

D15
368

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Mr Nataša Tošić

INTERAKCIJA GENETIČKIH MARKERA
IPROLIFERACIJE, DIFERENCIJACIJE I APOPTOZE
KOD AKUTNIH LEUKEMIJA

Doktorska disertacija

Beograd, 2010. godine

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Mr Nataša Tošić

Interakcija genetičkih markera proliferacije, diferencijacije i apoptoze

kod akutnih leukemija

Doktorska disertacija

Beograd, 2010 godine

Универзитет у Београду
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА ФИЗИОЛОГИЈУ И БИОХЕМИЈУ
БИБЛИОТЕКА

Инв. бр. 50078
БЕОГРАД

Abstrakt

Interakcija genetičkih markera proliferacije, diferencijacije i apoptoze kod akutnih leukemija

Leukemije predstavljaju klonalne maligne bolesti hematopoetskog tkiva, koje nastaju kao posledica poremećaja u procesima proliferacije, diferencijacije i/ili apoptoze. Leukemogeneza je višestepeni proces u kome postepeno dolazi do akumulacije genetičkih i epigenetičkih promena koje na kraju dovode do ekspresije kompletnog leukemijskog fenotipa.

Cilj ovog istraživanja bio je praćenje genetičkih markera proliferacije diferencijacije i apoptoze kod obolelih od akutne mijeloidne leukemije (AML) i akutne limfoblastne leukemije (ALL), kao i sagledavanje njihovih međusobnih interakcija. Istraživanja su obuhvatila; 1) utvrđivanje učestalosti mutacija u genu za *FLT3* i *NPM1*, ispitivanje uticaja koje njihovo prisustvo ima na prognozu i preživljavanje obolelih, kao i ispitivanje njihove međusobne povezanosti u procesima leukemogeneze, 2) analizu ekspresije gena vezanih za procese apoptoze i proliferacije, i to; ekspresije *FLT3* gena koji ima značajnu ulogu u procesima proliferacije, ekspresije gena za *FAS* i *FAS-L* kao osnovnih činilaca spoljašnjeg puta aktivacije apoptoze, i ekspresije gena *BCL2* familije kao osnovnih činilaca unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze.

Ispitivanjem zastupljenosti *FLT3* mutacija kod obolelih od adultne i pedijatrijske AML je pokazano da su bile prisutne u 25%, odnosno u 9,5% slučajeva. Pokazano je da *FLT3*⁺ pacijenti imaju značajno nižu stopu postizanja kompletne remisije, čime je potvrđeno da prisustvo *FLT3* mutacija predstavlja nepovoljan faktor prognoze bolesti. Dužina *FLT3/ITD* duplikacije kao i veličina odnosa *ITD/wt* nisu povezani sa određenom kliničkim karakteristikama, niti imaju bilo kakvog uticaja na prognozu i ishod bolesti. Ispitivanjem ekspresije *FLT3* gena kod adultnih AML i pedijatrijskih ALL pacijenata pokazana je značajna povezanost visokog nivoa ekspresije *FLT3* sa nepovoljnom prognozom. Praćenjem nivoa ekspresije *FLT3* gena u različitim vremenskim periodima u toku trajanja bolesti, pokazano je da *FLT3* ekspresija predstavlja potencijalni marker za praćenje minimalne rezidualne bolesti. Ispitivanjem zastupljenosti *NPM1* mutacija kod obolelih od adultne AML je pokazano da su bile prisutne u 18,5% slučajeva, dok je kod pedijatrijskih AML bolesnika, učestalost ovih mutacija iznosila 2,7%. Detektovane *NPM1* mutacije kod adultnih pacijenata su najčešće bile *A tipa* (88,2%), dok je kod pedijatrijskih pacijenata, detektovana retka mutacija *mutacija Q tipa*. Postojanje očigledne razlike u frekvenciji i u tipu *NPM1* mutacija između adultne i pedijatrijske AML, govori u prilog pretpostavci o postojanju različite biologije i etiologije AML kod ove dve grupe pacijenata. U našoj grupi pacijenata prisustvo *NPM1* mutacije je predstavljalo nepovoljan prognostički faktor. Pokazano je da je prisustvo *NPM1* mutacija značajno povezano sa normalnim kariotipom i prisustvom *FLT3* mutacija. Praćenjem ekspresije gena za *FAS* i *FAS-L* kod obolelih od AML i pedijatrijske ALL, primećena je izrazita heterogenost, bez uticaja na prognozu i ishod bolesti. Istovremena heterogenost rezultata

dobijenih ispitivanjem veličine odnosa *mFAS/sFAS* transkripta, doprinose zaključku da poremećaj FAS-indukovane apoptoze nije esencijalan za proces leukemogeneze. Praćenje ekspresije gena *BCL2* familije, uočena je značajna veza između povećane ekspresije anti-apoptotskog *BCL2* gena i smrtnog ishoda bolesti, kao i značajna korelacija između smanjene ekspresije pro-apoptotskog *BAX* gena i povoljne prognoze. Rezultati dobijeni određivanjem vrednosti odnosa ekspresije *BCL2/BAX* su doprineli zaključku da, iako pojedinačno *BCL2* i *BAX* predstavljaju snažne supresore, odnosno aktivatore procesa apoptoze, oni predstavljaju samo jedan od brojnih faktora koji određuju krajnju sudbinu leukemijske ćelije. Praćenje ekspresije *BCL2L12* gena je pokazalo da povećana ekspresija *BCL2L12* gena predstavlja nezavisan nepovoljan faktor prognoze i ishoda bolesti.

Iz svega navedenog možemo da zaključimo da su akutne leukemije veoma heterogena oboljenja, kao i da se ova heterogenost zasniva na različitim kombinacijama genetičkih promena koje se dešavaju na molekularnom nivou. Naša istraživanja usmerena u pravcu izučavanja načina na koji pojedine genetičke promene remete osnovne ćelijske procese, kao i njihovog sinergističkog delovanja u procesima leukemogeneze, doprinela su boljem razumevanju molekularne osnove leukemija. Takođe, naši rezultati ukazuju na neophodnost detekcije novih markera bolesti koji će poslužiti kao osnova za dizajn novih specifičnih terapeutika i efikasnijih protokola lečenja, a sve za dobrobit pacijenta.

Abstract

The interaction of genetic markers of proliferation, differentiation and apoptosis in acute leukemias

Leukemias represent clonal neoplastic hematopoietic disorders that emerge as a consequence of deregulation in the process of differentiation, proliferation and apoptosis. Leukemogenesis is a multistep process involving acquisition of series of genetic and epigenetic alterations leading to the development of the full blown leukemia.

In this study we investigated the genetic markers of the proliferation, differentiation and apoptosis and their mutual interactions in the acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoid leukemia (ALL) patients. This study has included detection of the *FLT3* and *NPM1* gene mutations, the most frequent mutations in the adult AML patients, and the effects that they have on the prognosis and outcome of the disease, and also their cooperation in the leukemogenic process. We also analyzed the expression pattern of the gene involved in proliferation and apoptotic processes, such as; the expression of the *FLT3* gene involved in the proliferation, expression of the *FAS* and *FAS-L* gene involved in the external apoptotic pathway, and expression of the *BCL2* family genes, involved in the internal apoptotic pathway.

The frequency of the *FLT3* mutations among the adult and pediatric AML patients was 25% and 9,5%, respectively. It was confirmed that the *FLT3* mutations represent an adverse prognostic factor, because *FLT3*⁺ patients had lower complete remission rate. The size of the *FLT3/ITD* duplication and the *ITD/wt* ratio were not associated with the particular clinical characteristics and had no impact on the prognosis and the outcome of the disease. Investigation of the *FLT3* expression levels in adult AML and pediatric ALL patients showed significant correlation between high *FLT3* expression level and poor prognosis. Follow-up of the *FLT3* expression level during the course of the disease showed that *FLT3* expression monitoring had a great value as a potential marker of minimal residual disease. The frequency of the *NPM1* mutations among the adult and pediatric AML patients was 18,5% and 2,7%, respectively. *NPM1* mutations detected among adults were mostly of type A (88,2%), whereas among pediatric patients we detected type Q mutation. Evident differences that exist between adult and pediatric AML patients, regarding the frequency and the type of the *NPM1* mutations, contribute to the hypothesis of different biology and etiology of AML among these two groups. In our cohort of patients the presence of the *NPM1* mutation had an adverse impact on the prognosis. Also, it was shown that the presence of the *NPM1* mutations was associated with normal karyotype and the presence of the *FLT3* mutations. We detected extreme heterogeneity in the expression pattern of the *FAS* and *FAS-L* gene, both in the AML and ALL patients, without having any impact on the prognosis and the outcome of the disease. Alongside with the heterogeneity of the *mFAS/sFAS* transcript ratio, we concluded that the disruption of the FAS-induced apoptosis is not essential for the leukemogenic process. The investigation of the expression levels of the

SADRŽAJ

I – UVOD	1
I - 1. Leukemije	1
I - 1.1. Uloga genetičkih faktora u etiologiji leukemija	2
I - 1.1.a) Genetički faktori poremećaja diferencijacije	3
I - 1.1.b) Genetički faktori poremećaja proliferacije	5
I - 1.1.c) Genetički faktori poremećaja apoptoze	6
I - 2. FLT3	7
I - 2.1. FLT3 u leukemijama	10
I - 2.2. FLT3 mutacije	10
I - 3. Nukleofosmin (NPM)	12
I - 3.1.NPM u leukemijama	15
I - 4. Apoptoza	17
I - 4.1. Fas receptor(FAS) i FAS ligand (FAS-L)	20
I - 4.2. BCL2 familija proteina	21
I - 4.2.a) BCL2	22
I - 4.2.b) BAX	23
I - 4.2.c) BCL2L12	23
I - 4.3. Poremećaj apoptoze u leukemijama	24
I - 4.3.a) Poremećaji FAS/FAS-L sistema	26
I - 4.3.b) Poremećaji BCL2 familije proteina	28
II – CILJ ISTRAŽIVANJA	31
III – MATERIJAL I METODE	33

III - 1. Ispitanici	33
III - 2. Izolacija DNK iz periferne krvi/koštane srži	34
III - 3. Izolacija mononuklearnih ćelija iz aspirata koštane srži ili periferne krvi	35
III - 4. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija	35
III - 5. Izolacija DNK iz mononuklearnih ćelija	36
III - 6. Reverzna transkripcija (RT)	37
III - 7. Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)	37
III - 7.1. Detekcija FLT3/ITD mutacije	38
III - 7.2. Detekcija FLT3/D835 mutacije	39
III - 7.3. Detekcija mutacija u NPM1 genu	40
III - 8. Standardizovani RT-PCR protokol za detekciju fuzionih transkripata koji nastaju kao posledica najčešćih hromozomskih aberacija u ALL i AML	41
III - 9. RT-PCR protokol za detekciju NUP98/HOX fuzionog transkripata koji nastaje kao posledica hromozomske translokacije t(11;12)(p15;q13)	44
III - 10. Analiza DNK na agaroznom gelu	45
III - 11. Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu	46
III - 12. Bojenje poliakrilamidnih gelova srebronitratom	46
III - 13. Izolacija DNK fragmenta iz agaroznog gela	46
III - 14. Kapilarna elektroforeza DNK na „Lab-on-Chip“-u	47
III - 15. Sekvenciranje PCR produkata	48
III - 16. Praćenje ekspresije gena pomoću „real-time“ PCR (q-PCR) metode	49
III - 16.1. Relativna kvantifikacija	54
III - 16.1.a) Metod relativne standardne krive	54
III - 16.1.b) Komparativni ddCt metod	54

III - 16.2. Određivanje ekspresije FLT3, BCL2, BAX i BCL2L12 gena komparativnim ddCt metodom	55
III - 16.3. Određivanje ekspresije FAS receptor (FAS) i FAS-ligand (FAS-L) gena primenom metode relativne standardne krive	56
III - 17. Statistička obrada podataka	58
IV REZULTATI	60
IV - 1. Detekcija i molekularna karakterizacija t(11;12)(p15;q13)	61
IV - 2. Detekcija FLT3 i NPM1 mutacija kod adultne AML	63
IV - 2.1. Detekcija FLT3 mutacija	63
IV - 2.1.a) Dužina FLT3/ITD duplikacije i odnos IDT/wt	68
IV - 2.2. Detekcija mutacija u NPM1 genu	72
IV - 3. Detekcija FLT3 i NPM1 mutacija kod dece obolele od AML	75
IV - 4. Ekspresija FLT3 gena	80
IV - 4.1. Ekspresija FLT3 gena kod obolelih od AML	80
IV - 4.2. Ekspresija FLT3 gena kod obolelih od ALL	85
IV - 5. Ekspresija gena za FAS receptor (FAS)	88
IV - 5.1. Ekspresija FAS gena kod obolelih od AML	88
IV - 5.2. Ekspresija FAS gena kod obolelih od ALL	92
IV - 5.3. Relativni odnos mFAS/sFAS mRNK transkripta	95
IV - 6. Ekspresija gena za FAS-ligand (FAS-L)	100
IV - 6.1. Ekspresija gena za FAS-L kod obolelih od AML	100
IV - 6.2. Ekspresija gena za FAS-L kod obolelih od ALL	103
IV - 7. Ekspresija BCL2 gena	106
IV - 7.1. Ekspresija BCL2 gena kod obolelih od AML	106

IV - 7.2. Ekspresija BCL2 gena kod obolelih od ALL	111
IV - 8. Ekspresija BAX gena	114
IV - 8.1. Ekspresija BAX gena kod obolelih od AML	114
IV - 8.2. Ekspresija BAX gena kod obolelih od ALL	118
IV - 9. Određivanje odnosa ekspresije BCL2/BAX kod obolelih od AML i ALL	121
IV - 10. Ekspresija BCL2L12 gena	126
V DISKUSIJA	132
V - 1. FLT3 u leukemogenezi	132
V - 1.a) Mutacije u FLT3 genu	132
V - 1.b) Ekspresija FLT3 gena	136
V - 2. NPM1 mutacije u procesu leukemogeneze	139
V - 3. Udruženost mutacija u procesu leukemogeneze	141
V - 4. Ekspresija apoptotskih gena u procesu leukemogeneze	143
V - 4.1. Poremećaji ekspresije gena FAS/FAS-L sistema	143
V - 4.2. Promena ekspresije gena BCL2 familije	147
V - 4.2.a) Ekspresija BCL2	147
V - 4.2.b) Ekspresija BAX	151
V - 4.2.c) Uticaj BCL2/BAX odnosa	152
V - 4.2.d) Ekspresija BCL2L12	153
V - 4.3. Leukemije i ekspresija gena uključenih u apoptozu	155
VI - ZAKLJUČCI	157
VII – LITERATURA	162

Skratčenice;

ALL – akutna limfoblastna leukemija

AML – akutna mijeloidna leukemija

AML1 – „Acute Myeloid Leukemia 1“

APL – Akutna promijelocitna leukemija

ATL – Akutna T limfoblastna leukemija

B-ALL – B ćelijska akutna limfoblastna leukemija

C-KIT – (CD117) tirozin kinazni receptor

IAP – „Inhibitor of Apoptosis Protein“

FAB – „French – American – British“ klasifikacija leukemija (vidi III 1. Materijal i metode)

FADD – „FAS Associated Protein with Death Domain“

FLT3 – „FMS-Like Tyrosine Kinase 3“

HLL – Hronična limfoblastna leukemija

HML – Hronična mijeloidna leukemija

MDS – Mijelo-displastični sindrom

MLL – „Mixed Lineage Leukemia“

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

NUP98 – „Nucleoporin 98 kDa“

PDGF – „Platelet-Derived Growth Factor“

PML – „Promyelocytic leukemia“

RAR α – „Retinoic Acid Receptor α “

T-ALL – T ćelijska akutna limfoblastna leukemija

TNF-R – „Tumor Necrosis Factor Receptor“

TRAIL – „Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand“

I - UVOD

I - 1. Leukemije

Leukemije predstavljaju klonalne maligne bolesti hematopoetskog tkiva, koje nastaju kao posledica poremećaja u procesima proliferacije, diferencijacije i/ili programirane ćelijske smrti (apoptoze).

U odnosu na hematopoetsku liniju u kojoj je došlo do maligne transformacije razlikujemo limfoidne i mijeloidne leukemije, koje se odnose na limfocitnu (limfoidne leukemije), odnosno granulocitnu, eritroidnu, monocitnu i megakariocitnu lozu (mijeloidne leukemije).

Prema brzini napretka kliničkog toka bolesti leukemije se mogu podeliti na akutne, kada broj malignih ćelija koji odgovara nižim stupnjevima diferencijacije brzo raste, akumulira se i blokira proizvodnju normalnih krvnih elemenata, i hronične, kada takođe dolazi do akumulacije leukemičnih ćelija koje su na višem stupnju diferencijacije, ali je hematopoeza u manjoj meri ometena i bolest sporije napreduje.

Primena savremenih dijagnostičkih metoda i protokola lečenja omogućila je postizanje visoke stope preživljavanja obolelih koja kod npr. pedijatrijske akutne limfoblastne leukemije iznosi čak 80%. Međutim, iako većina leukemičnih pacijenata nakon konvencionalne hemo- i radio-terapije ulazi u stanje kompletne kliničke remisije, značajan broj ovih pacijenata, ubrzo relapsira i umire od primarne bolesti. Smatra se da je ponovna pojava bolesti uslovljena malim brojem malignih ćelija koje ostaju prisutne i nakon indukcione terapije.

Pojava da mali broj leukemičnih ćelija ostaje u koštanoj srži i nakon indukcije kliničke remisije, naziva se minimalna rezidualna bolest (MRB; 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. Uloga genetičkih faktora u etiologiji leukemija

Proces maligne transformacije podrazumeva niz genetičkih i epigenetičkih promena koje rezultiraju nastankom neoplastičnog klona. U slučaju akutnih leukemija, sticanjem brojnih genetičkih promena normalna hematopoetska matična ćelija biva transformisana u leukemijsku matičnu ćeliju (LSC ili LMĆ) koja ima sposobnost klonske propagacije. Leukemijske ćelije se karakterišu zastojem u diferencijaciji, uvećanom proliferacijom, uvećanom sposobnošću samo-obnavljanja i smanjenom apoptozom (Warner JK, 2004).

Izučavanjem genetičke osnove akutne mijeloidne leukemije (AML) i akutne limfoblastne leukemije (ALL) zapaženo je da su najčešće hromozomske aberacije u ovim leukemijama translokacije. Do danas je klonirano preko 100 različitih hromozomskih translokacija, a neke od njih su prikazane u Tabelama 1. i 2. (Gilliland DG & Tallman MS, 2002).

Tabela 1. Translokacije detektovane u AML

GENETIČKA PROMENA	MOLEKULARNA PROMENA	GENETIČKA PROMENA	MOLEKULARNA PROMENA
t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO	t(11;19)(q23;p13)	MLL-ENL
t(15;17)(q22;q21)	PML-RARA	t(6;9)(q23;q34)	DEK-CAN
inv16/t(16;16)(p13;q22)	CBFB-MYH II	inv3/t(3;3)(q21;q26)	EVI-I
t(6;11)(p25;q23)	MLL-AF6	t(9;22)(q24;q11)	BCR-ABL
t(9;11)(p22;q23)	MLL-AF9	t(3;21)(q26;q22)	AML1-EVI-I/EAP/MDS I
t(10;11)(p12;q23)	MLL-AF10	t(16;21)(p11;q22)	TLS/FUS-ERG

Tabela 2. Translokacije detektovane u ALL

TRANSLOKACIJA	MOLEKULARNA PROMENA	TRANSLOKACIJA	MOLEKULARNA PROMENA
prekursor-B-ALL		T-ALL	
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML	t(1;14)(q32;q11)	TAL1
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1	t(1;7)(q32;q35)	TAL1
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL	t(7;9)(q34;32)	TAL2
t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	t(7;19)(q34;p13)	LYL1
11q23	MLL-AF4	t(10;14)(q24;q11)	HOX11
B-ćelijske ALL		t(7;10)(q35;24)	HOX11
t(8;14)(q24;32)	myc/IgH	t(11;14)(p15;q11)	LMO1
t(2;8)(q12;q24)	myc/IgL	t(7;11)(q35;p13)	LMO2
t(8;22)(q24;q11)	IgK/myc	t(11;14)(p13;q11)	LMO2
		t(1;7)(p34;q34)	LCK
		t(7;9)(q34;q34)	TAN1

I - 1.1.a) Genetički faktori poremećaja diferencijacije

Veoma često translokacije pogađaju gene koji kodiraju transkripcione faktore koji imaju veoma važnu ulogu u hematopoezi, tačnije omogućavaju nesmetanu diferencijaciju ćelija hematopoeze. Promene u funkciji pojedinih transkripcionih faktora, izazvane prisustvom translokacija, zaustavljaju ćelijsku diferencijaciju na nižem stadijumu sazrevanja. S obzirom na visoku učestalost translokacija kod obolelih, blokada diferencijacije predstavlja veoma čest mehanizam leukemogeneze.

Translokacije u AML i ALL najčešće pogađaju transkripcione faktore kao što su; „core-binding factor“ (CBF) kompleks, receptor retinoične kiseline (RAR α), MLL protein i HOX proteine. CBF se sastoji iz dva proteina CBF β i AML-1 i ima veliku ulogu u procesima rane hematopoeze.

Prisustvo t(8;21) i inv16 izaziva poremećaj u funkciji AML1 proteina, što dovodi do utišavanja ekspresije pojedinih gena koje se nalaze pod njegovom kontrolom.

Akutna promijelocitna leukemija (APL) je pravi primer zastoja u diferencijaciji. Naime, t(15;17) koja je prisutna u oko 98% slučajeva APL, dovodi do stvaranja PML-RAR α fuzionog proteina, remeti funkciju RAR α transkripcionog faktora i izaziva efikasnu blokadu granulocitne diferencijacije na stadijumu promijelocita.

Rearanžmani koji pogađaju *MLL* gen takođe dovode do poremećaja funkcije ovog transkripcionog faktora, izazivajući supresiju jedne grupe gena, a aktivaciju ekspresije HOX transkripcionih faktora.

Geni za „Homeobox“ familiju transkripcionih faktora (HOX) su veoma često uključeni u translokacije nađene kod akutnih leukemija. Najčešći fuzioni partner *HOX* gena je *NUP98* gen na hromozomu 11q15. Članovi HOX familije gena su podeljeni u 2 klase; klasa I i klasa II. Kod sisara, 39 gena klase I je organizovano u 4 genska klastera (A-D), koji se nalaze na hromozomima 7, 17, 12 i 2. Svaki klaster se sastoji od 9-11 gena organizovanih u 13 paralogih grupa (Argiropoulos B, 2007). Većina *HOX* gena A, B i C klastera su eksprimirani u toku hematopoeze, a najviši nivo ekspresije je prisutan u matičnim ćelijama hematopoeze i nezrelim progenitorima. Fuzijom *NUP98* sa *HOX* genima nastaje aberantni transkripcioni faktor čiji su ciljni geni nepoznati, ali je u *in vivo* i u *in vitro* uslovima pokazano da njegovo prisustvo dovodi do poremećaja u procesima diferencijacije i proliferacije.

Tabela 3. Genetičke promene u akutnim leukemijama koje su povezane sa poremećajem 3 najvažnija ćelijska procesa; diferencijacije, proliferacije i apoptoze.

	GENETIČKA PROMENA
DIFERENCIJACIJA	• Aberantni transkripcioni faktori; t(15;17), t(11;17), t(8;21), inv16, t(3;21), t(12,21), t(1;19) • MLL fuzije • HOX fuzije i povećana ekspresija • Tačkaste mutacije u genima za Pu.1, C/EBPα, AML1
PROLIFERACIJA	• Aktivirajuće mutacije u genima za; FLT3, RAS, C-KIT, C-FMS • t(9;22) • povećana ekspresija FLT3
APOPTOZA	• povećana ekspresija BCL2 • NPM1 mutacije • inhibicija BAD proteina od strane aktiviranih receptor tirozin kinaza • p53 mutacije • p53 deregulacija od strane fuzionih proteina • povećana ekspresija IAP

I - 1.1.b) Genetički faktori poremećaja proliferacije

Blokada procesa diferencijacije je samo jedan od koraka ka razvitku kompletnog leukemijskog fenotipa. Da bi maligno transformisan klon postao dominantan, mora posedovati dodatnu selektivnu prednost u odnosu na normalne ćelije („2 hit“ hipoteza) (Gilliland DG, 2002). Dominacija leukemijskog klona se postiže povećanjem proliferacije i/ili smanjenjem apoptoze.

Proliferativna prednost leukemijskog klona se najčešće postiže aktivacijom tirozin kinaznih receptora (Tabela 3.).

Mutacije u genima za *FLT3* i *C-KIT* koje su veoma česte kod obolelih od AML, dovode do konstitutivne aktivacije ovih tirozin kinaznih receptora, povećavajući mitogeni potencijal ćelije (Reilly JT, 2003). Do konstitutivne aktivacije FLT3 receptora može doći i povećanjem njegove ekspresije, i ekspresije njegovog liganda (FL), autokrinim mehanizmom (Zheng R, 2004).

Translokacija t(9;22) koja se javlja u 25-30% adultnih ALL pacijenata, 2-10% dečije ALL, a u pojedinim slučajevima je prisutna i u AML, takođe dovodi do povećanja proliferacije. Ona dovodi do stvaranja BCR-ABL fuzionog proteina, konstitutivno aktiviranog tirozin kinaznog receptora, koji dovodi do ubrzane ćelijske deobe i do ukidanja mehanizma DNK-popravke, te na taj način izaziva povećanje genomske nestabilnosti u ćeliji.

I - 1.1.c) Genetički faktori poremećaja apoptoze

Sposobnost maligne ćelije da izbegne proces ćelijske smrti je kritična za proces leukemogeneze.

Konstitutivna aktiviranost receptora za tirozin kinaze ima dvostruku ulogu u procesu leukemogeneze. Naime, pored povećanja proliferacije, oni deluju na izbegavanje apoptoze tako što aktiviraju fosfatidil-inozitol kinazu 3 (PI3-kinaza), koja dalje deluje na povećanje ekspresije anti-apoptotskog BCL2 proteina i inhibira BAD pro-apoptotski protein.

U brojnim studijama pokazano je da pacijenti oboleli od akutne leukemije imaju povećani nivo ekspresije anti-apoptotskih molekula kao što su BCL2, članovi IAP familije proteina, a u nekim slučajevima povećava se nivo ekspresije i proteina spoljašnjeg puta aktivacije apoptoze kao što je FAS receptor i FADD. Nivo ekspresije ovih proteina kod obolelih veoma varira, a značaj i razlog za postojanje ove varijabilnosti još uvek nije poznat.

Protein p53 predstavlja ključnu tačku regulacije apoptoze. Mutacije u genu za p53 za posledicu imaju poremećaj njegove funkcije i smanjenu osetljivost na apoptotske stimulse. Takođe, neki hromozomski rearanžmani kao npr. t(8;21) i inv8, mogu delovati posredno na p53, izazivajući njegovu destabilizaciju. Na poremećaj funkcije p53 utiču i mutacije u *NPM1* genu za nukleofosmin, čija je jedna od osnovnih uloga stabilizacija p53 proteina.

Iz svega navedenog možemo da zaključimo da su akutne leukemije veoma heterogena oboljenja, kao i da se ova heterogenost zasniva na različitim kombinacijama genetičkih i epigenetičkih promena koje se dešavaju na molekularnom nivou. Takođe je pokazano da se leukemijske ćelije u procesu maligne transformacije ponašaju vrlo „ekonomično“ u smislu da ne pokazuju sklonost ka potpunom ukidanju signalnih puteva koji normalno regulišu ćelijske

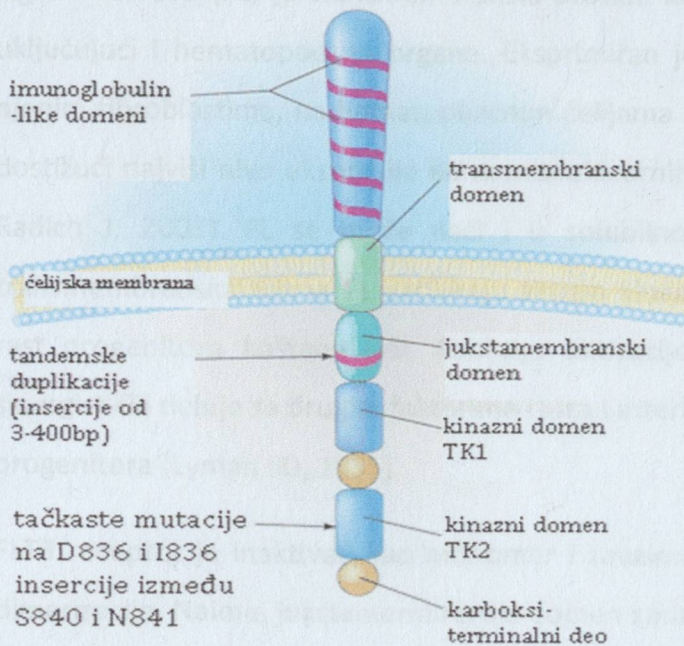
procesu, već vrše njihovu modulaciju, inkorporirajući leukemijske programe u već postojeću osnovu.

Iako su prema „2 hit“ hipotezi (Gilliland DG, 2002), za kompletnu ekspresiju leukemijskog fenotipa potrebne barem 2 promene, veoma često jedna genetička promena ima za posledicu remećenje dva ključna ćelijska procesa. Takođe redosled dešavanja ovih promena je još uvek nepoznat. To sve zajedno u mnogome komplikuje izučavanje složene molekularne osnove leukemogeneze, kao i pronalaženje specifičnih terapeutika usmerenih u pravcu prevazilaženja blokade u ključnim ćelijskim procesima i ponovnom uspostavljanju ćelijske homeostaze.

I - 2. FLT3

FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) je transmembranski receptor za faktor rasta. Pripada familiji klase III tirozin kinaznih receptora, kojoj pripadaju i receptori za PDGF, FMS i KIT, i ima veoma važnu ulogu u hematopoezi (Rosnet O, 1991).

Gen za *FLT3* je, skoro istovremeno, otkriven i kloniran od strane dve grupe naučnika (Rosnet O, 1991; Mathews W, 1991). U humanom genomu on je lociran na hromozomu 13q12. Sastoji se od 24 egzona i prostire se na 96 kb genomske DNK (Abu-Duhier F, 2001). Transkript *FLT3* gena se prevodi u protein od 993 aminokiselina, molekulske mase 150 kDa, koji se eksprimira na površini ćelije u glikozilovanoj formi. Protein se sastoji iz više domena; ekstracelularnog domena (dužine 516 aminokiselina) koji se sastoji od 5 imunoglobulin-like domena, transmembranskog domena (dužine 21 aminokiseline) i intracelularnog domena (Slika 1.) (Rosnet O, 1991).



Slika 1. Šematski prikaz strukture FLT3 proteina.

Intracelularni deo receptora se sastoji iz 4 domena; jukstamembranskog domena (dužine 46 aminokiselina), dva tirozin kinazna domena TK1 (dužine 103 aminokiseline) i TK2 (dužine 167 aminokiselina) koja su razdvojena interkinaznim domenom (dužine 72 aminokiseline).

Gen za *FLT3* se eksprimira u svim limfo-hematopoeznim organima čoveka kao što su jetra, slezina, timus i placenta. U zdravoj koštanoj srži, njegova ekspresija je prisutna kod mijeloidnih i limfoidnih progenitora, uključujući i $CD34^+$ ćelije sa visokim nivoom ekspresije $CD117$ (C-KIT) (Rosnet O, 1996). Tokom sazrevanja ćelija, njegovo prisustvo na membrani se smanjuje, tako da zrele ćelije u perifernoj krvi ne ekspimiraju FLT3. Prisustvo FLT3 na membrani označava stepen diferencijacije ćelije, stadijum sazrevanja i trenutak gubitka sposobnosti samoobnavljanja. U mijeloidnoj liniji ekspresija FLT3 se brzo gubi u procesu sazrevanja izuzev u dendritičnim ćelijama i ćelijama monocitne loze, gde se zadržava duže tokom maturacije (Stirewalt D & Radich J, 2003).

Ligand za FLT3 (FL) je transmembranski protein koji je eksprimiran u skoro svim tkivima, uključujući i hematopoezne organe. Eksprimiran je na ćelijama mikrosredine kostne srži, njenim fibroblastima, na hematopoeznim ćelijama mijeloidne, T i B limfoidne ćelijske linije, dostižući najviši nivo ekspresije na mononuklearnim ćelijama periferne krvi (Stirewalt D & Radich J, 2003). FL se može naći i u solubilnoj formi kao homodimer. I solubilna i transmembranska forma FL aktiviraju tirozin kinaznu aktivnost FLT3 receptora i stimulišu rast progenitora koštane srži. Funkciju aktivacije proliferacije FL ne obavlja sam, već sinergistički deluje sa drugim faktorima rasta i interleukinima, izazivajući efikasnu ekspanziju progenitora (Lyman SD, 1995).

FLT3 receptor je inaktivan kao monomer i zauzima konformaciju koja rezultira u inhibiciji dimerizacije. Naime, jukstamembranski domen zauzima oblik zavojnice, izazivajući distorziju kinaznih domena, čineći ih „nedostupnim“ za fosforilaciju (Gilliland G & Griffin J, 2002). Nakon vezivanja liganda za receptor dolazi do brze promene konformacije receptora, do stvaranja homodimera i fosforilacije tirozin kinaznih domena. Fosforilisani tirozini u tirozin kinaznim domenima su mesta za koje se vezuju SH2 (sarkom homolog 2) domeni brojnih adaptorskih molekula, preko kojih dolazi do aktivacije „nizvodnih“ signalnih puteva. Aktiviranjem FLT3 dolazi do aktivacije RAS i PI3K (fosfatidil inozitol 3-kinaza) signalnih puteva, što dovodi do uvećane proliferacije i inhibicije apoptoze.

Aktivirana PI3K stimuliše „nizvodne“ proteine kao što je PDK1 (fosfatidil inozitol zavisna protein kinaza 1) i protein kinaza B (PKB/AKT) što dovodi do transkripcije i translacije ključnih regulatornih gena. Na kraju dolazi do fosforilacije pro-apoptotskog BAD proteina (člana BCL2 familije proteina) i inhibicije apoptoze (Zhang S, 1999). Aktivacija RAS signalnog puta dovodi do stimulacije „nizvodnih“ efektor kao što su RAF, MAPK/ERK i ERK kinaza. Oni aktiviraju CREB protein što na kraju vodi ka transkripciji gena koji učestvuju u proliferaciji (Srinivasa S & Doshi P, 2002). Aktivacija FLT3 receptora dovodi i do aktivacije JAK/STAT signalnog puta, tačnije uzrokuje direktnu aktivaciju STAT5a transkripcionog faktora preko JAK-nezavisnog mehanizma. To dovodi do povećane transkripcije gena vezanih za proliferaciju, a takođe sprečava povećanu ekspresiju gena koji indukuju apoptozu, kao npr. BAX („BCL2-associated X protein“) (Zhang S, 2000; Lsovsky M, 1996).

I - 2.1. FLT3 u leukemijama

FLT3 je eksprimiran u različitim tipovima leukemija, pa je tako uvećana ekspresija FLT3 na nivou *mRNK* i proteina nađena u 70-100% AML i u 94% common-B-ALL. Eksprimiran je u manjoj meri i u nekim oblicima T-ALL i u HML u blastnoj krizi (Carow CE, 1996).

Uvećana ekspresija *mRNK* za *FLT3* povezana je sa konstitutivnom aktivacijom FLT3 i sa lošom prognozom obolelih od AML (Ozeki K, 2004). Tendencija ka lošoj prognozi kod AML pacijenata sa visokom ekspresijom *FLT3* je primećena i u drugim istraživanjima (Kuchenbauer F, 2005; Libura M, 2003). Međutim, u nekim studijama se naglašava da nivo ekspresije *FLT3* ima svoja ograničenja u prognoziranju ishoda bolesti i praćenja MRB (Kainz B, 2005). Sva ova istraživanja, kao i istraživanja sprovedena na AML sa trizomijom 13, pokazala su da je prekomerna ekspresija *FLT3* uvek povezana sa aktivacijom FLT3 (Silva FPG, 2007; Dicker F, 2007).

Do konstitutivne aktivacije FLT3 može doći delovanjem još 2 mehanizma:

1. koekspresija FL, čija autokrina i parakrina funkcija dovode do konstitutivne aktivacije FLT3 (Zheng R, 2004)
2. postojanje mutacija u *FLT3* genu, koje dovode do ligand-nezavisne aktivacije FLT3 (Nakao M, 1996).

I - 2.2. FLT3 mutacije

U akutnim leukemijama, najčešće prisutne mutacije *FLT3* gena jesu; internal (unutrašnja) tandem duplikacija jukstamembranskog domena (ITD) i tačkasta mutacija kinaznog domena (TKD). Obe mutacije promovišu ligand-nezavisnu konstitutivnu aktivaciju receptora, što dalje uzrokuje uvećanu proliferaciju ćelije (Tse KF, 2000).

FLT3/ITD mutacija je prvi put opisana od strane Nakao M i saradnika, 1996. godine (Nakao M, 1996), nakon čega je usledilo objavljivanje većeg broja studija koje su se bavile izučavanjem frekvencije i značaja ove mutacije kod obolelih od leukemija (Kiyoi H, 1997; Kiyoi H, 1998; Stirewalt D, 2001; Schnittger S, 2002). Najčešće *FLT3/ITD* mutacije zahvataju egzon 14 ili 15, i nastaju kao posledica duplikacije dela jukstamembranske kodirajuće sekvence. Dužina *FLT3/ITD* duplikacija može varirati od 3 do ≥ 400 bp, pri čemu je uvek očuvan otvoreni okvir čitanja (Schnittger S, 2002).

FLT3/ITD mutacije su veoma česte u AML, i kod adultnih bolesnika dijagnostikuju se u oko 35% slučajeva, dok je kod pedijatrijskih pacijenata ova učestalost niža i kreće se oko 15% (Meshinchi S, 2001). Niža učestalost ove mutacije u dece se objašnjava time da je ova mutacija veoma retka kod obolelih ispod 10 godina. U dece mlađe od 10 godina učestalost ove mutacije je niža od 5%, dok je kod starijih učestalost ove mutacije oko 24% (Liang DC, 2002). *FLT3/ITD* mutacija je prisutna u manje od 1% ALL, uglavnom su u pitanju bifenotipske leukemije i leukemije sa MLL rearanžmanom i hiperdiploidijom (Armstrong SA, 2004, Stirewalt DL, 2003, Xu F, 1999).

FLT3/ITD mutacija je otkrivena u svim FAB podtipovima; najveća učestalost u M3, a najmanja u M2 podtipu (Kiyoi H, 1997; Meshinchi S, 2001; Thiede C, 2002). Ona se često detektuje u paru sa t(15;17) i sa normalnim kariotipom.

Veoma često je ova mutacija povezana sa velikim brojem leukocita, visokim procentom blasta u koštanoj srži i sa povećanim rizikom od relapsa bolesti (Small D, 2006; Stirewalt DL, 2003; Kottaridis PD, 2001). Smatra se da je prisustvo *FLT3/ITD* mutacija faktor loše prognoze (Kiyoi H, 1997; Meshinchi S, 2001; Kottaridis PD, 2001). Međutim, još uvek nije poznato da li se loš ishod bolesti kod nosilaca ove mutacije može objasniti jednostavnim prisustvom odnosno odsustvom mutacije, i da li možda i drugi faktori mogu imati prognostički značaj. Tako npr. ispitivanjem relativnog nivoa mutiranog *ITD* u odnosu na *wt FLT3* („*FLT3* alelic-ratio“), zapaženo je da on mnogo varira, a u nekoliko studija pacijenti sa višim *ITD/wt* odnosom imali su lošiju prognozu (Whitman SP, 2001; Thiede C, 2002). Neke od novijih studija su pokazale da veličina *FLT3/ITD* duplikacije može imati uticaja na prognozu (Stirewalt DL, 2006; Kušec R, 2006; Ponziani V, 2006). Međutim, rezultati ovih studija su

kontradiktorni. tj. u nekima je pokazano da pacijenti sa dužom *FLT3/ITD* duplikacijom imaju lošiju prognozu, dok u drugim studijama nije primećeno da dužina duplikacije ima uticaj na prognozu i ishod bolesti.

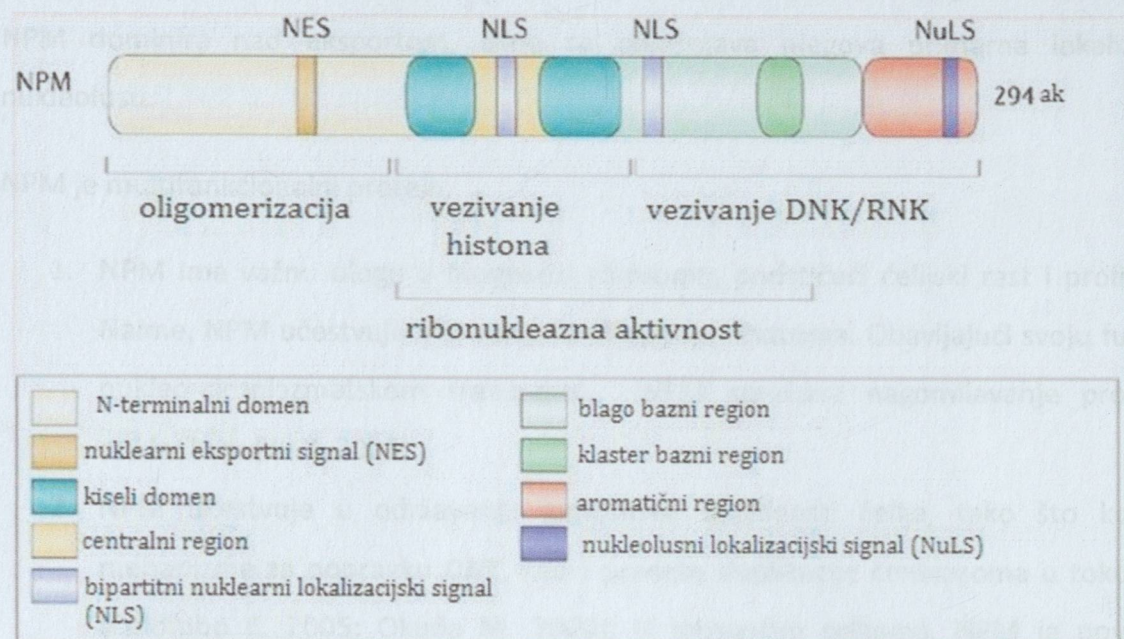
Drugi tip *FLT3* mutacije je „missense“ tačkasta mutacija i egzonu 20 koji kodira tirozin-kinazni domen *FLT3* receptora. Najčešća zamena nukleotida se dešava u kodonu 835 (GAT→TAT), što dovodi do izmene amino-kiselinske sekvence (Asp→Tyr). *FLT3/TKD* mutacije se javljaju u 5-10% AML pacijenata, 2-5% MDS pacijenata i kod 1-3% pacijenata obolelih od ALL (Thiede C, 2002; Yamamoto Y, 2001; Abu-Duhier F, 2001). Zbog veoma niske učestalosti ove mutacije teško je doneti konačan zaključak o njenom uticaju na prognozu bolesti. U najvećoj do sada objavljenoj studiji na 3082 AML pacijenata, pokazano je da *FLT3/TKD* mutacije nemaju značajan uticaj na prognozu bolesti (Bacher U, 2008).

I - 3. Nukleofozmin (NPM)

Nukleofozmin, poznat i kao B23, NO38 ili numatrin, je visoko konzervisan, nukleolarni fosfoprotein, koji pripada nukleoplazmin/nukleofozminskoj familiji nuklearnih šaperona (Eirin-Lopez JM, 2006). On je široko eksprimiran, multifunkcionalan protein sa značajnom ulogom u regulaciji rasta ćelija i proliferaciji.

Gen za nukleofozmin (*NPM1*) se nalazi na hromozomu 5q35 i sastoji se od 12 egzona. Primarni transkript podeleže alternativnoj obradi, pa tako razlikujemo 2 izoforme; *NPM1* ili *B23.1* izoformu, koja je dominantna i prisutna u svim tkivima i *NPM2* ili *B23.2* izoformu, kojoj nedostaje egzon 10 i koja se eksprimira u veoma maloj količini (Chang JH, 1990). *NPM1* forma je primarno lokalizovana u nukleolusu, dok je retka *NPM2* forma smeštena u nukleoplazmi.

Dominantan NPM protein je sastavljen od 294 amino-kiseline, dok kraćoj formi nedostaje poslednjih 35 aminokiselina C-terminalnog domena. U građi NPM razlikujemo više domena koji su odgovorni za različite biohemijske funkcije ovog proteina (Slika 2.).



Slika 2. Šematski prikaz funkcionalnih domena NPM proteina.

Počevši od N-kraja, razlikujemo hidrofobne segmente koji su uključeni u procese oligomerizacije i šaperonsku funkciju, a zatim slede dva domena bogata kiselim amino-kiselinama (kiseli domeni) koji su uključeni u procese vezivanja NPM za histone. Centralni deo molekula koji se nalazi između dva kisela domena, je region koji ima ribonukleaznu aktivnost, i zajedno sa C-terminalnim domenom odgovoran je za vezivanje nukleinskih kiselina (Hingorani K, 2000). C-terminalni kraj se sastoji od regiona bogatog baznim amino-kiselinama (bazni region i klaster bazni region), na koje se zatim nastavlja region bogat aromatičnim amino-kiselinama koji sadrži 2 triptofana na pozicijama 288 i 290 i koji su ključni za nukleolusnu lokalizaciju proteina (NuLS) (Nishimura Y, 2002). Bipartitni nuklearni lokalizacijski signal (NLS) i nuklearni eksportni signal (NES) motivi, igraju veliku ulogu u nukleus-citoplazma transportu NPM proteina (Hingorani K, 2000; Yu Y, 2006).

Iako je NPM protein lokalizovan primarno u nukleolusu, on se stalno kreće između nukleusa i citoplazme (Yun JP, 2003). Uz pomoć NLS signalnog motiva NPM iz citoplazme ulazi u nukleoplazmu, odakle se prebacuje u nukleolus uz pomoć NuLS domena. NPM ostaje u nukleolusu bez obzira na to što sadrži visoko konzervisane leucinom-bogate NES motive koji pomažu njegov izlazak iz nukleolusa. U normalnim fiziološkim uslovima nukleusni import wt

NPM dominira nad eksportom, čime se objašnjava njegova primarna lokalizacija u nukleolusu.

