovora na terapiju i predikciju relapsa bolesti, a da ekspresija *BAALC* predstavlja stabilan molekularni marker pogodan za praćenje MRB i odgovora na terapiju kod AML-NK. Ekspresija *MNI* gena predstavlja molekularni marker pogodan za praćenje odgovora na inicijalnu terapiju, ali nije stabilan marker za praćenje MRB kod AML-NK.

Ova studija je ukazala na različitu molekularnu osnovu dAML i aAML, kao i na potencijalne targete za ciljanu terapiju. Ekspresije *WT1*, *BAALC* i *MNI* predstavljaju nove molekularne markere značajne za prognozu AML-NK.

Ključne reči: akutna mijeloidna leukemija sa normalnim kariotipom (AML-NK); Next Generation Sequencing (NGS); *WT1* ekspresija; *EVII* ekspresija; *BAALC* ekspresija; *MNI* ekspresija

Naučna oblast: molekularna biologija

Uža naučna oblast: molekularna biologija eukariota

UDK broj: 616.155.392:616-092(043.3)

## Identification of molecular genetic markers of acute myeloid leukemia pathogenesis

### Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a group of haematological malignancies characterized by a heterogeneous genetic and epigenetic profile. AML with normal karyotype (AML-NK) represents the largest subgroup within the AML, characterized by an intermediate risk. However, only 40% of patients with AML-NK survive for more than 5 years, so it is necessary to detect molecular genetic markers significant for prognosis and disease monitoring, early detection of minimum residual disease (MRD), and the selection of appropriate therapy in order to enable better stratification of patients with AML-NK.

The first aim of this study is the analysis of the mutation profile of childhood (cAML) and adult (aAML) AML which will contribute to the clarification of the pathogenesis of myeloid leukemia. The second aim is to determine the level of expression of *WT1*, *EVII*, *BAALC* and *MNI* gene, as potential molecular genetic markers relevant to AML-NK.

Unselected DNA samples of 20 cAMLs and 20 aAML patients were analyzed using the targeted next generation sequencing (NGS) method, on the TruSeq Amplicon-Cancer Panel (TSACP), which enables the detection of somatic mutations in 48 genes involved in carcinogenesis. In the second part of this research, the level of expression of the genes *WT1* (104 patients), *EVII* (104 patients), *BAALC* (111 patients) and *MNI* (111 patients) was analyzed in mononuclear bone marrow cells of AML-NK patients and healthy individuals by the real-time PCR method.

The results showed that the AML contains a relatively small number of genetic changes, on average only 3 mutations per patient in the aAML and cAML group. The incidence of the most common mutations in individual genes, which are associated with AML pathogenesis, differed in cAML and aAML: *IDH1* (0% in cAML, 5% in aAML), *IDH2* (0% in cAML, 10% in aAML), *NPM1* (10% in cAML, 35% in aAML). Also, the presence of mutations in 4 genes (*JAK3*, *ABL1*, *GNAQ*, and *EGFR*) that encode tyrosine kinases or proteins that are associated with tyrosine kinases were detected exclusively in cAML patients, while in 5 genes (*IDH1*, *APC*, *HNF1A*, *GNAS* and *SMARCB1*) involved in methylation and histone modification, the presence of mutations was

found exclusively in aAML patients. Groups of patients with high level of expression of *WT1* or *BAALC* or *MNI* gene had a short duration of complete remission (CR) and shorter overall survival (OS). It is therefore concluded that a high level of *WT1*, a high level of *BAALC* and a high level of *MNI* expression, each for itself, is an unfavorable prognostic factor. Patients with elevated levels of *EVII* expression have been shown to have an increased risk of relapse of the disease, but without affecting the duration of CR and OS.

The difference in the mutational profile between cAML and aAML patients highlights the existence of a difference in AML pathogenesis in these two groups, and the finding that AML in both groups of patients contains a relatively small number of mutations compared to other malignancies makes this disease suitable for the application of molecular targeted therapy. Our results suggest that expression of *WT1* represents a good molecular marker for MRD monitoring, response to therapy and prediction of relapse, and that expression of *BAALC* is a stable molecular marker suitable for monitoring MRB and response to therapy in AML-NK. *MNI* expression is a molecular marker suitable for monitoring response to initial therapy, but it is not a stable marker for monitoring MRD in AML-NK.

This study pointed to an existence of a different molecular basis of cAML and aAML, and to potential targets for targeted therapy. Expressions of *WT1*, *BAALC* and *MNI* represent new molecular markers significant for the prognosis of AML-NK.

Keywords: acute myleoid leukemia with normal karyotype (AML-NK); Next Generation Sequencing (NGS); *WT1* expression; *EVII* expression; *BAALC* expression; *MNI* expression

Research area: molecular biology

Area of special interest: molecular biology of eukaryotes

UDC number: 616.155.392:616-092(043.3)



# SADRŽAJ

<b>I – UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>I - 1. Leukemije</b> .....	<b>1</b>
I - 1.1. Proces hematopoeze i leukemogeneza .....	3
I - 1.2. Klonska evolucija u leukemijama .....	7
<b>I - 2. Akutna mijeloidna leukemija</b> .....	<b>8</b>
I – 2.1. Klasifikacija na osnovu citogenetičkog nalaza .....	8
I – 2.2. Molekularno-genetičke promene u AML-NK .....	9
<b>I - 3. Mutacioni profil adultne i dečje AML</b> .....	<b>10</b>
<b>I - 4. WT1</b> .....	<b>12</b>
I - 4.1. WT1 u normalnoj hematopoezi i leukemijama .....	15
<b>I – 5. EVI1</b> .....	<b>16</b>
I - 5.1. EVI1 u normalnoj hematopoezi .....	18
I - 5.2. EVI1 u leukemijama.....	20
<b>I - 6. BAALC</b> .....	<b>22</b>
I – 6.1. BAALC u normalnoj hematopoezi i leukemijama .....	23
<b>I – 7. MN1</b> .....	<b>26</b>
I - 7.1. MN1 u normalnoj hematopoezi i leukemijama .....	27
<b>II - CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>32</b>
<b>III - MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>34</b>
<b>III - 1. Ispitanici</b> .....	<b>34</b>
<b>III - 2. Izolacija DNK iz periferne krvi/koštane srži mononuklearnih ćelija</b> .....	<b>35</b>
<b>III - 3. Izolacija mononuklearnih ćelija iz aspirata koštane srži ili periferne krvi</b> .....	<b>36</b>
<b>III - 4. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija</b> .....	<b>36</b>
<b>III - 5. Reverzna transkripcija (RT)</b> .....	<b>37</b>
<b>III - 6. Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)</b> .....	<b>37</b>
III - 6.1. Detekcija <i>FLT3/ITD</i> mutacije.....	38
III - 6.2. Detekcija mutacija u <i>NPM1</i> genu .....	40
III - 6.3. Detekcija mutacija u <i>IDH1</i> genu .....	40
III - 6.4. Detekcija mutacija u <i>IDH2</i> genu .....	41
<b>III - 7. Analiza DNK na agaroznom gelu</b> .....	<b>42</b>

<b>III - 8. Sanger sekvenciranje PCR produkata</b> .....	42
<b>III - 9. Praćenje ekspresije gena pomoću „real-time“ PCR (q-PCR) metode</b> .....	44
<b>III - 10. Relativna kvantifikacija</b> .....	47
III - 10.1. Komparativni ddCt metod .....	47
III - 10.1.1. Određivanje ekspresije WT1, EVII i BAALC gena komparativnim ddCt metodom .	48
III - 10.1.2. Određivanje ekspresije MN1 gena komparativnim ddCt metodom .....	49
III - 10.2. Statistička obrada podataka .....	50
<b>III – 11. Detekcija somatskih mutacija primenom ciljanog sekvenciranja nove generacije (eng. „targeted next generation sequencing (NGS)“)</b> .....	51
III – 11.1. Ciljano NGS sekvenciranje – priprema DNK uzoraka i biblioteke .....	53
11.1.1. Hibridizacija oligonukleotidnih proba .....	53
11.1.2. Prečišćavanje produkata reakcije hibridizacije .....	53
11.1.3. Elongacija vezanih oligonukleotidnih proba.....	54
11.1.4. Umnožavanje dobijenih produkata lančanom reakcijom polimeraze .....	54
11.1.5. Prečišćavanje produkata lančane reakcije polimeraze .....	55
11.1.6. Normalizacija koncentracije biblioteke.....	55
11.1.7. Spajanje dobijenih biblioteka i nanošenje na MiSeq platformu za sekvenciranje .....	56
III – 11.2. Ciljano NGS sekvenciranje – reakcija sekvenciranja .....	57
III – 11.3. Ciljano NGS sekvenciranje – obrada podataka.....	57
11.3.1. Bioinformatička obrada podataka .....	57
11.3.2. Statistička obrada podataka.....	58
<b>IV – REZULTATI</b> .....	<b>59</b>
<b>IV - 1. Analiza mutacionog profila adultne i dečje AML primenom metode paralelnog ciljanog sekvenciranja nove generacije</b> .....	59
<b>IV - 2. Kvantifikacija ekspresije <i>WT1</i> gena kod AML-NK pacijenata</b> .....	72
IV - 2.1. Ekspresija <i>WT1</i> gena kod <i>de novo</i> AML-NK pacijenata.....	72
IV - 2.2. Ekspresija <i>WT1</i> gena kod AML-NK pacijenata nakon indukcione terapije .....	78
<b>IV - 3. Kvantifikacija ekspresije <i>EVII</i> gena kod AML-NK pacijenata</b> .....	84
IV - 3.1. Ekspresija <i>EVII</i> gena kod <i>de novo</i> AML-NK pacijenata.....	84
<b>IV - 4. Kvantifikacija ekspresije BAALC gena kod AML-NK pacijenata</b> .....	90
IV - 4.1. Ekspresija BAALC gena kod <i>de novo</i> AML-NK pacijenata.....	90
IV - 4.2. Ekspresija <i>BAALC</i> gena kod AML-NK pacijenata nakon indukcione terapije .....	94
<b>IV - 5. Kvantifikacija ekspresije <i>MNI</i> gena kod AML-NK pacijenata</b> .....	97

IV - 5.1. Ekspresija <i>MNI</i> gena kod <i>de novo</i> AML-NK pacijenata .....	97
IV - 5.2. Ekspresija <i>MNI</i> gena kod AML-NK pacijenata nakon indukciono terapije .....	101
<b>IV - 6. Povezanost ekspresije <i>BAALC</i> i <i>MNI</i> gena kod AML-NK pacijenata .....</b>	<b>104</b>
<b>V – DISKUSIJA .....</b>	<b>107</b>
<b>V - 1. Mutacioni profil adultne i dečje AML .....</b>	<b>107</b>
<b>V - 2. Ekspresija <i>WT1</i> gena .....</b>	<b>111</b>
<b>V - 3. Ekspresija <i>EVII</i> gena .....</b>	<b>116</b>
<b>V - 4. Ekspresija <i>BAALC</i> gena .....</b>	<b>120</b>
<b>V - 5. Ekspresija <i>MNI</i> gena.....</b>	<b>125</b>
<b>V - 6. Udruženost ekspresije <i>BAALC</i> i <i>MNI</i> gena .....</b>	<b>128</b>
<b>VI – ZAKLJUČCI.....</b>	<b>130</b>
<b>VII – LITERATURA.....</b>	<b>133</b>

***Skraćenice;***

AML – akutna mijeloidna leukemija

AML-NK – Akutna mijeloidna leukemija sa normalnim kariotipom

dAML – dečja AML

aAML – adultna AML

*BAALC* – Brain and Acute Leukemia, Cytoplasmic

*EVII* – Ecotopic viral integration site-1

FAB – „French – American – British“ klasifikacija leukemija

*FLT3* – FMS-Like Tyrosine Kinase 3

HLL – Hronična limfoblastna leukemija

HML – Hronična mijeloidna leukemija

HMĆ – Hematopoetske matične ćelije

*IDH* – Izocitratdehidrogenaza

KR – kompletna remisija

LĆB – Leukemijske ćelije blasta

LMĆ – Leukemijske matične ćelije

MDS – Mijelo-displastični sindrom

*MNI* – Meningioma 1

MRB (MRD) – minimalna rezidualna bolest („Minimal Residual Disease“)

NGS – Next generation sequencing

TSACP – TruSeq Amplicon Cancer Panel

UP – ukupno preživljavanje

*WT1* – Wilms tumor

# I – UVOD

## **I - 1. Leukemije**

Leukemije predstavljaju klinički i genetički heterogenu grupu klonalnih malignih bolesti hematopoetskog tkiva. Nastaju kao posledica akumulacije stečenih genetičkih alteracija u hematopoetskim progenitorskim ćelijama, koje dovode do neoplastične proliferacije, zastoja u diferencijaciji i/ili programiranoj ćelijskoj smrti (apoptozi) (Fröhling S, 2005).

Leukemije se u odnosu na poreklo ćelije u kojoj dolazi do maligne transformacije dele u dve glavne kategorije - limfoidnu i mijeloidnu, koje se odnose na limfocitnu (limfoidne leukemije), odnosno granulocitnu, eritrocitnu, monocitnu i megakariocitnu lozu (mijeloidne leukemije).

I limfoidna i mijeloidna leukemija se prema brzini kliničke progresije bolesti i na osnovu stepena diferencijacije ćelija u kojima se događa maligna promena, mogu podeliti na akutne i hronične. Kod akutnih, broj malignih ćelija odgovara nižim stupnjevima diferencijacije, brzo se povećava, akumulira i blokira proizvodnju normalnih krvnih elemenata, a kod hroničnih, takođe dolazi do akumulacije leukemijskih ćelija, ali su one na višem stupnju diferencijacije, hematopoeza je u manjoj meri poremećena i bolest sporije napreduje.

Akutna Mijeloidna Leukemija (AML) predstavlja heterogenu grupu agresivnih hematoloških neoplazmi mijeloidne ćelijske linije, sa širokim spektrom strukturnih hromozomskih aberacija, genskih mutacija, epigenetičkih alteracija i promenama u genskoj ekspresiji (Mrózek K, 2006). Prisustvo, odsustvo i kombinacija ovih promena kod AML pacijenata dovode do različitih kliničkih odgovora na terapiju. Ove genetičke promene se samostalno ili kombinovano koriste prilikom definisanja prognostičkih grupa, odnosno prilikom predviđanja kliničkog ishoda i odgovora na terapiju.

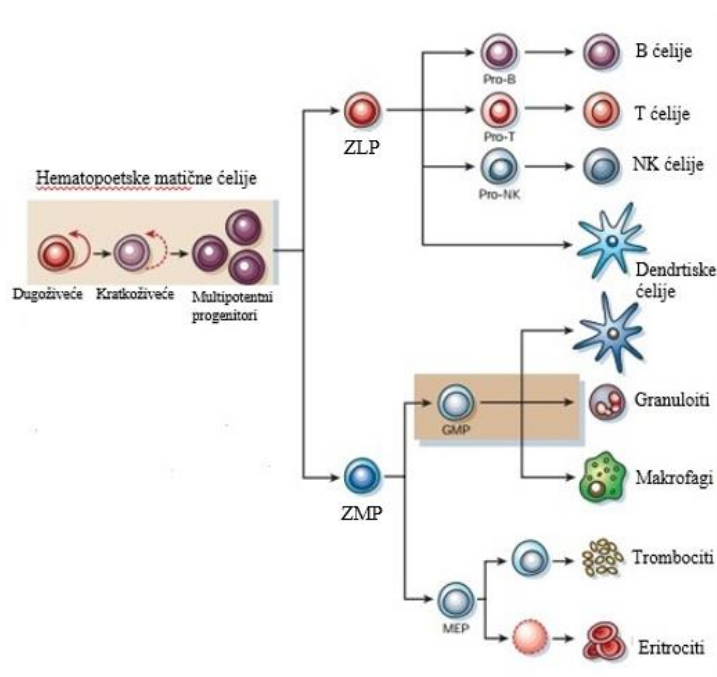
AML se karakteriše klonalnom proliferacijom mijeloidnih prekursora i redukovanim kapacitetom za diferencijaciju u zrele ćelijske komponente (Löwenberg B, 1999). Drugim rečima, ove abnormalne prekursorske ćelije imaju sposobnost za proliferaciju, ali im nedostaje sposobnost diferencijacije. Kao posledica toga, dolazi do gubitka hematopoetske funkcije zbog nedostatka zrelih granulocita i monocita, kao i zbog smanjene produkcije eritrocita i trombocita.

AML je najčešći oblik akutne leukemije kod odraslih i čini oko 80% slučajeva u ovoj grupi pacijenata (Yamamoto JF, 2008). Dok u tretmanu nekih hematoloških maligniteta postoje značajni napreci, prognoza kod AML međutim ostaje loša. Iako primenom savremenih dijagnostičkih metoda i protokola lečenja, nakon konvencionalne indukcionne hemoterapije, preko 70% AML pacijenata dostiže stanje kompletne kliničke remisije, petogodišnje preživljavanje iznosi ispod 40%, većina pacijenata doživljava relaps u periodu od 5 godina i, bez obzira na kontinuiranu terapiju, umire od primarne bolesti (Appelbaum FR, 2001). Pacijenti stariji od 60 godina imaju naročito lošu prognozu, sa verovatnoćom dvogodišnjeg preživljavanja nižom od 10% (Löwenberg B, 1998). Smatra se da do relapsa, odnosno ponovne pojave bolesti, dolazi jer i nakon indukcionne terapije mali broj malignih ćelija ostaje prisutan. Iz ovog razloga neophodno je bolje razumevanje molekularne osnove ovog oboljenja, u cilju razvoja efektivnijih terapeutika.

Pojava da mali broj leukemijskih ćelija ostaje u koštanoj srži i nakon indukcije kliničke remisije, naziva se minimalna rezidualna bolest (MRB; eng. „MRD –minimal residual disease“). Minimalna rezidualna bolest predstavlja veoma moćan prognostički faktor koji može da ukaže na ponovnu pojavu bolesti (relaps) i pre pojave kliničkih simptoma (Szczepanski T, 1997).

## I - 1.1. Proces hematopoeze i leukemogeneza

Leukemijske ćelije blasta (LĆB), koje se akumuliraju u koštanoj srži i perifernoj krvi pacijenata, su posledica poremećaja normalnog procesa hematopoeze. Hematopoeza predstavlja proces nastanka zrelih ćelija krvi različitih ćelijskih linija od hematopoetskih matičnih ćelija (HMC) (Slika 1.). Hematopoetske ćelije su retke, u koštanoj srži nalazimo jednu na  $20 \times 10^6$  drugih ćelija. One su pluripotentne i imaju kapacitet samoobnavljanja, obezbeđujući održavanje homeostaze hematopoetskog sistema (Kondo M, 2003). HMC stvaraju zajedničke multipotentne mijeloidne i limfoidne ćelije progenitore, koje se diferenciraju u ćelije mijeloidne odnosno limfoidne ćelijske linije (Orkin SH, 2008). Kako ćelije postepeno postaju sve više diferencirane, one gube kapacitet samoobnavljanja i pluripotentnosti, koje su karakteristike HMC.



Slika 1. Šematski prikaz hematopoeze. Prikazano je razviće hematopoetskih matičnih ćelija (HMC). HMC se mogu podijeliti na dugoživeće samoobnavljajuće HMC, kratkoživeće samoobnavljajuće HMC i multipotentne progenitore. Od njih nastaju zajednički mijeloidni ili limfoidni progenitori (ZMP i ZLP), granulocitni mijeloidni progenitor (GMP), megakariocitni eritrocitni prekursor (MEP), eritroidni prekursor (ErP), megakariocitni prekursor (MkP), „natural killer“ (NK). Modifikovano iz rada *Reya T.* iz 2001. godine. (Reya T, 2001).

Leukemogeneza kod AML predstavlja heterogen višestepeni proces, u kome jedna genetička promena nije dovoljna da izazove nastanak AML, već je neophodno prisustvo najmanje dve različite mutacije (aberracije) u hematopoetskim progenitorskim ćelijama, koje će dovesti do njene transformacije u malignu ćeliju, od koje će se dalje razviti klonalna populacija AML ćelija (Mrozek K, 2007). Rezultujuće molekularne alteracije dovešće do prekida skoro svakog aspekta normalne ćelijske homeostaze. Prisutni su brojni poremećeni procesi uključujući neadekvatnu proliferaciju u odsustvu normalnih signala rasta, neograničenu samoobnovu na način analogan stem ćelijama, izbegavanje programirane ćelijske smrti, inhibicija diferencijacije, aberantna kontrola ključnih tačaka ćelijskog ciklusa, genomska nestabilnost i rasejavanje leukemijskih ćelija u različite delove organizma (Lichtman JD i Sternberg DW, 2005).

Proces u kome leukemijske matične ćelije (LMĆ) stvaraju leukemijske ćelije blasta u AML je proces analogan hijerarhijskom uređenju HMC, opredeljenim progenitorima i terminalno diferenciranim ćelijama krvi u normalnoj hematopoezi (Bonnet i Dick, 1997). LMĆ su ćelije kancera koje imaju osobine matičnih ćelija, sa izrazito velikim kapacitetom za samoobnavu i repopulaciju (Dick JE, 2008). LMĆ mogu takođe biti u stanju mirovanja, i pretpostavlja se da upravo njihova latencija pruža mogućnost rezistencije na konvencionalnu hemoterapiju, omogućavajući njihovo preživljavanje, koje zatim dovodi do relapsa bolesti kod pacijenata koji su postigli kompletnu remisiju (Dick JE, 2008). Precizno poreklo LMĆ je i dalje predmet diskusije (Dick JE, 2008). Pa tako, LMĆ može voditi poreklo of multipotentne HMC koja je pretrpela malignu transformaciju ili, može poticati od HMC koja je već u određenoj meri opredeljena. U ovom slučaju stadijum zrelosti leukemijske ćelije predstavljao bi odraz stadijuma zrelosti normalne ćelije od koje ona vodi poreklo. Isto tako proces može biti obrnut, odnosno LMĆ može nastati od ćelija mijeloidnog progenitora koja tokom leukemogeneze ponovo stiče osobine koje poseduje stem ćelija, kao npr. veliki kapacitet samoobnove (Krivtsov AV, 2006; Gairdon N, 2011).



Transformacija normalne hematopoetske ćelije u leukemijsku ćeliju obuhvata sticanje višestrukih genetičkih alteracija, kao što su hromozomske aberacije ili genske mutacije, tokom dužeg perioda vremena, u višestepenom procesu (Kelly LM, 2002). Sve prisutne alteracije možemo klasifikovati u one Klase I i Klase II. Klasa I, odnosno induktorske mutacije, obuhvataju promene koje aktiviraju puteve signalne transdukcije i stoga povećavaju preživljavanje i proliferaciju ćelija nosilaca ovih promena. Ovim ćelijama, induktorske mutacije obezbeđuju selektivnu prednost i generalno se događaju u genima asociranim sa kancerom. Nasuprot tome, mutacije klase II, odnosno propratne mutacije, remete funkciju transkripcionih faktora, koji su važni za diferencijaciju ćelija. Ove promene ne obezbeđuju selektivnu prednost, i mogu nastati u ćeliji i pre sticanja induktorske mutacije. U Tabeli 1. sumirane su najčešće citogenetičke i genetičke aberacije podeljene po klasama.

Tabela 1. Promene u genima klase I i klase II u AML (Arber DA, 2016)

Mutacije klase I	Mutacije klase II
FLT3/ITD FLT3/TKD KIT JAK NRAS KRAS	PML-RARA/t(15;17) AML-ETO/t(8;21) CFBF-MYH11/inv(16)-t(16;16) NPM1 CEBPA MLL RUNX1/AML DNMT3A

Hipoteza kojom se objašnjava proces leukemogeneze, tzv. "2 hit" hipoteza, je zasnovana na navedenoj klasifikaciji genetičkih promena i postulira da je udruženo delovanje mutacija obe klase neophodno za malignu transformaciju ćelija i razvoj kompletnog leukemijskog fenotipa. Iako se ovom teorijom ne mogu objasniti svi AML slučajevi, ona može da objasni zašto mutacije klase I često koegzistiraju sa mutacijama klase II. Na primer, *FLT3/ITD* mutacije (eng. „FMS-Like Tyrosine Kinase 3 internal tandem duplication“) su kod obolelih od AML često udružene sa mutacijama u *NPM1* genu (eng. „Nucleophosmin 1“) (Schlenk

RF, 2008). Pregled najčešćih molekularno genetičkih alteracija u AML prikazan je u Tabeli 2.

Tabela 2. Pregled najčešćih molekularno genetičkih abnormalnosti u AML (Arber DA, 2016)

Gen	Promena	Procenat zastupljenosti	Prognostički efekat
ASXL1	Mutacija	5-10%	Nepovoljan
BAALC	Prekomerna ekspresija		Nepovoljan
CEBPA	Homozigotna mutacija	10%	Povoljan
DNMT3A	Mutacija	20%	Nepovoljan
EVI1	Prekomerna ekspresija		Nepovoljan
FLT3	ITD-mutacija	25-30%	Nepovoljan
FLT3	TKD-mutacija	5%	Nepovoljan
IDH1/2	Mutacija	10%	Nepovoljan
JAK2	Mutacija	5%	Intermedijeran
KIT	Mutacija	10%	Nepovoljan u CBF-AML
KRAS	Mutacija	5%	Intermedijeran
MLL	Mutacija	5%	Nepovoljan
MN1	Prekomerna ekspresija		Nepovoljan
NPM1	Mutacija	30-35%	Povoljan bez FLT3-ITD
NRAS	Mutacija	10-15%	Intermedijeran
RUNX1/AML1	Mutacija	5-10%	Intermedijeran
TET2	Mutacija	10%	Intermedijeran
TP53	Mutacija	5%	Nepovoljan
WT1	Prekomerna ekspresija		Nepovoljan

Ovi genetički “dogadjaji” narušavaju normalne ćelijske procese i njihova akumulacija u klonu rezultuje kancerogenim fenotipom, koji se odlikuje “karakteristikama kancera”. Ove “karakteristike“ mogu uključivati sposobnost da se održi proliferativna signalizacija,

izbegavanje uticaja supresora rasta, rezistencija na apoptozu i indukcija nekontrolisane replikacije (Hanahan D, 2011). Selektivna prednost, koju ćelije leukemijskih blasta stiču nad normalnim ćelijama, omogućavaju dominaciju leukemijskog klonu i akumulaciju leukemijskih blasta u perifernoj krvi i koštanoj srži pacijenta. Iz svih navedenih razloga identifikacija novih terapeutika koji bi ciljano delovali na ukidanje vijabilnosti leukemijskih matičnih ćelija, znatno bi doprinela efikasnijem lečenju ove bolesti.

### I - 1.2. Klonska evolucija u leukemijama

Za razliku od normalne hematopoeze, koja predstavlja proces poliklonske ekspanzije u kome nekoliko matičnih ćelija proliferiše i diferencira se da bi proizvelo mešavinu terminalno diferenciranih ćelija, većina hematoloških neoplazmi nastaje kao rezultat monoklonske ekspanzije. Genetička promena koja jednoj ćeliji omogućuje selektivnu prednost nad drugim ćelijama, može dovesti do razvoja klonu, a višestepena priroda procesa nastanka AML leži u osnovi stvaranja čitavog spektra sub-klonova koji se međusobno razlikuju u svojim stečenim sekundarnim alteracijama. Jedan klon će obično biti dominantan i usmeravati tok bolesti, ali će primena selektivnog pritiska (npr. u obliku primenjene hemoterapije), u određenom trenutku dovesti do smene između klonova, i omogućiti hijerarhijski nižem klonu da preuzme dominaciju nad tokom bolesti. Činjenica da se kod AML pacijenata koji dožive relaps rezistencija na hemoterapiju javlja tek u kasnijim stadijumima lečenja, govori u prilog tome da klon koji izaziva relaps nije uvek onaj klon koji je prisutan na samom početku bolesti. Klon koji uzrokuje relaps bolesti se javlja kao posledica selektivnog pritiska primenjene terapije i pojave klonske evolucije (Nakano Y, 1999). Prisutvo evolucije klonu se dokazuje praćenjem određenih genetičkih promena u toku trajanja lečenja obolelih. Praćenje promena u *FLT3* genu kod AML pacijenata pokazalo je nestabilnost aberacija u ovom genu, na osnovu čega je zaključeno da su one tzv. sekundarne „prateće“ mutacije koje se gube u toku procesa klonske evolucije (Nakano Y, 1999; Shih LY, 2004; Chen W, 2005).

## I - 2. Akutna mijeloidna leukemija

### I – 2.1. Klasifikacija na osnovu citogenetičkog nalaza

Citogenetičke abnormalnosti detektuju se kod otprilike 55% adultnih AML pacijenata (Döhner H, 2010). Kariotip predstavlja jedan od najsnažnijih nezavisnih prognostičkih faktora kod obolelih od AML (Mrozek K. et al 2004). Tačnije, na osnovu kariotipa detektovanog na početku bolesti, pacijenti se svrstavaju u grupe rizika, a od procenjenog rizika zavisi i koji će terapijski protokol biti primenjen. Stoga je detekcija ovih citogenetičkih alteracija neophodan korak za započinjanje lečenja (Bloomfield CD, 1998). Međutim, kod oko 45% obolelih od AML nije moguće detektovati citogenetičku abnormalnost, pa se ovi pacijenti klasifikuju kao AML sa normalnim kariotipom (AML-NK).

Na osnovu citogenetike, AML pacijenti se mogu podeliti u tri rizične kategorije. Pacijenti sa translokacijom  $t(15;17)(q22;q12-21)$ ,  $t(8;21)(q22;q22)$  ili  $inv(16)(p13q22)$  odnosno  $t(16;16)(p13;q22)$  imaju povoljnu prognozu (Mrozek K, 2004). Pacijenti sa kompleksnim kariotipom i  $inv(3)(q21q26)$ , odnosno  $t(3;3)(q21;q26)$ , spadaju u grupu sa nepovoljnom prognozom. Grupa sa intermedijernim rizikom sastoji se od pacijenata sa normalnim kariotipom i pacijenata koji se odlikuju prisustvom  $t(9;11)(p22;q23)$ ,  $del6q$ ,  $del9q$ ,  $del11q$ , ili  $del20q$ . Ovakva kategorizacija pruža mogućnost predviđanja ishoda i toka bolesti, kao i odabir najadekvatnije terapije i predviđanje odgovora na istu. Međutim, grupa sa intermedijernim rizikom koja je većim delom sastavljena od pacijenata sa normalnim kariotipom (AML-NK) je grupa sa veoma heterogenim ishodom bolesti. U praksi ova grupa predstavlja skup pacijenata koji mogu imati povoljan, intermedijeran ili loš klinički ishod (Grimwade D, 1998). Poslednjih decenija je velika pažnja posvećena izučavanju molekularnih mehanizmima koji leže u osnovi kliničke heterogenosti AML-NK grupe pacijenata. Došlo se do zaključka da je heterogenost u kliničkom smislu samo odraz velike heterogenosti koja je prisutna na molekularno-genetičkom nivou kod ovih pacijenata. Identifikovani su brojni novi molekularni markeri koji doprinose boljem razumevanju etiologije AML-NK, ali omogućavaju i dodatnu stratifikaciju rizika ovih bolesnika

prevazilazeći ograničenja procene rizika na osnovu kariotipa pacijenta. Dodatna stratifikacija mogla bi da spreči previše intenzivnu ili nedovoljno intenzivnu terapiju, putem diskriminacije pacijenata koji bi imali koristi od agresivnijeg protokola, uključujući alogenu transplantaciju matičnih ćelija. Takođe, molekularni markeri mogu da otkriju mehanizme koji leže u osnovi leukemogenze i mogu takođe poslužiti kao potencijalni targeti za nove terapije.

## I – 2.2. Molekularno-genetičke promene u AML-NK

Kao što je već navedeno AML-NK čini više od 50% svih detektovanih adultnih AML slučajeva. Svi su svrstani u intermedijarnu grupu rizika, a njihovo petogodišnje preživljavanje se kreće od samo 20 - 42% (Byrd, 2002). Ova grupa pacijenata se karakteriše izuzetno heterogenim mutacionim profilom i heterogenim profilom genske ekspresije (eng. „gene expression profile“-GEP), koji se može znatno razlikovati između pojedinačnih pacijenata, a razlike se mogu detektovati čak i u okviru istog pacijenta u zavisnosti od posmatrane faze bolesti, odnosno lečenja. Ovo ne čudi, s obzirom na prisustvo višestrukih leukemijskih klonova koji se uporedo razvijaju, nestaju i evoluiraju u toku nastanka bolesti i njenog lečenja. Sve ovo veoma otežava izučavanje molekularno-genetičke osnove AML-NK, ali i komplikuje odabir efikasne terapije.

Proteklih decenija mnogo napora je uloženo u pronalazak novih molekularno-genetičkih markera koje će omogućiti dodatnu subklasifikaciju AML-NK pacijenata. Neki od ovih markera kao što su mutacije u *FLT3*, *NPM1* i *CEBPA* (eng. “CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha”) genu, već su uključeni u novu klasifikaciju Svetske zdravstvene organizacije (eng. „World Health Organisation – WHO“) i uvršćeni su u kliničku praksu (Arber DA, 2016). Geni kao što su *IDH1* (eng. „Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 1, Cytosolic“) i *IDH2* (eng. „Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 2, Mitochondrial“) i detekcija mutacija u njima, se nalaze na „spisku“ onih čija se analiza preporučuje, ali se još uvek nije došlo do konačnih zaključaka o njihovoj ulozi kao markera značajnih za prognozu. Ovakve preporuke definišu veliki istraživački konzorcijumi kao što je „European LeukemiaNet – ELN“, i

njihovom širokom primenom dobijaju se kompletniji podaci o validaciji potencijalnih prognostičkih markera (Döhner H, 2016). Grupa eksperata okupljenih oko ELN organizacije, takođe je preporučila izučavanje ekspresionog profila pojedinih gena kod obolelih od AML-NK. Geni kao što su *WT1* („Wilms Tumor 1“), *BAALC* („Brain and Acute Leukemia, Cytoplasmic“), *MNI* („Meningioma (disrupted in balanced translocation) 1“) i *EVII* („Ecotopic viral integration site-1“) su prepoznati kao važni za procese proliferacije, preživljavanja i diferencijacije, a takođe za njih je u mnogim istraživanjima pokazano da imaju prediktivni značaj za ishod AML-NK pacijenata (Cilloni D, 2009; Rockova V, 2011). Praćenje ekspresije ovih gena još uvek nije usvojeno kao deo rutinske molekularne dijagnostike u kliničkim protokolima.

Dalja analiza brojnih molekularno-genetičkih faktora prisutih kod AML-NK pacijenata, njihova detaljnija karakterizacija, kao i pronalazak novih kandidata, pomoći će u daljem razumevanju leukemijskog procesa, u substratifikaciji pacijenata u preciznije grupe rizika kao i u uspostavljanju ciljane, personalizovane terapijske strategije.

### **I - 3. Mutacioni profil adultne i dečje AML**

Akutna mijeloidna leukemija je maligno oboljenje čija se pojava vezuje prvenstveno za srednje i starije starosno doba (Pollyea DA, 2011). Kod dece, AML je zastupljena sa 15 - 20%, a učestalost se povećava sa starošću i dostiže 80% svih detektovanih slučajeva akutnih leukemija kod odraslih (Weinstein HJ, 1999). Razlike između ove dve starosne grupe postoje i u zastupljenosti citogenetičkih aberacija i molekularnih karakteristika.

Učestalost abnormalnog kariotipa je generalno niža kod adulta nego kod pedijatrijskih *de novo* AML (55% nasuprot 76%), a incidenca pojave specifičnih rekurentnih aberacija takođe se značajno razlikuje. Dok je zastupljenost t(15;17) i inv(16) slična kod adulta i kod dece, t(8;21) je dva puta češća kod pedijatrijskih AML. S druge strane, neke retke rekurentne aberacije detektuju se samo u dečjoj AML, dok su kod adulta potpuno odsutne [Mrozek K, 2004].

Još veće razlike između dečje (dAML) i adultne (aAML) AML su zapažene na molekularnom nivou. Mutacije u egzonu 12 *NPM1* gena su najčešće mutacije koje se detektuju kod AML, sa učestalošću od 30% kod adultnih AML i sa više od 50% kod AML-NK pacijenata (Falini B, 2009). Kod dečjih AML, *NPM1* mutacije se značajno ređe sreću, sa učestalošću između 0% i 6.5%. Internalna tandemska duplikacija *FLT3* gena (*FLT3/ITD*) prisutna je kod oko 25% adultnih AML, dok je učestalost kod dece znatno niža, sa oko 5-15% (Krstovski N, 2010; Rubnitz JE, 2012). Ovi podaci ukazuju da postoje značajne razlike u molekularnim mehanizmima leukemogeneze kod dece u poređenju sa adultima.

Pojava nove tehnologije sekvenciranja nove generacije (eng. „next generation sequencing“ - NGS) omogućila je sekvenciranje pojedinačnih genoma tumorskih ćelija, otkrivajući veliki broj (1,000 do 100,000) somatski stečenih genetičkih alteracija. Razvoj mnogobrojnih NGS pristupa obezbedio je znatno bolji uvid u poreklo i evoluciju leukemogeneze, uključujući i patogenezu AML.

NGS tehnologija primenjena je u nekoliko istraživanja omogućujući bolje razumevanje mutacionog profila koji leže u osnovi AML patologije. Prvo sekvenciranje AML genoma prijavili su Ley TJ i saradnici 2008. godine, koristeći metodu sekvenciranja celog genoma (eng. „whole genome sequencing“). Nakon toga, objavljene su i druge studije, među kojima je i istraživanje Mardis i saradnika, u kojem su kod AML-NK pacijenata prvi put prijavljene mutacije u *IDH1* genu (Ley TJ, 2010; Mardis ER, 2009; Welch JS, 2011). Dalje analize velikog broja AML-NK pacijenata, koji su podvrgnuti različitim kliničkim protokolima, potvrdili su da se *IDH* mutacije (*IDH1* i *IDH2*) događaju kod otprilike 20% pacijenata, što ih čini jednom od najčešćih molekularnih aberacija kod AML-NK (Marcucci G, 2010). Interesantno je da učestalost ovih mutacija takođe zavisi od starosne dobi pacijenta, pri čemu je najveća zastupljenost kod adultnih AML-NK pacijenata, a najniža kod pedijatrijskih pacijenata, sa učestalošću koja se kreće od 0% do 9.8% (Oki K, 2011 ; Andersson AK, 2011).

Novi podaci o mutacionom profilu obolelih od AML dobijeni primenom moderne NGS tehnologije, samo su doprineli već zapaženim razlikama koje postoje između adultne i dečje AML. Istovremeno, tek je nova NGS metodologija postala „kadra“ da sveobuhvatno sagleda

mutacioni profil ovog veoma kompleksnog i heterogenog oboljenja i da paralelno analizira obe starosne kategorije.

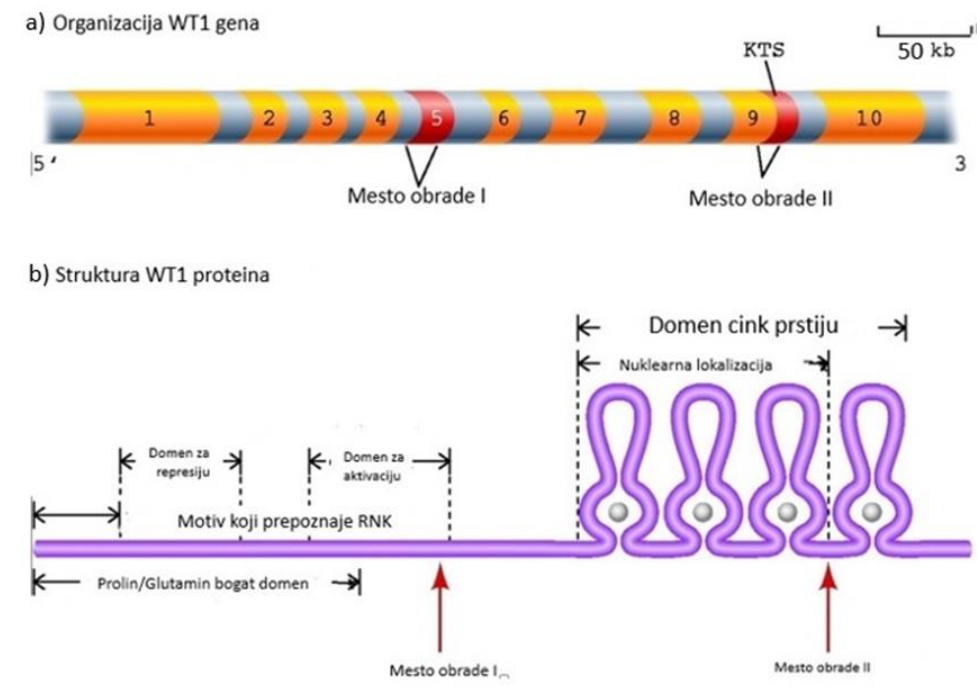
## I - 4. WT1

*WT1* (Wilms tumor 1) gen je prvi put identifikovan kao tumor-supresorski gen uključen u patogenezu Wilmsovog tumora - kancera bubrega (Haber DA, 1990). U humanom genomu je lociran na hromozomu 11p13 i prostire se na 50 Kb genomske DNK (Coppes MJ, 1993). U humanim adultnim tkivima ovaj gen se eksprimira u urogenitalnom sistemu, centralnom nervnom sistemu i tkivima uključenim u hematopoezu, uključujući koštanu srž i limfne čvorove.

*WT1* gen se sastoji od 10 egzona koji se prepisuju u 3 Kb dugačak primarni transkript informacione RNK (Slika 2). Najčešće, alternativna obrada primarnog transkripta (eng. „RNA splicing“) uključuje: 1) iskrajanje egzona 5 (koji kodira 17 amino kiselina); 2) iskrajanje devet nukleotida na 3' kraju egzona 9 (tri amino kiseline – lizin, treonin i serin (KTS)). Alternativna obrada ova dva mesta dovodi do nastanka četiri različite proteinske izoforme, sa prisutnim, odnosno odsutnim egzonom 5 i KTS regionom (Haber DA, 1991).

WT1 protein se sastoji od N-terminalog domena, koga čine sekvence bogate prolinom i glutaminom (Slika 2.), i koji je od krucijalne važnosti za funkciju transkripcione regulacije WT1 proteina, s obzirom da sadrži domene za represiju i aktivaciju transkripcije. C-terminalni domen WT1 proteina sastoji se od četiri Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> cink prstića, koji omogućavaju vezivanje za ciljne DNK sekvence, ali su takođe uključeni i u interakcije sa RNK i proteinima (Menke AL, 1998). Dodatni domeni WT1 proteina esencijalni su za nuklearnu lokalizaciju proteina i za prepoznavanje RNK. Kombinacijom alternativne obrade primarnog transkripta, inicijacijom translacije sa različitim start kodona, i RNK editovanjem nastaje više od 20 različitih *WT1* genskih produkata, koji kodiraju različite proteine sa molekulskom masom od 52 do 65 kDa (Haber DA, 1991).





Slika 2. Šematski prikaz organizacije *WT1* gena i strukture WT1 proteina. a) šematski prikaz *WT1* gena. Brojevima od 1-10 obeleženi su egzoni. b) šematski prikaz WT1 proteina. Modifikovano iz rada Scholz H. iz 2005.godine. (Scholz H, 2005)

Postojanje ovako velikog broja izoformi govori u prilog tome da potencijalno svaka izoforma može imati svoju specifičnu funkciju. Ipak, najviše ispitivana je funkcija WT1 kao transkripcionog faktora.

Kao što se može zaključiti na osnovu prisustva motiva cink prstića na C-terminalnom domenu proteina, WT1 je moćan transkripcioni regulator. Među njegovim ciljnim genima nalaze se geni važni za ćelijski rast i metabolizam, kao što su komponente ćelijskog matriksa, faktori rasta i drugi transkripcioni faktori. WT1 može aktivirati ili izvršiti represiju transkripcije specifičnih ciljnih gena. Da li će se WT1 ponašati kao aktivator ili kao represor može zavisiti od nivoa ekspresije *WT1* gena, tipa WT1 izoforme ili od toga da li se WT1 protein vezuje uzvodno ili nizvodno od mesta početka transkripcije ciljnog gena. Takođe,

interakcija između WT1 i p53 proteina tumor supresora, koji je veoma važan za proces samoobnove i preživljavanja, može da odredi da li će se WT1 ponašati kao represor ili kao aktivator transkripcije (Reddy JC, 1995).

Razlike u transkripcionoj aktivnosti WT1 proteina mogu se objasniti post-translacionim modifikacijama i protein-protein interakcijama. Jedan od proteina za koji je pronađeno da je povezan sa WT1 i da reguliše njegovu aktivnost je tumor supresor p53, koji može da interaguje se prva dva domena cink prstića WT1 proteina. Jedno istraživanje je pokazalo da interakcija p53 i WT1 remeti proapoptotsku aktivnost oba proteina, što nam omogućava da razumemo važnost perzistentne ekspresije wt (eng. „wild type“) p53 i WT1 u AML ćelijama (Boyapati A, 2004). Ovo takođe može objasniti brzu indukciju ćelijske smrti, nakon inhibicije ili p53 ili WT1 u ovim ćelijama.

Takođe, istraživanja su pokazala da je i Par-4 protein (eng. „Prostate apoptosis response factor“), represor WT1 transaktivacione aktivnosti. On interaguje sa WT1 i indukuje ćelijsku smrt. U kontekstu AML, istraživanje Valk PJ i saradnika je pokazalo da je Par-4 visoko eksprimiran u normalnim CD34<sup>+</sup> ćelijama, ali nisko eksprimiran ili potpuno odsutan kod većine AML uzoraka koji imaju visoke nivoe ekspresije *WT1* gena (Valk PJ, 2004). Ovo otkriće može objasniti na koji način AML ćelije održavaju visoke nivoe ekspresije *WT1* gena, a ostaje nepoznato kako *Par-4* gen postaje utišan u tim slučajevima.

*WT1* gen kodira transkripcioni faktor koji je uključen u regulaciju ćeliskog metabolizma i rasta. Takođe, on utiče na proliferaciju i diferencijaciju ćelije, kao i na njeno preživljavanje (Ariyaratana S, 2007). Iako još uvek nema dovoljno informacija o funkciji WT1 proteina, ono što jeste poznato je da on ima sposobnost da se ponaša i kao tumor supresor i kao onkogen (Yang L, 2007).

#### I - 4.1. WT1 u normalnoj hematopoezi i leukemijama

U normalnoj koštanoj srži uvećana *WT1* ekspresija ograničena je na primitivnu CD34<sup>+</sup> progenitorsku populaciju ćelija. Njegova ekspresija je odsutna kod zrelih, diferenciranih ćelija, što ukazuje na to da ovaj gen ima krucijalnu ulogu u hematopoezi (Hosen N, 2002). U humanim hematopoetskim ćelijama *WT1* najverovatnije ima ulogu tumor supresora, s obzirom da prekomerna ekspresija *WT1* gena dovodi do inhibicije proliferacije CD34<sup>+</sup> progenitorskih ćelija (Svedberg H, 2001). Međutim, u protekloj deceniji izučavanje uloge koju *WT1* ima u malignim ćelijama je otkrilo njegovu potencijalnu onkogenu ulogu. Najvažniji dokaz koji ide u prilog ovome je prekomerna ekspresija *WT1* gena u mnogim humanim kancerima, hematološkog i nekog drugog porekla. Konkretno kod leukemija, postoji sve više dokaza koji pokazuju biološki i klinički značaj aberantne ekspresije *WT1* gena.

*WT1* je visoko eksprimiran kod različitih tipova leukemija, pa tako, u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji, nivo *WT1* ekspresije je obično nizak u hroničnoj fazi, ali se često detektuje rast njegove ekspresije kod pacijenata koji ulaze u fazu blastne krize. U akutnim leukemijama, povećan nivo *WT1* može se detektovati kako kod akutnih limfoblastnih, tako i kod mijeloidnih leukemija (Miwa H, 1992). Visok nivo *WT1* ekspresije se takođe može detektovati i u nekim formama mijelodisplastičnih sindroma (MDS), gde se dovodi u vezu sa povećanim procentom blasta i predstavlja prediktor rane progresije u AML (Tamaki H, 1999).

U istraživanjima na ćelijskim linijama poreklom od AML, ukidanje ekspresije *WT1* gena je dovodilo do smanjenja proliferacije i do indukcije apoptoze ovih ćelija (Yamagami T, 1996). Kod AML pacijenata, uvećana ekspresija *WT1* gena je često udružena sa lošom prognozom, a prisustvo povišene *WT1* ekspresije i nakon tretmana standardne hemoterapije ukazuje na nepotpuni odgovor na primenjenu terapiju (Barragan E, 2004).

Pokazano je da uloga *WT1* gena u kontroli normalnog procesa hematopoeze može biti narušena i prisustvom mutacija u ovom genu. Za *WT1* mutacije je ustanovljeno da

predstavljaju deo procesa leukemogeneze, i da se mogu detektovati kod oko 10% AML-NK pacijenata. Ove mutacije pretežno se događaju u egzonomima 7 i 9, i nezavisno predviđaju loš ishod kod AML-NK pacijenata (Virappane P, 2008).

Prekomerna ekspresija *WT1* se može detektovati kod 85% adultnih AML pacijenata, te se stoga smatra da ovaj gen ima veoma važnu ulogu u razvoju AML (Inoue K, 1997; Ostergaard M, 2004). Takođe, postoje dokazi koji ukazuju na to da nivo ekspresije *WT1* može imati prognostičke implikacije kod obolelih od AML. Brojne studije su pokazale da je prekomerna ekspresija *WT1* udružena sa kraćim ukupnim preživljavanjem obolelih i sa ranom pojavom relapsa bolesti (Bergmann L, 1997; Trka J, 2002; Garg M, 2003; Barragan E, 2004; Cilloni D, 2009). Zapažanja da se nivo ekspresije *WT1* gena kod pacijenata u kompletnoj kliničkoj remisiji smanjuje, ponekad i do nivoa koji je niži od onog detektovanog u zdravoj populaciji, uticale su na pojavu studija koje su posvećene ispitivanju *WT1* ekspresije kao potencijalnog markera za određivanje minimalne rezidualne bolesti (MRB). Određivanjem nivoa ekspresije *WT1* na kraju inicijalnog tretmana, može se predvideti postojanje rizika od pojave recidiva, tačnije može ukazati na pojavu ranog relapsa (Weisser M, 2005; Lapillonne H, 2006; Cilloni D, 2008; Gray JX, 2012; Ommen HB, 2008). Međutim, još uvek postoje kontroverze po pitanju značaja koji *WT1* ekspresija može imati kao marker za MRB, i to zbog rezultata studija koji govore o tome da *WT1* ekspresija nema prediktivnu vrednost (Rodrigues PC, 2007; Hamalainen MM, 2008).

## **I – 5. *EVII***

Ecotopic viral integration site-1 (*EVII*) gen prvi put je opisan od strane Morishita K i saradnika u mišjem model sistemu, kao uobičajeno mesto retrovirusne insercije, što uzrokuje prekomernu ekspresiju *EVII* i razvoj leukemije (Morishita K, 1988). Ova prva zapažanja ukazuju na ulogu *EVII* kao onkogen. Nakon toga, humani *EVII* gen je lokalizovan na hromozomu 3q26.2 region, koji je sklon hromozomskim rearanžmana u različitim mijeoidnim malignitetima (Morishita K, 1992). Ovaj gen se prostire na oko 100 kb i sadrži

16 egzona, a njegov primarni transkript je podložan alternativnoj obradi. Pored prethodno navedenog mehanizma do varijabilnosti u nastalim iRNK *EVII* gena može doći i prilikom upotrebe alternativnih mesta početka transkripcije. Većina varijanti iRNK nastalih transkripcijom sa 5' kraja *EVII* gena, translacijom se prevode u isti protein, osim transkript varijante koja se naziva *MDS1/EVII* (Wimmer K, 1998). Ova iRNK, osim *EVII* sekvenci koje počinju od egzona 2, sadrži i sekvence koje su poreklom sa *MDS1* gena, koji se nalazi uzvodno od *EVII* gena. Protein koji nastaje translacijom *MDS1/EVII* transkripta sadrži dodatak od 188 amino kiselina, koje kodiraju takozvani PR domen. U svemu ostalom, *MDS1/EVII* protein je identičan *EVII* proteinu (Fears S, 1996).

*EVII* gen kodira relativno veliki nuklearni protein sa molekulskom masom oko 145 kDa. Sadrži dva domena sa cink prstićima: 1) proksimalni domen sa sedam cink prstića i 2) distalni domen sa tri cink prstića. Između ova dva domena nalazi se domen za represiju, a na C terminusu proteina nalazi se acidični region. (Wieser R, 2007).

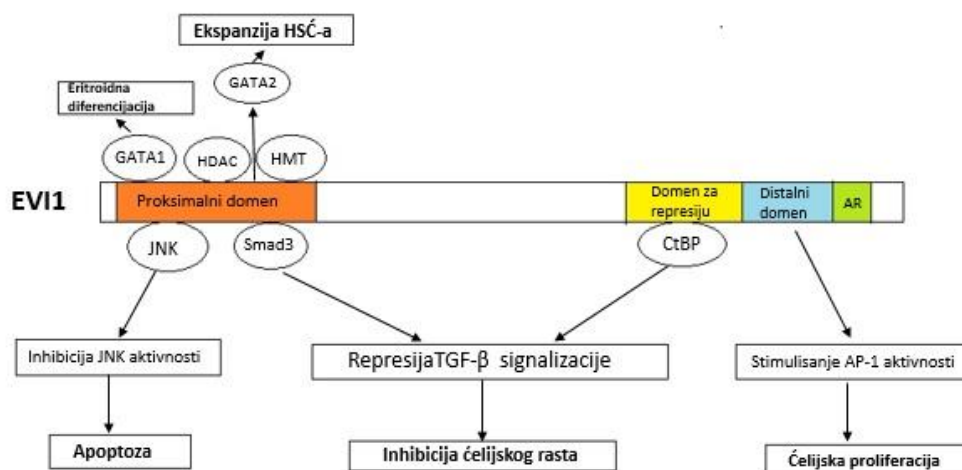
*EVII* protein ima ulogu regulatora transkripcije, kod koga su interakcije sa DNK molekulom regulisane preko dva domena sa cink prstićima (Nucifora G, 2006). Interakcijom sa drugim proteinima *EVII* obavlja višestruke uloge:

- (1) interakcija sa CtBP (C-terminal binding protein) proteinom za posledicu ima dejstvo *EVII* kao represora transkripcije (Nucifora G, 2006);
- (2) interakcija sa transkripcionim faktorima GATA-2, GATA-1 i PU.1 koji su od ključne važnosti za hematopoezu i mijelodnu homeostazu. Preko interakcije sa GATA1, *EVII* uzrokuje inhibiciju eritroidne diferencijacije, vrši pozitivnu regulaciju GATA2 ekspresije i stimuliše ekspanziju HSC. (Yuasa H, 2005; Laricchia-Robbio L, 2006; Laricchia-Robbio L, 2009);
- (3) interakcija sa TGF- $\beta$ , JNK i AP-1 i PI3K signalnim putem. *EVII* inhibira aktivnost JNK kinaze i time sprečava apoptozu. Takođe, indirektno interakcijom sa Smad3 i CtBP proteinom, blokira efekat inhibicije rasta koji ostvaruje TGF- $\beta$  i stimuliše aktivnost AP-1 proteina, što rezultuje povećanom ćelijskom proliferacijom (Liu Y, 2006; Tanaka T, 1994);

- (4) interakcija sa molekulima koji su uključeni u održavanje genomske stabilnosti. Tako npr. preko interakcije sa SOX4 dovodi do stabilizacije tumor supresorskog gena TP53 (Boyd KE, 2006).

Proteini koji interaguju sa EVI1 i njihov efekat na ćelijsku funkciju prikazani su na Slici 3. Skorija istraživanja su pokazala da EVI1 interaguje i sa histon metiltransferazama, kao i sa nekoliko proteina koji vrše remodelovanje hromatina, naglašavajući ulogu EVI1 u epigenetičkoj regulaciji genske ekspresije (Lugthart S, 2011; Senyuk V, 2005).

U svim navedenim molekularnim mehanizmima, EVI1 igra ulogu kako regulatora HSC, tako i ulogu onkogenog proteina.



Slika 3. Biohemijske osobine EVI1 proteina. Modifikovano iz rada Goyama S. iz 2009. godine (Goyama S, 2009)

### I - 5.1. EVI1 u normalnoj hematopoezi

Uloga *EVI1* u normalnoj hematopoezi do danas nije u potpunosti razjašnjena. Ustanovljeno je da se *EVI1* pretežno eksprimira i u embrionskim i u adultnim HSC, da je negativno regulisan tokom diferencijacije, kao i da ima važne uloge u ranoj ekspanziji HSC tokom

embriogeneze miša, kao i u regulaciji proliferacije i održavanju HSC<sup>ć</sup> pula kod adulta (Yuasa H, 2005). Goyama S i saradnici su pokazali da EVI1 ostvaruje svoju ulogu u regulaciji HSC<sup>ć</sup> tako što reguliše njihov proliferativni kapacitet na dozno-zavistan način (Goyama S, 2008).

Steinleitner K i saradnici su pokazali da se *EVII* transkript, kao i njegova alternativno obrađena varijanta *MDS1/EVII*, eksprimiraju u CD34<sup>+</sup> ćelijama, ali ona veoma brzo opada prilikom diferencijacije u granulocitnu, monocitnu, dendritsku, eritroidnu i mega-kariocitnu lozu (Steinleitner K, 2012). Slično se dešava i sa nivoom EVI1 proteina koji se drastično smanjuje tokom procesa mijeloidne diferencijacije. Izazivanje povećane ekspresije *EVII* u CD34<sup>+</sup> ćelijama u *in vitro* uslovima, dovela je do zastoja u rastu, apoptoze i/ili starenja humanih hematopoetskih ćelija.

Veliki broj gena koji su uključeni u samoobnovu HSC<sup>ć</sup>, su identifikovani kao direktni nizvodni targeti za EVI1, a među njima su *GATA2*, *PBX1* i *PTEN* (Yoshimi A, 2011; Shimabe M, 2009; Yuasa H, 2005). *GATA2* je od ključne važnosti za održavanje i proliferaciju HSC<sup>ć</sup>, a EVI1 se direktno vezuje za *GATA2* promotor gde vrši ulogu enhensera (Tsai FY, 1994; Yuasa H, 2005). *PBX1* je transkripcioni faktor koji reguliše samoobnavu HSC<sup>ć</sup>, održavajući njihovu latentnost, a EVI1 direktno pozitivno reguliše njegovu transkripciju, što je važno za leukemijsku transformaciju indukovanu poremećajem ekspresije *EVII* gena (Ficara F, 2008; Shimabe M, 2009). *PTEN* tumor supresor je obično deletiran ili inaktiviran u raznim kancerima, uključujući i mijeloidne malignitete, a EVI1 direktno vrši represiju *PTEN* transkripcije. Naime, postoje podaci da je u humanim leukemijama *PTEN* ekspresija obrnuto povezana sa *EVII* ekspresijom (Yoshimi A, 2011). Rezultati ovih istraživanja ukazali su da je EVI1 glavni transkripcioni faktor u HSC<sup>ć</sup>, i da može funkcionisati kao aktivator, ili kao represor transkripcije njemu podređenih gena.

Ujedno sa njegovom DNK-vezujućom aktivnošću, EVI1 može da regrutuje različite proteine, kao što su ključni hematopoetski transkripcioni faktori i hromatin remodelujući proteini, stvarajući na taj način komplekse za transkripcionu regulaciju. EVI1 fizički interaguje sa RUNX1, svestranim regulatorom uključenim u nastanak HSC<sup>ć</sup> i u proces leukemijske transformacije. U slučaju prekomerne ekspresije EVI1 ova interakcija dovodi do represije

RUNX1-zavisne transaktivacije, a time i do blokade diferencijacije granulocita (Senyuk V, 2007). Takođe, EVI1 se direktno vezuje za PU.1, transkripcioni faktor ključan za limfoidni i mijeloidni razvoj, a deregulisana ekspresija EVI1 remeti mijelopoezu vršeći supresiju PU.1-zavisne aktivacije mijeloidnih gena (Laricchia-Robbio L, 2009). U slučaju prekomerne ekspresije, EVI1 efikasno blokira vezivanje GATA1 (glavnim regulatorom eritropoeze) za DNK, i inhibira pravilnu eritroidnu diferencijaciju (Laricchia-Robbio L, 2006). Ova otkrića ukazuju na ključnu ulogu EVI1 u procesu samoobnove HSĆ, u kome dolazi do kompeticije između različitih kompleksa transkripcionih faktora, čime se i održava balans između procesa samoobnove i diferencijacije.

#### I - 5.2. EVI1 u leukemijama

Pokazano je da je evoluciono konzerviran *EVI1* gen uključen u veliki broj mijeloidnih poremećaja, a danas se sa sigurnošću može reći da je njegova deregulisana ekspresija jedan od dominantnih uzroka pojave agresivnog tipa leukemije (Wieser R, 2007). Prekomerna ekspresija *EVI1* dešava se kod oko 5-10% pacijenata sa *de novo* akutnom mijeloidnom leukemijom (Barjesteh van Waalwijk i van Doorn-Khosrovani S, 2003). Kod AML obolelih koji nose *inv(3)(q21q26.2)* ili *t(3;3)(q21q26.2)* abnormalnosti, aberantna *EVI1* ekspresija uzrokovana je tačkom prekida u okviru, ili blizu *EVI1* lokusa, tj. u regionu 3q26.2. Međutim, mnogo veću grupu AML pacijenata čine oni koji nemaju navedene hromozomske abnormalnosti, a kod kojih se takođe mogu detektovati visoki nivoi *EVI1* ekspresije. Kod obe grupe obolelih, *EVI1* je prediktor lošeg ishoda bolesti i rezistencije na terapiju.

S obzirom da je prekomerna ekspresija *EVI1* u AML povezana sa lošim ishodom kod tih pacijenata, pretpostavlja se da je osnovna uloga EVI1 u leukemogenezi tipična kao i za druge onkoproteine, a to je povećanje preživljavanja i kapaciteta samoobnove leukemijske stem ćelije (LSĆ), što dovodi do progresije leukemije i do rezistencije na terapiju. Brojne su studije koje pokazuju da aberantna ekspresija *EVI1* rezultuje u gubitku kontrole ćelijskog ciklusa i povećanom kapacitetu samoobnove (Laricchia-Robbio L, 2008; Kilbey A, 1999). Kao i u



slučaju drugih onkogeni, za kompletnu ekspresiju leukemijskog fenotipa, pored uvećane ekspresije *EVII* neophodno je prisustvo i dodatnih aberacija. U prilog neophodnosti postojanja nekog sekundarnog „događaja“ za postojanje leukemije, govore i zapažanja da je prekomerna ekspresija *EVII* česta kako kod pacijenata sa mijelodisplastičnim sindromom (MDS), kao oboljenjem koje predstavlja „preteču“ AML, tako i kod pacijenata sa sekundarnom AML (Langabeer SE, 2001). Smatra se da kod navedenih oboljenja uvećana ekspresija *EVII* primarno izaziva mijeloidnu displaziju, a do pojave dodatnih sekundarnih „događaja“ dolazi naknadno u toku evolucije bolesti u potpuno razvijenu AML. Glass C i saradnici su pokazali da se *EVII* direktno vezuje i negativno reguliše *CEBPE* gen (CCAAT/Enhancer Binding Protein Eta) koji predstavlja glavni gen regulacije mijeloidne diferencijacije. *EVII* se vezuje i za neke od *CEBPE* nizvodnih targeta, koji su takođe ključni za terminalnu mijeloidnu diferencijaciju (Glass C, 2013). Ova grupa autora takođe je pokazala da *EVII* učestvuje u regulaciji brojnih gena uključenih u Jak-Stat signalni put i u regulaciji procesa apoptoze. Postoje i dokazi koji ukazuju na pozitivnu asocijaciju između uvećane ekspresije *EVII* i povećanja potencijala za klonsku ekspanziju leukemijskih ćelija (Ott MG, 2006).

Epigenetička modifikacija je još jedan od mehanizama pomoću kojeg *EVII* može doprineti malignoj transformaciji ćelije. Postoje brojni dokazi o *EVII*-indukovanim epigenetičkim promjenama u akutnim leukemijama (Pradhan AK, 2011; Vazquez I, 2011). Ove epigenetičke promene se dešavaju kao rezultat hromatin-modifikujućih sposobnosti *EVII* proteina. *EVII* se može direktno vezivati za hromatin-modifikujuće enzime kao što su histon deacetilaze (HDAC), i izazvati represiju genske transkripcije (Vinatzer U, 2001). *EVII* se takođe direktno vezuje za histon acetil-transferaze (HAT) enzime, kao i za histon metil-transferazne (HMT) enzime. Pretpostavlja se da preko HAT proteina *EVII* ima ulogu u aktivaciji transkripcije, dok interakcijom sa HMT proteinima *EVII* uzrokuje pojavu inaktivne heterohromatinske strukture (Cattaneo F i Nucifora G, 2008). U jednoj studiji na ćelijama poreklom od AML pacijenata pokazana je direktna fizička interakcija između *EVII* i DNK metiltransferaza DNMT3A i DNMT3B, koje posreduju u *de novo* DNK metilaciji (Lugthart S, 2011). Ista studija je pokazala i potpuno različitu šemu hipermetilacije koja je postojala

između AML blastnih ćelija koje su ekspimirale EVI1 sa jedne strane, i normalnih CD34<sup>+</sup> i AML ćelija koje nisu ekspimirale EVI1, sa druge strane.

## I - 6. BAALC

Humani Brain And Acute Leukemia, Cytoplasmic (*BAALC*) gen identifikovan je od strane Tanner SM i saradnika 2001. godine, prilikom potrage za novim molekularnim markerima u AML sa trizomijom 8. *BAALC* gen je lokalizovan na hromozomu 8q22.3. Ovaj gen se sastoji od osam egzona, a u humanom genomu alternativnom obradom nastaje najmanje osam transkripata, koje rezultuju u 5 proteinskih formi (Tanner et al 2001). Svim alternativno obrađenim transkriptima zajedničko je da sadrže prvi egzon. Izoforma koja se sastoji od egzona 1, 6 i 8, i izoforma koja se sastoji od egzona 1 i 8 (*BAALC 1-6-8* i *BAALC 1-8*) ekspimirane su u mozgu, dok su izoforme *BAALC 1-2-6-8*, *BAALC 1-5-6-8* i *BAALC 1-6-8*, ekspimirane u leukemijskim ćelijama (Wang X, 2005).

DNK sekvenca i obrazac ekspresije ovog gena pokazuje da je on visoko konzerviran kod sisara, dok njegovi ortolozi nisu nađeni kod nižih kičmenjaka. Proteinska sekvenca *BAALC* proteina ne pokazuje homologiju ni sa jednim do sada poznatim proteinom ili funkcionalnim domenom (Tanner SM, 2001).

*BAALC* gen se u normalnim fiziološkim uslovima ekspimirira pretežno u tkivima neuroektodermalnog porekla, kao i u hematopoetskom tkivu u nezrelim prekursorskim ćelijama. O ulozi *BAALC* proteina u metaboličkim, strukturnim, i drugim funkcijama ćelije, kao i o učešću u signalnim putevima, ima veoma malo podataka. U primarnoj studiji Tanner SM i saradnika, *BAALC* protein je u *in vitro* transfekovanim ćelijama detektovan u citoplazmi, na periferiji ćelije, sugerišući da ovaj protein ima ulogu u adheziji (Tanner SM, 2001). Sa druge strane, pokazana je i njegova uloga u deregulaciji TP53 signalnog puta, preko koga se reguliše proces apoptoze (Eisfeld AK, 2014). U najnovijoj studiji detektovana je interakcija *BAALC* proteina sa MEKK1 (MEK kinaza-1) i KLF4 (Krupel-like faktor 4) proteinima (Morita K, 2015). Oba proteina imaju veoma važnu ulogu u Ras/Raf/MEK/ERK signalnom

putu, za koji je pokazano da predstavlja glavni kaskadni put u etiologiji AML (Karandikar M, 2000; Kim MO, 2012).

Kako je prekomerna ekspresija BAALC karakteristična za obolele od različitih vrsta leukemija, ali se takođe može detektovati i kod melanoma, karcinoma mozga, i dečjih gastrointestinalnih stromalnih tumora, možemo zaključiti da ovaj protein ima važnu ulogu u procesu kancerogeneze. (Schrama D, 2008; Tanner SM, 2001; Agaram NP, 2008)

### I – 6.1. BAALC u normalnoj hematopoezi i leukemijama

U zdravim hematopoetskim ćelijama, BAALC ekspresija je ograničena na progenitorske ćelije i ne detektuje se u zrelim ćelijama koštane srži, niti u kompletno diferenciranim cirkulišućim ćelijama periferne krvi. BAALC ekspresija je ograničena na CD34<sup>+</sup> hematopoetske progenitorske ćelije i predstavlja njihov pouzdani marker (Baldus CD, 2003a). Tačnije, pokazano je da se BAALC ekspresira ne samo kod neopredeljenih pluripotentnih ćelija (CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>), već i kod onih progenitora koji su već opredeljeni za pojedine krvne loze: BAALC se detektuje u B (CD34<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>/CD10<sup>+</sup> pro-B ćelija) i T (CD34<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup>) progenitorima, u mijeloidnim (CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>) i eritroidnim (CD34<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>) progenitorima (Xiao M, 2000; Ryan DH, 1997; Lessard J, 1998). Nasuprot tome, ni u jednom podsetu CD34<sup>-</sup> ćelija koštane srži nije detektovana BAALC ekspresija. Takođe, imunohistohemijske analize su potvrdile da je BAALC protein prisutan u morfološki nezrelim CD34<sup>+</sup> ćelijama, sa granularnom, citoplazmatskom lokalizacijom proteina, dok je u CD34<sup>-</sup> ćelijama odsutan. U odgovoru na primenu citokina specifičnih za određene krvne loze, dolazi do stimulacije diferencijacije, i BAALC biva negativno regulisan.

Kod leukemija, visok nivo BAALC ekspresije detektuje se u blastnim ćelijama pacijenata obolelih od AML i ALL, kod CML pacijenata koji se nalaze u blastnoj krizi, dok se ekspresija ovog gena ne detektuje kod CML pacijenata u hroničnoj fazi bolesti, niti kod pacijenata sa CLL-om (Tanner SM, 2001). To što visoka BAALC ekspresija preovlađuje u akutnim leukemijama, a odsustvuje u hroničnim leukemijama, kao i ograničenost BAALC ekspresije

na CD34<sup>+</sup> hematopoetske progenitorske ćelije, tj. njen gubitak tokom procesa diferencijacije, ukazuje na to da je *BAALC* ekspresija predstavlja marker hematopoetskih progenitorskih ćelija (Baldus CD, 2003a).

U studijama posvećenim izučavanju AML, prekomerna ekspresija *BAALC* gena je prvo zapažena i prepoznata kao negativan prognostički faktor ove bolesti, a tek kasnije su sledile studije posvećene izučavanju uloge ovog gena, tj. proteina u procesu leukemogeneze (Langer C, 2008b; Baldus CD, 2003b; Damiani D, 2013).

Do danas je između ostalog pokazano da je *BAALC* neophodan za održavanje proliferativnog kapaciteta i inhibiciju procesa diferencijacije leukemijskih ćelija (Tanner SM, 2001; Xo B, 2012). Međutim, *BAALC* ne obavlja ove uloge sam, već u kooperaciji sa drugim prisutnim aberacijama. Pa je tako pokazano da konstitutivna aktivacija *BAALC* nije imala uticaja na proliferaciju i preživljavanje matične, odnosno progenitorske hematopoetske ćelije, već je pokazano da utiče na blokiranje mijeloidne diferencijacije, ali kroz udruženo delovanje sa *HOXA9* onkogenom „zaduženim“ za procese samoobnove (Heuser M, 2012). To znači da je *BAALC* krucijalan za leukemijsku transformaciju, ali da su dodatne mutacije neophodne za nastanak kompletno razvijenog leukemijskog fenotipa. Ovome u prilog govori i nalaz Eisfeld AK i saradnika o postojanju polimorfizma rs62527607, koji utiče na uvećanu ekspresiju *BAALC*, ali ne predstavlja predispoziciju za pojavu leukemije kod osoba koji su njegovi nosioci (Eisfeld AK, 2012). Mehanizam kojim dolazi do nastajanja prekomerne *BAALC* ekspresije povezan je sa prisustvom rs62527607[T] alela umesto rs62527607[G] alela u regionu promotora ovog gena, što dovodi do stvaranja vezivnog mesta za aktivirajući *RUNX1* transkripcioni faktor. Ovo zatim dovodi do konstitutivne ekspresije *BAALC* gena. Autori smatraju da ovaj mehanizam nije jedini uzrok povećane ekspresije *BAALC* gena u leukemiji, već predstavlja faktor koji doprinosi aktivaciji ovog onkogen. Isti autori su u narednoj studiji pokazali da uvećana ekspresija *BAALC* gena može biti praćena uvećanom ekspresijom miR-3151 mikro RNK, koja je kodirana sekvencom koja se nalazi u prvom intronu *BAALC* gena (Eisfeld AK, 2014). I u ovoj studiji uvećana ekspresija *BAALC* gena sama po sebi nije imala sposobnost leukemijske transformacije, ali je zato udružena sa uvećanom ekspresijom miR-3151 dovodila do ubrzane ćelijske proliferacije AML ćelijskih

linija *in vitro* i leukemogeneze *in vivo* kod miša, ukazujući da je miR-3151 ključan onkogeni produkt. U osnovi leukemijskog efekta koji ostvaruje miR-3151 nalazi se regulacija *TP53* gena. *TP53* je identifikovan kao direktan nizvodni target za miR-3151, što dovodi do deregulacije *TP53* apoptotske kaskade i do inhibicije apoptoze (Eisfeld AK, 2014).

Najnovija istraživanja ukazuju na direktnu povezanost BAALC sa ključnim signalnim putevima ćelije. Pokazano je da BAALC uvećava proliferativni kapacitet, propagira ćelijski ciklus i inhibira diferencijaciju u leukemijskim ćelijama, i to tako što prolongira stimulaciju ERK (eng. “extracellular signal-regulated kinase“) kaskade (Morita K, 2015). BAALC dovodi do uvećane proliferacije AML ćelija tako što izaziva kontinuiranu aktivaciju ERK signalnog puta. Ovaj efekat BAALC ostvaruje tako što ometa interakciju MEKK1 (ERK-specifične fosfataze) sa ERK-om. Sa druge strane, BAALC inhibira monocitnu diferencijaciju (proces pod kontrolom ERK signalnog puta). BAALC ovaj efekat ostvaruje interakcijom sa KLF4 izazivajući njegovo izmeštanje iz nukleusa u citoplazmu. Na osnovu svih navedenih nalaza autori predlažu da se kod pacijenata sa visokom ekspresijom BAALC primenjuje specifična terapija usmerena ka inhibiciji ERK signalnog puta, uz istovremenu indukciju KLF4 (Morita K, 2015).

## I – 7. MN1

Meningioma 1 (*MNI*) gen je lociran na hromozomu 22q11.2. Prvi put je izolovan i kloniran 1995. godine kod pacijenta obolelog od meningioma, kod koga je detektovana translokacija  $t(4;22)(p16;q11)$ , koja dovodi do prekida u prvom egzonu *MNI* gena (Lekanne Deprez RH, 1995). U isto vreme je pokazano prisustvo translokacije  $t(12;22)(p13;q11)$  kod pacijenata sa mijeloidnom leukemijom, odnosno mijelodisplastičnim sindromom, kod kojih je *TEL* (transkripcioni faktor *ETS* gena) fuzionisan sa *MNI* genom (Buijs A, 1995).

*MNI* gen se sastoji od dva velika egzona od 4.7 kb (5' kraj) i 2.8 kb (3' kraj).

Analizom različitih tkiva detektovane su dve varijante transkripta. Duži transkript (8 kb) je detektovan u nekoliko tkiva, uključujući mozak, srce, skeletne mišiće i jetru, a kraći transkript, koji nastaje alternativnom obradom, detektuje se u skeletnom mišiću. (Lekanne Deprez RH, 1995). Ekspresija *MNI* takođe je detektovana u hematopoetskom sistemu (Carella S, 2007).

*MNI* gen kodira protein od 1319 amino kiselina. Protein je visoko konzerviran kod kičmenjaka, ali pokazuje veoma malo homologije sa drugim poznaim proteinima. Jasno se mogu prepoznati dva niza prolin-glutamin amino kiselina, kao i jedan niz od 28 glutamina, što ukazuje na ulogu MN1 u regulaciji transkripcije (Grosveld GC, 2007; Lai CK, 2014). Analize su pokazale da je ta njegova aktivnost locirana u N-terminlnom regionu MN1 proteina (van Wely KH, 2003).

MN1 funkcioniše kao transkripcioni koaktivator i ne vezuje se direktno za DNK, već svoju ulogu regulatora transkripcije obavlja preko drugih transkripcionih faktora, delujući na njih direktno ili indirektno.

MN1 funkcioniše kao kofaktor nuklearnog dimer receptora retinoične kiseline, RAR/RXR (eng. „retinoic acid receptor / retinoic X receptor“). Retinoična kiselina je regulator diferencijacije tokom nekoliko faza embriogeneze i hematopoeze i smatra se da MN1, kao

kofaktor, moduliše puteve retinoične kiseline. Interakcija sa RAR/RXR se odvija preko p300/CBP i RAC3 koaktivatora nuklearnih receptora. Krajnji rezultat ove interakcije je inhibicija diferencijacije ćelija mijeloidne loze (van Wely KH, 2003).

MN1 takođe funkcioniše kao kofaktor receptora za vitamin D (VDR) za koji je već poznato da ima ulogu u monocitno/makrofagnoj diferencijaciji (Sutton AL, 2005). VDR nuklearni receptor, isto kao i RAR protein, formira dimer sa RXR receptorom i ostvaruje dualnu funkciju. MN1, interakcijom sa VDR, može vršiti aktivaciju ili represiju transkripcije. MN1 svoj uticaj na proces proliferacije ćelije ostvaruje uglavnom preko p300/CBP koaktivatora, kao što je to slučaj i sa drugim transkripcionim faktorima koji regulišu ćelijski ciklus i proliferaciju u mijeloidnim ćelijama (npr. AML1, GATA1, GATA2, CEBPA i PU.1) (Blobel GA, 2000).

MN1 ostvaruje svoju ulogu u ćeliji, ne samo interakcijom sa transkripcionim faktorima koji predstavljaju nuklearne receptore, već on interaguje i sa transkripcionim faktorima koji prepoznaju CACCC-bogate DNK sekvence koji nije ograničen na nuklearne receptore, pri čemu dolazi do uvećanja transkripcije ciljanih gena (Meester-Smoor MA, 2008).

#### I - 7.1. MN1 u normalnoj hematopoezi i leukemijama

Analize su pokazale da se *MNI* eksprimira u HMC<sup>+</sup>, s tim što je ta ekspresija na višem nivou u ćelijama koje se sporije dele i u primitivnim ćelijskim populacijama koje se karakterišu asimetričnom deobom i samoobnavljanjem (Wagner W, 2004). U prilog ovome doprinose i nalazi da je najviši nivo *MNI* ekspresije detektovan u CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> ćelijama, koje predstavljaju pul ćelija sa dugoživećim HMC<sup>+</sup>. *In vitro* diferencijacija ranih hematopoetskih ćelija, pokazuje da je *MNI* negativno regulisan u toku napredovanja diferencijacionog procesa, pa se na osnovu toga smatra da svoju najvažniju funkciju *MNI* obavlja u najranijim, još neopredeljenim progenitorima (Heuser M, 2006).

Carella C i saradnici su ispitivali nivo ekspresije *MNI* gena u progenitorskim ćelijama sortiranih iz koštane srž miša. Analizirali su pet različitih ćelijskih frakcija: HMC<sup>+</sup>, zajednički

mijeloidni progenitor (ZMP), zajednički limfoidni progenitor (ZLP), granulocitno/monocitni progenitor (GMP) i megakariocitno/eritroidni progenitor (MEP). Zajednički mijeloidni progenitor ima potencijal diferencijacije u pravcu mijeloidne i eritroidne ćelijske linije, granulocitno/monocitni progenitor u pravcu mijeloidne ćelijske linije, a megakariocitno/eritroidni progenitor u pravcu eritroidne ćelijske linije. *MNI* ekspresija je detektovana u frakciji hematopoetskih matičnih ćelija, i u frakciji granulocitno/monocitnog progenitora (GMP), gde je detektovan najviši nivo. Ekspresija *MNI* nije detektovana u frakcijama zajedničkog limfoidnog progenitora (ZLP), zajedničkog mijeloidnog progenitora (ZMP) i megakariocitno/eritroidnog progenitora (MEP)(Carella C, 2007). Dakle, *MNI* ekspresija prisutna je u progenitorima mijeloidnog porekla i u matičnim ćelijama, ukazujući na značaj *MNI* za održavanje nediferenciranog stanja i samoobnavu ćelija.

U leukemijama ispitivanje uloge *MNI* je započelo kod AML i MDS pacijenata koji nose t(12;22) translokaciju (Heuser M, 2006). Kao posledica ove translokacije dolazi do fuzije *MNI* sa *TEL* genom, a za rezultujući *MNI/TEL* fuzioni protein je pokazano da svoj onkogeni potencijal ostvaruje u kooperaciji sa *HOXA9*, i brzo indukuje mijeloidnu leukemiju (Kawagoe H, 2005). Na koji način ovaj fuzioni protein doprinosi procesu leukemogeneze rasvetljen je u studiji Meester-Smoor MA i saradnika, u kojoj je pokazano da *MNI*, kao i *MNI/TEL*, direktno ili indirektno regulišu ekspresiju mnogih gena koji su uljučeni u leukemogenezu (Meester-Smoor MA, 2008). Nalaz da oba navedena proteina (*MNI* wt i onko-protein) imaju sposobnost da stimulišu/inhibiraju efekte na gensku ekspresiju koje ostvaruje primena all-trans retinoidna kiseline (ATRA), može biti iskorišćena u terapiji obolelih od AML. U određenim slučajevima, AML pacijentima se uz standardnu konvencionalnu hemoterapiju dodaje ATRA, iz razloga što je pokazano da ATRA stimuliše diferencijaciju hematopoetskih ćelija, te veliki broj pacijenata ima beneficije od ovog tretmana. Molekularne analize su otkrile da je *MNI* gen kofaktor diferencijacije koje indukuje ATRA, te stoga nivo *MNI* ekspresije može biti povezan sa ishodom ATRA tretmana. Kod AML pacijenata rezistencija na ATRA tretman je udružena sa visokom *MNI* ekspresijom detektovanom na početku bolesti. Zbog toga su samo pacijenti sa niskom *MNI* ekspresijom imali koristi od dodatne ATRA terapije (Heuser M, 2007).



*MNI* doprinosi leukemijskoj transformaciji ne samo preko aberantnih funkcija njegovih fuzionih onkogenata, kao npr. navedeni *MNI/TEL*, već i putem sopstvene prekomerne ekspresije. Uvećana ekspresija *MNI* je detektovana kod obolelih od AML, MDS, ali takođe i kod B-ALL (Liu T, 2010; Numata M, 2015). Pitanje, da li je prekomerna ekspresija *MNI* u leukemijskim ćelijama osobina „preuzeta“ od ranih progenitora hematopoeze, ili se javlja *de novo* u kasnijim stadijumima leukemijske transformacije, još uvek nije u potpunosti razjašnjeno.

Analize humanih CD34<sup>+</sup> hematopoetskih ćelija, koje vode poreklo iz krvi pupčane vrpce, pokazale su višu *MNI* ekspresiju u CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> frakciji, nego u opredeljenim CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> ćelijama. U poređenju sa CD34<sup>+</sup> ćelijama, *MNI* ekspresija je negativno regulisana prilikom monocitne/granulocitne diferencijacije, odnosno prekomerna ekspresija *MNI* gena inhibira diferencijaciju u pravcu monocita, a sa druge strane uvećava njihov proliferativni kapacitet (Kandilci A i Grosveld GC, 2009). Takođe, analiza ekspresije *MNI* u određenim podsetovima transfekovanih humanih AML ćelija pokazala je visoku ekspresiju u zajedničkim mijeloidnim progenitorima (ZMP), dok je smanjena ekspresija *MNI* bila obeležje granulocitno-makrofagnih progenitorima (GMP). Retrovirusna transfekcija zajedničkog mijeloidnog progenitora samo jednom ćelijom sa visokim nivoom ekspresije *MNI*, zaustavila je ćelije na ovom stadijumu (Heuser M, 2011). Ovi podaci ukazuju da je *MNI* negativno regulisan prilikom prelaska ćelija iz stadijuma zajedničkog mijeloidnog progenitora u stadijum granulocitno/makrofagnog progenitora u normalnoj hematopoezi. Efekat zaustavljanja procesa diferencijacije, *MNI* ostvaruje preko *CEBPA* transkripcionog faktora. Povećana ekspresija *MNI* gena u humanim CD34<sup>+</sup> ćelijama negativno utiče na ekspresiju *CEBPA* gena, što povećava samoobnavu, proliferaciju i preživljavanje ovih ćelija. Takođe, ubrzava se prelazak iz jedne faze ćelijskog ciklusa u drugu u odgovoru na hematopoetske faktore rasta *in vitro* (Rosenbauer F, 2007). Ponovnim uvođenjem konstitutivne ekspresije *CEBPA* u ovim ćelijama, poništeni su efekti *MNI* gena, što ukazuje na to da represija *CEBPA* gena doprinosi *MNI*-indukovanom hematopoetskom fenotipu (Kandilci A and Grosveld GC, 2009).

Kod obolelih od AML, visok nivo ekspresije *MNI* je veoma često udružen sa drugim onkogenima, sa kojima udruženo deluje na indukciju leukemije, dovodeći do ekspanzije populacije leukemija-inicirajućih ćelija. Pokazana je funkcionalna kolaboracija između *MNI* i *NUP98/HOXD13*, *AML1*, *CBFB/MYH11*, *HOXA9* i *MLL/ENL* (Slape C, 2007; Watanabe-Okochi N, 2008; Carella C, 2007; Heuser M, 2009; Liu T, 2010). Takođe je pokazano da visok nivo ekspresije *MNI* može biti povezan sa smanjenom ekspresijom specifične miRNK, što je uočeno kod obolelih od AML-NK (Langer C, 2008a). Target za delovanje ove miRNK predstavlja *BCL2* gen. U slučaju visokog nivoa *MNI* ekspresije, očekuje se indirektna pozitivna regulacija *BCL2*. Za *BCL2* je pokazano da ima anti-apoptotske funkcije i da je često prekomerno eksprimiran u leukemijama (Zinkel S, 2006). Indirektna pozitivna regulacija *BCL2*, u vidu negativne regulacije pomoću miR-16, mogla bi biti jedan od puteva leukemogeneze uključenih u leukemije koje prekomerno eksprimiraju *MNI*. Ovom ide u prilog zapažanje da je miR-16 ekspresija pozitivno regulisana u odgovoru na ATRA indukovanu diferencijaciju u humanoju akutnoj promijelocitnoj leukemiji (Grazon R, 2007).

Kod obolelih od AML posebna pažnja je posvećena izučavanju značaja visine *MNI* ekspresije kao prediktivnog i prognostičkog faktora. Najizraženija prekomerna ekspresija *MNI* detektuje se kod AML pacijenata koji imaju inv(16), a studije su pokazale da je *CBFB/MYH11* fuzioni protein koji nastaje kao posledica ove inverzije, veoma važan, ali ne i dovoljan za malignu transformaciju. Zato se smatra da je kod ovih leukemija uvećanje ekspresije *MNI* tzv. „second hit“ u procesu leukemogeneze (Carella C, 2007). Ukoliko posmatramo sve tipove AML, visoka ekspresija *MNI* značajno je češća u M2, M4, i M5 FAB podtipovima AML, a mnogo manje zastupljena u M0, M1, i M6 podtipovima (Heuser M, 2006).

Prognostički značaj *MNI* ekspresije je najviše izučavan kod AML-NK podgrupe pacijenata, koja čini oko 50% svih adultnih pacijenata (Heuser M, 2006; Langer C, 2008a; Aref S, 2013). Kod ove grupe pacijenata je pokazana jasna asocijacija uvećane *MNI* ekspresije sa uvećanom ekspresijom *EVII* i *BAALC* gena za koje je pokazano da predstavljaju loš prognostički marker bolesti (Carella C, 2007; Langer C, 2008b). Stoga ne čudi nalaz brojnih studija da uvećana ekspresija *MNI* povezana sa rezistencijom na terapiju, kraćim trajanjem kompletne remisije

i kraćim ukupnim preživljavanjem. Ovome u prilog govore i nalazi da su *NPM1* mutacije (povoljan prognostički marker) povezane sa nižim nivoom ekspresije *MNI*, a da je sa druge strane *FLT3/ITD*<sup>+</sup> mutacioni status (izdrazito nepovoljan prognostički marker) asociran sa visokim nivoom *MNI* ekspresije. Ova zapažanja ukazuju na veliki prognostički značaj prekomerne ekspresije *MNI* gena (Rosenbauer F, 2007; Verhaak RG, 2005)

## **II - CILJ ISTRAŽIVANJA**

Akutna mieloidna leukemija (AML) je klonalni hematopoetski poremećaj koji se karakteriše prisustvom blokade diferencijacije i akumulacije leukemijskih ćelija u perifernoj krvi i koštanoj srži. Ovo je najčešći tip akutne leukemije kod odraslih, a drugi najčešći kod dece. Glavna karakteristika AML je njena ogromna klinička i genetička heterogenost.

U lečenju AML današnja medicina se uglavnom oslanja na primenu pravilne stratifikacije pacijenata u rizične grupe, pri čemu se za svaku grupu rizika uspostavljaju protokoli lečenja. Svi pacijenti koji pripadaju jednoj rizičnoj grupi tretiraju se na jedinstven način koristeći isti protokol. Kao rezultat ovakvog terapijskog pristupa ukupno petogodišnje preživljavanje kod adultnih pacijenata iznosi samo 30%, dok je ono kod dece nešto veće i iznosi 60%.

Već nekoliko decenija unazad, analiza kariotipa netretiranih pacijenata predstavlja glavnu karakteristiku leukemijske ćelije koja se koristi za stratifikaciju rizika obolelih od AML. Ipak, bez obzira na citogenetički nalaz, početni, tretman je u velikoj meri nepromenjen, dok je samo post-remisioni tretman podložan modifikaciji. Klonalne hromozomske aberacije mogu se naći u oko 55% AML pacijenata i, na osnovu toga, pacijenti su podeljeni u povoljnu, intermedijarnu i nepovoljnu rizičnu grupu. Nedostatak ovog pristupa klasifikaciji rizika je u tome da skoro polovina pacijenata nema nikakvih detektabilnih citogenetičkih promena. Ova grupa pacijenata se naziva AML sa normalnim kariotipom (AML-NK) i kategorizuje se u intermedijarnu rizičnu grupu. Nedavno su u ovoj specifičnoj grupi otkrivene brojne nove genetičke aberacije i promene u ekspresiji pojedinih gena.

Današnja istraživanja patogeneze AML su usmerena ka otkrivanju novih molekularno-genetičkih markera ovog oboljenja, kao i ka njihovoj implementaciji u procesu uspostavljanja dijagnoze, izbora terapije i praćenja toka lečenja (minimalna rezidualna bolest).

Uzimajući u obzir gore navedene aspekte savremenih istraživanja AML, formulisani su sledeći ciljevi ove studije:

1. Analiza mutacionog profila dečje i adultne AML primenom savremene tehnologije ciljanog sekvenciranja nove generacije (eng. „targeted next generation sequencing“ - NGS). Analizom će biti obuhvaćeno 20 adultnih i 20 dečjih neselektovanih AML uzoraka. Koristiće se platforma koja omogućava detekciju somatskih mutacija u „hot spot“ regionima 48 gena koji su uključeni u kancerogenezu (TruSeq Amplicon Cancer Panel, Illumina). Na ovaj način će biti određen detaljni mutacioni profil obe starosne grupe AML , uz potencijalno otkriće novih molekularnih markera koji učestvuju u patogenezi akutnih mijeloidnih leukemija.
2. Određivanje nivoa ekspresije *WT1*, *EVII*, *BAALC* i *MNI* gena kod *de novo* AML-NK pacijenata, i to u različitim vremenskim tačkama tokom lečenja.
3. Uspostavljanje veze između detektovanog nivoa ekspresije navedenih gena i drugih kliničkih i molekularno-genetičkih karakteristika obolelih, u cilju utvrđivanja značaja koji ovi markeri imaju za prognozu i praćenja odgovora na terapiju (određivanje minimalne rezidualne bolesti).

Rezultati predloženih istraživanja omogućiće jasnije sagledavanje međusobnih interakcija koje genetičke promene ostvaruju u kompleksnom procesu leukemogeneze. Takođe, ova istraživanja će doprineti saznanjima o novim molekularnim markerima značajnim za dijagnostiku, prognozu i predviđanje toka bolesti, odnosno za adekvatan odabir terapije.

## **III - MATERIJAL I METODE**

### **III - 1. Ispitanici**

U ovu studiju uključeni su pacijenti oboleli od AML, dijagnostikovani na Institutu za hematologiju, Kliničkog Centra Srbije, odnosno u Univerzitetnoj dečjoj klinici u Beogradu. Dijagnoza je postavljena na osnovu standardnih citomorfoloških, citohemijskih, citogenetičkih i imunofenotipskih kriterijuma. Sveži uzorci periferne krvi odnosno aspirata koštane srži su uzeti na 3,8% Na-citratu kao antikoagulansu u odnosu 9:1.

U trenutku postavljanja dijagnoze evidentirane su brojne kliničke i hematološke karakteristike od kojih mnoge imaju nepovoljan uticaj na prognozu bolesti kao npr; starost (pacijenti starosti preko 60 godina su u većem riziku), prisustvo organomegalije, naročito hepatomegalije i splenomegalije, povišeni serumski LDH (laktat dehidrogenaza), povećan početni broj leukocita, veći procenat blasta u krvi i koštanoj srži.