NPM je multifunkcionalni protein;

1. NPM ima važnu ulogu u biogenezi ribozoma, podstičući ćelijski rast i proliferaciju. Naime, NPM učestvuje u procesima sklapanja ribozoma. Obavljajući svoju funkciju u nukleo-citoplazmatskom transportu, NPM sprečava nagomilavanje proteina u nukleolusu (Yu Y, 2006).
2. NPM učestvuje u održavanju genomske stabilnosti ćelije, tako što kontroliše mehanizme za popravku *DNK*, kao i procese duplikacije centrozoma u toku mitoze (Colombo E, 2005; Okuda M, 2002). U mirujućim ćelijama, NPM je povezan sa nedupliciranim centrozomom, ali se nakon fosforilacije on odvaja od njega, omogućavajući pravilnu duplikaciju hromozoma. Nakon toga, NPM se opet vezuje za centrozom u mitotičkom vretenu (Okuda M, 2002). NPM na ovaj način štiti ćeliju od hiper-amplifikacije centrozoma i povećanja genomske nestabilnosti, koja može dovesti do maligne transformacije.
3. NPM je uključen u apoptotski odgovor ćelije na stres i onkogeni stimulus, tako što moduliše aktivnost tumor-supresorskog proteina p53 (Ye K, 2005). Ćelijski stres indukuje stimulus koji remeti integritet nukleolusa, pri čemu se NPM seli iz nukleolusa i nukleoplazmu gde se vezuje za p53, povećavajući njegovu stabilnost i aktivirajući ga, što na kraju dovodi do zaustavljanja ćelijskog rasta.
4. NPM stabilizuje tumorsupresor ARF i određuje njegovu subcelularnu lokalizaciju, te na taj način doprinosi modulaciji signalnih puteva koji suprimiraju rast ćelije (Grisendi S, 2006). ARF je smešten u nukleolusu gde sa NPM proteinom formira molekulski kompleks. Preko ovog kompleksa ARF direktno utiče na procesovanje *rRNK*, sprečavajući eksport obrađenih *rRNK* i inhibirajući ćelijski rast (Sugimoto M, 2003). Nakon onkogenog stresa NPM i ARF se premeštaju u nukleoplazmu, gde ARF utiče na p53 signalni put, što dovodi do blokade ćelijskog ciklusa (Chen D, 2005).

I - 3.1.NPM u leukemijama

NPM je direktno povezan sa pojavom maligniteta i progresijom tumora (Tsui KH, 2004). U leukemijama svoju tumorogenu funkciju nukleofosmin ostvaruje tako što *NPM1* gen učestvuje u translokacijama koje vode do stvaranja onkogenog fuzionog proteina, ili su u *NPM1* genu prisutne mutacije koje remete osnovnu funkciju proteina (Falini B, 2002; Falini B, 2005).

Translokacija t(5;17), pri čemu dolazi do formiranja novog fuzionog proteina NPM1-RARα, je veoma retka, primećena je kod samo 3 slučaja pedijatrijske APL (Grimwade D, 2000). Novonastali NPM1-RARα fuzioni protein izaziva promenu lokalizacije NPM i menja njegovu funkciju. Takođe, kao što je to slučaj sa PML-RARα fuzionim proteinom, on izaziva zaustavljanje mijeloidne diferencijacije u promijelocitnom stadijumu.

Translokacija t(3;5)(q25;q35) se dešava u manje od 1% AML slučajeva, pri čemu nastaje NPM-MLF1 fuzioni protein koji izaziva citoplazmatsku lokalizaciju NPM (Yoneda Kato N, 1996).

Heterozigotne mutacije egzona 12 *NPM1* gena koje pogađaju C-terminalni deo proteina su specifične za AML, i nisu primećene u drugim tipovima leukemija, uključujući ALL i HML (Falini B, 2005). Do sada je otkriveno oko 40 različitih tipova mutacija, sa tačkama prekida između pozicije 956 i 971(Slika 3.).

tip mutacije	sekvenca	protein
Wt	CTCTG.....GCAGT..... GGAGGAAGTCTCTTAACAAAATAG	DLWQWRKSL (wt)
A	CTCTGTCTG GCAGT..... GGAGGAAGTCTCTTAACAAAATAG	DLCLAVEEVSLRK
B	CTCTGCATGGCAGT..... GGAGGAAGTCTCTTAACAAAATA	DLCMAVEEVSLRK
C	CTCTGCGTGGCAGT..... GGAGGAAGTCTCTTAACAAAATAG	DLCVAVEEVSLRK
D	CTCTGCCGTGGCAGT..... GGAGGAAGTCTCTTAACAAAATAG	DLCLAVEEVSLRK
E	CTCTG.....GCAGTCTCTTGCCCAAGTCTCTTAACAAAATA	DLWQSLAQVSLRK
F	CTCTG.....GCAGTCCCTGGAGAAAGTCTCTTAACAAAATA	DLWQSLEKVSLRK

Slika 3. NPM1 genske mutacije (tip A-F). Insertovani nukleotidi su obeleženi ljubičastom bojom. Sve mutacije pogađaju barem jedan triptofan (W) u NLS domenu proteina.

Tačke prekida obuvataju jednostruke ili dvostruke tetranukleotidne insercije, delecije od 4 ili 5 bp u kombinaciji sa insercijom od 9 bp ili delecije od 9 bp u kombinaciji sa 14 bp insercijom. Najčešći tip mutacije, mutacija *tipa A*, je insercija TCTG nukleotida na poziciji 956-959, koja je prisutna u 75-80% slučajeva adultne AML. Mutacije *tipa B i D* se javljaju u 10%, odnosno 5% slučajeva, dok su ostale mutacije veoma retke. Bez obzira na tip, *NPM1* mutacije su sve „frame-shift“ tipa, tj. pomeraju okvir čitanja u regionu koji kodira C-terminalni deo NPM proteina, što rezultira u zameni poslednjih 7 amino-kiselina, sa novim 11 odnosno 13 amino-kiselina. Mutacije za posledicu imaju poremećaj u nukleolusnom lokalizacionom signalu, ili u stvaranju leucinom-bogatog NES koji je odgovoran za aberantnu citoplazmatičnu lokalizaciju NPM. Smatra se da je prisustvo *NPM1* mutacija primarni događaj u procesu maligne transformacije i da je citoplazmatična lokalizacija NPM mutiranog proteina kritična u procesu leukomogeneze.

NPM1 mutacije su nađene isključivo u *de novo* AML sa učestalošću od oko 30%, čime su ove mutacije postale najčešće genetičke promene nađene u ovom tipu leukemija. Prisustvo *NPM1* mutacija je vezano za starost pacijenata, pa je tako najveća učestalost mutacija nađena među starijim bolesnicima (Falini B, 2005; Verhaak RG, 2005). U slučaju pedijatrijske AML, učestalost *NPM1* mutacija je veoma niska (0-6,5%), što govori u prilog tome da su procesi patogeneze AML kod dece i kod odraslih potpuno različiti (Shimada A, 2007; Mullighan CG, 2007).

NPM1 mutacije su prisutne kod svih FAB kategorija (osim kod M3) i najveća frekvencija mutacija je zapažena kod M4 i M5 AML (Schnitger S, 2005; Dohner K, 2005). Prisustvo *NPM1* mutacija je u značajnoj meri povezano sa nekoliko kliničkih katarakteristika pacijenata kao što su: inicijalno visok broj leukocita, viši procenat blasta u koštanoj srži, povećanje broja trombocita, ženski pol i nepostojanje ili smanjenje ekspresije CD34 na blastima (Thiede C, 2006). Osim u retkim slučajevima, *NPM1* mutacije nisu prisutne kod AML pacijenata kod kojih je pronađeno postojanje najčešćih rekurentnih translokacija t(8;21), t(15;17) i inv16 (Suzuki T, 2005; Thiede C, 2006). Ove mutacije su takođe retke kod pacijenata sa kompleksnim kariotipom ili nekim drugim citogenetskim abnormalnostima (Thiede C, 2006).

NPM1 mutacije su predominantno prisutne kod AML sa normalnim kariotipom (AML-NK), tačnije 50% AML-NK pacijenata ima mutacije u *NPM1* genu (Suzuki T, 2005). U okviru AML-NK, *NPM1* mutanti pokazuju osobeni ekspresioni profil („gene-expression profile“ GEP), koji se karakteriše povećanom ekspresijom gena koji su uključeni u održavanje pluripotentog stanja matičnih ćelija, kao što su geni *HOX* familije (*HOXA*, *HOXB*) (Verhaak RG, 2005; Alcalay M, 2005).

Prisustvo *NPM1* mutacija je u korelaciji sa prisustvom *FLT3/ITD* i *FLT3/D835* mutacija (Schnitger S, 2005; Boissel N, 2005; Thiede C, 2006; Falini B, 2005, Dohner K, 2005; Verhaak RG, 2005). Njegova uloga kao faktora prognoze može se posmatrati samo u svetlu odnosa sa *FLT3* mutacijama. Pa tako, u AML-NK grupi pacijenata (prema citogenetskoj klasifikaciji, intermedijarna grupe rizika), *NPM1*⁺/*ITD*⁻ pacijenti pokazuju bolji odgovor na indukcionu terapiju i imaju duže ukupno preživljavanje od *NPM1*⁻ pacijenata (Schnitger S, 2005; Thiede C, 2006, Falini B, 2005, Dohner K, 2005; Verhaak RG, 2005).

NPM1 mutacije pokazuju relativnu stabilnost tokom trajanja bolesti (Chou WC, 2006; Cazzaniga G, 2005). Gubitak mutacije prilikom relapsa bolesti je izuzetno redak, i povezan je sa promenom tipa kariotipa obolelog, iz normalnog u abnormalni kariotip. Baš zbog ove izuzetne stabilnosti, poslednjih godina se ubrzano radi na uvođenju standardizovane qPCR („quantitative PCR“; „real-time PCR“) metodologije za praćenje minimalne rezidualne bolesti (MRB) AML pacijenata koji su pozitivni za najčešće *NPM1* mutacije (Papadaki C, 2008; Chou WC, 2007; Gorello P, 2006).

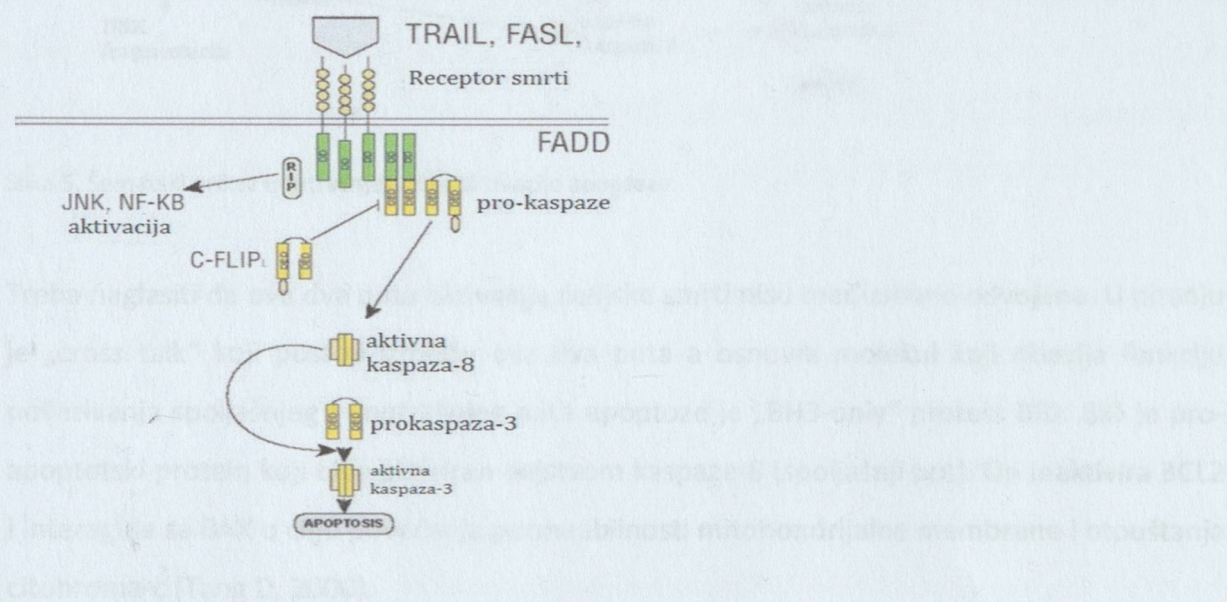
I - 4. Apoptoza

Apoptoza, odnosno programirana ćelijska smrt, je evolutivno visoko konzervisan fiziološki proces ćelijskog suicida, koji ima značajnu ulogu u regulaciji brojnih fizioloških i patoloških procesa (Hengartner MO, 2000). Apoptoza je naročito značajna u održavanju homeostaze brzo-obnavljajućih tkiva, kao što su hematopoetsko i limfoidno tkivo.

Osnovna odlika procesa apoptoze jeste aktivacija kaspaza, familije intracelularnih cisteinskih proteaza. Ovi enzimi su u mirujućoj ćeliji prisutni u neaktivnom stanju kao zimogeni, a po aktivaciji podležu proteolitičkoj obradi i prelaze u aktivno stanje. Kaspaze se dele na inicijatorske kaspaze (kaspaza-8, -2, -9 i -10) i efektorske kaspaze (kaspaza-3, -6 i -7). Kao što im samo ime govori, inicijatorske kaspaze učestvuju u procesima inicijacije ćelijske smrti (nazivaju se još i „uzvodnim“ kaspazama), dok efektorske kaspaze učestvuju u njenoj egzekuciji („nizvodne“ kaspaze) (Thornberry N, 1998).

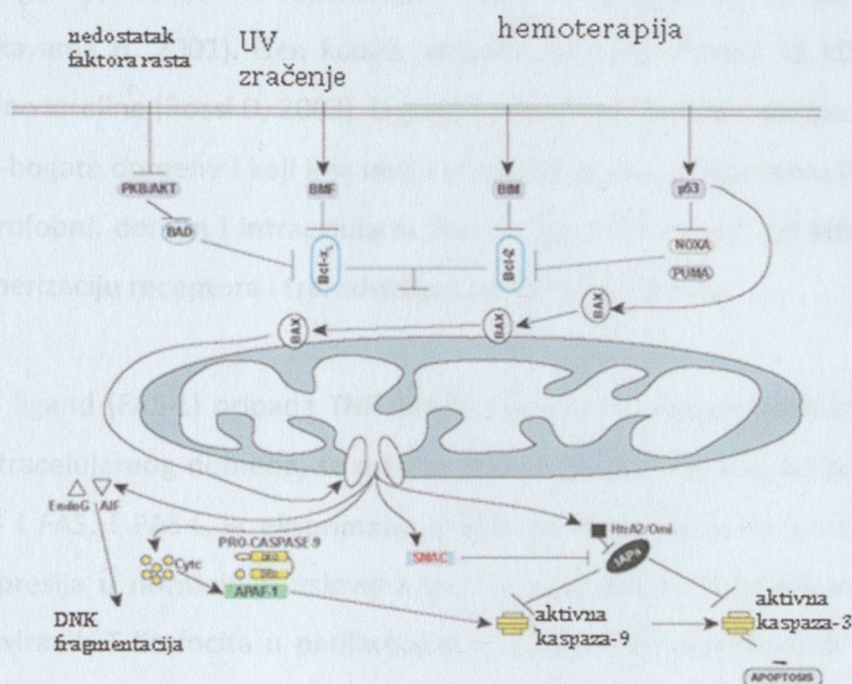
Postoje dva puta aktivacije apoptoze; unutrašnji i spoljašnji. Oba puta dovode do aktivacije efektorskih kaspaza, ali su inicijatorske kaspaze koje učestvuju u ova dva apoptotska puta različite.

Spoljašnji put aktivacije apoptoze započinje vezivanjem liganda za tzv. „receptore smrti“ koji se nalaze na površini ćelije (Slika 4.). U „receptore smrti“ spadaju FAS, TNF-R (tumor necrosis factor receptor) i TRAIL-R (TNF-related apoptosis ligand receptor). Vezivanjem odgovarajućih liganda za njih dolazi do formiranja oligomernog DISC-a (death-induced signaling complex). DISC aktivira kaspazu-8 i dalju kaskadu kaspaza koja na kraju dovodi do ćelijske smrti.



Slika 4. Šematski prikaz spoljašnjeg puta aktivacije apoptoze.

Brojni, različiti, stimuli mogu dovesti do aktivacije unutrašnjeg apoptotskog puta (Slika 5.). Tu spadaju oštećenja DNK, nedostatak faktora rasta, indukcija onkogenih i delovanje različitih citotoksičnih lekova. Kao odgovor na ove stimule, brojni intermedijarni molekuli (p53, c-myc itd.) aktiviraju mitohondrija-zavisan put apoptoze, što na kraju dovodi do promene permeabilnosti mitohondrijske membrane i otpuštanja citohroma-c i drugih pro-apoptotskih molekula, i do ćelijske smrti. Permeabilnost mitohondrijske membrane je kontrolisana od strane pro- i anti-apoptotskih članova BCL2 familije proteina.



Slika 5. Šematski prikaz unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze.

Treba naglasiti da ova dva puta aktivacije ćelijske smrti nisu međusobno odvojena. U pitanju je „cross talk“ koji postoji između ova dva puta a osnovni molekul koji obavlja funkciju povezivanja spoljašnjeg i unutrašnjeg puta apoptoze je „BH3-only“ protein BID. BID je pro-apoptotski protein koji biva aktiviran dejstvom kaspaze-8 (spoljašnji put). On inaktivira BCL2 i interaguje sa BAX u cilju povećanja permeabilnosti mitohondrijalne membrane i otpuštanja citohroma-c (Tang D, 2000).

I - 4.1. FAS receptor(FAS) i FAS ligand (FAS-L)

FAS receptor (FAS ili CD95 ili Apo-1) pripada superfamiliji TNF receptora, gde spadaju TNFR-1 i TRAIL receptori DR-4 i DR-5 (Nagata S, 1995). To je glikozilovani transmembranski protein koji je normalno eksprimiran na širokom spektru ćelija, pre svega na aktiviranim T i B limfocitima u perifernom krvotoku, ćelijama timusa, jetre, jajnika, srca (Nagata S, 1995; Cheng J, 1994).

FAS gen je lociran na hromozomu 10q24.1, dužine oko 12 kb, sastoji se od 9 egzona (Takayama H, 2001). Gen kodira protein molekulske mase 45 kDa, koji se sastoji od 325 amino kiseline (Rossi D, 2003). U građi proteina se razlikuju: ekstracelularni region koji sadrži Cys-bogate domene i koji ima ulogu u interakciji sa FAS ligandom (FAS-L), transmembranski, hidrofobni, domen i intracelularni domen tzv. smrtonosni, „death“, domen, neophodan za trimerizaciju receptora i transdukciju apoptotskog signala.

FAS ligand (FAS-L) pripada TNF familiji liganda i pokazuje visok stepen homologije u građi ekstracelularnog domena, sa ostalim članovima familije kao što su TNF, limfotoksin i drugi. Kao i FAS, i FAS-L je eksprimiran u glikozilovanoj formi na površini ćelija, ali je njegova ekspresija u normalnim uslovima veoma ograničena. Eksprimiran je isključivo na površini aktiviranih T limfocita u perifernoj krvi, na površini citotoksičnih T limfocita, NK ćelija, na ćelijama testisa i oka. Gen za FAS-L se nalazi na hromozomu 1q23, dužine je oko 8 kb, i sastavljen je od 5 egzona koje kodiraju protein od 281 amino-kiseline (Nagata S, 1995).

Vezivanjem liganda za ekstraćelijski deo receptora bogat cisteinom, dolazi do trimerizacije FAS receptora i aktivacije citoplazmatskog dela receptora („death domain“- DD). Adaptorski proteini kao što je FADD („FAS associated death domain“), sopstvenim DD interagije sa DD aktiviranog receptora, i aktivira svoj efektorski domen smrti, DED („death effector domain“). DED domen FADD proteina se vezuje za prokaspazu-8 i formira signalni kompleks indukovani smrtnim signalom („death inducing signalling complex“-DISC). Prokaspaza-8 se auto-proteolitički aktivira i prelazi u aktivnu formu enzima kaspaza-8, koja dalje aktivira kaspaznu kaskadu i dovodi do ćelijske smrti.

FAS/FAS-L indukovana apoptoza je naročito značajna za normalno funkcionisanje imunog sistema. Neophodna je za normalno funkcionisanje citotoksičnih T limfocita, za uklanjanje aktiviranih T i B limfocita nakon ostvarenog imunog odgovora, za uklanjanje autoreaktivnih T limfocita itd. Gubitak funkcije kao i povećana aktivnost FAS/FAS-L sistema dovode do pojave raznih oboljenja, kao što su tumori, autoimuni i imunodeficijenti poremećaji.

I - 4.2. BCL2 familija proteina

Do danas je u ćelijama sisara nađeno oko 20 članova BCL2 familije proteina, i svi oni imaju ulogu u regulaciji apoptoze.

BCL2 familija proteina je podeljena u 3 subfamilije;

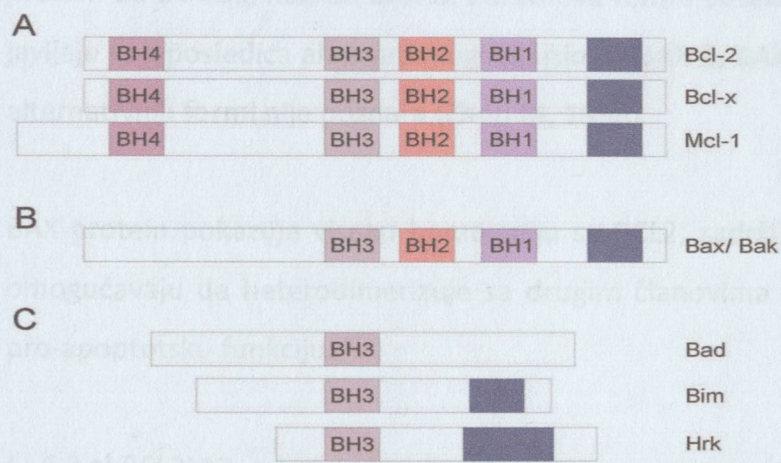
1. Anti-apoptotska familija, čiji članovi pokazuju visoku strukturnu i funkcionalnu homologiju sa BCL2 proteinom. Pored BCL2 tu spadaju BCL-XL i MCL-1.
2. Pro-apoptotska familija gde pored BAX spada i BAK protein, i
3. „BH3-only“ familija u koju spadaju HRK, BIM, BAD i BID i koji takođe imaju pro-apoptotska svojstva.

Članovi BCL2 familije imaju između 1- 4 konzervisana homologa domena nazvana BCL2-homologi domeni (BH domeni). Ovi domeni imaju značajnu ulogu u heterodimerizaciji između članova familije do koje dolazi u procesima apoptoze. Takođe, nekoliko članova ove familije poseduje i hidrofobni karboksi-terminalni transmembranski region (TM domen), koji je neophodan za vezivanje ovih proteina za membrane mitohondrija, endoplazmatičnog retikuluma i nukleusa (Adams JM & Cory S, 1998).

Proteini anti-apoptotske familije pokazuju viši nivo strukturne konzervisanosti, sadrže 3 ili 4 BH domena, i smešteni su na citoplazmatskoj strani mitohondrijalne membrane. Pro-apoptotski članovi familije su manje konzervisani i obično nemaju BH4 amino-terminalni domen. Oni su kod zdrave ćelije smešteni u citosolu i na citoskeletu. Svi članovi BCL2 familije imaju BH3 domen, što govori u prilog tome da on igra glavnu ulogu u heterodimerizaciji i u promociji apoptoze (Adams JM & Cory S, 1998). Ova pretpostavka je

potvrđena pronalaskom cele subfamilije pro-apoptotskih proteina koji sadže samo BH3 domen („BH3- only“) (Slika 6.).

Balans između nivoa ekspresije i intracelularne lokalizacije pro- i anti-apoptotskih proteina određuje da li će ćelija ući u apoptozu ili će biti rezistentna na apoptotski stimulus. Posebno se naglašava da je stroga podela na pro- i anti-apoptotske funkcije pripadnika ove familije proteina uprošćena slika „pravog“ stanja u ćeliji, u kojoj može doći do kompleksnih promena u apoptotskom putu. Pa tako npr. BCL2, anti-apoptotski protein, pod proteolitičkim dejstvom kaspaze-3 može postati pro-apoptotski orijentisan; BAX može mutirati i kao posledica toga može izgubiti svoju pro-apoptotsku ulogu (Meijerink JPP, 1998).



Slika 6. Šematski prikaz BH domena u; A) anti-apoptotskim članovima BCL2 familije, B) pro-apoptotskim članovima i C) „BH3-only“ familiji proteina

1 - 4.2.a) BCL2

BCL2 gen je prvi put identifikovan kao protoonkogen u okviru hromozomske transkolacije t(14;18) u ćelijama humanog B-ćelijskog limfoma (Tsujimoto Y & Croce CM, 1986). Lokalizovan je na hromozomu 18q21.3, i kao rezultat alternativnog splajsinga kodira dva proteina (26 kDa i 22 kDa). Manja forma BCL2-β, koja nema karboksi-terminalan domen, predstavlja solubilnu formu BCL2 (Tanaka S, 1993). Za BCL2-β nije pokazano da deluje bilo anti-ili pro-apoptotski (Nguyen M, 1994).

BCL2- α protein se sastoji od 239 amino-kiselina, ima sva 4 BH domena i hidrofobni karboksi-terminalni domen koji mu omogućava lokalizaciju na citosolnoj strani mitohondrijalne membrane. Svoju funkciju obavlja formiranjem homodimera ili heterodimera sa pro-apoptotskim članovima BCL2 familije.

U fetalnim tkivima BCL2 protein je široko eksprimiran, dok je kod adulta njegova ekspresija ograničena na visoko proliferišuća tkiva i tkiva u kojima se odigrava diferencijacija ćelija.

I - 4.2.b) BAX

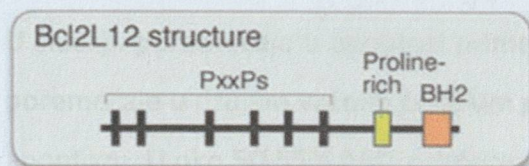
BAX gen je mapiran na hromozomu 19q13.3-q13.4. Sastoji se od 6 egzona koji kodiraju protein od 24 kDa, nazvan BAX- α . Pored ove forme detektovano je još 4 forme BAX, koje se javljaju kao posledica alternativnog splajsinga; BAX- β , BAX- γ , BAX- δ , i BAX- ω . Tačna funkcija alternativnih formi nije poznata (Zhou M, 1998).

BAX protein pokazuje visoku homologiju sa BCL2, sadrži BH1, BH2 i BH3 domene koji mu omogućavaju da heterodimerizuje sa drugim članovima BCL2 familije i tako obavlja svoju pro-apoptotsku funkciju.

I - 4.2.c) BCL2L12

BCL2L12 je nov član BCL2 familije proteina, identifikovan od strane Scorilas A i saradnika 2001. godine. Gen za *BCL2L12* se nalazi na hromozomu 19q13.3-13.4 i zauzima 8,8 kb genomske DNK. Postoje dve osnovne varijante *BCL2L12 mRNK*, nastale kao posledica alternativne obrade primarnog transkripta; „full-length“ klasična forma, kodirana od strane 7 egzona, i kraća forma kojoj nedostaje egzon 3 (*BCL2L12-A*). Obe varijante su eksprimirane u skoro svim humanim tkivima, uključujući limfoidna i hematopoetska tkiva (Scorilas A, 2001). Klasična *BCL2L12 mRNK* forma kodira protein dužine 334 amino-kiseline, molekulske mase 36,8 kDa. Kraća *mRNK* varijanta kodira protein od 176 amino-kiseline.

BCL2L12 protein se sastoji iz C-terminalnog BH2 domena (14 amono-kiselina), prolinom-bogatog domena i 6 ponovaka sa PXXP motivom (Slika 7.).



Slika 7. Struktura BCL2L12 proteina

Filogenetske analize su pokazale nepostojanje veze sa drugim BCL2 proteinima koji imaju BH2 domen, što govori o strukturnoj specifičnosti ovog proteina (Stegh AH, 2007).

Tačna uloga BCL2L12 u procesu apoptoze još uvek nije precizno definisana, a najnovija istraživanja sprovedena na ćelijama glioblastoma govore u prilog njegove anti-apoptotske funkcije (Stegh AH, 2007; Stegh AH, 2008).

I - 4.3. Poremećaj apoptoze u leukemijama

Promene u procesu apoptoze remete fini balans koji postoji između proliferacije, preživljavanja ćelija i ćelijske smrti, i na taj način igraju veliku ulogu u razvoju leukemija i drugih kancera. Takođe, poremećaji u ekspresiji proteina uključenih u proces apoptoze su odgovorni za pojavu rezistencije na hemoterapiju. Moderni lekovi koji se danas primenjuju u hemoterapiji „koriste“ unutrašnji put aktivacije apoptoze kao glavni mehanizam delovanja, tj. izazivanja smrti malignih ćelija. Svaki poremećaj u tom putu apoptoze, naročito u ekspresiji BCL2 familije proteina, ima za posledicu rezistenciju na hemoterapiju i relaps bolesti.

Poznato je da leukemije predstavljaju višestepeni proces u kome dolazi do nagomilavanja genetičkih promena u hematopoetskoj ćeliji, što na kraju dovodi do njene maligne transformacije i klonalne ekspanzije. Ovo znači da će u većini slučajeva leukemijska ćelija biti okarakterisana sa više genetičkih promena koje deluju sinergistički u pravcu ekspresije celokupnog leukemijskog fenotipa. Ova pretpostavka je i osnova za tzv. „2 hit“ hipotezu etiologije leukemija (Gilliland DG, 2002).

U slučaju poremećaja u apoptozi primećeno je da mnoge genetičke promene koje indukuju poremećaje u drugim važnim ćelijskim procesima, posredno ili neposredno imaju uticaja i na apoptozu. U oko 50-55% AML primećeno je prisustvo specifičnih balansiranih hromozomskih aberacija koje za posledicu imaju formiranje fuzionih gena. Ekspresija ovih fuzionih proteina ima za posledicu uglavnom poremećene procese proliferacije i ćelijskog ciklusa (Fhroling S, 2005).

PML/RAR α je fuzioni protein koji je eksprimiran u skoro svim slučajevima APL i njegova osnovna uloga u procesu leukemogeneze jeste inhibicija diferencijacije mijeloidnih progenitora (Grignani F, 1993). Međutim, ovaj fuzioni protein ima ulogu i u sprečavanju procesa apoptoze, a tu ulogu vrši tako što remeti funkciju PML. Naime, u normalnoj ćeliji PML ima funkciju pozitivnog regulatora p53-zavisnog i p53-nezavisnog puta apoptoze (Guo A, 2000). On fizički interaguje sa p53 izaziva njegovu acetilaciju što dovodi do indukcije gena za *BAX* i dovodi do apoptoze. U slučaju p53-nezavisnog puta, PML kontroliše FAS-indukovanu apoptozu (Zhong S, 2000).

CBF β /SMMHC fuzioni protein koji se javlja kao posledica inv16, takođe svoju ulogu u apoptozi obavlja preko p53 puta (Britos-Bary M, 1998), dok AML1/ETO fuzioni protein (t(8;21)) deluje tako što se vezuje za promotor *BCL2* i povećava ekspresiju ovog anti-apoptotskog gena (Klampfer L, 1996).

Još jedan fuzioni protein svoju anti-apoptotsku ulogu vrši tako što izaziva povećanu ekspresiju antiapoptotskih gena. To je *BCR/ABL* onkogen karakterističan za HML i ALL (pedijatrijsku i adultnu), za koga je nađeno da konstitutivno aktivira STAT-ove, koji se direktno vezuju za promotor *BCL-XL* gena (Neiborowska-Skorska M, 1999).

Na proces apoptoze utiču i brojne mutacije u genima nađene kod obolelih od akutnih leukemija. Jedna od njih je i mutacija u genu za nukleofosmin koja se u visokom procentu javlja kod AML pacijenata, naročito kod onih kod kojih nisu detektovane hromozomske translokacije. Ove mutacije koje pogađaju karboksi-terminalni domen nukleofosmina

remete njegovu funkciju u p53 putu apoptoze i štite ćeliju od programirane smrti (Lambert B & Buckle M, 2006).

Mutacije u genima za receptore tirozin kinaza su takođe veoma česte u AML. Najčešće su mutacije u genu za *FLT3* (*FLT3/ITD* i *FLT3/D835* mutacije). Takođe, primećena je i uvećana ekspresija *FLT3* gena u skoro svim AML. I uvećana ekspresija i postojanje mutacija u *FLT3* genu dovode do konstitutivne aktivacije *FLT3* receptora što uzrokuje direktnu aktivaciju *STAT5a*, i dalje dovodi do *BCL-XL* hiperekspresije i inhibicije *BAX* (Minami Y, 2003; Lsovsy M, 1996).

I - 4.3.a) Poremećaji FAS/FAS-L sistema

FAS/FAS-L sistem je veoma važan put aktivacije apoptoze i njegovi poremećaji predstavljaju jedan od uzroka pojave i razvitka leukemija. U većini slučajeva *in vivo*, leukemične ćelije su rezistentne na FAS/FAS-L indukovanu apoptozu. Ova rezistencija je osnovni mehanizam pomoću koga leukemične ćelije izbegavaju imuni odgovor, i jedan od osnovnih mehanizama rezistencije na određene hemoterapeutike.

Do poremećaja FAS/FAS-L sistema može doći iz više razloga;

1. Mutacije u FAS genu. Najčešće supstitucione zamene „missense“ tipa ili manje delecije u regionu koji kodira DD domen FAS receptora nađene su u malom procentu kod dečije T-ALL (Beltinger C, 1998), kod pacijenata sa adultnom T ćelijskom leukemijom (ATL) (Tamiya K, 1998), ali nisu pronađene kod pedijatrijske B-ALL (Beltinger C, 1998a) niti u slučajevima obolelih od AML (Rozenfeld-Garnot G, 2001).
2. Alteranativna obrada primarnog transkripta FAS gena. Transkripcijom *FAS* gena dobijaju se 2 osnovna tipa *mRNK* transkripta;
 - a) „full-lenght“ *FAS mRNK* čijom translacijom nastaje membranski vezani protein i
 - b) kraći transkript kome nedostaje egzon 6, nazvan *sFAS*, čijom translacijom nastaje kraća forme FAS proteina koja je solubilna.

Smatra se da ova solubilna forma proteina može delovati anti-apoptotski, tako što predstavlja „mamac“ za vezivanje FAS-L. Brojne varijante alternativno obrađenog transkripta su nađene ne samo kod obolelih već i kod zdravih individua (Liu C, 1995). U normalnim ćelijama *mFAS* forma je uvek malo dominantnija. Međutim, pomeranje ovog odnosa u pravcu dominacije *sFAS* forme može imati anti-apoptotski efekat (Inaba H, 1999; Kamihira S, 1999; Liu JH, 2002).

3. Promene u ekspresiji FAS i FAS-L. Aberantna ekspresija FAS je zapažena kod solidnih tumora kao i kod hematopoetskih neoplazmi i primećeno je da je smanjene ekspresije FAS povezano sa progresijom bolesti (Galle PR, 1995; Kamihira S, 1997).

FAS ekspresija u akutnim leukemijama je veoma heterogena. Ekspresija je smanjena kod ALL pacijenata. Veoma širok opseg ekspresije je nađen kod AML pacijenata, a kod pacijenata obolelih od retke bilinijske leukemije, FAS ekspresija nije primećena (Li Q, 2000; Wood CM, 2003; Wuchter C, 2000; Suminoe A, 2004). FAS ekspresija je povezana sa stadijumom diferencijacije ćelija mijeloidne loze, gde se najniži stepen ekspresije sreće kod CD34⁺ nezrelih progenitorskih ćelija (Wuchter C, 2000; Iijima N, 1997). U nekim studijama nađena je korelacija između ekspresije FAS i odgovora na indukcionu terapiju, tj. postizanja kompletne remisije, ali u većini slučajeva nivo ekspresije FAS se nije pokazao kao značajan i nezavisan faktor prognoze (Iijima N, 1997; Min YH, 1996; Wuchter C, 2000).

Teorijski gledano, smanjena ekspresija FAS „štiti“ leukemijsku ćeliju od FAS-indukovane apoptoze. Međutim, situacija je nešto komplikovanija *in vivo*, jer je primećeno je da neke leukemijske ćelije pokazuju rezistenciju na FAS-indukovanu apoptozu, bez obzira na značajnu ekspresiju FAS (Beltinger C, 1998a; Karawajew L, 1997).

FAS-L je konstitutivno eksprimiran na leukemijskim ćelijama i njegova ekspresija je najviša kod CD34⁺ nezrelih progenitorskih ćelija. Povećanje ekspresije FAS-L je povezano sa agresivnijim tipovima leukemija. Kako se pretpostavlja, razlog za to je indukcija FAS-indukovane apoptoze u aktiviranim T limfocitima od strane malignih ćelija, koje na svojoj površini eksprimiraju visok nivo FAS-L. Na taj način maligne ćelije suprimiraju anti-tumorski odgovor (Lickliter JD, 1999). Za ovaj sistem

izbegavanja anti-tumorskog imunog odgovora je pokazano da funkcioniše kod solidnih tumora, ali ne i kod leukemija (Reichmann E, 2002). Naime, u slučaju leukemija je pokazano da FAS-L -ekspimirajuće ćelije u mnogim slučajevima nisu sposobne da izazovu FAS-indukovanu apoptozu kod limfocita koji ekspimiraju funkcionalni FAS (Buzyn A, 1999).

Pretpostavlja se da je gubitak funkcije FAS/FAS-L sistema koji postoji kod akutnih leukemija posledica neadekvatnog sprovođenja signala duž FAS puta apoptoze, ili jednostavno, na finalnu sudbinu ćelije veći uticaj imaju članovi BCL2 familije proteina.

I - 4.3.b) Poremećaji BCL2 familije proteina

In vitro studije su pokazale da BCL2 familija proteina predstavlja kritične regulatore apoptoze u leukemiaškim ćelijama. U eksperimentima transfekcije, uvećana ekspresija BCL2 i njegovog homologa BCL-XL dovodi do kompletne inhibicije apoptoze i do rezistencije na čitav niz hemoterapeutskih lekova (Miyashita T, 1993). Isto tako, smanjenje ekspresije BCL2, kao i uvećanje pro-apoptotskih proteina kao što su BCL-XS i BAX, čini da ćelije ponovo postanu hemosenzitivne, tj. dolazi do smrti ćelije (Kitada S, 1994; Sumantran VN, 1995).

U brojnim *in vivo* studijama praćen je nivo ekspresije BCL2 familije (na proteinskom i na nivou *mRNA*) kod pacijenata obolelih od AML i ALL. Pokazana je izuzetna heterogenost u nivou ekspresije. U skoro svim studijama nađena je povećana ekspresija BCL2 u poređenju sa normalnim, zdravim ispitanicima (Coustan-Smith E, 1996; Karakas T, 1998; Andreeff M, 1999), dok je u nekim studijama nađen povišen nivo i BAX (Ong YL, 2000; Kohler T, 2002). Opseg ekspresije ovih proteina je bio veliki i zalazio je u opseg ekspresije zdravih uzoraka. Pretpostavlja se da je izuzetno širok opseg ekspresije BCL2 familije proteina, prvenstveno BCL2 i BAX, posledica različitog nivoa njihove ekspresije u različitim stadijumima diferencijacije mijeloidne, odnosno limfoidne loze. Pokazano je da CD34⁺ nezrele hematopoetske ćelije u AML imaju uvećanu ekspresiju BCL2, BCL-XL i nižu ekspresiju BAX (van Stijn A, 2003; Andreeff M, 1999). Situacija je ista i kod ALL, tačnije pedijatrijske ALL, gde

je pokazano da najprimitivniji T i B limfoidni prekursori povećano ekprimiraju BCL-XL i BCL2 (Salomons GS, 1997).

Zbog heterogenosti rezultata u nivou ekspresije BCL2 i BAX, naučnici su se okrenuli izučavanju BCL2/BAX kvantitativnog odnosa. Poznato je da su BCL2 i BAX sposobni da stvaraju homo- i hetero-dimere i da na taj način vrše modulaciju apoptotskog procesa, pa se pretpostavlja da odnos BCL2/BAX može odrediti u kom smeru će ćelija odreagovati na apoptotski stimulus (Oltvai ZN, 1993). U leukemijama je odnos BCL2/BAX uglavnom povećan, ali i on pokazuje velike varijacije između pacijenata (Ong YL, 2000; Kohler T, 2002; Andreeff M, 1999).

Ispitivanjem nivoa ekspresije BCL2, BAX i odnosa BCL2/BAX na velikom broju pacijenata obolelim od akutnih leukemija pokazano je da oni predstavljaju značajne parametre prognoze i predikcije preživljavanja. Pa tako, povećana ekspresija BCL2 je povezana sa niskom stopom kompletne remisije bolesti (Banker De, 1998), dok je njegova snižena ekspresija vezana za pacijente sa povoljnim kariotipom (DelPoeta G, 2003). Štaviše, povećani BCL2/BAX odnos predviđa loš ishod bolesti (Venditti A, 2004).

Međutim, postoje i studije koje govore suprotno ili u kojima nije pokazana nikakva veza između prognoze/ishoda bolesti i ekspresije ovih članova BCL2 familije. Campos L i saradnici nisu potvrdili postojanje nikakve veze između prognoze bolesti i ekspresije BCL2, dok su Coustan-Smith E i saradnici, utvrdili postojanje korelacije povećane ekspresije BCL2 i povećane stope preživljavanja ALL pacijenata (Campos I, 1996; Coustan-Smith E, 1996). U velikoj studiji koja je obuhvatila 165 *de novo* AML pacijenata izostala je korelacija između ekspresije BAX i odgovora na terapiju i preživljavanja, a u drugoj studiji je visok nivo BAX ekspresije jasno povezan sa povećanim preživljavanjem (Cornblau SM, 2000; Ong YL, 2000).

Bez obzira na sve kontraverzne podatke o ekspresiji proteina BCL2 familije, rezistencija na apoptozu odnosno hemorezistencija je obeležje akutnih leukemija, naročito u slučaju relapsa bolesti. S tim u vezi, krenulo se u primenu novih terapeutika tzv. „antisense-BCL2“

oligonukleotida koji izazivaju apoptozu u BCL2 eksprimirajućim leukemijskim ćelijama. Do sada se došlo do faze II kliničkog ispitivanja i rezultati su više nego zadovoljavajući (Marcucci G, 2005).

Proces leukemogeneze je kompleksan i nastaje usled postojanja poremećaja u jednom od ključnih ćelijskih procesa kao što su diferencijacija, proliferacija i apoptoza. Takode, leukemogeneza je višestepeni proces u kome postupno dolazi do akumulacije genetičkih i epigenetičkih promena koje na kraju dovode do stvaranja klonalnog leukemijskog ćelijskog tipa.

Priroda gena koja su uključena u proces leukemije, ali i priroda njihovih promena kao i to da li se promene u njima odnose na aktivaciju ili inaktivaciju određenih gena, može biti veoma različita. Često jedna genetička promena ima za posledicu regulaciju dva ili više ćelijskih procesa, što je jedan njihovih karakterističnih delovanja u dotičnim procesima mogle transformacije.

Cilj ovog istraživanja je evaluirati genetičke markere proliferacije i apoptoze koji ukazuju na akutnu leukemiju i utvrditi da li se mogu koristiti za određivanje

stvarivanja adekvatnih i neadekvatnih interakcija karakterističnih za akutnu leukemiju i leukemije (AML) i akutne limfoblastne leukemije (ALL) kao i utvrditi kako, retinik, alteracije koje imaju ulogu u procesu maligne transformacije

stvarivanja adekvatnih i neadekvatnih interakcija karakterističnih za akutnu leukemiju i leukemije (AML) i akutne limfoblastne leukemije (ALL) kao i utvrditi kako, retinik, alteracije koje imaju ulogu u procesu maligne transformacije

analizu ekspresije gena vezan za procese apoptoze i proliferacije i to:

1. ekspresiju Bcl-2 gena koji ima značajnu ulogu u procesu proliferacije kao i utvrditi da li se može koristiti kao marker za određivanje maligne transformacije
2. ekspresiju gena za Fas i FasL kao osnovni faktori započetog puta aktivacije apoptoze

II - CILJ ISTRAŽIVANJA

Proces leukemogeneze je kompleksan i zasniva se na postojanju poremećaja u nekom od ključnih ćelijskih procesa kao što su diferencijacija, proliferacija i apoptoza. Takođe, leukemogeneza je višestepeni proces u kome postepeno dolazi do akumulacije genetičkih i epigenetičkih promena koje na kraju dovode do ekspresije kompletnog leukemijskog fenotipa.

Prema danas opšte prihvaćenoj „2 hit“ hipotezi, za pojavu leukemije, potrebne su bar 2 genetičke promene, koje svaka za sebe mogu „pogađati“ odvojene ćelijske procese, ali veoma često jedna genetička promena ima za posledicu remećenje dva ključna ćelijska procesa. Još je češće njihovo sinergističko delovanje u složenim procesima maligne transformacije.

Cilj našeg istraživanja je praćenje genetičkih markera proliferacije, diferencijacije i apoptoze kod obolelih od akutne leukemije. Istraživanja će obuhvatiti:

- utvrđivanje učestalosti hromozomskih aberacija karakterističnih za akutne mijeloidne leukemije (AML) i akutne limfoblastne leukemije (ALL), kao i detekciju novih, retkih, aberacija koje imaju ulogu u procesima maligne transformacije
- utvrđivanje učestalosti najzastupljenijih genetičkih mutacija u genu za *FLT3* i *NPM1*, uticaja koje njihovo prisustvo ima na prognozu i preživljavanje obolelih, kao i njihovu međusobna povezanost u procesima leukemogeneze
- analizu ekspresije gena vezanih za procese apoptoze i proliferacije, i to:
 1. ekspresija *FLT3* gena koji ima značajnu ulogu u procesima proliferacije, kao i potencijalni značaj koji može imati kao marker za praćenje minimalne rezidualne bolesti
 2. ekspresija gena za *FAS* i *FAS-L* kao osnovnih činilaca spoljašnjeg puta aktivacije apoptoze

3. ekspresija gena *BCL2* familije kao osnovnih činilaca unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze: praćenje ekspresije klasičnog anti-apoptotskog *BCL2* gena i pro-apoptotskog *BAX* gena, kao i njihov međusobni odnos, i praćenje ekspresije novog člana *BCL2* familije, *BCL2L12* gena, u cilju utvrđivanja značaja koji ima u prognozi i preživljavanju obolelih od akutne leukemije.