Pacijenti su klasifikovani u podgrupe prema FAB (eng. „French-American-British“) klasifikaciji. FAB grupa je 1976. godine objavila FAB klasifikaciju leukemija koja je napravljena na osnovu morfoloških i citohemijskih osobina leukemijskih ćelija (Bennet JM, 1976; Bennet JM, 1985). Na osnovu FAB klasifikacije AML je podeljena na 7 podgrupa (Tabela 3).

U slučaju obolelih od AML najjači nezavisni faktor prognoze jeste citogenetički nalaz. Na osnovu njega pacijenti su podeljeni u 3 prognostičke grupe (Grimwade D, 1998);

1. Povoljnu – t(15;17), t(8;21), inv(16)
2. Nepovoljnu – (-5), (-7), del(5q), kompleksan kariotip
3. Intermedijernu – normalan kariotip, +8, +21, del(7q) itd.

Tabela 3. FAB klasifikacija AML

<b>klasifikacija</b>	<b>podtip AML</b>
M0	Akutna mijeloblastna, minimalno diferencirana
M1	Akutna mijeloblastna bez sazrevanja
M2	Akutna mijeloblastna sa sazrevanjem
M3	Akutna promijelocitna, hipergranulirana
M3v	Akutna promijelocitna, mikrogranulirana
M4	Akutna mijelomonocitna leukemija
M4eo	Akutna mijelomonocitna sa eozinofilijom
M5a	Akutna monoblastna, slabo diferencirana
M5b	Akutna monocitna, diferencirana
M6	Akutna eritroleukemija
M7	Akutna megakarioblastna leukemija

### III - 2. Izolacija DNK iz periferne krvi/koštane srži mononuklearnih ćelija

Za izolaciju DNK iz krvi/koštane srži ili mononuklearnih ćelija korišćen je QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany).

#### *Protokol:*

- na dno tube sipati 20 µl proteinaze K (20 mg/ml), dodati 200 µl uzorka, 200 µl pufera AL i promešati vorteksovanjem
- inkubirati u vodenom kupatilu 10 min/56°C
- dodati 200 µl 96-100% etanola i promešati vorteksovanjem
- ovako pripremljen uzorak naneti na QIAamp Mini spin kolonicu i centrifugirati na 8 000 rpm/1 min
- kolonicu isprati sa 500 µl pufera AW1, centrifugirati na 8 000 rpm/1 min
- kolonicu isprati sa 500 µl pufera AW2, centrifugirati na 13 000 rpm/3 min
- na kraju prebaciti kolonicu u čistu tubu, dodati 200 µl pufera AE i centrifugirati na 8 000 rpm/1 min

### III - 3. Izolacija mononuklearnih ćelija iz aspirata koštane srži ili periferne krvi

**Protokol:**

- na dno sterilne epruvete zapremine 10 ml sipati 3 ml Ficoll-Plaque PLUS (GE Healthcare), a zatim na ovaj gradijent naneti 4 ml razblaženog uzorka (1:1, uzorak:fiziološki rastvor)
- centrifugirati na 1 500 g/25 min na sobnoj temperaturi, u kliničkoj centrifugi, bez kočenja
- nakon centrifugiranja, pipetom prebaciti „buffy coat“ interfazu koja je sastavljena od mononuklearnih ćelija u novu sterilnu epruvetu
- isprati dva puta u PBS-u. Nakon svakog ispiranja sledi centrifugiranje na 1 500 g/15 min
- talog resuspendovati u TRIzol<sup>®</sup>-u (Invitrogen) ili u PBS-u

### III - 4. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija

Za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija je korišćen TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen). TRIzol<sup>®</sup> predstavlja monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, a sam proces izolacije predstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK definisan od strane Chomczynski P & Sacchi N (Chomczynski P & Sacchi N, 1987).

**Protokol:**

- u 1 ml TRIzol<sup>®</sup>-a resuspendovano je maksimalno  $1 \times 10^7$  ćelija i lizirano provlačenjem kroz iglu promera 0,7 mm
- liziran uzorak se ostavi da stoji na sobnoj temperaturi 5-10 min
- dodaje se 200  $\mu$ l hloroforma, snažno promućka, a zatim uzorak ostavi da stoji 5-15 min na sobnoj temperaturi
- nakon centrifugiranja na 12 000 rcf/15 min/+4°C pojavljuju se jasno odvojene faze; gornja vodena faza u kojoj se nalazi RNK, interfaza i donja, crvena, organska faza u kojoj se nalaze DNK i proteini



- gornja vodena faza se prebacije u novu tubu i dodaje se 0,5 ml izopropanola. Promešati invertovanjem tube i ostaviti da stoji 10-15 min na sobnoj temperaturi (precipitacija RNK)
- centrifugirati na 12 000rcf/15 min/+4°C, a zatim ukloniti supernatant dekantovanjem i oprati talog sa 1 ml hladnog 70% etanola
- centrifugirati na 12 000rcf/10 min/+4°C, ukloniti pažljivo etanol i talog osušiti na sobnoj temperaturi
- talog RNK rastvoriti u „RNase-free“ vodi, a koncentraciju i čistoću RNK odrediti merenjem  $A_{260}/A_{280}$  na spektrofotometru

### III - 5. Reverzna transkripcija (RT)

Sinteza cDNK je izvršena reakcijom reverzne transkripcije.

#### **Protokol:**

- smešu finalnog volumena 11  $\mu$ l koja sadrži 1  $\mu$ g RNK i 100 pmol „random-hexamer“ prajmera inkubirati 5 min na 70°C, a zatim ohladiti na ledu
- dodati smešu finalnog volumena 9  $\mu$ l koja sadrži 4  $\mu$ l 5x RT-pufera, 2  $\mu$ l dNTP (10 mM) i 40 U M-MuLV reverzne transkriptaze (Fermentas)
- inkubirati 15 min na 25°C, a zatim 1h na 42°C
- reakcija se zaustavlja inkubacijom od 10 min na 70°C

### III - 6. Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)

PCR (eng. „polymerase chain reaction“) je *in vitro* amplifikacija definisane DNK sekvence i predstavlja imitaciju procesa DNK replikacije. Reakcija koristi dva oligonukleotida komplementarna krajevima sekvence koja se umnožava (prajmeri), koji su međusobno suprotno orijentisani i dugački 15-20 nukleotida. Sinteza DNK katalizovana je

termostabilnom DNK polimerazom. Ponavljanje ciklusa, od kojih se svaki sastoji od denaturacije DNK, hibridizacije prajmera (eng. „aniling“) i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane termostabilne DNK polimeraze, za rezultat ima eksponencijalnu amplifikaciju specifičnog DNK fragmenta. Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera, a njihova veličina određena je rastojanjem između sekvenci koje prajmeri prepoznaju. PCR reakciona smeša mora sadržati u sebi komponente potrebne za *in vitro* sintezu DNK: matrica (DNK koja se kopira), prajmeri (oligonukleotidi komplementarni krajevima sekvence koja se kopira), nukleotidi (gradivni elementi DNK), *Taq* polimeraza (termostabilna DNK polimeraza koja katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa matricom), joni magnezijuma i pufer (neophodni za optimalni rad *Taq* polimeraze).

### III - 6.1. Detekcija *FLT3/ITD* mutacije

Reakciona smeša zapremine 30  $\mu$ l, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (0.5 mM finalno),  $MgCl_2$  (2.75 mM finalno), prajmeri 14F i 15R (Tabela 4.) (600 nM finalno) i 2U HotStarTaq<sup>®</sup>DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Tabela 4. Sekvence prajmera za detekciju i sekvenciranje *FLT3/ITD*, *FLT3/D835*, *NPM1*, *IDH1* i *IDH2* mutacija.

<b>Prajmer</b>	<b>sekvenca (5'-3')</b>
<b>14F</b>	GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC
<b>15R</b>	CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC
<b>21F</b>	CCG CCA GGA ACG TGC TTG
<b>21R</b>	GCA GCC TCA CAT TGC CCC
<b>NPM1-F</b>	TTA ACT CTC TGG TGG TAG AAT GAA
<b>NPM1-R</b>	CAA GAC TAT TTG CCA TTC CTA AC
<b>NPM1_1112R</b>	CCT GGA CAA CAT TTA TCA AAC ACG GTA
<b>IDH1-F</b>	AAA CAA ATG TGG AAA TCA CC
<b>IDH1-R</b>	TGC CAA CAT GAC TTA CTT GA
<b>IDH2-F</b>	CAA GCT GAA GAA GAT GTG GAA
<b>IDH2-R</b>	CAG AGA CAA GAG GAT GGC TA

#### Temperaturni profil PCR reakcije

1. 15 min/95<sup>0</sup>C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 35 ciklusa;
  - 1 min/95<sup>0</sup>C – denaturacija
  - 1 min/60<sup>0</sup>C – aniling
  - 2 min/72<sup>0</sup>C – elongacija
3. 10 min/72<sup>0</sup>C – finalna elongacija

Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 4% agaroznom gelu. Očekivana dužina wt PCR produkta je 325 bp. Postojanje *FLT3/ITD* mutacije je praćeno prisustvom dodatnog PCR produkta veće dužine.

### III - 6.2. Detekcija mutacija u *NPM1* genu

Reakciona smeša zapremine 50 µl, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (0,3 mM finalno), MgCl<sub>2</sub> (2,25 mM finalno), prajmeri NPM1-F i NPM1-R (Tabela 4.) (500 nM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

#### Temperaturni profil PCR reakcije

1. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 35 ciklusa;
  - 1 min/95°C – denaturacija
  - 1 min/60°C – aniling
  - 2 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Nakon PCR amplifikacije izvršeno je prečišćavanje na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Nakon toga je izvršena reakcija sekvenciranja upotrebom NPM1\_1112R prajmera (Tabela 4.)

### III - 6.3. Detekcija mutacija u *IDH1* genu

Reakciona smeša zapremine 25 µl, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (0,4 mM finalno), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM finalno), prajmeri IDH1-F i IDH1-R (Tabela 4.) (400 nM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije

1. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 35 ciklusa;
  - 30 sek/94°C – denaturacija
  - 1 min/55°C – aniling
  - 1 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Nakon PCR amplifikacije izvršeno je prečišćavanje na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Nakon toga je izvršena reakcija sekvenciranja upotrebom IDH1F prajmera (Tabela 4.)

III - 6.4. Detekcija mutacija u *IDH2* genu

Reakciona smeša zapremine 25 µl, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (0,4 mM finalno), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM finalno), prajmeri IDH2-F i IDH2-R (Tabela 4.) (400 nM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije

1. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 35 ciklusa;
  - 30 sek/94°C – denaturacija
  - 1 min/61°C – aniling
  - 1min/72°C- elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Nakon PCR amplifikacije izvršeno je prečišćavanje na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Nakon toga je izvršena reakcija sekvenciranja upotrebom IDH2R prajmera (Tabela 4.)

### **III - 7. Analiza DNK na agaroznom gelu**

Analiza DNK je vršena na horizontalnom agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (2 – 4%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. U gelove je pre polimerizacije dodavan etidijum bromid (5µg/ml). Elektroforeza je tekla u 1XTAE puferu (40mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA), pri voltaži od 4-7 V/cm. DNK je vizuelizovana osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 266 nm. Trajni zapis rezultata dobija se fotografisanjem gela CCD kamerom integrisanom u sistem za automatsku digitalnu akviziciju slike, BioDocAnalyze sistemom. Veličina fragmenata DNK određuje se pomoću adekvatnih komercijalnih markera (Fermentas).

### **III - 8. Sanger sekvenciranje PCR produkata**

Sekvenciranje DNK je rađeno BigDye™ Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems) kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Ovaj kit omogućava sekvenciranje u PCR reakciji u kojoj se pored deoksinukleotida koriste i 2',3'-dideoksinukleotidi (Sanger F, 1977). DNK polimeraza kopira jedan lanac DNK matrice ugrađujući nukleotide na 3' kraj prajmera sve dok u rastući lanac ne ugradi neki od dideoksinukleotida. Dideoksinukleotidi nemaju OH-grupu na 3' poziciji, zbog čega nemaju sposobnost vezivanja sledećeg nukleotida, pa njihovom ugradnjom dolazi do terminacije polimerizacije. Reakcije se rade sa samo jednim

prajmerom (asimetrični PCR) tako da se dobija serija fragmenata različitih dužina koji se završavaju dideoksinukleotidom. Svaki od 4 dideoksinukleotida obeležen je različitom fluorescentnom bojom čime je omogućena detekcija fragmenata u sekvenceru. Za razliku od kitova u kojima su dideoksinukleotidi obeleženi jednom istom fluorescentnom bojom, ovaj kit omogućava da se sekvenciranje jednog uzorka radi u jednoj PCR reakciji umesto u četiri odvojene.

Smeša za sekvenciranje finalne zapremine 8  $\mu$ l sadrži sledeće komponente:

- 3-20 ng prečišćenog PCR produkta (za dužine 200-1000 bp)
- 3,2 pmol prajmera za sekvenciranje
- 3  $\mu$ l Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)

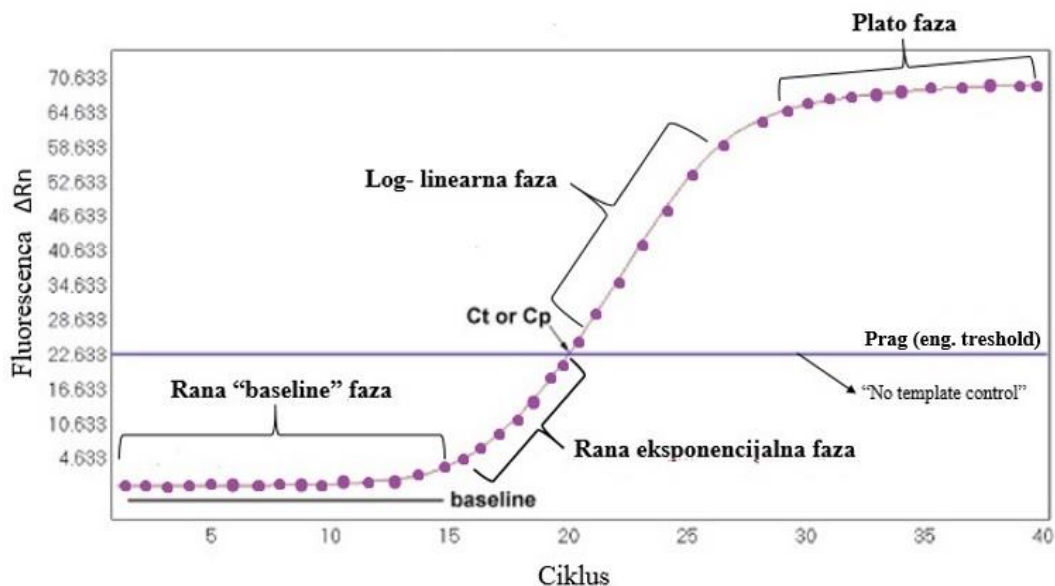
Temperaturni profili PCR reakcije za sekvenciranje:

1. 1 min/ 96°C
2. 25 ciklusa;
  - 10 sec/96°C
  - 5 sec/50°C
  - 4 min/60°C
3. 4°C/  $\infty$

Posle završene reakcije sekvenciranja uzorci su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom. U uzorke se doda 40  $\mu$ l Na-acetata, promućka se i centrifugira 20 min na 13000 rpm, posle čega se supernatant uklanja. Talogu se doda 200  $\mu$ l 70% etanola i centrifugira 10 min na 13000 rpm, posle čega se supernatant uklanja. Ovaj korak se ponavlja još jednom. Nakon drugog ispiranja etanolom talog je neophodno u potpunosti osušiti. Osušeni talog se rastvara u 25  $\mu$ l HiDi i celokupna količina se nanosi na plejt za sekvenciranje.

### III - 9. Praćenje ekspresije gena pomoću „real-time“ PCR (q-PCR) metode

„Real-time“-PCR ili kvantitativni PCR (q-PCR) jeste metod koji omogućava tačnu kvantifikaciju količine PCR produkta u toku svakog PCR ciklusa, tj. u realnom vremenu („real-time“). U qPCR meri se fluorescentni signal koji se emituje u toku PCR reakcije koji je direktno proporcionalan količini PCR produkta u datom ciklusu. Za razliku od „klasičnog“ PCR gde se količina produkta može meriti samo na kraju PCR reakcije, ovde se kvantifikacija odvija u toku eksponencijalne faze reakcije, u toku koje dolazi do udvostručavanja PCR produkta prilikom svakog PCR ciklusa (Slika 4.).

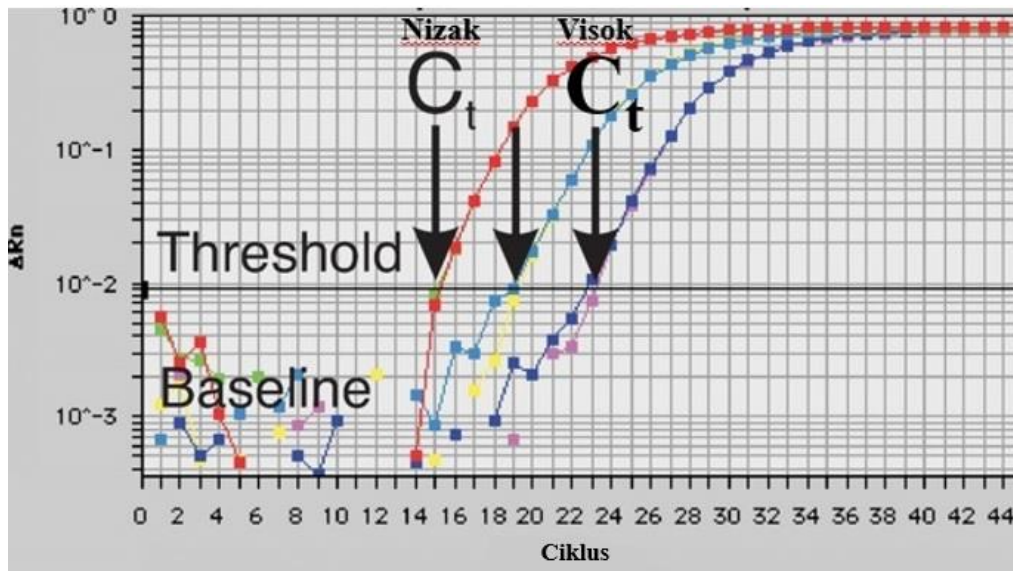


Slika 4. Faze PCR amplifikacije. Rn predstavlja vrednost fluorescencije reporterske boje, a  $\Delta Rn$  predstavlja razliku Rn vrednosti između uzorka i kontrole („no template control“). Modifikovano iz knjige *Huggett J. i O’Grady J.* iz 2014.godine. (Huggett J. i O’Grady J, 2014)

U početnim ciklusima intenzitet fluorescencije ne prelazi bazalni nivo (eng. „baseline“). Ciklus u kome je fluorescentni signal uzorka značajno viši od bazalnog signala, naziva se „threshold cycle“ – Ct. Vrednost Ct je direktno proporcionalna količini target sekvence u



uzorku. Što je veći početni broj kopija target sekvence,  $C_t$  je niži, i obratno,  $C_t$  je viši u uzorcima sa manjom početnom količinom target sekvence (Slika 5.).



Slika 5. Amplifikacioni plotovi sa različitim početnom količinom target molekula. Niska  $C_t$  vrednost znači da je broj početnih molekula bio veliki, a visoka  $C_t$  vrednost da je broj početnih molekula bio mali. Modifikovano iz rada *Bustin SA.* iz 2005. godine (Bustin SA, 2005)

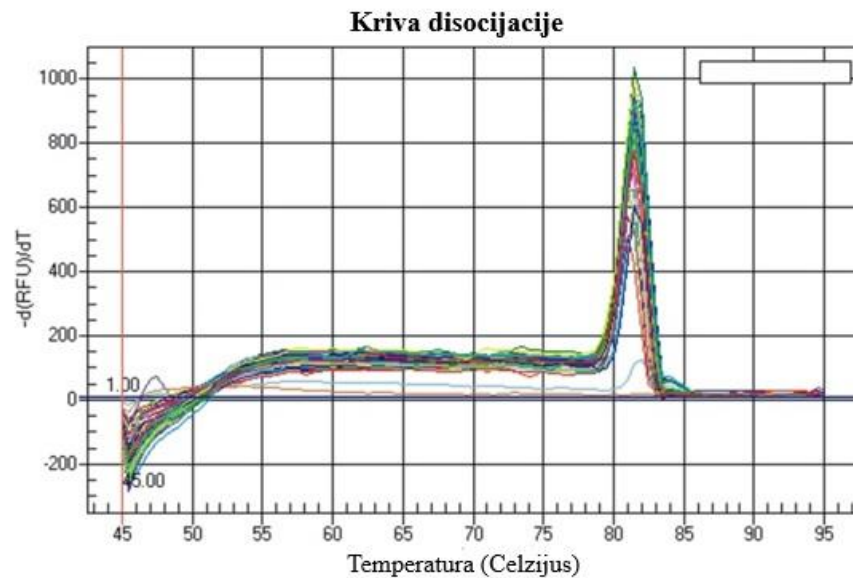
Trenutno se koriste 2 osnovne „real-time“ PCR tehnike;

1. SYBR Green
2. TaqMan

SYBR Green je najjednostavnija tehnika, zasnovana na primeni DNK-interkalirajuće SYBR Green I boje. Ova boja se vezuje za manji žleb dvolančane DNK i sa povećanjem broja PCR reakcije dolazi do povećanja količine dvolančane DNK, pa samim tim dolazi i do povećanja fluorescentnog signala koga emituje SYBR Green I boja (na 520nm).

SYBR Green tehnika nije specifična i za posledicu može imati detekciju nespecifično amplifikovanih PCR produkata, kao i detekciju dimera prajmera. Za procenu specifičnosti primenjuje se analiza krive topljenja („melting curve analysis“). U ovoj analizi, temperatura polako raste od 40 do 95°C, pri čemu se konstantno prati nivo fluorescencije. Fluorescentni

signal će biti visok pri niskim temperaturama u slučaju postojanja dvolančane DNK, ali će fluorescencija drastično pasti pri temperaturama oko tačke topljenja PCR produkata. PCR produkti različite dužine i sastava će imati različite tačke topljenja pa će davati različite pikove fluorescencije. Specifični PCR produkt ima samo jedan pik (Slika 6.).



Slika 6. Kriva topljenja (disocijacije) specifičnog PCR produkta.  
Modifikovano iz rada *Nahid N.* iz 2011. godine (Nahid N, 2011)

TaqMan tehnika koristi 5'→3'egzonukleaznu aktivnost Taq polimeraze za specifičnu detekciju PCR produkata. TaqMan proba je dvostuko obeležena oligo-nukleotidna proba; na 5'kraju je fluorescentna, reporter boja-R (najčešće FAM, VIC ili JOE), a na 3'kraju se nalazi kvenčer-Q. Sve dok se reporter i kvenčer boja nalaze „blizu“ jedna drugoj, tj. dok je TaqMan proba intaktna, nema emitovanja fluorescencije jer fluorescencija koju emituje repoter biva „apsorbovana“ od strane kvenčera. Međutim, u toku PCR amplifikacije 5'→3'egzonukleazna aktivnost Taq polimeraze izmešta probu i uklanja je sa DNK lanca, što rezultira u emitovanju detektabilne fluorescencije od strane reporter boje. U toku svakog novog ciklusa PCR reakcije, fluorescencija će rasti kao posledica akumulacije „slobodnih“ reportera.

Kvantifikacija qPCR podataka može biti:

1. Apsolutna kvantifikacija, gde je rezultat izražen kao apsolutni broj kopija target sekvence. Tačna kvantifikacija target sekvence se dobija poređenjem sa standardnom krivom izrađenom od uzoraka poznate koncentracije.
2. Relativna kvantifikacija, gde je rezultat predstavljen kao relativni odnos reference (kalibrator) i merenog uzorka.

U oba pristupa kvantifikaciji, veoma je važno izvršiti normalizaciju dobijenih podataka. Kako je količina dobijenih PCR produkata direktno zavisna od početne količine matrice da bi se izbegle greške nastale prilikom postavke eksperimenta, uporedo sa umnožavanjem target sekvence vrši se i umnožavanje takozvane endogene kontrole. Endogena kontrola je obično „housekeeping“ gen čija je ekspresija stabilna u svim uzorcima koji se kvantifikuju, odnosno čija se ekspresija ne menja prilikom esperimentalnih tretmana.

### III - 10. Relativna kvantifikacija

#### III - 10.1. Komparativni ddCt metod

Komparativni ddCt metod je najčešće korišćen metod kvantifikacije ekspresije target gena primenom qPCR tehnologije, definisan od strane Livak KJ & Schmittgen TD (Livak KJ & Schmittgen TD, 2001). Količina target gena, normalizovanog u odnosu na endogenu kontrolu i relativno u odnosu na kalibrator je;

$Q = 2^{-ddCt}$ , gde je

$$ddCt = dCt_{uzorak} - dCt_{KALIBRATOR} =$$

$$(Ct_{target} - Ct_{endogena kont.}) - (Ct_{target, KALIBRATOR} - Ct_{endogena kont., KALIBRATOR})$$

Da bi kalkulacija primenom ove metode bila tačna, efikasnost amplifikacije target gena i endogene kontrole mora biti približno ista i mora biti iznad 96%.

III - 10.1.1. Određivanje ekspresije *WT1*, *EVII* i *BAALC* gena komparativnim *ddCt* metodom

Ekspresija *WT1*, *EVII* i *BAALC* gena je praćena primenom „real-time“ PCR metode na 7900 HT Real-time PCR aparatu (Applied Biosystems), upotrebom TaqMan hemije. Kao endogena kontrola korišćen je *ABL* gen. Svi prajmeri i probe kao i njihove sekvence su navedeni u tabeli 5.

Tabela 5. Sekvence prajmera i PROBA za „real-time“ PCR kvantifikaciju gena za *EVII*, *BAALC* i *ABL*.

<b>prajmeri</b>	<b>sekvenca (5'-3')</b>
<b>EVII - F</b>	AGT GCC CTG GAG ATG AGT TG
<b>EVII- R</b>	TTT GAG GCT ATC TGT GAA GTG C
<b>BAALC - F</b>	GCC CTC TTG ACC CAG AAA CAG
<b>BAALC- R</b>	CTT TTG CAG GCA TTC TCT TAG CA
<b>ABL - F</b>	TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC T AA AGG T
<b>ABL - R</b>	GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA
<b>Probe</b>	<b>sekvenca (5'-3')</b>
<b>EVII- P</b>	(FAM) – CCC CAG TGA GGT ATA AAG AGG A – (TAMRA)
<b>BAALC - P</b>	(FAM)- CTC TTT TAG CCT CTG TGG TCT GAA GGC CAT - (TAMRA)
<b>ABL- P</b>	(FAM) – CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T – (TAMRA)

Finalni volumen PCR reakcije je bio 10 µl sledećeg sastava;

<b>ABL</b>	<b>EVII, BAALC</b>
50 ng cDNK	50 ng cDNK
1x KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix-Universal (Kapa Biosystems)	1x KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix-Universal (Kapa Biosystems)
prajmeri finalne koncentracije 300 nM	prajmeri finalne koncentracije 300 nM
proba finalne koncentracije 200 nM	proba finalne koncentracije 200 nM
1x ROX High finalne koncentracije 500 nM	1x ROX High finalne koncentracije 500 nM

Kvantifikacija *WT1* ekspresije izvršena je u PCR reakciji finalnog volumena 10 µl koristeći 50ng cDNK sa TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems), TaqMan® Gene

Expression Assay for WT1 (Hs01103751\_m1, Applied Biosystems) i prajmere i probu za ABL gen kao endogenu kontrolu (Beillard E, 2003).

Temperaturni profil za sve PCR reakcije je bio;

1. 3 min/95°C
2. 50 ciklusa
  - 15 sec/95°C
  - 1 min/60°C

Obrada rezultata je izvršena primenom komparativnog ddCt metoda, a kao kalibrator je korišćena medijana dCt vrednosti nađena kod analiziranih zdravih kontrola;

$$Q = 2^{-ddCt}; \text{ gde je } ddCt = dCt_{uzorak} - dCt_{KALIBRATOR} = dCt_{uzorak} - dCt_{zdrave kontrole(medijana)}$$

### III - 10.1.2. Određivanje ekspresije MN1 gena komparativnim ddCt metodom

Ekspresija MN1 gena je praćena primenom „real-time“ PCR metode na 7900 HT Real-time PCR aparatu (Applied Biosystems), upotrebom SYBR Green hemije. Kao endogena kontrola korišćen je ABL gen. Prajmeri kao i njihove sekvence su navedeni u tabeli 6.

Tabela 6. Sekvence prajmera za „real-time“ PCR kvantifikaciju gena za MN1 i ABL.

<b>Prajmer</b>	<b>sekvenca (5'-3')</b>
<b>MN1 - F</b>	GAA GGC CAA ACC CCA GAA C
<b>MN1 - R</b>	GAT GT GAG GCC TTG TTT GC
<b>ABL - F</b>	TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC T AA
<b>ABL - R</b>	AGG T GAR GTA GTT GCT TGG GAC CCA

Finalni volumen PCR reakcije je bio 10 µl sledećeg sastava;

<b>ABL</b>	<b>MN1</b>
50 ng cDNK	50 ng cDNK
1x KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix Universal (Kapa Biosystems)	1x KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix Universal (Kapa Biosystems)
Prajmeri finalne koncentracije 300 nM	Prajmeri finalne koncentracije 300 nM
1x ROX High finalne koncentracije 500 nM	1x ROX High finalne koncentracije 500 nM

Termperaturni profil za sve PCR reakcije je bio;

1. 3 min/95°C
2. 50 ciklusa
  - 15 sec/95°C
  - 1 min/60°C

Obrada rezultata je izvršena primenom komparativnog ddCt metoda, a kao kalibrator je korišćena medijana dCt vrednosti nađena kod analiziranih zdravih kontrola;

$$Q = 2^{-ddCt}; \text{ gde je } ddCt = dCt_{\text{uzorak}} - dCt_{\text{KALIBRATOR}} = dCt_{\text{uzorak}} - dCt_{\text{zdrave kontrole (medijana)}}$$

### III - 10.2. Statistička obrada podataka

Dobijeni podaci su obrađeni i prikazani u tabelama i na slikama uz propratnu diskusiju.

Od opisnih statističkih pokazatelja korišćeni su: srednja vrednost i standardno odstupanje, raspon vrednosti promenljivih (minimum, maksimum) i medijana vrednosti.

Za istraživanje jačine veze između dve neprekidne promenljive upotrebljen je metod Pirsonove korelacije (r-Pirsonov koeficijent linearne korelacije).

Za ispitivanje veze između kategorijskih promenljivih korišćeni su neparametarski testovi i to; za poređenje između dve kategorijske promenljive (2x2 „crosstabs“) korišćen je Hi-kvadrat test nezavisnosti, a za ispitivanje veze između 3 i više kategorijskih promenljivih korišćen je Fišerov „tačan pokazatelj verovatnoće“ (Fisher's Exact Probability Test).

Od statističkih testova za poređenje grupa korišćeni su sledeći neparametarski testovi: Man-Vitnijev U-test (za ispitivanje razlika između dve grupe neprekidno promenljivih) i Kruskal-Volisov test (za ispitivanje razlika između tri ili više grupa neprekidno promenljivih).

Za analizu dužine preživljavanja korišćena je Kaplan-Majerova metoda, kao i Log Rank test za poređenje preživljavanja među ispitivanim grupama.

Za identifikaciju faktora rizika korišćen je model logističke regresije.

Svi statistički testovi su posmatrani na nivou značajnosti nulte hipoteze od  $p < 0,05$ . Statistička analiza je urađena na PC računaru primenom licenciranog statističkog paketa SPSS 21.0 (IBM).

### **III – 11. Detekcija somatskih mutacija primenom ciljanog sekvenciranja nove generacije (eng. „targeted next generation sequencing (NGS)“)**

Pre otkrića nove NGS metodologije sekvenciranja, automatsko Sanger sekvenciranje bila je metoda izbora za sekvenciranje DNK. Glavni nedostaci Sanger sekvenciranja jesu mali broj uzoraka koji mogu biti uporedo analizirani i stoga rezultujući visoki troškovi sekvenciranja po baznom paru. Ovi nedostaci doveli su do razvoja novih tehnologija sekvenciranja.

NGS tehnologija omogućuje precizno masivno paralelno DNK sekvenciranje velikog broja DNK sekvenci (celog genoma) u kratkom vremenskom periodu od nekoliko dana.

Generalno, NGS sekvenciranje obuhvata 3 osnovna koraka:

1. Priprema DNK uzoraka i biblioteke
2. Reakcija sekvenciranja
3. Analiza podataka

U ovom eksperimentu korišćena je Illumina MiSeq platforma za sekvenciranje (Illumina, Sjedinjene Američke Države) i „TruSeq Amplicon – Cancer Panel“ (TSACP, Illumina,

Sjedinjene Američke Države) kit za pripremu biblioteke za sekvenciranje uzoraka genomske DNK pacijenata. TSACP omogućava paralelno sekvenciranje 212 umnoženih regiona koji imaju visoku učestalost mutacionih događaja (mutaciona „hot spot“ mesta) kod 48 gena povezanih sa kancerom, odnosno procesima ćelijske proliferacije, apoptoze, održavanja integriteta genoma, kao i regulacije strukture hromatina (sekvencirani geni su prikazani Tabeli 7.). Eksperiment je obuhvatio 20 dečjih AML i 20 adultnih AML neselektovanih pacijenata.

Tabela 7. Geni asocirani sa kancerom obuhvaćeni „TruSeq Amplicon – Cancer Panel“ kitom za sekvenciranje

<i>ABL1</i>	<i>EGFR</i>	<i>GNAS</i>	<i>MLH1</i>	<i>RET</i>
<i>AKT1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>HNF1A</i>	<i>MPL</i>	<i>SMAD4</i>
<i>ALK</i>	<i>ERBB4</i>	<i>HRAS</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>APC</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH1</i>	<i>NPM1</i>	<i>SMO</i>
<i>ATM</i>	<i>FGFR1</i>	<i>JAK2</i>	<i>NRAS</i>	<i>SRC</i>
<i>BRAF</i>	<i>FGFR2</i>	<i>JAK3</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>STK11</i>
<i>CDH1</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KDR</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>TP53</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FLT3</i>	<i>KIT</i>	<i>PTEN</i>	<i>VHL</i>
<i>CSF1R</i>	<i>GNA11</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTPN11</i>	
<i>CTNNB1</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MET</i>	<i>RB1</i>	



## III – 11.1. Ciljano NGS sekvenciranje – priprema DNK uzoraka i biblioteke

Ovaj korak predstavlja pripremu DNK uzoraka za sekvenciranje i sastoji se od nekoliko koraka:

*11.1.1. Hibridizacija oligonukleotidnih proba*

Tokom koraka hibridizacije oligonukleotidnih proba, posebno dizajnirani oligonukleotidi, koji ograničavaju željene sekvence, hibridizuju sa molekulom genomske DNK.

Pomešano je 250 ng genomske DNK svakog uzorka sa 5  $\mu$ L smeše oligonukleotida (Amplicon Fixed Panel 1) i 40  $\mu$ L OHS1 pufera za hibridizaciju (Oligo Hybridization for Sequencing). Nakon centrifugiranja u trajanju od 1 minut na 1000 x g i 20°C, reakciona smeša je inkubirana na 95°C u trajanju od 1 minut, nakon čega je temperatura inkubacije postepeno spuštana na 40°C u trajanju od 80 minuta. Korak postepenog spuštanja temperature je kritičan za proces ispravne hibridizacije.

*11.1.2. Prečišćavanje produkata reakcije hibridizacije*

Korak prečišćavanja uklanja nehibridizovane oligonukleotidne probe korišćenjem procesa filtriranja na osnovu veličine molekula. Ispiranje puferom obezbeđuje potpuno uklanjanje nevezanih oligonukleotida i pripremu za kasniju reakciju elongacije i ligacije oligonukleotida.

Nakon inkubacije, 50  $\mu$ L reakcione smeše je postavljeno na unapred pripremljeni filter za prečišćavanje, a zatim je centrifugirana u trajanju od 2 minuta na 2400 x g i 20°C. Nakon toga, filter je ispran dva puta korišćenjem 45  $\mu$ L pufera za ispiranje SW1 (Stringent Wash 1) i centrifugiranjem na 2400 x g u trajanju od 2 minuta. Heterodupleksi molekula gDNK sa oligonukleotidnim graničnicima su eluirani sa filtera korišćenjem 45  $\mu$ L univerzalnog pufera UB1 (Universal Buffer 1) i centrifugiranjem na 2400 x g u trajanju od 2 minuta.

### 11.1.3. Elongacija vezanih oligonukleotidnih proba

Korak elongacije podrazumeva polimerizaciju i, samim tim, obogaćivanje (eng. „enrichment“) ciljnih regiona za sekvenciranje, korišćenjem enzima DNK polimeraze. Polimerizacija započinje na 3' kraju uzvodno hibridizovanog oligonukleotida, a završava se ligacijom na 5' kraju nizvodno hibridizovanog oligonukleotida upotrebom enzima DNK ligaze. Ovaj proces rezultuje dobijanjem ciljnih sekvenci molekula DNK, sa obe strane kovalentno povezanih sa oligonukleotidnim sekvencama.

Zapremina od 45  $\mu\text{L}$  prethodno prečišćenih molekula DNK sa hibridizovanim oligonukleotidima je pomešana sa 45  $\mu\text{L}$  smeše za polimerizaciju i ligaciju ELM3 (Extension Ligation Mix 3), a zatim inkubirana na 37°C u trajanju od 45 minuta.

### 11.1.4. Umnožavanje dobijenih produkata lančanom reakcijom polimeraze

Korak umnožavanja lančanom reakcijom polimeraze dovodi do amplifikacije selektovanih „hot spot“ regiona dobijenih upotrebom oligonukleotidnih proba. Proces amplifikacije se odvija dodavanjem prajmera, koji se sastoje iz sekvenci indeksa (i5 i i7), kao i adaptera, koji će se vezati za komplementarne oligonukleotide (eng. „oligos“) na površini „flowcell“. Nakon nanošenja uzorka na „flowcell“, dolazi do vezivanja DNK, formiranja klastera (eng. „cluster generation“) i do klonalnog umnožavanja klastera. Dodavanjem indeksa i5 i i7, svakom uzorku se dodeljuje jedinstveni kod (eng. „barcode“), na osnovu kojeg se kasnije identifikuje svaki pojedinačni uzorak prilikom analize podataka.

Nakon reakcije elongacije, u svaki uzorak je dodato 25  $\mu\text{L}$  50 mM NaOH i smeša je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi. U ovako denaturisane produkte nakon koraka elongacije dodato je po 5  $\mu\text{L}$  prajmera odgovarajuće orijentacije (i5 i i7), kao i 22  $\mu\text{L}$  gotove smeše za lančanu reakciju polimeraze PMM2/TDP1 (PCR Master Mix 2/TruSeq DNA Polymerase 1). Nakon toga, reakciona smeša je postavljena na temperaturni program lančane reakcije polimeraze (Tabela 8.).

Tabela 8. Temperaturni program lančane reakcije polimeraze

Temperatura	Dužina	Broj ciklusa
95°C	3'	1
95°C	30''	
62°C	30''	27
72°C	30''	
72°C	5'	1

#### 11.1.5. Prečišćavanje produkata lančane reakcije polimeraze

Korak prečišćavanja koristi „Agencourt AMPure XP“ magnetne kuglice (Beckman Coulter International SA, Švajcarska) za prečišćavanje u svrhu uklanjanja neželjenih produkata lančane reakcije polimeraze koji mogu interferirati sa nishodnim koracima pripreme biblioteke matričnih molekula DNK za sekvenciranje.

Nakon lančane reakcije polimeraze, u uzorke je dodato 45  $\mu$ L magnetnih AMPure XP kuglica za prečišćavanje uzorka i smeša je inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su postavljeni na magnetno postolje u trajanju od 2 minuta, nakon čega je supernatant odbačen, a talog, veoma pažljivo, ispran sa 200  $\mu$ L svežeg 80% etanola u trajanju od 30 sekundi. Ispiranje etanolom je ponovljeno, talog je osušen na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta i pažljivo resuspendovan u 30  $\mu$ L pufera za eluciju sa Tris EBT (Elution Buffer with Tris). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 minuta, uzorci su postavljeni na magnetno postolje u trajanju od 2 minuta, a zatim je 200  $\mu$ L supernatanta preuzeto za dalji rad.

#### 11.1.6. Normalizacija koncentracije biblioteke

Kvantifikacija indeksirane, umnožene i prečišćene biblioteke uzoraka DNK je od velike važnosti za dalju reakciju sekvenciranja i postupak obrade podataka. Odgovarajuća početna

količina DNK svakog uzorka u reakciji umnožavanja u obliku mosta (eng. „bridge amplification“) dovodi do odgovarajuće gustine dobijenih klastera (eng. „cluster density“), što određuje kvalitet reakcije sekvenciranja, a samim tim i kvalitet analize dobijenih podataka.

U prečišćene produkte lančane reakcije polimeraze dodato je 45  $\mu\text{L}$  smeše kuglica za normalizaciju LNA1/LNB1 (Library Normalization Additives 1/Library Normalization Beads 1), i smeša je promešana na 1800 rpm u trajanju od 30 minuta. Korak mešanja u trajanju od 30 minuta je ključan za reakciju normalizacije i može dovesti do povećane ili smanjene reprezentacije pojedinačnih uzoraka ako se vreme mešanja poveća ili smanji. Nakon mešanja, reakciona smeša je postavljena na magnetno postolje u trajanju od 2 minuta, nakon čega je supernatant odbačen. Talog je ispran dva puta sa 45  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje LNW1 (Library Normalization Wash 1) u trajanju od 5 minuta, nakon čega je LNW1 odbačen. U uzorak je dodato 30  $\mu\text{L}$  0,1 N NaOH, nakon čega je promešan na 1800rpm u trajanju od 5 minuta u cilju elucije molekula DNK sa LNB1 kuglica za normalizaciju. Supernatant sa eluiranim molekulima DNK je preuzet za dalji rad i pomešan sa 30  $\mu\text{L}$  pufera za čuvanje LNS1 (Library Normalization Storage Buffer 1). Ovako dobijena biblioteka za sekvenciranje se sastoji od jednolančanih molekula DNK, spremnih za dalje spajanje i nanošenje na MiSeq platformu za sekvenciranje.

#### *11.1.7. Spajanje dobijenih biblioteka i nanošenje na MiSeq platformu za sekvenciranje*

U pripremi za procese umnožavanja u obliku mosta i dobijanja klonalnih klastera uzoraka DNK, kao i za reakciju sekvenciranja, jednake količine molekula DNK svakog uzorka moraju biti spojene zajedno. Spajanje i razblaživanje se vrši u puferu za razblaživanje, nakon čega sledi toplotna denaturacija direktno pre nanošenja spojenih uzoraka na MiSeq platformu.

Nakon normalizacije koncentracije uzoraka, 5  $\mu\text{L}$  biblioteke svakog uzorka je spojeno zajedno. Od ovako dobijene biblioteke svih uzoraka, 6  $\mu\text{L}$  je pomešano sa 594  $\mu\text{L}$  pufera za hibridizaciju HT1 (Hybridization Buffer), nakon čega je smeša denaturisana na 96°C u

trajanju od 2 minuta. Denaturisana biblioteka je inkubirana 5 minuta na ledu, nakon čega je, sledeći uputstva proizvođača, nanosena na MiSeq platformu za sekvenciranje.

### III – 11.2. Ciljano NGS sekvenciranje – reakcija sekvenciranja

Reakcija sekvenciranja je izvršena na MiSeq platformi za sekvenciranje (Illumina, Sjedinjene Američke Države), korišćenjem verzije 3 (V3) kita za pripremu biblioteke i softvera za obradu podataka (Illumina, Sjedinjene Američke Države). U reakciji sekvenciranja je korišćen 151 ciklus sekvenciranja jednog DNK lanca sa oba kraja (eng. „pair end read“), dok je par indeks sekvenci sekvenciran u po 8 ciklusa. Kvalitet sekvenciranja je prikazan u vidu Q vrednosti, koji predstavlja merilo kvaliteta sekvenciranja, sa graničnom verovatnoćom greške manjom od 1 u 1000 baza (Q30 vrednost).

### III – 11.3. Ciljano NGS sekvenciranje – obrada podataka

#### *11.3.1. Bioinformatička obrada podataka*

Primarna analiza podataka je izvršena od strane ugrađenog softvera MiSeq platforme (Illumina, Sjedinjene Američke Države). Sekundarna analiza, odnosno dobijanje FASTQ datoteka potrebnih za detekciju genomske varijacije, je sprovedena kroz četiri stupnja: osnovna provera kvaliteta i uklanjanje sekvenci lošeg kvaliteta, preklapanje kratkih dobijenih sekvenci (eng. „reads“) sa referentnim genomom, dodatna provera kvaliteta, kao i detekcija varijanti i dodatno filtriranje. Set algoritama za obradu podataka (eng. „pipeline“) je formiran od strane kompanije „Seven Bridges Genomics“ (SBG, Srbija). Set algoritama se sastojao od slobodno dostupnih softverskih alata, kao i od alata razvijenih od strane SBG korišćenjem sopstvenih bioinformatičkih resursa.

Prvi korak osnovne provere kvaliteta je izvršen korišćenjem FastQC softvera ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc)), dok je uklanjanje baza sa kvalitetom manjim od Q20 vrednosti (verovatnoća greške 1 u 100) izvršeno pomoću FastqMcf softvera

(code.google.com/p/ea-utils). Preklapanje sekvenci sa referentnim GRCh37 genomom je izvršeno pomoću BWA-MEM algoritma, u cilju dobijanja BAM datoteke. Dodatna provera kvaliteta nakon preklapanja izvršena je pomoću algoritma razvijenog od strane kompanije SBG. Razvijeni algoritam detektuje umnožene sekvence sa neadekvatnom dubinom sekvenciranja i isključuje ih iz daljeg razmatranja. Detekcija genomskih varijacija i finalno filtriranje je izvršeno korišćenjem GATK “UnifiedGenotyper” i “VariantFiltration” softvera. Softver “UnifiedGenotyper” proizvodi vcf datoteke koje sadrže informacije o poziciji jednonukleotidnih varijacija (SNV) i kratkih inserciono-delecionih varijacija (indel) u odnosu na referentni GRCh37 genom, dok “VariantFiltration” softver filtrira varijacije u regionima sa nedovoljnom dubinom sekvenciranja. Anotacija pojedinačnih dobijenih varijacija je izvršena korišćenjem “Variant Effect Predictor” softvera ([www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Tools/VEP](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP)), koji koristi “SIFT” i “PolyPhen” algoritme za procenu funkcionalnog efekta mutacija. Korišćenjem ovih podataka, formiran je izveštaj sa rezultatima detektovanih varijacija u svakom genu, za svakog pacijenta, uključujući i informacije o dubini sekvenciranja detektovane varijacije, kao i o mogućem dbSNP identifikacionom broju. Za vizuelizaciju podataka je korišćen “Integrated Genomics Viewer” softver .

### *11.3.2. Statistička obrada podataka*

Statistička obrada podataka je izvršena korišćenjem Prism5 softverskog paketa (GraphPad, Sjedinjene Američke Države). Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ) i koeficijent determinacije ( $r^2$ ) su dobijeni poređenjem 19 XY parova. Za svaki rezultat dat je 95% interval poverenja (eng. „confidence interval – CI“), a značajnost razlika između dve grupe od  $p < 0,05$  je smatrana statistički značajnom.

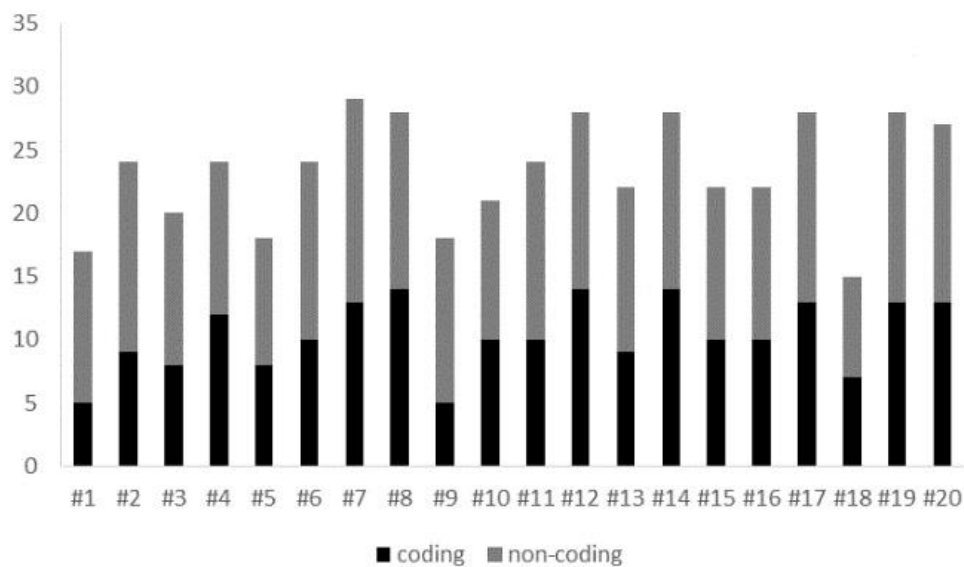
## **IV – REZULTATI**

### **IV - 1. Analiza mutacionog profila adultne i dečje AML primenom metode paralelnog ciljanog sekvenciranja nove generacije**

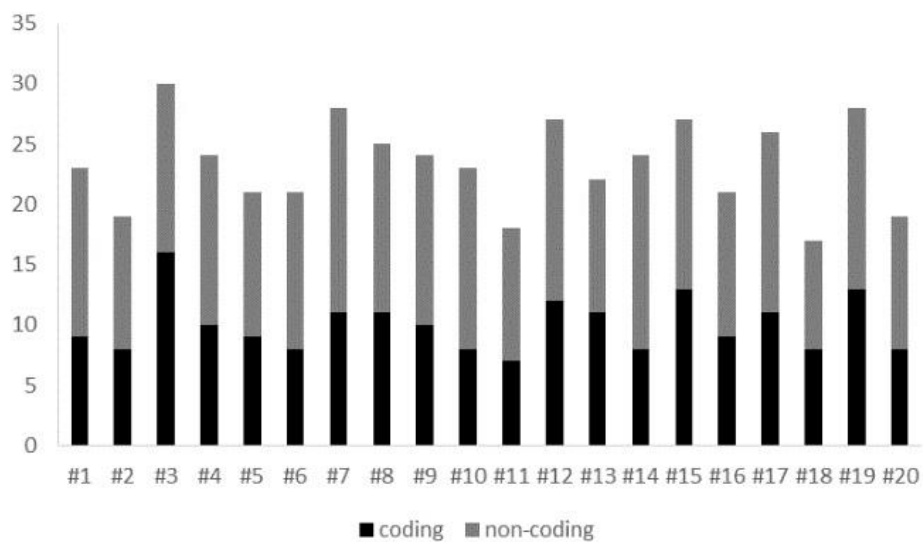
U našoj studiji, primenili smo ciljano sekvenciranje nove generacije u analizi somatskih mutacija u grupi adultnih (aAML) i dečjih (dAML) AML pacijenata, u cilju lakšeg prepoznavanja i boljeg razumevanja genetičkog profila ove bolesti.

Da bismo detektovali mutacioni profil uključen u patogenezu dečje i adultne AML, analizirano je približno  $14 \times 10^8$  bp sekvenci kod 20 dAML i 20 aAML pacijenata, koristeći TruSeq Amplicon - Cancer Panel (TSACP) platformu. Na TSACP platformi umnožava se 212 amplikona koji obuhvataju mutaciona „hot spot“ mesta u 48 gena povezanih sa kancerom. Prosečna pokrivenost čitanja sekvenci iznosila je  $2981 \times$  po amplikonu. Devet gena nije uključeno u dalju analizu zbog nedovoljne pokrivenosti čitanja, tako da je ukupno korišćeno 188 amplikona, poreklom iz 39 gena za sledeći korak analize. Kako bismo utvrdili koja je od detektovanih mutacija bila somatska, odnosno poreklom od leukemijskog tkiva, za svakog pacijenta nam je bio potreban DNK uzorak iz zdravog, normalnog tkiva. S obzirom da takav materijal nije bio dostupan, detektovane varijante su identifikovane u odnosu na referentni genom, primenjujući Bajesov pristup aproksimacije i vršeci poređenje sa javnim bazama podataka genetičkih varijacija.

Broj različitih varijanti detektovanih u kodirajućim i u nekodirajućim regionima je bio 114, od kojih je 75 (55 kod dAML, 42 kod aAML) varijanti bilo u kodirajućim regionima, a 39 varijanti (31 kod dAML, 34 kod aAML) u nekodirajućim regionima. U kodirajućim regionima identifikovane su 4 različite insercije i delecije (indel) (3 kod dAML, 3 kod aAML), dok je u nekodirajućim regionima identifikovano 13 različitih indel (9 kod dAML, 13 kod aAML). Identifikovano je 71 različitih pojedinačnih nukleotidnih varijanti (eng. “single nucleotide variants” -SNV) (52 kod dAML, 39 kod aAML) u kodirajućim regionima, dok je njih 26 nađeno u nekodirajućim regionima (22 kod dAML, 21 kod aAML) (Slika 7a i 7b).



Slika 7a. Ukupan broj varijanti u kodirajućim i nekodirajućim regionima detektovan targetovanim NGS sekvenciranjem kod dečje AML

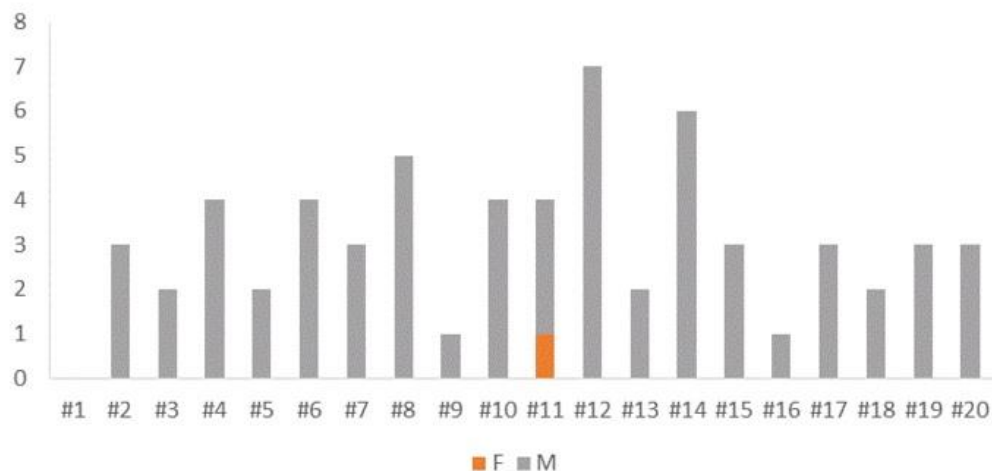


Slika 7b. Ukupan broj varijanti u kodirajućim i nekodirajućim regionima detektovan targetovanim NGS sekvenciranjem kod adultnih AML pacijenata

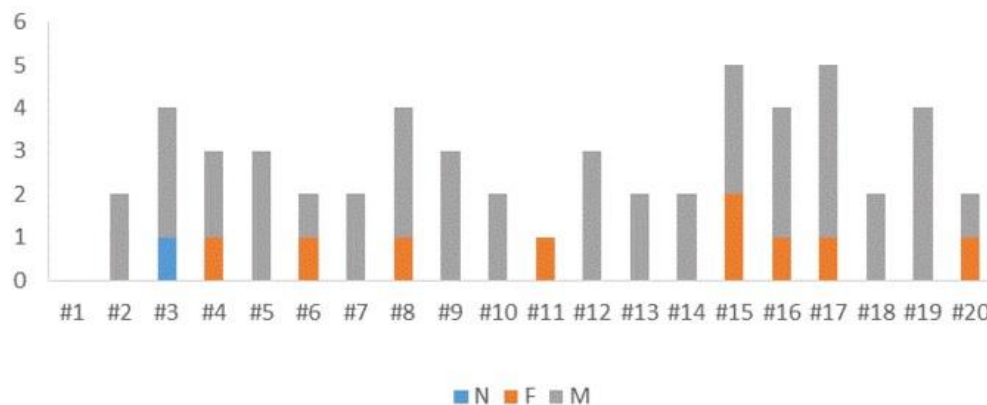


U našoj grupi pacijenata identifikovano je ukupno 412 (207 kod dAML, 205 kod aAML) varijanti u kodirajućim regionima (medijana po pacijentu 10, opseg: 5-16; medijana po dAML pacijentu: 10, opseg: 5-14; medijana po aAML pacijentu: 10, opseg: 7-16). U nekodirajućim regionima nađeno je 527 varijanti (260 kod dAML, 267 kod aAML) (medijana po pacijentu: 14, opseg: 8-17; medijana po dAML pacijentu: 14, opseg: 8-16; medijana po aAML pacijentu: 14, opseg: 9-17).

Prilikom dalje analize u obzir su uzimane samo varijante koje potencijalno mogu izazvati promene u strukturi proteina, tzv. „protein-changing“ varijante - mutacije. Ove mutacije uključuju „nonsense“ (N), „frameshift“ (F) i „missense“ (M) mutacije (NFM). Ukupan broj takvih promena bio je 122, 62 kod dAML i 60 kod aAML pacijenata (prosečno po pacijentu 3, opseg: 0-7; po dAML pacijentu 3, opseg: 0-7; po aAML pacijentu 3, opseg: 1-5). Šest pacijenata je imalo 5 ili više NFM mutacija, uključujući 3 dAML pacijenta (#8, #12, #14) i 3 aAML pacijenta (#1, #15, #17) (Slika 8a i 8b).

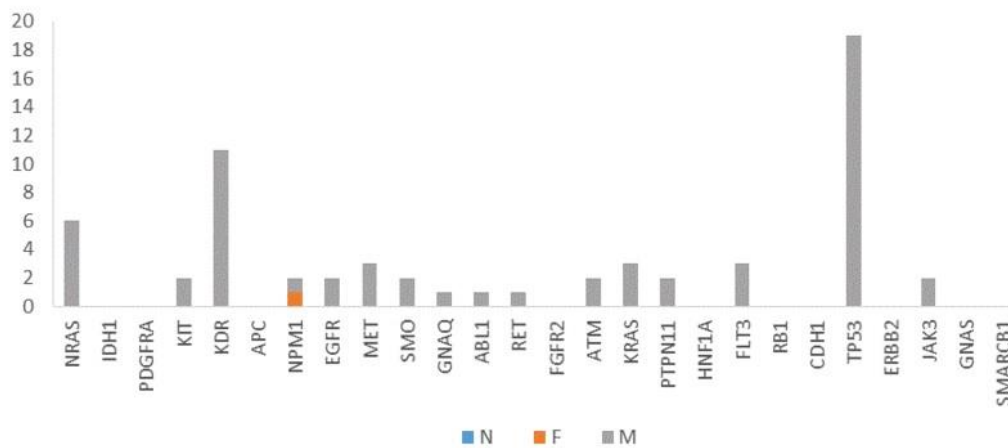


Slika 8a. Broj mutacija po pacijentu. Distribucija nonsense (N), frameshift (F), i missense (M) mutacija u kodirajućim regionima targetovanih gena kod dečje AML.

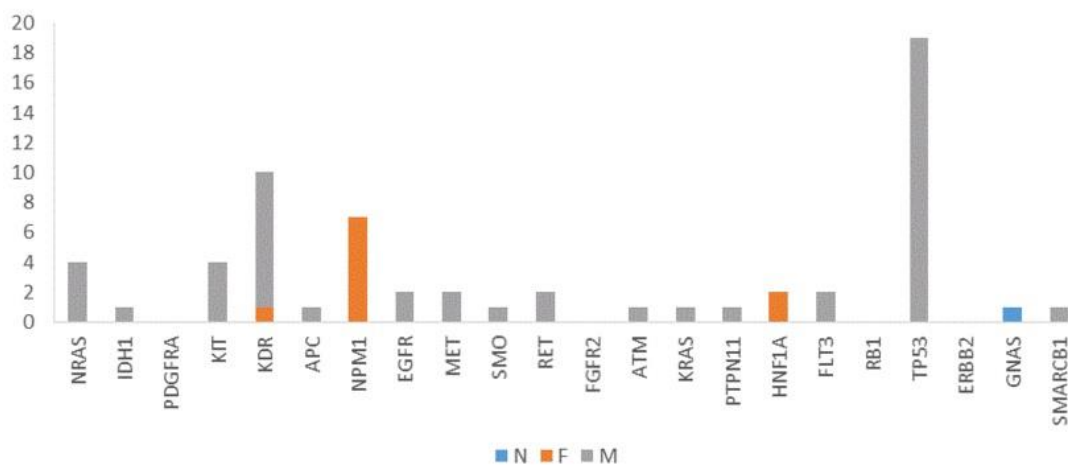


Slika 8b. Broj mutacija po pacijentu. Distribucija nonsense (N), frameshift (F), i missense (M) mutacija u kodirajućim regionima targetovanih gena kod adultnih AML pacijenta.

TSACP platforma je dizajnirana tako da „pokriva” mutaciona „hot spot“ mesta u kancer-vezanim genima i da detektuje prisustvo somatskih mutacija. Na ovoj platformi su zastupljeni onkogeni i tumor supresor geni uključeni u ćelijsku proliferaciju, apoptozu, u održavanje stabilnost genoma i u regulaciju strukture hromatina. U našoj analizi otkrili smo da je 26 gena imalo najmanje jednu mutaciju u kodirajućim regionima (23 kod dAML, 23 kod aAML), dok je kod 21 različitih gena detektovana bar jedna NFM mutacija (16 u dAML, 17 u aAML), odnosno mutacija sa potencijalnom „protein-changing“ funkcijom. Štaviše, identifikovali smo 4 gena koji su bili mutirani isključivo kod dAML pacijenata; *JAK3*, *ABL1*, *GNAQ* i *EGFR* gen koji kodiraju tirozin kinase odnosno proteine koji su udruženi sa tirozin kinazama. Detektovali smo i 5 gena koji su bili mutirani isključivo kod aAML grupe pacijenata: *IDH1*, *APC*, *HNF1A*, *GNAS* i *SMARCB1* geni, uključeni u procese metilacije i modifikaciju histona. Najviše NFM mutacija je detektovano u *KDR* i *TP53* genima (više od 10 NFM mutacija) (Slika 9a i 9b).



Slika 9a. Broj mutacija po targetovanom genu. Distribucija „nonsense“ (N), f“rameshift“ (F) i „missense“ (M) mutacija u kodirajućim regionima targetovanih gena kod dečje AML.



Slika 9b. Broj mutacija po targetovanom genu. Distribucija „nonsense“ (N), „frameshift“ (F) i „missense“ (M) mutacija u kodirajućim regionima targetovanih gena kod adultnih AML.

Kod 6 dAML pacijenata i kod 4 aAML pacijenta, u 10 gena detektovano je 14 novih neprijavljenih NFM mutacija (9 kod dAML i 5 kod aAML pacijenata) (Tabela 9 i 10). Najveći broj novih mutacija su detektovane u *FLT3* genu (3 nove mutacije), a zatim u genima za *RET* i *EGFR* (po 2 nove mutacije). Sve mutacije su bile po tipu zamene/„missense“, a mnoge od njih predstavljaju nove substitucije u već „prijavljenim“ kodonima koji predstavljaju mutaciona “hot spot” mesta. Na primer, detektovali smo novu mutaciju u *FLT3* genu na poziciji c.2522 A>T; p.N841I, ali su substitucije u kodonu 841 već prijavljene (N841K, N841H, N841S).

**Tabela 9.** Mutacije identifikovane kod dečje AML metodom NGS sekvenciranja, Sanger sekvenciranjem i metodom PCR. dbSNP (eng. „Single Nucleotide Polymorphism DataBase“); COSMIC (eng. „Catalogue of Somatic Mutations In Cancer database“)

Broj uzorka	Mutacija detektovana metodom NGS sekvenciranja	Status mutacije	dbSNP	COSMIC	Mutacija detektovana PCR metodom ili Sanger sekvenciranjem	Dubina čitanja (eng. "Coverage") (x)
1	None					
2	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Homozigot	rs1870377	COSM149673		10894
	GNAQ, c.842A>G, p.E281G	Heterozigot				82
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061		62
3	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061		252
	JAK3, c.2164G>A, p.V722I	Heterozigot	rs3213409	COSM34213		236
4	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061		66
	KIT, c.2447A>T, p.D816V	Heterozigot	rs121913507	COSM1314		3356
	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673		2892
	FLT3, c.2522A>T, p.N841I	Heterozigot				705
5	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061		60
	NRAS, c.182A>T, p.Q61L	Heterozigot	rs11554290	COSM583		979
6	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673		11062
	ATM, c.2572T>C, p.F858L	Heterozigot	rs1800056	COSM21826		2249
	FLT3, c.2028C>A, p.N676K	Heterozigot		COSM303886		2479
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061		184
7	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061		198
	NRAS, c.182A>T, p.Q61L	Heterozigot	rs11554290	COSM583		1486
	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673		3806
8	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061		413
	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Homozigot	rs1870377	COSM149673		3411
	NRAS, c.35G>A, p.G12D	Heterozigot	rs121913237	COSM564		3807
	NRAS, c.34G>A, p.G12S	Heterozigot	rs121913250	COSM563		3431
	KIT, c.1621A>C, p.M541L	Heterozigot	rs3822214	COSM28026		2871
9	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673		4443
10	EGFR, c.2368.A>T, p.T790S	Heterozigot				36
	RET, c.2770T>C, p.F924L	Heterozigot				60
	TP53, c.442G>A, p.D148N	Heterozigot		COSM44043		78
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061		65
11	NPM1, c.863_864insCGGA P.W288fs#12	Heterozigot		COSM28066		2182
	NPM1, c.871G>T,p.R291M	Heterozigot				2182
	NRAS, c.34G>A, p.G12S	Heterozigot	rs121913250	COSM563		557
	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673		12063

## REZULTATI

<b>12</b>	NRAS, c.34G>A, p.G12S	Heterozigot	rs121913250	COSM563	387
	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Homozigot	rs1870377	COSM149673	14782
	SMO, c.984C>T, p.A235V	Heterozigot	rs142599757	COSM1226876	216
	ABL1, c.806C>T, p.A269V	Heterozigot			125
	KRAS, c.35G>A, p.G12D	Heterozigot	rs121913529	COSM521	3552
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	386
	JAK3, c.2164G>A, p.V722I	Heterozigot	rs3213409	COSM3413	579
<b>13</b>	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673	10653
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061	218
FLT3/ITD					
<b>14</b>	EGFR, c.2437T>G, p.Y813D	Heterozigot			30
	MET, c.3029C>T, p.T1010I	Heterozigot	rs56391007	COSM707	8695
	SMO, c.618G>T, p.W206L	Heterozigot			42
	PTPN11, c.206A>T, p.E76V	Heterozigot	rs121918465	COSM13025	7569
	TP53, c.308A>T, p.Y103F	Heterozigot			54
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061	75
<b>15</b>	KRAS, c.38G>A, p.G13D	Heterozigot		COSM532	978
	PTPN11, c.179G>T, p.G60V	Heterozigot		COSM13028	1929
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	88
<b>16</b>	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	343
FLT3/ITD					
<b>17</b>	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Homozigot	rs1870377	COSM149673	14429
	MET, c.1124A>G, p.N375S	Heterozigot	rs33917957	COSM5020653	6643
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	36
<b>18</b>	FLT3, c.2503G>T, p.D835Y	Heterozigot		COSM783	299
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061	42
<b>19</b>	MET, c.1124A>G, p.N375S	Heterozigot	rs33917957	COSM5020653	12193
	KRAS c.37G>T, p.G13C	Heterozigot	rs121913535	COSM527	1175
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061	142
<b>20</b>	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673	10697
	ATM, c.7357C>T, p.R2453C	Heterozigot		COSM1351001	4009
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	326

**Tabela 10.** Mutacije identifikovane kod adultnih AML metodom NGS sekvenciranja, Sanger sekvenciranjem i metodom PCR

Broj uzorka	Mutacija detektovana metodom NGS sekvenciranja	Status mutacije	dbSNP	COSMIC	Mutacija detektovana PCR metodom ili Sanger sekvenciranjem	Dubina čitanja (eng. "Coverage") (x)
1	NRAS, c.38G>A, p.G13D	Heterozigot	rs121434596	COSM573		1159
	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673		22343
	PTPN11, c.1508G>A, p.G503E	Heterozigot		COSM13021		1140
	HNF1A, c.863_864insC p.P289fs#28	Heterozigot		COSM1476243		2306
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061		166
	FLT3, c.2503G>T, p.D835Y	Heterozigot		COSM783	FLT3, c.2503G>T, p.D835Y IDH2, c.419G>A, p.R140Q	358
2	SMO, c.704C>T, p.A235V	Heterozigot	rs142599757	COSM1226876		170
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061		184
3	KIT, c.1621A>C, p.M541L	Heterozigot	rs3822214	COSM28026		2585
	RET, c.2975A>G, p.T929A	Heterozigot				151
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061		252
	GNAS, c.631A>T, p.K211stop	Heterozigot				113
4	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673		12563
	NPM1, c.859_860insTCTG p.W288fs#12	Heterozigot	rs758959453	COSM158604	NPM1, c.859_860insTCTG p.W288fs#12	2009
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	FLT3/ITD	58
5	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673		11343
	FLT3, c.2522A>C, p.N841T	Heterozigot				652
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061		198
	NPM1, c.859_860insTCTG p.W288fs#12	Heterozigot	rs758959453	COSM158604	NPM1, c.859_860insTCTG p.W288fs#12	1836
6	NPM1, c.859_860insTCTG p.W288fs#12	Heterozigot	rs758959453	COSM158604		2671
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061		247
7	APC, c.3920T>A, p.I1307K	Heterozigot	rs1801155			6274
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061		89
8	IDH1, c.394C>A, p.R132S	Heterozigot	rs121913499	COSM28748		1575
	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673		15785
	NPM1, c.859_860insTCTG p.W288fs#12	Heterozigot	rs758959453	COSM158604		1592
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061		109

## REZULTATI

<b>9</b>	ATM, c.3925G>A, p.A1309T	Heterozigot	rs149711770	COSM22507	1988
	FLT3, c.2027A>G, p.N676S	Heterozigot			906
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	102
<b>10</b>	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673	12686
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	98
<b>11</b>	NPM1, c.859_860insTCTG p.W288fs#12	Heterozigot	rs758959453	COSM158604	1782
FLT3/ITD					
<b>12</b>	KIT, c.2446G>T, p.D816Y	Heterozigot	rs28933969	COSM1310	3329
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	142
	SMARCB1, c.622A>T, p.M208L	Heterozigot			160
<b>13</b>	KRAS, c.437C>T, p.A146V	Heterozigot		COSM19900	1230
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	59
<b>14</b>	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673	9183
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061	70
<b>15</b>	KIT, c.1621A>C, p.M541L	Heterozigot	rs3822214	COSM28026	6057
	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673	8539
	HNF1A, c.863_864insC p.P289fs#28	Heterozigot		COSM1476243	100
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	68
	RET, c.2372A>T, p.Y791F	Heterozigot	rs77724903	COSM1159820	40
<b>16</b>	KIT, c.2446G>T, p.D816Y	Heterozigot	rs121913507	COSM1314	4710
	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Homozigot	rs1870377	COSM149673	5500
	NPM1, c.859_860insTCTG p.W288fs#12	Heterozigot	rs758959453	COSM158604	1978
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	186
<b>17</b>	NRAS, c.38G>A, p.G13D	Heterozigot	rs121434596	COSM564	439
	NRAS, c.37G>T, p.G13C	Heterozigot	rs121434595	COSM570	1160
	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673	14553
	NPM1, c.859_860insTCTG p.W288fs#12	Heterozigot	rs758959453	COSM158604	2562
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	102
<b>18</b>	MET, c.1124A>G, p.N375S	Heterozigot	rs33917957	COSM5020653	4403
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061	126
IDH2, c.515G>A, p.R172K					
<b>19</b>	NRAS, c.35G>A, p.G12D	Heterozigot	rs121913237	COSM564	539
	KDR, c.1416A>T, p.Q472H	Heterozigot	rs1870377	COSM149673	17024
	MET, c.1124A>G, p.N375S	Homozigot	rs33917957		8726
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Homozigot	rs1042522	COSM250061	186
<b>20</b>	NPM1, c.859_860insTCTG p.W288fs#12	Heterozigot	rs758959453	COSM158604	1991
	TP53, c.215C>G, p.P72R	Heterozigot	rs1042522	COSM250061	72



Pojedini geni za koje je pokazano da učestvuju u etiologiji AML nisu bili sadržani na „TruSeq Amplicon Cancer“ platformi (kao što je *IDH2* gen), ili promena u datom genu nije mogla biti detektovana standardnom obradom podataka NGS analize („internal tandem“ duplikacija u *FLT3* genu). Navedene promene su analizirane kod svakog pacijenta primenom PCR i metode direktnog Sanger sekvenciranja.

Naša studija je pokazala razliku između dAML i aAML grupe pacijenata u zastupljenosti najčešćih mutacija asociiranih sa AML, uključujući mutacije u *NPM1*, *IDH1* i *IDH2* genima. Tako je učestalost mutacija u *IDH1* bila 0% kod dAML i 5% kod aAML, učestalost u *IDH2* je iznosila 0% kod dAML i 10% kod aAML), dok je u slučaju *NPM1* mutacija ova razlika iznosila 10% kod dAML u odnosu na 35% detektovanih kod aAML. Lista različitih mutacija detektovanih „TruSeq Amplicon Cancer“ platformom, PCR i Sanger sekvenciranjem sumirana je u tabeli 9 i 10, a kliničke karakteristike dAML i aAML pacijenata u tabelama 11 i 12.

**Tabela 11.** Kliničke karakteristike dAML pacijenata.

Broj pacijenta	pol	starost (godine)	FAB	% blasta u koštanoj srži	kariotip	Kompletna remisija	Ukupno preživljavanje (meseći)	Ishod
1	M	9	3	37	46XY [9]/46XY, +17q- [1]	Da	134	živ
2	M	3	mixed lineage	45	ND	Ne	3	mrtav
3	Ž	1	7	43	ND	Da	21	mrtav
4	M	12	2	73	46 XY [4]/45 X, -Y, t(8;21)(q22;q22)[6]	Da	10	živ
5	Ž	6	4	78	46XX [4]/46XX, del(11q), del(12p12), del(6q24-25) [6]/47XX, +D, del(11q), del(12p) [3]	Da	97	živ
6	Ž	9	4	70	NK	Da	24	živ
7	M	1	1	94	ND	Ne	1	mrtav
8	Ž	10	4	25	NK	Da	91	živ
9	M	2	5	78	48XY, +8, +21 [10]/46XY [10]	Ne	1	mrtav
10	M	9	2	69	NK	Da	16	živ
11	Ž	11	4	61	ND	Da	88	živ
12	M	7	2	60	46XY [10]/46XY, t(8;21)(q22;q22) [3]/47XY, t(8;21)(q22;q22) [4]	ND	NA	ND
13	M	3	4	78	kompleksni	Ne	1	mrtav
14	M	12	2	77	NK	Da	10	živ
15	Ž	5	5	69	NK	Da	9	živ
16	Ž	14	2	72	46XX [3]/47XX, +8 [7]	Da	12	mrtav
17	Ž	16	5	98	46XX [12]/46XX, del(12p)[8]	Da	24	mrtav
18	M	14	3	85	t(15;17)[20]	Da	56	živ
19	Ž	9	5	92	ND	Ne	1,5	mrtav
20	M	3	4	99	46XX [3]/47XY, +13, t(16;16)(p13;q22) [17]	Da	72	živ

Skraćenice: M-muški, F-ženski; ND-nije dostupno; NK-normalan kariotip

Tabela 12. Kliničke karakteristike aAML pacijenata.

Broj pacijenta	pol	starost (godine)	FAB	% blasta u koštanoj srži	kariotip	Kompletna remisija	Ukupno preživljavanje (meseći)	ishod
1	M	56	7	40	kompleksan	Da	6	mrtav
2	M	25	2	32	46,XY,inv(9)(p11;q13),+9)(q34)[13]	Ne	1	mrtav
3	M	63	1	79	NK	Ne	1	mrtav
4	M	62	5	93	NK	Ne	1	mrtav
5	M	67	5	87	kompleksan	Ne	1	mrtav
6	Ž	63	4	60	NK	Ne	1	mrtav
7	Ž	73	2	22	45,XX,-C[12]/45,XX,-C,+2mark[4]	Da	10	mrtav
8	Ž	33	2	65	NK	Ne	1	mrtav
9	M	57	2	76	45,-Y,t(8,21)[7]/hipotetraploidija 86,XX,-Y,t(8,21)[9]/46,XY[4]	Da	27	živ
10	M	28	AML plazmocitoidnih dendritskih ćelija	89	92,XX,YY,[2]	Da	6	mrtav
11	Ž	36	4	70	NK	Ne	0	mrtav
12	Ž	53	2	46	t(8;21)[20]	Da	17	mrtav
13	M	63	mixed lineage	47	52-57,XY, trisomija hromozoma [15]/46,XY[5]	Da	15	mrtav
14	Ž	52	2	83	47,XX,+4 [12]/48,XX,+4,+8 [5]/46,XX, del Cq [3]	Da	2	mrtav
15	Ž	57	5	82	NK	Da	9	mrtav
16	M	34	4	48	NK	Da	21	živ
17	M	71	5	67	NK	Da	8	mrtav
18	M	67	5	90	NK	Ne	1	mrtav
19	M	33	3	95	t(15;17)[20]	Da	23	živ
20	M	58	3	84	t(15;17)[20]	Ne	0	mrtav

Skraćenice: M-muški, F-ženski; NK-normalni kariotip

**Sažetak:**

- Analiza mutacionog profila 20 dečjih (dAML) i 20 adultnih AML (aAML) pacijenata primenom metode ciljanog sekvenciranja nove generacije pokazali smo da AML sadrži relativno mali broj genetičkih promena, u proseku samo 3 mutacije po pacijentu kod obe grupe pacijenata. Ovaj nalaz ukazuje na to da je za razviće ovog tipa leukemije potrebno manje genetičkih promena nego u drugim malignitetima. Zastupljenost najčešćih mutacija u pojedinačnim genima, koji su povezani sa patogenezi AML, razlikovala se kod dAML i aAML: *IDH1* (0% kod dAML, 5% kod aAML), *IDH2* (0% kod dAML, 10% kod aAML), *NPM1* (10% kod dAML, 35% kod aAML). Ova razlika u mutacionom profilu između dečjih i adultnih AML pacijenata ističe postojanje razlike u patogenezi AML kod ove dve grupe bolesnika. Takođe, prisustvo mutacija u 4 gena (*JAK3*, *ABL1*, *GNAQ* i *EGFR*) koji kodiraju tirozin kinaze ili proteine koji su udruženi sa tirozin kinazama detektovano je isključivo kod dAML pacijenata, dok je kod 5 gena (*IDH1*, *APC*, *HNF1A*, *GNAS* i *SMARCB1*) koji su uključeni u metilaciju i modifikaciju histona prisustvo mutacija utvrđeno isključivo kod aAML pacijenata.

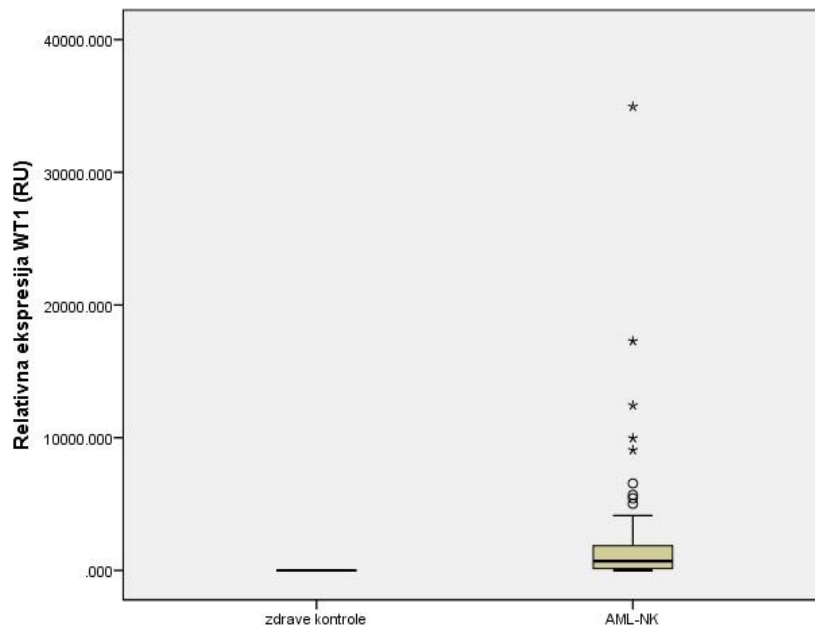
**IV - 2. Kvantifikacija ekspresije *WT1* gena kod AML-NK pacijenata**

Ekspresija *WT1* je praćena “real-time” PCR metodom. Relativni nivo ekspresije je određen primenom ddCt metode, gde su kao kalibrator korišćene zdrave kontrole. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama (RU).

**IV - 2.1. Ekspresija *WT1* gena kod *de novo* AML-NK pacijenata**

Nivo ekspresije *WT1* gena je kvantifikovan u grupi od 104 *de novo* AML-NK pacijenata, kao i kod 15 uzoraka zdravih kontrola. Medijana nivoa ekspresije *WT1* transkripta kod *de novo*

AML-NK pacijenata iznosila je 654.39 (0.19–34949.88), dok kod jednog pacijenta nije detektovana ekspresija. Ovaj nivo ekspresije je značajno viši od nivoa ekspresije koji je detektovan kod zdravih kontrola (srednja vrednost  $1.29 \pm 0.30$ , medijana  $1.00 \pm 1.04$  (0.24-3.74), dok kod 3 zdrave kontrole ekspresija nije detektovana). ( $p < 0.001$ ) (Slika 10).



Slika 10. Box-plot grafički prikaz ekspresije *WT1* (RU) kod AML-NK pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

Vrednost 4.13 RU, dobijena zbirom medijane vrednosti nivoa ekspresije zdravih kontrola i trostruke vrednosti standardne greške ( $1.00 + 3 \times 1.04$ ), uzeta je kao “cut off” vrednost, iznad koje se smatra da je uzorak pozitivan na ekspresiju *WT1*. Nakon toga naša grupa AML-NK pacijenata imala je 98 pacijenata pozitivnih na *WT1* ekspresiju.

Kako bi ispitali uticaj nivoa ekspresije *WT1* na prognozu bolesti, kao i povezanost sa kliničkim i drugim prognostičkim parametrima, podelili smo pacijente na one sa niskim (*WT1*<sup>nizak</sup>) i visokim (*WT1*<sup>visok</sup>) nivoom ekspresije. Kao “cut off” vrednost uzeli smo 75% vrednosti *WT1* ekspresije kod *de novo* *WT1* pozitivnih AML-NK pacijenata, koja iznosi 1876.44 RU. U trenutku postavljanja dijagnoze, 25/98 pacijenata (25,5%) imalo je visok nivo ekspresije *WT1* gena.

Poredeći nivo *WT1* ekspresije sa kliničkim karakteristikama *de novo* AML-NK pacijenata, uočeno je da je visok nivo *WT1* ekspresije statistički značajno povezan sa visokim procenta blasta u koštanoj srži ( $p=0.003$ ). Nije uočena značajna asocijacija sa drugim prognostički značajnim faktorima kao što su starost, ukupan broj leukocita, trombocita, procenat blasta u perifernoj krvi itd. Najviše pacijenata sa *WT1<sup>visok</sup>* statusom detektovano je u M2 i M4 FAB grupi, ali bez statističke značajnosti.

U tabeli 13. su prikazane kliničke karakteristike *de novo* AML-NK pacijenata, kategorizovane na osnovu nivoa *WT1* ekspresije.

**Tabela 13.**

Kliničke karakteristike *de novo* AML-NK pacijenata podjeljenih na osnovu nivoa WT1 ekspresije

Parameter	Total (n=98)	WT1 <sup>+</sup> (n=25)	WT1 <sup>-</sup> (n=73)	<i>p</i> value
<b>Pol</b>				0.366
Muškarci (%)	51 (52)	11 (22)	40 (78)	
Žene (%)	47 (48)	14 (30)	33 (70)	
<b>Starost</b> , godine, medijana, (opseg)	54(19-78)	54(19-71)	54(21-78)	0.803
<b>Broj leukocita</b> (x10 <sup>9</sup> /L) medijana, (opseg)	17.4 (0.5-195)	18.0 (1.2-162)	16.8 (0.5-195)	0.322
<b>Hemoglobin</b> (g/L) medijana, (opseg)	96.0 (6-178)	84.50 (30-131)	99.0 (6-178)	0.002
<b>Broj trombocita</b> (x10 <sup>9</sup> /L) medijana, (opseg)	69.0 (1-420)	83.0 (22-168)	63.0 (1-420)	0.320
<b>LDH</b> (U/L) medijana, (opseg)	849.5 (273-7180)	924 (280-7180)	833.5 (273-5105)	0.418
<b>Blasti u perifernoj krvi</b> (%) medijana, (opseg)	36.0 (1-96)	38.0 (9-95)	33.5 (1-96)	0.612
<b>Blasti u koštanoj srži</b> (%) medijana, (opseg)	73.0 (30-97)	80.0 (40-97)	68.0 (30-97)	0.003
<b>FAB</b> (%)				0.955
M0	9 (9)	2 (22)	7 (78)	
M1	17 (17)	4 (24)	13 (76)	
M2	28 (29)	8 (29)	20 (71)	
M4	24 (25)	5 (21)	19 (79)	
M5	20 (20)	6 (30)	14 (70)	
<b>Kompletna remisija</b>				0.004
da (%)	58(60)	9 (16)	49(84)	
ne (%)	38(40)	16(42)	22 (58)	
<b>Rezistencija</b>				0.007
da (%)	14 (14)	6 (43)	8 (57)	
ne (%)	84 (86)	19 (23)	65 (77)	
<b>FLT3</b>				0.001
prisutna (%)	33 (34)	15 (45)	18 (55)	
odsutna (%)	65 (66)	10 (15)	55 (85)	
<b>FLT3-ITD</b>				0.003
prisutna (%)	25 (26)	12 (48)	13 (52)	
odsutna (%)	73 (74)	13 (18)	60 (82)	
<b>FLT3-D835</b>				0.417
prisutna (%)	8 (8)	3 (38)	5 (62)	
odsutna (%)	90 (92)	22 (24)	68 (76)	
<b>NPM1</b>				0.021
prisutna (%)	36 (37)	14 (39)	24 (61)	
odsutna (%)	62 (63)	9 (14.5)	53 (85.5)	
<b>FLT3-ITD/NPM1</b>				0.013
FLT3 <sup>+</sup> ITD <sup>-</sup> /NPM1 <sup>-</sup>	54 (55)	8 (15)	46 (85)	
FLT3-ITD <sup>+</sup> /NPM1 <sup>+</sup>	17 (17.5)	9 (53)	8 (47)	
FLT3-ITD <sup>-</sup> /NPM1 <sup>+</sup>	19 (19.5)	5 (26)	14 (74)	
FLT3-ITD <sup>+</sup> /NPM1 <sup>-</sup>	8 (8)	3 (38)	5 (62)	

<b>IDH</b>				0.441
prisutna (%)	22 (22)	7 (32)	15 (68)	
odsutna (%)	76 (78)	18 (24)	58 (76)	
<b>IDH1</b>				0.417
prisutna (%)	8 (13.9)	3 (38)	5 (62)	
odsutna (%)	90 (86.1)	22 (22)	76 (78)	
<b>IDH2</b>				0.777
prisutna (%)	14 (13.9)	4 (29)	10 (71)	
odsutna (%)	84 (86.1)	21 (25)	63 (75)	

Analizom povezanosti *WT1* ekspresije sa drugim molekularnim markerima kao što su *FLT3*, *NPM1* i *IDH1/2* mutacioni status, konstatovana je značajna asocijacija visokog nivoa ekspresije *WT1* i prisustva mutacija u *FLT3* genu ( $p=0.001$ ), gde se 60% pacijenata sa *WT1*<sup>visok</sup> statusom odlikovalo prisustvom mutacija u *FLT3* genu (*FLT3*<sup>+</sup>). Takođe, *WT1*<sup>visok</sup> status pokazao je visok nivo korelacije sa prisustvom *NPM1* mutacija ( $p=0.021$ ), gde je 56% pacijenata sa *WT1*<sup>visok</sup> statusom imalo mutaciju u *NPM1* genu (*NPM1*<sup>+</sup>). Kako je mutacioni status ova dva gena, tačnije prisustvo *ITD* mutacije u genu za *FLT3* (*FLT3-ITD*<sup>+</sup>) i prisustvo mutacija u genu za *NPM1*, veoma značajan za prognozu bolesti, pacijente smo podelili u 4 grupe: *FLT3-ITD*<sup>-</sup>/*NPM1*<sup>-</sup>, *FLT3-ITD*<sup>+</sup>/*NPM1*<sup>+</sup>, *FLT3-ITD*<sup>-</sup>/*NPM1*<sup>+</sup> i *FLT3-ITD*<sup>+</sup>/*NPM1*<sup>-</sup>. Detektovano je da je *FLT3-ITD*<sup>+</sup>/*NPM1*<sup>+</sup> dvostruko pozitivni status bio značajno povezan sa visokim nivoom *WT1* ekspresije ( $p=0.013$ ).

Kada su u pitanju mutacije u *IDH1/2* genu, od 22 *IDH*<sup>+</sup> pacijenta samo 7 pacijenata je imalo *WT1*<sup>visok</sup> status (3 *IDH1*<sup>+</sup> i 4 *IDH2*<sup>+</sup> pacijenta) (Tabela 1.). Nije utvrđena značajna statistička veza između *IDH1/2* mutacionog statusa i nivoa *WT1* ekspresije.

Analizom uticaja nivoa ekspresije *WT1* gena na prognozu i ishod obolelih od AML-NK, detektovano je da pacijenti sa *WT1*<sup>visok</sup> statusom imaju nižu stopu postizanja kompletne remisije (KR) ( $p=0.004$ ). Od 98 pacijenata koji su bili pozitivni za *WT1* ekspresiju, na dva pacijenta je primenjeno palijativno lečenje, a od preostalih 96 pacijenata njih 58 je postiglo kompletnu remisiju (60%). Među *WT1*<sup>visok</sup> pacijentima samo 9/25 je postiglo kompletnu remisiju (36%), u poređenju sa *WT1*<sup>nizak</sup> pacijentima gde je njih 49/71 (70%) dostiglo KR (Tabela 13.). Primenom multivarijantne analize logističke regresije potvrđeno je da *WT1*<sup>visok</sup> status predstavlja nezavisni nepovoljni faktor za postizanje KR (Tabela 14.).



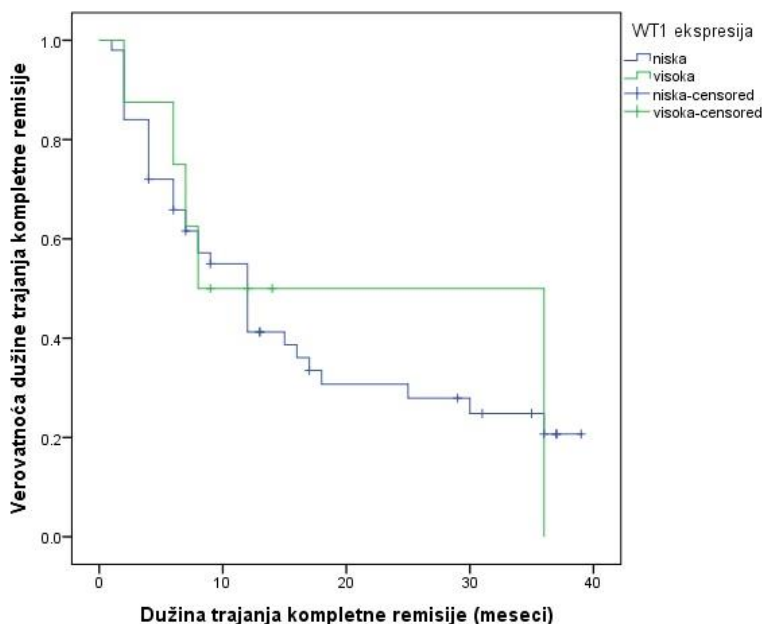
**Tabela 14.** Analiza logističke regresije za promjenljive koji imaju nepovoljni uticaj za postizanje kompletne remisije

Parametar	OR	95% CI	<i>p</i>
<i>WT1</i> ekspresija, <i>WT1</i> <sup>visok</sup>	0.281	0.098-0.810	0.019
Leukociti $\geq 30 \times 10^9/L$	0.309	0.116-0.823	0.019
<i>FLT3-ITD</i> , mutiran	0.566	0.187-1.714	0.314

OR- eng. „Odds ratio“; CI – eng. „Confidence interval“. Promjenljive koje su uključene u analizu logističke regresije su (*p* vrednost u Hi-kvadrat analizi): *WT1*<sup>visok</sup> status (0.004), WBC  $\geq 30 \times 10^9/L$  (0.004), *FLT3-ITD* mutiran (0.015)

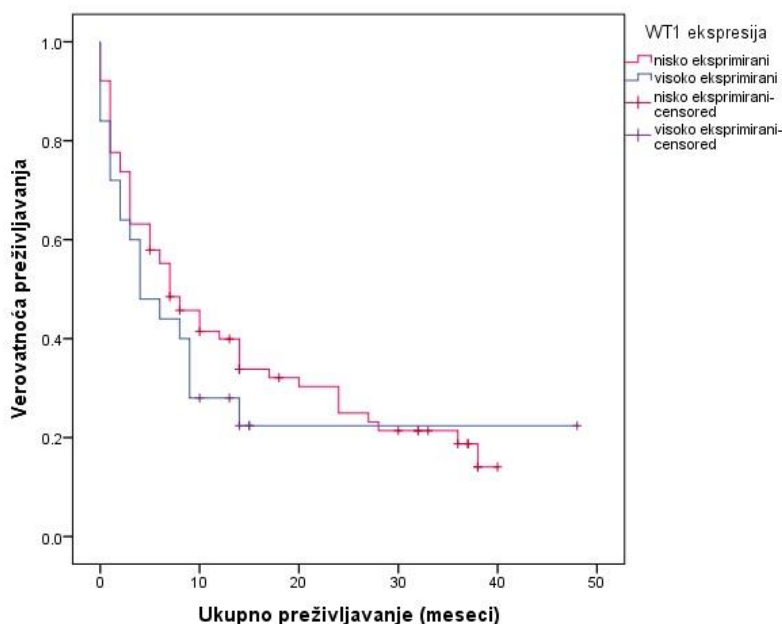
Visok nivo ekspresije *WT1* gena je bio povezan i sa prisustvom rezistencije na terapiju i sa pojavom rane smrti (*p*=0.007 i *p*=0.108, respektivno) (Tabela 13.).