Sagledavanje međusobnih interakcija koje ove genetičke promene ostvaruju, treba da dovede do novih saznanja o njihovom sinergističkom delovanju u kompleksnom procesu leukemogeneze i do rasvetljavanja njene molekularne osnove. Takođe, ova istraživanja bi mogla da dovedu do saznanja o novim molekularnim markerima značajnim za dijagnostiku, tok, prognozu i lečenje leukemija.

III - MATERIJAL I METODE

III - 1. Ispitanici

U ovu studiju uljučeni su pacijenti oboleli od AML i ALL, dijagnostikovani na Institutu za hematologiju, Kliničkog Centra Srbije, odnosno u Univerzitetnoj dečjoj klinici u Beogradu. Dijagnoza je postavljena na osnovu standardnih citomorfoloških, citohemijskih, citogenetskih 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.

Imunofenotipizacijom, tehnikom protočne citofluorimetrije, omogućena je precizna podela leukemija na mijeloidne i limfoblastne, kao i detekcija retke bifenotipske leukemije sa prisustvom ekspresije markera mijeloidne i limfoblastne loze.

Pacijenti su klasifikovani u podgrupe prema FAB klasifikaciji. FAB (French-American-British) 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 4.), dok su ALL na osnovu morfologije limfoblasta podeljene na 3 podgrupe (L1, L2 i veoma retku L3).

U slučaju obolelih od AML najjači nezavisni faktor prognoze jeste citogenetski 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 4. FAB klasifikacija AML

klasifikacija	podtip AML
M0	Akutna mijeloblastna, minimalno diferentovana
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 diferentovana
M5b	Akutna monocitna, diferentovana
M6	Akutna eritroleukemija
M7	Akutna megakarioblastna leukemija

Kod obolelih od ALL, grupe sa niskim, visokim i standardnim rizikom su pravljene na osnovu BFM ALL IC 2002 protokola („Berlin Frankfurt Munster Acute lymphoblastic Leukemia International Committee“).

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

Za izolaciju DNK iz krvi odnosno koštane srži 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®-u (Invitrogen)

III - 4. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija

Za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija je korišćen TRIzol® (Invitrogen). TRIzol® 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®-a resuspendovano je maksimalno 1×10^7 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 μ l hloroforma, snažno promućka, a zatim uzorak ostavi da stoji 5-15 min na sobnoj temperaturi
- nakon centrifugiranja na 12 000rcf/15 min/+4°C pojavljuju se jasno odvojene faze; gornja vodena faza u kojoj se nalazi RNK, interfaza i donja, crevena, organska faza u kojoj se nalazi 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. Izolacija DNK iz mononuklearnih ćelija

Iz mononuklearnih ćelija koje su resuspendovane u TRIzol®-u (Invitrogen), pored izolacije RNK može se paralelno vršiti i izolacija DNK.

Protokol:

- nakon lize ćelija, dodavanja 200 μ l hloroforman i centrifugiranja na 12 000 rcf/15 min/+4°C pojavljuju se jasno odvojene faze; DNK se nalazi u donjoj, obojenoj, organskoj fazi
- pažljivo ukloniti ostatke vodene faze
- precipitirati DNK iz interfaze i organske faze dodavanjem 300 μ l 100% etanola. Promešati invertovanjem tube i ostaviti da stoji na sobnoj temperaturi 3-5 min
- nakon centrifugiranja na 2 000rcf/5 min/+4°C, ukloniti supernatant (koji sadrži proteine) i oprati talog dva puta dodavanjem 1 ml rastvora koji sadrži 0,1 M Na-citrat i 10% etanol („wash-solution“). U toku svakog ispiranja omogućiti da DNK stoji

najmanje 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega sledi centrifugiranje na 2 000rcf/5 min/+4°C

- resuspendovati talog u 1,5-2 ml 75% etanola i ostaviti da stoji 10-20 min na sobnoj temperaturi
- nakon ponovnog centrifugiranja 2 000rcf/5 min/+4°C, odbaciti supernatant i osušiti talog na sobnoj temperaturi
- talog rastvoriti u 8 mM NaOH

III - 6. Reverzna transkripcija (RT)

Sinteza cDNK je izvršena reakcijom reverzne transkripcije.

Protokol:

- smešu finalnog volumena 11, 5 µl koja sadrži 2 µg RNK i 100 pmol „random-hexamer“ prajmera inkubirati 5 min na 70°C, a zatim ohladiti na ledu
- dodati smešu finalnog volumena 8,5 µl koja sadrži 4 µl 5x RT-pufera, 20U RNase-inhobitora, 2 µl dNTP (10 mM) i 40 U M-MuLV reverzne transkriptaze (Fermentas)
- inkubirati 10 min na 25°C, a zatim 1h na 42°C
- reakcija se zaustavlja inkubacijom od 10 min na 70°C

III - 7. Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)

PCR („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 (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).

PCR-RFLP („Polimerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism“) je metoda koja se koristi za direktnu detekciju mutacije koja menja, kreira novo ili ukida postojeće mesto prepoznavanja nekog restrikcionog enzima.

III - 7.1. Detekcija FLT3/ITD mutacije

Reakciona smeša zapremine 30 μ l, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (2 mM finalno), $MgCl_2$ (2,75 mM finalno), prajmeri 14F i 15R (Tabela 5.) (350 mM finalno) i 2U HotStarTaq® DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Tabela 5. Sekvence prajmera za detekciju i sekvenciranje FLT3/ITD, FLT3/D835 i NPM1 mutacija.

Prajmer	sekvenca (5'-3')
14F	GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC
15R	CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC
21F	CCG CCA GGA ACG TGC TTG
21R	GCA GCC TCA CAT TGC CCC
NPM1-F	TTA ACT CTC TGG TGG TAG AAT GAA
NPM1-R	CAA GAC TAT TTG CCA TTC CTA AC
NPM1_1112R	CCT GGA CAA CAT TTA TCA AAC ACG GTA

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

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. Kod *FLT3/ITD* pozitivnog nalaza, vršeno je isecanje dužeg PCR produkta sa agaroznog gela, a nakon prečišćavanja je izvršeno sekvenciranje upotrebom prajmera koji su korišćeni za PCR amplifikaciju.

III - 7.2. Detekcija FLT3/D835 mutacije

Reakciona smeša zapremine 30 µl, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (2 mM finalno), MgCl₂ (2,75 mM finalno), prajmeri 21F i 21R (Tabela 4.) (350 mM 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/58°C – aniling
 - 2 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Produkt PCR reakcije za *FLT3/D835* je 114 bp. Detekcija mutacije se vrši digestijom ovako dobijenog PCR fragmenta restrikcionim enzimom *EcoRV* (Fermentas). Prisustvo mutacije

narušava restrikcionno mesto za ovaj enzim, tako da će se seći samo nemutirani fragmenti. U slučaju digestije dobijamo produkte dužina 68 bp i 46 bp.

Smeša za digestiju sadrži sledeće komponente:

- 10 µl PCR produkta
- 1 x pufer R
- 20U *EcoRV* (Fermentas)

Uslovi digestije su 12 sati na 37°C. Analiza fragmenata se vrši na 8% poliakrilamidnom gelu.

III - 7.3. 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), MgCl₂ (2,25 mM finalno), prajmeri NPM1-F i NPM1-R (Tabela 4.) (500 mM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije

4. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
5. 35 ciklusa;
 - 1 min/95°C – denaturacija
 - 1 min/60°C – aniling
 - 2 min/72°C – elongacija
6. 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 5.)

III - 8. Standardizovani RT-PCR protokol za detekciju fuzionih transkripata koji nastaju kao posledica najčešćih hromozomskih aberacija u ALL i AML

Detekcija najčešćih fuzionih transkripata kod obolelih od ALL i AML je rađena standardizovanom RT-PCR metodom preporučenom od strane EAC-grupe („Europe Against Cancer-group“) (Van Dongen JJM, Leukemia 1999).

RT-PCR protokol se sastoji iz jedne ili dve runde PCR reakcija, u zavisnosti da li se fuzioni transkript detektuje na početku bolesti ili se vrši praćenje minimalne rezidualne bolesti. Osetljivost metode varira u zavisnosti od transkripta i za prvu PCR reakciju („1st round“) iznosi 10^{-2} - 10^{-3} , dok se u drugoj rundi („2nd round“ ili „nested“-PCR) postiže osetljivost od 10^{-4} - 10^{-6} .

Protokol:

<u>Prva runda PCR (finalni volumen 25 µl)</u>	<u>Druga runda PCR (finalni volumen 25 µl)</u>
• 50-100 ng cDNK (5-10% RT smeše) • 1x reakcioni pufer • prajmeri finalne koncentracija 400 nM • dNTP finalne koncentracije 200 µM • MgCl₂ finalne koncentracije 1,5 mM • 2,5 U HotStarTaq polimeraza (Qiagen, Nemačka)	• 1 µl smeše prve runde PCR reakcije • 1x reakcioni pufer • prajmeri finalne koncentracija 400 nM • dNTP finalne koncentracije 200 µM • MgCl₂ finalne koncentracije 1,5 mM • 2,5 U HotStarTaq polimeraza (Qiagen, Nemačka)

Temperaturni profil amplifikacije (za obe runde PCR reakcija)

1. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 35 ciklusa;
 - 30 sec/95°C – denaturacija
 - 1 min/65°C – aniling
 - 1 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 2% agaroznom gelu.

Prajmeri i dužine PCR produkata za pojedine hromozomske aberacije nalaze se u tabeli 6. I 7.

Tabela 6. Najčešće hromozomske aberacije u ALL; prajmeri i dužina PCR produkata.

hromozomska abercija	fuzioni transcript	prajmeri za prvu rundu PCR reakcije	veličina PCR produkta (bp)	prajmeri za drugu rundu PCR reakcije	veličina PCR produkta (bp)
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1	E2A-A 5'-CACCAGCCTCATGCACAAC-3' PBX-B 5'-TCGCAGGAGATTTCATCACG-3'	373 (400) ^a	E2A-C 5'-CACCCTCCTGACCTGTCT-3' PBX-D 5'-GGCTGCTCGTATTCTCC-3'	289 (316) ^a
t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	MLL-A 5'-CCGCCTCAGCCACCTAC-3' AF4-B 5'-TGTCAGTGAAGGTGC-3'	e8-e7 - 184 e8-e4 - 353 e9-e5 - 382 e9-e4 - 427	MLL-C 5'-AGGACCGCAAGAAAAGA-3' AF4-D 5'-CGTTCCTTGCTGAGAAATTTG-3'	e8-e7 - 127 e8-e4 - 296 e9-e5 - 325 e9-e4 - 370 e10-e6 - 370 e10-e5 - 457 e10-e4 - 502 e11-e6 - 484 e11-e5 - 571 e11-e4 - 616
			e10-e6 - 427 e10-e5 - 514 e10-e4 - 559 e11-e6 - 541 e11-e5 - 628 e11-e4 - 673		
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1	TEL-A 5'-TGCACCTCTGATCCTGAAC-3' AML1-B 5'-AACGCCTCGCTCATCTTGC-3'	298 (259) ^b	TEL-C 5'-AAGCCCATCAACCTCTCTCATC-3' AML1-D 5'-TGGAAGGCGCGTGAAGC-3'	181 (142) ^b
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL p190	BCR-e1-A 5'-GACTGCAGCTCCAATGAGAAC-3' ABL-a3-B 5'-GTTTGGGCTTCACACCAATTCC-3'	e1-a2 - 521 e1-a3a - 347	BCR-e1-C 5'-CAGAACTCGCAACAGTCCTTC-3' ABL-a3-D 5'-TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA-3'	e1-a2 - 381 e1-a3a - 207
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL p210	BCR-b1-A 5'-GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC-3' ABL-a3-B 5'-GTTTGGGCTTCACACCAATTCC-3'	b3-a2 - 417 b2-a2 - 342 b3-a3 - 243 b2-a3 - 168	BCR-b2-C 5'-CAGATGCTGACCAACTCGTGT-3' ABL-a3-D 5'-TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA-3'	b3-a2 - 360 b2-a2 - 285 b3-a3 - 186 b2-a3 - 111

^a varijanta sa insercijom od 27 bp; ^b varijanta nastala alternativnom obrado transkripta ili korišćenjem alternativnih tačaka prekida u intronu 2.

Tabela 7. Najčešće hromozomske aberacije u ALL; prajmeri i dužina PCR produkata.

hromozomska abercija	fuzioni transkript	prajmeri za prvu rundu PCR reakcije	veličina PCR	produkta (bp)	prajmeri za drugu rundu PCR reakcije	veličina PCR	produkta (bp)
t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO	AML1-A 5'-CTACCGCAGCCATGAAGAACC-3' ETO-B 5'-AGAGGAAGGCCATTGCTGAA-3'	395	A1-B	AML1-C 5'-ATGACTCTCAGGTTTGTCCGGTCG-3' ETO-D 5'-TGAACCTGGTTCTTGGAGCTCCT-3'	260	A2-B
t(15;17)(q22;q21)	PML-RARA	PML-A1 5'-CAGTGTACGCCTTCTCCATCA-3' PML-A2 5'-CTGCTGGAGGCTGTGGAC-3' RARA-B 5'-GCTTGTAGATGCGGGGTAGA-3'	bcr1 381 bcr2 345 ^a bcr3 —	A1-B	PML-C1 5'-TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG-3' PML-C2 5'-AGCGGAGCTACGAGGAGAT-3' RARA-D 5'-CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT-3'	bcr1 214 bcr2 178 ^a bcr3 —	A2-B
inv(16)(p13;q22)	CBFB-MYH11	CBFB-A 5'-GCAGGCAAGGTATATTGAAGG-3' MYH11-B1 5'-TGAAGCAACTCCTGGGTGTC-3' MYH11-B2 5'-TCCTCTTCTCCTCATTCTGCTC-3'	A-B1	A-B2	CBFB-C 5'-GGGCTGTCTGGAGTTTGATG-3' MYH11-D1 5'-TCCCTGTGACGCTCTCAACT-3' MYH11-D2 5'-CTTGAGCGCCTGCATGTT-3'	A-B1	A-B2
						tip A — tip B — tip C — tip D 155 tip E 362 tip F — tip G 59 tip H 161 tip J —	271 483 664 (991) (1198) 175 (895) (997) 886

^aDužina PCR produkta kod bcr2⁺ pacijenata je varijabilna zbog varijabilne tačke prekida u egzonu 6 PML gena

III - 9. RT-PCR protokol za detekciju NUP98/HOX fuzionog transkripata koji nastaje kao posledica hromozomske translokacije t(11;12)(p15;q13)

Na osnovu citogenetskog nalaza prisustva t(11;12)(p15;q13) kod jednog pacijenta, pretpostavili smo da je došlo do fuzije gela *NUP98* gena na hromozomu 11p15 i nekog iz familije *HOXC* gena lokalizovanog na hromozomu 12q13. Da bi smo odredili koji gen iz *HOXC* genskog klastera učestvuje u ovoj translokaciji primenili smo „nested“ RT-PCR analizu, na totalnoj RNK izolovanoj iz mononuklearnih ćelija pacijenta.

Prva runda PCR reakcije je vršena sa različitim kombinacijama prajmera. „Sense“ prajmer je bio uvek isti, NUP98-F1, dok su „antisense“ prajmeri bili iz različitih *HOXC* genskih klastera (*HOXC10-R*, *HOXC11-R*, *HOXC12-R*, *HOXC13-R*) (Tabela 8.).

Tabela 8. Prajmeri i sekvence korišćeni u detekciji NUP98/*HOXC13* fuzionog transkripta.

prajmer	sekvenca (5'-3')
NUP98-F1	GTG CAC CTT CAT TTG GTA CAA CC
NUP98-F2	ACT ACG ACA GCC ACT TTG GG
NUP98-R	TTTAGCCCTTCACCCACAGGTGG
HOXC10-R	ATG GTC TTG CTA ATC TCC AGG CG
HOXC11-R	ATA CTG CAG CCG GTC TCT GC
HOXC12-R	AGA CGT TGC TCC CTC AGC AGA AGT C
HOXC13-R	AGG TGG AGT GGA GAT GAG GCG C
HOXC13-F	ACA ACG TGA ACC TGC AGC AGA AGC

Protokol:

Prva runda PCR (finalni volumen 25 µl)	Druga runda PCR (finalni volumen 25 µl)
• 50-100 ng cDNK (5-10% RT smeše) • 1x reakcioni pufer • prajmeri finalne koncentracije 800 nM • dNTP finalne koncentracije 400 µM • MgCl₂ finalne koncentracije 1,5 mM • 2,5 U HotStarTaq polimeraza (Qiagen, Nemačka)	• 1,5 µl smeše prve runde PCR reakcije • 1x reakcioni pufer • prajmeri finalne koncentracije 400 nM • dNTP finalne koncentracije 200 µM • MgCl₂ finalne koncentracije 1,5 mM • 2,5 U HotStarTaq polimeraza (Qiagen, Nemačka)

Temperaturni profil za obe runde PCR reakcije

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

Nakon prve runde PCR amplifikacija je detektovana samo u reakciji u kojoj su korišćeni prajmeri NUP98-F1 i HOXC13-R. Primenom „semi nested“ PCR reakcije u kojoj je korišćen isti „antisense“ prajmer (HOXC13-R), ali različit „sense“ prajmer (NUP98-F2) dobijen je produkt dužine 1039 bp. Da bi smo potvrdili postojanje *NUP98/HOXC13* fuzionog transkripta, amplifikovani fragment je direktno sekvenciran prajmerima koji su korišćeni u drugoj rundi PCR amplifikacije.

III - 10. 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 Na₂EDTA), 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 - 11. Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu

Fragменти DNK su razdvajani na nadenaturišućem 8% poliakrilamidnom gelu (Akrilamid: N,N-metilenbisakrilamid (29:1) (30% w/v), 100mM Tris, 83mM borna kiselina, 1mM EDTA pH 8; 0,1% (w/v) amonijumpersulfat, 0,01% (v/v) TEMED). Elektroforeza je tekla pri naponu od 10 V/cm u 1xTBE puferu (100mM Tris, 83 mM borna kiselina, 1mM EDTA pH 8). Po završetku elektroforeze, gelovi su bojeni srebronitratom.

III - 12. Bojenje poliakrilamidnih gelova srebronitratom

Vizuelizacija DNK na poliakrilamidnim gelovima vršena je bojenjem srebronitratom. Poliakrilamidni gelovi su, nakon elektroforeze, najpre fiksirani 30 minuta u rastvoru 10% etanola i 0,5% sirćetne kiseline. Nakon toga, gelovi su bojeni u 0,1% rastvoru srebronitrata 10 minuta. Višak srebra je uklanjnjan ispiranjem najpre u bi-destilovanoj vodi, a zatim u razvijaču, koji je bio sledećeg sastava: 1,5% natrijumhidroksid, 0,01% natrijumborhidrid i 0,048% formaldehid. Gelovi su u razvijaču držani 20 minuta. Fiksiranje dobijenih traka vršeno je potapanjem gelova u 0,75% rastvor natrijumbikarbonata.

III - 13. Izolacija DNK fragmenta iz agaroznog gela

Za izolaciju DNK fragmenta iz agaroznog gela korišćen je QIAquick Gel Extraction Kit. Nakon detekcije FLT3/ITD pozitivnih pacijenata, amplifikovani PCR proizvod je elektroforetski razdvajan na „low-melting“ 4% agaroznom gelu, nakon čega je iz gela isecana gornja, duža FLT3/ITD mutirana traka.

Protokol:

- upotrebom oštrog i čistog skalpela iseći željenu traku iz gela staviti u tubu

- izmeriti težinu isečenog dela gela i dodati 3 volumena QG pufera na 1 volumen gela (100 mg $\approx$ 100 μ l)
- inkubirati 10-15 min na 50°C uz povremeno vorteksovanje, sve dok se gel ne istopi
- dodati 10 μ l 3M Na-acetata pH 5,0 i izmešati
- dodati 1 volumen (težina gela) izopropanola i promešati
- naneti celokupan uzorak na kolonicu i centrifugirati 1 min/13 000 rpm
- dodati 500 μ l QG pufera na kolonicu i centrifugirati 1 min/13 000 rpm
- oprati kolonicu sa 750 μ l PE pufera i centrifugirati 1 min/13 000 rpm
- dodatno centrifugirati 1 min/13 000 rpm
- staviti kolonicu u čistu tubu, naneti 30 μ l EB, ostaviti da stoji 1min, a zatim centrifugirati 1 min/13 000 rpm

Ovako pripremljen uzorak je spreman za sekvenciranje.

III - 14. Kapilarna elektroforeza DNK na „Lab-on-Chip“-u

Za određivanje *ITD/wt* odnosa kod *FLT3/ITD* pozitivnih pacijenata, kao i za određivanje odnosa transkripata *mFAS/sFAS* vršeno je elektroforetsko razdvajanje PCR produkata na aparatu Agilend 2100 bioanalyzer, korišćenjem metoda kapilarne elektroforeze, prema protokolu za DNA 1000 Assay Kit (Agilent Technology).

U prvom koraku pripreman je čip na koji su nanošeni uzorci. Po 9 μ L „Gel-Dye“ miksa nanošeno je u odgovarajuće obeležena ležišta na čipu. Koristeći „Chip Priming Station Gel-Dye“ miks je razliven u kapilare čipa. Na ovako pripremljeni čip, po 5 μ L markera je nanošeno u ležišta namenjena za uzorke i lestvicu. Zatim je 1 μ L lestvice naneto u odgovarajuće obeleženo mesto. Uzorci su nanošeni po 1 μ L. Nakon nanošenja uzoraka, čip je vorteksovan 1 min na 2 400 rpm. Pripremljeni čip je analiziran na Agilend 2100 bioanalyzer-u uz korišćenje 2100 Expert Software.

III - 15. 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 µl sadrži sledeće komponente:

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

Temperaturni profili PCR reakcije za sekvenciranje:

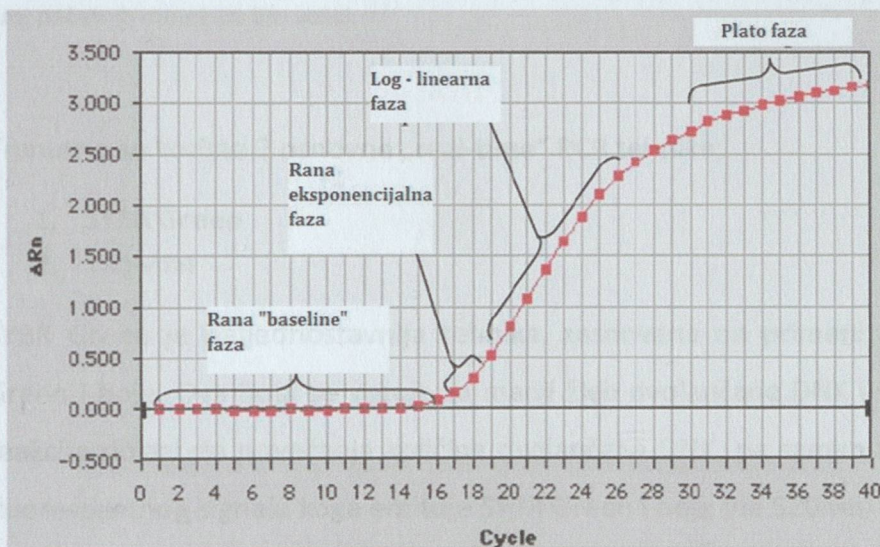
1. 1 min/ 96°C
2. 25 ciklusa;
 - 10 sec/96°C
 - 5 sec/50°C
 - 4 min/60°C
3. 4°C/ ∞

Posle završene reakcije sekvenciranja uzorci su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom. U uzorke se doda 40 µl Na-acetata, promućka se i centrifugira 20 min na 13000 rpm, posle

čega se supernatant uklanja. Talogu se doda 200 μ 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 μ l HiDi i celokupna količina se nanosi na plejt za sekvenciranje.

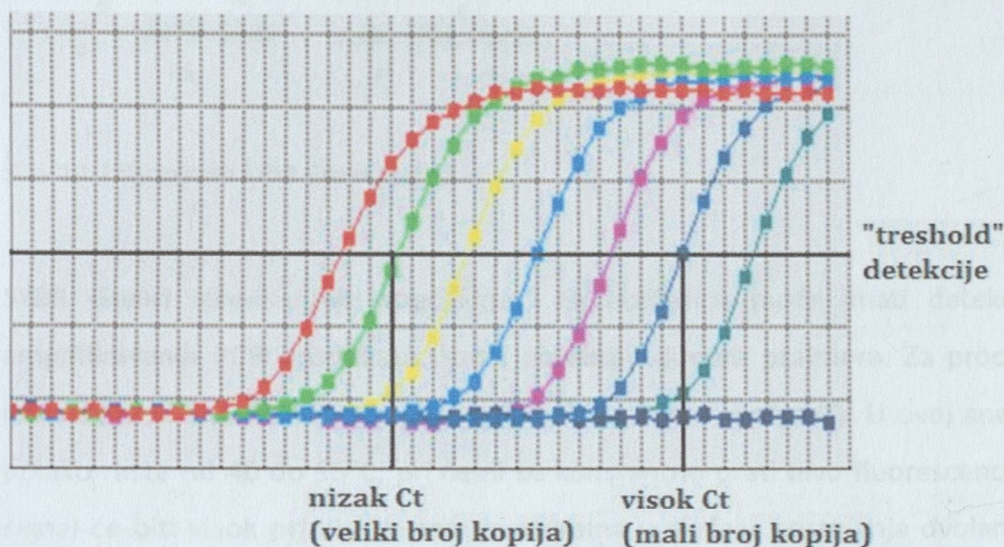
III - 16. Praćenje ekspresije gena pomoću „real-time“ PCR (q-PCR) metode

„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 8.).



Slika 8. Faze PCR amplifikacije. R_n predstavlja vrednost fluorescencije reporterske boje, a ΔR_n predstavlja razliku R_n vrednosti između uzorka i kontrole („no template control“).

U početnim ciklusima intenzitet fluorescencije ne prelazi bazalni nivo („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, Ct je niži, i obratno, Ct je viši u uzorcima sa manjom početnom količinom target sekvence (Slika 9.).



Slika 9. Amplifikacioni plotovi sa različitim početnom količinom target molekula. Niska Ct vrednost znači da je broj početnih molekula bio veliki.

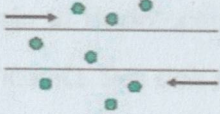
Trenutno se koriste 2 osnovne „real-time“ PCR tehnike;

1. SYBR Green
2. TaqMan

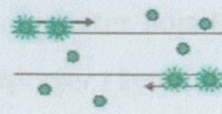
SYBR Green je najjednostavnija tehnika, zasnovana na primeni DNK-interkalirajuće SYBR Green I boje. Ova boja se vezuje za manji žleb dvolančane DNK i sa povećanjem broja PCR reakcije dolazi do povećanja količine dvolančane DNK, pa samim tim dolazi i do povećanja fluorescentnog signala koga emituje SYBR Green I boja (na 520nm) (Slika 10.).

SYBR Green I

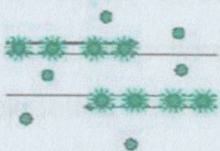
1. aniling



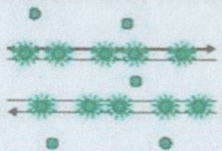
2. Ekstenzija (I)



3. Ekstenzija (II)

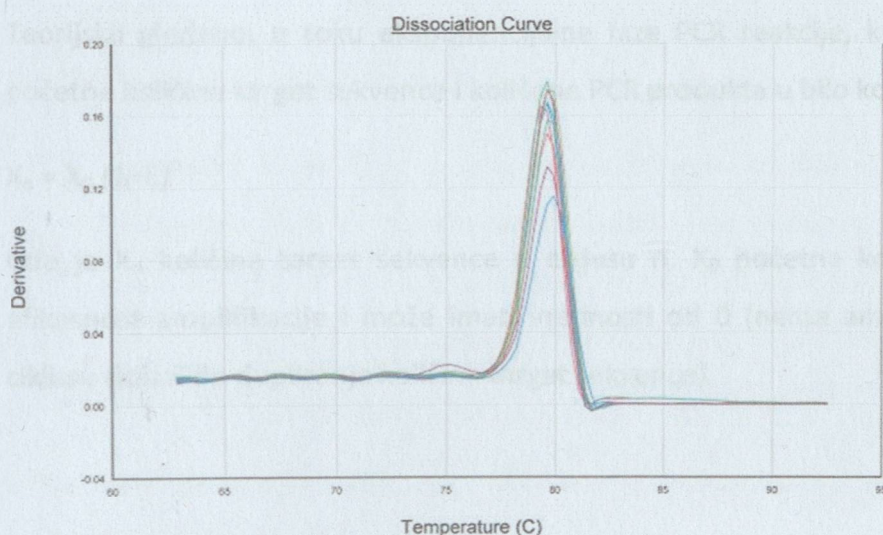


4. Kraj PCR ciklusa



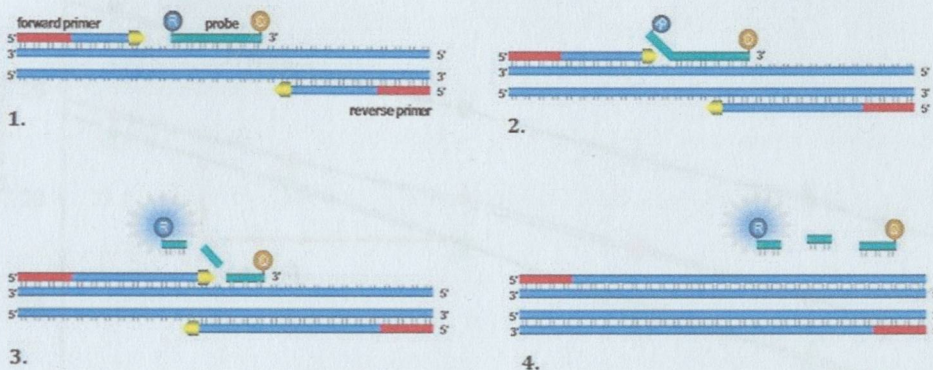
Slika 10. Princip rada SYBR Green I tehnike.

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 nalaiza 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 11.).



Slika 11. Kriva topljenja specifičnog PCR produkta.

TaqMan tehnika koristi 5'→3'egzonukleaznu aktivnost Taq polimeraze za specifičnu detekciju PCR produkata. TaqMan proba je dvostuko pbeležena 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 (Slika 12.). U toku svakog novog ciklusa PCR reakcije, fluorescencija će rasti kao posledica akumulacije „slobodnih“ reportera.



Slika 12. Princip rada TaqMan tehnike; 1. TaqMan proba i prajmeri se vezuju za target sekvencu i ekstenzija započinje, 2. Kada Taq polimeraza stigne do probe, njena 5'→3'egzonukleazna aktivnost uklanja probu, 3. započinje "seckanje" probe i emitovanje fluorescencije, 4. završetak polimerizacije.

Teorijskii gledano, u toku eksponencijalne faze PCR reakcije, kvantitativni odnos između početne količine target sekvence i količone PCR produkta u bilo kom ciklusu je;

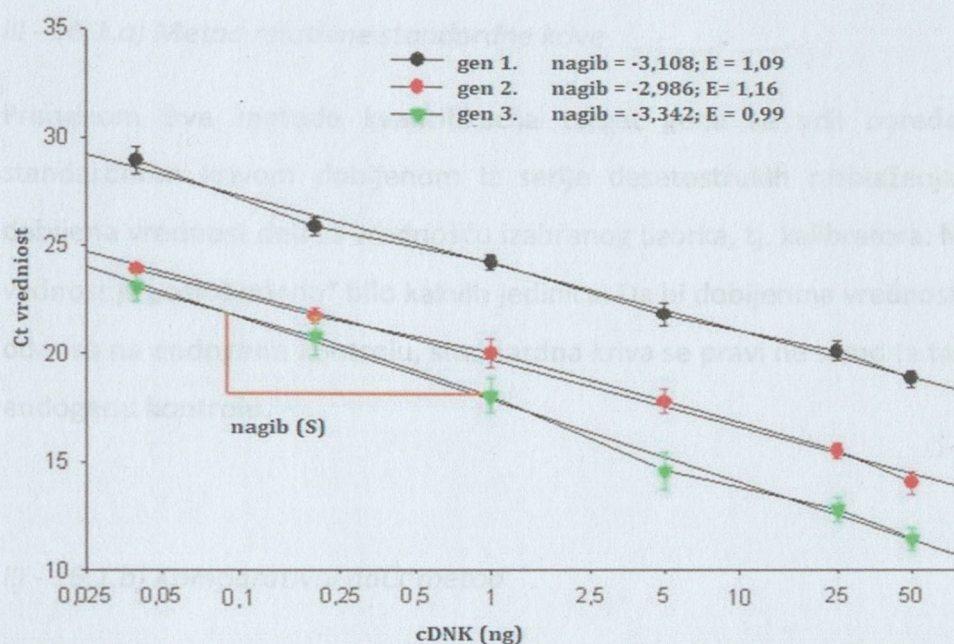
$$X_n = X_0 (1+E)^n$$

Gde je X_n količina target sekvence u ciklusu n , X_0 početna količina sekvence, dok je E efikasnost amplifikacije i može imati vrednosti od 0 (nema amplifikacije) do 1 (u svakom ciklusu dolazi do dupliranja količine target sekvence).

Efikasnost reakcije je veoma važna za odabir metode kvantifikacije qPCR podataka i ona se izračunava iz nagiba (S) standardne krive (Slika 13.);

$$E = 10^{-1/S} - 1$$

Standardna kriva se pravi analiziranjem desetostrukih razblaženja početne količine cDNK (RNK ili DNK).



Slika 13. Određivanje efikasnosti PCR reakcije metodom standardne krive.

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 stabilana u svim uzorcima koji se kvantifikuju, odnosno čija se ekspresija ne menja prilikom eksperimentalnih tretmana.

III - 16.1. Relativna kvantifikacija

III - 16.1.a) Metod relativne standardne krive

Primenom ove metode kvantifikacija target gena se vrši poređenjem sa relativnom standardnom krivom dobijenom iz serije desetostrukih razblaženja uzorka, a zatim se dobijena vrednost deli sa vrednošću izabranog uzorka, tj. kalibratora. Na ovaj način dobijena vrednost je „oslobođena“ bilo kakvih jedinica. Da bi dobijena vrednost bila normalizovana u odnosu na endogenu kontrolu, standardna kriva se pravi ne samo ta target sekvencu već i za endogenu kontrolu.

III - 16.1.b) 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 - 16.2. Određivanje ekspresije FLT3, BCL2, BAX i BCL2L12 gena komparativnim ddCt metodom

Ekspresija *FLT3*, *BCL2*, *BAX* i *BCL2L12* gena je praćena primenom „real-time“ PCR metode na 7500 Real-time PCR aparatu (Applied Biosystems), upotrebom SYBR Green hemije. Kao endogena kontrola korišćen je *ABL* gen, osim u slučaju *BCL2L12* gena, gde je za normalizaciju korišćen *GAPDH* gen. Svi prajmeri kao i njihove sekvence su navedeni u tabeli 9.

Tabela 9. Sekvence prajmera za „real-time“ PCR kvantifikaciju gena za FLT3, BAX, BCL2, BCL2L12, ABL i GAPDH.

Prajmer	sekvenca (5'-3')
FLT3 - F	AGC ATC CCA GTC AAT CAG
FLT3 - R	CTG GCT GGT GCT TAT GA
BCL2 - F	TCG CCC TGT GGA TGA CTG A
BCL2 - R	CAG AGA CAG CCA GGA GAA ATC
BAX - F	TGG CAG CTG ACA TGT TTT CTG AC
BAX - R	TCA CCC AAC CAC CCT GGT CTT
BCL2L12 - F	CCC TCG GCC TTG CTC TCT
BCL2L12 - R	GGG CCA CCA AAG CAT AGA AG
GAPDH - F	ATG GGG AAG GTG AAG GTC G
GAPDH - R	GGG TCA TTG ATG GCA ACA ATA TC
ABL - F	TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC T AA AGG T
ABL - R	GAR GTA GTT GCT TGG GAC CCA

Finalni volumen PCR reakcije je bio 10 µl sledećeg sastava;

ABL, FLT3	BCL2, BAX, BCL2L12, GAPDH
• 50 ng cDNK • 1x Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), • Prajmeri finalne koncentracije 200 nM	• 50 ng cDNK • 1x Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), • Prajmeri finalne koncentracije 50 nM

Termperaturni profil za sve PCR reakcije je bio;

1. 2 min/50°C
2. 10 min/95°C
3. 40 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;

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

U slučaju BCL2L12 gena kao kalibrator je korišćena HL60 ćelijska linija.

III - 16.3. Određivanje ekspresije FAS receptor (FAS) i FAS-ligand (FAS-L) gena primenom metode relativne standardne krive

Ekspresija FAS i FAS-L gena je praćena primenom „real-time“ PCR metode na 7500 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 10.

Tabela 10. Sekvence prajmera I PROBA za „real-time“ PCR kvantifikaciju gena za FAS, FAS-L i ABL.

prajmeri	sekvenca (5'-3')
FAS - F	TGA AGG ACA TGG CTT AGA AGT G
FAS - R	GGT GCA AGG GTC ACA GTG TT
FAS-L - F	GCA GCC CTT CAA TTA CCC AT
FAS-L - R	CAG AGG TTG GAC AGG GAA GAA
ABL - F	TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC T AA AGG T
ABL - R	GAR GTA GTT GCT TGG GAC CCA
probe	sekvenca (5'-3')
FAS - P	(FAM) – AAA CTG CAC CCG GAC CCA GAA TAC C – (TAMRA)
FAS-L - P	(FAM) – TCC CCA GAT CTA CTG GGT GGA CAG C – (TAMRA)
ABL - P	(FAM) – CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T – (TAMRA)

Finalni volumen PCR reakcije je bio 10 µl sledećeg sastava;

ABL	FAS, FAS-L
• 50 ng cDNK • 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), • prajmeri finalne koncentracije 300 nM • proba finalne koncentracije 200 nM	• 50 ng cDNK • 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), • prajmeri finalne koncentracije 400 nM • proba finalne koncentracije 300 nM

Termperaturni profil za sve PCRreakcije je bio;

4. 2 min/50°C
5. 10 min/95°C
6. 50 ciklusa;
 - 15 sec/95°C
 - 1 min/60°C

Obrada rezultata je izvršena primenom metode relativne standardne krive. Odlučili smo se za ovu metodu nakon izračunavanja efikasnosti PCR reakcija za pojedinačne gene i saznanja da su efikasnosti PCR reakcija za *FAS*, *FAS-L* i *ABL* bile različite. Vrednosti efikasnosti reakcije su iznosile; 86,9% za *FAS-L*, 91,7% za *FAS* i 100% za *ABL* gen. Kako je za pravilnu primenu ddCt metoda neophodno da efikasnosti target gena i endogene kontrole budu iste, odlučili smo se za primenu metode relativne standardne krive koja ne podrazumeva jednakost u efikasnosti PCR reakcije gena koji se međusobno porede (User bulletin #2, Applied Biosystems).

Upotrebom serije desetostrukih razblaženja početnog uzorka, za svaki od analiziranih gena konstruisana je relativna standardna kriva, a interpolacijom nepoznatih uzoraka na standardnu krivu target gena i endogene kontrole, dobijene su relativne količine uzorka u ng. Nakon toga se vrši normalizacija vrednosti target gena za nepoznati uzorak i za uzorak koji će nam koristiti kao kalibrator. Npr. za *FAS* kao target gen;

Normalizovani *FAS* (nepoznati uzorak) = $FAS/ABL = 14 \text{ ng}/0,5 \text{ ng} = 28$

Normalizovani *FAS* (kalibrator) = $FAS/ABL = 2 \text{ ng}/5 \text{ ng} = 0,4$

Normalizovana vrednost ciljnog gena (*FAS*) u nepoznatom uzorku se na kraju podeli sa normalizovanom vrednosti *FAS* za kalibrator, kako bi se dobla relativna količina („fold-difference“) target gena u nepoznetom uzorku u odnosu na kalibrator.

$$Q = \text{Normalizovani } FAS (\text{nepozneti uzorak}) / \text{Normalizovani } FAS (\text{kalibrator}) = 28/0,4 = 70$$

U našem istraživanju kao kalibrator je korišćena medijana normalizovanih vrednosti zdravih kontrola.

III - 17. 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 (mnimum, 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

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 ispitanim grupama.

Za identifikaciju faktora rizika korišćen je univarijantni i multivarijantni Cox-ov proporcionalni regresioni model.

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 16.0.

IV - REZULTATI

Leukemije su heterogena grupa hematoloških maligniteta. Do danas, nijedna od postojećih klasifikacija ove grupe bolesti nije zadovoljavajuća, jer ne omogućava da jedan tip leukemija bude lečen specifičnim lekovima usmerenim na konkretan uzrok bolesti.

Potvrđeno je da dosadašnja klasifikacija leukemija bazirana na hemato-morfološkim parametrima (FAB i dr.) i citogenetskim karakteristikama leukemične ćelije, nije dovoljno precizna. Upravo iz ovih razloga savremena hematologija je usmerila svoja istraživanja ka izučavanju molekularno-genetičkih markera. Na ovaj način smo se približili razumevanju molekularne osnove bolesti. Samim tim, omogućeno je da osnovni uzročnici bolesti, postanu legitimni targeti za specifičnu, kauzalnu terapiju, usmerenu na promenu koja dovodi do malignog preobražaja matične ćelije hematopoeze.

Savremena hematološka istraživanja leukemija su bazirana na 3 osnovna aspekta:

1. Potraga za novim molekularno-genetičkim markerima značajnim za nastanak, tok, prognozu i ishod bolesti.
2. Testiranje kandidata za molekularno-genetičke markere leukemija na što većem broju pacijenata, sa posebnim akcentom na moguće etničke i rasne specifičnosti.
3. Praćenje udruženog delovanja različitih molekularno-genetičkih markera u što većem broju pacijenata, u cilju formiranja tačne klasifikacije leukemija. Naime, hipoteza o neophodnosti bar dva mutaciona događaja za pojavu leukemije („2 hit“ hipoteza), svakodnevno nalazi potvrdu u praksi.

Naša istraživanja su uzimala u obzir sva tri aspekta:

1. Okarakterisana je nova translokacija t(11;12)(p15;q13), koja za posledicu ima formiranje aberantnog transkripcionog faktora *NUP98/HOXC13*, što narušava procese diferencijacije leukemijske ćelije. Ispitivana je ekspresija gena *FLT3* i *BCL2L12* u nastojanju da se utvrdi njihov potencijal kao novih molekularno-genetičkih markera u AML.

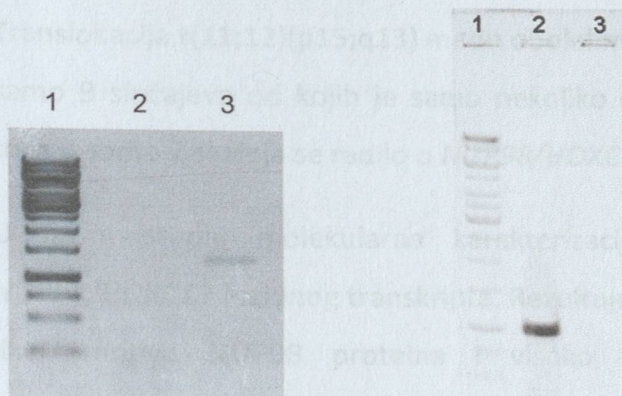
2. Testirani su već priznati molekularno-genetički markeri (translokacije, *FLT3* mutacije, dužina *ITD* i odnos *ITD/wt* kod *FLT3/ITD*⁺ pacijenata, mutacije u *NPM1* genu) kod pacijenata u Srbiji.
3. Praćeno je udruženo delovanje različitih molekularno-genetičkih markera koji narušavaju proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu leukemijskih ćelija; udruženost mutacija u genima *FLT3* i *NPM1*, ekspresija gena vezanih za procese apoptoze (*BCL2*, *BAX*, *FAS*, *FAS-L*) kao i njihova međusobna povezanost i povezanost sa drugim molekularno-genetičkim markerima, a sve u pokušaju da se uspostavi kriterijum za novu klasifikaciju leukemija.

III - 1. Detekcija i molekularna karakterizacija t(11;12)(p15;q13)

Kod jednog AML pacijenata citogenetskom analizom je utvrđeno prisustvo veoma retke translokacije t(11;12)(p15;q13). Na osnovu ovog nalaza smo pretpostavili da je došlo do fuzije dela *NPM98* gena sa hromozoma 11p15 i *HOXC* gena iz klase I HOX genske familije, lokalizovanog na hromozomu 12q13.

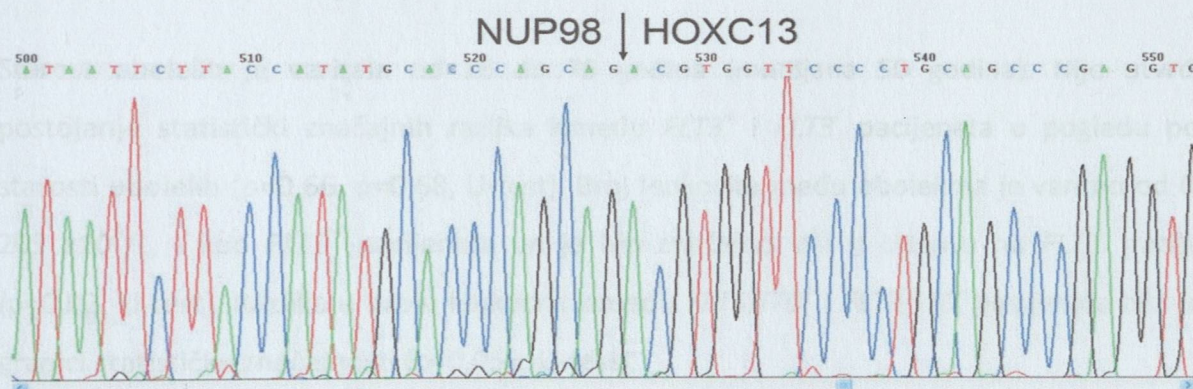
NUP98 gen kodira protein od 98 kDa koji predstavlja komponentu kompleksa nukleusne pore („nuclear pore complex“), i učestvuje u transportu *RNK* između nukleusa i citoplazme. Do danas je detektovano više desetina različitih translokacija koje za posledicu imaju fuziju *NUP98* gena sa različitim partnerskim genima, a najčešće su u pitanju geni iz HOX familije transkripcionih faktora.

Da bi smo definisali koji je gen iz HOXC genskog klastera uključen u ovu translokaciju, primenjena je „semi-nested“ RT-PCR analiza. U prvoj rundi RT-PCR je urađeno više reakcija u kojima je korišćen isti *NUP98* „sense“ prajmer, i više različitih HOXC „antisense“ prajmera koji su locirani u različitim genskim klasterima *HOXC* gena; *HOXC10*, *HOXC11*, *HOXC12* i *HOXC13*. PCR produkt je dobijen samo u reakciji u kojoj je korišćen *HOXC13* prajmer (Slika 14. Levo). Nakon „semi-nested“ PCR reakcije dobijen je produkt dužine 1039 bp (Slika 14. Desno).



Slika 14. RT-PCR analiza NUP98/HOXC13 fuzije. Levo: 1-DNK marker 1kb (Fermentas), 2-negativna kontrola, 3-produkt prve runde PCR reakcije; Desno: 1-DNK marker 1kb (Fermentas), 2-produkt druge runde PCR reakcije, 3-negativna kontrola.

Prisustvo *NUP98/HOXC13* fuzionog transkripta je potvrđeno reakcijom direktnog sekvenciranja PCR produkta „semi-nested“ reakcije (Slika 15.). Potvrđeno je da je došlo do „in-frame“ fuzije nukleotida 2290 u egzonu 16 *NUP98* gena (GenBank U41815) sa nukleotidom 852 u egzonu 2 *HOXC13* gena (GenBank NM_017410).



Slika 15. Hromatogram dela sekvence NUP98/HOXC13 fuzionog transkripta. Strelica ukazuje na mesto fuzije NUP98 i HOXC13 gena.

RT-PCR analizom nije utvrđeno postojanje recipročnog *HOXC13/NUP98* fuzionog transkripta.

Translokacija *t(11;12)(p15;q13)* među obolelima od AML je veoma retka; do danas je opisano samo 9 slučajeva od kojih je samo nekoliko okarakterisano na molekularnom nivou, a od toga u samo 2 slučaja se radilo o *NUP98/HOXC13* fuziji.

U našoj studiji molekularna karakterizacija *t(11;12)(p15;q13)* je otkrila postojanje *NUP98/HOXC13* fuzionog transkripta. Rezultujući fuzioni protein sadrži FG ponovke i „GLEBS-like“ motive *NUP98* proteina i visoko konzervisane homeoboks motive *HOXC13* transkripcionog faktora.

III - 2. Detekcija FLT3 i NPM1 mutacija kod adultne AML

III - 2.1. Detekcija FLT3 mutacija

Na prisustvo *FLT3* mutacija analizirano je ukupno 92 adultna pacijenta obolelih od *de novo* AML. *FLT3/ITD* mutacija je nađena u 16 (17,4%) slučajeva, dok je *FLT3/D835* mutacija bila prisutna u 7 (7,6%) slučajeva (Tabela 11.).

Starost obolelih je varirala od 16 do 75 godina (medijana 50 godina). Nije utvrđeno postojanje statistički značajnih razlika između *FLT3*⁺ i *FLT3*⁻ pacijenata u pogledu pola i starosti obolelih ($p=0,66$, $p=0,68$, U-test). Broj leukocita među obolelima je varirao od $0,6 - 203 \times 10^9/L$, i kod *FLT3*⁺ pacijenata on je bio značajno viši u odnosu na *FLT3*⁻ pacijente ($p=0,02$, U-test). Razlika u broju leukocita između *FLT3/ITD*⁺ i *FLT3/ITD*⁻ pacijenata bila je na granici statističke značajnosti ($p=0,058$, U-test).

Ispitivanjem povezanosti prisustva *FLT3/ITD* mutacije sa ostalim kliničkim karakteristikama obolelih, značajna razlika između *FLT3/ITD*⁺ i *FLT3/ITD*⁻ pacijenata primećena je samo u odnosu na detektovan procenat blasta u perifernoj krvi ($p=0,032$, U-test). Statistički značajne razlike nije bilo u pogledu procenta blasta u koštanoj srži, broja trombocita ($p=0,59$; $p=0,15$,

U-test), kao ni u pogledu prisustva hemoragijskog sindroma, splenomegalije i hepatomegalije ($p=0,6$; $p=0,7$; $p=0,9$, Hi-kvadrat test).

Ispitivanjem povezanosti *FLT3/ITD* mutacija i ekspresije mijeloidnih markera na površini ćelije, statistička značajnost je nađena samo u slučaju ekspresije CD34 markera ($p=0,03$, Hi-kvadrat test). Prisustvo *FLT3/ITD* mutacije je povezano sa CD34⁺ statusom.

Pacijenti su na osnovu FAB kriterijuma (Bennet JM, 1985) klasifikovani u pojedinačne grupe. Najviša učestalost *FLT3/ITD* mutacije primećena je kod M5 grupe 3/8(37,5%), M0 2/6(33,3%) i M4 grupe 4/20(20%). Najviša učestalost *FLT3/D835* mutacije je primećena kod M4 grupe 3/20(15%) (Tabela 11. i 12.).

Tabela 11. FLT3 i NPM1 mutacioni status i kliničke karakteristike obolelih od AML.

	FLT3/ITD ⁺	FLT3/D835 ⁺	FLT3 ⁻	NPM1 ⁺	NPM1 ⁻	FLT3 ⁻ / NPM1 ⁻
broj pacijenata(%)	16(17,4)	7(7,6)	69(75)	17(18,5)	75(18,5)	61(66,3)
pol (muki/ženski)	10/6	4/3	39/30	11/6	42/33	34/27
Starost	48(20-63)	50(39-59)	50(16-75)	53(20-69)	48,5(16-75)	46,5(16-75)
FAB						
M0	2		4		6	4
M1	2		10	6	6	6
M2	3	3	23	3	26	23
M3	1	1	8	1	9	8
M4	4	3	13	2	18	12
M5	3		5	5	3	2
M6			2		2	2
bifenotipska			4		5	4
Broj leukocita (medijana)	33,0	100,0	13,0	21,6	13,4	12,0
prognostička grupa						
povoljna	1	3	15	2	17	15
intermedijerna	13	3	35	12	39	30
nepovoljna	1		12		13	12

Od ukupno 92 pacijenta, rezultati analize kariotipa bili su dostupni za 83 pacijenata. Translokacija t(15;17) je bila prisutna kod 10 pacijenata, t(8;21) je nađena kod 2, a inv16 je nađena kod 6 pacijenata. Kod 3 pacijenta utvrđeno je prisustvo t(9;22) koja je retka kod obolelih od AML, osim u slučaju bifenotipske leukemije (Tabela 12.). Najbrojniji su bili pacijenti sa normalnim kariotipom (44 pacijenta), dok su pacijenti sa različitim numeričkim i strukturnim promenama hromozoma smešteni u grupu „ostali“ (18 pacijenata).

Tabela 11. Zastupljenost FLT3 i NPM1 mutacija prema FAB podtipovima i citogenetskom nalazu.

FAB grupa	broj pacijenata	citogenetika	FLT3/ITD ⁺	FLT3/D835 ⁺	NPM1 ⁺
M0	6				
	4	normalan kariotip	1		
	2	neuspela	1		
M1	12				
	9	normalan kariotip	2		5
	1	t(9;22)			
M2	2	neuspela			1
	29				
	17	normalan kariotip	2	2	3
M3	8	ostalo	1		
	2	t(8;21)			
	1	t(9;22)			
	1	neuspela		1	
	10				
M4	10	t(15;17)	1	1	1
	20				
	8	ostalo	1		
M5	6	inv16		2	1
	5	normalan kariotip	3	1	
	1	neuspela			1
	8				
M6	5	normalan kariotip	3		5
	2	neuspela			1
	1	ostalo			
bifenotipska	2				
	1	normalan kariotip			
	1	neuspela			
bifenotipska	5				
	3	normalan kariotip	1		
	1	t(9;22)			
	1	ostalo			

Pacijenti su na osnovu citogenetskog nalaza podeljeni u 3 prognostičke grupe;

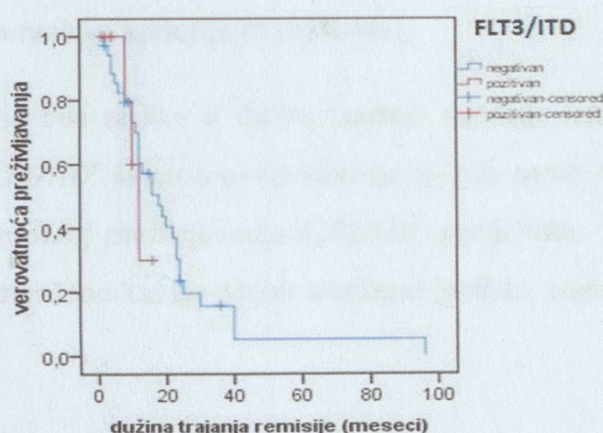
1. Povoljnu – t(15;17), t(8;21), inv16
2. Nepovoljnu – (-5), (-7), del(5q), kompleksan kariotip
3. Intermedijernu – normalan kariotip, +8, +21, del(7q) itd.

Intermedijerna grupa je većim delom sačinjena od pacijenata sa normalnim kariotipom, 44 pacijenta, a 7 pacijenata je imalo aberantni kariotip. U povoljnoj prognostičkoj grupi nalazilo se 18 pacijenata, i to 10 pacijenata sa t(15/17), 6 pacijenata sa inv16 i dva pacijenta sa t(8;21), a u grupi nepovoljne prognoze bilo je 13 pacijenata.

Učestalost *FLT3/ITD* mutacija je bila najveća kod intermedijerne grupe pacijenata, 13 od 38 (25,5%), dok je u drugim prognostičkim grupama učestalost bila mnogo manja.

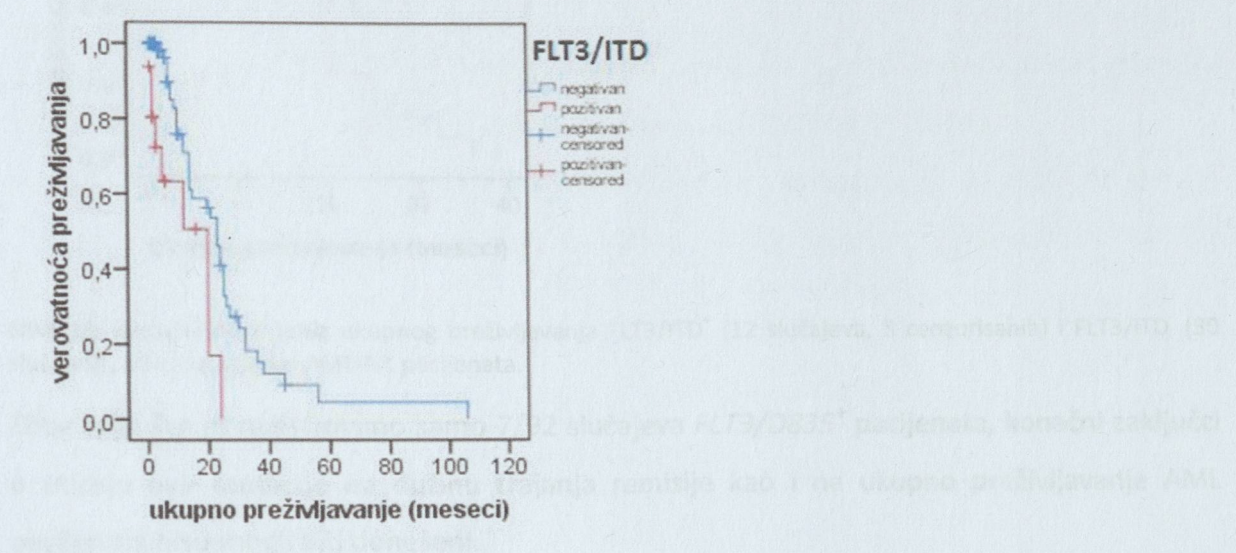
Kompletna remisija bolesti je postignuta kod 10/23 *FLT3*⁺ pacijenta. Stopa postizanja kompletne remisije bila je značajno niža od one kod *FLT3*⁻ pacijenata ($p=0,04$, Hi-kvadrat test).

Medijana dužine trajanja remisije kod celokupne grupe pacijenata je iznosila 12 meseci, dok je kod *FLT3/ITD*⁺ ona iznosila 10 meseci. Nije pronađena statistički značajna razlika između *FLT3/ITD*⁺ i *FLT3/ITD*⁻ u pogledu dužine trajanja remisije ($p=0,56$, Log-rank) (Slika 16.).



Slika 16. Kaplan-Mejer kriva dužine trajanja remisije *FLT3/ITD*⁺ (7 slučajeva, 4 cenzurisana) i *FLT3/ITD*⁻ (36 slučajeva, 7 cenzurisanih) pacijenata.

Medijana ukupnog preživljavanja kod *FLT3/ITD*⁺ pacijenata iznosila je 4 meseca, što je znatno niže od *FLT3/ITD*⁻ pacijenata gde je ona iznosila 10 meseci. Kaplan-Majer analizom ukupnog preživljavanja između ove dve grupe pacijenata pokazana je statistički značajna razlika (p=0,004, Log-rank) (Slika 17.).

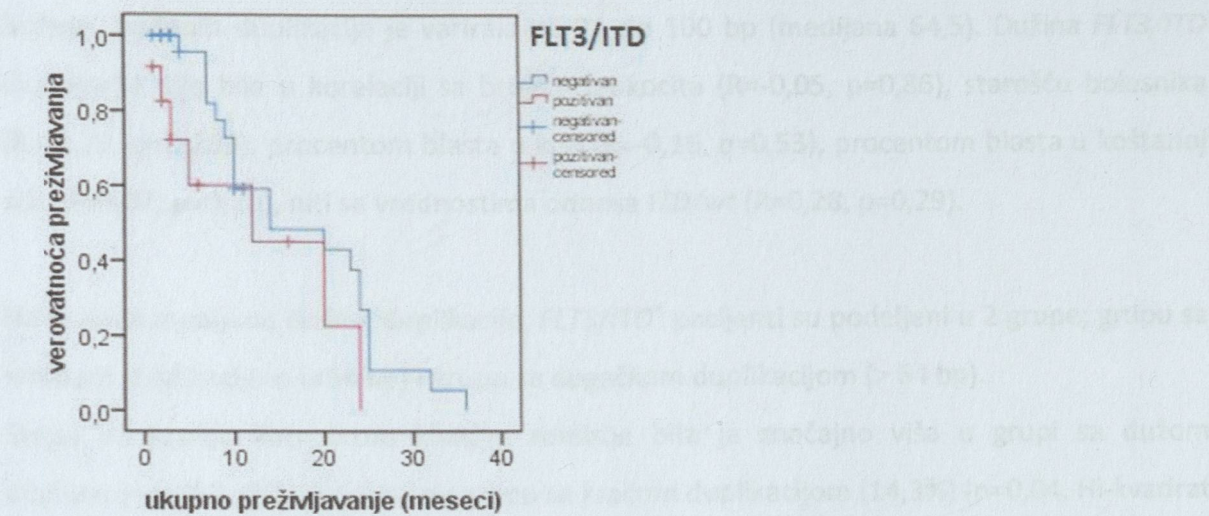


Slika 17. Kaplan-Majer kriva ukupnog preživljavanja *FLT3/ITD*⁺ (16 slučajeva, 7 cenzurisanih) i *FLT3/ITD*⁻ (71 slučaj, 33 cenzurisana) pacijenata.

Od ukupno 16 *FLT3/ITD*⁺ pacijenata, njih 12 su imali normalan kariotip, pa smo se zato odlučili da posebno analiziramo uticaj *FLT3/ITD* mutacije u grupi AML pacijenata sa normalnim kariotipom (AML-NK).

Nije bilo razlike u dužini trajanja remisije između *FLT3/ITD*⁺ i *FLT3/ITD*⁻ pacijenata. Kod *FLT3/ITD*⁺ ukupno preživljavanje je bilo samo 4 meseca (medijana), što je znatno niže od ukupnog preživljavanja *FLT3/ITD*⁻ pacijenata, 10 meseci (medijana). Ovo, međutim, nije potvrđeno Kaplan-Mejer analizom (p=0,11, Log-rank) (Slika 18.).

17 bp	0,52	11	100 bp	0,15
27 bp	0,7	12	141 bp	0,25
34 bp	0,35	13	78 bp	1,2
45 bp	0,23	14	84 bp	0,82
53 bp	0,32	15	90 bp	0,55
63 bp	0,1	16	62 bp	0,41



Slika 18. Kaplan-Majer kriva ukupnog preživljavanja FLT3/ITD⁺ (12 slučajeva, 5 cenzurisanih) i FLT3/ITD⁻ (30 slučajeva, 10 cenzurisana) AML-NK pacijenata.

Zbog toga što je registrovano samo 7/92 slučajeva FLT3/D835⁺ pacijenata, konačni zaključci o uticaju ove mutacije na dužinu trajanja remisije kao i na ukupno preživljavanje AML pacijenata nisu mogli biti donešeni.

III - 2.1.a) Dužina FLT3/ITD duplikacije i odnos ITD/wt

Dužina prisutne duplikacije je utvrđena primenom tehnike sekcenciranja u svih 16 FLT3/ITD⁺ pacijenata (Tabela 13.).

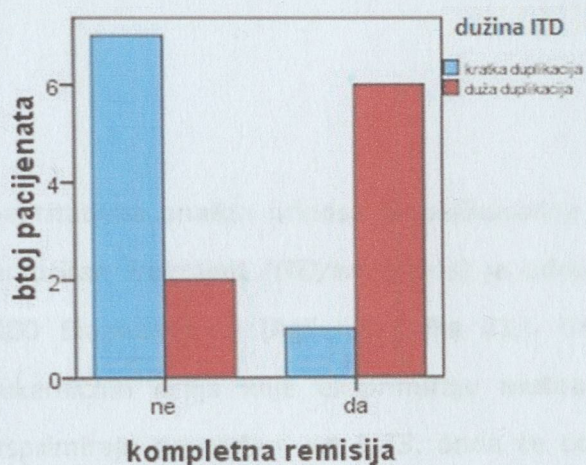
Tabela 13. FLT3/ITD⁺ AML pacijenti; dužina duplikacije i odnos ITD/wt

Redni broj pacijenta	veličina duplikacije	odnos ITD/wt	redni broj pacijenta	veličina duplikacije	odnos ITD/wt
1.	81 bp	0,52	9.	82 bp	0,42
2.	24 bp	0,77	10.	84 bp	8,6
3.	37 bp	0,52	11.	100 bp	0,15
4.	67 bp	0,1	12.	24 bp	0,28
5.	34 bp	0,35	13.	78 bp	1,3
6.	69 bp	0,22	14.	84 bp	0,81
7.	33 bp	0,32	15.	60 bp	0,55
8.	24 bp	0,1	16.	62 bp	0,41

Dužina nađenih duplikacija je varirala od 24 do 100 bp (medijana 64,5). Dužina *FLT3/ITD* duplikacije nije bila u korelaciji sa brojem leukocita ($R=-0,05$, $p=0,86$), starošću bolesnika ($R=-0,29$, $p=0,269$), procentom blasta u krvi ($R=-0,16$, $p=0,53$), procentom blasta u koštanoj srži ($R=0,07$, $p=0,78$), niti sa vrednostima odnosa *ITD/wt* ($R=0,28$, $p=0,29$).

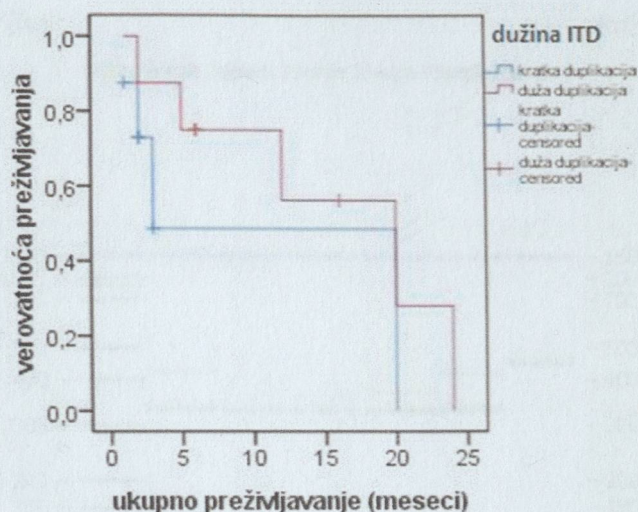
Na osnovu medijane dužine duplikacije, *FLT3/ITD*⁺ pacijenti su podeljeni u 2 grupe; grupu sa kratkom duplikacijom (<64 bp) i grupu sa dugačkom duplikacijom (> 64 bp).

Stopa postizanja kompletne kliničke remisije bila je značajno viša u grupi sa dužom duplikacijom (87,5%) u odnosu na grupu sa kraćom duplikacijom (14,3%) ($p=0,04$, Hi-kvadrat test) (Slika 19.).



Slika 19. Grafički prikaz raspodele *FLT3/ITD*⁺ pacijenata koji su jesu/nisu postigli kompletnu remisiju u odnosu na dužinu duplikacije.

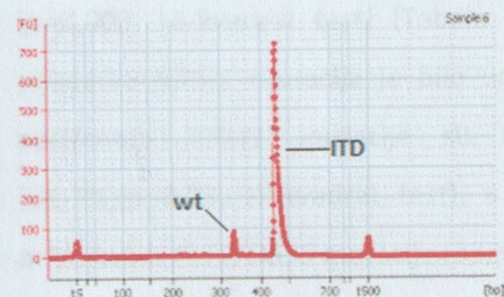
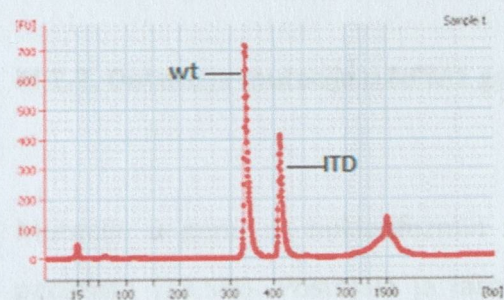
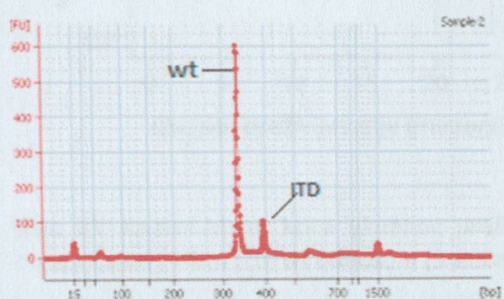
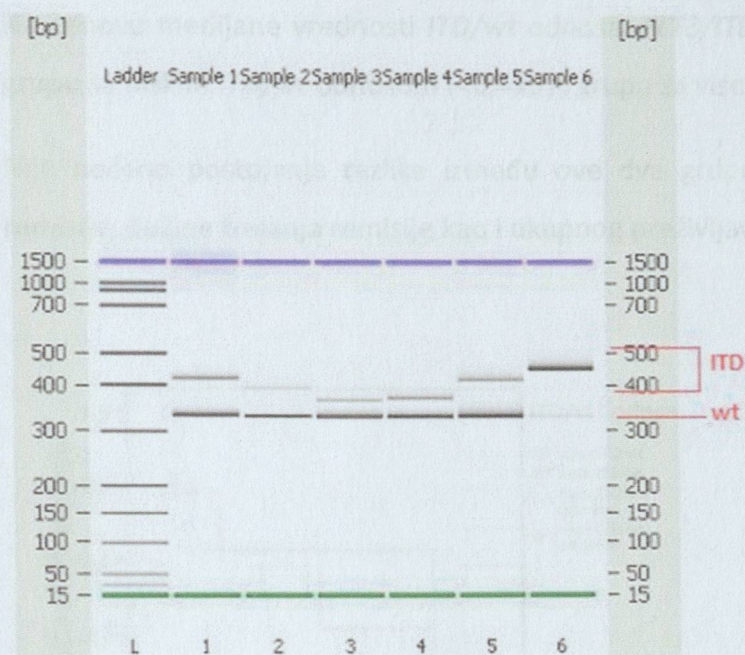
Univarijantnom Kaplan-Mejer analizom nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između grupa pacijenata sa dužom i sa kraćom *FLT3/ITD* duplikacijom u dužini trajanja remisije ($p=0,35$, Log-rank) i ukupnom preživljavanju pacijenata ($p=0,25$, Log-rank) (Slika 20.).



Slika 20. Kaplan-Meier kriva ukupnog preživljavanja pacijenata sa dužom FLT3/ITD duplikacijom (8 slučajeva, 3 cenzurisana) i kraćom FLT3/ITD duplikacijom (8 slučajeva, 4 cenzurisana).

Kvantitativna analiza odnosa amplifikovanog *ITD* mutiranog fragmenta u odnosu na *wt*, nemutiran fragment (*ITD/wt* odnos) je određen primenom „lab-on-chip“ tehnologije na 2100 Bioanalyze-ru (Agilent) (Slika 21.). Ukoliko je u posmatranom uzorku procenat leukemičnih ćelija koje ekspiriraju mutirani *FLT3/ITD* manji od procenta ćelija koje ekspiriraju normalan, *wt FLT3*, onda će odnos *ITD/wt* imati vrednost <1 , a ako je taj procenat *FLT3/ITD* mutiranih ćelija jednak ili veći od procenta *FLT3 wt* ćelija onda će odnos *ITD/wt* imati vrednosti ≥ 1 .

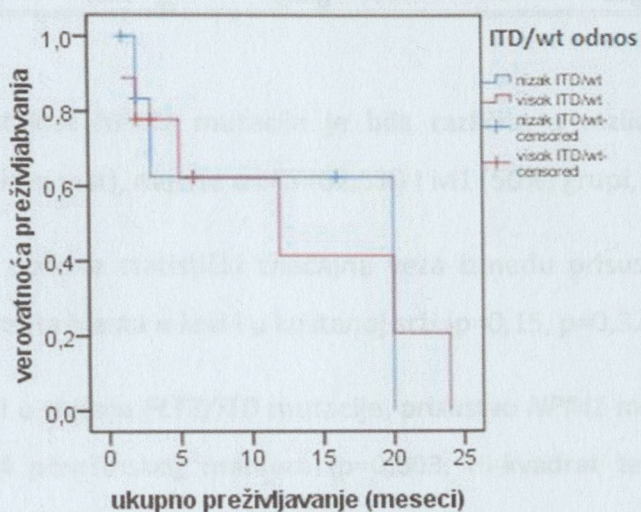
Vrednost *ITD/wt* odnosa među našim AML pacijentima je varirala od 0,1 do 8,6, sa medijanom vrednosti od 0,41. Nije utvrđeno postojanje značajne korelacije između utvrđene vrednosti *ITD/wt* odnosa i drugih kliničkih karakteristika kao što su; broj leukocita ($R=-0,13$, $p=0,62$), procenat blasta u krvi ($R=0,05$, $p=0,85$) i procenat blasta u koštanoj srži ($R=0,35$, $p=0,17$).



Slika 21. Kapilarna elektroforeza PCR produkta pacijenata pozitivnih za FLT3/ITD mutaciju. Elektroforetogrami pacijenta sa niskim ITD/wt odnosom (uzorak 2), sa ITD/wt odnosom ≈ 1 (uzorak 1) i sa visokim ITD/wt odnosom (uzorak 6).

Na osnovu medijane vrednosti ITD/wt odnosa, $FLT3/ITD^+$ pacijenti su podeljeni u 2 grupe; grupu sa niskim ITD/wt odnosom ($<0,415$) i grupu sa visokim odnosom ($>0,415$).

Nije uočeno postojanje razlike između ove dve grupe u pogledu postizanja kompletne remisije, dužine trajanja remisije kao i ukupnog preživljavanja ($p=0,91$, Log-rank) (Slika 22.).



Slika 19. Kaplan-Majer kriva ukupnog preživljavanja pacijenata sa nižim ITD/wt odnosom (7 slučajeva, 4 cenzurisana) i višim ITD/wt odnosom (9 slučajeva, 3 cenzurisana).

III 2.2. Detekcija mutacija u $NPM1$ genu

Mutacije u genu za nukleofosmin su registrovane kod 17 od ukupno 92 adultna AML pacijenata (18,5%). Postojala je jasna korelacija između prisustva $NPM1$ i $FLT3$ mutacija ($p=0,003$, Hi-kvadrat test) (Tabela 11.). Naime, kod 9 od 17 $NPM1^+$ pacijenata (53%) prisustvo $NPM1$ mutacija je bilo udruženo sa prisustvom mutacija u $FLT3$ genu. Kod 6 pacijenata $NPM1$ mutacije su bile udružene sa prisustvom $FLT3/ITD$ mutacija (66,7%)($p=0,03$, Hi-kvadrat test), a kod 3 pacijenata ove mutacije su bile udružene sa prisustvom $FLT3/D835$ mutacije (33,3%)($p=0,08$, Hi-kvadrat test).

Detektovane $NPM1$ mutacije su najčešće bile A tipa, u 15 od 17 pacijenata (88,2%), dok su u preostala dva pacijenata pronađene mutacije tipa D i mutacija tipa K (Tabela 14.).

Tabela 14. Nukleotidne i proteinske sekvence NPM1 mutacija nađenih u ovoj studiji. Insertovani nukleotidi su obeleženi crvenom bojom.

Tip mutacije	nukleotidna sekvenca				proteinska sekvenca	
Wt	ctct	g	gcag	t	ggaggaagtctctttaagaaaatag	286-DLWQWRKSL
A	ctct	g TCTG	gcag	t	ggaggaagtctctttaagaaaatag	286-DLCLAVEEVSLRK
D	ctct	g CCTG	gcag	t	ggaggaagtctctttaagaaaatag	286-DLCLAVEEVSLRK
K	ctct	g	gcag	t CCCTTTCCA	aagtctctttaagaaaatag	286-DWQSLSKVSLRK

Učestalost *NPM1* mutacija je bila različita u različitim FAB grupama ($p=0,003$, Fišerov egzaktni test), najviša u M5 (62,5%) i M1 (50%) grupi, a najniža u M2 i M4 grupi (10%).

Nije uočena statistički značajna veza između prisustva *NPM1* mutacija i broja leukocita, procenta blasta u krvi i u koštanoj srži ($p=0,15$, $p=0,32$ i $p=0,11$, U-test).

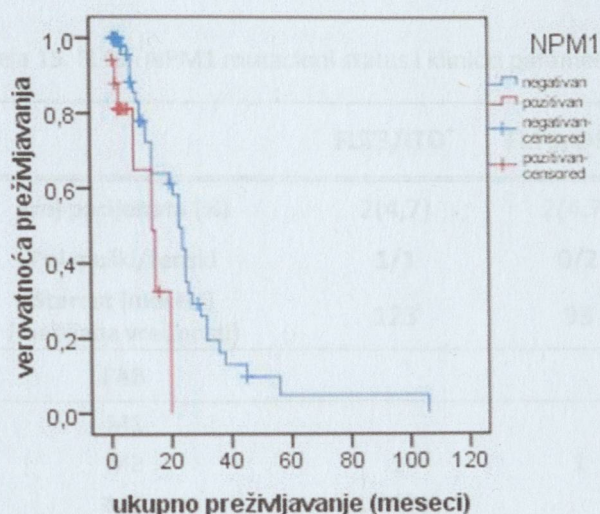
Kao i u slučaju *FLT3/ITD* mutacije, prisustvo *NPM1* mutacija je bilo povezano sa ekspresijom CD34 površinskog markera ($p=0,003$, Hi-kvadrat test). U 80% slučajeva prisustvo *NPM1* mutacije bilo u vezi sa CD34⁺ statusom.

U 12 od 17 *NPM1*⁺ slučajeva (85,7%), radi se o pacijentima koji pripadaju intermedijernoj prognostičkoj grupi, tačnije u pitanju su pacijenti sa normalnim kariotipom (AML-NK pacijenti). Druga 2 *NPM1*⁺ pacijenta su pripadala povoljnoj prognostičkoj grupi (jedan je bio t(15;17)⁺, a drugi inv16⁺). *NPM1* mutacije nisu detektovane među pacijentima sa lošom prognozom.

Kompletna remisija bolesti je postignuta kod 7/17 *NPM1*⁺ pacijenta. Stopa postizanja kompletne remisije kod *NPM1*⁺ pacijenata bila je značajno niža od one koja je nađena kod *NPM1*⁻/*FLT3*⁻ pacijenata ($p=0,02$, Hi-kvadrat test). U slučaju kada su iz proračuna izbačeni *NPM1*⁺/*FLT3*⁺ dvostruko pozitivni pacijenti (9 pacijenata) kao i pacijenti pozitivni samo za *FLT3* mutacije, uticaj *NPM1* mutacije na smanjenje stope postizanja kompletne remisije bio je još veći ($p=0,008$, Hi-kvadrat test), i kompletna remisija je postignuta kod samo 2 od 8 *NPM1*⁺ pacijenata.

Medijana dužine trajanja remisije kod celokupne grupe pacijenata je iznosila 12 meseci, dok je kod $NPM1^+$ ona iznosila 10,5 meseci. Nije pronađena statistički značajna razlika između $NPM1^+$ i $NPM1^-$ u pogledu preživljavanja bez pojave bolesti ($p=0,38$, Log-rank).

Medijana ukupnog preživljavanja kod $NPM1^+$ pacijenata iznosila je 4 meseca, dok je kod $NPM1^-$ ona iznosila 10 meseci. Kaplan-Majer analizom ukupnog preživljavanja između ove dve grupe pacijenata pokazana je statistički značajna razlika ($p=0,015$, Log-rank) (Slika 23.).



Slika 23. Kaplan-Majer kriva ukupnog preživljavanja $NPM1^+$ pacijenata (17 slučajeva, 10 cenzurisanih) i $NPM1^-$ pacijenata (70 slučajeva, 22 cenzurisana).

III - 3. Detekcija FLT3 i NPM1 mutacija kod dece obolele od AML

Naša studija je obuhvatila 42 pedijatrijska pacijenta obolelih od *de novo* AML koje smo analizirali na prisustvo *FLT3* mutacija. Od njih 37 je analizirano na prisustvo *NPM1* mutacija. *FLT3* mutacije su detektovane u 4/42 pacijenta (9,5%), a frekvencije *FLT3/ITD* i *FLT3/D835* mutacija bile su podjednake 2/42 (4,7%) (Tabela 15.).

Tabela 15. FLT3 i NPM1 mutacioni status i klinički parametri pedijatrijskih AML pacijenata.

	FLT3/ITD ⁺	FLT3/D835 ⁺	FLT3 ⁻	NPM1 mutacije
Broj pacijenata (%)	2(4,7)	2(4,7)	38(90,5)	1(2,7)
Pol muški/ženski	1/1	0/2	20/18	0/1
Starost (meseci) (medijana vrednosti)	123	93	101	125
FAB				
M1			5	
M2	1	1	13	1
M3	1(M3v)		5	
M4		1	9	
M5			2	
M6			1	
M7			3	
Broj leukocita (x 10 ⁹ /L) (medijana vrednosti)	158,6	69,35	53,6	69,7
Kariotip				
Abnormalan	1 [t(15;17)]	1[t(11;17)]	17	
Neuspeo	1		11	
Normalan		1	10	1
Neuspeh indukcione terapije	1	1	4	0

Kod analiziranih pacijenata nije postojala statistički značajna razlika između *FLT3*⁺ i *FLT3*⁻ pacijenata u odnosu na pol i uzrast (p=0,06; p=0,068, U-test). Takođe nije postojala statistički značajna razlika u početnom broju leukocita između *FLT3/ITD*⁺ i *FLT3/ITD*⁻ pacijenata (p=0,114, U-test).

FLT3/ITD mutacija je detektovana samo u 2 slučaja; kod jednog dečaka koji nikada nije dostigao stanje kompletne remisije, i kod još jednog pacijenta sa mikrogranularnom varijantom APL (M3v) koji se nalazi u dugotrajnoj kontinuiranoj remisiji. Sekvenciranjem je pokazano da se u oba *FLT3/ITD*⁺ slučaja radi o „in-frame“ duplikacijama koje ne remete okvir čitanja, i obe su se nalazile u egzonu 14 koji kodira jukstamembranski domen *FLT3* proteina. Otvoreni okvir čitanja transkripta je u jednom slučaju održan čistim prisustvom duplikacije od 24 bp, dok je u drugom slučaju došlo i do insercije od 4 bp na mestu duplikacije od 48 bp.

FLT3/D835 mutacija je bila prisutna kod pacijenta sa t(11;17)(q23.q21) koji je pokazao izuzetnu rezistenciju na terapiju, i pored izvršene transplantacije došlo je do smrtnog ishoda. Drugi *FLT3/D835*⁺ pacijent je relapsirao posle godinu dana, pri čemu je došlo do reverzije mutacionog statusa iz *FLT3/D835*⁺ u *FLT3/ITD*⁺. Duplikacija *ITD* u relapsiranom uzorku iznosila je 107 bp (Slika 24.). Ovaj pacijent je takođe bio nosilac *NPM1* mutacije čiji se status nije menjao u toku bolesti.

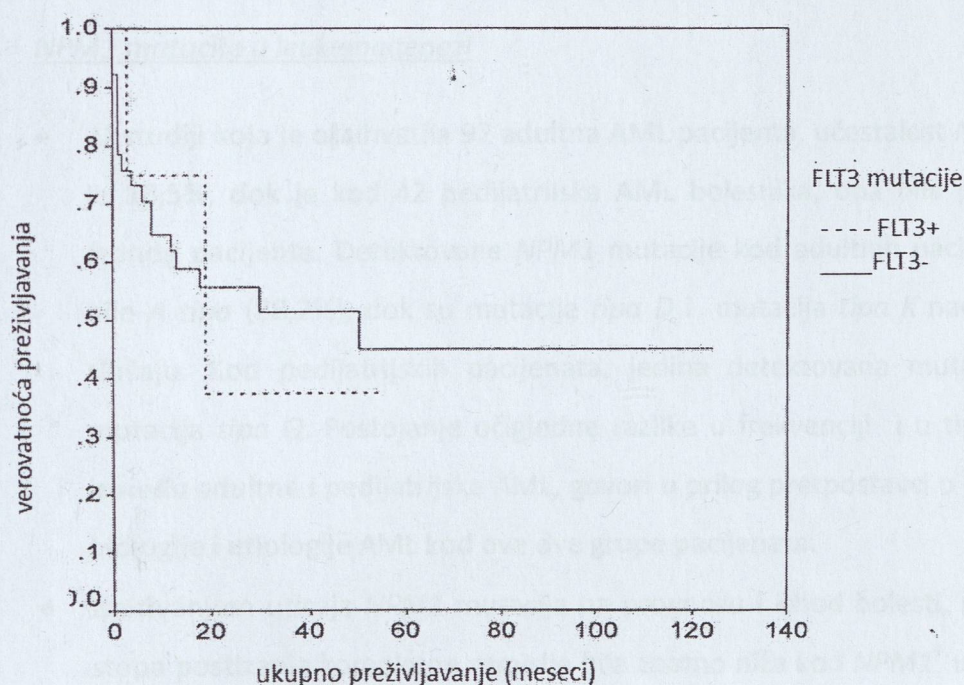


Slika 24. Detekcija *FLT3/ITD* mutacije. Gore: 1-PCR produkt relapsiranog uzorka (duplikacija 107 bp), 2-DNK marker (100 bp), 3-PCR produkt wt-*FLT3*. Dole: Hromatogram dela sekvence *FLT3/ITD* mutacije (duplikacija 107 bp obeležena žutom bojom).

Među analiziranim pedijatrijskim AML pacijentima *NPM1* mutacija je bila prisutna u 1/37 (2,7%) slučajeva. Nađena mutacija je bila heterozigotna, *Q tipa* (Falini B, 2006). Suprotno prethodno prijavljenim slučajevima u kojoj je *Q tip* mutacije predstavljao inserciju od 4 bp (AGGA), u našem slučaju sekvenca 4 bp insercije bila je CGGA, ali je amino-kiselinska sekvenca bila potpuno ista; 286-DLWQRMEEVSLRK umesto wt sekvence 286-DLWQWRKSL.

Statistički značajna razlika između *FLT3*⁻ i *FLT3*⁺ pacijenata je primećena u odgovoru na indukcionu terapiju, odnosno u stopi postizanja kompletne remisije ($p=0,047$, Hi-kvadrat test). Naime, neuspeh indukcione terapije je primećen kod 4 od 30 *FLT3*⁻ pacijenata kod kojih je stanje remisije postignuto nakon primenjene indukcione terapije, dok je kod *FLT3*⁺ pacijenata neuspeh indukcione terapije primećen kod 2/4 pacijenata.

Nakon 63 meseca, što predstavlja medijanu ukupnog praćenja bolesnika, kod *FLT3*⁻ preživljavanje bez pojave bolesti bilo je 45% (CI, 42,23-82,62,), dok je ukupno preživljavanje ove grupe pacijenata bilo 44% (CI 40,89-78,63). Grupa APL pacijenata koji su bili *FLT3*⁻ imala je ukupno preživljavanje 39% (CI 6,74-70,93).



Slika 25. Kaplan Majer kriva preživljavanja dece obolele od AML koji su nosioci *FLT3* mutacije. Zbog malog broja pacijenata statistička obrada nije mogla biti izvedena.

Sažetak

Mutacije u genu za FLT3 u leukemogenezi

- Kod 92 pacijenta obolela od adultne AML FLT3 mutacije su bile prisutne u 25% slučajeva; FLT3/ITD u 17,4%, a FLT3/D835 u 7,6% slučajeva. Prisustvo FLT3/ITD mutacije je bilo u značajnoj vezi sa povećanim brojem leukocita, većim procentom blasta u perifernoj krvi, CD34⁺ statusom i normalnim kariotipom. Nosioци FLT3 mutacija imali su nižu stopu postizanja kompletne remisije, a pacijenti pozitivni za FLT3/ITD mutaciju imali su značajno kraće ukupno preživljavanje od FLT3/ITD⁻ pacijenata. Dužina FLT3/ITD duplikacije kao i veličina odnosa ITD/wt nisu bile povezane sa određenom kliničkim karakteristikama, niti su imale bilo kakvog uticaja na prognozu i ishod bolesti.
- Kod dečijih AML pacijenta FLT3 mutacije su detektovane u 4 od 42 pacijenta (9,5%), a frekvencije FLT3/ITD i FLT3/D835 mutacija bile su podjednake, 4,7%. FLT3⁺ pacijenti su imali značajno nižu stopu postizanja kompletne remisije u odnosu na FLT3⁻ pacijente. Uticaj FLT3 mutacija na ukupno preživljavanje pedijatrijskih AML pacijenata, nije utvrđen zbog njihove male učestalosti.

NPM1 mutacije u leukemogenezi

- U studiji koja je obuhvatila 92 adultna AML pacijenta, učestalost NPM1 mutacija bila je 18,5%, dok je kod 42 pedijatrijska AML bolesnika, ona bila prisutna samo kod jednog pacijenta. Detektovane NPM1 mutacije kod adultnih pacijenata su najčešće bile A tipa (88,2%), dok su mutacije tipa D i mutacija tipa K nađene u po jednom slučaju. Kod pedijatrijskih pacijenata, jedina detektovana mutacija je bila retka mutacija tipa Q. Postojanje očigledne razlike u frekvenciji i u tipu NPM1 mutacija između adultne i pedijatrijske AML, govori u prilog pretpostavci o postojanju različite biologije i etiologije AML kod ove dve grupe pacijenata.
- Ispitivanjem uticaja NPM1 mutacija na prognozu i ishod bolesti, primećeno je da je stopa postizanja kompletne remisije bila znatno niža kod NPM1⁺ u odnosu na NPM1⁻ pacijente. Prisustvo NPM1 mutacija nije imalo uticaja na dužinu trajanja remisije, ali na naše veliko iznenađenje, njeno prisustvo je značajno uticalo na smanjenje ukupnog preživljavanja obolelih. Nepovoljan prognostički uticaj koji NPM1 mutacije

imaju u našoj grupi pacijenata se može objasniti time što su one u 66,7% slučajeva bile udružene sa *FLT3/ITD* mutacijama za koje je pokazano da imaju negativan prognostički značaj.

- U našoj studiji, prisustvo *NPM1* mutacije je značajno povezano sa prisustvom *FLT3* mutacija i normalnim kariotipom, i kod adultnih i kod pedijatrijskih AML pacijenata. *NPM1* mutacija je u našoj grupi adultnih AML-NK pacijenata bila zastupljena u 27% slučajeva, od toga je u 66,7% slučajeva bila vezana sa *FLT3/ITD* mutacijom, dok je u 33,3% slučajeva bila udružena sa *FLT3/D835* mutacijom.

Udruženost *NPM1* i *FLT3* mutacija u leukemogenezi

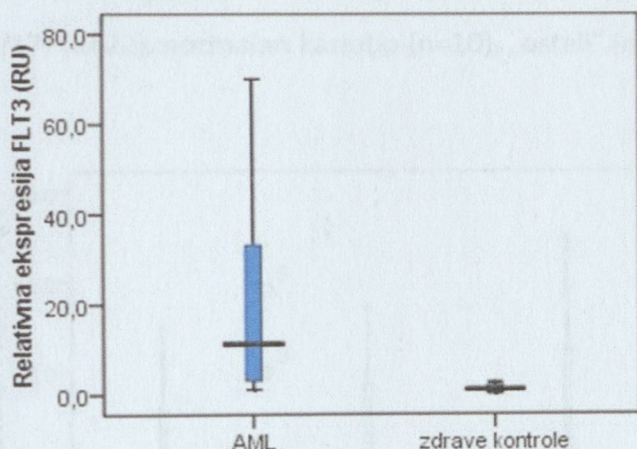
- Udruženost *FLT3* i *NPM1* mutacija predstavlja jedan od najboljih primera tzv. „2 hit“ hipoteze nastanka leukemija, koja govori o tome da je za malignu transformaciju ćelije neophodno prisustvo najmanje 2 mutacije. Prema ovoj hipotezi, mutacije u genu za *NPM* dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, poremećaja u apoptozi i do povećanja genomske nestabilnosti ćelije, dok *FLT3* mutacije obezbeđuju visok proliferativni kapacitet i selektivnu prednost već mutiranih ćelija.