Medijana dužine trajanja kompletne remisije (TKR) kod 58 pacijenata koji su je postigli bila je 12 meseci (2-47 meseci). Nije postojala statistički značajna razlika u dužini TKR između *WT1*<sup>visok</sup> i *WT1*<sup>nizak</sup> grupe pacijenata (medijana 9 meseci odnosno 12 meseci, *p*=0.794), što je potvrđeno i Kaplan-Majer analizom preživljavanja (*p*=0.981, LogRank=0.001) (Slika 11).



Slika 11. Kriva dužine trajanja kompletne remisije *de novo* AML-NK pacijenata u odnosu na visok ili nizak nivo *WT1* ekspresije. Pacijenti sa visokim nivoom *WT1* ekspresije (n=9, 4 cenzurisano) imali su medijanu dužine trajanja kompletne remisije od 36 meseci; pacijenti sa niskim nivoom *WT1* ekspresije (n=49, 20 cenzurisano) su imali medijanu dužine trajanja kompletne remisije od 12 meseci (Log rank=0.981; *p*=0.001)

Analizom dužine ukupnog preživljavanja (UP) kod  $WT1^{visok}$  grupe pacijenata detektovana je medjana UP od samo 4 meseca, ali poređenjem sa  $WT1^{nizak}$  grupom pacijenata (medijana UP je iznosila 8 meseci), primenom Kaplan-Majer analize nije utvrđena statistčki značajna razlika ( $p=0.160$ ,  $\text{LogRank}=1.975$ ) (Slika 12).



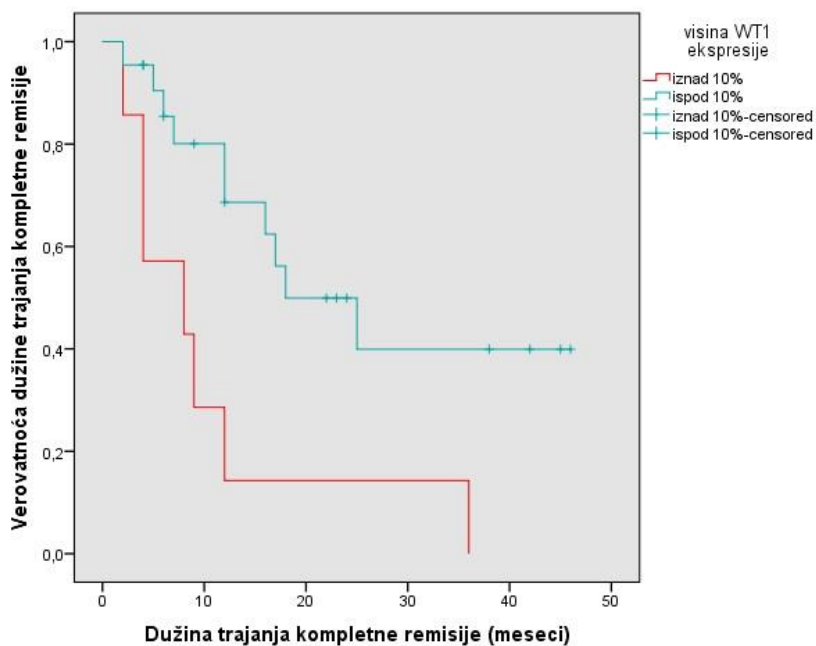
Slika 12. Kriva preživljavanja *de novo* AML-NK pacijenata sa niskim i visokim nivoom ekspresije  $WT1$ . Pacijenti sa visokim nivoom  $WT1$  ekspresije ( $n=25$ , 4 cenzurisano) imali su medijanu ukupnog preživljavanja od 4 meseci; pacijenti sa niskim nivoom  $WT1$  ekspresije ( $n=73$ , 14 cenzurisano) su imali medijanu ukupnog preživljavanja od 8 meseci ( $\text{Log rank}=1.975$ ;  $p=0.160$ )

#### IV - 2.2. Ekspresija $WT1$ gena kod AML-NK pacijenata nakon indukciono terapije

Ekspresija  $WT1$  je praćena ne samo na početku bolesti, već i u stadijumu nakon indukciono terapije, odnosno u kompletnoj remisiji ili prilikom relapsa bolesti. Od 58 pacijenta koji su postigli kompletnu remisiju, za njih 34 smo imali uzorke i u drugim stadijumima bolesti. Tačnije, kod 29 pacijenata određen je nivo  $WT1$  ekspresije nakon primljene indukciono terapije, odnosno u trenutku kompletne remisije, a za njih 13/29 nivo  $WT1$  ekspresije je

određen i prilikom relapsa bolesti. Kod 5 pacijenta nivo *WT1* ekspresije je određen samo na početku bolesti i prilikom njenog relapsa.

Medijana nivoa *WT1* ekspresije nakon indukciono terapije određen kod 29 pacijenata bio je 4.29 RU (0.00 - 126.68), dok je medijana nivoa ekspresije detektovanom na početku bolesti iznosila 610.41 (11.24 - 9967.39). U kompletnoj remisiji 14/29 pacijenata je pokazao nivo *WT1* ekspresije koji je niži od „cut off“ vrednosti određene za prisustvo *WT1* ekspresije (4.13 RU; vrednost dobjena uzimanjem medijane ekspresije *WT1* kod zdravih kontrola + 3x SD), tj. bili su negativni za ekspresiju *WT1*. Tačnije, samo 7/29 pacijenata je imalo ekspresiju *WT1* gena koja je viša od 10% od nivoa ekspresije detektovanog kod ovih pacijenata na početku bolesti (22.35 RU). Poredeći dužinu trajanja remisije kod ove dve grupe pacijenata (tj. kod one sa <10% i sa >10% ekspresijom *WT1*) detektovana je statistički značajna razlika (LogRank=7.474; p=0.006) (Slika 13). Medijana dužine trajanja kompletne remisije kod pacijenta sa ekspresijom *WT1* u KR nižom od 10% je bila 18 meseci, dok je kod onih pacijenata sa nivoom ekspresije višim od 10% ona iznosila samo 8 meseci.



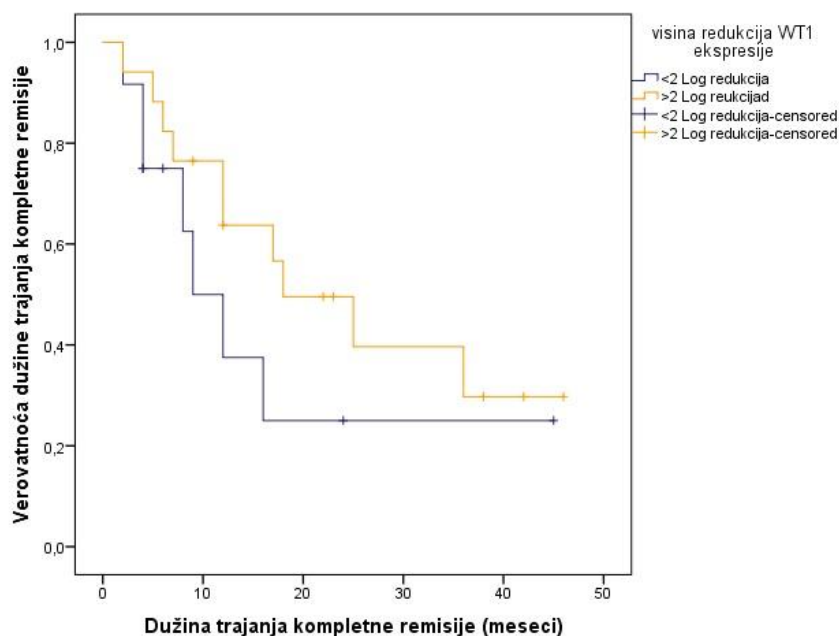
Slika 13. Kriva dužine trajanja kompletne remisije kod pacijenata u kompletnoj remisiji u odnosu na to da li je nivo *WT1* ekspresije viši ili niži od 10% ekspresije detektovane na početku bolesti. Pacijenti sa nivoom *WT1* ekspresije >10% (n=7, 0 cenzurisano) imali su medijanu dužine trajanja kompletne remisije od 8 meseci; pacijenti sa nivoom *WT1* ekspresije <10% (n=22, 12 cenzurisano) su imali medijanu dužine trajanja kompletne remisije od 18 meseci (Log rank=7.474; p=0.006).

Uticaj visine ekspresije *WT1* u KR, <10% u odnosu na >10%, nije imao statistički značaj (LogRank=0,248; p=0,618), mada su pacijenti sa ekspresijom <10% živeli duže (17 meseci u odnosu na 14 meseci).

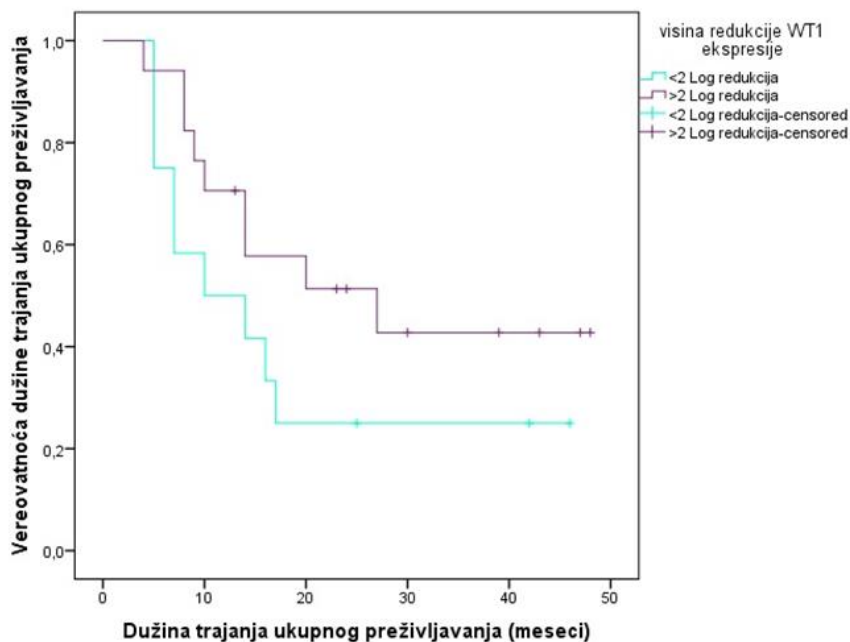
Da bismo ispitali potencijal *WT1* ekspresije kao markera za praćenje minimalne rezidualne bolesti (MRB), vrednost odnosa nivoa ekspresije *WT1* detektovanog na početku bolesti i u kompletnoj remisiji smo logaritmovali. Na taj način smo uveli pojam logaritamske redukcije nivoa ekspresije gena, čija visina govori o potencijalu koji dati marker ima kao marker za praćenje MRB. U slučaju da se ekspresija nekog markera od početka bolesti do postizanja KR smanji za 2 log vrednosti, smatra se da je u pitanju dobar marker za praćenje MRB. Isti princip smo primenili i u našoj kohorti pacijenata koji su postigli kompletnu remisiju, a koji su bili dostupni za kvantifikaciju *WT1* ekspresije (ukupno 29 pacijenata). Kod njih 17 je

detektovana log redukcija *WT1* ekspresije veća od 2 ( $>2$  log), dok je kod preostalih 12 pacijenata nivo redukcije bio manji od 2 ( $<2$  log).

Pacijenti u kompletnoj remisiji koji su imali nivo redukcije *WT1* ekspresije  $>2$  log, imali su duži period trajanja kompletne remisije od 18 meseci, u poređenju sa samo 9 meseci kod pacijenata koji su imali nivo redukcije *WT1* ekspresije  $< 2$  log (Slika 14). Takođe, logaritamska vrednost postignutog nivoa redukcije *WT1* ekspresije u kompletnoj remisiji, je imala uticaj na dužinu ukupnog preživljavanja pacijenata. Tako je medijana trajanja ukupnog preživljavanja kod pacijenata koji su nakon indukcije postigli nivo redukcije  $>2$  log, iznosila je 27 meseci, u poređenju sa pacijentima koji su imali nivo redukcije  $< 2$  log, čija je medijana ukupnog preživljavanja bila 10 meseci. Ipak, ova velika razlika u dužini ukupnog preživljavanja nije karakterisala statistički značajna razlika (LogRank=1,920;  $p=0,166$ ) (Slika 15).



Slika 14. Kriva dužine trajanja kompletne remisije kod pacijenata u kompletnoj remisiji u odnosu na nivo detektovane redukcije nivoa ekspresije *WT1* gena.. Pacijenti sa  $< 2$ log redukcije *WT1* ekspresije ( $n=12$ , 5 cenzurisano) imali su medijanu dužine trajanja kompletne remisije od 9 meseci; pacijenti sa  $> 2$ log redukcije nivoa *WT1* ekspresije ( $n=17$ , 7 cenzurisano) su imali medijanu dužine trajanja kompletne remisije od 18 meseci (Log rank=1.340;  $p=0.247$ ).



Slika 15. Kriva dužine trajanja ukupnog preživljavanja kod pacijenata u kompletnej remisiji u odnosu na nivo rektovane redukcije nivoa ekspresije WT1 gena.. Pacijenti sa < 2log redukcije WT1 ekspresije (n=12, 3 cenzurisano) imali su medijanu dužine trajanja ukupnog preživljavanja od 10 meseci; pacijenti sa > 2log redukcije nivoa WT1 ekspresije (n=17, 8 cenzurisano) su imali medijanu dužine trajanja ukupnog preživljavanja od 27 meseci (Log rank=1.920; p=0.166).

Od 34 pacijenta kod kojih je praćen nivo ekspresije WT1 i u drugim fazama bolesti, relapsiralo je njih 22. Za 18/22 relapsiranih pacijenata posedovali smo uparene dijagnoza/relaps uzorke. Određivanjem nivoa ekspresije WT1 gena u relapsu bolesti, primećeno je da ona uglavnom, po redu veličine, odgovara nivou ekspresije detektovanom na početku bolesti. Tačnije, samo 2/18 pacijenata u relapsu bolesti je imalo ekspresiju WT1 gena koj je niža od 10% od ukupne ekspresije detektovane kod pacijenata na početku bolesti (22,35 RU). Treba reći i da vrednosti WT1 ekspresije detektovane u uzocima pacijenata koji su bili u dugotrajnoj remisiji nije premašivala 10% od ukupne ekspresije detektovane kod pacijenata na početku bolesti.

S obzirom na ovakav nalaz može se reći da prilikom praćenja MRB, približavanje visine ekspresije *WT1* gena ovoj vrednosti od 10%, znači „najavu“ potencijalnog relapsa.

### **Sažetak**

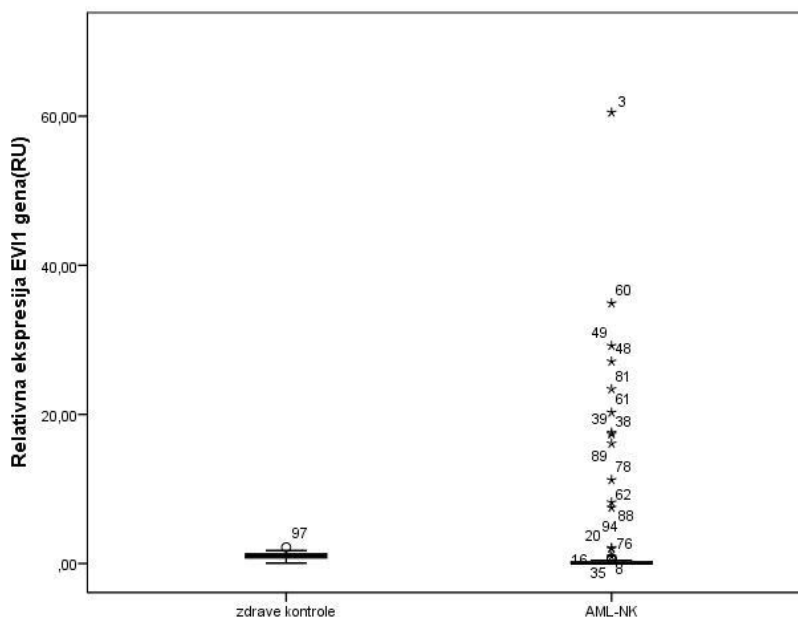
- Ispitivanje ekspresije *WT1* gena kod 104 *de novo* AML-NK pacijenata je pokazalo da je ekspresija ovog gena kod obolelih znatno viša od one detetovane kod zdravih kontrola. Takođe, pokazana je značajna povezanost visokog nivoa ekspresije *WT1* sa nepovoljnom prognozom, tj. sa visokim procentom blasta u koštanoj srži, sa dvostruko pozitivnim *FLT3-ITD*<sup>+</sup>/*NPM1*<sup>+</sup> statusom, sa nižom stopom postizanja kompletne remisije, rezistencije na terapiju i pojavom rane smrti. Multivarijantna analiza logističke regresije pokazala je da *WT1*<sup>visok</sup> status predstavlja nezavisni nepovoljni faktor za postizanje KR. Ispitivanjem nivoa ekspresije *WT1* nakon indukcione terapije, primećeno je da su pacijenti u kompletnoj remisiji koji su imali nivo redukcije *WT1* ekspresije > 2 log, imali duži period trajanja kompletne remisije, u poređenju sa pacijentima kod kojih je redukcija *WT1* ekspresije bila < 2 log, kod kojih je period trajanja kompletne remisije bio značajno kraći. Takođe, ukupno preživljavanje pacijenata sa > 2 log redukcijom *WT1* ekspresije bilo je duže od onih sa < 2 log redukcijom *WT1* ekspresije. Ovi rezultati govore o potencijalu koji *WT1* ekspresija ima kao mogući marker za praćenje MRB.

### IV - 3. Kvantifikacija ekspresije *EVII* gena kod AML-NK pacijenata

Ekspresija *EVII* je praćena “real-time” PCR metodom. Relativni nivo ekspresije je određen primenom ddCt metode, gde su kao kalibrator korišćene zdrave kontrole. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama (RU).

#### IV - 3.1. Ekspresija *EVII* gena kod de novo AML-NK pacijenata

Nivo ekspresije *EVII* gena je kvantifikovan u grupi od 104 *de novo* AML-NK pacijenta, kao i kod 10 uzoraka zdravih kontrola. Medijana nivoa ekspresije *EVII* transkripta kod *de novo* AML-NK pacijenata iznosila je 0.06 (0.00–60.50), dok je srednja vrednost iznosila  $2.76 \pm 0.85$ . Ovaj nivo ekspresije se značajno razlikovao od nivoa ekspresije koji je detektovan kod zdravih kontrola (srednja vrednost  $1.00 \pm 0.59$ , medijana 1.00 (0.06-2.18) ( $p=0.001$ ) (Slika 16).



Slika 16. Box-plot grafički prikaz ekspresije *EVII* (RU) kod AML-NK pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.



Analizom vrednosti *EVII* ekspresije kod obolelih, primećeno je da približno 50% AML-NK pacijenata ne pokazuje ekspresiju ovog gena, ili je njen nivo na ivici detektabilne vrednosti (53/104 pacijenta je imalo *EVII* ekspresiju ispod najniže detektovane vrednosti među zdravim kontrolama,  $\leq 0.6$ ).

Vrednost 2.77 RU, dobijena zbirom medijane vrednosti nivoa ekspresije zdravih kontrola i trostruke vrednosti standardne greške ( $1.00 + 3 \times 0.59$ ), uzeta je kao "cut off" vrednost, iznad koje se smatra da je uzorak pozitivan na ekspresiju *EVII*. Nakon toga naša grupa AML-NK pacijenata imala je 12 pacijenta pozitivnih na *EVII* ekspresiju (*EVII*<sup>+</sup>). To znači da je od 104 pacijenata, njih 11.5% imalo ekspresiju koja je bila veća od one detektovane kod zdravih kontrola.

Poredeći nivo *EVII* ekspresije sa kliničkim karakteristikama *de novo* AML-NK pacijenata, uočeno je da su *EVII*<sup>+</sup> pacijenti pokazali tendenciju da imaju niži procenat blasta u koštanoj srži ( $p=0.0055$ ). Detektovana je značajna udruženost uvećane *EVII* ekspresije sa CD34<sup>+</sup> statusom, koji predstavlja faktor loše prognoze (10/12 *EVII*<sup>+</sup> pacijenata je bilo ujedno i CD34<sup>+</sup>;  $p=0.057$ ). Nije uočena značajna asocijacija sa drugim prognostički značajnim faktorima kao što su starost, ukupan broj leukocita, trombocita, procenat blasta u perifernoj krvi itd. Najviše pacijenata sa *EVII*<sup>+</sup> statusom detektovano je u M0 i M4 FAB grupi, ali bez statističke značajnosti. U tabeli 2. su prikazane kliničke karakteristike *de novo* AML-NK pacijenata, kategorizovane na osnovu nivoa *EVII* ekspresije.

Analizom povezanosti *EVII* ekspresije sa *FLT3*, *NPM1* i *IDH1*, odnosno *IDH2* mutacionim statusom, konstatovali smo da se *EVII*<sup>+</sup> grupa pacijenata odlikovala odsustvom *NPM1* mutacija, pokazano  $\chi^2$  testom ( $p=0.036$ ), s obzirom da je samo 1/12 (8%) *EVII*<sup>+</sup> pacijenata bilo *NPM1* pozitivno (*NPM1*<sup>+</sup>), za razliku od *EVII*<sup>-</sup> pacijenata kod kojih je 36/92 (39%) bilo *NPM1*<sup>+</sup>. Takođe, *EVII*<sup>+</sup> grupu pacijenata je karakterisalo odsustvo *FLT3/ITD* mutacija, ali bez statističke značajnosti ( $p=0.156$ ). Povećani nivo *EVII* ekspresije bio je u obrnutoj korelaciji sa prisustvom mutacija u *IDH1* odnosno *IDH2* genu, s obzirom da je samo 1/12 (8%) *EVII*<sup>+</sup> pacijenata bilo *IDH*<sup>+</sup>.

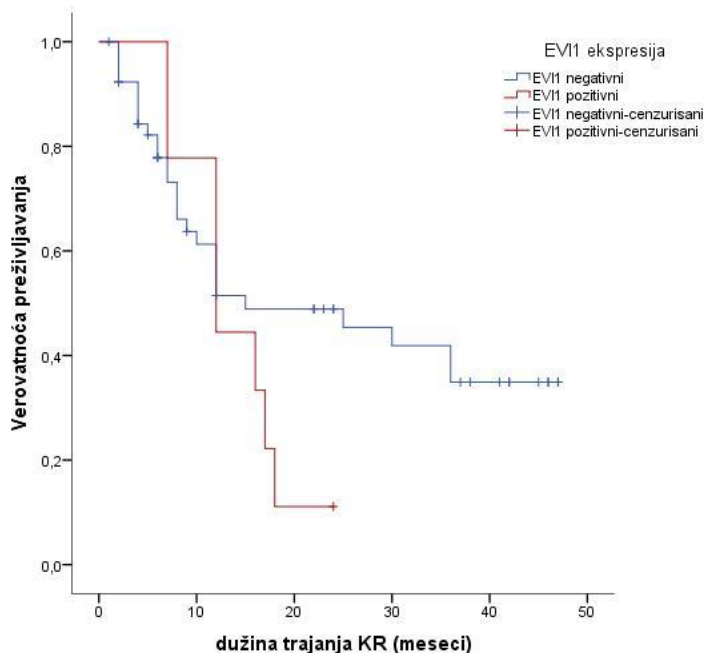
Analizom uticaja nivoa ekspresije *EVII* gena na prognozu i ishod obolelih, detektovano je da *EVII*<sup>+</sup> AML-NK pacijenti koji su postigli kompletnu remisiju (9/12 pacijentata) nakon inicijalne terapije, imaju višu stopu relapsa bolesti ( $p=0.034$ ). Uvećana ekspresija *EVII* nije imala uticaj na pojavu rane smrti, rezistencije na terapiju i pojavu smrtnog ishoda (Tabela 15).

**Tabela 15.**

Kliničke karakteristike *de novo* AML-NK pacijenata podjeljenih na osnovu nivoa *EVII* ekspresije

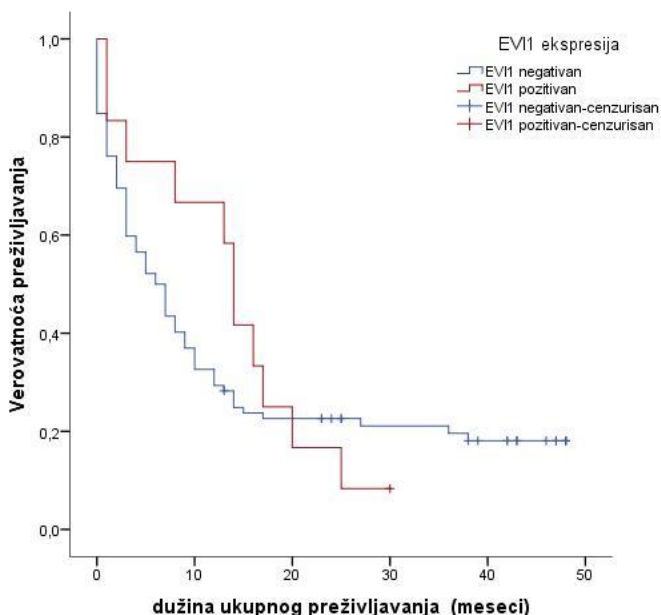
Parameter	Total (n=104)	<i>EVII</i> <sup>+</sup> (n=12)	<i>EVII</i> <sup>-</sup> (n=92)	<i>p</i> value
<b>Pol</b>				0.174
Muškarci (%)	59 (57)	9 (15)	50 (85)	
Žene (%)	45 (43)	3 (7)	42 (93)	
<b>Starost</b> , godine, medijana, (opseg)	54(19-78)	53(44-78)	54(17-73)	0.710
<b>Broj leukocita</b> (x10 <sup>9</sup> /L) medijana, (opseg)	16.8 (0.5-195)	2.05 (0.9-118)	18.35 (0.5-195)	0.367
<b>Hemoglobin</b> (g/L) medijana, (opseg)	97.0 (6-178)	94.50 (27-130)	97.0 (6-178)	0.888
<b>Broj trombocita</b> (x10 <sup>9</sup> /L) medijana, (opseg)	72.0 (1-420)	79.0 (12-109)	72.0 (1-420)	0.246
<b>LDH</b> (U/L) medijana, (opseg)	812.5 (273-7180)	350.5 (280-734)	875.5 (273-7180)	0.931
<b>Blasti u perifernoj krvi</b> (%) medijana, (opseg)	30.0 (1-96)	15.0 (9-95)	31 (1-96)	0.292
<b>Blasti u koštanoj srži</b> (%) medijana, (opseg)	71.0 (30-97)	56.5 (30-90)	74.0 (30-97)	0.055
<b>FAB</b> (%)				0.176
M0	9 (9)	3 (33)	6 (67)	
M1	19 (18)	2 (10)	17 (89)	
M2	29 (28)	2 (7)	27 (93)	
M4	24 (23)	4 (17)	20 (83)	
M5	23 (22)	1 (4)	22 (96)	
<b>Kompletna remisija</b>				0.130
da (%)	62(60)	9 (14)	53(85)	
ne (%)	40(40)	2(5)	38 (95)	
<b>Rezistencija</b>				0.116
da (%)	16 (15)	0 (0)	16 (100)	
ne (%)	88 (85)	12 (14)	76 (86)	
<b>Relaps</b>				0.034
da(%)	35(56)	8 (23)	27 (77)	
ne(%)	27(43)	1 (4)	26 (96)	
<b>FLT3</b>				0.208
prisutna (%)	34 (33)	2 (6)	32 (94)	
odsutna (%)	70 (67)	10 (14)	60 (86)	
<b>FLT3-ITD</b>				0.156
prisutna (%)	26 (25)	1 (4)	25 (96)	
odsutna (%)	78 (75)	11 (14)	67 (86)	
<b>NPM1</b>				0.036
prisutna (%)	37 (64)	1 (3)	36 (97)	
odsutna (%)	67 (36)	11 (16)	56 (84)	
<b>IDH</b>				0.221
prisutna (%)	23 (22)	1 (4)	22 (96)	
odsutna (%)	81 (78)	11 (14)	70 (86)	
<b>CD34<sup>+</sup></b>				0.057
pozitivan(%)	59(57)	10 (17)	49 (83)	
negativan(%)	43(41)	2 (5)	41(95)	

Kaplan-Majer analizom je izvršeno poređenje dužine trajanja kompletne remisije u *EVII*<sup>+</sup> i *EVII*<sup>-</sup> grupi AML-NK pacijenata. Pokazano je da su *EVII*<sup>+</sup> pacijenti imali medijanu trajanja remisije od 15 meseci, u poređenju sa *EVII*<sup>-</sup> kod kojih je trajanje remisije iznosilo 12 meseci, ali nije detektovana statistički značajna razlika (Slika 17).



Slika 17. Kriva dužine trajanja kompletne remisije *EVII*<sup>+</sup> i *EVII*<sup>-</sup> *de novo* AML-NK pacijenata koji su postigli kompletnu remisiju. *EVII*<sup>+</sup> pacijenti (n=9, 1 cenzurisano) imali su medijanu dužine trajanja remisije od 12 meseci; *EVII*<sup>-</sup> pacijenti (n=53, 26 cenzurisano) su imali medijanu dužine trajanja kompletne remisije od 9 meseci (Log rank=1.198; p=0.274).

Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja pacijenata sa visokom i niskom ekspresijom *EVII*, međutim iako je medijana ukupnog preživljavanja bila duža u grupi *EVII*<sup>+</sup> pacijenata u poređenju sa *EVII*<sup>-</sup> grupom (14 prema 6 meseci), nije pokazana statistički značajna razlika u preživljavanju između ove dve grupe pacijenata (Slika 18).



Slika 18. Kriva dužine trajanja ukupnog preživljavanja *EVII*<sup>+</sup> i *EVII*<sup>-</sup> *de novo* AML-NK pacijenata. *EVII*<sup>+</sup> pacijenti (n=12, 1 cenzurisano) imali su medijanu trajanja ukupnog preživljavanja od 14 meseci; *EVII*<sup>-</sup> pacijenti (n=92, 18 cenzurisano) su imali medijanu trajanja ukupnog preživljavanja od 6 meseci (Log rank=0.253; p=0.615).

### Sažetak

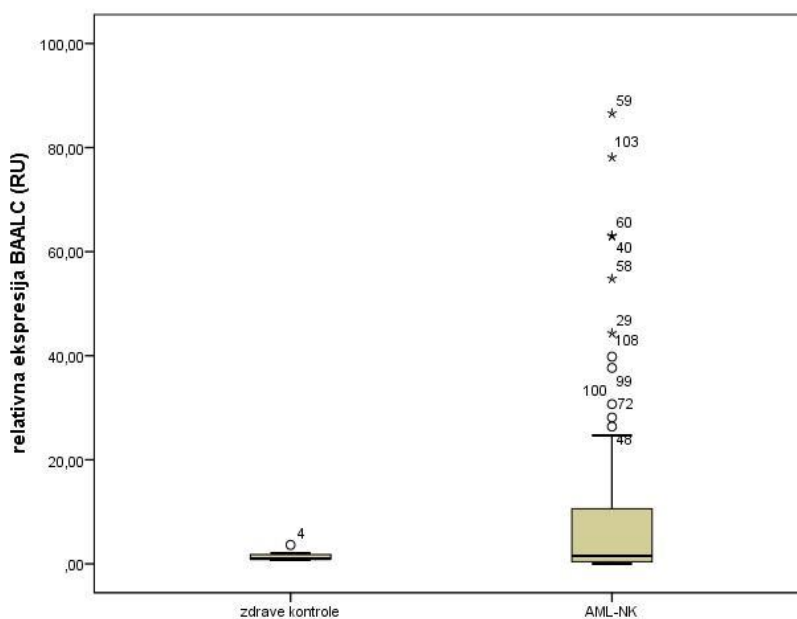
- Ispitivanje ekspresije *EVII* gena kod 104 *de novo* AML-NK pacijenata pokazalo je da je ekspresija ovog gena kod obolelih značajno uvećana samo kod 11.5% pacijenata. Štaviše, u oko 50% pacijenata nije bilo moguće registrovati ekspesiju *EVII* ili je ona bila na granici detektabilnosti. Takođe, pokazano je da kod *EVII*<sup>+</sup> pacijentata postoji inverzna asocijacija sa prisustvom mutacija u *NPM1*, *FLT3* i *IDH1/IDH2* genima. Pacijenti sa uvećanom *EVII* ekspresijom su imali značajno veću učestalost pojave relapsa bolesti u odnosu na *EVII*<sup>-</sup> pacijente, bez uticaja na dužinu trajanja kompletne remisije i ukupnog preživljavanja obolelih.

#### IV - 4. Kvantifikacija ekspresije BAALC gena kod AML-NK pacijenata

Ekspresija *BAALC* gena je praćena “real-time” PCR metodom. Relativni nivo ekspresije je određen primenom ddCt metode, gde su kao kalibrator korišćene zdrave kontrole. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama (RU).

##### IV - 4.1. Ekspresija BAALC gena kod *de novo* AML-NK pacijenata

Nivo ekspresije *BAALC* gena je kvantifikovan u grupi od 111 *de novo* AML-NK pacijenta, kao i kod 9 uzoraka zdravih kontrola. Medijana vrednosti ekspresije *BAALC* transkripta kod *de novo* AML-NK pacijenata iznosila je 1.55, opseg od 0.01–4246.00, srednja vrednost  $47.27 \pm 38.20$ . Ovaj nivo ekspresije nije bio statistički različit od nivoa ekspresije koji je detektovan kod zdravih kontrola 1.00, opseg ekspresije od 0.65-3.63, (srednja vrednost  $1.44 \pm 0,32$ ) (U-test,  $p=0,488$ ) (Slika 19.).

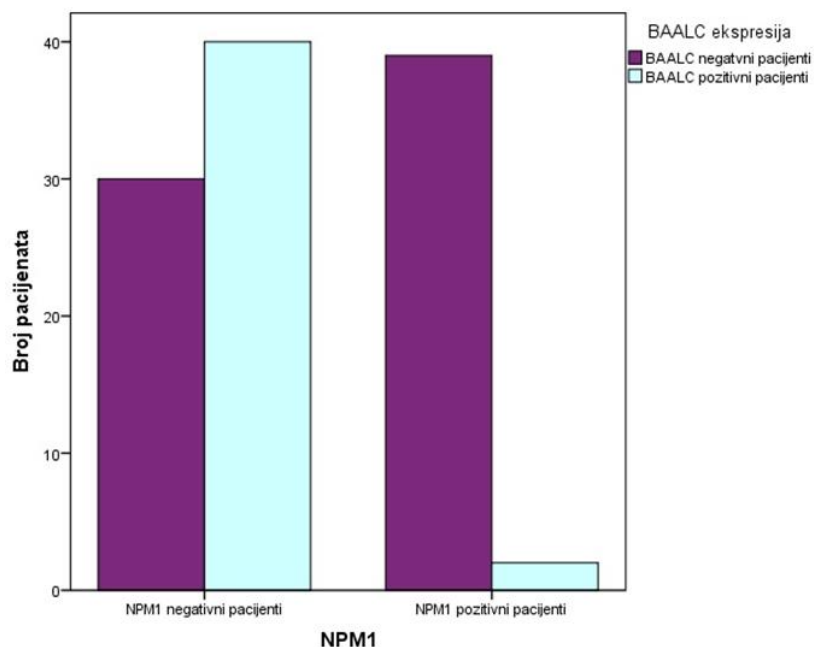


Slika 19. Box-plot grafički prikaz ekspresije *BAALC* (RU) kod AML-NK pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane. Radi preglednosti na slici nije prikazana najviša vrednost detektovana kod AML-NK pacijenata (4246.00)

U daljoj analizi, vrednost 3.85 RU, dobijena zbirom medijane nivoa ekspresije zdravih kontrola i trostruke vrednosti standardne greške, uzeta je kao “cut off” vrednost, iznad koje se smatra da je uzorak pozitivan na ekspresiju *BAALC*. Nakon toga naša grupa AML-NK pacijenata imala je 42 (37.8%) pacijenta pozitivnih na *BAALC* ekspresiju (*BAALC*<sup>+</sup>) i 69 (62.2%) pacijenata negativnih na *BAALC* ekspresiju (*BAALC*<sup>-</sup>). Medijana ekspresije kod *BAALC*<sup>+</sup> AML-NK pacijenata iznosila je 16.89 (4.19-4246.00).

Poređenjem povezanosti nivoa *BAALC* ekspresije sa kliničkim parametrima nisu uočene značajne korelacije. Detektovana je prevalenca *BAALC*<sup>+</sup> pacijenata među populacijom muškog pola; 28/42 (66.7%) *BAALC*<sup>+</sup> pacijenta bili su muškog pola, za razliku od *BAALC*<sup>-</sup> pacijenata gde je taj procenat iznosio 49.2% odnosno 34/69 *BAALC*<sup>-</sup> pacijenata (p=0.074). Takođe, u grupi *BAALC*<sup>+</sup> pacijenata najzastupljeniji su bili pripadnici M2 FAB podtipa, koju je imalo 13/42 (31%), za razliku od *BAALC*<sup>-</sup> pacijenata, gde je najviše pacijenata (20/69 (29%)) pripadalo podtipu M5 (p=0.09).

Analizom povezanosti *BAALC* ekspresije sa drugim molekularnim markerima kao što su *FLT3*, *NPM1* i *IDH1*, odnosno *IDH2* mutacionim statusom, utvrđeno je da se *BAALC*<sup>+</sup> grupa pacijenata odlikovala odsustvom *NPM1* mutacija ( $\chi^2$  test, p<0.001). Naime, samo 2/42 (5%) *BAALC*<sup>+</sup> pozitivna pacijenta su pokazala prisustvo *NPM1* mutacije (Slika 20). Prisustvo mutacija u *FLT3*, *IDH1* i *IDH2* genima nije se značajno razlikovalo između *BAALC*<sup>+</sup> i *BAALC*<sup>-</sup> grupe pacijenata. Međutim, podelom pacijenata u odnosu na njihov *FLT3-ITD/NPM1* mutacioni status na 4 grupe (-/-, +/+, +/- i +/-) pokazano je da ni jedan pacijent sa *FLT3-ITD*<sup>+</sup>/*NPM1*<sup>-</sup> statusom nije bio pozitivan za *BAALC* ekspresiju odnosno nije pripadao grupi *BAALC*<sup>+</sup> pacijenata.



Slika 20. Grafički prikaz povezanosti nivoa BAALC ekspresije i prisustva/odsustva *NPM1* mutacije.  $\chi^2$  testom je pokazana statistički značajna povezanost *BAALC*<sup>+</sup> pacijenata sa odsustvom *NPM1* mutacija, ( $p < 0.001$ ). Naime, samo 2/42 (5%) *BAALC*<sup>+</sup> pozitivna pacijenta su pokazala prisustvo *NPM1* mutacije

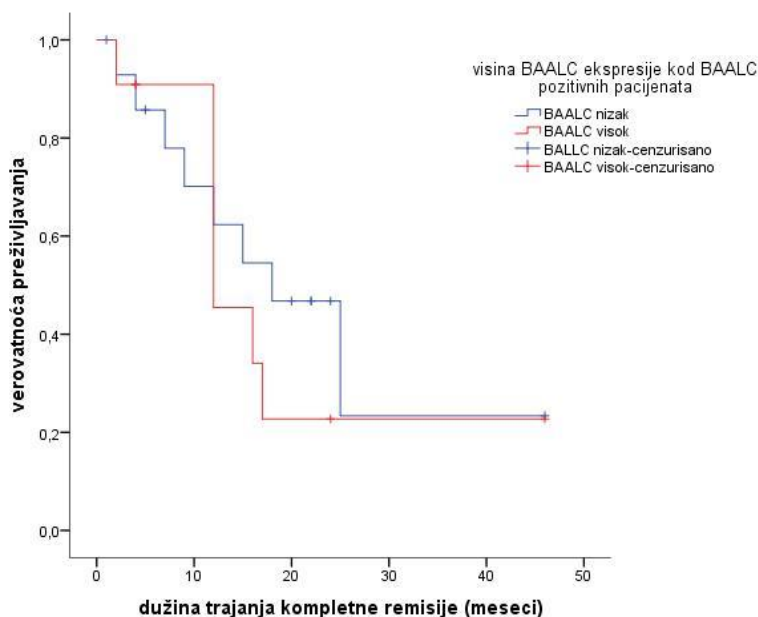
U našoj grupi pacijenata nije pokazana korelacija nivoa *BAALC* ekspresije sa *IDH1* ili *IDH2* mutacijama.

Kako bi ispitali uticaj nivoa ekspresije *BAALC* gena na prognozu bolesti, kao i povezanost sa kliničkim i drugim prognostičkim parametrima, grupu *BAALC*<sup>+</sup> pacijenata smo podelili na one sa niskim (*BAALC*<sup>nizak</sup>) i visokim (*BAALC*<sup>visok</sup>) nivoom ekspresije. Kao “cut off” vrednost uzeli smo medijanu ekspresije *BAALC* kod *de novo BAALC*<sup>+</sup> AML-NK pacijenata, koja iznosi 16.89 RU. U trenutku postavljanja dijagnoze, 50% (21/42) *BAALC*<sup>+</sup> pacijenata je imalo visok nivo ekspresije *BAALC* gena.

*NPM1* mutacije nisu detektovane ni kod jednog pacijenta u *BAALC*<sup>visok</sup> grupi, *FLT3/ITD* mutacije su detektovane kod samo 5 pacijenta, pa je stoga najbrojnija bila grupa pacijenata sa takozvanim *FLT3-ITD/NPM1*<sup>-</sup> dvostruko negativnim statusom (16/21 *BAALC*<sup>visok</sup>). Pacijenti sa *BAALC*<sup>visok</sup> statusom su imali tendenciju ka nižoj stopi postizanja kompletne remisije (42% prema 58% detektovanim kod *BAALC*<sup>nizak</sup> grupe,  $p=0.137$ ), kao i ka rezistenciji na terapiju (67% prema 33% detektovanim kod *BAALC*<sup>nizak</sup> grupe,  $p=0.378$ ).

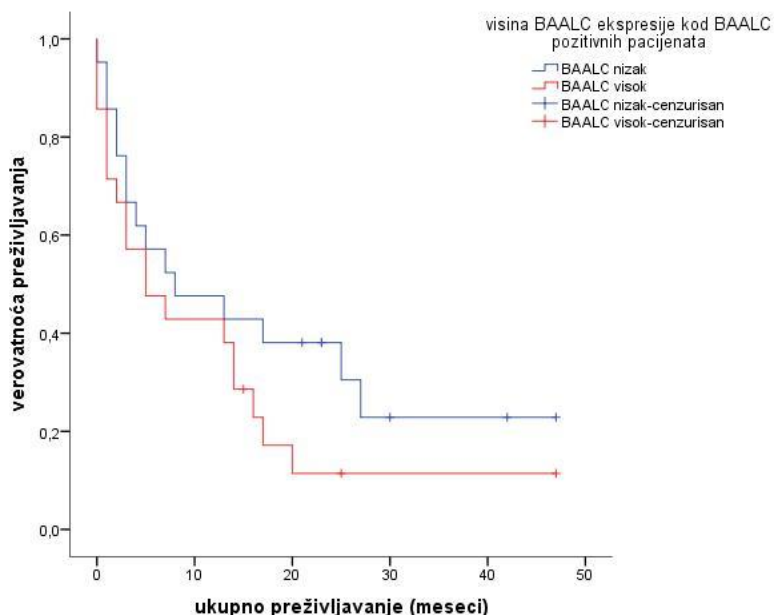


Kaplan-Majer analizom je izvršeno poređenje dužine trajanja kompletne remisije u okviru grupe od 26 AML-NK *BAALC*<sup>+</sup> pacijenata koji su postigli kompletnu remisiju, u odnosu na visok ili nizak nivo *BAALC* ekspresije. Pacijenti sa *BAALC*<sup>visok</sup> statusom su imali kraće trajanje kompletne remisije od 12 meseci, u poređenju sa 18 meseci detektovanim u *BAALC*<sup>nizak</sup> grupi pacijenata, ali ova razlika nije bila statistički značajna ( $p=0.609$ ; Log Rank=0.261) (Slika 21).



Slika 21. Kaplan-Majer analiza dužine trajanja kompletne remisije. Pacijenti sa visokim nivoom *BAALC* ekspresije ( $n=11$ , 4 cenzurisano) imali su medijanu dužine trajanja remisije od 12 meseci; pacijenti sa niskim nivoom *BAALC* ekspresije ( $n=15$ , 7 cenzurisano) su imali medijanu dužine trajanja kompletne remisije od 18 meseci (Log rank=0.609;  $p=0.261$ )

Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja pacijenata sa visokom i niskom ekspresijom *BAALC*, međutim, iako je medijana dužine ukupnog preživljavanja bila kraća u *BAALC*<sup>visok</sup> grupi pacijenata (5 meseci) u poređenju sa grupom koja je imala nizak nivo *BAALC* ekspresije (8 meseci), nije pokazana statistički značajna razlika u preživljavanju između ove dve grupe pacijenata ( $p=0.196$ ; Log Rank=1.675) (Slika 22).



Slika 22. Kriva preživljavanja *de novo* AML-NK pacijenata sa niskim i visokim nivoom *BAALC* ekspresije. Pacijenti sa visokim nivoom *BAALC* ekspresije (n=21, 3 cenzurisano) imali su medijanu ukupnog preživljavanja od 5 meseci; pacijenti sa niskim nivoom *BAALC* ekspresije (n=21, 6 cenzurisano) su imali medijanu ukupnog preživljavanja od 8 meseci (Log rank=0.196; p=1.675).

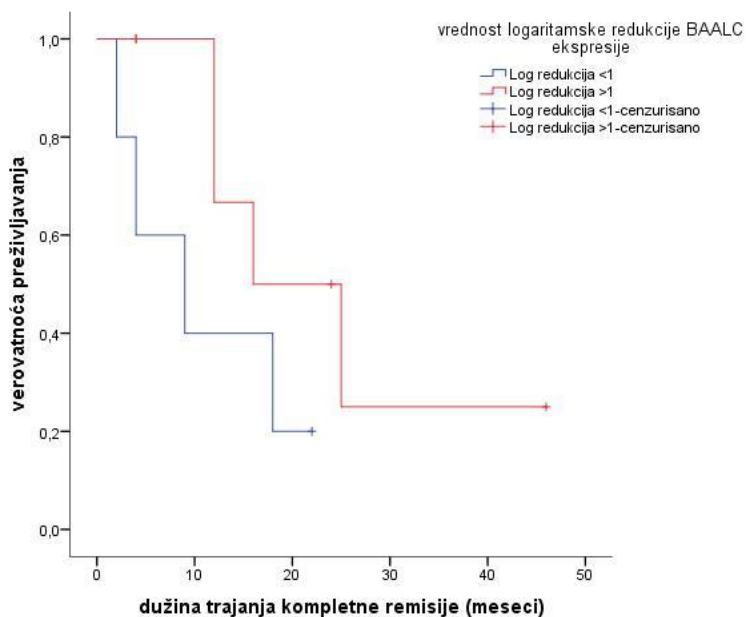
#### IV - 4.2. Ekspresija *BAALC* gena kod AML-NK pacijenata nakon indukciono terapije

Ekspresija *BAALC* gena je praćena ne samo na početku bolesti, već i u kompletnoj remisiji i/ili prilikom relapsa bolesti. Od 68 pacijenata koji su postigli kompletnu remisiju, za njih 34 smo imali uzorke i u drugim stadijumima bolesti. Tačnije, kod 29 pacijenata određen je nivo *BAALC* ekspresije nakon primljene indukciono terapije, odnosno u trenutku kompletne remisije, a za njih 10/29 nivo *BAALC* ekspresije je određen i prilikom relapsa bolesti. Kod 5 pacijenata nivo *BAALC* ekspresije je određen samo na početku bolesti i prilikom njenog relapsa.

Nakon indukciono terapije bili su dostupni uzorci 29 pacijenata čija je medijana ekspresije iznosila 1.09 (opseg 0.11-6.21). U kompletnoj remisiji samo 2/29 pacijenata su pokazala nivo *BAALC* ekspresije koji je viši od „cut off“ vrednosti određene za prisustvo *BAALC* ekspresije (3.85 RU) tj. bili su *BAALC*<sup>+</sup>.

Da bismo ispitili potencijal *BAALC* ekspresije kao markera za praćenje MRB, vrednost odnosa nivoa ekspresije *BAALC* detektovanog na početku bolesti i u kompletnoj remisiji smo logaritmovali. Ovim su bili obuhvaćeni samo pacijenti koji su na dijagnozi okarakterisani kao *BAALC*<sup>+</sup>, njih 15. Na taj način smo uveli pojam logaritamske redukcije nivoa ekspresije gena, čija visina govori o potencijalu koji dati marker ima kao marker za praćenje MRB. Da bi se za neki marker reklo da je dobar za praćenje MRB, potrebno je da se njegova ekspresija nakon indukciono terapije smanji za minimum 1 log vrednosti. Kod 15 pacijenata, koji su bili *BAALC*<sup>+</sup> pri dijagnozi, kod njih 8 je detektovana log redukcija *BAALC* ekspresije veća od 1 (>1 log), dok je kod preostalih 5 pacijenata nivo redukcije bio manji od 1 (<1 log).

Visina detektovane redukcije je imala uticaja na stopu relapsa, odnosno pacijenti sa >1 log redukcijom su u 50% slučajeva ulazili u relaps, za razliku od <1 log pacijenata koji su imali relaps u 80% slučajeva (p=0.279). Pacijenti u kompletnoj remisiji koji su imali nivo redukcije *BAALC* ekspresije >1 log, imali su duži period trajanja kompletne remisije od 16 meseci, u poređenju sa samo 9 meseci kod pacijenata koji su imali nivo redukcije *BAALC* ekspresije <1 log (Slika 23).



Slika 23. Kriva dužine trajanja kompletne remisije kod pacijenata u odnosu na vrednost detektovane redukcije ekspresije *BAALC* gena. Pacijenti sa <1log redukcije *BAALC* ekspresije (n=5, 1 cenzurisano) imali su medijanu dužine trajanja kompletne remisije od 9 meseci; pacijenti sa >1log redukcije nivoa *BAALC* ekspresije (n=8, 4 cenzurisano) su imali medijanu dužine trajanja kompletne remisije od 16 meseci (Log rank=2.009; p=0.156).

Od 34 pacijenta kod kojih je praćen nivo ekspresije *BAALC* i u drugim fazama bolesti, relapsiralo je njih 22. Za 15/22 relapsiranih pacijenata posedovali smo uparene dijagnoza/relaps uzorke. Od ovih 15 dostupnih pacijenata samo njih 7 je imalo *BAALC*<sup>+</sup> status. Njihova medijana ekspresije *BAALC* gena u relapsu bolesti je iznosila 8.8 (0.05-19.44). Samo kod 2/7 *BAALC*<sup>+</sup> pacijenata je nivo ekspresije ovog gena u relapsu bolesti bio niži od „cut-off“ vrednosti (3.85 RU) koja determiniše prisustvo ekspresije veće od vrednosti nađene kod zdravih kontrola. Kod ostalih pacijenata je ona bila visoka, ali nikada nije dostizala početni nivo detektovan na prezentaciji bolesti.

### **Sažetak**

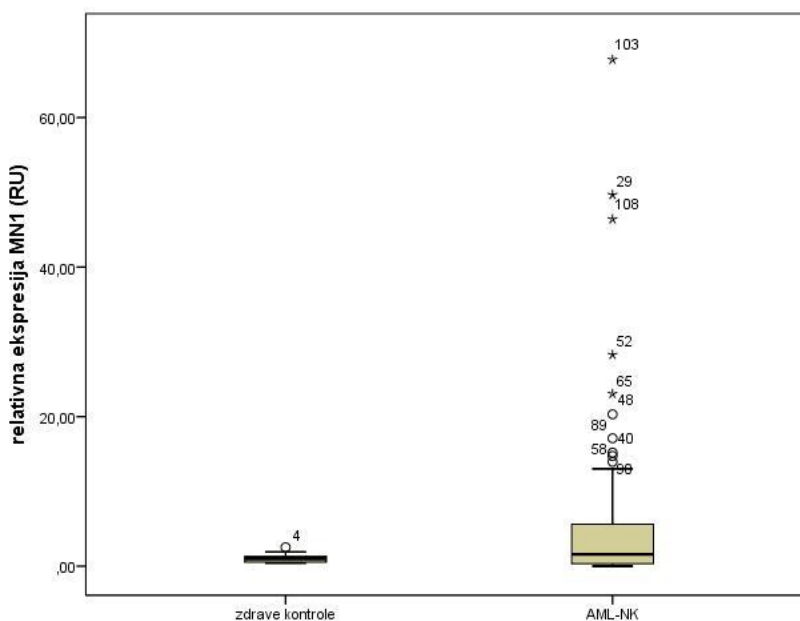
- Ispitivanje ekspresije *BAALC* gena kod 111 *de novo* AML-NK pokazalo je da je ona bila viša od nivoa detektovanog među zdravim kontrolama u 38% slučajeva. *BAALC*<sup>+</sup> pacijenti sa visokom ekspresijom (*BAALC*<sup>visok</sup>) imali su tendenciju ka nižoj stopi postizanja kompletne remisije i ka njenom kraćem trajanju. Iako su ovi pacijenti pokazivali kraće ukupno preživljavanje, statističkom analizom nije pokazano da povišena ekspresija *BAALC* predstavlja nepovoljan prognostički faktor. Ispitivanjem nivoa ekspresije *BAALC* nakon indukciono terapije, primećeno je da su *BAALC*<sup>+</sup> pacijenti u kompletnoj remisiji koji su imali nivo redukcije *BAALC* ekspresije > 1 log, imali duži period trajanja kompletne remisije, u poređenju sa pacijentima kod kojih je redukcija *BAALC* ekspresije bila < 1 log, kod kojih je period trajanja kompletne remisije bio značajno kraći. Ovi rezultati govore o potencijalu koji *BAALC* ekspresija ima kao mogući marker za praćenje MRB.

## IV - 5. Kvantifikacija ekspresije *MNI* gena kod AML-NK pacijenata

Ekspresija *MNI* gena je praćena “real-time” PCR metodom. Relativni nivo ekspresije je određen primenom ddCt metode, gde su kao kalibrator korišćene zdrave kontrole. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama (RU).

### IV - 5.1. Ekspresija *MNI* gena kod *de novo* AML-NK pacijenata

Nivo ekspresije *MNI* gena je kvantifikovan u grupi od 111 *de novo* AML-NK pacijenta, kao i kod 9 uzoraka zdravih kontrola. Medijana vrednosti ekspresije *MNI* transkripta kod *de novo* AML-NK pacijenata iznosila je 1.59, opseg od 0.00–67.74, srednja vrednost  $5.05 \pm 0.93$ . Ovaj nivo ekspresije nije bio statistički različit od nivoa ekspresije koji je detektovan kod zdravih kontrola 1.00, opseg ekspresije od 0.40-2.53, (srednja vrednost  $1.16 \pm 0.23$ ) (U-test,  $p=0,166$ ) (Slika 24.).

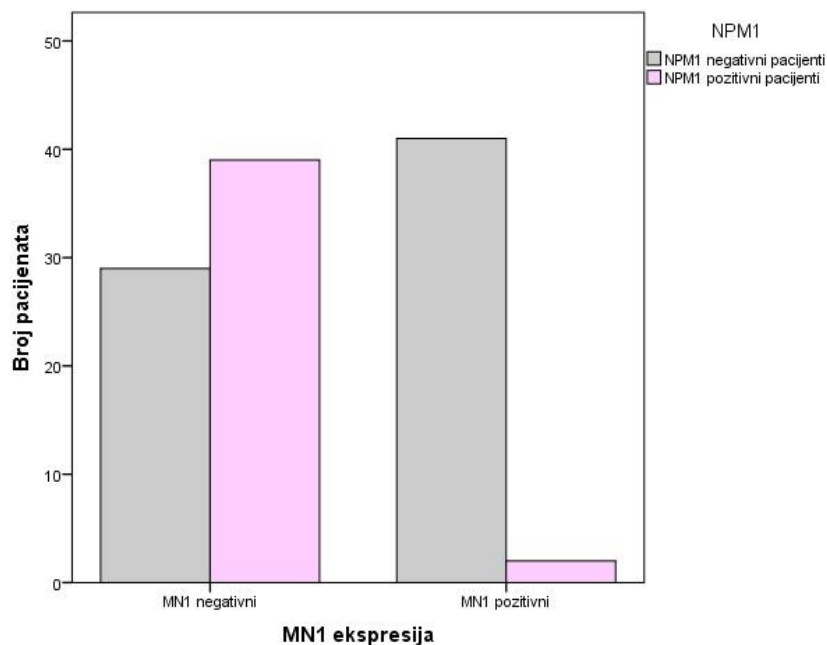


Slika 24. Box-plot grafički prikaz ekspresije *MNI* (RU) kod AML-NK pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

U daljoj analizi, vrednost 3.07 RU, dobijena zbirom medijane nivoa ekspresije zdravih kontrola i trostruke vrednosti standardne greške, uzeta je kao “cut off“ vrednost, iznad koje se smatra da je uzorak pozitivan na ekspresiju *MNI*. Nakon toga naša grupa AML-NK pacijenata imala je 43 (39%) pacijenta pozitivnih na *MNI* ekspresiju (*MNI*<sup>+</sup>) i 68 (61%) pacijenata negativnih na *MNI* ekspresiju (*MNI*<sup>-</sup>). Medijana ekspresije kod *MNI*<sup>+</sup> AML-NK pacijenata iznosila je 6.47 (3.32-67.74).

Poređenjem povezanosti nivoa *MNI* ekspresije sa kliničkim parametrima nisu uočene značajne korelacije. Detektovana je prevalenca *MNI*<sup>+</sup> pacijenata među populacijom muškog pola; 31/43 (72%) *MNI*<sup>+</sup> pacijenata bili su muškog pola, za razliku od *MNI*<sup>-</sup> pacijenata gde je taj procenat iznosio 46%, odnosno 31/68 *MNI* pacijenata (p=0.006). Takođe, u grupi *MNI*<sup>+</sup> pacijenata najzastupljeniji su bili pripadnici M2 FAB podtipa, koju je imalo 17/43 (39%), za razliku od *MNI*<sup>-</sup> pacijenata, gde je najviše pacijenata (21/68 (31%)) pripadalo podtipu M5, (p=0.015).

Analizom povezanosti *MNI* ekspresije sa drugim molekularnim markerima kao što su *FLT3*, *NPM1* i *IDH1* odnosno *IDH2* mutacionim statusom, utvrđeno je da se *MNI*<sup>+</sup> grupa pacijenata odlikovala odsustvom *NPM1* mutacija, pokazano ( $\chi^2$  test, (p<0.001). Naime, samo 2/43 (5%) *MNI*<sup>+</sup> pozitivna pacijenta su pokazala prisustvo *NPM1* mutacije (Slika 25). Distribucija mutacija u *FLT3* se razlikovala između ove dve grupe, kod *MNI*<sup>+</sup> 9/43 (21%) pacijenta je bilo *FLT3*<sup>+</sup>, dok je kod *MNI*<sup>-</sup> pacijenata 24/68 (35%) bilo *FLT3*<sup>+</sup>, ali uočena razlika nije dostigla statističku značajnost. Prisustvo mutacija u *IDH1* i *IDH2* genima nije se značajno razlikovalo između *MNI*<sup>+</sup> i *MNI*<sup>-</sup> grupe pacijenata. Podelom pacijenata u odnosu na njihov *FLT3-ITD/NPM1* mutacioni status na 4 grupe (-/-, +/+, +/- i +/-) pokazano je da je najbrojnija grupa pacijenata u *MNI*<sup>+</sup> kategoriji bila *FLT3-ITD*<sup>+</sup>/*NPM1*<sup>-</sup>, koju je imalo 33/43 (77%).

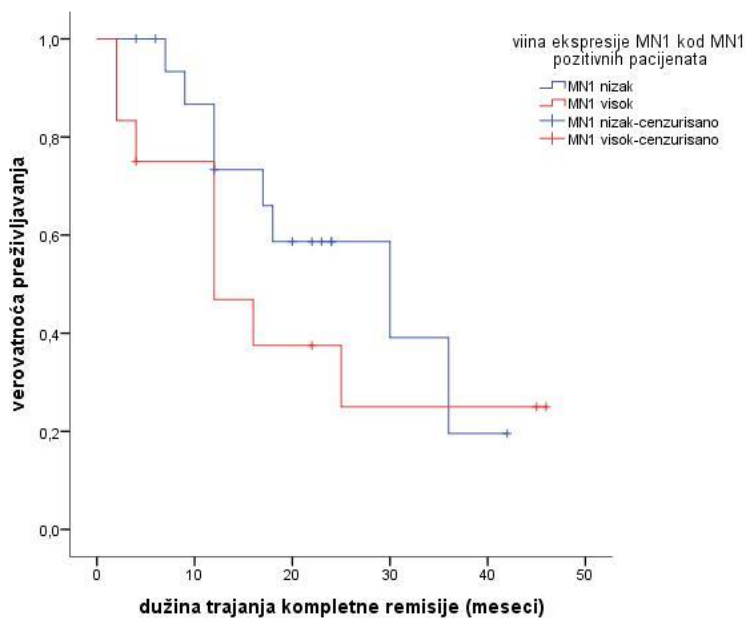


Slika 25. Grafički prikaz povezanosti nivoa *MN1* ekspresije i prisustva/odsustva *NPM1* mutacije.  $\chi^2$  testom je pokazana statistički značajna povezanost *MN1*<sup>+</sup> pacijenata sa odsustvom *NPM1* mutacija, ( $p < 0.001$ ). Naime, samo 2/43 (5%) *MN1*<sup>+</sup> pozitivna pacijenta su pokazala prisustvo *NPM1* mutacije

Kako bi ispitali uticaj nivoa ekspresije *MN1* gena na prognozu bolesti, kao i povezanost sa kliničkim i drugim prognostičkim parametrima, grupu *MN1*<sup>+</sup> pacijenata smo podelili na one sa niskim (*MN1*<sup>nizak</sup>) i visokim (*MN1*<sup>visok</sup>) nivoom ekspresije. Kao “cut off” vrednost uzeli smo medijanu ekspresije *MN1* kod *de novo* AML-NK pacijenata, koja iznosi 6.47 RU. U trenutku postavljanja dijagnoze, 49% (21/43) *MN1*<sup>+</sup> pacijenata je imalo visok nivo ekspresije *MN1* gena.

*NPM1* mutacije nisu detektovane ni kod jednog pacijenta u *MN1*<sup>visok</sup> grupi, *FLT3/ITD* su detektovane kod samo 3 pacijenta, pa je stoga najbrojnija bila grupa pacijenata takozvanim *FLT3-ITD*<sup>-</sup>/*NPM1*<sup>-</sup> dvostruko negativnim statusom (18/21 *MN1*<sup>visok</sup>). U poređenju sa *MN1*<sup>nizak</sup> grupom, u kojoj je 17/22 (77%) pacijenta postiglo kompletnu remisiju, *MN1*<sup>visok</sup> grupa je imala tendenciju ka nižoj stopi postizanja kompletne remisije s obzirom da je ovde 12/20 (60%) obolelih ušlo u stanje kompletne remisije ( $\chi^2$  test  $p=0.227$ ).

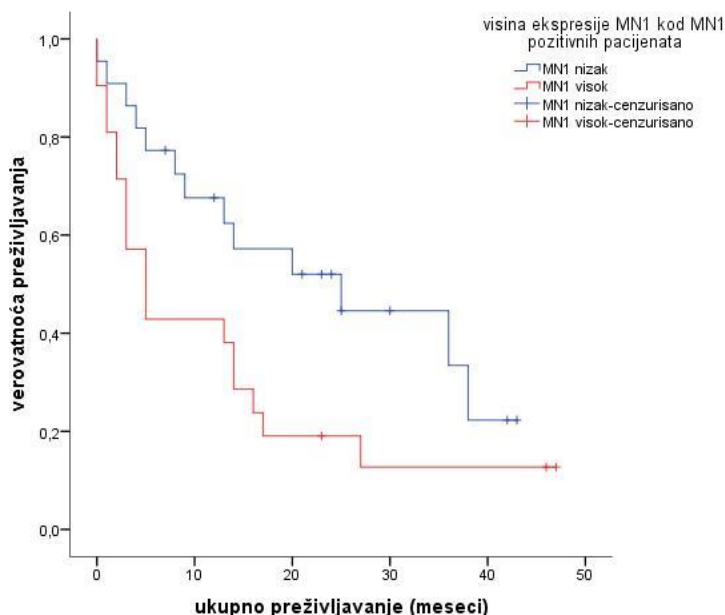
Kaplan-Majer analizom je izvršeno poređenje dužine trajanja kompletne remisije u okviru grupe od 29 AML-NK  $MN1^+$  pacijenta koji su postigli kompletnu remisiju, u odnosu na visok ili nizak nivo  $MN1$  ekspresije. Uočena je značajna razlika u medijani dužine trajanja kompletne remisije između  $MN1^{\text{visok}}$  (12 meseci) i  $MN1^{\text{nizak}}$  grupe (30 meseci), koja nije dostigla statistički značaj ( $p=0.319$ ; Log Rank=0.993) (Slika 26).



Slika 26. Kaplan-Majer analiza dužine trajanja kompletne remisije. Pacijenti sa visokim nivoom  $MN1$  ekspresije ( $n=12$ , 4 cenzurisano) imali su medijanu dužine trajanja remisije od 12 meseci; pacijenti sa niskim nivoom  $MN1$  ekspresije ( $n=17$ , 9 cenzurisano) su imali medijanu dužine trajanja kompletne remisije od 30 meseci (Log rank=0.319;  $p=0.993$ )

Poređenjem ukupnog preživljavanja pacijenata sa visokom i niskom ekspresijom  $MN1$ , u Kaplan-Majer analizi, pokazano je da je medijana ukupnog preživljavanja kod  $MN1^{\text{visok}}$  pacijenata bila značajno kraća (5 meseci) u poređenju sa grupom koja je imala nizak nivo  $MN1$  ekspresije (5 prema 25 meseci), ( $p=0.042$ ; Log Rank=4.152) (Slika 27).





Slika 27. Kriva preživljavanja *de novo* AML-NK pacijenata sa niskim i visokim nivoom *MNI* ekspresije. Pacijenti sa visokim nivoom *MNI* ekspresije (n=21, 3 cenzurisano) imali su medijanu ukupnog preživljavanja od 5 meseci; pacijenti sa niskim nivoom *MNI* ekspresije (n=22, 9 cenzurisano) su imali medijanu ukupnog preživljavanja od 25 meseci (Log rank=0.042; p=4.152)

#### IV - 5.2. Ekspresija *MNI* gena kod AML-NK pacijenata nakon indukciono terapije

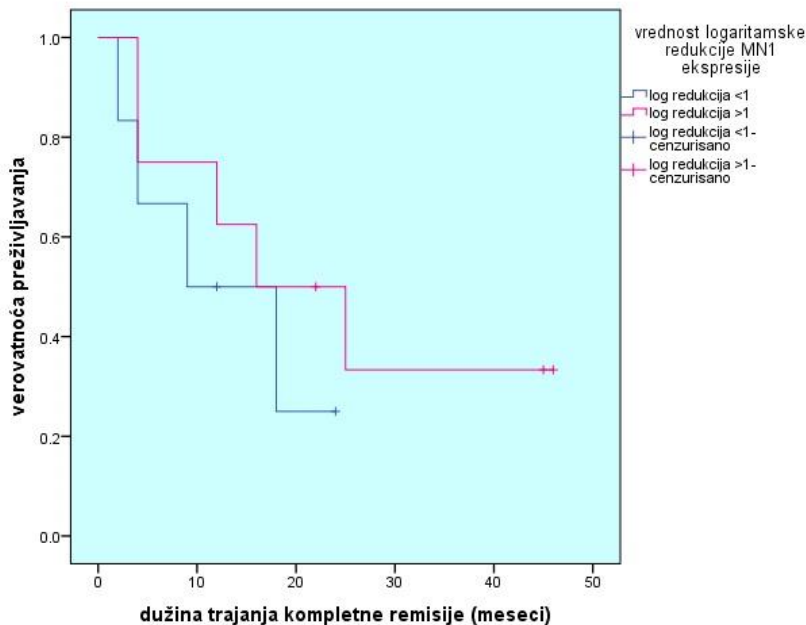
Ekspresija *MNI* je praćena ne samo na početku bolesti, već i u stadijumu nakon indukciono terapije, odnosno u kompletnoj remisiji ili prilikom relapsa bolesti. Od 69 pacijenata koji su postigli kompletnu remisiju, za njih 30 smo imali uzorke i u drugim stadijumima bolesti. Tačnije, kod 25 pacijenata određen je nivo *MNI* ekspresije nakon primljene indukciono terapije, odnosno u trenutku kompletne remisije, a za njih 12/25 nivo *MNI* ekspresije je određen i prilikom relapsa bolesti. Kod 5 pacijenata nivo *MNI* ekspresije je određen samo na početku bolesti i prilikom njenog relapsa.

Medijana nivoa *MNI* ekspresije nakon indukciono terapije određen kod 25 pacijenata bio je 0.47 RU (0.12 – 2.41), dok je medijana nivoa ekspresije kod ovih pacijenata detektovana na početku bolesti iznosila 6.21 (0.08 – 49.66). U kompletnoj remisiji kod svih 25 pacijenata

nivo *MNI* ekspresije bio je niži od „cut off“ vrednosti određene za prisustvo *MNI* ekspresije (3.07 RU; vrednost dobjena uzimanjem medijane ekspresije *MNI* kod zdravih kontrola + 3x SD), tj. oni su bili negativni za ekspresiju *MNI*.

Da bismo ispitali potencijal *MNI* ekspresije kao markera za praćenje minimalne rezidualne bolesti (MRB), vrednost odnosa nivoa ekspresije *MNI* detektovanog na početku bolesti i u kompletnoj remisiji smo logaritmovali. Ovim su bili obuhvaćeni samo pacijenti koji su na dijagnozi okarakterisani kao *MNI*<sup>+</sup>, njih 14. Na taj način smo uveli pojam logaritamske redukcije nivoa ekspresije gena, čija visina govori o potencijalu koji dati marker ima kao marker za praćenje MRB. Da bi se za neki marker reklo da je dobar za praćenje MRB, potrebno je da se njegova ekspresija nakon indukciono terapije smanji za minimum 1 log vrednosti. Kod 14 pacijenata, koji su bili *MNI*<sup>+</sup> pri dijagnozi, kod njih 8 je detektovana log redukcija *MNI* ekspresije veća od 1 (>1 log), dok je kod preostalih 6 pacijenata nivo redukcije bio manji od 1 (<1 log).

Visina detektovane redukcije nije imala uticaja na stopu relapsa. Međutim, pacijenti u kompletnoj remisiji koji su imali nivo redukcije *MNI* ekspresije >1 log, imali su duži period trajanja kompletne remisije od 19 meseci, u poređenju sa samo 10.5 meseci kod pacijenata koji su imali nivo redukcije *MNI* ekspresije < 1 log (Slika 28). Logaritamska vrednost postignutog nivoa redukcije *MNI* ekspresije u kompletnoj remisiji nije imala uticaj na dužinu ukupnog preživljavanja pacijenata, s obzirom da su medijane trajanja ukupnog preživljavanja kod obe grupe pacijenata iznosile 20 meseci.



Slika 28. Kriva dužine trajanja kompletne remisije kod pacijenata u odnosu na vrednost detektovane redukcije ekspresije *MNI* gena. Pacijenti sa  $< 1$ log redukcije *MNI* ekspresije ( $n=6$ , 2cenzurisano) imali su medijanu dužine trajanja ukupnog preživljavanja od 10.5 meseci; pacijenti sa  $> 1$ log redukcije nivoa *MNI* ekspresije ( $n=8$ , 3 cenzurisano) su imali medijanu dužine trajanja ukupnog preživljavanja od 19 meseci (Log rank=0.658;  $p=0.417$ ).

Od 30 pacijenata kod kojih je praćen nivo ekspresije *MNI* i u drugim fazama bolesti, relapsiralo je njih 21. Za 17/21 relapsiranih pacijenata posedovali smo uparene dijagnoza/relaps uzorke. Od ovih 17 dostupnih pacijenata samo njih 7 je imalo *MNI*<sup>+</sup> status. Njihova medijana ekspresije *MNI* gena u relapsu bolesti je iznosila 2.3 (0.67-9.8). Kod 3/7 *MNI*<sup>+</sup> pacijenata je nivo ekspresije ovog gena u relapsu bolesti bio viši od početnog nivoa detektovanog na prezentaciji bolesti, a kod preostala 4 *MNI*<sup>+</sup> pacijenta nivo ekspresije ovog gena u relapsu bio je niži od „cut-off“ vrednosti (3.07 RU) koja determiniše prisustvo ekspresije veće od vrednosti nađene kod zdravih kontrola.

**Sažetak**

- Ispitivanje ekspresije *MNI* gena kod 111 *de novo* AML-NK pacijenata pokazalo je da je ona u 39% slučajeva bila viša od nivoa detektovanog kod zdravih kontrola. *MNI*<sup>+</sup> pacijenti sa visokom *MNI* ekspresijom (*MNI*<sup>visok</sup>) imali su tendenciju ka nižoj stopi postizanja kompletne remisije kao i ka njenom kraćem trajanju. Pacijenti sa *MNI*<sup>visok</sup> statusom su imali značajno kraće ukupno preživljavanje pa se može govoriti o uvećanoj *MNI* ekspresiji kao o faktoru loše prognoze. Ispitivanjem nivoa ekspresije *MNI* nakon indukciono terapije, primećeno je da su *MNI*<sup>+</sup> pacijenti u kompletnoj remisiji koji su imali nivo redukcije *MNI* ekspresije > 1 log, imali duži period trajanja kompletne remisije, u poređenju sa pacijentima kod kojih je redukcija *MNI* ekspresije bila < 1 log, kod kojih je period trajanja kompletne remisije bio značajno kraći. Ovi rezultati govore o potencijalu koji *MNI* ekspresija ima kao mogući marker za praćenje MRB.

**IV - 6. Povezanost ekspresije *BAALC* i *MNI* gena kod AML-NK pacijenata**

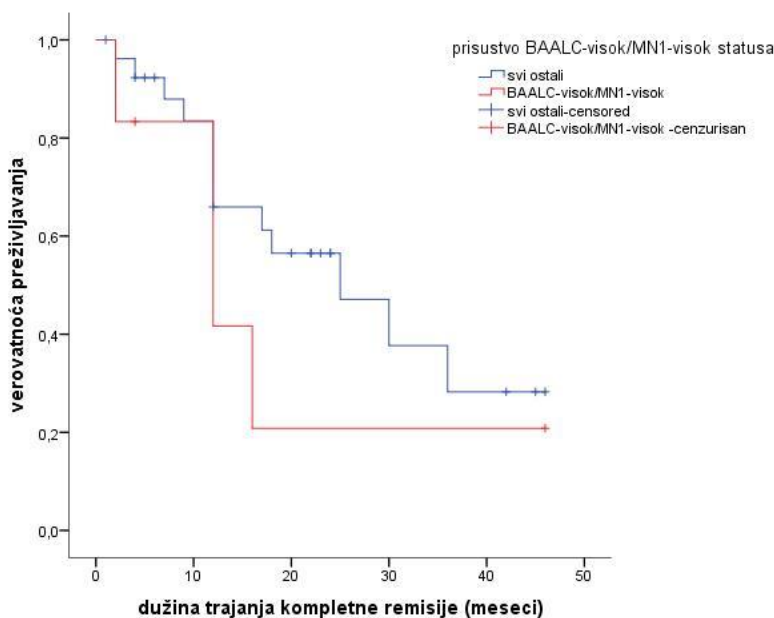
Analizirajući vrednosti ekspresije *BAALC* i *MNI* na celokupnoj grupi AML-NK pacijenata, primećeno je postojanje pozitivne korelacije (Spirmanov koeficijent  $r=0.693$ ,  $p<0.0005$ ). Zbog toga smo se odlučili da analiziramo zajednički uticaj oba gena na prognozu i ishod bolesti. Posmatrali smo grupu od 51 AML-NK pacijenata, kod kojih je detektovana ekspresija ili *BALLC*, ili *MNI* bila viša od one detektovane kod zdravih kontrola, odnosno grupu pacijenata koji su bili *BAALC*<sup>+</sup> ili *MNI*<sup>+</sup>. U okviru ove grupe 23.5% (12/51) pacijenata je imalo visoku ekspresiju oba gena odnosno *BAALC*<sup>visok</sup>/*MNI*<sup>visok</sup> status.

Kao i prilikom analize pojedinačne ekspresije *BAALC*, odnosno *MNI*, primećena je asocijacija *BAALC*<sup>+</sup> odnosno *MNI*<sup>+</sup> pacijenata sa *FLT3-ITD*<sup>-</sup>/*NPM1*<sup>-</sup> dvostruko negativnim statusom. Ista tendencija je nađena i u ovoj grupi pacijenata. Tačnije, 41/51 (80%) pacijenata,

odnosno 10/12  $BAALC^{visok}/MNI^{visok}$  pacijenata je imalo  $FLT3-ITD^-/NPM1^-$  status, odnosno 10/12  $BAALC^{visok}/MNI^{visok}$  pacijenata.

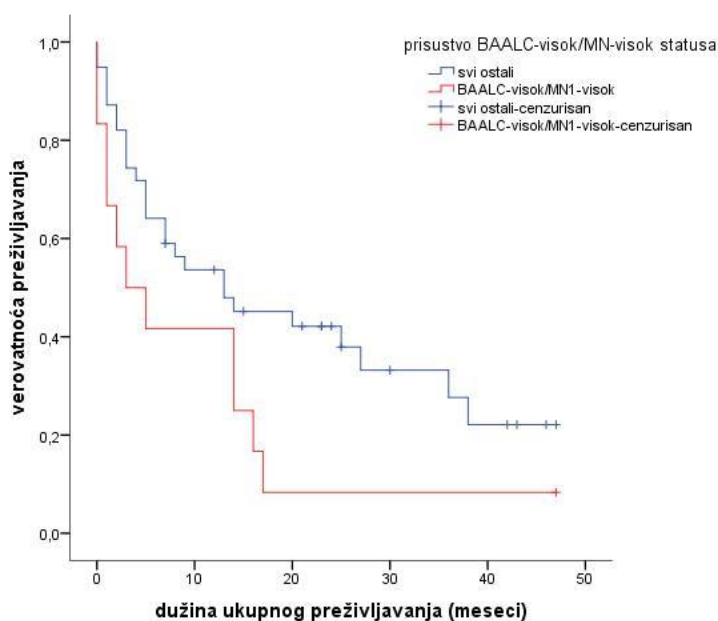
$BAALC^{visok}/MNI^{visok}$  status je bio povezan sa nižom stpom postizanja kompletne remisije od 54.5% u odnosu na preostale pacijente kod kojih je ona iznosila 75% (p=0.194). Takođe, pacijenti sa  $BAALC^{visok}/MNI^{visok}$  statusom su pokazali snažnu tendenciju ka smrtnom ishodu bolesti (92% u odnosu na 67% kod ostalih pacijenata, p=0.090).

Kaplan-Majer analizom je izvršeno poređenje dužine trajanja kompletne remisije u okviru grupe od 31 AML-NK  $BAALC^+$  ili/i  $MNI^+$  pacijenata koji su postigli kompletnu remisiju, u odnosu na prisustvo  $BAALC^{visok}/MNI^{visok}$  statusa. Pacijenti sa  $BAALC^{visok}/MNI^{visok}$  statusom su imali kraće trajanje kompletne remisije od 12 meseci, u poređenju sa 25 meseci detektovanim u preostaloj grupi pacijenata, ali ova razlika nije bila statistički značajna (p=0.356; Log Rank=0.852) (Slika 29).



Slika 29. Kaplan-Majer analiza dužine trajanja kompletne remisije. Pacijenti sa  $BAALC^{visok}/MNI^{visok}$  statusom (n=6, 2 cenzurisano) imali su medijanu dužine trajanja remisije od 12 meseci; preostali pacijenti (n=27, 14 cenzurisano) su imali medijanu dužine trajanja kompletne remisije od 25 meseci (Log rank=0.852; p=0.536).

Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja između pacijenata sa  $BAALC^{visok}/MNI^{visok}$  statusom i  $BAALC^+$  ili/i  $MNI^+$  pacijenata. Medijana dužine ukupnog preživljavanja bila je značajno kraća u  $BAALC^{visok}/MNI^{visok}$  grupi (3 meseca), dok je među preostalim pacijentima ona iznosila 13 meseci ( $p=0.068$ ; Log Rank=3.326) (Slika 30).



Slika 30. Kaplan-Majer analiza trajanja ukupnog preživljavanja. Pacijenti sa  $BAALC^{visok}/MNI^{visok}$  statusom ( $n=12$ , 1 cenzurisan) imali su medijanu trajanja ukupnog preživljavanja od 3 meseca; preostali pacijenti ( $n=39$ , 13 cenzurisano) su imali medijanu trajanja ukupnog preživljavanja od 13 meseci (Log rank=0.068;  $p=3.326$ ).

### Sažetak

- Analiza nivoa ekspresije  $BAALC$  i  $MNI$  gena kod 111 pacijenata obolelih od AML-NK je pokazala da je njihova ekspresija pozitivno korelisana. Međutim, naša pretpostavka da će udruženi  $BAALC^{visok}/MNI^{visok}$  status kod pacijenata imati snažniju prediktivnu moć po pitanju prognoze i ishoda bolesti, od visoke ekspresije pojedinačnih gena se nije pokazala kao ispravna.

## **V – DISKUSIJA**

### **V - 1. Mutacioni profil adultne i dečje AML**

Akutna mijeloidna leukemija (AML) predstavlja hematološki malignitet koje se odlikuje prekomernom produkcijom nezrelih ćelija krvi mijeloidne loze (Löwenberg B, 1999). Napredovanje NGS metodologije omogućio je istraživačima dublji uvid u mutacioni profil ove kompleksne bolesti, kako kod dečjih, tako i kod adultnih AML pacijenata. Međutim, uprkos postojanju velikih metodoloških pomaka, mutacioni profil ovog tipa leukemija još uvek nije u potpunosti definisan. Takođe, saznanja vezana za epigenetički status koji leži u osnovi AML patogeneze su još uvek slabo rasvetljena (Marchesi V, 2013). Istovremeno, rezultati novih istraživanja pružaju bolje razumevanje AML bolesti i vode ka otkriću novih prognostičkih markera i potencijalnih terapijskih strategija.

Koristeći „TruSeq Amplicon Cancer Panel“ - TSACP platformu za detekciju somatskih varijanti, u našoj studiji (Marjanovic I, 2016) je analizirano 40 AML uzoraka (20 dečjih - dAML i 20 adultnih - aAML). Upotreba ove platforme omogućila nam je da steknemo uvid u mutacioni profil dečje i adultne AML i da analiziramo ulogu gena koji su prethodno opisani primarno kod solidnih tumora. Takođe, primena ciljanog re-sekvenciranja omogućila nam je visok nivo tačnosti u detekciji tačkastih nukleotidnih varijanti (SNV), što se ogledalo u dubini čitanja koje je u proseku iznosilo 2981x po ampliconu. Potrebu za visokom stopom preciznosti u detekciji somatskih mutacija bila je prepoznata i od strane Luthra R i saradnika, koji su u svojim istraživanjima koristili istu TSACP platformu (Luthra R, 2014). Visoka dubina čitanja je neophodna za detekciju somatskih mutacija u heterogenim uzorcima sa velikim brojem subklonova, što je karakteristično za malignitete, uključujući i AML.

Koristeći ciljano NGS sekvenciranje detektovali smo 122 (62 kod dAML, 60 kod aAML) varijante u kodirajućim regionima, koje potencijalno mogu izazvati promene u strukturi

proteina (tzv. „protein-changing“ varijante). Metodološki pristup korišćen u našoj studiji primarno je baziran na detekciji ovih „protein-changing“ mutacija. Na ovaj način, naša pažnja je bila usmerena ka identifikaciji mutacija koje imaju značajnu ulogu u patogenezi leukemija, odnosno na takozvane induktorske, okidač (eng. „driver“) mutacije, koje ometaju esencijalne ćelijske procese kao što je proliferacija, diferencijacija, ćelijski ciklus i apoptoza. U drugim studijama korišćeni su različiti NGS pristupi (npr. sekvenciranje celog genoma, eng. „whole genome sequencing“) što je omogućilo detekciju mutacija u regionima genoma sa regulatornim potencijalom. Međutim, čak i analizom dominantnih klonova, učestalost mutacija u ovim regionima bila je veoma niska. Npr. u studiji Mardis i saradnika, detektovano je 52 pojedinačne nukleotidne varijante (SNV““single nucleotide variants“) u dominantnom klonu, za koje je zaključeno da u većini slučajeva predstavljaju nasumične, benigne promene u genomu hematopoetskih ćelija (Mardis ER, 2009). Naime, one postoje u normalnim hematopoetskim ćelijama, čak i pre maligne transformacije i nisu od značaja za patogenezu AML (Sjöblom T, 2006).

Sekvenciranje celog genoma i celog egzona od strane „Cancer Genome Atlas Research – CGAR“ grupe, kojim je obuhvaćeno 200 AML pacijenata, pokazalo je da je prosečan broj mutiranih gena po uzorku bio samo 5 (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). U poređenju sa rezultatima analiza koje su za predmet istraživanja koristila druga kancerogena tkiva, pokazano je da AML ima najmanji broj mutiranih gena. Isto je potvrđeno i u našoj studiji gde je prosečan broj varijanti u kodirajućim regionima, po pacijentu, bio samo 10 kod obe starosne grupe AML pacijenata, dok kod jednog pedijatrijskog AML pacijenata (#1 dAML) nismo uspeli da detektujemo nijednu mutaciju (Tabela 6). U drugoj studiji u kojoj je izvršena analiza adultih AML primenom ciljane NGS metodologije, prosečan broj mutiranih gena je bio samo 2.56 (Kihara R, 2014). Kao i u našem istraživanju, Kihara R i saradnici su analizirali veoma heterogenu populaciju pacijenata (heterogen citogenetski nalaz), sa tom razlikom što su u našoj studiji analizom bili obuhvaćeni i AML-M3 pacijenti (Tabela 8 i 9). Veoma indikativan je bio naš nalaz da je većina mutacija detektovana među AML-NK pacijentima. Ovakav nalaz može da ukaže na veliki potencijal koji rekurentne citogenetičke aberacije, kao što su translokacije i inverzije, imaju u inicijaciji AML. Naime,



aberrantni transkripcijski faktor kao što je npr. PML/RARA (nastao kao posledica prisustva t(15;17) kod AML-M3 pacijenata) predstavlja dominantnu „driver“ aberaciju, koja je sama po sebi dovoljna za malignu transformaciju i nastanak bolesti.

Analizirajući mutacije koje potencijalno mogu dovesti do promena u proteinu (NFM mutacije), kod preko 50% AML pacijenata detektovali smo jednu ili više NFM mutacija u *TP53* i *KDR* genima. U slučaju *TP53* gena, promena u kodonu 72 (P72R), koja je prisutna u 17 od 20 dAML i kod 19 od 20 aAML slučajeva, predstavlja najčešći *TP53* germinativni polimorfizam, prisutan u više od 70% Evropske populacije (Bodian DL, 2014). Kod dva dečja AML pacijenta, detektovali smo dodatne *TP53* mutacije, D148N i Y103F. Ove mutacije su za razliku od P72R polimorfizma imale potencijalno patogeni efekat. *TP53* je prvi identifikovan tumor supresor gen odgovoran za održavanje stabilnosti genoma, a koji je povezan i sa pojavom nekoliko tipova tumora, naročito hematoloških tumora (Oren M, 2010). Sve varijante koje smo detektovali u *KDR* genu su sve bile tipa Q472H, i nađene su kod 11 dečjih i 10 adultnih AML pacijenata. Gen za receptor kinaznog domena (*KDR*) kodira receptor za vaskularni endotelni faktor rasta (VEGFR-2). Predstavlja transmembranski receptor važan za angiogenezu, i stoga može biti važan u razvoju solidnih tumora i njihovoj metastazi. S obzirom da postoje dokazi o prisustvu povećane angiogeneze i kod AML, moguće je da *KDR* igra ulogu i u patofiziologiji leukemija. Pokazano je da prisustvo Q472H somatske mutacije povećava gustinu mikrocirkulacije kod pacijenata sa kancerom pluća (Glubb DM, 2011). Efekat prisustva Q472H odražava se u vidu umerenog porasta signala koji pristižu preko *KDR*, a koji potiče od njegove povećane fosforilacije. Kod pacijenata obolelih od leukemije prisustvo Q472H mutacije dovodi do neuspeha terapije tirozin kinaznim inhibitorima, kao što je npr. imatinib, terapeutik koji se koristi u lečenju hronične mijeloidne leukemije (Kim DH, 2010).

U našoj studiji, kao i u slučaju brojnih kancera, najčešće smo detektovali varijante u genima koji kodiraju tirozin kinaze, ili koji kodiraju proteine uključene u signalne puteve koji kreću nizvodno od aktiviranih tirozin kinaza. Mutacije koje pogađaju kinazne domene ovih proteina, rezultuju u njihovoj konstitutivnoj, ligand-nezavisnoj aktivaciji (Luthra R, 2014; Ohgami RS, 2015). Mi smo identifikovali veliki broj ovih mutacija u obe starosne grupe

AML pacijenata, kao što su mutacije u *NRAS*, *KRAS*, *RET*, *FLT3* genima (Tabela 6 i 7). Prevalenca u zastupljenosti ovih mutacija kod obe grupe pacijenata ukazuje na to da su one induktorske („driver“) mutacije, od velike važnosti za patogenezu AML. Sa druge strane, naša analiza je otkrila mutacije u pojedinim genima koje su se javljale isključivo u jednoj grupi pacijenata. Tačnije, detektovali smo NFM mutacije u 4 gena (*JAK3*, *ABL1*, *GNAQ* i *EGFR*) koje su bile specifične za dečju AML, a mutacije nađene kod drugih 5 gena (*IDH1*, *APC*, *HNF1A*, *GNAS* i *SMARCB1*) su bile prisutne isključivo kod adultnih AML pacijenata. Primetili smo da su sva 4 mutirana gena nađena kod dečjih AML pacijenata, predstavljala gene za tirozin kinazne ili gene koji kodiraju proteine asocirane sa tirozin kinazama. U slučaju adultnih AML pacijenata pretežno su bile zastupljene mutacije u genima za metilaciju i modifikaciju histona (*IDH1*, *IDH2*, i *SMARCB1*). U jednoj od ranijih studija posvećenih izučavanju AML genoma, Mardis ER i saradnici su po prvi put prijavili mutacije u *IDH1*, *IDH2* i *TET2* genima (Mardis ER, 2009). Nakon ovog otkrića, prijavljene su mutacije i u drugim hromatin remodelujućim genima (e.g. *DNMT3A*, *PBRM1*, *ASXL1*), što sve ukazuje na to da su histon-modifikujući proteini u velikoj meri uključeni u patogenezu AML (Luthra R, 2014; Ohgami RS, 2015). Prisustvo velikog broja mutacija u genima koji kodiraju epigenetičke modifikatore, ne predstavlja eksplicitan dokaz za prisustvo specifičnih obrazaca genske ekspresije. Ley TJ i saradnici su u svom radu u kome su po prvi put prijavljene *DNMT3a* mutacije kod obolelih od AML, pokušali da zaključe da li prisustvo mutacija u ovom epigenetskom genu modifikatoru na bilo koji način utiču na pojavu nekih specifičnih obrazaca metilacije kod pacijenata (Ley TJ, 2010). Reklo bi se da se specifičan obrazac genske ekspresije može detektovati kod podgrupa AML pacijenata koje su jasno definisane na osnovu morfoloških, citogenetičkih i molekularno-genetičkih parametara. Naime, pokazano je da određeni podtipovi AML, kao što je AML-M3, imaju poseban obrazac genske ekspresije (Payton JE, 2009).

Zbog visoke heterogenosti AML smatrano je da broj detektovanih mutacija i „pogođenih“ gena mora biti veliki. Međutim, analize su pokazale da su učestale mutacije (< 5%) prisutne samo kod deset gena, a to su *FLT3*, *NPM1*, *DNMT3a*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *RUNX1*, *p53*, *NRAS*, *CEBPA*, i *WT1* geni. Upravo zbog toga se o ovim genima govori kao o „leukemija-

-specifičnim“ genima. U našoj studiji najučestalije mutacije detektovane su upravo u ovim genima, a to su mutacije u *FLT3*, *IDH1*, *IDH2* i u *NPM1* genu. Naši rezultati doprinose sve većem broju dokaza o značaju ovih gena u patogenezi leukemija.

U ovom istraživanju, izvedenom i na dečjim i na adultnim AML uzorcima, mi smo potvrdili postojanje veoma malog broja mutacija (prosečno 3 NFM mutacije po pacijentu), što ukazuje na to da je za nastanak AML potrebno manje genetičkih promena nego za druge malignitete. Analiza većeg broja pacijenata i kontrolnih uzoraka, koristeći isti pristup, omogućila bi potvrdu naših rezultata. S obzirom da je AML ekstremno heterogeno oboljenje po pitanju kliničkih i genetičkih karakteristika, rezultati koji bi na informativniji način govorili o sličnostima i razlikama između ova dva starosna entiteta AML pacijenata mogu biti dobijeni u NGS ciljanoj analizi morfoloških i citogenetičkih homogenijih grupa dečjih i adultnih AML pacijenata. Naše istraživanje predstavlja inicijalnu studiju koja pruža uvid u genetičku strukturu AML na početku bolesti, i predstavlja početnu tačku za dalje analize brojnih genetičkih promena koje se dešavaju tokom evolucije bolesti, uvodeći primenu NGS tehnologije u praćenje toka ove bolesti.