III - 4. Ekspresija *FLT3* gena

Ekspresija *FLT3* 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).

III - 4.1. Ekspresija *FLT3* gena kod obolelih od AML

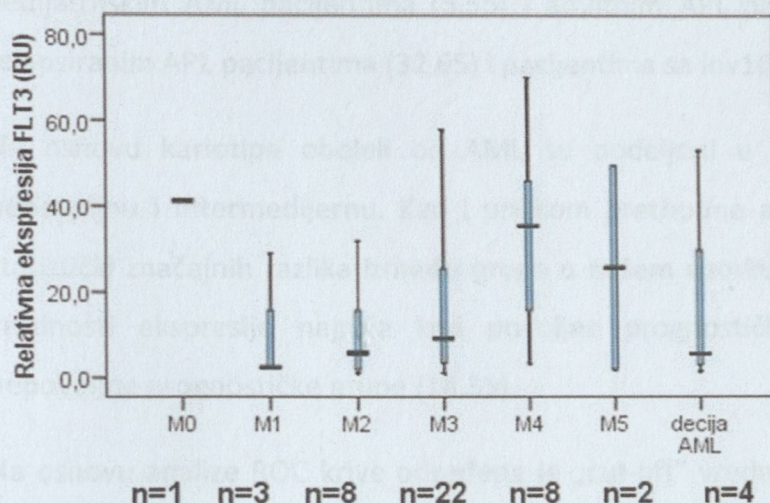
Analizirano je ukupno 48 pacijenata obolelih od AML; 44 adultnih pacijenata (40 sa *de novo* AML i 4 pacijenta u relapsu bolesti), 4 pedijatrijska pacijenta i 6 uzoraka zdravih kontrola. Srednja vrednost ekspresije *FLT3* među obolelima od ove bolesti je $18,5 \pm 2,7$, a medijana iznosi 10,2 (1,1-70,0). Ovaj nivo ekspresije je izrazito viši od ekspresije nađene kod zdravih kontrola (srednja vrednost $1,1 \pm 0,4$, medijana 1,0 (0,1-2,6)) što je pokazano i statistički U-testom ($p=0,0001$) (Slika 26.).



Slika 26. Box-plot grafički prikaz ekspresije *FLT3* (RU) kod AML pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

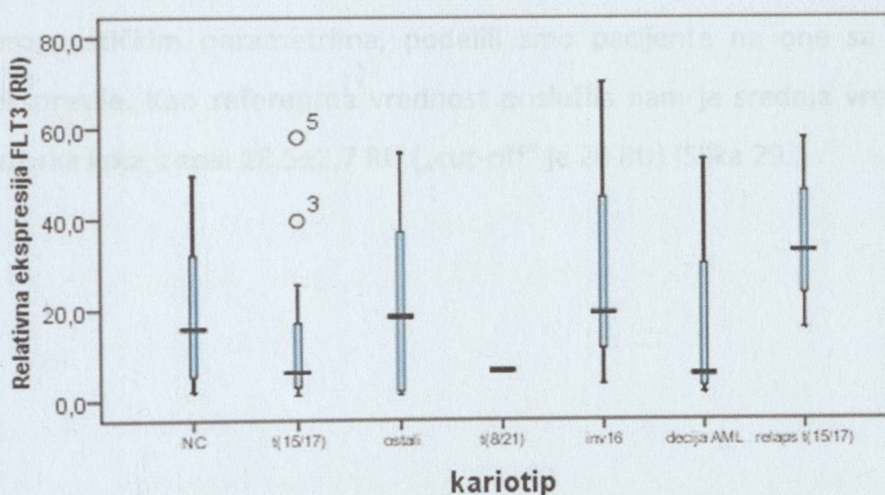
Nivo ekspresije *FLT3* je različita kod različitih FAB grupa. Najveća medijana nivoa ekspresije je među pacijentima M4 grupe i iznosi 35,4 (3,4-70), a najniža je kod M2 grupe pacijenata 5,8 (1,1-32,0). Analizom varijanse (Kruskal-Voliz test) nije utvrđeno postojanje statistički

značajne razlike između grupa, mada je tome sigurno doprineo veoma mali broj pacijenata u pojedinim grupama (Slika 27.).



Slika 27. Box-plot grafički prikaz ekspresije FLT3 (RU) po FAB grupama. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane. n – predstavlja broj pacijenata u grupi. Dečiji AML pacijenti su izdvojeni u posebnu grupu.

Na osnovu citogenetskih nalaza pacijenti su podeljeni u 6 grupa; t(8/21) (n=1), inv16 (n=3), t(15/17) (n=22), normalan kariotip (n=10), „ostali“ (n=8) i pedijatrijska AML (n=4).



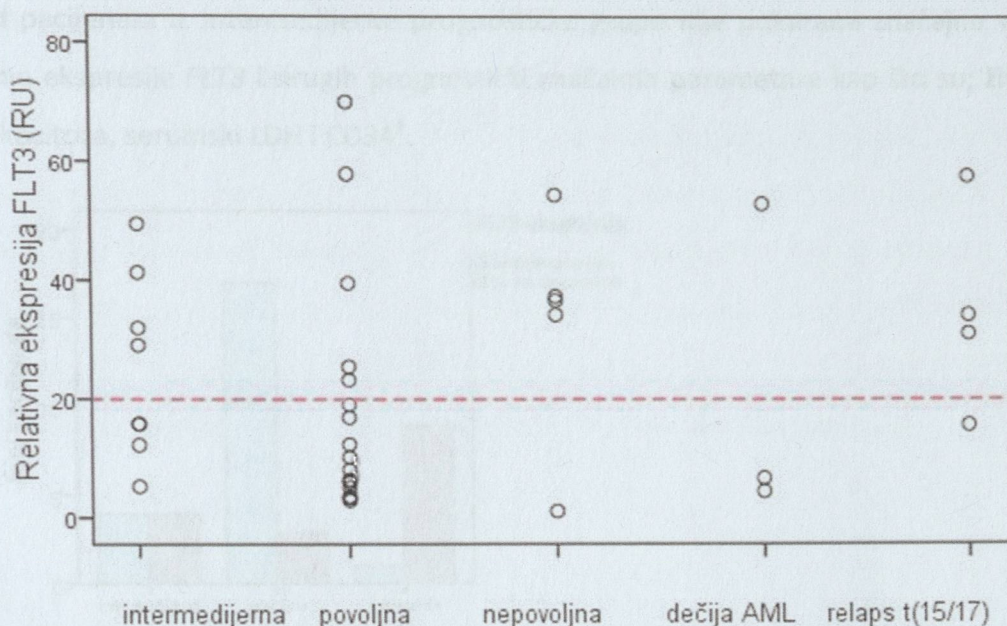
Slika 28. Box-plot grafički prikaz ekspresije FLT3 na osnovu kariotipa pacijenata. Iz najbrojnije grupe pacijenata koji su pozitivni za t(15/17) izdvojeno je 4 pacijenata koji nisu *de novo* AML, već su se nalazili u relapsu bolesti.

Analizom varijanse (Kruskal-Voliss test) nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između grupa sa različitim kariotipom. Najniža vrednost medijane zapažena je među pedijatrijskim AML pacijentima (5,55) i adultnim APL pacijentima (6,17), a najviša među relapsiranim APL pacijentima (32,65) i pacijentima sa inv16 (19,09) (Slika 28.)

Na osnovu kariotipa oboleli od AML su podeljeni u 3 prognostičke grupe; povoljnu, nepovoljnu i intermedijernu. Kao i prilikom prethodne analize, nije potvrđeno postojanje statistički značajnih razlika između grupa u našem uzorku, ali je primećeno da je medijana vrednosti ekspresije najniža kod povoljne prognostičke grupe (6,38), a najviša kod nepovoljne prognostičke grupe (18,35).

Na osnovu analize ROC krive određena je „cut-off“ vrednost nivoa ekspresije iznad koje se smatra da je uzorak pozitivan za ekspresiju *FLT3*, i ona je iznosila 2,74 RU (osetljivost-77,1%, specifičnost-0%). Nakon toga naša grupa AML pacijenata imala je 36 pacijenata pozitivnih za *FLT3* ekspresiju. Najviše pacijenata negativnih za *FLT3* ekspresiju bilo je iz grupe pacijenata sa povoljnom prognozom (t(15/17) pozitivni), i to 4, dva pacijenta iz grupe sa normalnim kariotipom (intermedijerna prognostička grupa), jedan je bio pedijatrijski slučaj, a četvoro su spadali u grupu sa lošom prognozom.

Kako bi ispitali uticaj nivoa ekspresije *FLT3* na prognozu bolesti, kao i povezanost sa drugim prognostičkim parametrima, podelili smo pacijente na one sa visokim i niskim nivoom ekspresije. Kao referentna vrednost poslužila nam je srednja vrednost ekspresije ukupnog uzorka koja iznosi $18,5 \pm 2,7$ RU („cut-off“ je 20 RU) (Slika 29.).

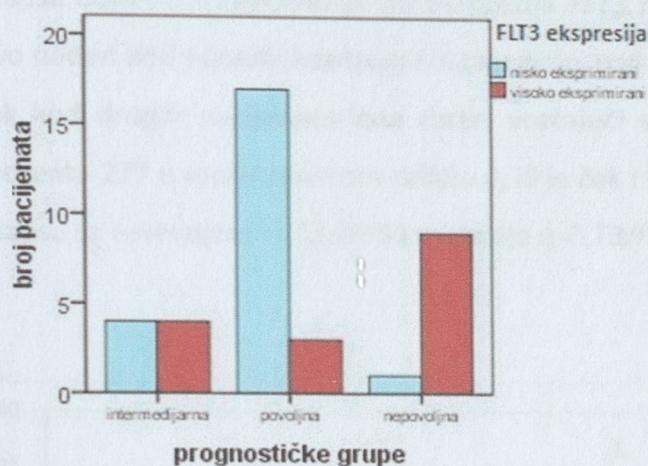


Slika 29. Tačkasti dijagram ekspresije FLT3 po prognostičkim grupama. „Cut-off“ vrednost je 20 RU.

Skoro svi pacijenti iz nepovoljne prognostičke grupe su imali visoku ekspresiju *FLT3*, što je slučaj i sa relapsiranim $t(15/17)^+$ pacijentima. Većina pacijenata sa povoljnom prognozom imala je nizak nivo ekspresije, što je bio slučaj i kod pedijatrijskih AML, sa izuzetkom jednog pacijenta koji je bio *FLT3/ITD*⁺. Prisustvo ove mutacije inače predstavlja nepovoljan prognostički marker, ali zbog malog broja pozitivnih pacijenata, možemo je posmatrati samo u svetlu pojedinačnih slučajeva. Naime, prisustvo *FLT3* mutacija je detektovano kod veoma malog broja pacijenata; *FLT3/ITD* kod 4 pacijenata, a *FLT3/D835* kod 6 pacijenata. Nosioci ovih mutacija nisu pokazivali sklonost bilo ka visokoj ili niskoj ekspresiji *FLT3*. Na osnovu toga je zaključeno da mutacioni status *FLT3* gena nema značajan uticaj na nivo ekspresije *FLT3* u našoj grupi pacijenata.

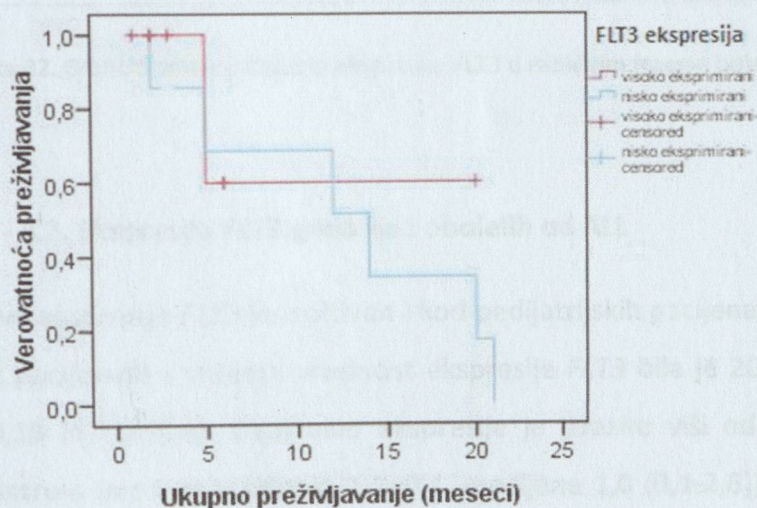
Statistički značajna veza između nivoa ekspresije *FLT3* i prognoze bolesti pokazana je Fišerovim egzaktnim testom ($p=0,0001$), osim u slučaju intermedijerne prognostičke grupe. Za potrebe ove analize pacijente koji su relapsirali i pacijente sa *FLT3/ITD*⁺ mutacijom svrstali smo u grupu sa nepovoljnom prognozom, a pedijatrijske slučajeve smo raspodelili u određene prognostičke grupe na osnovu njihovog kariotipa (Slika 30.).

Kod pacijenata iz intermedijerne prognostičke grupe nije pokazana značajna veza između visine ekspresije *FLT3* i drugih prognostički značajnih parametara kao što su; životno doba, leukocitoza, serumski LDH i CD34⁺.



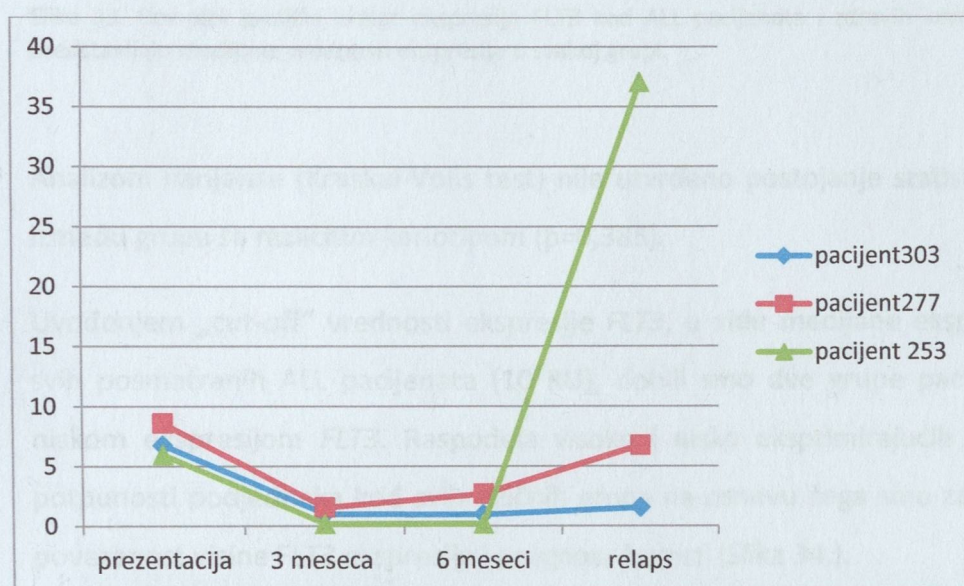
Slika 30. Grafički prikaz raspodele pacijenata po prognostičkim grupama u odnosu na visoki odnosno niski nivo ekspresije *FLT3*.

Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja pacijenata sa visokom i sa niskom ekspresijom *FLT3*. Ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između ove 2 grupe pacijenata ($p=0,49$; Log Rank) (Slika 31.). U ovu analizu nisu uključeni pacijenti pozitivni za t(15/17), jer oni zbog visoko specifične terapije imaju bolje preživljavanje.



Slika 31. Kriva preživljavanja pacijenata sa niskim i sa visokim nivoom ekspresije *FLT3*. Broj visoko ekspimirajućih pacijenata 9 (cenzurisani slučajevi 7), a nisko ekspimirajućih 7 (cenzurisani slučajevi 1).

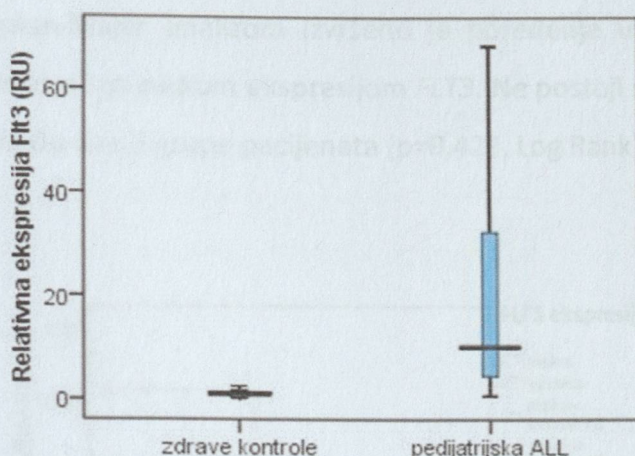
Ekspresija *FLT3* je praćena ne samo na početku bolesti, već i u kasnijim stadijumima lečenja. Četiri pacijenta koja su bila dostupna za praćenje, analizirana su u trenutku nakon indukciono terapije, nakon konsolidacione terapije i u kompletnoj remisiji, odnosno prilikom relapsa bolesti. Primećeno je da ekspresija *FLT3* nakon indukciono terapije brzo opada na nivo nađen kod zdravih kontrola i ostaje niska kod pacijenta u remisiji bolesti (pacijent 303), dok kod drugih pacijenata ona raste, vraćajući se na nivo sa početka bolesti (u slučaju pacijenta 277 u molekularnom relapsu), ili je čak i premašuje (kod pacijenta 253 u kliničkom relapsu sa reverzijom *FLT3/D835* mutacije u *FLT3/ITD* mutaciju) (Slika 32).



Slika 32. Grafički prikaz relativne ekspresije *FLT3* u različitim fazama bolesti.

III - 4.2. Ekspresija *FLT3* gena kod obolelih od ALL

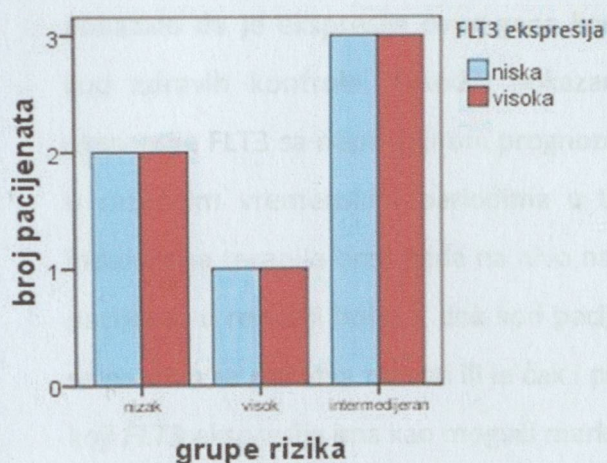
Nivo ekspresije *FLT3* je ispitivan i kod pedijatrijskih pacijenata obolelih od ALL. Analizirano je 12 pacijenata i srednja vrednost ekspresije *FLT3* bila je $20,18 \pm 6,35$, a medijana je iznosila 10,19 (0,71-68,4). Ovaj nivo ekspresije je izrazito viši od ekspresije nađene kod zdravih kontrola (srednja vrednost $1,1 \pm 0,4$, medijana 1,0 (0,1-2,6)) što je pokazano i statistički, U-testom ($p=0,003$) (Slika 33.).



Slika 33. Box-plot grafički prikaz ekspresije FLT3 kod ALL pacijenata i zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju medijane vrednosti ekspresije u svakoj grupi.

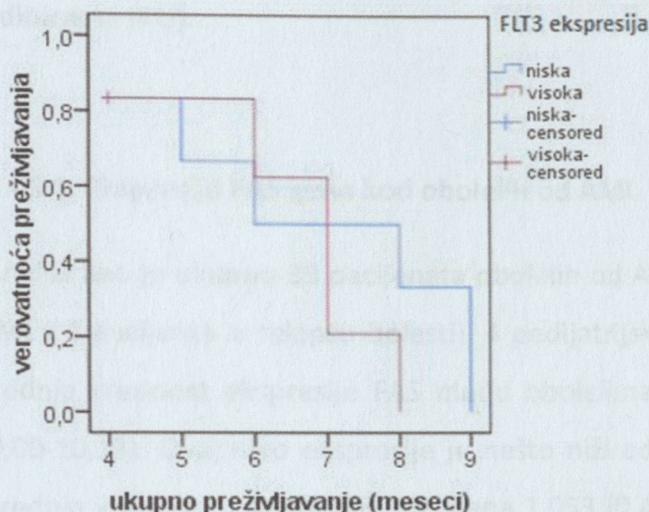
Analizom varijanse (Kruskal-Volis test) nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između grupa sa različitim kariotipom ($p=0,385$).

Uvođenjem „cut-off“ vrednosti ekspresije *FLT3*, u vidu medijane ekspresije zapažene kod svih posmatranih ALL pacijenata (10 RU), dobili smo dve grupe pacijenata sa visokom i niskom ekspresijom *FLT3*. Raspodela visoko i nisko eksprimirajućih pacijenata bila je u potpunosti podjednaka kod svih rizičnih grupa na osnovu čega smo zaključili da ne postoji povezanost visine *FLT3* ekspresije i prognoze bolesti (Slika 34.).



Slika 34. Raspodela FLT3 visoko i nisko eksprimirajućih ALL pacijenata po kategorijama rizika.

Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja ALL pacijenata sa visokom i sa niskom ekspresijom *FLT3*. Ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između ove 2 grupe pacijenata ($p=0,429$, Log Rank) (Slika 35.).



Slika 35. Kriva preživljavanja ALL pacijenata sa niskom i visokom ekspresijom *FLT3*. Broj pacijenata sa visokom *FLT3* ekspresijom je 6 (cenzurisani slučajevi 1), a sa niskom ekspresijom je 6.

Sažetak

- Ispitivanje ekspresije *FLT3* gena kod 48 AML i 12 pedijatrijskih ALL pacijenata je pokazalo da je ekspresija ovog gena kod obolelih znatno viša od one detektovane kod zdravih kontrola. Takođe, pokazana je značajna povezanost visokog nivoa ekspresije *FLT3* sa nepovoljnom prognozom. Ispitivanjem nivoa ekspresije *FLT3* gena u različitim vremenskim periodima u toku lečenja, primećeno je da ona nakon indukciono terapije brzo pada na nivo nađen kod zdravih kontrola i ostaje niska kod pacijenta u remisiji bolesti, dok kod pacijenata u relapsu bolesti ona raste, vraćajući se na nivo sa početka bolesti ili je čak i premašuje. Ovi rezultati govore o potencijalu koji *FLT3* ekspresija ima kao mogući marker za praćenje MRB.

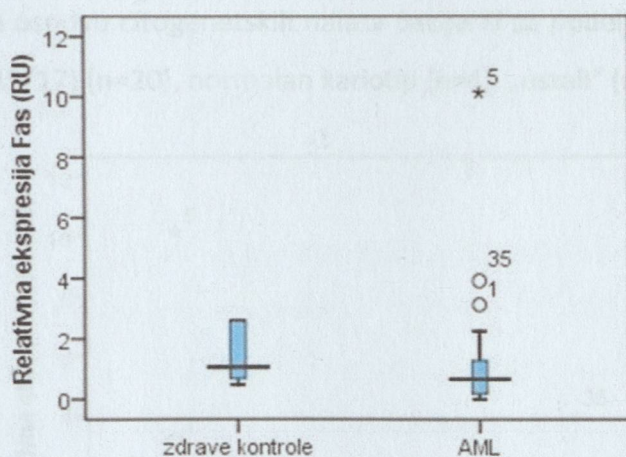
Универзитет у Београду
 БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
 ИНСТИТУТ ЗА ФИЗИОЛОГИЈУ И БИОХЕМИЈУ
 БИБЛИОТЕКА
 Инв. бр. 30078
 БЕОГРАД

III - 5. Ekspresija gena za FAS receptor (FAS)

Ekspresija FAS gena je praćena „real-time“-PCR metodom. Relativni nivo ekspresije je određen primenom metode standardne krive. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama (RU).

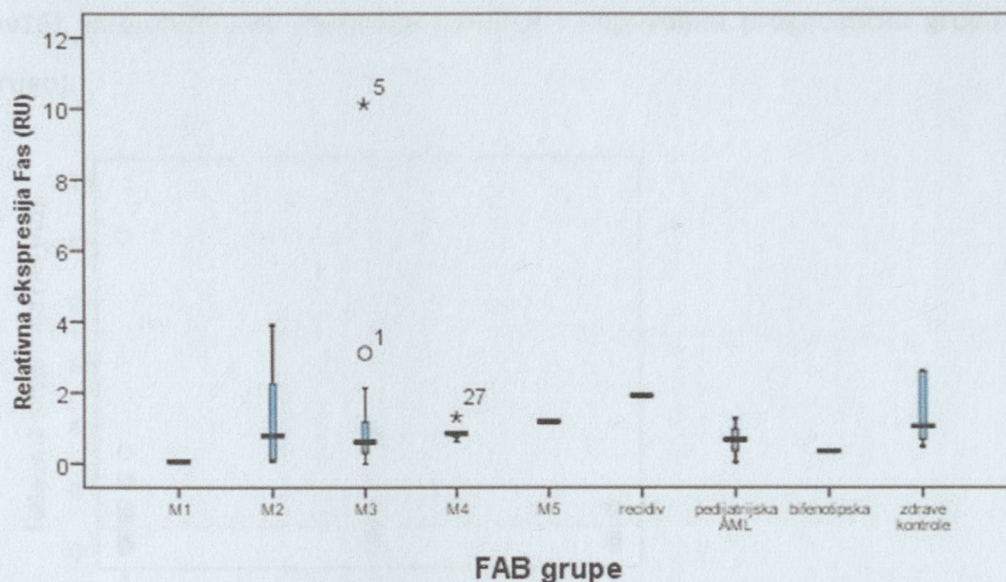
III - 5.1. Ekspresija FAS gena kod obolelih od AML

Analizirano je ukupno 39 pacijenata obolelih od AML 35 adultnih pacijenata (31 sa *de novo* AML i 4 pacijenta u relapsu bolesti), 4 pedijatrijska pacijenta i 6 uzoraka zdravih kontrola. Srednja vrednost ekspresije FAS među obolelima je $1,234 \pm 0,293$, a medijana iznosi 0,67 (0,00-10,13). Ovaj nivo ekspresije je nešto niži od ekspresije nađene kod zdravih kontrola (srednja vrednost $1,41 \pm 0,396$, medijana 1,053 (0,482-2,6), ali ta razlika nije imala statistički značaj ($p=0,151$, U-test) (Slika 36).



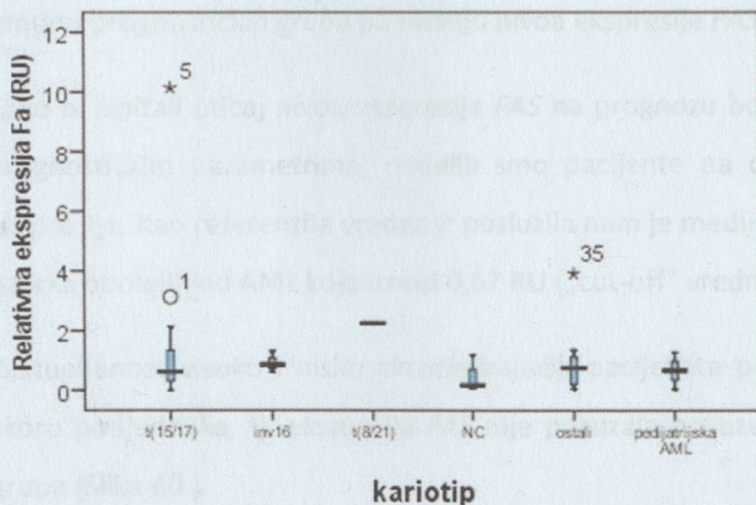
Slika 36. Box-plot grafički prikaz ekspresije FAS kod AML pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

Poređenjem ekspresije FAS kod različitih FAB grupa nisu uočene značajne razlike. Primećeno je postojanje šireg opsega vrednosti ekspresije kod M2 i M3 grupe koji izlazi iz okvira vrednosti nađenih u zdravim kontrolama (Slika 37.).



Slika 37. Box-plot prikaz ekspresije FAS u različitim FAB grupama. Horizontalne linije predstavljaju medijanu vrednosti ekspresije.

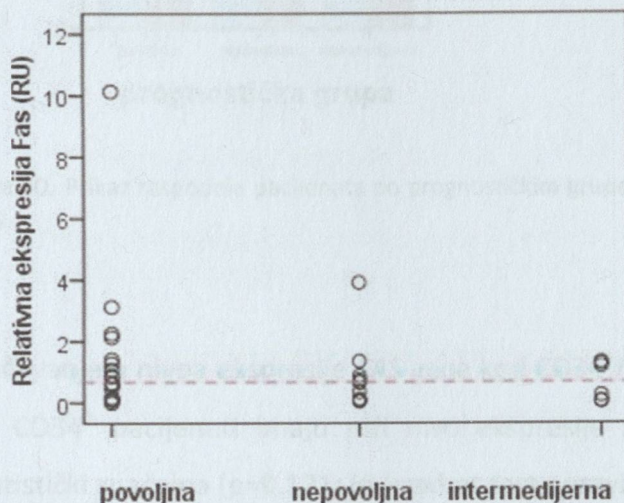
Na osnovu citogenetskih nalaza pacijenti su podeljeni u 4 grupe; t(8/21) (n=1), inv16 (n=3), t(15/17) (n=20), normalan kariotip (n=4), „ostali“ (n=7) i pedijatrijska AML (n=4) (Slika 38.).



Slika 38. Box-plot grafički prikaz ekspresije FAS na osnovu kariotipa pacijenata.

Nije utvrđeno postojanje statistički značajnih razlika između grupa sa različitim kariotipom ($p=0,59$).

Oboleli od AML su podeljeni u 3 prognostičke grupe; povoljnu (pozitivni za $t(15/17)$, $t(8/21)$ i $inv16$), intermedijernu (normalni kariotip) i nepovoljnu prognostičku grupu ($del5$, $del7$ i drugo).

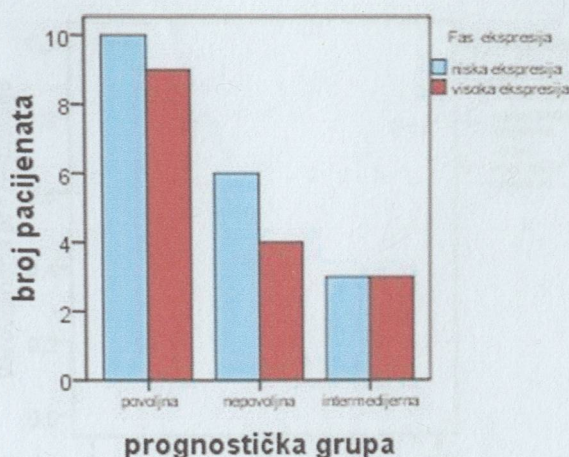


Slika 39. Tačkasti dijagram ekspresije FAS po prognostičkim grupama. Crvena isprekidana linija predstavlja „cut-off“ vrednost od 0,67 RU.

Analizom varijanse (Kruskal-Voliz test) nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između prognostičkih grupa po pitanju nivoa ekspresije FAS ($p=0,768$).

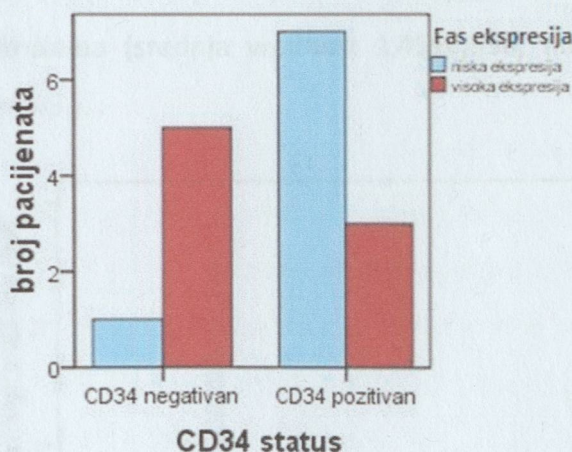
Kako bi ispitali uticaj nivoa ekspresije FAS na prognozu bolesti kao i povezanost sa drugim prognostičkim parametrima, podelili smo pacijente na one sa visokim i niskim nivoom ekspresije. Kao referentna vrednost poslužila nam je medijana vrednosti ekspresije ukupnog uzorka obolelih od AML koja iznosi 0,67 RU („cut-off“ vrednost) (Slika 39.).

Zastupljenost visoko i nisko eksprimirajućih pacijenata po prognostičkim grupama bila je skoro podjednaka, tj. ekspresija FAS nije pokazala povezanost sa nekom od prognostičkih grupa (Slika 40.).



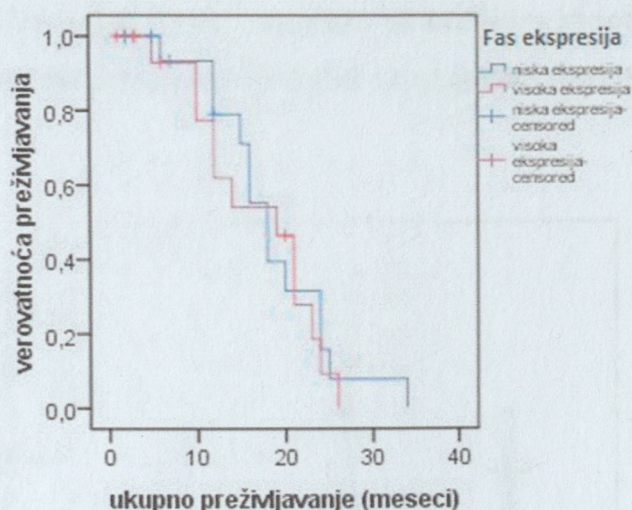
Slika 40. Prikaz raspodele pacijenata po prognostičkim grupama u odnosu na visoku odnosno nisku ekspresiju FAS.

Izučavanjem nivoa ekspresije *FAS* gena kod $CD34^+/CD34^-$ pacijenata primećena je tendencija da $CD34^+$ pacijenti imaju niži nivo ekspresije *FAS* (7/10 pacijenata), ali ona nije bila statistički značajna ($p=0,121$; Hi-kvadrat test nezavisnosti) (Slika 41.).



Slika 41. Grafički prikaz zavisnosti prisustva $CD34^+$ ćelija kod AML pacijenata i visine ekspresije FAS. Podaci o $CD34^+$ su bili dostupni za 16/39 pacijenata.

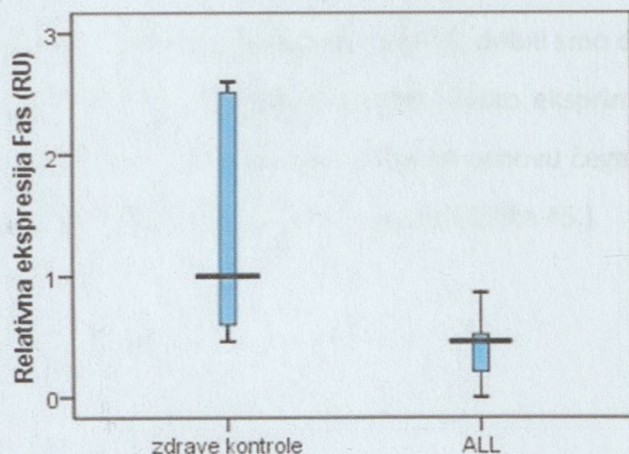
Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja pacijenata sa visokom i sa niskom ekspresijom FAS. Ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između ove 2 grupe pacijenata ($p=0,621$, Log Rank) (Slika 42.).



Slika 42. Kriva preživljavanja pacijenata sa niskom i visokom ekspresijom Fas. Broj pacijenata sa visokom FAS ekspresijom 17 (cenzurisani slučajevi 5), a sa niskom ekspresijom 18 (cenzurisani slučajevi 5).

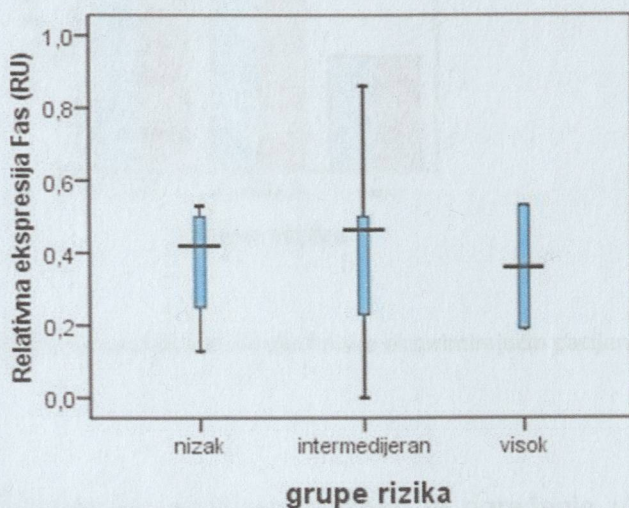
III - 5.2. Ekspresija FAS gena kod obolelih od ALL

Nivo ekspresije *FAS* je ispitivan i kod pedijatrijskih pacijenata obolelih od ALL. Analizirano je 12 pacijenata i srednja vrednost ekspresije *FAS* bila je $0,395 \pm 0,066$, a medijana je iznosila 0,459 (0,00-0,860). Ovaj nivo ekspresije je značajno niži od onog nađenog među zdravim kontrolama (srednja vrednost $1,41 \pm 0,396$, medijana 1,053 (0,482-2,6) ($p=0,009$, U-test) (Slika 43.).



Slika 43. Box-plot grafički prikaz ekspresije FAS gena (RU) kod ALL pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

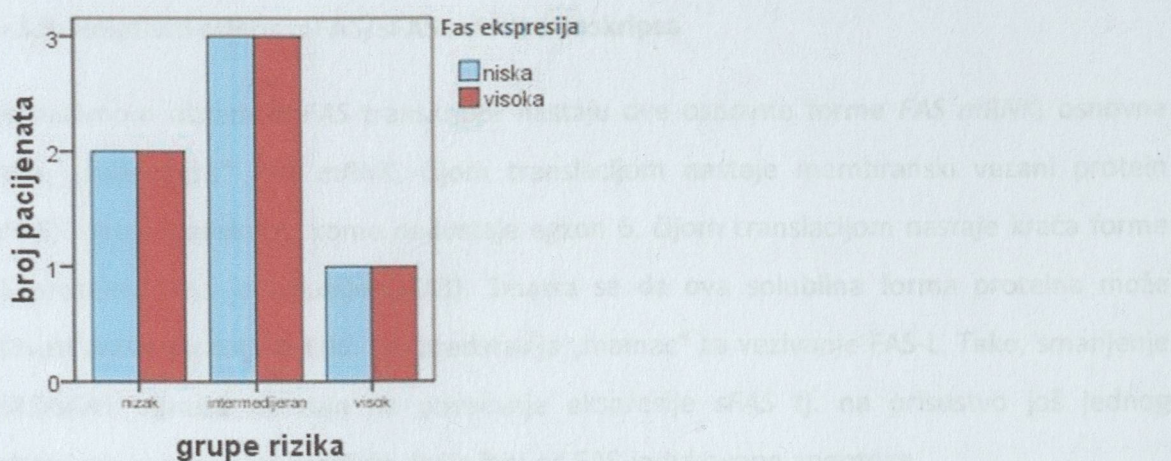
Ekspresija *FAS* gena kod grupa sa različitim kariotipom je veoma različita i na granici je statističke značajnosti ($p=0,059$, Kruskal-Volis test) (Slika 44.).



Slika 44. Box-plot grafički prikaz ekspresije *FAS* kod ALL pacijenata sa različitim kariotipom.

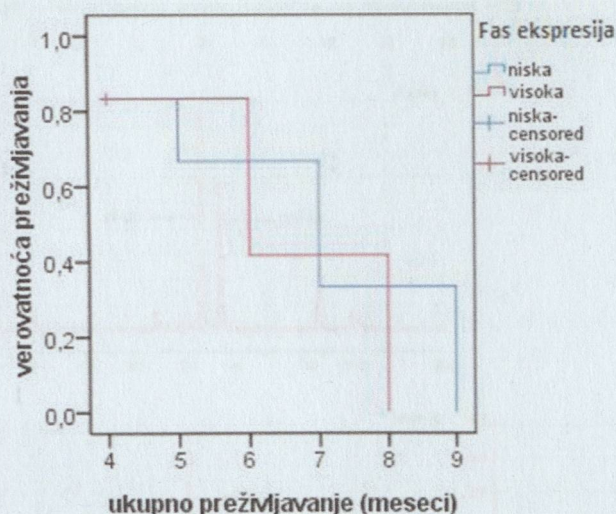
Na osnovu kariotipa, imunofenotipa i drugih kliničkih karakteristika pacijenti su podeljeni u različite rizične kategorije. Ekspresija *FAS* gena se nije značajno razlikovala između različitih rizičnih grupa.

Uvođenjem „cut-off“ vrednosti ekspresije *FAS* u vidu medijane ekspresije zapažene kod svih posmatranih ALL pacijenata (0,459 RU), dobili smo dve grupe pacijenata sa visokom i niskom ekspresijom *FAS*. Raspodela visoko i nisko eksprimirajućih pacijenata bila je u potpunosti podjednaka kod svih rizičnih grupa na osnovu čega smo zaključili da ne postoji povezanost visine *FAS* ekspresije i prognoze bolesti (Slika 45.).



Slika 45. Raspodela FAS visoko i nisko ekspimirajućih pacijenata po kategorijama rizika.

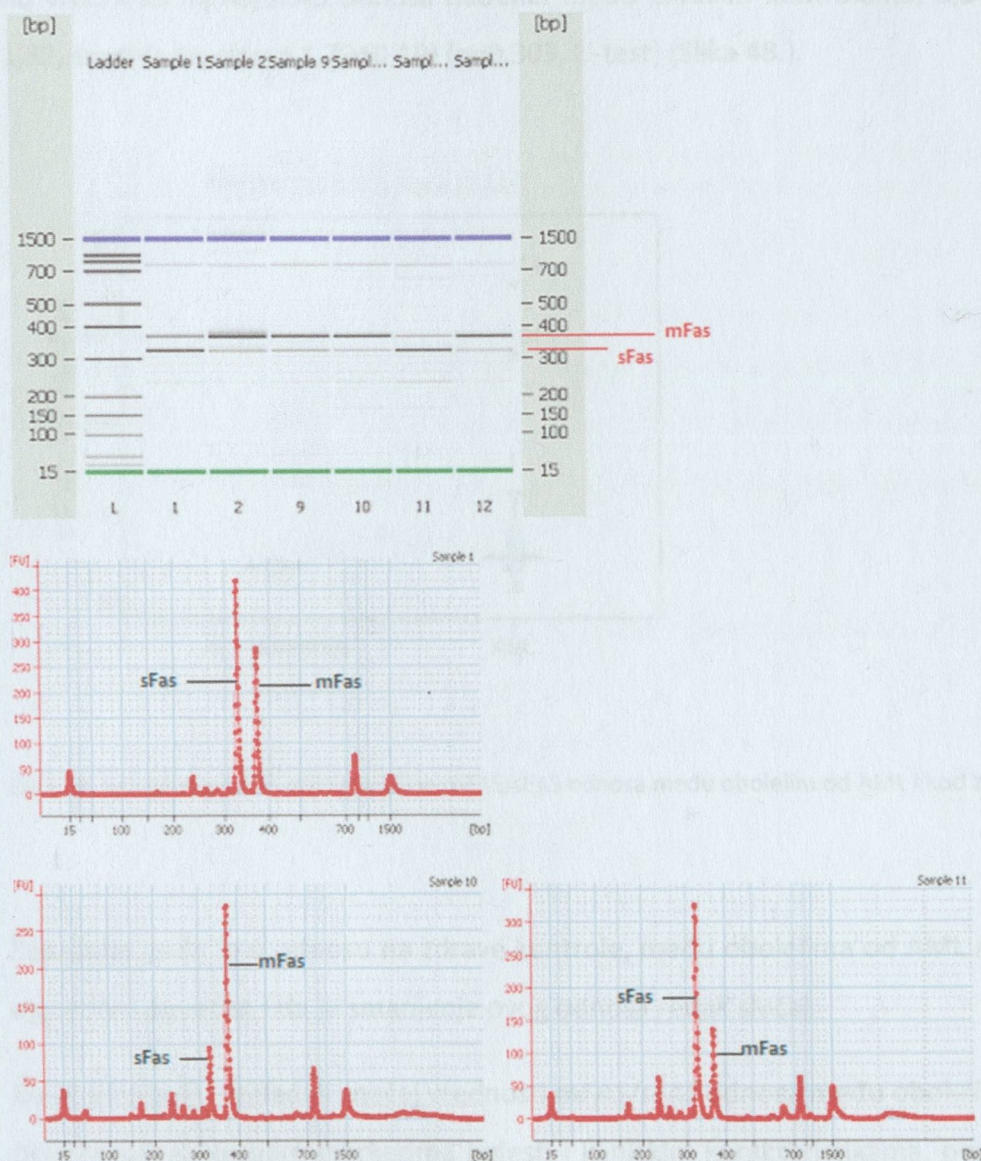
Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja ALL pacijenata sa visokom i sa niskom ekspresijom FAS. Ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između ove 2 grupe pacijenata ($p=0,510$, Log Rank) (Slika 46.).



Slika 46. Kriva preživljavanja ALL pacijenata sa niskom i visokom ekspresijom FAS. Broj pacijenata sa visokom Fas ekspresijom 6 (cenzurisani slučajevi 1), a sa niskom ekspresijom 6.

III - 5.3. Relativni odnos mFAS/sFAS mRNK transkripta

Alternativnom obradom *FAS* transkripta nastaju dve osnovne forme *FAS* mRNK, osnovna forma, „full-length“ *FAS* mRNK, čijom translacijom nastaje membranski vezani protein (*mFAS*) i kraći transkript, kome nedostaje egzon 6, čijom translacijom nastaje kraća forma *FAS* proteina koja je solubilna (*sFAS*). Smatra se da ova solubilna forma proteina može delovati anti-apoptotski tako što predstavlja „mamac“ za vezivanje *FAS-L*. Tako, smanjenje *mFAS/sFAS* odnosa ukazuje na povećanje ekspresije *sFAS* tj. na prisustvo još jednog mehanizma kojim se leukemijska ćelija štiti od *FAS*-indukovane apoptoze.

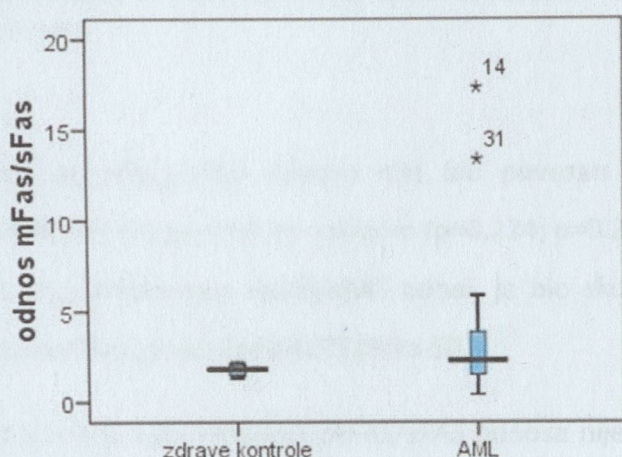


Slika 47. Slika 18. Kapilarna elektroforeza *FAS* PCR produkta. Elektroforetogrami pacijenta sa visokim *mFAS/sFAS* odnosom (uzorak 10), sa *mFAS/sFAS* odnosom ≈ 1 (uzorak 1) i sa niskim *mFAS/sFAS* odnosom (uzorak 11).

Odnos *mFAS/sFAS* *mRNK* transkripta je određen primenom „lab-on-chip“ tehnologije na 2100 Bioanalyzeru (Agilent). (Slika 47.).

Odnos *mFAS/sFAS* je određen kod obolelih od AML, ALL i kod 4 zdrave kontrole.

Analizirano je 43 AML pacijenata, od toga 39 adultnih (35 *de novo* AML, 4 u relapsu bolesti) i 4 slučaja pedijatrijske AML. Opseg dobijenih vrednosti *mFAS/sFAS* odnosa je bio veoma širok, 0,39-17,33 (medijana 2,28, srednja vrednost $3,21 \pm 0,48$), i nije se značajno razlikovao od vrednosti *mFAS/sFAS* odnosa nađenih među zdravim kontrolama, 1,34-2,19 (medijana 1,82, srednja vrednost $1,79 \pm 0,19$) ($p=0,303$, U-test) (Slika 48.).

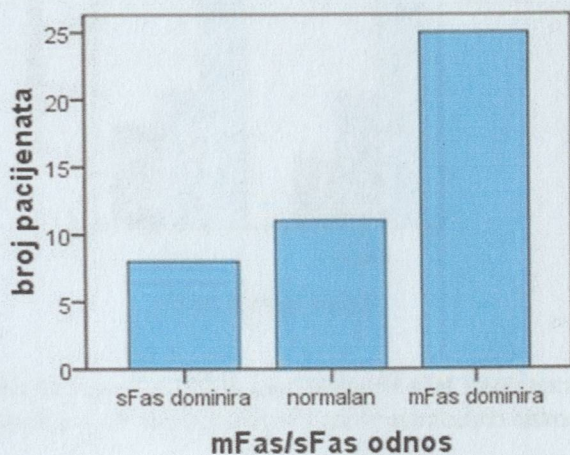


Slika 48. Box-plot grafički prikaz veličine *mFAS/sFAS* odnosa među obolelim od AML i kod zdravih kontrola.

Zapaženo je da je u odnosu na zdrave kontrole, među obolelima od AML *mFAS/sFAS* odnos uglavnom povećan i da je smanjenje ovog odnosa redak slučaj.

Da bi smo bolje sagledali značaj vrednosti *mFAS/sFAS* odnosa među obolelima, kao i njegovu povezanost sa ostalim markerima bolesti i kliničkim karakteristikama, podelili smo obolele na 3 grupe; I grupa ima *mFAS/sFAS* odnos nepromenjen u odnosu na zdrave kontrole (*mFAS/sFAS* je 1,00-2,20), kod II grupe *mFAS/sFAS* odnos je viši od 2,20, a u III grupi je

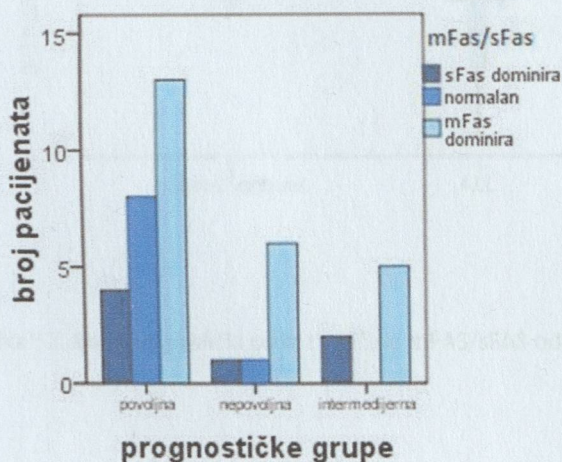
mFAS/sFAS odnos snižen ispod vrednosti 1,00 (Slika 47.). Samo u 8/43 (18,6%) pacijenata nađena je dominacija sFas transkripta (Slika 49.).



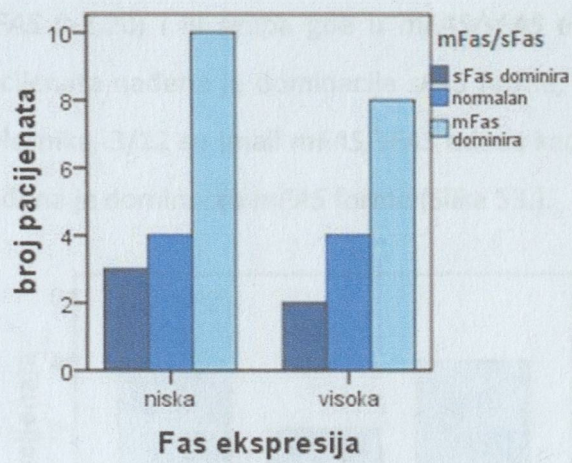
Slika 49. Grafički prikaz broja AML pacijenata u pojedinim grupama sa različitim vrednostima mFAS/sFAS odnosa (nepromenjen u odnosu na zdrave kontrole ili u kojima dominira ekspresija sFAS odnosno mFAS transkripta).

Vrednost mFAS/sFAS odnosa nije bio povezan ni sa pojedinom FAB grupom, niti sa specifičnim citogenetskim nalazom ($p=0,224$; $p=0,251$). Takođe, normalan, sFAS dominantan i mFAS dominantan mFAS/sFAS odnos je bio skoro podjednako raspoređen među sve 3 prognostičke grupe ($p=0,427$) (Slika 50.).

Pokazano je i da vrednost mFAS/sFAS odnosa nije imao nikakve veze sa ukupnom visinom ekspresije FAS gena (Slika 51.).

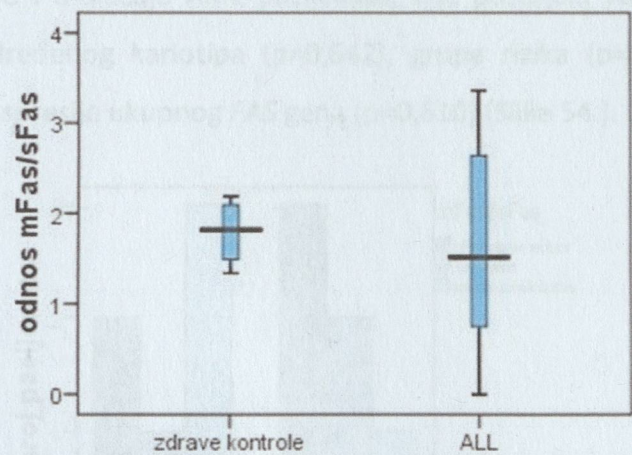


Slika 50. Grafički prikaz zastupljenosti AML pacijenata sa normalnim, sFas i mFas dominantnim mFAS/sFAS odnosom u pojedinim prognostičkim grupama.



Slika 51. Grafički prikaz zastupljenosti AML pacijenata sa normalnim, sFAS i mFAS dominantnim mFAS/sFAS odnosom u grupi pacijenata sa visokom odnosno niskom ekspresijom FAS gena.

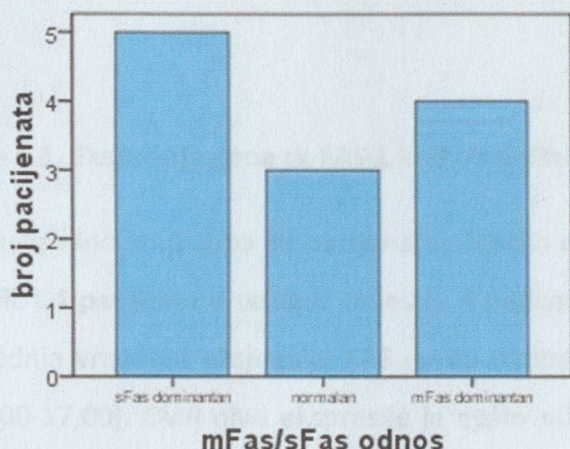
Odnos *mFAS/sFAS* je izučavana i kod obolelih od pedijatrijske ALL. Analizirano je 12 ALL pacijenata. Srednja vrednost *mFAS/sFAS* odnosa je $1,63\pm0,31$, medijana 1,51 (0,00-3,36), i nije se značajno razlikovala od vrednosti *mFAS/sFAS* odnosa nađenih među zdravim kontrolama, 1,34-2,19 (medijana 1,82, srednja vrednost $1,79\pm0,19$) ($p=0,628$, U-test) (Slika 52.).



Slika 52. Box-plot grafički prikaz veličine mFAS/sFAS odnosa među obolelim od ALL i kod zdravih kontrola.

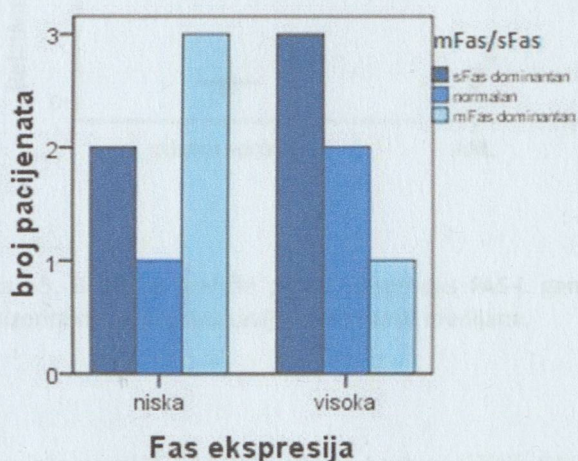
Kao i u slučaju obolelih od AML, ALL pacijente smo na osnovu vrednosti *mFAS/sFAS* podelili u 3 grupe; I grupa sa normalnim *mFAS/sFAS* odnosom (1,00-2,20), II grupa gde dominira

mFAS ($>2,20$) i III grupa gde u *mFAS/sFAS* odnosu dominira *sFAS* ($>1,00$). U 5/12 (25%) pacijenata nađena je dominacija *sFAS* forme, što je procentualno više nego u slučaju AML bolesnika, 3/12 su imali *mFAS/sFAS* odnos kao kod zdravih kontrola, a kod 4/12 pacijenata nađena je dominacija *mFAS* forme (Slika 53.).



Slika 53. Grafički prikaz broja ALL pacijenata u pojedinim grupama sa različitim vrednostima *mFAS/sFAS* odnosa (nepromenjen u odnosu na zdrave kontrole ili u kojima dominira ekspresija *sFAS* odnosno *mFAS* transkripta).

Kao i u slučaju AML pacijenata, nije postojala veza između veličine *mFAS/sFAS* odnosa i određenog kariotipa ($p=0,642$), grupe rizika ($p=0,992$), a isto je potvrđeno i za visinu ekspresije ukupnog *FAS* gena ($p=0,610$) (Slika 54.).



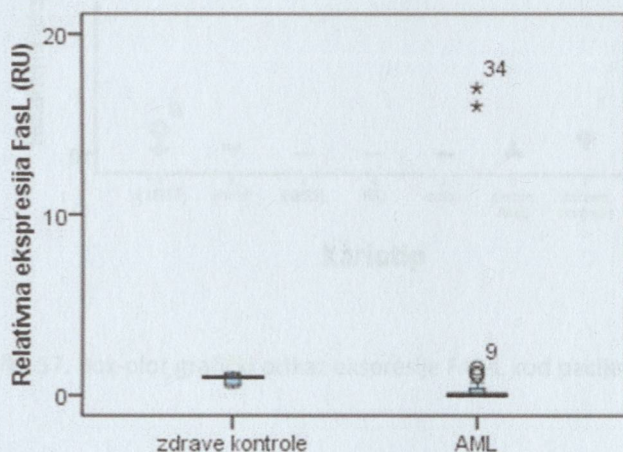
Slika 54. Grafički prikaz zastupljenosti ALL pacijenata sa normalnim, *sFAS* i *mFAS* dominantnim *mFAS/sFAS* odnosom u grupi pacijenata sa visokom odnosno niskom ekspresijom *FAS* gena.

III - 6. Ekspresija gena za FAS-ligand (FAS-L)

Ekspresija *FAS-L* je praćena „real-time“-PCR metodom. Relativni nivo ekspresije je određen primenom metode standardne krive. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama (RU).

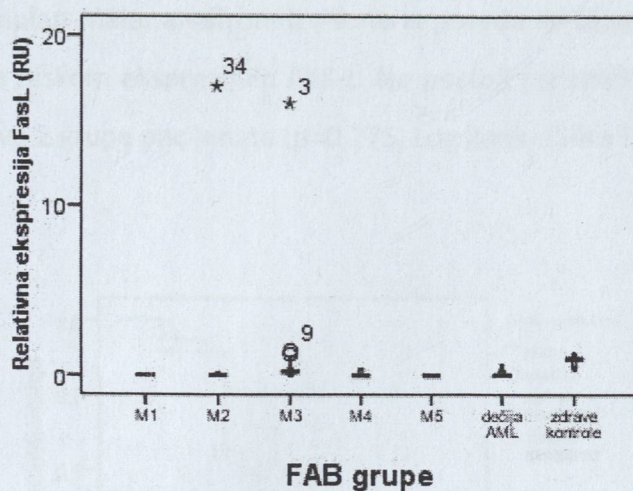
III - 6.1. Ekspresija gena za FAS-L kod obolelih od AML

Analizirano je ukupno 39 pacijenata obolelih od AML; 35 adultnih pacijenata (31 sa *de novo* AML i 4 pacijenta u relapsu bolesti), 4 pedijatrijska pacijenta i 6 uzoraka zdravih kontrola. Srednja vrednost ekspresije *FAS* među obolelima je $1,067 \pm 0,585$, a medijana iznosi 0,045 (0,00-17,00). Ovaj nivo ekspresije je nešto niži od ekspresije nađene kod zdravih kontrola (srednja vrednost $0,913 \pm 0,150$, medijana 1,00 (0,410-1,32) ($p=0,004$, U-test) (Slika 55.).

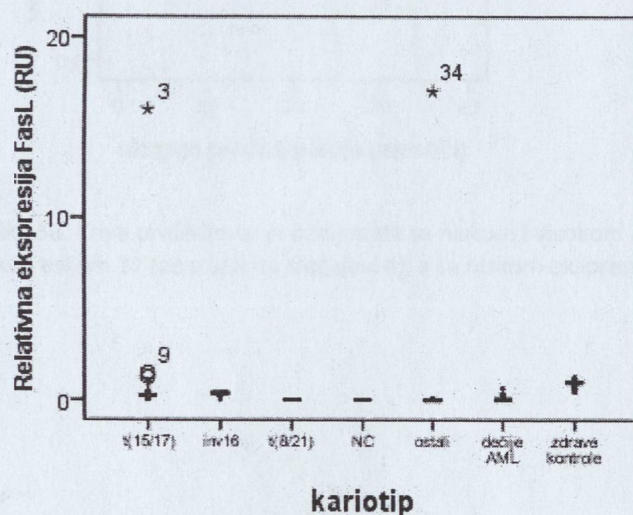


Slika 55. Box-plot grafički prikaz ekspresije *FAS-L* gena (RU) kod AML pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

Nivo ekspresije *FAS-L* je sličan kod različitih FAB grupa, isto kao i kod pacijenata sa različitim kariotipom (Slika 56. i 57.). Osim par izuzetaka (pacijenti broj 3, 9 i 34), svi pacijenti su imali niži nivo ekspresije *FAS-L* od one zapažene kod zdravih kontrola.



Slika 56. Box-plot grafički prikaz ekspresije FAS-L kod različitih FAB grupa.

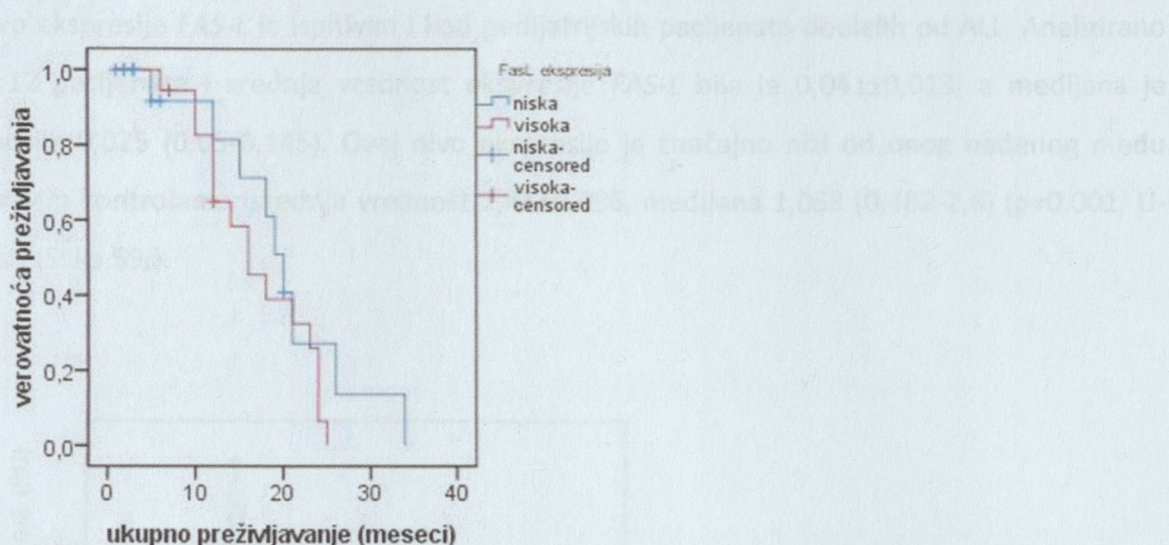


Slika 57. Box-plot grafički prikaz ekspresije FAS-L kod pacijenata sa različitim kariotipom.

Kako bi ispitali uticaj nivoa ekspresije *FAS-L* na prognozu bolesti, kao i povezanost sa drugim prognostičkim parametrima, podelili smo pacijente na one sa visokim i niskim nivoom ekspresije. Kao referentna vrednost poslužila nam je medijana vrednosti ekspresije ukupnog uzorka koja iznosi 0,045 RU („cut-off“ vrednost).

Nije primećena značajna veza između visoke/niske ekspresije *FAS-L* i određene prognostičke grupe (Fišer egzaktni test, $p=0,278$).

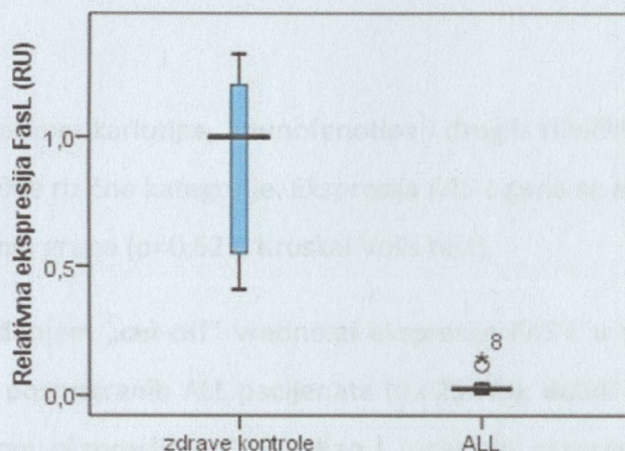
Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja pacijenata sa visokom i sa niskom ekspresijom *FAS-L*. Ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između ove 2 grupe pacijenata ($p=0,275$, Log Rank) (Slika 58.).



Slika 58. Kriva preživljavanja pacijenata sa niskom i visokom ekspresijom *FAS-L*. Broj pacijenata sa visokom *FasL* ekspresijom 17 (cenzurisani slučajevi 8), a sa niskom ekspresijom 18 (cenzurisani slučajevi 2).

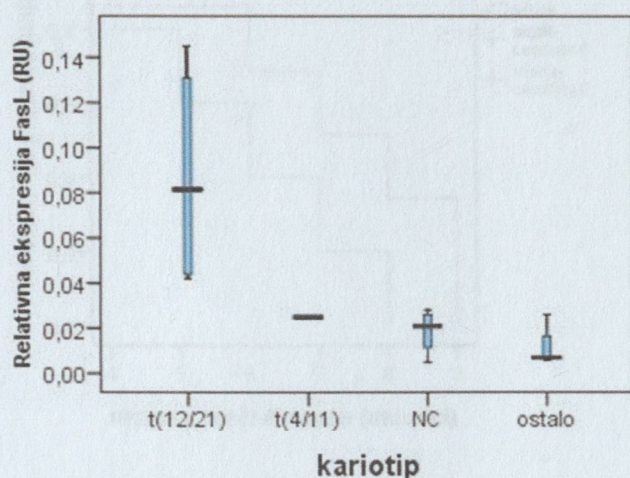
III - 6.2. Ekspresija gena za FAS-L kod obolelih od ALL

Nivo ekspresije *FAS-L* je ispitivan i kod pedijatrijskih pacijenata obolelih od ALL. Analizirano je 12 pacijenata i srednja vrednost ekspresije *FAS-L* bila je $0,041 \pm 0,013$, a medijana je iznosila 0,025 (0,05-0,145). Ovaj nivo ekspresije je značajno niži od onog nađenog među zdravim kontrolama (srednja vrednost $1,41 \pm 0,396$, medijana 1,053 (0,482-2,6) ($p=0,001$, U-test) (Slika 59.).



Slika 59. Box-plot grafički prikaz ekspresije *FAS-L* kod obolelih od dečije ALL i zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju medijane ekspresije.

Ekspresija *FAS-L* gena kod grupa sa različitim kariotipom je veoma različita, i na granici je statističke značajnosti ($p=0,055$, Kruskal-Volvis) (Slika 60.). Najviši nivo ekspresije je zapažen kod pacijenata nosilaca $t(12/21)$.

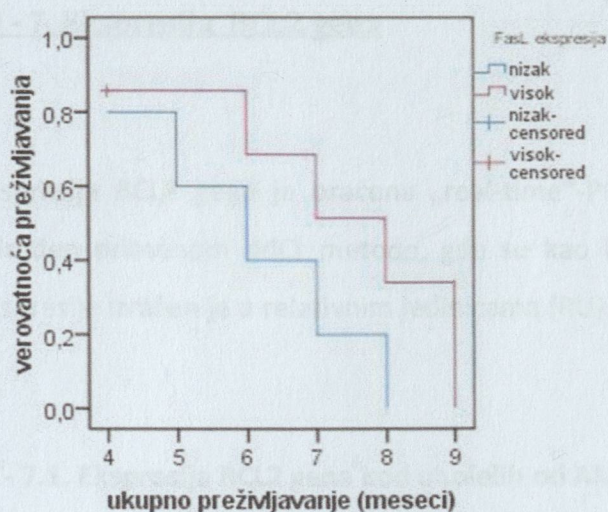


Slika 60. Box-plot grafički prikaz ekspresije FAS-L među pacijentima sa različitim kariotipom.

Na osnovu kariotipa, imunofenotipa i drugih kliničkih karakteristika pacijenti su podeljeni u različite rizične kategorije. Ekspresija *FAS-L* gena se nije značajno razlikovala između različitih rizičnih grupa ($p=0,527$, Kruskal Volis test).

Uvođenjem „cut-off“ vrednosti ekspresije *FAS-L* u vidu medijane ekspresije zapažene kod svih posmatranih ALL pacijenata (0,025 RU), dobili smo dve grupe pacijenata sa visokom i niskom ekspresijom *FAS-L*. Kao i u slučaju ekspresije *FAS* gena, raspodela visoko i nisko eksprimirajućih pacijenata bila je u potpunosti podjednaka kod svih grupa na osnovu čega smo zaključili da ne postoji povezanost visine *FAS-L* ekspresije i prognoze bolesti.

Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja ALL pacijenata sa visokom i sa niskom ekspresijom *FAS-L*. Ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između ove 2 grupe pacijenata ($p=0,166$, Log Rank) (Slika 61.).



Slika 61. Kriva preživljavanja ALL pacijenata sa niskom i visokom ekspresijom FAS-L. Broj pacijenata sa visokom FasL ekspresijom 7 (cenzurisani slučajevi 1), a sa niskom ekspresijom 5.

Sažetak

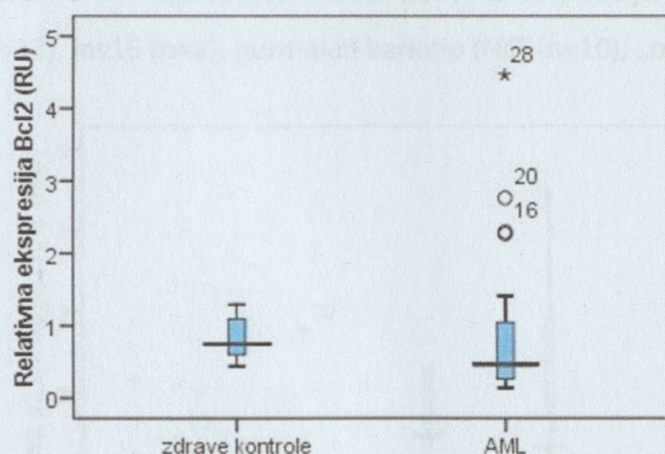
- Praćenjem ekspresije *FAS* gena kod obolelih od AML i pedijatrijske ALL, primećena je izrazita heterogenost. Nizak nivo ekspresije *FAS* je bio povezan sa $CD34^+$ statusom, ali nije imao uticaja na prognozu i ishod bolesti. Slično je dobijeno i prilikom ispitivanja nivoa ekspresije *FAS-L*, koja je bila izrazito niska, naročito kod obolelih od ALL. Heterogenost rezultati dobijenih ispitivanjem veličine odnosa *mFas/sFas* transkripta, samo su doprineli zaključku da poremećaj *FAS*-indukovane apoptoze nije esencijalan za proces leukemogeneze.

III - 7. Ekspresija BCL2 gena

Ekspresija *BCL2* 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).

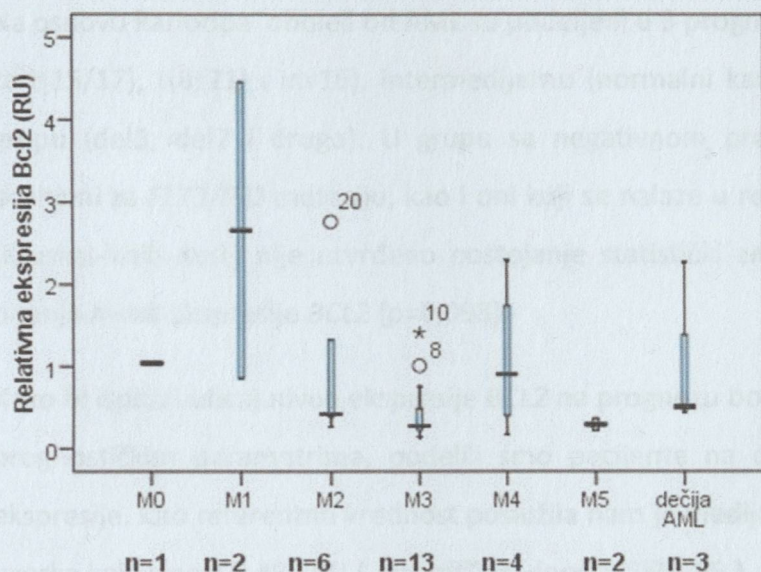
III - 7.1. Ekspresija BCL2 gena kod obolelih od AML

Analizirano je ukupno 31 pacijent oboleo od AML; 28 adultnih pacijenata (25 sa *de novo* AML i 3 pacijenta u relapsu bolesti), 3 pedijatrijska pacijenata i 11 uzoraka zdravih kontrola. Srednja vrednost ekspresije *BCL2* među obolelima je $0,846 \pm 0,170$, a medijana iznosi 0,485 (0,140-4,460). Ekspresija *BCL2* kod AML pacijenata nije statistički različita u odnosu na ekspresiju *BCL2* gena kod zdravih kontrola (srednja vrednost $0,839 \pm 0,087$, medijana 0,746 (0,442-1,291)) ($p=0,951$, U-test) (Slika 62.).



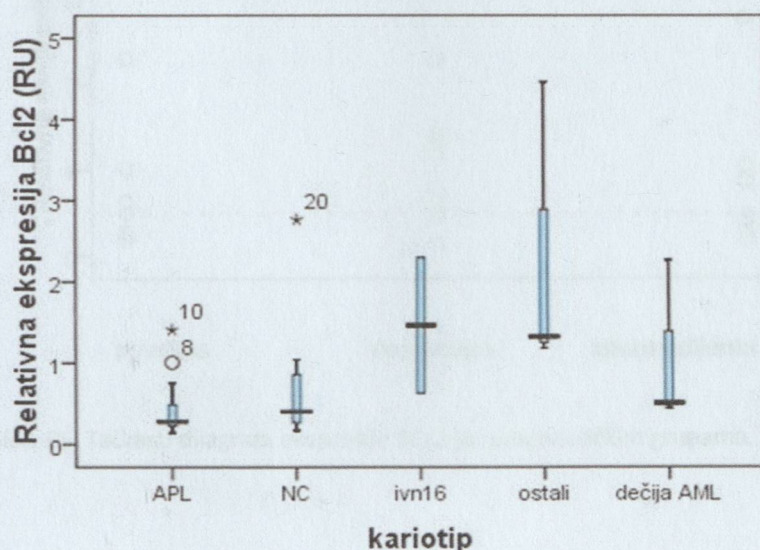
Slika 62. Box-plot grafički prikaz ekspresije BCL2 gena (RU) kod AML pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

Nivo ekspresije *BCL2* je različita kod različitih FAB grupa. Najveća medijana nivoa ekspresije je među pacijentima M1 grupe i iznosi 2,658, a najniža je kod M5 i M3 grupa pacijenata (0,293 i 0,279). Analizom varijanse (Kruskal-Volis test) nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između grupa (Slika 63.).



Slika 63. Box-plot grafički prikaz ekspresije *BCL2* (RU) po FAB grupama. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane. n – predstavlja broj pacijenata u grupi. Dečiji AML pacijenti su izdvojeni u posebnu grupu.

Na osnovu citogenetskih nalaza pacijenti su podeljeni u 3 grupe; APL tj. t(15/17) pozitivni (n=13), inv16 (n=2), normalan kariotip (NC) (n=10), „ostali“ (n=4) i pedijatrijska AML (n=3).

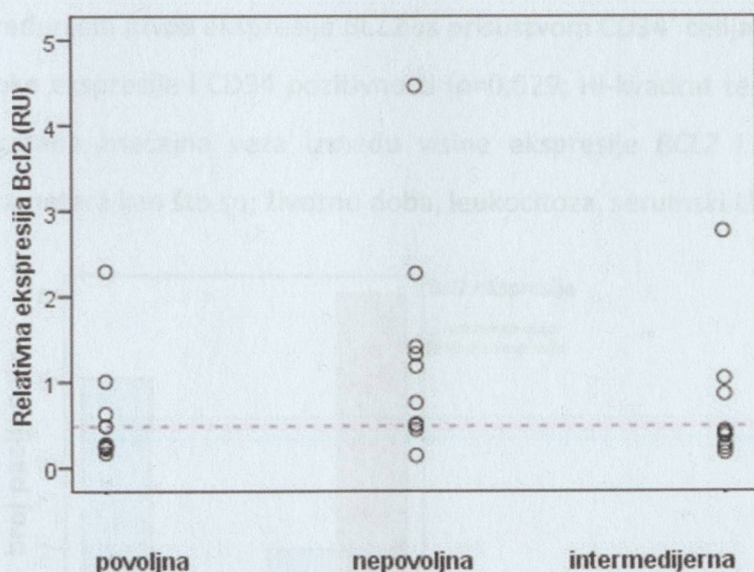


Slika 64. Box-plot grafički prikaz ekspresije *BCL2* na osnovu kariotipa pacijenata.

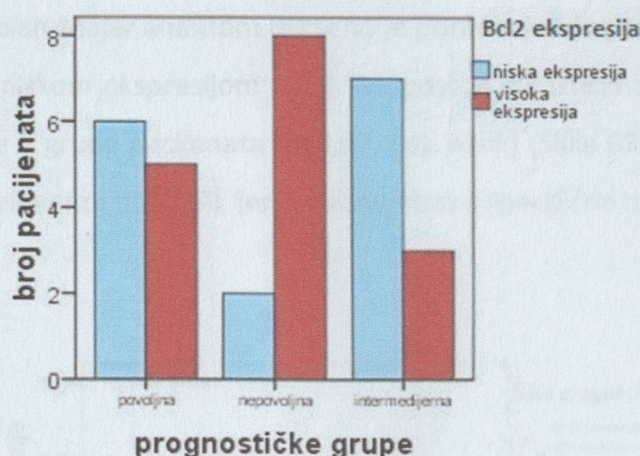
Analizom varijanse (Kruskal-Volis test) utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike između grupa sa različitim kariotipom ($p=0,047$). Najviša vrednost medijane je primećena u grupi pacijenata sa inv16 (1,461) i u grupi „ostali“ (1,32), a najniža kod grupe APL pacijenata pozitivnih za t(15/17) (0,279) (Slika 64.)

Na osnovu kariotipa oboleli od AML su podeljeni u 3 prognostičke grupe: povoljnu (pozitivni za t(15/17), t(8/21) i inv16), intermedijernu (normalni kariotip) i nepovoljnu prognostičku grupu (del5, del7 i drugo). U grupu sa negativnom prognozom uvršćeni su i pacijenti pozitivni za *FLT3/ITD* mutaciju, kao i oni koji se nalaze u relapsu bolesti. Analizom varijanse (Kruskal-Volis test) nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između grupa po pitanju nivoa ekspresije *BCL2* ($p=0,098$).

Kako bi ispitali uticaj nivoa ekspresije *BCL2* na prognozu bolesti, kao i povezanost sa drugim prognostičkim parametrima, podelili smo pacijente na one sa visokim i niskim nivoom ekspresije. Kao referentna vrednost poslužila nam je medijana vrednosti ekspresije ukupnog uzorka koja iznosi 0,485 RU („cut-off“ vrednost) (Slika 65.).



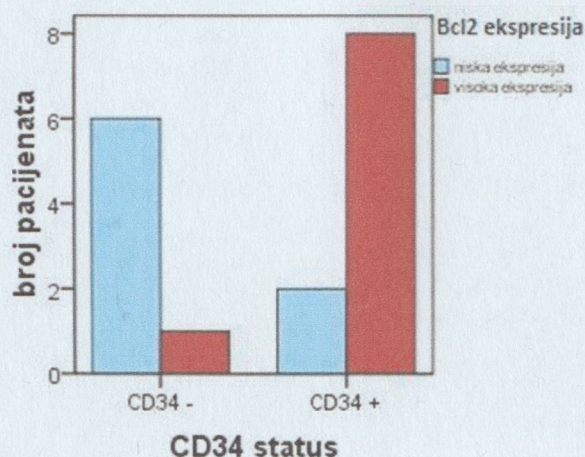
Slika 65. Tačkasti dijagram ekspresije *BCL2* po prognostičkim grupama. „Cut-off“ vrednost je 0,485 RU.



Slika 66. Grafički prikaz raspodele pacijenata po prognostičkim grupama u odnosu na visoki odnosno nizak nivo ekspresije BCL2.

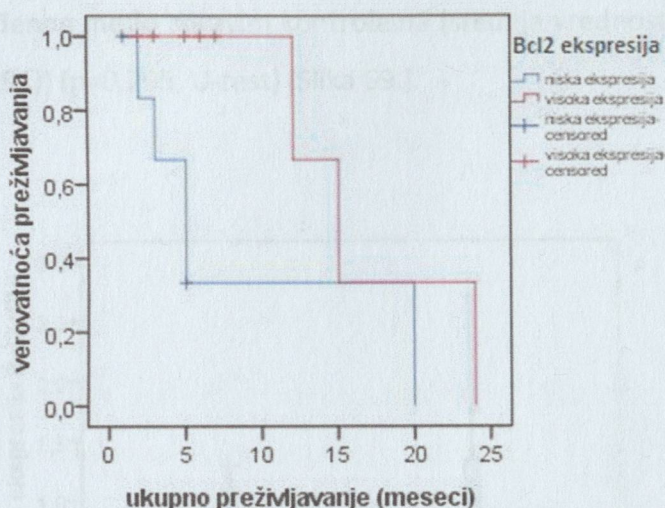
U povoljnoj prognostičkoj grupi 6/11 pacijenata imalo je nizak nivo *BCL2* ekspresije, u intermedijernoj 3/10, dok su pacijenti sa nepovoljnom prognozom većinom imali visak nivo ekspresije *BCL2* 8/10 (Slika 66.). Bez obzira na jasnu tendenciju povezanosti visokog nivoa *BCL2* ekspresije i loše prognoze, statistička analiza (Fišerov egzaktni test) nije pokazala značajnost ($p=0,09$).

Poređenjem nivoa ekspresije *BCL2* sa prisustvom $CD34^{+}$ ćelija našli smo značajnu povezanost visoke ekspresije i $CD34$ pozitivnosti ($p=0,029$; Hi-kvadrat test nezavisnosti) (Slika 67.). Nije pokazana značajna veza između visine ekspresije *BCL2* i drugih prognostički značajnih parametara kao što su; životno doba, leukocitoza, serumski LDH.



Slika 67. Grafički prikaz zavisnosti prisustva $CD34^{+}$ ćelija i nivoa ekspresije BCL2. Podaci o $CD34^{+}$ su bili dostupni za 17/31 pacijenata.

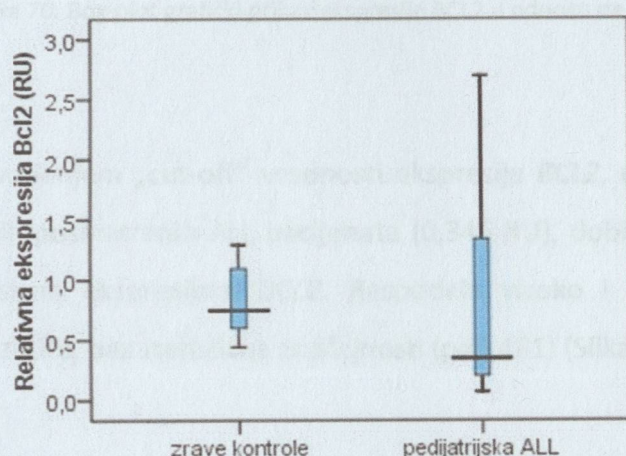
Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja pacijenata sa visokom i sa niskom ekspresijom *BCL2*. Ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između ove 2 grupe pacijenata ($p=0,07$, Log Rank) (Slika 68.). U ovu analizu nisu uključeni pacijenti pozitivni za $t(15/17)$, jer oni zbog visoko specifične terapije imaju bolje preživljavanje.



Slika 68. Kriva preživljavanja pacijenata sa niskim i sa visokim nivoom ekspresije *BCL2*. Broj visoko ekspimirajućih pacijenata 8 (cenzurirani slučajevi 5), a nisko ekspimirajućih 7 (cenzurirani slučajevi 2).

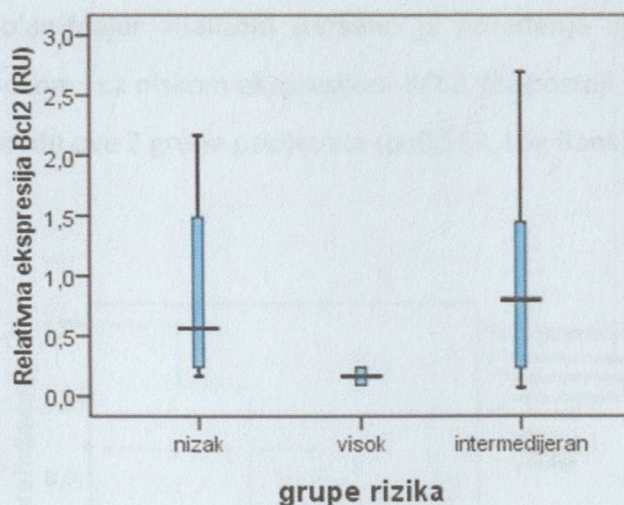
III - 7.2. Ekspresija BCL2 gena kod obolelih od ALL

Nivo ekspresije *BCL2* je ispitivan i kod pedijatrijskih pacijenata obolelih od ALL. Analizirano je 12 pacijenata i srednja vrednost ekspresije *BCL2* bila je $0,820 \pm 0,254$, a medijana je iznosila 0,346 (0,07-2,694). Ovaj nivo ekspresije se nije statistički značajno razlikovao od onog nađenog među zdravim kontrolama (srednja vrednost $0,839 \pm 0,087$, medijana 0,746 (0,442-1,291)) ($p=0,295$, U-test) (Slika 69.).



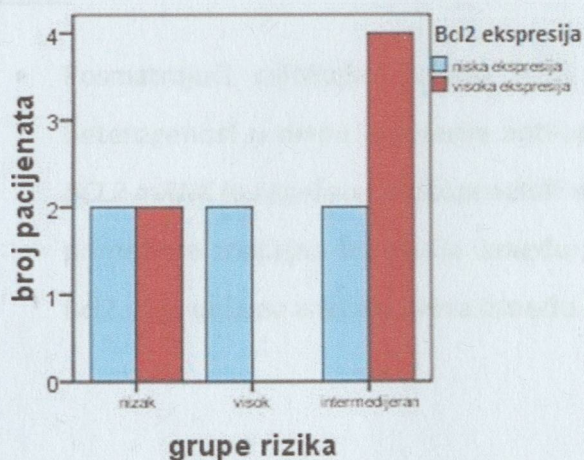
Slika 69. Box-plot grafički prikaz ekspresije BCL2 gena (RU) kod pedijatrijskih ALL pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

Ekspresija BCL2 gena kod grupa sa različitim kariotipom se nije značajno razlikovala ($p=0,346$ Kruskal-Voliss). Podelom pacijenata na različite kategorije rizika, primećeno je da je najniža ekspresija prisutna kod grupe pacijenata sa visokim rizikom, ali bez statističke značajnosti ($p=0,435$) (Slika 70.).



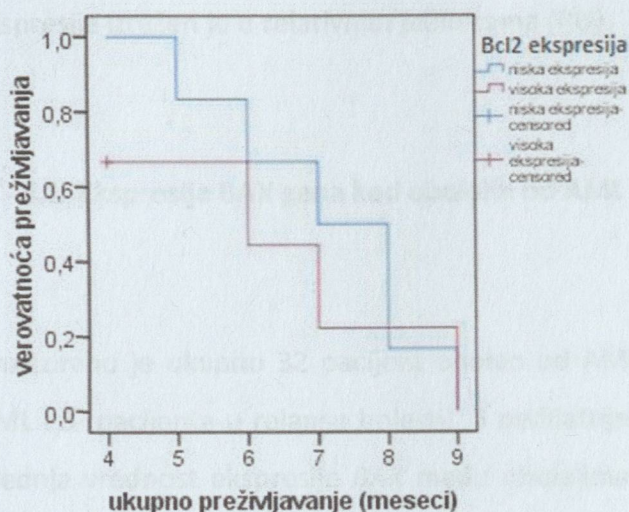
Slika 70. Box-plot grafički prikaz ekspresije BCL2 u odnosu na pojedine grupe rizika.

Uvođenjem „cut-off“ vrednosti ekspresije *BCL2*, u vidu medijane ekspresije zapažene kod svih posmatranih ALL pacijenata (0,346 RU), dobili smo dve grupe pacijenata sa visokom i niskom ekspresijom *BCL2*. Raspodela visoko i nisko eksprimirajućih pacijenata bila je različita, bez statističke značajnosti ($p=0,481$) (Slika 71.).



Slika 71. Raspodela BCL2 visoko i nisko eksprimirajućih pacijenata po kategorijama rizika.

Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja ALL pacijenata sa visokom i sa niskom ekspresijom *BCL2*. Ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između ove 2 grupe pacijenata ($p=0,563$, Log Rank) (Slika 72.).



Slika 72. Kriva preživljavanja ALL pacijenata sa niskom i visokom ekspresijom *BCL2*. Broj pacijenata sa visokom *BCL2* ekspresijom 6 (cenzurisani slučajevi 1), a sa niskom ekspresijom 6.

Sažetak

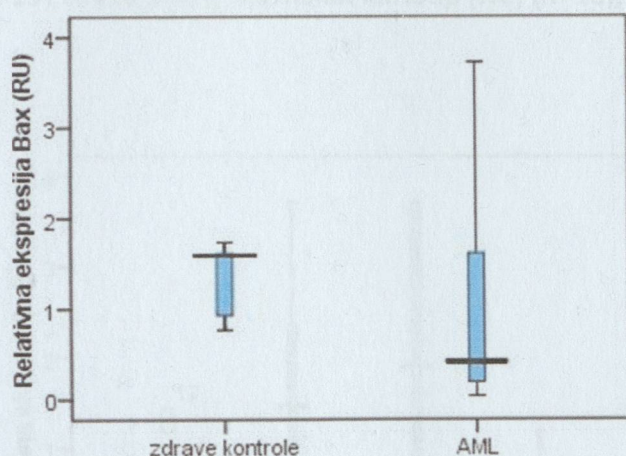
- Posmatrajući celokupan uzorak AML i ALL pacijenata, primećena je izuzetna heterogenost u nivou ekspresije anti-apoptotskog *BCL2* gena. Povećanje ekspresije *BCL2 mRNK* je zapaženo u citogenetski nepovoljnoj grupi AML pacijenata, a takođe je primećena značajna korelacija između prisustva $CD34^+$ ćelija i povećane ekspresije *Bcl2*. Nije uočena značajna veza između ekspresije *BCL2* i prognoze i ishoda bolesti.

III - 8. Ekspresija BAX gena

Ekspresija *BAX* 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).