## **V - 2. Ekspresija *WT1* gena**

*WT1* je visoko eksprimiran u koštanoj srži ili perifernoj krvi različitih tipova leukemija, što se povezuje sa lošijom prognozom. S obzirom da *WT1* može imati ulogu onkogeno i tumor-supresora, na osnovu te funkcionalne dualnosti, pretpostavlja se da bi u procesu maligne transformacije mogao biti uključen u aktivaciju transkripcije ili supresiju diferencijacije.

Ekspresija *WT1* gena može se detektovati kod 75-100% adultnih AML pacijenata (Østergaard M, 2004; Barragan E, 2004). U našoj studiji (Marjanovic I, 2017), koja je obuhvatila 104 AML-NK pacijenta, u 94% slučajeva nivoi *WT1* ekspresije su bili viši nego oni detektovani kod zdravih pojedinaca. Kao što je već prethodno opisano, uzorci koštane srži (pa čak i uzorci periferne krvi) uzeti od zdravih ljudi, eksprimiraju veoma niske nivoe *WT1*

(Hosen N, 2002). Pokazano je da je kod zdravih kontrola *WT1* gen tipično eksprimiran u nezrelim hematopoetskim ćelijama, kao što su  $CD34^+$  progenitorske ćelije, što ukazuje na značaj koji *WT1* ima u hematopoezi (Gao L, 2004). Međutim, na osnovu ovog saznanja ne može se sa sigurnošću reći da u AML uzorcima *WT1* ekspresija vodi poreklo isključivo od  $CD34^+$  ćelija, s obzirom da u različitim studijama istraživači nisu mogli da nađu bilo kakvu direktnu povezanost između  $CD34$  pozitivnosti i nivoa *WT1* ekspresije (Cilloni D, 2008; Cilloni D, 2009). U našoj studiji, povišen procenat blasta u koštanoj srži bio je u asocijaciji sa visokim nivoom ekspresije *WT1* gena kod *de novo* AML-NK pacijenata, što ide u prilog pretpostavci da visok nivo *WT1* ekspresije nije posledica povišene proliferacije isključivo  $CD34^+$  ćelija, već i drugih progenitora koji sačinjavaju blastnu frakciju.

U našoj grupi AML-NK pacijenata, 25.5% imalo je visok nivo ekspresije *WT1* gena (*WT1<sup>visok</sup>*) (ekspresija viša od 75% od nivoa koji je detektovan kod svih pacijenata na početku bolesti). Zapažena je snažna povezanost između visokih nivoa ekspresije *WT1* na početku bolesti i pojave rezistencije na terapiju. Još 1994. godine su Inoue K i saradnici pretpostavili da visok nivo *WT1* ekspresije kod pacijenata potiče od leukemijskih ćelija (nezrelih prekursorskih hematopoetskih ćelija sa visokom stopom proliferacije), kao i da su upravo ove leukemijske ćelije uzrok rezistencije na terapiju. Nekoliko decenija kasnije, kada je koncept leukemijskih stem ćelija (LSC) uveliko prihvaćen, pokazano je da je jedna od glavnih odlika LSC-a, visok nivo ekspresije *WT1* gena i da su LSC odgovorne za pojavu rezistencije *in vivo*, pa samim tim i za relaps bolesti (Saito Y, 2010). Identifikacija prekomerne ekspresije *WT1* kao jednog od markera LSC-a, dovelo je do pojave brojnih kliničkih studija koje se bave ispitivanjem anti-*WT1* ciljane imunoterapije kod AML-a (Di Stasi A, 2015).

Našu studiju odlikovalo je zapažanje da je stopa kompletne remisije (KR) bila veoma niska kod pacijenata sa *WT1<sup>visok</sup>* statusom (samo 36%). Takođe, pokazano je da je prekomerna ekspresija *WT1* nezavisan nepovoljan faktor za postizanje KR u našoj grupi AML-NK pacijenata. Sličan negativan efekat na prognozu bolesti zapazili su i drugi autori (Bergmann L, 1997; Barragan E, 2004).

Naša studija je pokazala da kvantifikacija *WT1* ekspresije metodom real-time PCR, može biti validan pristup za predviđanje postizanja kompletne remisije i pojavu rezistencije kod *de novo* AML-NK pacijenata. Takođe, navedeni pristup omogućava primenu individualizovanih terapijskih protokola kod obolelih.

Pronalazak novih molekularnih markera u AML je veoma važan, naročito kod AML-NK pacijenata. Mnogi od ovih markera, kao što je mutacioni status *NPM1* i *FLT3*, već su uvršteni u novu klasifikaciju ove bolesti. Na osnovu navedenih markera, vrši se procena kategorije rizika obolelih, a sve u cilju uspostavljanja novih i efikasnijih terapijskih protokola. Primenom novog sistema klasifikacije AML-NK pacijenata na osnovu *NPM1* i *FLT3-ITD* mutacionog statusa, naše pacijente smo podelili u 3 prognostičke grupe: povoljnu, intermedijernu i lošu. Primenom statusa *WT1* ekspresije za subkategorizaciju intermedijerne grupe pacijenata (*FLT3-ITD*<sup>-</sup>/*NPM1*<sup>-</sup> dvostruko negativni pacijenti), došli smo do saznanja da se pacijenti iz navedene grupe sa *WT1*<sup>visok</sup> statusom, ponašaju skoro isto kao i pacijenti iz grupe sa lošom prognozom. Tačnije, *WT1*<sup>visok</sup> pacijenti su imali nižu stopu postizanja KR i kraće UP, slično kao i *FLT3-ITD*<sup>+</sup> koji pripadaju grupi pacijenata sa lošom prognozom. Ovo saznanje omogućuje *WT1*<sup>visok</sup> pacijentima sa intermedijernom prognozom da budu podvrgnuti agresivnijem terapijskom protokolu, ili onom koji je usmeren specifično ka *WT1*.

Navedeni nalazi su u skladu sa rezultatima nekoliko drugih studija (Barragan E, 2004; Frairia C, 2013), a prema Kottaridis PD i saradnicima se mogu objasniti kooperativnim modelom maligne transformacije. Naime, s obzirom da su *FLT3* mutacije često povezane sa drugim stečenim mutacijama, njihova asocijacija sa visokim nivoom *WT1* ekspresije može predstavljati model kooperativnog dejstva različitih promena, koje finalno rezultuju u transformisanom fenotipu (Kottaridis PD, 2003). Shodno važnoj ulozi koju *WT1* gen ima u ćelijskoj proliferaciji, diferencijaciji i inhibiciji apoptoze (Maheswaran S, 1995; Mayo MW, 1999) i s obzirom na uticaj koji *FLT3* mutacije takođe imaju na ove ključne procese u leukemijskim ćelijama (Drexler HG, 1996; Lisovsky M, 1996), Barragan E i saradnici su predložili hipotezu koja govori o tome da alteracije u *WT1* genu i *FLT3* genu udruženo doprinose leukemogenezi i rezultuju povećanom proliferacijom leukemijskih ćelija, inhibicijom apoptoze i blokadom diferencijacije (Barragan E, 2004).

S obzirom da je fokus ovog dela istraživačkog rada bio usmeren na ispitivanje kliničke značajnosti nivoa *WT1* ekspresije kod AML-NK pacijenata, i na njegovu relevantnost kao markera za određivanje minimalne rezidualne bolesti (MRB), u ovoj studiji analizirani su i uzorci koji su sakupljeni nakon indukcione terapije, tokom postizanja kompletne remisije i/ili tokom relapsa bolesti. *WT1* ekspresija nakon završetka indukcione terapije bila je značajno niža kod pacijenata koji su postigli KR u poređenju sa pacijentima koji nisu postigli kompletu remisiju. Polovina pacijenata koja je postigla KR bila je negativna na ekspresiju *WT1* nakon indukcione terapije, odnosno nivo ekspresije koji je detektovan bio je u opsegu *WT1* ekspresije kao kod zdravog uzorka koštane srži. Iako je nivo detektovane *WT1* ekspresije u navedenim slučajevima nizak, on je ipak prisutan. Zbog toga je veoma važno odrediti vrednost nivoa ekspresije („cut-off“ vrednost) nakon koje se smatra da je došlo do ponovnog prisustva bolesti, i koja predstavlja signal pojave relapsa AML.

Kako bi se izbeglo uvođenje apsolutnog broja *WT1* transkripta kao „cut off“ vrednosti za određivanje MRB, u našem istraživanju posmatrana je logaritamska vrednost smanjenja *WT1* ekspresije (log redukcija) koja se određuje između uparenih uzoraka na prezentaciji bolesti, i nakon postizanja kompletne remisije. Po uzoru na studiju koja je izvedena od strane Evropske Leukemiske Mreže (eng. „European Leukemia Net – ELN“) (Cilloni D, 2009), analizirali smo vrednost dvostruke logističke redukcije (2-log) *WT1* ekspresije, kao markera za detekciju MRB. Iako je u našoj studiji smanjenje ekspresije *WT1* veće od 2 log ukazivalo na mogućnost dužeg trajanja kompletne remisije i ukupnog preživaljvanja, nismo uspeli da pokažemo da je nivo logističke redukcije nezavistan prediktor smanjenog rizika za pojavu relapsa, kao što je to slučaj u drugim studijama (Østergaard M, 2004; Cilloni D, 2009; Gray JX, 2012). Naši rezultati su slični onim koje su prijavili i drugi autori, s tim što su njihove studije izvođene na svim AML pacijentima nezavisno od njihovog citogenetičkog statusa, a naše istraživanje je bazirano samo na AML-NK pacijentima. (Shibasaki Y, 2015; Mossallam GI, 2013). Neki drugi autori koristili su razliku od 1 log redukcije u pokušaju da postignu statistički značajnu povezanost između vrednosti log redukcije i relapsa (Andersson C, 2012). U našoj studiji, smatrali smo da je razlika od 2 log pouzdana „cut off“ vrednost, pre svega iz tog razloga jer je 82% pacijenata sa >2 log redukcijom imalo nivo *WT1* ekspresije gena koji

odgovara opsegu detektovanom kod zdrave populacije. Bez obzira na rezultate statističke analize, viša vrednost log redukcije *WT1* ekspresije jeste jasna indikacija za kvalitet odgovora na terapiju, i stoga ona predstavlja pravo merilo kompletne remisije, ne samo u citomorfološkom, već i u molekularnom smislu. Naša zapažanja poklapaju se sa studijom Rossi i saradnika, u kojoj log redukcija niža od 1.96 ima bolju prediktivnu ulogu u određivanju MRB, u poređenju sa apsolutnim brojem *WT1* kopija (Rossi G, 2016).

Bez obzira na sve navedene nalaze, i dalje postoji problem određivanja “cut off” nivoa *WT1* ekspresije koja govori o tome da se pacijent nalazi u kompletnoj remisiji. Tu je prisutan problem normalne, fiziološke, ekspresije *WT1* koja se detektuje kod pacijenata kod kojih se koštana srž nalazi u stadijumu oporavka (Alonso-Dominguez JM, 2012). Naime, problem leži nepostojanju jasne definicije pojma kompletne remisije. Da li se pod tim terminom podrazumeva i molekularna remisija, kao dodatak jasnoj citomorfološkoj remisiji, bez kliničkih zakova relapsa? Brojne studije su posvećene ovoj problematici, ali ona i dalje predstavlja predmet rasprave. Broj uzoraka koji je nama bio dostupan za dugotrajno praćenje bio je veoma mali, tako da nije bilo moguće izvesti bilo kakav konačan zaključak u vezi sa nedvosmislenim definisanjenjem “cut off” vrednosti koja određuje potpunu molekularnu remisiju.

Navedeni rezultati ukazuju na značajnost praćenja nivoa *WT1* ekspresije kod AML-NK pacijenata. Visina *WT1* ekspresije kod *de novo* pacijenata je nezavisan faktor prognoze; ukazuje na verovatnoću postizanja kompletne remisije i pojavu rezistencije na terapiju. Prognostički značaj ovog molekularnog markera se ogleda i u uticaju *WT1*<sup>nizak/visok</sup> statusa na dužinu trajanja kompletne remisije i ukupnog preživljavanja obolelih. Takođe, praćenjem nivoa ekspresije ovog gena u različitim vremenima u toku tretmana, odnosno određivanje vrednosti log redukcije *WT1* ekspresije nakon indukciono terapije, prepoznali smo vrednost *WT1* ekspresije kao molekularnog markera za određivanje prisustva minimalne rezidualne bolesti i predikciju pojave relapsa. Očigledan je i njegov doprinos u preciznoj stratifikaciji rizika, što je veoma značajno naročito za AML-NK grupu pacijenata, kojoj nedostaju specifični citogenetički i drugi molekularni markeri prognoze.

### V - 3. Ekspresija *EVII* gena

Ekspresija *EVII* gena je kod AML pacijenata izučavana samo u nekoliko većih studija (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, 2003; Lugthart S, 2008; Haas K, 2008; Groschel I, 2010; Vazquez I, 2011). U njima se prijavljena prekomerna ekspresija *EVII* kreće sa učestalošću od 7.8% do 19.3% slučajeva. U najvećoj studiji objavljenoj do sada, a koja je obuhvatila 1382 *de novo* AML pacijenata, uvećana ekspresija *EVII* je nađena u 10.7% slučajeva (Groschel S, 2010). U našoj studiji ovaj procenat iznosi 11.5%. Međutim, treba imati u vidu da se naša studija bazirala isključivo na AML-NK grupi pacijenata, a da su prehodno navedene studije obuhvatile sve citogenetičke podgrupe AML.

Postoji mali broj studija koji su posvećeni ispitivanju *EVII* ekspresije u AML-NK pacijentima, posebnom i izrazito heterogenom entitetu u okviru AML. Analizom objavljenih rezultata koji se odnose na oko 950 *de novo* AML-NK pacijenata, prijavljena frekvencija uvećane ekspresije *EVII* (*EVII*<sup>+</sup>) se kretala od samo 3% do 24.8% (Lugthart S, 2008; Santamaria CM, 2009). Postojanje ovako velikih razlika u procentu detektovanih *EVII*<sup>+</sup> slučajeva se može objasniti prvenstveno postojanjem različitih „cut-off“ vrednosti koje su primenjivane. Bezmalob, skoro svaka studija je imala sopstveni način kategorisanja pacijenata u *EVII*<sup>+</sup>, odnosno *EVII*<sup>-</sup> grupu. Neki istraživači su se rukovodili isključivo postojanjem statistički značajne razlike između ove dve grupe pacijenata, međutim pravo pitanje jeste koji je to normalan, fiziološki nivo ekspresije *EVII* gena kod zdravih kontrola?

Ekspresija *EVII* u normalnim hematopoetskim stem ćelijama, kao i u nediferenciranim mijeloidnim progenitorima je veoma visoka, da bi se u potpunosti izgubila prilikom procesa mijeloidne diferencijacije (Goyama S, 2008; Steinleitner K, 2012). U našoj studiji analizom ekspresije koštane srži zdravih kontrola dobijene su veoma niske vrednosti, što je u skladu sa već objavljenim rezultatima u kojima je pokazano da je *EVII* ekspresija veoma niska, kako u perifernoj krvi, tako i u koštanoj srži zdravih individua (Smol T, 2015; Haas K, 2008). Naš izbor „cut-off“ vrednosti predstavljen je medijanom *EVII* ekspresije kod zdravih kontrola uz dodatak trostruke vrednosti standardne devijacije. Ova „cut-off“ vrednost ujedno predstavlja i 75% vrednosti *EVII* detektovane na prezentaciji bolesti, a slično je odabrana i



„cut-off“ vrednost u novijoj studiji Brand J. i saradnika (Brand J, 2013). Smatramo da ovakav pristup odabiru „cut-off“ vrednosti obezbeđuje postojanje male verovatnoće detektovanja lažno pozitivnih pacijenata.

Prilikom pravilnog odabira „cut-off“ vrednosti otežavajuća okolnost je bio nalaz da je veoma visok procenat naših AML-NK pacijenata (50%) imalo veoma nisku, jedva detektabilnu ekspresiju *EVII* ili je nije bilo moguće detektovati (ispod vrednosti donje granice *EVII* ekspresije detektovane u zdravim kontrolama). Visok procenat AML pacijenata koji su bili nedetektabilni za ekspresiju ovog gena prijavljen je u drugim studijama, što znači da to nije neuobičajeno (Haas K, 2008; Brand J, 2013). Danas, još uvek ne postoji nedvosmisleno objašnjenje za ovakav nalaz, prvenstveno zbog toga što se tačan mehanizam aktivacije uvećane ekspresije *EVII* zna samo za pacijente sa rearanžmanima u okviru 3q26.2 lokusa, gde je *EVII* gen lociran. U slučaju ovih rearanžmana dolazi do jukstapozicije enhansera hematopoetski značajnih gena (npr. *RPNI* gena) i njihovo premeštanje uz *EVII* gen. To dovodi do konstitutivne aktivacije transkripcije *EVII* gena i do propagacije procesa leukemogeneze (Yamazaki H, 2014).

Dobro je poznato da je deregulisana ekspresija *EVII*, kao posledica 3q26 hromozomskih lezija (t(3;3)(q21;q26) odnosno inv3(q21;q26)) povezana sa razvojem specifično agresivnog leukemijskog fenotipa koji se odlikuje visokim rizikom od pojave rezistencije na terapiju i smrtnim ishodom (Nucifora G, 2006; Morishita K, 1992). Međutim, postoje pacijenti nosioci 3q26 rearanžmana, kod kojih nije detektovano uvećanje ekspresije *EVII*, kao i pacijenti bez ovih rearanžmana sa izuzetno visokom ekspresijom ovog gena. Takvi su npr. pacijenti nosioci *MLL* (eng. „mixed lineage leukemia“) rearanžmana, kao i AML-NK pacijenti koji su bili predmet našeg istraživanja (Balgolind B, 2010; Groschel S, 2013).

Balansirane hromozomske translokacije koje obuhvataju 11q23 lokus, odnosno *MLL* rearanžmani su u adultnim AML prisutne u oko 5% slučajeva (Dohner H, 2010). Uvećana ekspresija *EVII* gena kod ovih pacijenata je prisutna u visokom procentu od 40% do 50% (Groschel S, 2012). Ovakav nalaz se objašnjava time što su *MLL*-fuzioni onkoproteini

(generisani u različitim *MLL*-translokacijama) direktno vezuju za promotor *EVII* gena, aktivirajući njegovu transkripciju (Arai S, 2011; Bindels EMJ, 2012).

Međutim, mehanizam putem koga *EVII* biva prekomerno eksprimiran kod AML-NK heterogene grupe pacijenata je nepoznat. Nekoliko grupa istraživača ispitivalo je mogućnost postojanja skrivenih 3q26 lezija kod AML-NK pacijenata, koje bi bile uzrok povišene *EVII* ekspresije. Kao uzrok nedetektovanja ovih lezija i kategorizacije ovih pacijenata u grupu AML-NK, navodi se slabija moć metode hromozomskih traka kojom se rutinski detektuju ove aberacije u većini dijagnostičkih laboratorija. Rezultati studija u kojima je primenjena FISH analiza su kontradiktorni. Neki nisu uspeli da detektuju skrivene 3q26 aberacije kod *EVII*<sup>+</sup> AML pacijenata FISH analizom, niti su primenom metode sekvenciranja našli lezije na molekularnom nivou. Sa druge strane, dve grupe autora detektovale su skrivene rearanžmane, odnosno skrivene amplifikacije ovog regiona, pa su zaključili da je učestalost 3q26 aberacija podcenjena u mijeloidnim malignitetima (Haferlach C, 2012; Volkert S, 2014). Pošto se ovi rearanžmani ne mogu detektovati metodom hromozomskih traka, autori navode da skrining na skrivene *EVII* rearanžmane interfaznom FISH analizom povećava dijagnostičku tačnost i može biti naročito pogodan za AML-NK. S obzirom da je naša grupa AML-NK pacijenata takođe citogenetički kategorizovana metodom hromozomskih traka, zaključujemo da hipoteza skrivenih 3q26 rearanžmana ipak i dalje ostaje otvoreno pitanje i predmet dodatnih analiza.

Kako je *EVII* ekspresija uvećana kod hematopoetskih progenitorskih ćelija, moguće je da je pojava prekomerne ekspresije ovog gena u leukemijama odraz normalnog fiziološkog statusa ćelija prekursora, pre nego što je došlo do maligne transformacije. Takođe s obzirom da *EVII* pokazuje hromatin-modifikujuće sposobnosti, regulacija njegove genske ekspresije može biti pod uticajem metilacionog statusa *EVII* promotora. Ispitivanja metilacionog statusa 3q26 lokusa su pokazala odsustvo metilacije kako kod ćelija koje imaju visoku ekspresiju *EVII* gena (normalni CD34<sup>+</sup> progenitori), tako i kod ćelija kod kojih je ekspresija ovog gena veoma mala (kod potpuno diferenciranih ćelija periferne krvi). To znači da mehanizam utišavanja *EVII* ekspresije prilikom procesa mijeloidne diferencijacije, nije zasnovan na promeni metilacionog statusa *EVII* promotora (Vazquez I, 2011).

Visoka zastupljenost potpunog odsustva ekspresije, odnosno skoro nedetektibilne ekspresije *EVII*, nađena u našoj studiji može se objasniti i postojanjem epigenetičkih modifikacija. Naime, rezultati nekih studija pokazuju da je histonska modifikacija mehanizam kojim se može objasniti utišavanje ekspresije *EVII* gena (Vazquez I, 2011). Kod pacijenata sa malom ekspresijom *EVII* detektovana je zatvorena histonska struktura, odnosno detektovana je trimetilacija H3 lizin 27 (H3K27) u *EVII* promotoru. Suprotno, u aktivnoj konformaciji u *EVII* lokusu se mogu detektovati acetolovani H3 i H4 histoni, kao trimetilan H3 lizin 4 (H3K4) (Glass C, 2014).

Cilj naše studije bio je fokusiran na izučavanje povezanosti *EVII* statusa pacijenata sa već poznatim molekularnim markerima karakterističnim za AML i sa kliničkim karakteristikama obolelih, kao i izučavanje *EVII* statusa kao potencijalnog prognostičkog markera.

Analizom povezanosti *EVII* ekspresije sa *FLT3*, *NPM1* i *IDH1* odnosno *IDH2* mutacionim statusom, u našoj grupi AML-NK pacijenata primetili smo da je odsustvo *NPM1* mutacije bilo u izrazitoj korelaciji sa *EVII*<sup>+</sup> grupom pacijenata, u poređenju sa *EVII*<sup>-</sup> grupom, koja je imala značajno viši broj pacijenata sa *NPM1* mutacijom. Ovo zapažanje u potpunosti je u skladu sa rezultatima drugih autora (Brand J, 2013; Gröschel S, 2010).

*FLT3/ITD* mutacije bile su takođe veoma slabo zastupljene kod *EVII*<sup>+</sup> pacijenata u našoj analizi, što je u potpunosti u saglasnosti sa rezultatima nekih grupa autora (Barjesteh S, 2003; Gröschel S, 2010; Brand J, 2013).

S obzirom da prisustvo mutacija u *FLT3* genu kod AML-NK pacijenata predstavlja marker lošeg ishoda (Schlenk RF, 2008; Whitman SP, 2001), da je prisustvo *NPM1* mutacije kod AML-NK pacijenata povezano sa višom stopom postizanja kompletne remisije, boljim preživljavanjem bez relapsa i dužim trajanjem kompletne remisije (Döhner K, 2005; Schnittger S, 2005), a da se povišen nivo *EVII* ekspresije povezuje sa lošijom prognozom (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, 2003), činjenica da visok procenat *EVII*<sup>+</sup> pacijenata pokazuje odsustvo mutacija u *FLT3* i *NPM1* genu, ukazuje na to da grupa AML-NK pacijenata koja eksprimira *EVII* predstavlja zasebnu klasu leukemija.

Analizom asocijacije *EVII*<sup>+</sup> statusa sa kliničkim karakteristikama pacijenata detektovali smo povezanost sa smanjenim ukupnim brojem leukocita i smanjenim procentom blasta u

koštanoj srži, nalaz koji nismo pronašli u do danas objavljenoj literaturi. Sa druge strane, detektovali smo statistički značajnu povezanost pacijenata sa visokom *EVII* ekspresijom sa  $CD34^+$  statusom. Ovaj nalaz je prijavljen od strane brojnih studija i ukazuje na to da prisustvo ekspresije ovog gena kod obolelih od AML nije ektopično, već da barem delom vodi poreklo od fiziološki normalne ekspresije *EVII* nađene u zdravim mijeloidnim prekursorskim ćelijama (Gerhardt T, 1997).

Izučavanje uticaja visine *EVII* ekspresije na prognozu bolesti, jednoznačan uticaj je zapažen samo kada je u pitanju stopa pojave relapsa koja je bila viša kod *EVII*<sup>+</sup> pacijenata. Što se tiče uticaja *EVII*<sup>+</sup> statusa na stopu postizanja kompletne remisije, dužinu trajanja remisije i ukupno preživljavanje, nismo detektovali statistički značajan uticaj na bilo koju od ovih prognostičkih kategorija, ali bila je primetna tendencija da pacijenti sa visokom ekspresijom *EVII* imaju višu stopu postizanja kompletne remisije, duže trajanje remisije kao i duže ukupno preživljavanje. Ovaj nalaz je bio u potpunosti suprotan nalazima većine objavljenih studija. Razlozi za postojanje diskrepance između studija leži u izboru „cut-off“ vrednosti, o čemu smo diskutovali u prethodnom tekstu, ali takođe, i u dizajnu RQ-PCR studije. Tačnije, u mnogim istraživanjima ispitivana je ekspresija samo pojedinih *EVII* transkripata, koji se međusobno razlikuju prema startu transkripcije i post-transkripcionoj obradi. U našem istraživanju korišćen je TaqMan esej dizajniran tako da detektuje sve postojeće transkripte tzv. ukupan *EVII*. Takođe, u drugim studijama posmatrani su isključivo „mlađi“ pacijenti (ispod 60, odnosno 65 godina)(Barjesteh S, 2003; Gröschel S, 2010; Brand J, 2013), dok je kod nas posmatrana celokupna kohorta. Čak i uzimanjem u obzir navedene starosne granice, rezultat je ostajao nepromenjen. Ostali uzroci postojanja razlika u prognostičkom značaju *EVII* ekspresije između naše i drugih studija leže u citogenetičkim karakteristikama ispitivane grupe pacijenata, ali takođe u različitim terapijskim protokolima koji su primenjivi u njihovom lečenju.

#### **V - 4. Ekspresija *BAALC* gena**

Činjenica da je ekspresija *BAALC* gena prisutna isključivo kod progenitorskih hematopoetskih ćelija, a da se prilikom procesa diferencijacije ona gubi i u potpunosti

izostaje kod zrelih ćelija, bila je osnova za početak ispitivanja nivoa ekspresije ovog gena kod različitih vrsta leukemija. Visok nivo *BAALC* ekspresije je detektovan kod pacijenata obolelih od AML i ALL, kod CML pacijenata koji se nalaze u blastnoj krizi, dok se ekspresija ovog gena ne detektuje kod CML pacijenata u hroničnoj fazi bolesti, niti kod pacijenata sa CLL-om (Tanner SM, 2001). Ono što otežava ispitivanje ekspresije *BAALC* u akutnim leukemijama jeste neujednačenost njegove ekspresije među različitim populacijama leukemijskih blastnih ćelija. Naime, pokazano je da je *BAALC* ekspresija ograničena na CD34<sup>+</sup> hematopoetske progenitorske ćelije i da predstavlja njihov pouzdani marker (Baldus CD, 2003a). Međutim, blastne ćelije obolelih od leukemija predstavljaju mešavinu različitih populacija ćelija, tj. mešavinu različitih klonova koji se odlikuju određenim progenitorskim karakteristikama i koji se nalaze na različitim stadijumima diferencijacije.

U našoj studiji detektovana je niska ekspresija *BAALC* u mononuklearnim ćelijama koštane srži zdravih kontrola, što i jeste odlika normalnog hematopoetskog procesa i predstavlja nalaz prijavljen od strane drugih grupa (Baldus CD, 2006a; Damiani D, 2013). Analizom ekspresije *BAALC* gena kod 111 *de novo* AML-NK pacijenata prisustvo ekspresije je nađeno kod 38% pacijenata (*BAALC*<sup>+</sup> pacijenti). Ovaj procenat je nešto niži od 47-70% detektovanih u već objavljenim studijama (Amirpour M, 2016; Azizi Z, 2015; Damiani D, 2013; Zoon JH, 20014). Razlog za ovako veliku varijabilnost u procentu detektovanih pacijenata sa povišenom ekspresijom *BAALC* leži prvenstveno u heterogenom uzorku analiziranih AML pacijenata (analizom su obuhvaćeni ne samo AML-NK pacijenti već i drugi tipovi AML; takođe u nekim studijama kohorte analiziranih AML su stratifikovane prema starosti pacijenata). U meta analizi Xiao SJ i saradnika, kao razlog za odstupanja u procentu detektovanih pacijenata sa povišenom *BAALC* ekspresijom spominju se i različiti pristupi odabiru adekvatne „cut-off“ vrednosti. U našoj studiji prilikom odabira „cut-off“ vrednosti za postojanje ekspresije *BAALC* (ekspresija različita od zdravih kontrola), rukovodili smo se time da imamo što manje lažno pozitivnih pacijenata. Tek u kasnijoj analizi primenjena je medijana ekspresije *BAALC*<sup>+</sup> pacijenata za podelu na *BAALC*<sup>visok</sup> i *BAALC*<sup>nizak</sup> grupe pacijenata, i tada je postotak pacijenata sa *BAALC*<sup>visok</sup> ekspresijom iznosio 50%, vrednost uporediva sa drugim studijama.

Prilikom naše analize AML-NK pacijenata, našli smo da je u grupi *BAALC*<sup>+</sup> pacijenata najzastupljeniji bio M2 FAB podtip, dok je kod *BAALC*<sup>-</sup> pacijenata najviše pacijenata pripadalo podtipu M5, što je takođe zapažanje velikog broja istraživača (Rashed RA, 2015; Metzeler KH, 2009; Langer C, 2008b; Baldus CD, 2006; Bienz M, 2005; Baldus CD, 2003b;). Ovakav nalaz ukazuje na to da je *BAALC* ekspresija prevashodno prisutna u najmanje diferenciranim M0, M1 i M2 FAB podtipovima, a da je manje zastupljena u podtipovima AML kod kojih su prisutne ćelije na višem stupnju diferencijacije (M4 i M5).

Analizom povezanosti nivoa *BAALC* ekspresije i kliničkih karakteristika AML-NK pacijenata kao što je procenat blasta u perifernoj krvi, odnosno u koštanoj srži, ukupan broj leukocita, nivo hemoglobina i nivo LDH, životno doba pacijenta, nismo uočili značajne korelacije, što je nalaz i mnogih drugih (Weber S, 2014; Bienz M, 2005; Metzeler KH, 2009; Baldus CD, 2006).

Analizom povezanosti ekspresije *BAALC* sa *IDH1* i *IDH2* mutacionim statusom, nismo našli različitu zastupljenost ovih mutacija u *BAALC*<sup>+</sup> i *BAALC*<sup>-</sup> grupi. Naši rezultati poklapaju se sa zapažanjima Weber S i saradnika, koji takođe nisu uočili veze sa *IDH1R132* i *IDH2R140* mutacijama, ali su prijavili snažnu korelaciju visokog nivoa *BAALC* ekspresije sa *IDH2R172* mutacijama (Weber S, 2014). U našoj grupi pacijenata, samo 2/14 *IDH* pozitivnih su imala *IDH2R172* mutaciju, i kod oba je bila prisutna visoka ekspresija *BAALC* pri dijagnozi, međutim s obzirom da su samo dva pacijenta u pitanju, ne može se izvesti statistički značajan zaključak. U prethodno navedenoj studiji takođe se ograđuju i govore da se ovaj njihov rezultat mora interpretirati sa oprezom s obzirom da je broj pacijenata sa *IDH2R172* mutacijom bio izuzetno mali, a da je u literaturi već opisano da se ova specifična mutacija razlikuje po učestalosti i prognostičkom značaju, u poređenju sa *IDH1R132* i *IDH2R140* mutacijama (Marcucci G, 2010).

Po pitanju postojanja asocijacije sa drugim molekularnim karakteristikama, visok nivo *BAALC* ekspresije je u našoj analizi bio u izrazito negativnoj korelaciji sa prisustvom mutacije u *NPM1* genu, s obzirom da je 95% *BAALC*<sup>+</sup> pacijenata imalo wt *NPM1*, a *NPM1* mutacije nisu detektovane ni kod jednog pacijenta u *BAALC*<sup>visok</sup> grupi. Ovaj rezultat je po našem saznanju uniforman među svim istraživačkim grupama (Rashed RA, 2015; Weber S,

2014; Brand J, 2013; Haferlach C, 2012b; Rockova V, 2011; Santamaria C, 2010; Langer C, 2008b). Kako je prisustvo *FLT3/ITD* mutacije pokazano samo kod 5 pacijenata sa *BAALC<sup>visok</sup>* statusom, najbrojniji u grupi AML-NK pacijenata sa visokom ekspresijom *BAALC* su bili tzv. dvostrukonegativni pacijenti (*FLT3-ITD/NPM1* su činili 76% pacijenata sa *BAALC<sup>visok</sup>* statusom). Upravo za ovu grupu AML-NK pacijenata postoji konstantna težnja istraživača za definisanjem novih molekularnih markera sa dijagnostičkim i prognostičkim značajem. Naime, Baldus C i saradnici su pokazali je da je visok nivo *BAALC* ekspresije bio povezan sa kraćim ukupnim preživljavanjem i kraćom dužinom trajanja kompletne remisije, u poređenju sa grupom sa niskim nivoom *BAALC*, na osnovu čega proizilazi zaključak da bi *BAALC* ekspresija mogla predstavljati nov prognostički marker, naročito koristan u grupi AML-NK pacijenata koji nemaju *FLT3/ITD* mutacije (Baldus CD, 2007).

U literaturi danas je prisutna heterogenost u rezultatima ispitivanja prognostičkog značaja *BAALC* ekspresije kod obolelih od AML. Za razliku od nas, u drugim studijama je pokazan jasan nepovoljni prognostički značaj povećane ekspresije *BAALC* gena, naročito po pitanju pojave rezistencije i niže stope postizanja kompletne remisije (Baldus CD, 2006; Langer C, 2008b; Schwind S, 2010; Eisfeld AK, 2012). U našoj studiji je pokazana samo tendencija ka nižoj stopi postizanja kompletne remisije, kao i ka njenom kraćem trajanju koja nije bila statistički značajna, što je u saglasnosti sa rezultatima nekoliko istraživačkih grupa (Weber S, 2014; Bienz M, 2005; Langer C, 2008; Rockova V, 2011; Rashed RA, 2015). Nešto slično smo detektovali i analizom uticaja visine *BAALC* ekspresije na ukupno preživljavanje (u *BAALC<sup>visok</sup>* grupi pacijenata je iznosila 5 meseci u poređenju sa *BAALC<sup>nizak</sup>* grupom 8 meseci). Dok neke studije nisu mogle da statistički potvrde nepovoljan prognostički efekat visoke *BAALC* ekspresije na ukupno preživljavanje (Haferlach C, 2012b; Metzeler KH, 2009), mnoge druge su nedvosmisleno pokazale ovaj efekat čak i u multivarijantnim analizama (Tanner SM, 2001; Baldus CD, 2003b; Bienz M, 2005; Marcucci G, 2005; Baldus CD, 2006; Langer C, 2009; Metzeler KH, 2009; Santamaria C, 2009; Schwind S, 2010; Eisfeld AK, 2012). Smatramo da su razlike u navedenim rezultatima uzrokovane brojnim faktorima. Pa tako, kao što je i prethodno navedeno, izrazita je razlika u veličini analizirane grupe pacijenata, u njihovoj heterogenosti po pitanju citogenetičkog nalaza, starosti,

primenjenom terapijskom protokolu, kao i različitim metodološkim pristupima koji su primenjeni u analizi ekspresije *BAALC* gena.

Do sada su samo dve studije ispitale vrednost koju *BAALC* ekspresija može imati kao potencijalni marker za molekularno praćenje minimalne rezidualne bolesti (MRB) (Najima Y, 2010; Weber S, 2014). Najima Y i saradnici su ukazali na primenljivost *BAALC* ekspresije kao targeta minimalne rezidualne bolesti u grupi od 34 AML i 11 ALL pacijenata, a Weber S i saradnici u grupi od 57 AML pacijenta. Prema broju dostupnih uzoraka nakon indukciono terapije (29 pacijenata), naša studija može se meriti sa prethodno navedenim. Ono što smo приметili jeste da je nakon indukciono terapije samo kod 2 pacijenta detektovan nivo *BAALC* ekspresije bio viši od opsega detektovanog kod zdravih kontrola. Ovo bi trebalo da znači da je odgovor na primenjenu terapiju kod posmatranih pacijenata bio zadovoljavajući, ali kako bismo izbegli korišćenje apsolutnih brojeva koji označavaju vrednosti *BAALC* ekspresije, koristili smo tzv. logaritmovanu vrednost redukcije *BAALC* ekspresije izmerene na početku lečenja i nakon inicijalne terapije. Veličina logaritamske redukcije nivoa ekspresije gena govori o potencijalu koji dati marker ima kao marker za praćenje MRB. Da bi se za neki marker reklo da je dobar za praćenje MRB, potrebno je da se njegova ekspresija nakon indukciono terapije smanji za minimum 1 log vrednosti. Kod 15 pacijenata, koji su bili *BAALC*<sup>+</sup> pri dijagnozi, kod njih 8 je detektovana log redukcija *BAALC* ekspresije veća od 1 (>1 log), dok je kod preostalih 5 pacijenata nivo redukcije bio manji od 1 (<1 log). Kod pacijenata sa >1 log redukcijom, detektovali smo nižu stopu pojave relapsa bolesti kao i duže trajanje kompletne remisije. I rezultati Weber S i saradnika, pokazuju da je redukcija *BAALC* ekspresije nakon inicijalne terapije ispod inicijalno definisane „cut-off“ granice, što je rezultovalo u većoj dužini trajanja kompletne remisije (Weber S, 2014). Navedeni nalazi govore ne samo o značaju detekcije *BAALC* ekspresije kao markera za praćenje rezidualne bolesti, već takođe potvrđuje validnost „cut-off“ granice postavljene pri dijagnozi.

Posmatrajući vrednosti *BAALC* ekspresije kod 15 pacijenata za koje smo imali uparene dijagnoza/relaps uzorke, stabilnost ekspresije ovog gena smo mogli da pratimo samo kod njih 7 koji su imali *BAALC*<sup>+</sup> status. Kod ovih pacijenata nivo *BAALC* ekspresije pri relapsu bolesti u potpunosti je odgovarao onom detektovanom pri dijagnozi. Iako se radi o veoma malom broju pacijenta navedeni rezultati su u skladu sa drugim studijama ukazujući na



činjenicu da je *BAALC* ekspresija predstavlja stabilan marker prisustva bolesti kod *BAALC*<sup>+</sup> pacijenata (Weber S, 2014).

Funkcija *BAALC* gena u hematopoetskom sistemu kao i njegov doprinos leukemogenezi, do danas nije u potpunosti rasvetljen. Međutim, brojne studije su pokušale da rasvetle njegov prognostički značaj kod obolelih od AML. Rezultat naše studije govori o njegovom parcijalnom uticaju na duzinu trajanja kompletne remisije i ukupno preživljavanje, ali kao što su to nagovestili i drugi autori, i mi smatramo da njegov prognostički smisao leži u interakciji sa drugim molekularnim markerima (Bou Samra E, 2012; Haferlach C, 2012b; Schwind S, 2010; Mrozek K, 2007).

## V - 5. Ekspresija *MNI* gena

Analiza ekspresije *MNI* kod velikog broja AML pacijenata kao i funkcionalne studije su ukazale na to da prekomerna ekspresija *MNI* može dovesti do nastanka agresivnog mijeloidnog maligniteta (Carella C, 2007; Heuser M, 2007). Ustanovljeno je da *MNI* ima kritičnu ulogu u leukemogenezi, s obzirom da njegova prekomerna ekspresija u humanim CD34<sup>+</sup> ćelijama krvi pupčane vrpce dramatično povećava njihov proliferativni potencijal, a da utišavanje *MNI* ekspresije u humanim leukemijskim ćelijskim linijama redukuje njihovu proliferaciju (Kandilci and Grosveld, 2009; Liu et al., 2010). Takođe, kod pacijenata sa visokom *MNI* ekspresijom primećena je pojava rezistencije na primenu ATRA-e, terapeutika koji indukuje diferencijaciju u *in vitro* uslovima kao i kod AML pacijenata (Heuser M, 2007).

Molekularni mehanizmi putem kojih *MNI* ostvaruje svoje efekte su većim delom nepoznati. Pokazano je da konstitutivna aktivacija *MNI* gena indukuje AML bez potrebe za prisustvom nekih drugih aberacija, pri čemu dolazi do stimulacije samoobnavljanja i blokade diferencijacije (Heuser et al., 2007). Svoju ulogu u procesima leukemogeneze *MNI* može ostvariti samostalno ili u kooperaciji sa drugim aberacijama kada se stvara himerni, aberantni onkogen kao npr. u slučaju prisustva t(12;22) translokacije, odnosno *MNI*/TEL fuzionog

proteina kod obolelih od B-ALL (Kawagoe H, 2005; Heuser M, 2006). Kod obolelih od AML, MN1 svoj leukemogeni efekat uglavnom obavlja udruženim delovanjem sa drugim onkogenima. Takav je mehanizam pokazan kod npr. pacijenata okarakterisanih prisustvom rekurentne hromozomske aberacije *inv(16)*, odnosno *CBFB/MYH11* fuzionim onkogenom (Carella C, 2007). Kod ovih pacijenata je detektovan najviši nivo *MNI* ekspresije, u poređenju sa ostalim tipovima AML. Međutim, zanimljivo je da je i izvestan procenat AML-NK pacijenata pokazao prekomernu ekspresiju ovog gena, pa se postavilo pitanje njegovog biološkog i prognostičkog značaja.

U našoj studiji analizirano je 111 *de novo* AML-NK pacijenata i prisustvo ekspresije *MNI* je nađeno kod 39% pacijenata (*MNI*<sup>+</sup> pacijenti). Ovo znači da je 43 pacijenta imalo *MNI* ekspresiju višu od gornjeg limita ekspresije detektovane među zdravim kontrolama. Primenom „cut-off“ vrednosti u vidu medijane ekspresije kod *MNI*<sup>+</sup> pacijenata, dobili smo da je 49% imalo prekomernu ekspresiju *MNI*, odnosno *MNI*<sup>visok</sup> status. Ovaj nalaz je u skladu sa prethodno objavljenim studijama koji navode opseg od 50 – 67% pacijenata sa *MNI*<sup>visok</sup> statusom (Xiang L, 2013; Shafik RE, ; Schwind S, 2011). Rezultati naše analize govore da nije postojala povezanost prisustva *MNI* ekspresije i kliničkih karakteristika *MNI*<sup>+</sup> pacijenata kao što su starosno doba, procenat blasta u perifernoj krvi i koštanoj srži, ukupan broj leukocita, nivo hemoglobina, nivo trombocita, nivo LDH. Takođe, uočili smo da su *MNI*<sup>+</sup> pacijenti većinom pripadali M2 FAB podgrupi sto je sve zajedno predstavljalo nalaz dokumentovan i od strane drugih studija (Salah A, 2013; Xiang L, 2013; Schwind S, 2011; Langer C, 2009; Heuser M, 2006). Analiza povezanosti *MNI* ekspresije sa drugim molekularnim markerima je pokazala statistički snažnu povezanost *MNI*<sup>+</sup> statusa i odsustva mutacija u *NPM1* genu, a za razliku od drugih istraživanja u našoj kohorti AML-NK pacijenata izostalo je prisustvo veze *MNI*<sup>+</sup> statusa sa postojanjem *FLT3/ITD* mutacija (Salah A, 2013; Langer C, 2009; Heuser M, 2006). Štaviše, u našoj grupi *MNI*<sup>+</sup> pacijenata najučestaliji su bili pacijenti sa dvostruko negativnim *FLT3-ITD*<sup>-</sup>/*NPM1*<sup>-</sup> statusom.

Ispitivanje prognostičkog značaja visoke ekspresije *MNI* u našoj studiji su pokazala da su pacijenti sa *MNI*<sup>visok</sup> statusom imali nepovoljan tok bolesti. Pacijenti sa visokim nivoom

*MNI* ekspresije imali su nižu stopu postizanja kompletne remisije. Ovo je u saglasnosti sa nalazima Heuser M i saradnika koji su prijavili da je *MNI* nezavistan prognostički marker kod AML pacijenata (Heuser M, 2006). Takođe, detektovali smo da je prekomerna ekspresija *MNI* bila povezana sa kraćim ukupnim preživljvanjem i kraćom dužinom trajanja kompletne remisije. Brojne studije su pokazale ovakav nalaz ukazujući na značaj uticaja *MNI* ekspresije na leukemijski fenotip obolelih od AML (Grosveld GC, 2007; Heuser M, 2007; Schwind S, 2011; Salah A, 2013, Xiang L, 2013). Naši rezultati ukazuju da prekomerna ekspresija *MNI* predstavlja nov prognostički marker kod AML-NK, da je povezana sa nižom stopom postizanja kompletne remisije, kraćom dužinom trajanja kompletne remisije i kraćim ukupnim preživljvanjem. Validacija ovih nalaza u prekliničkim modelima i većim kliničkim studijama može dovesti do dizajniranja novih terapija koje targetuju leukemijske mehanizame regulisane od strane *MNI* kofaktora. Uspostavljanje standarda za metodu kvantifikacije ekspresije *MNI* gena i definisanje apsolutne „cut-off“ vrednosti, omogućice da merenje nivoa *MNI* ekspresije pre primene terapije može biti uključeno u dijagnostičke panele i upotrebljeno da poboljša stratifikaciju rizika AML-NK pacijenata, naročito onih sa *FLT3-ITD*/*NPM1* statusom.