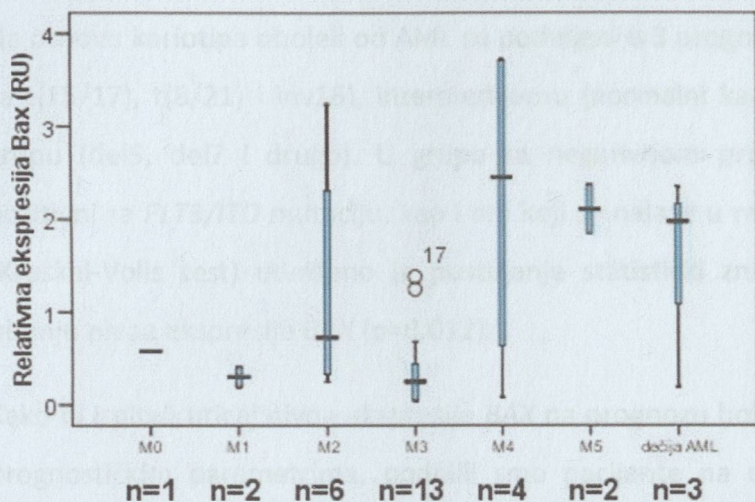
III - 8.1. Ekspresija BAX gena kod obolelih od AML

Analizirano je ukupno 32 pacijent oboleo od AML; 28 adultnih pacijenata (25 sa *de novo* AML i 3 pacijenta u relapsu bolesti), 3 pedijatrijska pacijenta i 5 uzoraka zdravih kontrola. Srednja vrednost ekspresije *BAX* među obolelima je $1,003 \pm 0,203$, a medijana iznosi 0,410 (0,036-3,717). Ekspresija *BAX* kod AML pacijenata nije statistički različita u odnosu na ekspresiju *BAX* gena kod zdravih kontrola (srednja vrednost $1,325 \pm 0,0198$, medijana 1,591 (0,765-1,735)) ($p=0,177$, U-test) (Slika 73.).



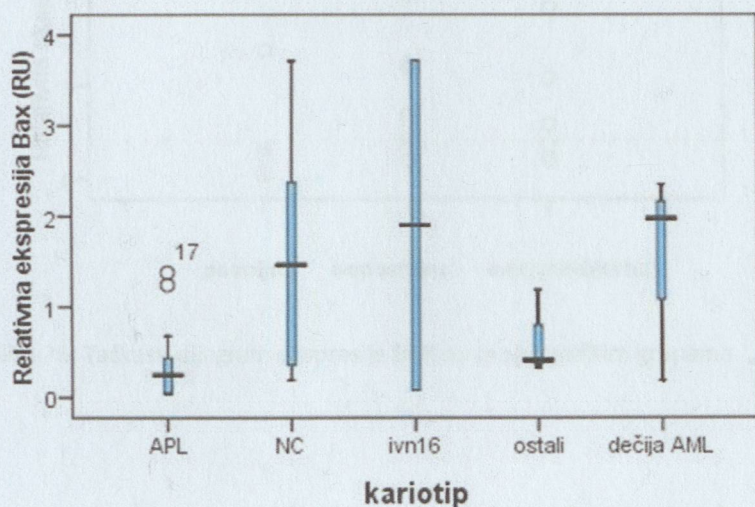
Slika 73. Box-plot grafički prikaz ekspresije BAX gena (RU) kod AML pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

Nivo ekspresije *BAX* je različita kod različitih FAB grupa. Najveća medijana nivoa ekspresije je među pacijentima M4 grupe i iznosi 2,449, a najniža je kod M1 i M3 grupa pacijenata (0,301 i 0,250). Analizom varijanse (Kruskal-Voliz test) nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između grupa (Slika 74.).



Slika 74. Box-plot grafički prikaz ekspresije BAX (RU) po FAB grupama. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane. n – predstavlja broj pacijenata u grupi. Dečiji AML pacijenti su izdvojeni u posebnu grupu.

Na osnovu citogenetskih nalaza pacijenti su podeljeni u 3 grupe: APL tj. t(15/17) pozitivni (n=13), inv16 (n=2), normalan kariotip (NC) (n=10), „ostali“ (n=4) i pedijatrijska AML (n=3).

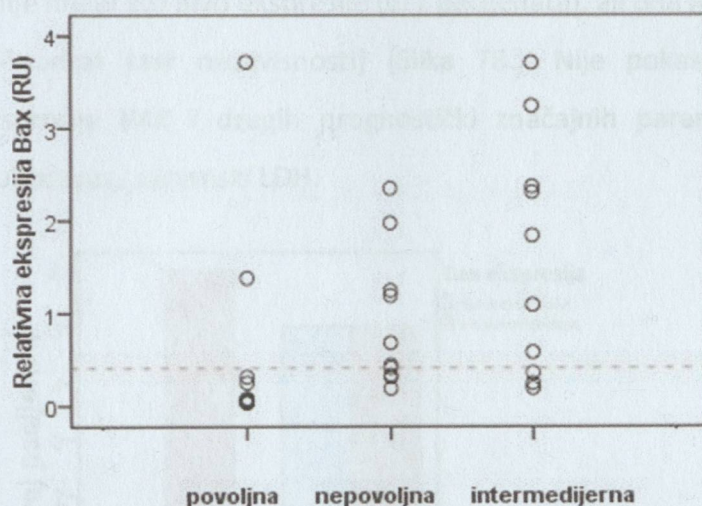


Slika 75. Box-plot grafički prikaz ekspresije BAX na osnovu kariotipa pacijenata.

Analizom varijanse (Kruskal-Volis test) nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između grupa sa različitim kariotipom. Najniža vrednost medijane zapažena je među APL pacijentima (0,250), a najviša među pacijentima sa inv16 (1,898) (Slika 75.)

Na osnovu kariotipa oboleli od AML su podeljeni u 3 prognostičke grupe; povoljnu (pozitivni za t(15/17), t(8/21) i inv16), intermedijernu (normalni kariotip) i nepovoljnu prognostičku grupu (del5, del7 i drugo). U grupu sa negativnom prognozom uvršćeni su i pacijenti pozitivni za *FLT3/ITD* mutaciju, kao i oni koji se nalaze u relapsu bolesti. Analizom varijanse (Kruskal-Volis test) utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike između grupa po pitanju nivoa ekspresije *BAX* ($p=0,012$).

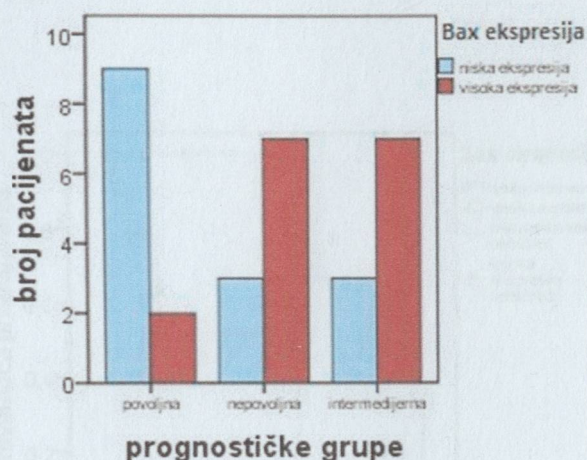
Kako bi ispitali uticaj nivoa ekspresije *BAX* na prognozu bolesti, kao i povezanost sa drugim prognostičkim parametrima, podelili smo pacijente na one sa visokim i niskim nivoom ekspresije. Kao referentna vrednost poslužila nam je medijana vrednosti ekspresije ukupnog uzorka koja iznosi 0,410 RU („cut-off“ vrednost) (Slika 76.).



Slika 76. Tačkasti dijagram ekspresije *BAX* po prognostičkim grupama. „Cut-off“ vrednost je 0,410 RU.

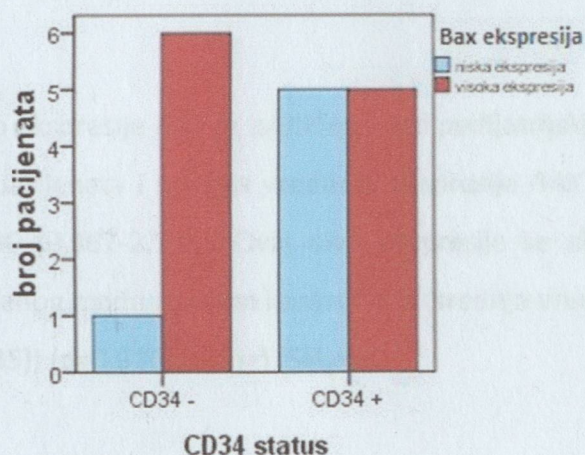
U povoljnoj prognostičkoj grupi 9/11 pacijenata imalo je nizak nivo *BAX* ekspresije, u intermedijernoj 6/10, dok su pacijenti sa nepovoljnom prognozom većinom imali visak nivo

ekspresije BAX 7/10 (Slika 77.). Statistička analiza (Fišerov egzaktni test) pokazala je značajnu razliku između prognoze bolesti i nivoa ekspresije BAX gena ($p=0,039$).



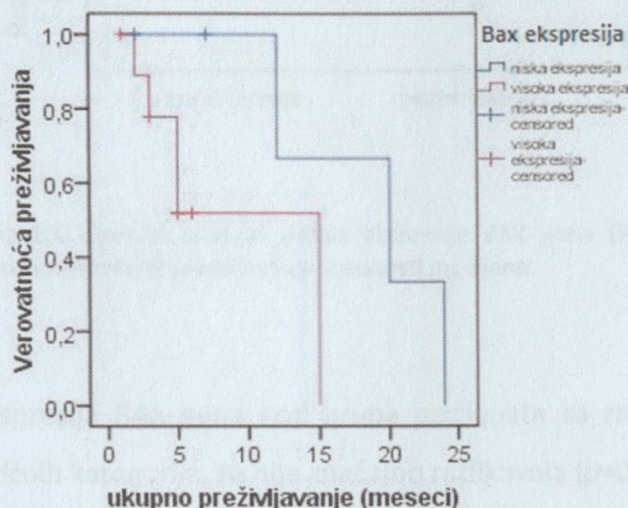
Slika 77. Grafički prikaz raspodele pacijenata po prognostičkim grupama u odnosu na visoki odnosno nizak nivo ekspresije BAX.

Izučavanjem nivoa ekspresije BAX gena kod CD34⁺ ćelija, primećena je tendencija da CD34⁻ ćelije imaju viši nivo ekspresije (6/7 pacijenata), ali ona nije bila statistički značajna ($p=0,317$; Hi-kvadrat test nezavisnosti) (Slika 78.). Nije pokazana značajna veza između visine ekspresije BAX i drugih prognostički značajnih parametara kao što su; životno doba, leukocitoza, serumski LDH.



Slika 78. Grafički prikaz zavisnosti prisustva CD34⁺ ćelija i nivoa ekspresije BAX. Podaci o CD34⁺ su bili dostupni za 17/31 pacijenata.

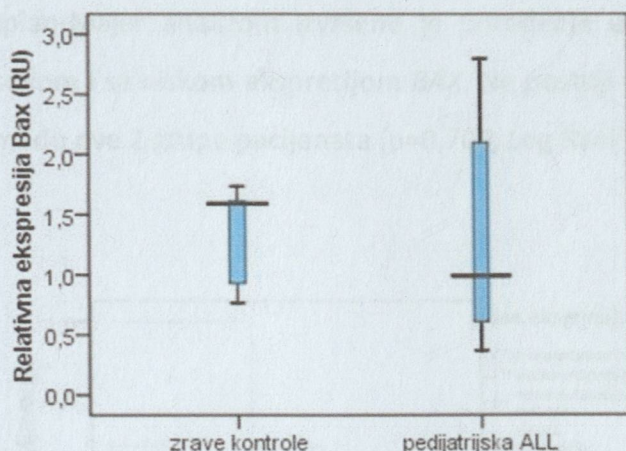
Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja pacijenata sa visokom i sa niskom ekspresijom *BAX*. Ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između ove 2 grupe pacijenata ($p=0,093$, Log Rank) (Slika 79.). U ovu analizu nisu uključeni pacijenti pozitivni za $t(15/17)$, jer oni zbog visoko specifične terapije imaju bolje preživljavanje.



Slika 79. Kriva preživljavanja pacijenata sa niskim i sa visokim nivoom ekspresije *BAX*. Broj visoko ekspimirajućih pacijenata 8 (cenzurisani slučajevi 5), a nisko ekspimirajućih 7 (cenzurisani slučajevi 2).

III - 8.2. Ekspresija *BAX* gena kod obolelih od ALL

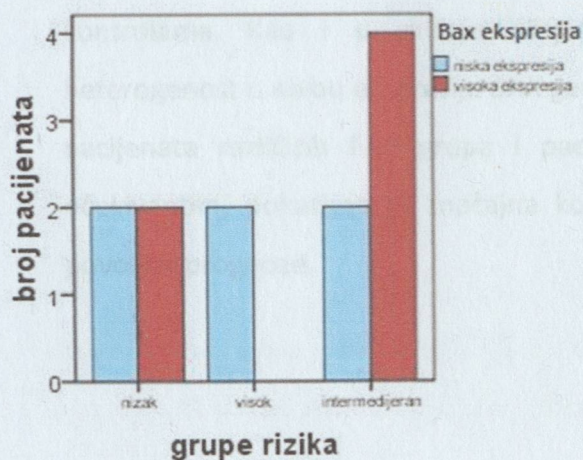
Nivo ekspresije *BAX* je ispitivan i kod pedijatrijskih pacijenata obolelih od ALL. Analizirano je 12 pacijenata i srednja vrednost ekspresije *BAX* bila je $1,331 \pm 0,250$, a medijana je iznosila 0,990 (0,367-2,795). Ovaj nivo ekspresije se nije statistički značajno razlikovao od onog nađenog među zdravim kontrolama (srednja vrednost $1,325 \pm 0,1989$, medijana 1,591 (0,765-1,735)) ($p=0,916$, U-test) (Slika 80.).



Slika 80. Box-plot grafički prikaz ekspresije BAX gena (RU) kod ALL pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

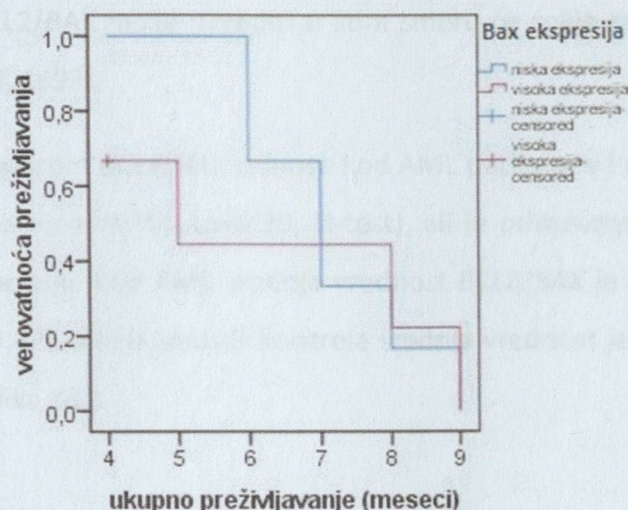
Ekspresija BAX gena kod grupa pacijenata sa različitim kariotipom, odnosno iz različitih rizičnih kategorija, se nije značajno razlikovala ($p=0,776$, $p=0,558$, Kruskal-Volis test).

Uvođenjem „cut-off“ vrednosti ekspresije BAX u vidu medijane ekspresije zapažene kod svih posmatranih ALL pacijenata (0,990 RU), dobili smo dve grupe pacijenata sa visokom i niskom ekspresijom BAX. Raspodela visoko i nisko eksprimirajućih pacijenata bila je u bila je različita, bez statističke značajnosti ($p=0,481$) (Slika 81.).



Slika 81. Raspodela BAX visoko i nisko eksprimirajućih pacijenata po kategorijama rizika.

Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja ALL pacijenata sa visokom i sa niskom ekspresijom *BAX*. Ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između ove 2 grupe pacijenata ($p=0,700$, Log Rank) (Slika 82.).



Slika 82. Kriva preživljavanja ALL pacijenata sa niskom i visokom ekspresijom *Bax*. Broj pacijenata sa visokom *Bax* ekspresijom 6 (cenzurisani slučajevi 1), a sa niskom ekspresijom 6.

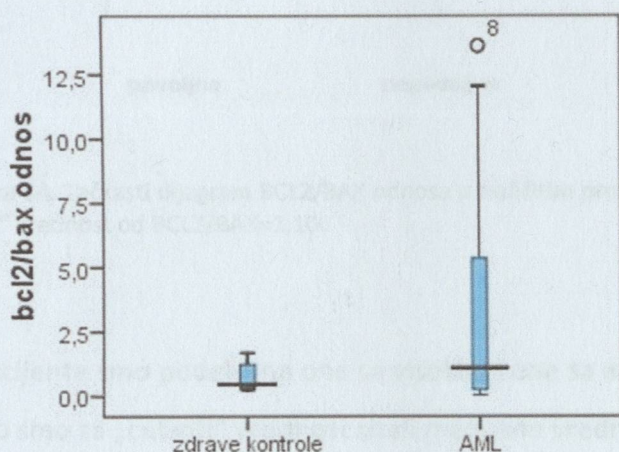
Sažetak

- Ispitivanje ekspresije pro-apoptotskog *BAX* gena kod obolelih od akutne leukemije je pokazalo da je ona bila niža ili se nije razlikovala od nivoa detektovanog u zdravim kontrolama. Kao i u slučaju ekspresije *BCL2* gena, primećena je izuzetna heterogenost u nivou ekspresije *BAX* gena, tako da nije bilo značajnih razlika između pacijenata različitih FAB grupa i pacijenata sa različitim kariotipom. Suprotno očekivanom, pokazana je značajna korelacija između smanjene ekspresije *BAX* i povoljne prognoze.

III - 9. Određivanje odnosa ekspresije BCL2/BAX kod obolelih od AML i ALL

Poznato je da su BCL2 i BAX sposobni da međusobno interaguju formirajući homo- i heterodimere i na taj način vrše modulaciju apoptotskog procesa. Pretpostavlja se da odnos BCL2/BAX može odrediti u kom smeru će ćelija odreagovati na apoptotski stimulus (Oltvai ZN, 1993).

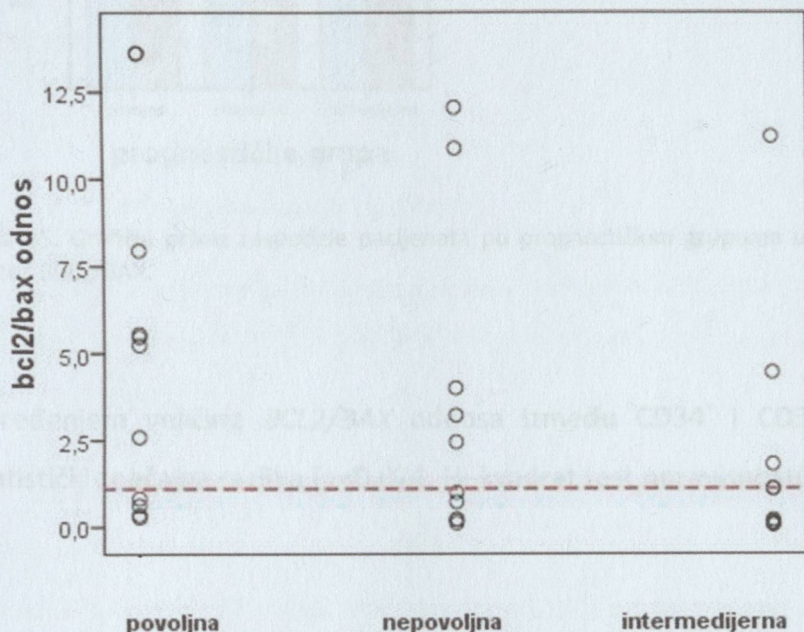
Analizom BCL2/BAX odnosa kod AML pacijenata i zdravih kontrola nije primećena statistički značajna razlika ($p=0,39$, U-test), ali je primećena tendencija višeg BCL2/BAX odnosa kod obolelih. Kod AML srednja vrednost BCL2/BAX je iznosila $3,585 \pm 0,789$, medijana 1,1 (0,05-13,62), a kod zdravih kontrola srednja vrednost je $0,796 \pm 0,282$, medijana 0,470 (0,25-1,69) (Slika 83.).



Slika 83. Box-plot grafički prikaz BCL2/BAX odnosa kod AML pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

Nije primećena značajna razlika u BCL2/BAX odnosu između različitih FAB grupa (najviši kod M1 grupe, najniži u M5 grupi pacijenata), kao ni kod različitih citogenetskih grupa (najviši kod pacijenata sa inv16, a najniži kod pedijatrijskih AML pacijenata).

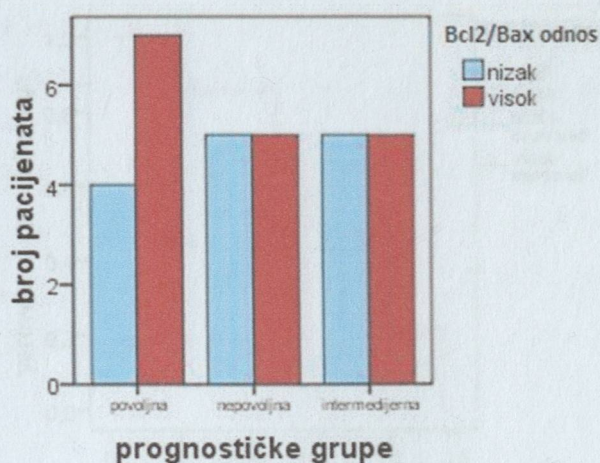
Podelom pacijenata na 3 prognostičke grupe, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između grupa (najviša kod prognostički povoljne grupe, a najniža kod intermedijerne grupe) (Slika 84.).



Slika 84. Tačkasti dijagram BCL2/BAX odnosa u različitim prognostičkim grupama. Crvena linija pretstavlja „cut-off“ vrednost od BCL2/BAX=1,10.

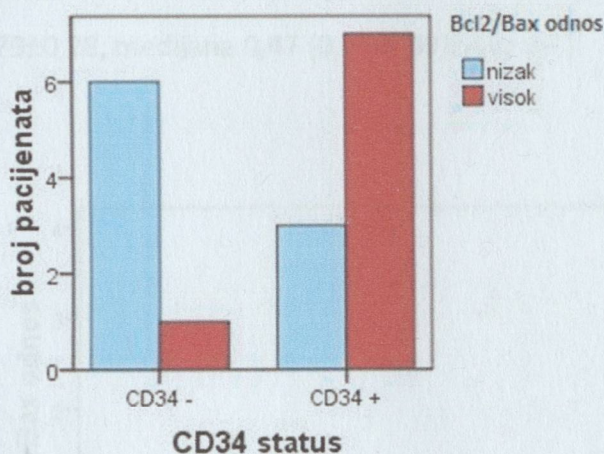
Pacijente smo podelili na one sa visokim i one sa niskim vrednostima BCL2/BAX odnosa, tako što smo za „cut-off“ vrednost uzeli medijanu vrednosti BCL2/BAX u AML pacijentima.

U povoljnoj prognostičkoj grupi 7/11 pacijenata imalo je visok BCL2/BAX odnos, u intermedijernoj i grupi sa nepovoljnom prognozom broj pacijenata sa visokim i niskim BCL2/BAX odnosom je bio potpuno izjednačen (Slika 85.). Statistička analiza (Fišerov egzaktni test) nije pokazala razliku između prognoze bolesti i BCL2/BAX odnosa.



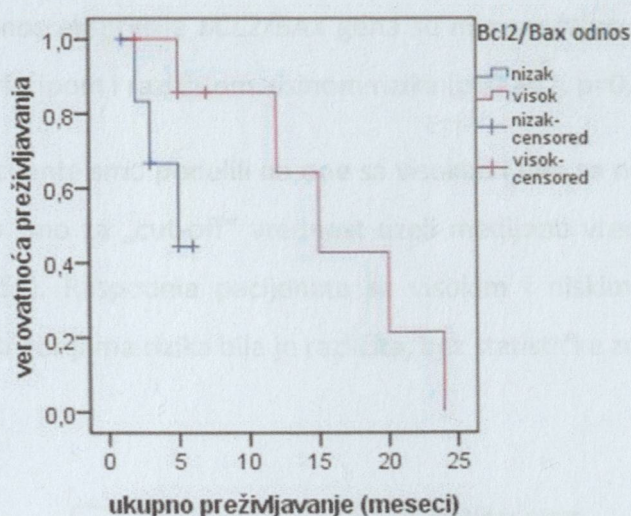
Slika 85. Grafički prikaz raspodele pacijenata po prognostičkim grupama u odnosu na visoki odnosno niski odnos BCL2/BAX.

Poređenjem veličine *BCL2/BAX* odnosa između $CD34^+$ i $CD34^-$ pacijenata, pokazana je statistički značajna razlika ($p=0,024$; Hi-kvadrat test nezavisnosti) (Slika 86.).



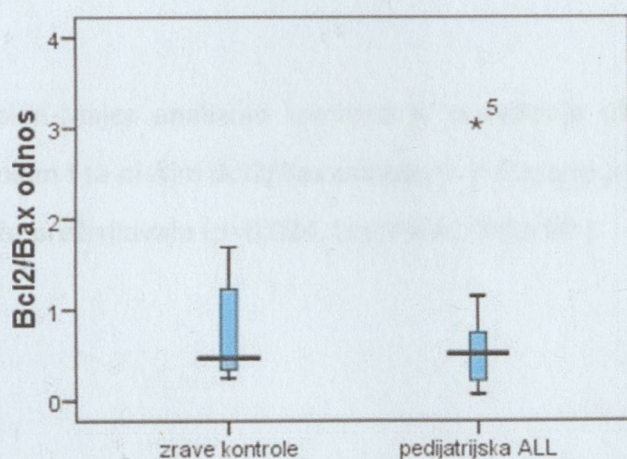
Slika 86. Grafički prikaz zavisnosti prisustva $CD34^+$ ćelija i veličine BCL2/BAX odnosa. Podaci o $CD34^+$ su bili dostupni za 17/31 pacijenata.

Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja pacijenata sa visokom i sa niskom *BCL2/BAX* odnosom. Ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između ove 2 grupe pacijenata ($p=0,09$, Log Rank) (Slika 87.). U ovu analizu nisu uključeni pacijenti pozitivni za $t(15/17)$, jer oni zbog visoko specifične terapije imaju bolje preživljavanje.



Slika 87. Kriva preživljavanja pacijenata sa niskim i sa visokim BCL2/BAX odnosom. Broj pacijenata sa visokim BCL2/BAX odnosom 8 (cenzurisani slučajevi 3), a sa niskim BCL2/BAX 7 (cenzurisani slučajevi 4).

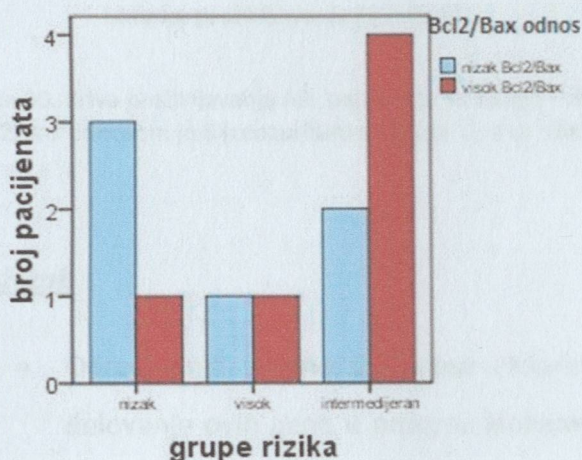
Analizom *BCL2/BAX* odnosa kod pedijatrijskih ALL pacijenata i zdravih kontrola nije primećena statistički značajna razlika ($p=0,598$, U-test). Kod ALL srednja vrednost *BCL2/BAX* je iznosila $0,69 \pm 0,23$, medijana 0,51 (0,7-3,04), a kod zdravih kontrola srednja vrednost je $0,79 \pm 0,28$, medijana 0,47 (0,25-1,69)(Slika 88.).



Slika 88. Box-plot grafički prikaz BCL2/BAX odnosa kod ALL pacijenata i kod zdravih kontrola. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

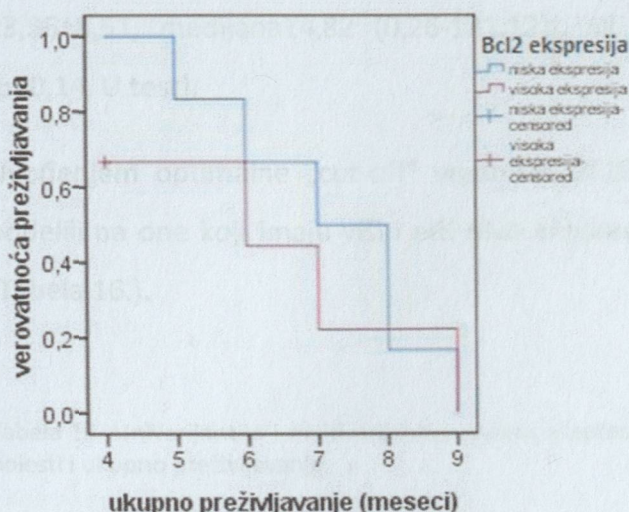
Odnos ekspresije *BCL2/BAX* gena se nije značajno razlikovao između pacijenata sa različim kariotipom i različitom visinom rizika ($p=0,447$, $p=0,663$, Kruskal-Volis).

Pacijente smo podelili na one sa visokim i one sa niskim vrenostima *BCL2/BAX* odnosa, tako što smo za „cut-off“ vrednost uzeli medijanu vrednosti *BCL2/BAX* među ALL pacijentima (0,51). Raspodela pacijenata sa visokim i niskim *BCL2/BAX* odnosom među određenim kategorijama rizika bila je različita, bez statističke značajnosti ($p=0,740$) (Slika 89.).



Slika 89. Grafički prikaz raspodele ALL pacijenata po prognostičkim grupama u odnosu na visoki odnosno niski odnos *BCL2/BAX*.

Kaplan-Majer analizom izvršeno je poređenje ukupnog preživljavanja ALL pacijenata sa visokim i sa niskim *Bcl2/Bax* odnosom. Pokazano je da pacijenti sa nižim *BCL2/BAX* odnosom duže preživljavaju ($p=0,024$, Log Rank) (Slika 90.).



Slika 90. Kriva preživljavanja ALL pacijenata sa niskim i visokim BCL2/BAX odnosom. Broj pacijenata sa visokom Bcl2/Bax odnosom je 6 (cenzurisani slučajevi 1), a sa niskim odnosom 6.

Sažetak

- Određivanje vrednosti odnosa ekspresije *BCL2/BAX* nije razjašnjeno pojedinačno delovanje ovih gena u procesu leukemogeneze, već je samo doprinelo zaključku da iako *BCL2* i *BAX* predstavljaju snažne supresore, odnosno aktivatore procesa apoptoze, oni predstavljaju samo jedan od brojnih faktora koji određuju krajnju sudbinu ćelije.

III - 10. Ekspresija BCL2L12 gena

Ekspresija *BCL2L12* gena je praćena „real-time“-PCR metodom. Relativni nivo ekspresije je određen primenom ddCt metode, gde je kao kalibrator korišćena HL60 ćelijska linija. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama (RU).

Analizom je obuhvaćeno 40 pacijenata obolelih od *de novo* AML i 21 uzorak zdravih kontrola. Srednja vrednost ekspresije među obolelima iznosi $18,82 \pm 4,77$, medijana 5,75 (0,17-163,69), i bila je niža od *BCL2L12* ekspresije nađene među zdravim kontrolama (srednja

23,56±8,51, medijana 14,82 (0,26-181,12)), ali ta razlika nije pokazala statistički značaj ($p=0,14$, U test).

Uvođenjem optimalne „cut-off“ vrednosti *BCL2L12* ekspresije od 3,42 RU, pacijente smo podelili na one koji imaju viši i niži nivo ekspresije, odnosno *BCL2L12*⁺ i *BCL2L12*⁻ pacijente (Tabela 16.).

Tabela 16. Univarijantna i multivarijantna analiza ekspresije *BCL2L12* u odnosu na preživljavanje bez znakova bolesti i ukupno preživljavanje.

	preživljavanje bez znakova bolesti			ukupno preživljavanje		
	FR ^a	95% CI ^b	p vrednost	FR ^a	95% CI ^b	p vrednost
univarijantna analiza						
BCL2L12						
Negativni	1,00			1,00		
Pozitivni	3,42	1,49-7,84	0,004	3,14	1,36-7,23	0,007
BCL2L12						
Negativni	1,00			1,00		
Pozitivni	1,14	0,59-2,21	0,68	1,34	0,65-2,76	0,42
BCL2L12						
Negativni	1,00			1,00		
pozitivni	1,67	0,78-3,58	0,18	2,83	1,077-7,45	0,035
kao kontinuirana promenljiva	1,014	1,002-1,026	0,023	1,017	1,005-1,030	0,007
multivarijantna analiza^c						
BCL2L12						
negativni	1,00			1,00		
pozitivni	3,56	1,29-9,83	0,014	2,51	0,83-7,63	0,10
kao kontinuirana promenljiva	1,009	0,99-1,024	0,240	1,011	0,99-1,027	0,210

^aFaktor rizika (FR) koji je određen upotrebom Cox proporcionalnog rizik regresivnog modela; ^bCI-Confidence interval procenjen za FR; ^cMultivarijantni model je primenjen za starost pacijenta, hemoragijski sindrom, splenomegaliju, hepatomegaliju, CD33, CD34 i CD117.

Od 40 AML pacijenata, 10 (25%) je bilo *BCL2L12*⁺ a 30 (75%) je bilo *BCL2L12*⁻ (Tabela 17.).

Tabela 17. Povezanost BCL2L12 statusa sa kliničko-patološkim parametrima.

		Broj pacijenata(%)		
	ukupno	BCL2L12 ⁻	BCL2L12 ⁺	p vrednost
Pol				
Žene	18	16(88,9)	2(11,1)	0,15 ^b
Muškarci	22	14(63,6)	8(36,4)	
Starost (godine)				
<40	10	6(60)	4(40)	0,27 ^c
40-60	21	17(81)	4(19)	
>60	9	8(88,9)	1(11,1)	
Hemoragični sindrom				
Prisutan	25	18(72)	7(28)	0,44 ^b
Odsutan	15	13(86,7)	2(13,3)	
Splenomegalija				
Prisutna	26	23(88,5)	3(11,5)	0,044 ^b
Odsutna	14	8(57,1)	6(42,9)	
Hepatomegalija				
Prisutna	26	22(84,6)	4(15,4)	0,23 ^b
Odsutna	14	9(64,3)	5(35,7)	
FAB klasifikacija				
M0	4	3(75)	1(25)	0,31 ^c
M1	5	3(60)	2(40)	
M2	9	6(66,7)	3(33,3)	
M3	6	6(100)	0(0)	
M4	8	6(75)	2(25)	
M5	5	4(80)	1(20)	
M6	1	0(0)	1(100)	
Bifenotipska	2	2(100)	0(0)	
CD33				
Negativan	6	5(83,3)	1(16,7)	0,56 ^b
Pozitivan	32	24(75)	8(25)	
CD34				
Negativan	16	11(68,8)	5(31,3)	0,45 ^b
Pozitivan	22	18(81,8)	4(18,2)	
CD117				
Negativan	24	21(87,5)	3(12,5)	0,032 ^b
Pozitivan	16	9(56,3)	7(43,8)	
Odgovor na hemoterapiju				
bez odgovora	9	4(44,4)	5(55,6)	0,034 ^a
parcijalni odgovor	5	4(80)	1(20)	
kompletan odgovor	24	21(87,5)	3(12,5)	

^a „cut-off“ vrednost od 25 RU (75% ukupne ekspresije); ^bFišerov egzaktni test; ^cHi-kvadrat test

U pokušaju da utvrdimo povezanost *BCL2L12* ekspresije sa kliničkim i citomorfološkim parametrima pacijenata, utvrdili smo statistički značajnu povezanost *BCL2L12* sa prisustvom splenomegalije ($p=0,0449$). Od 26 pacijenata kod kojih je utvrđeno prisustvo splenomegalije 23 (88,5%) bilo *BCL2L12*⁻, a samo 3 (11,5%) je bilo *BCL2L12*⁺.

Kod CD117 negativnih pacijenata, 21 pacijent (87,5%) je bio *BCL2L12*⁻, a 3 (12,5%) pacijenta su bila *BCL2L12*⁺, što je ukazivalo na postojanje statistički značajne veze između *BCL2L12* ekspresije i CD117 ekspresije ($p=0,032$).

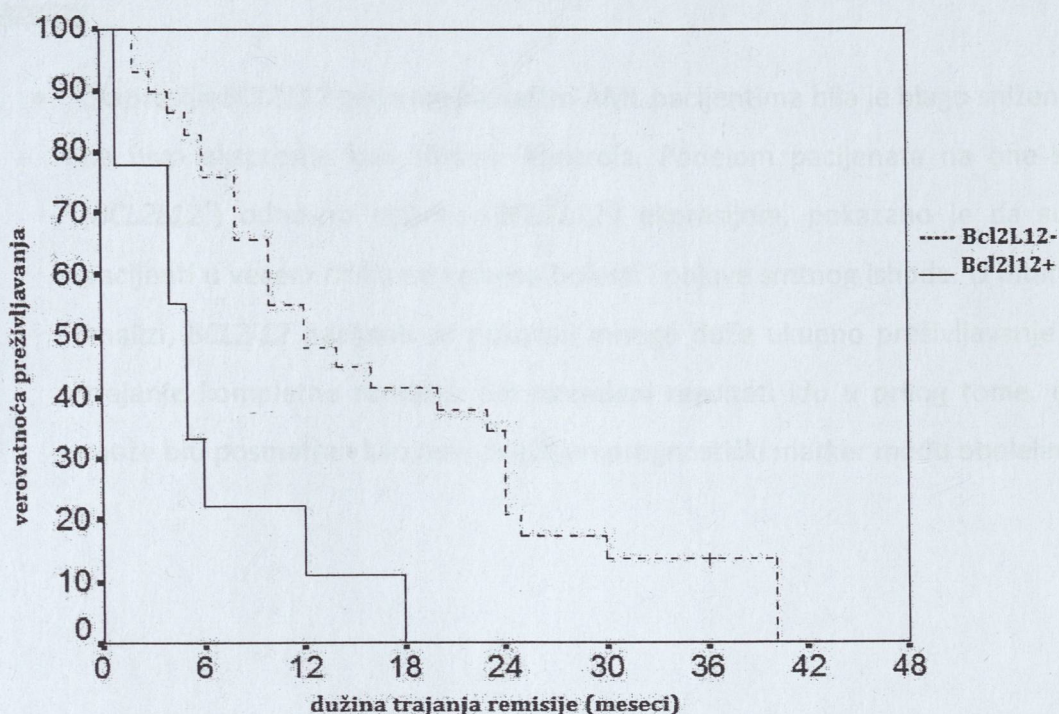
Statistički značajna veza je nađena i između *BCL2L12* ekspresije i odgovora na hemoterapiju ($p=0,034$). Kod pacijenata koji su imali potpuni odgovor na hemoterapiju 21/24 (87,5%) je bilo *BCL2L12*⁻, a samo 3 pacijenta (12,5%) je bilo *BCL2L12*⁺. Među pacijentima koji su ostvarili parcijalni odgovor na terapiju 4/5 (80%) je bilo *BCL2L12*⁻, a samo jedan pacijent je bio *BCL2L12*⁺ (Tabela 17.).

Nije nađena statistički značajna povezanost *BCL2L12* ekspresije i drugih parametara bolesti kao što su pol, starost, hemoragijski sindrom, hepatomegalija, FAB, CD33, CD34.

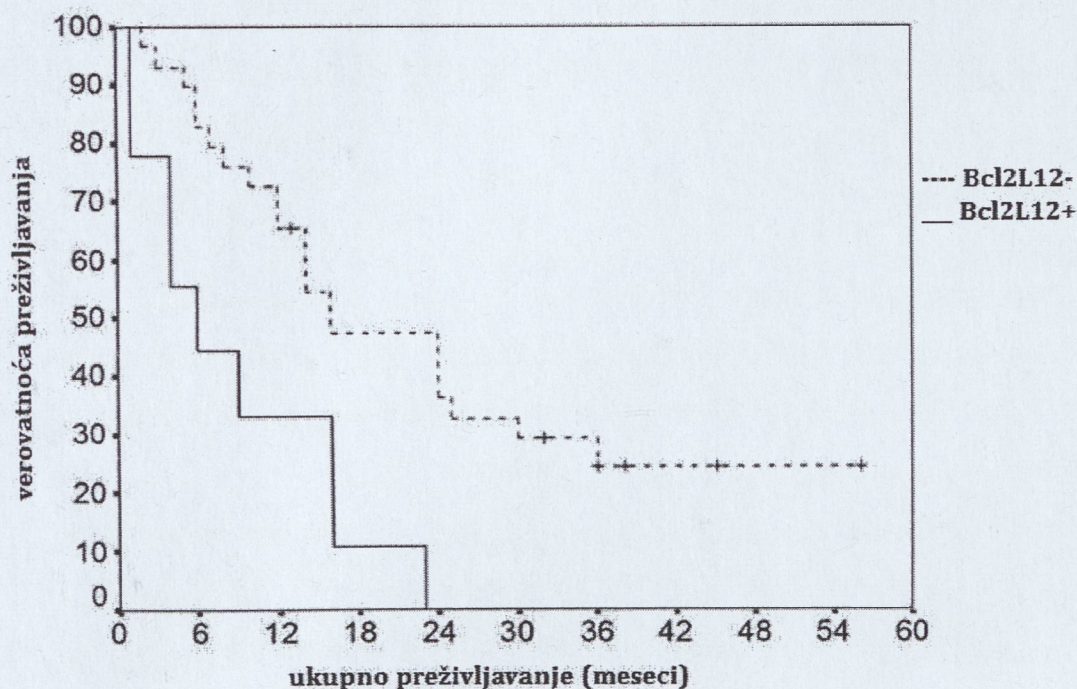
Uticaj ekspresije *BCL2L12* na preživljavanje AML pacijenata je određen primenom univarijantne i multivarijantne analize. Univarijantna analiza je pokazala da su *BCL2L12*⁺ pacijenti 3,42 puta u većem riziku od relapsa bolesti (FR=3,42, $p=0,004$) i da su 3,14 puta u većem riziku od smrtnog ishoda (FR=3,42, $p=0,007$) nego pacijenti koji su *BCL2L12*⁻.

Multivarijantna analiza je pokazala da je *BCL2L12* ekspresija značajan faktor predikcije preživljavanja bez pojave bolesti (FR=3,56, $p=0,014$).

Kaplan-Majer analiza je pokazala da *BCL2L12*⁻ pacijenti imaju duže trajanje remisije i duže ukupno preživljavanje ($p=0,0015$ i $p=0,0035$) u odnosu na *BCL2L12*⁺ pacijente (Slike 90. i 91.). Ova analiza je takođe pokazala da je većina pacijenata koja je postigla parcijalnu ili kompletnu remisiju bila *BCL2L12*⁻.



Slika 91. Kaplan-Majer analiza dužine trajanja remisije AML pacijenata. Isprekidana linija označava BCL2L12⁻ pacijente (30 pacijenata, 2 cenzurisana slučaja), a ispunjena linija predstavlja BCL2L12⁺ pacijente (10 pacijenata, 9 cenzurisanih).



Slika 92. Kaplan-Majer analiza ukupnog preživljavanja AML pacijenata. Isprekidana linija označava BCL2L12⁻ pacijente (30 pacijenata, 21 cenzurisani slučaj), a ispunjena linija predstavlja BCL2L12⁺ pacijente (10 pacijenata, 9 cenzurisanih).

Sažetak

- Ekspresija *BCL2L12* gena među našim AML pacijentima bila je blago snižena u odnosu na nivo ekspresije kod zdravih kontrola. Podelom pacijenata na one sa visokom (*BCL2L12*⁺) odnosno niskom (*BCL2L12*⁻) ekspresijom, pokazano je da su *BCL2L12*⁺ pacijenti u većem riziku od relapsa bolesti i pojave smtnog ishoda. U multivarijantnoj analizi, *BCL2L12*⁻ pacijenti su pokazali mnogo duže ukupno preživljavanje kao i duže trajanje kompletne remisije. Svi navedeni rezultati idu u prilog tome, da *BCL2L12* može biti posmatran kao nov, značajan prognostički marker među obolelima od AML.

V - DISKUSIJA

Proces maligne transformacije podrazumeva niz genetičkih i epigenetičkih promena koje rezultiraju zastojem u diferencijaciji ćelija, njenom uvećanom proliferacijom, uvećanom sposobnošću samo-obnavljanja i smanjenom apoptozom. Akutne leukemije su veoma heterogena oboljenja, čija se heterogenost zasniva na različitim kombinacijama genetičkih i epigenetičkih promena koje se dešavaju na molekularnom nivou.

V - 1. FLT3 u leukemogenezi

Uloga FLT3 u procesu maligne transformacije ćelije se zasniva na promenama na nivou *FLT3* gena koje dovode do konstitutivne aktivacije ovog tirozin-kinaznog receptora. Kao posledica toga dolazi do poremećaja, prvenstveno u procesu proliferacije (uvećanje proliferativnog kapaciteta ćelije), a aktivacijom fosfatidil-inozitol kinaze 3 (PI3-kinaza) dolazi do izbegavanja procesa apoptoze. Dva su osnovna mehanizma koja dovode do konstitutivne aktivacije FLT3 receptora; postojanje *FLT3* mutacija u jukstamembranskom i tirozin-kinaznom domenu i povećanje ekspresije *FLT3* gena.

V - 1.a) Mutacije u FLT3 genu

U našem istraživanju učestalosti *FLT3* mutacija kod obolelih od adultne AML, *FLT3/ITD* mutacija je bila prisutna u 17,4% pacijenata, dok je *FLT3/D835* mutacija bila prisutna kod 7,6% pacijenata. Ove vrednosti se u potpunosti poklapaju sa ranije objavljenim literaturnim podacima u kojima se učestalost *FLT3/ITD* kreće od 17-30% (Rombouts WJ, 2000; Kottaridis PD, 2001), dok se učestalost *FLT3/D835* mutacije kreće od 3,5-7,7% (Čolović N, 2007; Tiede C, 2002). Bez obzira na razlike u učestalosti *FLT3* mutacija, činjenica je da više od 25% obolelih od AML ima mutiran *FLT3* gen, što govori u prilog tome da konstitutivna aktivacija FLT3 receptora predstavlja značajan događaj u procesu leukemogeneze.