O kinetici *MNI* ekspresije u toku lečenja AML se veoma malo zna. Tačnije, pretragom literature naišli smo na samo jednu objavljenu studiju Carturan S i saradnika, koja se bavi analizom *MNI* ekspresije i u drugim fazama bolesti, a ne samo na njenom početku (Carturan S, 2016). U navedenoj studiji je praćen 41 pacijent, ali je većina njih pripadala AML sa karakterističnim hromozomskim aberacijama kao što su *inv(16)* i *t(8;21)*. Samim tim naša analiza u kojoj smo kod 30 AML-NK pacijenata pratili nivo *MNI* ekspresije i u drugim fazama bolesti, nije zanemarljiva. Kao i kod Carturan S i saradnika, i kod naših pacijenata u fazi kompletne remisije detektovan nivo *MNI* je bio niži od onog na početku bolesti i nazio se u opsegu vrednosti zdravih kontrola. Kao i u slučaju prethodno analiziranih *WT1* i *BAALC* gena, ovaj nalaz govori o tome da je odgovor na primenjenu terapiju kod posmatranih pacijenata bio zadovoljavajući, ali kako bi mogli da upoređujemo značaj redukcije ekspresije između različitih pacijenata koristili smo tzv. logaritmovanu vrednost redukcije *MNI* ekspresije izmerene na početku lečenja i nakon inicijalne terapije. Pa su tako pacijenti sa  $>1$

log redukcijom *MNI* ekspresije u našoj studiji imali duže trajanje kompletne remisije, u odnosu na pacijente sa  $<1$  log redukcijom. Iako ove rezultate nismo mogli da uporedimo sa studijom Carturan S i saradnika (gde su koristili metod apsolutne kvantifikacije *MNI* transkripta), možemo zaključiti da je održavanje *MNI* ekspresije na nivou detektovanom kod zdravih kontrola bio znak da se pacijent nalazi u kompletnoj molekularnoj remisiji. Naime, pokazano je da nivo *MNI* ekspresije u toku bolesti prati nivo ekspresije fuzionih transkripata koji predstavljaju obeležje prisustva leukemijskih ćelija (Carturan S, 2016). Na osnovu navedenog možemo da zaključimo da, *MNI*<sup>visok</sup> status zaista može biti posmatran kao osobina koju poseduju isključivo leukemijske ćelije, te samim tim ima osobinu markera minimalne rezidualne bolesti. Međutim, nalaz da je 4/7 *MNI*<sup>+</sup> pacijenata u relapsu imalo *MNI* ekspresiju nižu od „cut-off“ vrednosti govori o tome da ovaj marker nije stabilan i da se može menjati u toku bolesti pod uticajem terapije.

## V - 6. Udruženost ekspresije *BAALC* i *MNI* gena

U našoj studiji koja je obuhvatila 111 de novo AML-NK pacijenata, primetili smo visoku korelaciju između ekspresije *BAALC* i *MNI* gena. Ovakav nalaz prijavljen je i od strane drugih, štaviše zapaženo je da *MNI*<sup>+</sup> pacijenti dele isti genetički i mikro-RNK ekspresioni profil sa *BAALC*<sup>+</sup> pacijentima (Langer C, 2009; Bou Samre E, 2012). Iako se tačan mehanizam kojim *BAALC* i *MNI* pojedinačno dovode do leukemogeneze ne zna, verovatno se može govoriti o udruženom delovanju ova dva gena u procesu maligne transformacije, koja rezultuje u specifičnom leukemijskom fenotipu.

Međutim, najviše studija je posvećeno izučavanju udruženog uticaja *BAALC* i *MNI*, kao i nekih drugih gena, na prognozu i ishod obolelih od AML-NK. U ovom tipu leukemije kome pripada čak 50% svih adultnih slučajeva AML, prognostičke grupe su bazirane isključivo na mutacionom statusu i to prevashodno *NPM1* i *FLT3* gena (Baldus CD, 2006; Marcucci G, 2007). Danas su prisutni pokušaji da se izgradi tzv. “prognostički skor” koji će u sebi sadržati pored podataka o mutacionom statusu gena i podatke o ekspresiji pojedinih gena kao što su

*WT1*, *EVII*, *BAALC*, *ERG* i *MNI* (Mrozek K, 2007; Metzeler KH, 2009; Schwind S, 2010; Bou Samra E, 2012; Haferlach C, 2012).

U našem istraživanju zbog izuzetne korelacije u ekspresiji između *BAALC* i *MNI*, ali ne i kod drugih ispitivanih gena, bilo nam je logično da probamo da ispitamo eventualno postojanje njihovog zajedničkog efekta na prognozu i ishod bolesti. Definisali smo grupu od 51 *BAALC*<sup>+</sup>/*MNI*<sup>+</sup> pacijenata, odnosno 12 pacijenata sa udruženim *BAALC*<sup>visok</sup>/*MNI*<sup>visok</sup> statusom. U ovoj grupi pacijenta svi su imali *FLT3-ITD*<sup>-</sup>/*NPM1*<sup>-</sup> status, i u poređenju sa drugim pacijentima odlikovali su se nižom stopom postizanja kompletne remisije i smrtnim ishodom bolesti. Takođe kod *BAALC*<sup>visok</sup>/*MNI*<sup>visok</sup> pacijenata detektovano je i značajno kraće trajanje kompletne remisije, kao i kraće ukupno preživljavanje, ali pokazane statističke vrednosti ovakvog „udruženog“ delovanja *BAALC* i *MNI* ekspresionog statusa nije nadjačavao njihovu pojedinačnu snagu. Smatramo da je ovo isključivo posledica male veličine nama dostupnih uzoraka, i da razjašnjenje njihove biološke i kliničko-prognostičke uloge kod AML-NK leukemija leži u ispitivanju velikog broja pacijenata, i sagledavanju njihovog mutacionog i ekspresionog genetičkog i mikro-RNK profila.

## VI – ZAKLJUČCI

### Mutacioni profil dečje i adultne AML

- ✓ Analizom mutacionog profila uzoraka 20 dečjih i 20 adultnih AML pacijenata na TruSeq Cancer Panel (TSACP) platformi detektovan je mali broj mutacija, u proseku samo 3 po pacijentu u obe starosne grupe.
- ✓ Prisustvo mutacija u 4 gena (*JAK3*, *ABL1*, *GNAQ* i *EGFR*) koji kodiraju tirozin kinaze ili proteine koji su udruženi sa tirozin kinazama detektovano je isključivo kod dečjih AML pacijenata, dok je kod pet gena (*IDH1*, *APC*, *HNF1A*, *GNAS* i *SMARCB1*) koji su uključeni u metilaciju i modifikaciju histona prisustvo mutacija utvrđeno isključivo kod adultnih AML pacijenata.
- ✓ Najveće razlike između ove dve starosne grupe AML pacijenata utvrđene su u tzv. „leukemijskim genima“ uključujući *IDH1*, *IDH2* i *NPM1*.

### WT1 ekspresija

- ✓ Ispitivanje ekspresije *WT1* gena kod 104 *de novo* AML-NK pacijenata pokazalo je da je ekspresija ovog gena kod obolelih znatno viša od one detekovane kod zdravih kontrola.
- ✓ Pokazano je da visok nivo *WT1* ekspresije predstavlja nezavistan nepovoljan prognostički faktor za postizanje kompletne remisije, a može ukazati i na potencijalnu pojavu rezistencije na terapiju
- ✓ Pacijenti sa *WT1*<sup>visok</sup> statusom imaju kraće trajanje kompletne remisije i kraće vreme ukupnog preživljavanja
- ✓ Ekspresija *WT1* predstavlja dobar molekularni marker za praćenje minimalne rezidualne bolesti, odgovora na terapiju i predikciju relapsa bolesti

- ✓ Visok nivo ekspresije *WT1* je važan za preciznije definisanje prognostičkih grupa kod obolelih od AML-NK, i ukazuje na neophodnost primene intenzivnije, odnosno specifične anti-WT1 usmerene terapije.

### **EVII ekspresija**

- ✓ Ispitivanje ekspresije *EVII* gena kod 104 *de novo* AML-NK pacijenata pokazalo je da je ekspresija ovog gena kod obolelih značajno uvećana samo kod 11.5% pacijenata, dok je kod oko 50% pacijenata nije bilo moguće registrovati ili je ona bila na granici detektabilnosti.
- ✓ Pokazano je da se *EVII*<sup>+</sup> status AML/NK pacijenata nalazi u obrnutoj korelaciji sa prisustvom *NPM1* i *FLT3/ITD* mutacija.
- ✓ Pacijenti sa *EVII*<sup>+</sup> statusom pokazali su povećan rizik od pojave relapsa bolesti, ali bez uticaja na dužinu trajanja kompletne remisije i ukupnog preživljavanja.

### **BAALC ekspresija**

- ✓ Ispitivanje ekspresije *BAALC* gena kod 111 *de novo* AML-NK pacijenata pokazalo je da je ekspresija ovog gena kod obolelih viša od one detetovane kod zdravih kontrola u 38% slučajeva.
- ✓ Pokazano je da visok nivo *BAALC* ekspresije kod *BAALC*<sup>+</sup> pacijenata predstavljala nepovoljan prognostički faktor, jer su pacijenti sa *BAALC*<sup>visok</sup> statusom imali kraće trajanje kompletne remisije i ukupnog preživljavanja.
- ✓ Ekspresija *BAALC* predstavlja stabilan molekularni marker pogodan za praćenje minimalne rezidualne bolesti i odgovora na terapiju.

**MN1 ekspresija**

- ✓ Ispitivanje ekspresije *MN1* gena kod 111 *de novo* AML-NK pacijenata pokazalo je da je ekspresija ovog gena kod obolelih viša od one detetovane kod zdravih kontrola u 39% slučajeva .
- ✓ Pokazano je da visok nivo *MN1* ekspresije kod *MN1*<sup>+</sup> pacijenata predstavlja nepovoljan prognostički faktor, jer su pacijenti sa *MN1*<sup>visok</sup> statusom imali značajno kraće ukupno preživljavanje i kraću dužinu trajanja kompletne remisije.
- ✓ Ekspresija *MN1* gena predstavlja molekularni marker pogodan za praćenje odgovora na početno primenjenu inicijalnu terapiju, ali činjenica da neki *MN1*<sup>+</sup> pacijenti nisu imali uvećanu ekspresiju prilikom relapsa bolesti, govori o tome da ekspresija ovog gena nije stabilan marker za praćenje minimalne rezidualne bolesti.

**Povezanost ekspresije *BAALC* i *MN1***

- ✓ Analiza povezanosti nivoa ekspresije *BAALC* i *MN1* gena kod 111 pacijenata obolelih od AML-NK je pokazala da je njihova ekspresija pozitivno korelisana.
- ✓ U posmatranoj grupi pacijenata nismo uspeli da pokažemo da udruženi *BAALC*<sup>visok</sup>/*MN1*<sup>visok</sup> status ima snažniju prognostičku prediktivnu moć od pojedinačnog *BAALC*<sup>visok</sup> i *MN1*<sup>visok</sup> statusa.



## **VII – LITERATURA**

Agaram NP, Laquaglia MP, Ustun B. Molecular characterization of pediatric gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14:3204–3215.

Ahmad F, Mohota R, Sanap S. Molecular evaluation of DNMT3A and IDH1/2 gene mutation: frequency, distribution pattern and associations with additional molecular markers in normal karyotype Indian acute myeloid leukemia patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(3):1247-53.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature.* 2000;404: 193-197.

Alonso-Dominguez JM, Tenorio M, Velasco D. Correlation of WT1 expression with the burden of total and residual leukemic blasts in bone marrow samples of acute myeloid leukemia patients. *Cancer Genet.* 2012 Apr;205(4):190-1.

Amary MF, Bacsi K, Maggiani F. IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J Pathol.* 2011;224(3):334-343.

Andersson AK, Miller DW, Lynch JA. IDH1 and IDH2 mutations in pediatric acute leukemia. *Leukemia.* 2011 Oct;25(10):1570-7.

Andersson C, Li X, Lorenz F. Reduction in WT1 gene expression during early treatment predicts the outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Diagn Mol Pathol.* 2012 Dec;21(4):225-33.

Appelbaum FR, Rowe JM, Radich J, Dick JE. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2001:62-86

Arai S, Yoshimi A, Shimabe M. Evi-1 is a transcriptional target of mixed-lineage leukemia oncoproteins in hematopoietic stem cells. *Blood.* 2011 Jun 9;117(23):6304-14.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016 May 19;127(20):2391-405.

Aref S, Ibrahim L, Morkes H. Meningioma 1 (MN1) expression: refined risk stratification in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics (CN-AML). *Hematology.* 2013 Sep;18(5):277-83

Baldus CD, Mrozek K, Marcucci G. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol*. 2007 Jun;137(5):387-400.

Baldus CD, Tanner SM, Kusewitt DF. BAALC, a novel marker of human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2003a Nov;31(11):1051-6.

Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*. 2003b Sep 1;102(5):1613-8.

Baldus CD, Thiede C, Soucek S. BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *J Clin Oncol*. 2006 Feb 10;24(5):790-7.

Balgobind BV, Lugthart S, Hollink IH. EVI1 overexpression in distinct subtypes of pediatric acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010 May;24(5):942-9.

Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood*. 2003 Feb 1;101(3):837-845.

Barragan PD, Gale RE, Linch DC. Flt3 mutations and leukaemia. *Br J Haematol* 2003;122:523-38.

Barragan E, Cervera J, Bolufer P. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2004 Aug;89(8):926-33.

Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003; 17: 2474-2486.

Bergmann L, Miething C, Maurer U. High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* 1997;90(3):1217-25.

Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 15;11(4):1416-24.

Bindels EMJ, Havermans M, Lugthart S. EVI1 is critical for the pathogenesis of a subset of MLL-AF9-rearranged AMLs. *Blood*. 2012 Jun 14;119(24):5838-49.

Blobel, G.A. CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood* 95, 745-55 (2000).

Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res.* 1998;58(18):4173-4179.

Bodian DL, McCutcheon JN, Kothiyal P. Germline variation in cancer-susceptibility genes in a healthy, ancestrally diverse cohort: implications for individual genome sequencing. *PLoS One* 2014;9:e94554.

Boissel N, Nibourel O, Renneville A. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol.* 2010 Aug 10;28(23):3717-23.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997 Jul;3(7):730-7.

Bou Samra E, Klein B, Commes T. Development of gene expression-based risk score in cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients. *Oncotarget.* 2012 Aug;3(8):824-32.

Boyapati A, Kanbe E, Zhang DE. p53 alterations in myeloid leukemia. *Acta Haematol* 2004; 111: 100–106.

Boyd KE, Xiao YY, Fan K. Sox4 cooperates with Evi1 in AKXD-23 myeloid tumors via transactivation of proviral LTR. *Blood.* 2006 Jan 15;107(2):733-741.

Brand J, van Vliet MH, de Best L. A standardized microarray assay for the independent gene expression markers in AML: EVI1 and BAALC. *Exp Hematol Oncol.* 2013 Mar 6;2(1):7.

Buijs A, Sherr S, van Baal S. Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11. *Oncogene.* 1995 Apr 20;10(8):1511-9.

Buonamici S, Li D, Chi Y. EVI1 induces myelodysplastic syndrome in mice. *J Clin Invest* 2004; 114: 713–9.

Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond).* 2005 Oct;109(4):365-79.

Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood.* 2002 Dec 15;100(13):4325-36.

Cairns RA, Iqbal J, Lemonnier F. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood.* 2012;119(8):1901-1903.

Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368:2059-74.

Carapeti M.,Goldman JM, Cross, NC. Overexpression of Evi-1 in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996 Sep;10(9):1561.

Carella C, Bonten, J, Sirma, S. MN1 overexpression is an important step in the development of inv(16) AML. *Leukemia*. 2007 Aug;21(8):1679-90.

Cattaneo F1, Nucifora G. EVI1 recruits the histone methyltransferase SUV39H1 for transcription repression. *J Cell Biochem*. 2008 Oct 1;105(2):344-52.

Chaturvedi A, Araujo Cruz MM, Jyotsana N. Mutant IDH1 promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML. *Blood*. 2013 Oct 17;122(16):2877-87.

Chen W, Jones D, Medeiros LJ. Acute myeloid leukaemia with FLT3 gene mutations of both internal tandem duplication and point mutation type. *Br J Haematol*. 2005 Sep;130(5):726-8.

Chiara F, Semra A, Ludovica R. WT1 Expression In Acute Myeloid Leukaemia: A Useful Marker For Improving Therapy Response Evaluation. November 15, 2013. *Blood*: 122(21)

Chou WC, Hou HA, Chen CY. Distinct clinical and biologic characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing the isocitrate dehydrogenase 1 mutation. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2749-54.

Chou WC, Lei WC, Ko BS. The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011 Feb;25(2):246-53.

Chou WC, Peng KY, Lei WC. Persistence of mutant isocitrate dehydrogenase in patients with acute myeloid leukemia in remission. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):527-9.

Cilloni D, Messa F, Arruga F. Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukaemia by measurement of WT1 transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy. *Haematologica* 2008;93:921–4.

Cilloni D, Renneville A, Hermitte F. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 1;27(31):5195-201

Coppes MJ, Campbell, CE, Williams, BR. The role of WT1 in Wilms tumorigenesis. *FASEB J*. 1993 Jul;7(10):886-95.

Damiani D, Tiribelli M, Franzoni A. BAALC overexpression retains its negative prognostic role across all cytogenetic risk groups in acute myeloid leukemia patients. *Am J Hematol*. 2013 Oct;88(10):848-52.

- Dang L, White DW, Gross S. Cancer associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009 déc 10;462(7274):73944.
- Deuel TF, Guan LS, Wang ZY. Wilms' tumor gene product WT1 arrests macrophage differentiation of HL-60 cells through its zinc-finger domain. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 192–196.
- Di Stasi A, Jimenez AM, Minagawa K et al. Review of the Results of WT1 Peptide Vaccination Strategies for Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia from Nine Different Studies. *Front Immunol*. 2015; 6:36.
- Dick J.E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):4793-807.
- Döhner H, Estey EH, Amadori S. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115: 453-74.
- Döhner H, Estey E, Grimwade D. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 129(4):424-447.
- Döhner K, Schlenk RF, Habdank M. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005;106(12):37403746.
- Drexler HG. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia* 1996;10:588-99.
- Eisfeld AK, Marcucci G, Liyanarachchi S. Heritable polymorphism predisposes to high BAALC expression in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 24;109(17):6668-73.
- Eisfeld AK, Schwind S, Patel R. Intronic miR-3151 within BAALC drives leukemogenesis by deregulating the TP53 pathway. *Sci Signal*. 2014 Apr 15;7(321):ra36.
- Falini B, Sportoletti P, Martelli MP. Acute myeloid leukemia with mutated NPM1: diagnosis, prognosis and therapeutic perspectives. *Curr Opin Oncol* 2009;21:573-81.
- Fears S, Mathieu C, Zeleznik-Le N. Intergenic splicing of MDS1 and EVI1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Feb 20;93(4):1642-7.
- Ficara F, Murphy MJ, Lin M. Pbx1 regulates self-renewal of long-term hematopoietic stem cells by maintaining their quiescence. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 484–96.
- Figuroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18(6):553-567

- Frohling S, Schlenk RF, Breittruck J, et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*. 2002; 100(13):4372-4380
- Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*. 2004;22(4):624-633.
- Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies—pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol*. 2005;23:6285-6295
- Gaiger A, Schmid D, Heinze G. Detection of the WT1 transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1998; 12(12):1886–94.
- Gao L, Bellantuono I, Elsässer A. Selective elimination of leukemic CD34 (+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood*. 2000; 95: 2198- 2203.
- Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T. MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. 2007 Jun 14;26(28):4148-57.
- Gerhardt TM, Schmahl GE, Flotho C. Expression of the Evi-1 gene in haemopoietic cells of children with juvenile myelomonocytic leukaemia and normal donors. *Br J Haematol*. 1997 Dec;99(4):882-7.
- Glass C, Wilson M, Gonzalez R. The role of EVI1 in myeloid malignancies. *Blood Cells Mol Dis*. 2014 Jun-Aug;53(1-2):67-76.
- Glass C, Wuertzer C, Cui X. Global Identification of EVI1 Target Genes in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS One*. 2013 Jun 27;8(6):e67134.
- Glubb DM, Cerri E, Giese A. Novel functional germline variants in the VEGF receptor 2 gene and their effect on gene expression and microvessel density in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Aug 15;17(16):5257-67.
- Goardon N, Marchi E, Atzberger A. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2011 Jan 18;19(1):138-52.
- Goyama S, Yamamoto G, Shimabe M. Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and transformed leukemic cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 207–20.
- Goyama S, Kurokawa M. Pathogenetic significance of ecotropic viral integration site-1 in hematological malignancies. *Cancer Sci*. 2009 Jun;100(6):990-5

- Gray JX, McMillen L, Mollee P. WT1 expression as a marker of minimal residual disease predicts outcome in acute myeloid leukemia when measured post-consolidation. *Leuk Res.* 2012 Apr;36(4):453-8.
- Green A, Beer P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2010;362(4):369-370.
- Grimwade D, Walker H, Oliver F. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial: The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood.* 1998;92:2322-2333.
- Gröschel S, Lugthart S, Schlenk RF. High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J Clin Oncol.* 2010 Apr 20;28(12):2101-7.
- Gröschel S, Schlenk RF, Engelmann J. Deregulated expression of EVI1 defines a poor prognostic subset of MLL-rearranged acute myeloid leukemias: a study of the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group and the Dutch-Belgian-Swiss HOVON/SAKK Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 2013 Jan 1;31(1):95-103.
- Gross S, Cairns RA, Minden MD. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med.* 2010 Feb 15;207(2):339-44.
- Grosveld GC. MN1, a novel player in human AML. *Blood Cells Mol Dis.* 2007 Nov-Dec;39(3):336-9.
- Lai CK, et al. Cell fate decisions in malignant hematopoiesis: leukemia phenotype is determined by distinct functional domains of the MN1 oncogene. *PLoS One.* 2014;9(11):e112671.
- Haber DA, Buckler AJ, Glaser T. An internal deletion within an 11 p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell.* 1990 Jun 29;61(7):1257-69.
- Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9618–9622
- Haferlach C, Bacher U, Grossmann V. Three novel cytogenetically cryptic EVI1 rearrangements associated with increased EVI1 expression and poor prognosis identified in 27 acute myeloid leukemia cases. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012a Dec;51(12):1079-85.
- Haferlach C, Kern W, Schindela S. Gene expression of BAALC, CDKN1B, ERG, and MN1 adds independent prognostic information to cytogenetics and molecular mutations in adult acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012b Mar;51(3):257-65.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.

Heuser M, Argiropoulos B, Kuchenbauer F. MN1 overexpression induces acute myeloid leukemia in mice and predicts ATRA resistance in AML patients. *Blood* 2007;110:1639–47.

Heuser M, Berg T, Kuchenbauer F. Functional role of BAALC in leukemogenesis. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):532-6.

Heuser M, Beutel G, Krauter J. High meninoma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3898-905.

Heuser M, Sly LM, Argiropoulos B. Modeling the functional heterogeneity of leukemia stem cells: role of STAT5 in leukemia stem cell self-renewal. *Blood*. 2009 Nov 5;114(19):3983-93.

Heuser M, Yun H, Berg T, Yung E. Cell of origin in AML: susceptibility to MN1-induced transformation is regulated by the MEIS1/AbdB-like HOX protein complex. *Cancer Cell*. 2011 Jul 12;20(1):39-52.

Heuser M., Wingen LU, Steinemann D. Gene-expression profiles and their association with drug resistance in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2005 Nov;90(11):1484-92.

Hokland P, Ommen HB. Towards individualized follow-up in adult acute myeloid leukemia in remission. *Blood*. 2011 Mar 3;117(9):2577-84.

Hosen N, Sonoda Y, Oji Y. Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br J Haematol* 2002; 116: 409–420.

Huggett J, O'Grady. (2014) *Molecular Diagnostics – Current Research and Applications*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.

Im AP, Sehgal AR, Carroll MP. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia*. 2014 Sep;28(9):1774-83.

Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994;84:3071–9.

Jeziskova I, Razga F, Bajerova M. IDH2 mutations in patients with acute myeloid leukemia: missense p.R140 mutations are linked to disease status. *Leuk Lymphoma*. 2010 Dec;51(12):2285-7.

Kandilci A, Grosveld GC. Reintroduction of CEBPA in MN1-overexpressing hematopoietic cells prevents their hyperproliferation and restores myeloid differentiation. *Blood*. 2009 Aug 20;114(8):1596-606.



- Karandikar M, Xu S, Cobb MH. MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components. *J Biol Chem* 2000 Dec; 275(51): 40120-40127.
- Kawagoe H, Grosveld GC. Conditional MN1-TEL knock-in mice develop acute myeloid leukemia in conjunction with over expression of HOXA9 13. *Blood* 2005;106:4269–77.
- Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;3:179-98.
- Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2014;28:1586-95.
- Kilbey A, Stephens V, Bartholomew C. Loss of cell cycle control by deregulation of cyclin-dependent kinase 2 kinase activity in Evi-1 transformed fibroblasts. *Cell Growth Differ* 1999; 10: 601–610.
- Kim DH, Xu W, Kamel-Reid S. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor (VEGFA) and VEGF receptor (VEGFR2) gene polymorphism on the treatment outcome following imatinib therapy. *Ann Oncol.* 2010 Jun;21(6):1179-88.
- Kim MO, Kim SH, Cho YY. ERK1 and ERK2 regulate embryonic stem cell self-renewal through phosphorylation of Klf4. *Nat Struct Mol Biol* 2012 Mar; 19(3): 283-290.
- Koh HJ, Lee SM, Son BG. Cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 2004 sept 17;279(38):39968-74.
- Kondo M., Wagers A.J, Manz,M.G. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu.Rev.Immunol.* . 2003; 21:759-806.
- Kreider BL, Orkin SH, Ihle JN. Loss of erythropoietin responsiveness in erythroid progenitors due to expression of the Evi-1 myeloid-transforming gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:6454-6458.
- Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature.* 2006 Aug 17;442(7104):818-22.
- Krstovski N, Tomic N, Janic D. Incidence of FLT3 and nucleophosmin gene mutations in childhood acute myeloid leukemia: Serbian experience and the review of the literature. *Med Oncol* 2010;27:640-5.
- Langabeer SE, Rogers JR, Harrison G. EVI1 expression in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2001 Jan;112(1):208-11.
- Langer C, Maharry, K., Mrozek, K. Low meningioma 1 (MN1) gene expression to predict outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia (CN-AML): a cancer and leukemia group B (CALGB) study. *J Clin Oncol* may 20 suppl, abstr 7011 (2008)a

- Langer C, Radmacher, M.D., Ruppert, A.S. High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood* 111, 5371-9 (2008)b
- Laricchia-Robbio L, Fazzina R, Li D. Point mutations in two EVI1 Zn fingers abolish EVI1-GATA1 interaction and allow erythroid differentiation of murine bone marrow cells. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 7658–66.
- Laricchia-Robbio L, Nucifora G. Significant increase of selfrenewal in hematopoietic cells after forced expression of EVI1. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 40: 141–147.
- Laricchia-Robbio L, Premanand K, Rinaldi CR. EVI1 Impairs myelopoiesis by deregulation of PU.1 function. *Cancer Res* 2009; 69: 1633– 42.
- Lekanne Deprez RH, Riegman PH, Groen NA. Cloning and characterization of MN1, a gene from chromosome 22q11, which is disrupted by a balanced translocation in a meningioma. *Oncogene*. 1995 Apr 20;10(8):1521-8.
- Lessard J, Baban S, Sauvageau G. Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells. *Blood*. 1998 Feb 15;91(4):1216-24.
- Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;363:2424-33.
- Ley TJ, Mardis ER, Ding L. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008 Nov 6;456(7218):66-72 .
- Lichtman JD, Sternberg DW. The molecular pathology of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:137-42.
- Lisovsky M, Estrov Z, Zhang X. FLT3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukaemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood* 1996;88:3987-97.
- Liu T, Jankovic D, Brault L. Functional characterization of high levels of meningioma 1 as collaborating oncogene in acute leukemia. *Leukemia* 2010; 24:601–12.
- Liu Y, Chen L, Ko TC. Evi1 is a survival factor which conveys resistance to both TGFbeta- and taxol-mediated cell death via PI3K/AKT. *Oncogene*. 2006 Jun 15;25(25):3565-3575.
- Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;341:1051-62
- Löwenberg B, Terpstra W. Maturation hierarchy of leukemic stem cells. *Stem Cells*. 1998;16 Suppl 1:85-8; discussion 89.
- Lu C, Ward PS, Kapoor GS. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. 2012; 483(7390):474-478

- Lugthart S, Figueroa ME, Bindels E. Aberrant DNA hypermethylation signature in acute myeloid leukemia directed by EVI1. *Blood* 2011; 117: 234–41.
- Luthra R, Patel KP, Reddy NG. Next-generation sequencing-based multigene mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq: applicability for diagnostics and disease monitoring. *Haematologica* 2014;99:465-73.
- Maheswaran S, Englert C, Bennett P. The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev* 1995; 9: 2143-65.
- Mailloux RJ, Bériault R, Lemire J. The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS ONE*. 2007;2(8):e690.
- Marchesi V. Genetics: the AML mutational landscape. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Jun;10(6):305.
- Marcucci G, Baldus CD, Ruppert AS. Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2005 Dec 20;23(36):9234-42.
- Marcucci G, Maharry K, Wu YZ. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2010 May 10;28(14):2348-55.
- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009;361(11): 1058-1066.
- Marjanovic I, Karan-Djurasevic T, Ugrin M. Use of Wilms Tumor 1 Gene Expression as a Reliable Marker for Prognosis and Minimal Residual Disease Monitoring in Acute Myeloid Leukemia With Normal Karyotype Patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2017 May;17(5):312-319.
- Marjanovic I, Kostic J, Stanic B. Parallel targeted next generation sequencing of childhood and adult acute myeloid leukemia patients reveals uniform genomic profile of the disease. *Tumour Biol*. 2016 Oct;37(10):13391-13401.
- Mayo MW, Wang CY, Drouin SS. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J* 1999;18:3990-4003.
- Meester-Smoor MA, Janssen MJ, Grosveld GC. MN1 affects expression of genes involved in hematopoiesis and can enhance as well as inhibit RAR/RXR-induced gene expression. *Carcinogenesis*. 2008 Oct;29(10):2025-34.
- Metzeler KH, Dufour A, Benthaus T. ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol*. 2009 Oct 20;27(30):5031-8.

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

Morishita K, Parganas E, William CL. Activation of EVI1 gene expression in human acute myelogenous leukemias by translocations spanning 300-400 kilobases on chromosome band 3q26. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3937–3941.

Morishita K, Parker DS, Mucenski ML. Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell* 1988; 54: 831–840.

Mossallam GI, Seki Y, Tanaka T. The association of level of reduction of Wilms' tumor gene 1 mRNA transcript in bone marrow and outcome in acute myeloid leukemia patients. *Leuk Res.* 2015 Jun;39(6):667-71.

Morita K, Masamoto Y, Kataoka K. BAALC potentiates oncogenic ERK pathway through interactions with MEKK1 and KLF4. *Leukemia.* 2015 Nov;29(11):2248-56.

Mrozek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:169-77.

Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.* 2004;18: 115-36.

Mrozek K, Marcucci G, Paschka P. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics, are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood.* 2007 Jan 15;109(2):431-48.

Murugan AK, Bojdani E, Xing M. Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations in thyroid cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 393(3):555-559.

Najima Y, Ohashi K, Kawamura M. Molecular monitoring of BAALC expression in patients with CD34-positive acute leukemia. *Int J Hematol.* 2010 May;91(4):636-45.

Nahid N, Amin I, Briddon RW. RNA interference-based resistance against a legume mastrevirus. *Virol J.* 2011 Nov 2;8:499.

Nakano Y, Kiyoi H, Miyawaki S. Molecular evolution of acute myeloid leukaemia in relapse: unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene. *Br J Haematol.* 1999 Mar;104(4):659-64.

Niebuhr B, Iwanski GB, Schwieger M. Investigation of C/EBPalpha function in human (versus murine) myelopoiesis provides novel insight into the impact of CEBPAmutations in acute myelogenous leukemia (AML). *Leukemia.* 2009;23:978-983.

- Nishida S, Hosen N, Shirakata T. AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood* 2006; 107: 3303–3312.
- Nucifora G, Laricchia-Robbio L, Senyuk V. EVI1 and hematopoietic disorders: history and perspectives. *Gene*. 2006 Mar 1;368:1-11.
- Numata M, Yener MD, Ekmekçi SS. High MN1 expression increases the in vitro clonogenic activity of primary mouse B-cells. *Leuk Res*. 2015 Aug;39(8):906-12.
- Ogawa, S, Kurokawa, M., Tanaka, T. Increased Evi-1 expression is frequently observed in blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Leukemia*. 1996 May;10(5):788-94.
- Ohgami RS, Ma L, Merker JD. Next-generation sequencing of acute myeloid leukemia identifies the significance of TP53, U2AF1, ASXL1, and TET2 mutations. *Mod Pathol* 2015;28:706-14.
- Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Shimamoto T. Pattern of expression and their clinical implications of the GATA family, stem cell leukemia gene, and EVI-1 in leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 1996 Nov;23(5-6):431-6.
- Oki K, Takita J, Hiwatari M. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia*. 2011 Feb;25(2):382-4.
- Oren M, Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a001107.
- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):631-44.
- Østergaard M, Olesen LH, Hasle H. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *Br J Haematol*. 2004;125(5):590–600.
- Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med*. 2006 Apr;12(4):401-9.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008; 321(5897):1807-1812.
- Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 1;28(22):3636-43.
- Patel JP, Gönen M, Figueroa ME. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012 Mar 22;366(12):1079-89.

Patel KP, Ravandi F, Ma D. Acute myeloid leukemia with IDH1 or IDH2 mutation: frequency and clinicopathologic features. *Am J Clin Pathol*. 2011 Jan;135(1):35-45.

Payton JE, Grieselhuber NR, Chang LW. High throughput digital quantification of mRNA abundance in primary human acute myeloid leukemia samples. *J Clin Invest* 2009;119:1714-26.

Pollyea DA, Kohrt HE, Medeiros BC. Acute myeloid leukaemia in the elderly: a review. *Br J Haematol* 2011;152:524-42

Popovic R., Riesbeck L.E., Velu C.S., Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood*. 2009 Apr 2;113(14):3314-22.

Pradhan AK, Mohapatra AD, Nayak KB et al. Acetylation of the proto-oncogene EVI1 abrogates Bcl-xL promoter binding and induces apoptosis. *PLoS One*. 2011;6(9):e25370.

Rashed RA, Kadry DY, Taweel ME . Relation of BAALC and ERG Gene Expression with Overall Survival in Acute Myeloid Leukemia Cases. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(17):7875-82.

Ravandi F, Patel K, Luthra R. Prognostic significance of alterations in IDH enzyme isoforms in patients with AML treated with high-dose cytarabine and idarubicin. *Cancer*. 2012 May 15;118(10):2665-73.

Reddy JC, Hosono S, Licht JD. *J Biol Chem* 1995; 270: 29976–29982.

Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J. Natl. Cancer Inst*. 2010 juill 7;102(13):932-41.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105-11.

Rockova V, Abbas S, Wouters BJ. Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. *Blood*. 2011 Jul 28;118(4):1069-76.

Rommer A, Steinmetz B, Herbst F. EVI1 inhibits apoptosis induced by antileukemic drugs via upregulation of CDKN1A/p21/WAF in human myeloid cells. *PLoS One*. 2013;8(2):e56308.

Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:105–17.

Ross GI, Abdel Hamid TM, Mahmoud HK. Prognostic significance of WT1 expression at diagnosis and end of induction in Egyptian adult acute myeloid leukemia patients. *Hematology*. 2013 Mar;18(2):69-73.

Rossi G, Minervini MM, Carella AM et al. Wilms' Tumor Gene (WT1) Expression and Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. In: van den Heuvel-Eibrink MM, editor. Wilms Tumor. Brisbane (AU): Codon Publications; 2016. Chapter 16.

Rossi G, Minervini MM, Melillo L. Predictive role of minimal residual disease and log clearance in acute myeloid leukemia: a comparison between multiparameter flow cytometry and Wilm's tumor 1 levels. *Ann Hematol.* 2014 Jul;93(7):1149-57.

Ryan DH, Nuccie BL, Ritterman I. Expression of interleukin-7 receptor by lineage-negative human bone marrow progenitors with enhanced lymphoid proliferative potential and B-lineage differentiation capacity. *Blood.* 1997 Feb 1;89(3):929-40.

Saito Y, Kitamura H, Hijikata A et al. Identification of Therapeutic Targets for Quiescent, Chemotherapy-Resistant Human Leukemia Stem Cells. *Science translational medicine.* 2010; 2: 17ra9.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-5467.

Santamaria CM, Chillón MC, García-Sanz R. BAALC is an important predictor of refractoriness to chemotherapy and poor survival in intermediate-risk acute myeloid leukemia (AML). *Ann Hematol.* 2010 May;89(5):453-8.

Santamaria CM, Chillón MC, García-Sanz R. Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood.* 2009 Jul 2;114(1):148-52.

Sasaki M, Knobbe CB, Munger JC. IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature.* 2012;488(7413):656-659.

Schlenk RF, Döhner K, Krauter J. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008 May 1;358(18):1909-18.

Schmid D, Heinze G, Linnerth B. Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997; 11(5):639-43.

Schnittger S, Kern W, Tschulik C. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood.* 2009 Sep 10;114(11):2220-31.

Schnittger S, Schoch C, Kern W. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood.* 2005;106(12):3733-3739.

Scholz H, Kirschner KM. A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology (Bethesda).* 2005 Feb;20:54-9.

Schrama D, Keller G, Houben R. BRAFV600E mutations in malignant melanoma are associated with increased expressions of BAALC. *J Carcinog.* 2008 Jul 16;7:1.

Schwind S, Marcucci G, Maharry K. BAALC and ERG expression levels are associated with outcome and distinct gene and microRNA expression profiles in older patients with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood.* 2010 Dec 16;116(25):5660-9.

Senyuk V, Li D, Zakharov A. The distal zinc finger domain of AML1/ MDS1/EVI1 is an oligomerization domain involved in induction of hematopoietic differentiation defects in primary cells in vitro. *Cancer Res.* 2005 Sep 1;65(17):7603-7611.

Senyuk V, Sinha KK, Li D. Repression of RUNX1 activity by EVI1: a new role of EVI1 in leukemogenesis. *Cancer Res* 2007; 67: 5658–66.

Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M. Mutant IDH1 confers an in vivo growth in a melanoma cell line with BRAF mutation. *Am J Pathol.* 2011;178(3):1395-1402.

Shih LY, Huang CF, Wu JH. Heterogeneous patterns of FLT3 Asp(835) mutations in relapsed de novo acute myeloid leukemia: a comparative analysis of 120 paired diagnostic and relapse bone marrow samples. *Clin Cancer Res.* 2004 Feb 15;10(4):1326-32.

Shimabe M, Goyama S, Watanabe-Okochi N. Pbx1 is a downstream target of Evi-1 in hematopoietic stem/progenitors and leukemic cells. *Oncogene* 2009; 28: 4364–74.

Sjöblom T, Jones S, Wood LD. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2006;314:268-74.

Slape C, Hartung H, Lin YW. Retroviral insertional mutagenesis identifies genes that collaborate with NUP98-HOXD13 during leukemic transformation. *Cancer Res.* 2007; 67:5148–5155.

Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood.* 2000;96(13):4075-4083.

Steinleitner K, Rampetsreiter P, Köffel R. EVI1 and MDS1/EVI1 expression during primary human hematopoietic progenitor cell differentiation into various myeloid lineages. *Anticancer Res.* 2012 Nov;32(11):4883-9.

Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature.* 2009 Apr 9;458(7239):719-24.

Sutton AL, Zhang X, Ellison TI. The 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-regulated transcription factor MN1 stimulates vitamin D receptor-mediated transcription and inhibits osteoblastic cell proliferation. *Mol Endocrinol.* 2005 Sep;19(9):2234-44.



Svedberg H, Chylicki K, Baldetorp B. Constitutive expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in the leukemic cell line U937 blocks parts of the differentiation program. *Oncogene* 1998; 16: 925–932.

Svedberg H, Richter J, Gullberg U. Forced expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene inhibits proliferation of human hematopoietic CD34(+) progenitor cells. *Leukemia* 2001; 15: 1914–1922.

Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K. The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1999; 13: 393–399.

Tanaka T, Nishida J, Mitani K. Evi-1 raises AP-1 activity and stimulates c-fos promoter transactivation with dependence on the second zinc finger domain. *J Biol Chem* 1994; 269: 24 020–6.

Tanner SM, Austin JL, Leone G. BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13901-6.

Tefferi A, Jimma T, Sulai NH. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2 V617F. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):475-80.

Thol F, Damm F, Wagner K. Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010b Jul 29;116(4):614-6.

Thol F, Weissinger EM, Krauter J. IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica*. 2010a;95(10): 1668-1674.

Trka J, Kalinova M, Hrusak O. Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: Prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia*. 2002 Jul;16(7):1381-9.

Tsai FY, Keller G, Kuo FC. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994; 371: 221–6.

Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2004; 350: 1617–1628.

van Wely KH, Molijn AC, Buijs A. The MN1 oncoprotein synergizes with coactivators RAC3 and p300 in RAR-RXR-mediated transcription. *Oncogene*. 2003 Feb 6;22(5):699-709.

Vázquez I, Maicas M, Cervera J, et al. Down-regulation of EVI1 is associated with epigenetic alterations and good prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2011 Oct;96(10):1448-56.

Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 2005; 106:3747–54.

Vinatzer U, Taplick J, Seiser C. The leukaemia-associated transcription factors EVI-1 and MDS1/EVI1 repress transcription and interact with histone deacetylase. *Br J Haematol*. 2001 Sep;114(3):566-73.

Virappane P, Gale R, Hills R. Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol*. 2008;26:5429–35.

Volkert S, Schnittger S1, Zenger M. Amplification of EVI1 on cytogenetically cryptic double minutes as new mechanism for increased expression of EVI1. *Cancer Genet*. 2014 Mar;207(3):103-8.

Wagner K, Damm F, Göhring G. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol*. 2010 May 10;28(14):2356-64.

Wagner W, Ansorge A, Wirkner, U. Molecular evidence for stem cell function of the slow-dividing fraction among human hematopoietic progenitor cells by genome-wide analysis. *Blood*. 2004 Aug 1;104(3):675-86.

Wang X, Tian QB, Okano A. BAALC 1-6-8 protein is targeted to postsynaptic lipid rafts by its N-terminal myristoylation and palmitoylation, and interacts with alpha, but not beta, subunit of Ca/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurochem*. 2005 Feb;92(3):647-59

Ward PS, Patel J, Wise DR. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010;17(3): 225-234.

Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Ono R. AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. *Blood*. 2008; 111:4297–4308.

Weber S, Alpermann T, Dicker F. BAALC expression: a suitable marker for prognostic risk stratification and detection of residual disease in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2014 Jan 10;4:e173.

Weinstein HJ. Acute Myeloid Leukemia. In: Pui CH, editor. *Childhood Leukemias*, UK: Cambridge University Press; 1999, p. 322-35.

- Weisser M, Haferlach C, Hiddemann W. The quality of molecular response to chemotherapy is predictive for the outcome of AML1-ETO-positive AML and is independent of pretreatment risk factors. *Leukemia*. 2007 Jun;21(6):1177-82.
- Welch JS, Westervelt P, Ding L. Use of whole-genome sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogene. *JAMA*. 2011 Apr 20;305(15):1577-84.
- Whitman SP, Archer KJ, Feng L. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a Cancer and Leukemia Group B study. *Cancer Res*. 2001;61(19):7233-7239.
- Wieser R. The oncogene and developmental regulator EVI1: expression, biochemical properties, and biological functions. *Gene*. 2007 Jul 15;396(2):346-357.
- Wimmer K, Vinatzer U, Zwirn P. Comparative expression analysis of the antagonistic transcription factors EVI1 and MDS1-EVI1 in murine tissues and during in vitro hematopoietic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Nov 27;252(3):691-6.
- Winkler BS, DeSantis N, Solomon F. Multiple NADPH-producing pathways control glutathione (GSH) content in retina. *Exp. Eye Res*. 1986 nov;43(5):829-47.
- Xiao M, Dooley DC. Cellular and molecular aspects of human CD34+ CD38- precursors: analysis of a primitive hematopoietic population. *Leuk Lymphoma*. 2000 Aug;38(5-6):489-97.
- Xu B, Chen G, Shi P. shRNA-Mediated BAALC knockdown affects proliferation and apoptosis in human acute myeloid leukemia cells. *Hematology*. 2012 Jan;17(1):35-40.
- Xu W, Yang H, Liu Y. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011;19(1):17-30
- Xu X, Zhao J, Xu Z. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *J. Biol. Chem*. 2004 août 6;279(32):33946-57.
- Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M et al. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood* 1996; 87: 2878–2884.
- Yamaguchi S, Iwanaga E, Tokunaga K. IDH1 and IDH2 mutations confer an adverse effect in patients with acute myeloid leukemia lacking the NPM1 mutation. *Eur J Haematol*. 2014 Jun;92(6):471-7.

Yamamoto JF, Goodman MT . Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Causes Control*. 2008 May;19(4):379-90.

Yamazaki H, Suzuki M, Otsuki A. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression, *Cancer Cell* 25 (2014) 415–427.

Yang L, Han Y, Suarez Saiz F. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*. 2007 May;21(5):868-76.

Yoshimi A, Goyama S, Watanabe-Okochi N et al. Evi1 represses PTEN expression and activates PI3K/AKT/mTOR via interactions with polycomb proteins. *Blood* 2011; 117: 3617–28.

Yuasa H, Oike Y, Iwama A. Oncogenic transcription factor Evi1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression. *EMBO J*. 2005 Jun 1;24(11):1976-87.

Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity*. 2004;21:853-863.

Zhou KG, Jiang LJ, Shang Z. Potential application of IDH1 and IDH2 mutations as prognostic indicators in non-promyelocytic acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2012 Dec;53(12):2423-9.

Zinkel S., Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ*. 2006 Aug;13(8):1351-9.

Elektronske baze podataka:

- Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer database (COSMIC)  
(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)
- Database for Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP)  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)

## BIOGRAFIJA

Irena Marjanović je rođena 24.09.1985. godine u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 2004/2005. godine, a diplomirala je u novembru 2010. godine sa prosečnom ocenom 8.5 i diplomskim radom pod nazivom „Značaj molekularnih metoda u ranoj dijagnostici citomegalovirusne infekcije kod pacijenata sa transplantiranim bubregom“. Doktorske studije je upisala školske 2011/2012. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota. Od januara 2012. je zaposlena u Laboratoriji za molekularnu hematologiju (od 2013. godine Laboratorija za molekularnu biomedicinu), Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Trenutno je učesnik na nacionalnom projektu „Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti“ (Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, ev. br. III41004, 2011-2017. g.). Irena Marjanović je do sada objavila 7 radova u časopisima međunarodnog značaja i imala 36 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima i 3 saopštenja na skupu nacionalnog značaja.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Ирена Марјановић \_\_\_\_\_

број уписа \_\_\_\_\_ Б3013/2011 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

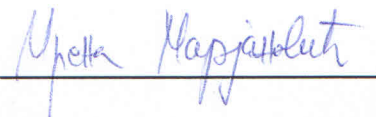
Идентификација молекуларно-генетичких маркера патогенезе акутне мијелоидне

леукемије

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 16.11.2017.

  
\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ирена Марјановић

Број уписа Б3013/2011

Студијски програм Молекуларна биологија, модул молекуларна биологија  
еукариота

Наслов рада Идентификација молекуларно-генетичких маркера патогенезе  
акутне мијелоидне леукемије

Ментор др Наташа Тошић, др Соња Павловић

Потписани Ирена Марјановић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 16.11.2017.

Ирена Марјановић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Идентификација молекуларно-генетичких маркера патогенезе акутне мијелоидне  
леукемије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 16.11.2017.

Потпис докторанда