Zbog toga što su mutacije *FLT3* gena u AML prisutne u tako visokom procentu, brojna istraživanja su posvećena izučavanju veze između prisustva ovih mutacija i brojnih kliničko-

morfoloških karakteristika, kao i uticaju koji ove mutacije mogu imati na prognozu i ishod bolesti.

Prisustvo *FLT3* mutacije je obično povezano sa visokim brojem leukocita i višim procentom blasta u koštanoj srži (Tiede C, 2002; Kottaridis PD, 2001; Schnittger S, 2002). U našoj studiji broj leukocita kao i procenat blasta u perifernoj krvi bio je značajno viši kod *FLT3*⁺ pacijenata. Takođe, kod naših AML pacijenata postojala je jasna povezanost *FLT3* mutacija sa CD34⁺ statusom koji je karakterističan za hematopoetske ćelije na višem stadijumu diferencijacije.

Učestalost *FLT3/ITD* mutacije među t(15;17)⁺ pacijentima se kreće od 20,3% do 30,2% (Kiyoi H, 1997; Thiede C, 2002). U našoj studiji učestalost *FLT3/ITD* mutacija kod t(15;17)⁺ pacijenata je bila 10%. Razlog za ovakav nalaz verovatno leži u tome što je zastupljenost t(15;17)⁺ pacijenata u ukupnom uzorku u našoj studiji bila veoma mala (10,8%). S druge strane, u našem istraživanju *FLT3/ITD* mutacija je u 75% slučajeva bila povezana sa normalnim kariotipom, što je potvrđeno i u drugim studijama (Gale RE, 2008; Abu-Duhier FM, 2000; Schnittger S, 2002).

U našoj studiji najveća učestalost *FLT3/ITD* mutacija je nađena u M5 FAB grupi (37,5%), što se poklapa sa rezultatima Thiede C i saradnika (40%). Smatra se da povezanost *FLT3* mutacija sa monocitnom, M5 tipom leukemija leži u tome što je za monocitnu diferencijaciju neophodan konstitutivno aktiviran FLT3. Naime, u toku normalne diferencijacije monocita, FLT3 i FLT3-ligand su visoko eksprimirani u svim stadijumima sazrevanja. Receptor se u toku normalne diferencijacije aktivira na ligand-zavisni način. U slučaju malignih ćelija monocitne linije, ligand-zavisni mehanizam aktivacije FLT3 receptora je zamenjen prisustvom mutacija u *FLT3* genu koje obezbeđuju konstitutivnu aktivaciju receptora nezavisno od prisustva liganda.

Smatra se da je prisustvo *FLT3/ITD* mutacija faktor loše prognoze (Kiyoi H, 1997; Meshinchi S, 2001; Kottaridis PD, 2001). U našoj studiji pokazano je statistički značajno sniženje stope postizanja kompletne remisije kod 10 od ukupno 23 *FLT3*⁺ pacijenata. Nije pokazano da prisustvo *FLT3/ITD* mutacije ima značajan uticaj na stopu postizanja kompletne remisije, niti na dužinu trajanja remisije. Isto je pokazano i u slučaju *FLT3/D835* mutacije.

Iako je u nekim studijama pokazano da *FLT3/D835* mutacija ima loš prognostički značaj (Whitman SP, 2008), većina autora kao i najnovija istraživanja Bacher U i saradnika na 3082 AML pacijenata su pokazala da ova mutacija nema prognostički značaj. Teorijski gledano, obe mutacije izazivaju konstitutivnu aktiviranost *FLT3* receptora na ligand-nezavisni način, pa bi obe trebalo da imaju sličan uticaj na prognozu bolesti. Međutim, pokazano je da razlika leži u signalnim putevima koje aktiviraju ove dve mutacije. Za razliku od *FLT3/ITD* mutacije koja dovodi do direktne snažne aktivacije *STAT5a*, *FLT3/D835* mutacija izaziva veoma blagu aktivaciju *STAT5a*, i nije u mogućnosti da aktivira transkripcione faktore nizvodno od *STAT5a* (Choudhary C, 2005).

Uticaj *FLT3/ITD* mutacije na ukupno preživljavanje je bio veliki i pokazano je značajno smanjenje ukupnog preživljavanja kod pacijenata koji su nosoci *FLT3/ITD* mutacije. Negativni uticaj *FLT3/ITD* mutacije na ukupno preživljavanje pacijenata je pokazan u skoro svim do sada objavljenim istraživanjima uključujući i meta-analizu Yanada M i saradnika (Yanada M, 2005). Rezultati izučavanja uticaja ove mutacije na stopu postizanja kompletne remisije kao i na dužinu trajanja remisije su kontraverzni, a objašnjenje verovatno leži u različitoj zastupljenosti prognostičkih grupa. Upravo zbog toga, u mnogim istraživanjima velika pažnja se poklanja izučavanju uticaja *FLT3* mutacija na prognozu pacijenata sa normalnim kariotipom koji su smešteni u grupu pacijenata sa standardnom, intermedijernom, prognozom.

U našem istraživanju AML-NK grupe pacijenata nije utvrđeno postojanje razlike u dužini trajanja remisije između *FLT3/ITD*⁺ i *FLT3/ITD*⁻ pacijenata. Kod *FLT3/ITD*⁺ pacijenata ukupno preživljavanje je iznosilo samo 4 meseca, što je znatno niže od ukupnog preživljavanja *FLT3/ITD*⁻ pacijenata (10 meseci), ali ova razlika nije bila statistički značajna.

Za razliku od adultne AML gde je *FLT3/ITD* mutacija prisutna u oko 35% slučajeva, učestalost ove mutacije kod dece je mnogo niža i iznosi 5-16,5% (Kottaridis PD, 2001; Iwai T, 1999; Meshinchi S, 2001). Nešto viša učestalost je nađena jedino kod APL pacijenata (Arrigoni P, 2003). Naša studija je pokazala veoma nisku učestalost *FLT3/ITD* mutacije u pedijatrijskoj AML (4,7%). Detektovana frekvencija *FLT3/D835* mutacija od 4,7% bila je uporediva sa rezultatima drugih studija (3,3-6,7%) (Kang HJ, 2005; Meshinchi S, 2006; Liang DC, 2002).

Većina studija na pedijatrijskim AML je pokazala da je prisustvo *FLT3/ITD* mutacije povezano sa starijim uzrastom, većim početnim brojem leukocita, M1, M2 i M3 FAB grupama, normalnim kariotipom, neuspehom indukciono terapije i lošom prognozom (Zwan CM, 2003). Mi smo slične karakteristike našli samo kod jednog pacijenta.

Takođe, većina studija govori u prilog tome da je prisustvo *FLT3/ITD* mutacije predstavlja nezavisan, izrazito negativan faktor prognoze, jer uticaj ove mutacije nadjačava čak i uticaj *t(15;17)* koja predstavlja izrazito povoljan prognostički marker (Zwan CM, 2003). S druge strane, Iwai i saradnici su prikazali slučaj jednog pacijenta koji je bio nosilac *t(15;17)* i *FLT3/ITD* mutacije, a koji je imao veoma povoljan ishod bolesti (Iwai T, 1999). Ovo je bio slučaj i sa našim pacijentom koji je nosilac *t(15;17)* i *FLT3/ITD* mutacije (duplikacija od 24 bp).

Učestalost *FLT3/D835* mutacija je niska i kod adultnih i kod dečijih AML pacijenata i njen prognostički značaj još uvek nije utvrđen. U nekim od objavljenih istraživanja pokazano je da ove mutacije ne predstavljaju faktor nepovoljne prognoze (Liang DC, 2003; Kang HJ, 2005). Jedan od naših pacijenata koji je bio nosilac ove mutacije imao je loš ishod bolesti, dok je drugi pacijent, koji je istovremeno bio nosilac *NPM1* mutacije, relapsirao. U toku relapsa bolesti njegov *FLT3* mutacioni status se promenio iz *FLT3/D835⁺* u *FLT3/ITD⁺*, dok je status *NPM1* mutacije ostao nepromenjen. Ovaj nalaz govori u prilog hipotezi da *FLT3* mutacije ne predstavljaju stabilne molekularne markere bolesti (Čolović N, 2007).

Postavlja se pitanje da li se nepovoljni uticaj *FLT3/ITD* mutacije može objasniti samo jednostavnim prisustvom, odnosno odsustvom mutacije. U cilju pronalaženja „dodatnog“ efekta koje *FLT3/ITD* mutacije mogu imati na pronozu bolesti izvršene su brojne analize uticaja veličine *FLT3/ITD* duplikacije kao i uticaja veličine *ITD/wt* odnosa na ishod bolesti.

Ispitivanjem relativnog nivoa mutiranog *ITD* u odnosu na *wt FLT3* („*FLT3* alelic-ratio“) kod *FLT3/ITD* pozitivnih pacijenata, zapaženo je da njegova vrednost varira, a takođe varira i njegov uticaj na ishod bolesti. U 3 studije je pokazano da pacijenti sa većim *ITD/wt* odnosom imaju kraće trajanje remisije i kraće ukupno preživljavanje u odnosu na pacijente sa nižim *ITD/wt* odnosom (Whitman SP, 2001; Thiede C, 2002; Meshinchi S, 2006). S druge strane, istraživanje Gale RE i saradnika na 354 *FLT3/ITD⁺* pacijenata je pokazalo da i nizak *ITD/wt* odnos ima loš prognostički značaj (Gale RE, 2008). U našoj studiji vrednost *ITD/wt* odnosa

nije imao nikakav uticaj na prognozu i ishod bolesti. Razlike u dobijenim rezultatima se prvenstveno mogu pripisati različitim „cut-off“ vrednostima *ITD/wt* odnosa koje su primenjene. Takođe, heterogenost rezultata se može objasniti i razlikama u primenjenoj terapiji, dužinom praćenja bolesnika, kao i razlikama u broju analiziranih pacijenata.

Postoji nekoliko objavljenih studija koje su se bavile uticajem veličina *FLT3/ITD* duplikacije na prognozu i ishod bolesti (Stirewalt DL, 2006; Kušec R, 2006; Ponziani V, 2006; Gale RE, 2008). Smatra se da postojanje duplikacije remeti auto-inhibitornu interakciju jukstamembranskog domena *FLT3* i aktivacione petlje koja normalno stabilizuje kinazne domene u svojim inaktivnim konformacijama (Grifith J, 2004). Stoga svako povećanje dužine duplikacije moglo bi da za posledicu ima smanjenje efikasnosti interakcije ova dva domena, ili čak njeno potpuno izostajanje kod veoma dugačkih duplikacija, što bi dalje dovelo do postepenog povećanja nivoa aktivacije *FLT3* receptora. Međutim, rezultati ovih studija su krajnje kontradiktorni. Tako, u nekima od njih, pacijenti sa dužom *FLT3/ITD* duplikacijom imaju lošiju prognozu (Stirewalt DL, 2006), dok u drugim studijama nije primećeno da dužina duplikacije ima uticaj na prognozu i ishod bolesti (Kušec R, 2006; Ponziani V, 2006; Gale RE, 2008). Ni naša studija na 16 *FLT3/ITD*⁺ pacijenata nije pokazala razlike u ukupnom preživljavanju pacijenta sa dužom i kraćom duplikacijom, mada je zanimljivo da su pacijenti sa dužom *FLT3/ITD* duplikacijom pokazali značajno veću stopu postizanja remisije bolesti. Heterogenost ovih rezultata se kao i u slučaju ispitivanja *ITD/wt* odnosa može pripisati heterogenosti pacijenata koji su uključeni u studiju, malim brojem pacijenata, varijacijama u primenjenim „cut-off“ vrednostima, od 33 do 70 bp, i uključivanjem APL pacijenata u slučaju jedne studije (Kušec R, 2006).

V - 1.b) Ekspresija *FLT3* gena

Do konstitutivne aktivacije *FLT3* receptora ne dolazi samo u prisustvu mutacija u *FLT3* genu. Alternativa postojanju mutacija jeste uvećanje njegove ekspresije. Nekoliko studija je rađeno u cilju izučavanja nivoa ekspresije *mRNA* za *FLT3* u različitim tipovima leukemija, kao i povezanosti ekspresije *FLT3* sa drugim parametrima bolesti (Libura M, 2003; Ozeki K, 2004; Kuchenbauer F, 2005).

U ovom radu ekspresija *FLT3* je praćena kod 49 AML, 12 ALL pacijenata i kod 6 zdravih kontrola. Među pacijentima obolelim od AML nađena je izrazito povišena ekspresija *FLT3* u

odnosu na zdrave kontrole. Ovaj nalaz je očekivan s obzirom da se *FLT3* ne eksprimira u kompletno diferenciranim, zrelim ćelijama periferne krvi.

Ekspresija *FLT3* je bila različita u različitim FAB grupama; najviša u M4 i M5, a najniža u M2 i M3 grupi. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa drugim studijama u kojima je M3 FAB grupa imala najmanju ekspresiju, dok je najviša ekspresija zabeležena u M5 i M1 grupi (Ozeki K, 2004; Kuchenbauer F, 2005). Povećana ekspresija u M5 grupi se može objasniti zadržavanjem *FLT3* ekspresije i u kasnijim stadijumima sazrevanja ćelija monocitne loze. Kako dolazi do gubitka ekspresije *FLT3* u toku maturacije ćelija, možemo da pretpostavimo da su ćelije pacijenta M4 grupe u našoj studiji poreklom od ranijih, nedovoljno diferenciranih progenitora. Niži nivo ekspresije *FLT3* u M3 grupi verovatno potiče od činjenice da je *FLT3* pokazuje izrazitu koekspresiju sa CD34, a ćelije M3 grupe su samo u oko 40% slučajeva CD34⁺ (Dunphy CH, 2004).

Na osnovu citogenetskih nalaza, FAB klasifikacije i prisustva/odsustva *FLT3*/*ITD* mutacije, sve pacijente pozitivne za *FLT3* ekspresiju smo podelili u 3 prognostičke grupe; povoljnu, nepovoljnu i intermedijernu. Svi pacijenti svrstani u grupu sa nepovoljnom prognozom imali su visok nivo ekspresije *FLT3*, dok je većina pacijenata svrstanih u povoljnu prognostičku grupu (17/20) imala nizak nivo *FLT3* ekspresije. Bez obzira na ovaj nalaz, nismo potvrdili postojanje statistički značajne povezanosti između visine ekspresije *FLT3* i boljeg ukupnog preživljavanja. U do sada sprovedenim studijama, samo su Ozeki K i saradnici uspeali da pokažu prisustvo statistički značajne veze između ukupnog preživljavanja i ekspresije *FLT3*. U ostalim istraživanjima, kao i u našoj studiji, prisutna je samo tendencija da pacijenti sa višom ekspresijom *FLT3* imaju slabiju prognozu (Libura M, 2003; Kuchenbauer F, 2005; Kainz B, 2005).

Pokazali smo da je proporcija visoko i nisko ekspimirajućih *FLT3* pacijenata u grupi sa intermedijernom prognozom (pacijenti sa normalnim kariotipom) podjednaka, što je u skladu sa nalazima drugih i potpuna potvrda izuzetne heterogenosti ove grupe pacijenata.

Mutacioni status *FLT3* gena nije imao značajan uticaj na nivo ekspresije *FLT3*. Rezultati objavljenih istraživanja po pitanju uticaja *FLT3* mutacija na ekspresiju *FLT3* gena su vrlo kontradiktorni. Ozeki K i Libura M nalaze da su oba tipa mutacija povezane sa visokim nivoom ekspresije *FLT3*, dok Kuchenbauer F i saradnici nalaze značajnu povezanost uvećane *FLT3* ekspresije i *FLT3*/*ITD* mutacije samo kod mutanata sa parcijalnim gubitkom *wt* alela.

Neujednačenost rezultata malog broja studija, uključujući i našu, o značaju povišene *FLT3* ekspresije za prognozu, ukupno preživljavanje, mutacioni status *FLT3* i druge parametre bolesti, proizilazi iz više razloga. Jedan od najznačajnijih jeste način obrade rezultata dobijenih „real-time“-PCR-om. Kod relativne kvantifikacije, u slučaju kada je korišćen ddCt metod, veoma je bitno šta se koristi kao kalibrator, a kod apsolutne kvantifikacije bitno je koji se uzorci koriste za formiranje standardne krive (plazmidi, razblaženja poznate cDNK). Drugi razlog jeste nepostojanje uniformne „cut-off“ vrednosti na osnovu koje razdvajamo visoko od nisko eksprimirajućih uzoraka. Nijedna „cut-off“ vrednost iz dosadašnjih studija se ne može međusobno uporediti ni po jednom kriterijumu. Standardizacija obrade rezultata „real-time“-PCR-a je neophodna kako bi se u daljim istraživanjima moglo doći do reproducibilnih podataka.

U našoj analizi ekspresija *FLT3* je praćena ne samo na početku bolesti već i u kasnijim stadijumima lečenja. Četiri pacijenta koja su nam bila dostupna za praćenje analizirana su u trenutku nakon indukciono terapije, nakon konsolidacione terapije i u kompletnoj remisiji, odnosno prilikom relapsa bolesti. Primećeno je da ekspresija *FLT3* nakon indukciono terapije brzo pada na nivo nađen kod zdravih kontrola i ostaje niska kod pacijenta u remisiji bolesti. Kod pacijenata koji relapsiraju nivo ekspresije *FLT3* raste, vraćajući se na nivo sa početka bolesti u slučaju pacijenta u molekularnom relapsu, ili dostiže najviši nivo, kod pacijenta u kliničkom relapsu. Jedina studija ekspresije *FLT3* u različitim fazama bolesti urađena je od strane Kainz B i saradnika (Kainz B, 2005). Analizom je obuhvaćeno ukupno 23 pacijenta u kliničkoj remisiji, a oni su zatim bili podeljeni u dve grupe; grupu koja je relapsirala (14 pacijenata) i grupu pacijenata koja je nastavila da bude u kompletnoj kliničkoj remisiji (9 pacijenata). Kao i u našem slučaju primećeno je brzo opadanje nivoa *FLT3* ekspresije do „bazalnog“ nivoa, kao i njen rast kod pacijenata u relapsu bolesti. Zbog toga što se pad ekspresije *FLT3*, od nivoa na početku bolesti do nivoa nađenog u toku kliničke remisije, nije značajno razlikovao kod pacijenata u kontinuiranoj remisiji i kod onih koji su relapsirali, zaključeno je da nivo ekspresije *FLT3* nije dobar marker za praćenje MRB. Naime, da bi neki marker bio koristan u praćenju MRB, razlika u njegovoj ekspresiji između grupa pacijenata u kliničkoj remisiji i onih u relapsu bolesti, trebalo bi da iznosi 3 log (Kainz B, 2005). Zbog malog broja pacijenata obuhvaćenih ovom studijom i zbog velikog potencijala ekspresije *FLT3* koja je skoro „ekskluzivno“ prisutna kod leukemičnih ćelija, neophodno je izvršiti

naknadna istraživanja u cilju donošenja konačnog zaključka o upotrebljivosti nivoa *FLT3* ekspresije kao markera za praćenje MRB.

Kao i u slučaju AML pacijenata, i kod ALL pacijenata primećena je povišena ekspresija *FLT3* u odnosu na zdrave kontrole. Studija je obuhvatila samo mali broj pedijatrijskih ALL slučajeva (12 pacijenata), ali su rezultati u saglasnosti sa malobrojnim objavljenim studijama. Naime, studije *FLT3* ekspresije kod ALL su rađene na veoma malom broju pacijenata i bile su usmerene u pravcu izučavanja *FLT3* ekspresije u podgrupi ALL, i to ALL novorođenčadi sa *MLL* rearanžmanom (Stam RW, 2005; Brown P, 2005). U ovim podgrupama ALL dokazano je postojanje visoko eksprimiranog *FLT3* koji je fosforilisan, tj. konstitutivno aktiviran. Pokazana je i jasna povezanost između visokog nivoa ekspresije *FLT3* i lošijeg preživljavanja kod pacijenata sa *MLL* rearanžmanom, koji i inače imaju lošije preživljavanje u poređenju sa drugim ALL pacijentima (Stam RW, 2007). Grupa Brown P i saradnika je čak pokazala da se ova povećana ekspresija *FLT3* može iskoristiti i u lečenju pacijenata tako što bi se primenili inhibitori-*FLT3* kao visoko specifični terapeutici (Weisberg E, 2008). Ovi lekovi se trenutno primenjuju u lečenju pacijenata sa prisustvom *FLT3* mutacija, a njihovo dejstvo na pacijente sa visokim nivoom ekspresije *FLT3* pokazano je samo na primarnim kulturama ćelija pacijenata. Trenutno se razmatra formiranje novih terapijskih protokola za lečenje svih AML i ALL pacijenata sa povišenom ekspresijom *FLT3*.

V - 2. NPM1 mutacije u procesu leukemogeneze

NPM je direktno povezan sa pojavom maligniteta i progresijom tumora (Tsui KH, 2004). U leukemijama prisustvo mutacija u *NPM1* remeti brojne funkcije proteina vezane za ćelijski ciklus, održanje genomske stabilnosti ćelija i apoptozu.

U našoj studiji koja je obuhvatila 92 adulta pacijenta obolela od AML, učestalost *NPM1* mutacija bila je 18,5%, što je nešto niže u odnosu na već objavljene podatke (Suzuki T, 2005; Tiede C, 2006; Gale RE, 2008). Razlog za ovakav rezultat leži u tome što je učestalost *NPM1* mutacija vezana za uzrast pacijenata i češće se detektuje kod starijih pacijenata. U našoj grupi pacijenata čak 30% njih su bili mlađi od 40 godina, a samo 13,5% je bilo starije od 60 godina.

Detektovane *NPM1* mutacije su najčešće bile *A tipa* (88,2%), dok su mutacije *tipa D* i mutacija *tipa K* nađene u po jednom slučaju. Ovaj nalaz odgovara prethodno objavljenim studijama u kojima je mutacija *tipa A* zastupljena u više od 80% slučajeva (Schnittger SP, 2005). Niska zastupljenost mutacije *tipa D*, koja je obično prisutna u oko 10% slučajeva, se može objasniti malim brojem *NPM1*⁺ pacijenata. Mutacija *tipa K* je inače veoma retka i javlja se u manje od 1% slučajeva (Falini B, 2006).

U našoj studiji izučavanja učestalosti *NPM1* mutacija kod pedijatrijskih AML pacijenata, mutacija je nađena samo kod jednog pacijenta (2,7%). Za razliku od adultne AML, gde *NPM1* mutacije predstavljaju najčešću genetičku promenu (Falini B, 2007), kod pedijatrijske AML učestalost *NPM1* mutacija je mnogo niža i varira od 0-6,5% (Shimada A, 2007; Cazzaniga G, 2005). Izrazito niska učestalost je primećena u azijskoj populaciji 0% (Shimada A, 2007) odnosno 2% (Chou WC, 2006). Ovi podaci govore o mogućnosti postojanja etničkih i rasnih varijacija u susceptibilnosti ka ovim mutacijama. Iako rezultati naše studije pokazuju veliku sličnost sa rezultatima dobijenim u azijskoj populaciji, broj analiziranih pacijenata je isuviše mali za konačan zaključak.

Postoje značajne razlike između dečije i adultne AML u tipu detektovanih *NPM1* mutacija. Kao što je već navedeno, u slučaju adultne AML u više od 80% slučajeva mutacije su *A tipa* (Schnittger S, 2005). Suprotno tome, komparativna studija *NPM1* mutacija kod 617 pedijatrijskih AML pacijenata pokazala je da su mutacije *A tipa* su nađene u samo 33,3% slučajeva, dok su u 66,7% slučajeva registrovane mutacije *tipa B, D* kao i potpuno nove mutacije, koje nikada nisu primećene kod adultnih pacijenata (Brown ; Cazzaniga G, 2005; Thiede C, 2007). Detekcija retke mutacije *Q tipa* kod našeg pacijenta se u potpunosti poklapa sa ovim podacima.

Postojanje očigledne razlike u frekvenciji kao i u tipu *NPM1* mutacija između adultne i pedijatrijske AML govori u prilog pretpostavci o postojanju različite biologije i etiologije AML kod ove dve grupe pacijenata.

U našoj studiji prisustvo *NPM1* mutacije je bilo značajno povezano sa prisustvom *FLT3* mutacija i normalnim kariotipom i kod adultnih i kod pedijatrijskih AML pacijenata. Od ranije je poznato da je više od 50% AML-NK pacijenata ima mutiran *NPM1* gen. *NPM1* mutacija je u našoj grupi adultnih AML-NK pacijenata bila zastupljena u 27% slučajeva, od toga je u 66,7%

slučajeva bila vezana sa *FLT3/ITD* mutacijom. Ovi rezultati su u potpunosti u saglasnosti sa studijama rađenim na velikom broju AML-NK pacijenata (Schnittger SP, 2005; Boissel N, 2005; Dohner K, 2005). U 33,3% slučajeva *NPM1* mutacija je bila udružena sa *FLT3/D835* mutacijom, što nije neočekivano, jer novije studije pokazuju da je sve više pacijenata sa udruženim prisustvom *NPM1* i *FLT3/D835* mutacija (Whitman SP, 2008). Ovome ide u prilog i naš nalaz da je jedina detektovana *NPM1* mutacija kod pedijatrijskih pacijenata bila udružena sa prisustvom *FLT3/D835* mutacije.

Ispitivanjem uticaja *NPM1* mutacija na prognozu i ishod bolesti primećeno je da je stopa postizanja kompletne remisije bila znatno niža kod *NPM1*⁺ u odnosu na *NPM1*⁻ pacijente, čak i u slučaju kada su iz proračuna izbačeni *FLT3* pozitivni pacijenti. Prisustvo *NPM1* mutacija nije imalo uticaja na dužinu trajanja remisije, ali na naše veliko iznenađenje njeno prisustvo je značajno uticalo na smanjenje ukupnog preživljavanja obolelih. Smatra se da *NPM1* mutacije predstavljaju povoljan faktor prognoze, dok u slučajevima kada su udružene sa *FLT3/ITD* mutacijama, one gube prognostički značaj. Međutim, u pojedinim studijama je primećeno da su one povezane sa većom stopom relapsa bolesti (Suzuki T, 2005). Nepovoljan prognostički uticaj koji *NPM1* mutacije imaju u našoj grupi pacijenata se može objasniti malim brojem analiziranih pacijenata i time što su one u 66,7% slučajeva bile udružene sa *FLT3/ITD* mutacijama.

V - 3. Udruženost mutacija u procesu leukemogeneze

Udruženost *FLT3* i *NPM1* mutacija predstavlja jedan od najboljih primera tzv. „2 hit“ hipoteze nastanka leukemija. Naime, Kundson i saradnici su prvi u svojim istraživanjima etiologije retinoblastoma prepostavili da je za malignu transformaciju ćelije neophodno prisustvo najmanje 2 mutacije; primarna mutacija (germinalna ili somatska) obično remeti diferencijaciju ćelija i ćelijski ciklus, dok sekundarna mutacija (somatska) obezbeđuje nekontrolisanu proliferaciju ćelije (Kundson AG, 1975). Gilliland G je ovu „2 hit“ hipotezu 2002 godine „prilagodio“ sledu događaja za koje se prepostavlja da se dešavaju u leukemijama. U svojoj hipotezi Gilliland G je *FLT3* mutacije svrstao u mutacije klase-I, odnosno u primarne mutacije (Gilliland G, 2002), dok su mutacije klase-II činile translokacije t(8;21), t(15;17) i druge genetičke promene koje su izazivaju poremećaj u procesu

diferencijacije ćelija. U prilog ovoj hipotezi išli su rezultati studija u kojima je *FLT3/ITD* mutacija u visokom procentu povezana sa prisustvom *t(15;17)*, tj. sa PML-RAR α rearanžmanom. Učestalost ove mutacije među *t(15;17)*⁺ pacijentima se kreće od 20,3% do 30,2% (Kiyoi H, 1997; Thiede C, 2002).

Međutim, na osnovu današnjih podataka iz literature, veoma je teško govoriti o tome koje su mutacije primarni, a koje sekundarni događaji u patogenezi leukemija. Naime, postoje brojni dokazi koji govore u prilog tome da su *FLT3* mutacije sekundarni genetički događaji koji obezbeđuju visok proliferativni kapacitet i selektivnu prednost već mutiranih ćelija. Jedan od takvih dokaza je i nalaz Kottaridis PD i saradnika koji su primetili da je u 21% pacijenata koji su na početku bolesti imali *wt-FLT3*, detektovana *FLT3* mutacija u relapsu bolesti (Kottaridis PD, 2001). Takođe, činjenica da je 1 od 20 pacijenata u relapsu bolesti promenio tip *FLT3* mutacije, dok je 5 relapsiranih pacijenata izgubilo *FLT3* mutaciju, govori u prilog hipotezi da su *FLT3* mutacije sekundarni događaji u leukemijama i da nisu karakteristika primarnog malignog klona koji odoleva primenjenoj terapiji i, nakon određenog vremena, dovodi do relapsa bolesti. S druge strane, rekurentne balansirane translokacije kao što su *t(15;17)*, *t(8;21)* i *inv16*, su veoma pouzdani markeri bolesti. Po pravilu su prisutni i na prezentaciji i u relapsu bolesti što sugerise da su one odlika primarnog malignog klona.

Najnovija istraživanja udruženosti *FLT3* mutacija sa mutacijama u *NPM1* genu takođe govore u prilog tome da su *FLT3* mutacije sekundarni događaji koji se dešavaju nakon nastanka *NPM1* mutacija (Gale, 2008; Tiede C, 2006). Prema ovim autorima, mutacije u genu za NPM, koji između ostalog ima ulogu i u održavanju genetičke stabilnosti i procesima DNK-popravke, dovode do povećanja genomske nestabilnosti ćelije, tj. ćelija biva podložnija pojavi dodatnih mutacija, između ostalih i pojavi *FLT3* mutacija. Ova hipoteza o *NPM1* mutacijama kao primarnim, odnosno *FLT3* mutacijama kao sekundarnim događajima, funkcioniše kod *NPM1*⁺/*FLT3*⁺ dvostruko pozitivnih pacijenata, ali ne objašnjava zašto prisustvo *NPM1* mutacija ne dovodi do pojave drugih aberacija kod AML pacijenata sa normalnim kariotipom.

Primera udruženosti mutacija u procesu maligne transformacije ima mnogo. Jedan od njih je primer adultnog AML pacijenta iz naše studije kod koga je detektovana retka translokacija

t(11;12)(p15;q13) koja je bila udružena sa prisustvom *FLT3/ITD* mutacije (Tošić N, 2009). Kao posledica prisustva ove translokacije dolazi do stvaranja NUP98-HOXC13 aberantnog transkripcionog faktora. Prethodno objavljeni rezultati izučavanja leukemogenog potencijala NUP98-HOX fuzija (Pineault N, 2004) govore o tome da ove fuzije dovode do stvaranja snažnog diferencijacionog bloka u procesu hematopoeze, ali one same po sebi ne dovode do razvitka punog leukemičnog fenotipa. Ako se ova saznanja primene na naš primer, onda možemo reći da je NUP98-HOXC13 fuzija obezbedila zastoj u procesu diferencijacije, a *FLT3/ITD* mutacija je, izazivanjem povećane proliferacije, obezbedila selektivnu prednost neophodnu za potpunu dominaciju leukemijskog klona.

Sve ovo govori o tome da, iako većina istraživanja u potpunosti potvrđuje „2 hit“ hipotezu razvitka leukemija, postoji veliki broj podataka iz literature koji govore o tome da je veoma teško utvrditi koja je od te 2 mutacije primarna, a koja sekundarna.

V - 4. Ekspresija apoptotskih gena u procesu leukemogeneze

V 4.1. Poremećaji ekspresije gena FAS/FAS-L sistema

Ekspresija gena za FAS i FAS-L u akutnim leukemijama je predmet velikog interesovanja molekularnih hematologa, naročito zbog prognostičkog i terapijskog značaja koji ona može imati. Naime, teorijski gledano, smanjena ekspresija FAS i povećana ekspresija FAS-L „štiti“ maligne ćelije od FAS-indukovane apoptoze. Međutim, rezultati dobijeni u *in vivo* studijama daju kontroverzne rezultate po pitanju značaja glavnih učesnika ovog apoptotskog puta u leukemijama.

Našim istraživanjem obuhvaćeno je 39 AML i 12 pedijatrijskih ALL pacijenata. Kod svih obolelih, ekspresija FAS je bila niža od one kod zdravih kontrola. Kao u slučaju prethodnih studija naši AML pacijenti su pokazali izuzetnu heterogenost u FAS ekspresiji, dok je u slučaju ALL pacijenata ekspresija FAS bila izrazito niska, sa manjim opsegom detektovanih vrednosti (Li Q, 2000; Wuchter C, 2000; Suminoe A, 2004).

Kod AML pacijenata nije pokazana povezanost nivoa *FAS* ekspresije sa pojedinim FAB podtipovima, a najširi opseg vrednosti je zapažen u M2 i M3 grupi, što je u skladu sa podacima Li Q et al. (Li Q, 2000). Takođe, nije pokazana veza između *FAS* ekspresije i citogenetskog nalaza, kao ni sa drugim kliničkim karakteristikama.

U našem istraživanju je zapaženo da $CD34^+$ leukemije imaju niži nivo ekspresije *FAS*. Ovo je primećeno i u drugim studijama, a osnova za ovakav nalaz leži u povezanosti *FAS* ekspresije sa stadijumom maturacije ćelija mijeloidne loze (Wuchter C, 2000; Iijima N, 1997). U toku normalne hematopoeze $CD34^+$ progenitorske ćelije se odlikuju niskom ekspresijom *FAS*, a zatim *FAS* ekspresija raste sa diferencijacijom ćelija u zrele monocite i granulocite (Di Giuseppe JA, 1996; Maciejewski J, 1995). Slično se dešava i u toku sazrevanja limfocita, mada se naglašava da je ekspresija *FAS* na njima mnogo niža od one nađene kod zrelih monocita i granulocita (Kawakami A, 1998). Sve ovo govori u prilog tome da se jedna od značajnih strategija razvitka leukemija zasniva na malignoj transformaciji ranih $CD34^+$ progenitora, gde leukemijska ćelija jednostavno „koristi“ i održava već postojeći anti-apoptotski mehanizam normalne stem ćelije (Wuchter C, 1999).

Najkontroverzniji rezultati su dobijeni u istraživanju postojanja korelacije između ekspresije *FAS* i prognoze bolesti. U našoj studiji nije pronađena veza između visine *FAS* ekspresije i boljeg ukupnog preživljavanja, ni kod obolelih od AML, ni kod pedijatrijskih ALL pacijenata. Slično su zapazili Wuchter i saradnici kod adultnih pacijenata sa AML i kod dečije ALL (Wuchter C, 1999; Wuchter C, 2000). U ranijim istraživanjima *FAS* ekspresije kod AML pacijenata, značajna korelacija je nađena samo u odgovoru na indukcionu terapiju (Iijima N, 1997), odnosno niska ekspresija *FAS* je bila u vezi sa nižom stopom kompletne remisije (Min YH, 1996). Kod ALL pacijenata dobijeni su slični rezultati, osim u slučaju retke ALL novorođenčadi kod koje je niska ekspresija *FAS mRNA* predstavljala prediktor rezistencije na indukcionu terapiju i prediktor relapsa bolesti (Karawajew L, 1997; Wuchter C, 2000; Suminoe A, 2004).

Može se zaključiti da je danas nivo ekspresije *FAS* u potpunosti odbačen kao značajan i nezavistan faktor prognoze. Razlog za to leži prvenstveno u činjenici da leukemijske ćelije pokazuju rezistenciju na *FAS*-indukovanu apoptozu čak i u slučajevima „zadovoljavajuće“

ekspresije FAS (Beltinger C, 1998a; Karawajew L, 1997). Isto je primećeno i kod normalnih mononuklearnih ćelija periferne krvi. FAS je konstitutivno eksprimiran kod svih mononuklearnih ćelija, ali je osetljivost na FAS-indukovanu apoptozu različita, tako da su granulociti najosetljiviji (kratkoživeće ćelije), a limfociti su skoro u potpunosti rezistentni (dugoživeće ćelije) (Iwai K, 1994). Štaviše, kod limfocita, koji čine najveći deo mononuklearnih ćelija, razlikujemo dve vrste T i B mirujućih limfocita, FAS⁺ i FAS⁻. Nakon aktivacije, FAS⁻ limfociti počinju da eksprimiraju FAS, ali obe vrste ostaju rezistentne na FAS indukovanu apoptozu (Kawakami A, 1998).

Sve ovo govori u prilog tome da ne postoji jednostavna, jednoznačna veza između FAS ekspresije i FAS-indukovane apoptoze, te da postoje i drugi faktori, kao npr. proteini BCL2 genske familije, koji imaju veći uticaj na odluku da li će ćelija umreti ili ne.

BCL2 ekspresija je obrnuto proporcionalna ekspresiji *FAS* u normalnim mononuklearnim ćelijama, pa je tako ona najviša u limfocitima, a najniža u granulocitima (Iwai K, 1994; Kawakami A, 1998). Smatra se da uticaj ekspresije ovog anti-apoptotskog gena nadvladava uticaj ekspresije *FAS* gena, čineći ćelije sa višom ekspresijom *BCL2* rezistentnim na FAS-indukovanu apoptozu, bez obzira na konstitutivnu ekspresiju FAS. Iako su *in vitro* studije na brojnim leukemijskim ćelijskim linijama pokazale da je smanjenje ekspresije *FAS* praćeno istovremenim povećanjem ekspresije *BCL2* i povećanjem FAS-indukovane apoptoze, studije *in vivo* nisu potvrdile ove rezultate (Mandal M, 1996). Iako je ekspresija *BCL2* kod AML i ALL generalno uvećana (što je pokazala i naša studija), studije u kojima je paralelno praćena ekspresija *BCL2* i *FAS* nisu pokazale postojanje korelacije između ekspresije ova dva gena, niti postojanje veze visine njihove ekspresije i FAS-indukovane apoptoze (Karawajew L, 1997; Wuchter C, 1999; Wuchter C, 2000; Suminoe A, 2004). Ni kod naših AML i ALL pacijenata nije uočena korelacija ekspresije *FAS* i *BCL2* gena.

Rezistencija na FAS indukovanu apoptozu može biti posledica tzv. pre-receptorskog mehanizma koji podrezumeva povećanu ekspresiju solubilne forme FAS (*sFAS*) koja antagonizuje dejstvo FAS-L. Postojanje *sFAS* transkripta odnosno proteina, nije specifična odlika maligno transformisane ćelije. *sFAS* forma je detektovana u svim normalnim hematopoetskim ćelijama, ali je ova forma manje dominantna u odnosu na *mFAS* formu.

Međutim, pomeranje vrednosti *mFAS/sFAS* odnosa u pravcu dominacije *sFAS* forme može imati anti-apoptotski efekat, što je i primećeno kod mnogih tipova leukemija (Inaba H, 1999; Kamihira S, 1999; Liu JH, 2002).

U našem istraživanju vrednosti *mFAS/sFAS* odnosa su se kretale u širokom opsegu 0,39-17,33 kod AML pacijenata i 0,00-3,36 kod pedijatrijskih ALL pacijenata. Slično je zapaženo i u drugim studijama, pa može se reći da je kod leukemija ekspresija *mFAS* i *sFAS* forme veoma heterogena. Zapaženi su slučajevi potpune dominacije *mFAS* ili *sFAS* forme, kao i slučajevi kada se kod mnogih pacijenata *mFAS/sFAS* odnos nije razlikovao od onog nađenog kod zdravih kontrola (Kamihira S, 1999; Liu JH, 2002). Do danas su objavljeni rezultati dva istraživanja *mFAS/sFAS* odnosa na malom broju AML pacijenata (Inaba H, 1999; Liu JH, 2002), u kojima je, kao i u našem slučaju, vrednost *mFAS/sFAS* odnosa varirala od pacijenata do pacijenta i nije imala značajan prognostički značaj. Takođe, ovaj odnos nije bio u korelaciji sa ekspresijom *total FAS* gena (membranske i solubilne varijante), što je pokazalo i naše istraživanje.

Vrednost *mFAS/sFAS* odnosa ima prognostički značaj samo u nekim tipovima leukemija kao što su ALL novorođenčadi i adultna T-ALL, gde je pokazano da *sFAS* forma predstavlja nezavistan faktor prognoze (Wood CM, 2003; Kamihira S, 1999). Kako je dominacija *sFAS* forme u našem istraživanju nađena samo u retkim slučajevima AML (18,6%) i pedijatrijske ALL (25%), možemo zaključiti da ovaj mehanizam rezistencije na FAS-indukovanu apoptozu nije dominantan u ovim tipovima leukemija.

Povećana ekspresija FAS-L na površini maligne ćelije može suprimirati imuni odgovor domaćina, tako što dolazi do FAS-indukovane apoptoze u aktiviranim T limfocitima. Pokazano je da ovaj sistem izbegavanja anti-tumorskog imunog odgovora funkcioniše kod solidnih tumora, ali isto nije pokazano kod leukemija (Reichmann E, 2002).

Do sada su objavljeni rezultati 2 studije ekspresije FAS-L proteina kod AML i ALL, urađene na ukupno 24 pacijenata (18 AML i 6 ALL pacijenata) (Lickliter JD, 1999; Buzyn A, 1999). U obe studije je pokazano da je ekspresija FAS-L bila povećana u odnosu na zdrave kontrole, što je u suprotnosti sa našim rezultatima. Povećana ekspresija FAS-L je nađena samo u nekoliko sporadičnih slučajeva obolelih od AML, dok je kod ALL pacijenata ona bila izrazito niska.

Razlozi za razliku u rezultatima sigurno leže u broju obrađenih pacijenata kao i u mnogo senzitivnijoj tehnici koja je korišćena u našem istraživanju, ali i u tome što smo mi posmatrali nivo ekspresije FAS-L na nivou *mRNK*, a ne na proteinskom nivou. Za razliku od FAS za koga je pokazano da povećana ekspresija na *mRNK*, prati povećanje ekspresije na proteinskom nivou (Kamihira S, 2001; Li Q, 2000), najnovija istraživanja su pokazala da FAS-L protein biva smešten u mikrovezikule, odakle se zatim transportuje do površine ćelije i izaziva apoptozu na senzitivnim FAS eksprimirajućim ćelijama. Ovo znači da FAS-L protein može biti prisutan u ćeliji i u odsustvu FAS-L *mRNK*. Pretpostavlja se da nakon sinteze određene količine FAS-L proteina nivo FAS-L *mRNK* može značajno opasti, kako bi se sprečila previsoka ekspresija FAS-L proteina, koja bi mogla da izazove aktivaciju neutrofila i ćelijsku smrt (Ryan AE, 2006). Studija u kojoj bi ekspresija FAS-L kod leukemijskih pacijenata bila praćena paralelno na proteinskom i na nivou *mRNK*, mogla bi razrešiti da li mehanizam izbegavanja anti-tumorskog odgovora zasnovan na prevelikoj ekspresiji FAS-L postoji i u hematopoetskim malignitetima.

V - 4.2. Promena ekspresije gena BCL2 familije

V 4.2.a) Ekspresija BCL2

BCL2 protein je moćan inhibitor apoptoze za koga je pokazano da poseduje onkogeni potencijal (Reed JC, 1998) kao i sposobnost da štiti leukemijske ćelije od apoptoze izazvane dejstvom hemoterapijskih lekova (Miyashita T, 1993).

U ovom radu je ekspresija *mRNK* za BCL2 gen praćena kod pacijenata obolelih od AML i ALL.

Posmatrajući celokupan uzorak AML pacijenata, primećena je izuzetna heterogenost u nivou ekspresije BCL2. Medijana ekspresije BCL2 kod AML pacijenata se nije statistički razlikovala od one kod zdravih kontrola, što i nije neočekivano, jer je poznato da se u mononuklearnim ćelijama zdravih osoba eksprimira BCL2. Mononuklearne ćelije čine uglavnom limfociti (nešto je manje monocita i granulocita) koji, iako predstavljaju konačno diferencirane ćelije, imaju dug životni vek, tj. u značajnoj meri ekspimiraju anti-apoptotski BCL2 gen (Van Der Vliet HJ, 1997). Opseg ekspresije nađen kod zdravih kontrola je bio mnogo uži i odnosu na veoma širok opseg ekspresije BCL2 nađen kod AML pacijenata.

Kod AML pacijenata heterogenost ekspresije *BCL2* bila je primećena i kod različitih FAB grupa. Ovo je u potpunom skladu sa drugim studijama u kojima nivo ekspresije *BCL2* nije pokazao povezanost sa pojedinim FAB grupama niti sa određenim kariotipom (Kornblau SE, 1999 i 2000; Karakas T, 1998). Među pacijentima sa različitim kariotipom primećena je niska ekspresija *BCL2* u grupi $t(15/17)^+$ pacijenata, tj. među APL pacijenatima. Slično je primećeno i u studiji Payton JE i saradnika u kojoj je praćena ekspresija velikog broja gena u primarnoj AML, GEP-metodom („high-throughput gene expression profiling“), i u kojoj je ekspresija *mRNK* za *BCL2* bila najniža kod obolelih od APL u odnosu na sve ostale posmatrane tipove AML (Payton JE, 2009).

Pokazano je da je povećana ekspresija *BCL2* povezana sa lošom prognozom među obolelim od AML. Tačnije, kod pacijenata sa povećanom ekspresijom *BCL2* na prezentaciji bolesti postoji niža učestalost postizanja kompletne remisije kao i veća učestalost pojave relapsa bolesti (Campos L, 1993). Takođe, visok nivo ekspresije *BCL2* je prepoznat kao negativni prognostički marker u univarijantnim i multivarijantnim analizama (Karakas T, 1998; Kornblau SE, 1999 i 2000).

U našem istraživanju povećanje ekspresije *BCL2 mRNK* je zapaženo u citogenetski nepovoljnoj grupi AML pacijenata (80% pacijenata je imalo povećanu ekspresiju). Slično je primećeno i u drugim studijama u kojima je ekspresija *BCL2* praćena na *mRNK* nivou (Kohler T, 1999 i 2002; Andreeff M, 1999; Karakas T, 1998), kao i u studijama koje su pratile ekspresiju na proteinskom nivou. Ako se zna da je osnovna uloga *BCL2* anti-apoptotska, očekivano je da oni pacijenti koji imaju lošu prognozu imaju i višu ekspresiju *BCL2*.

U uzorcima koje smo analizirali primećena je i značajna korelacija između prisustva $CD34^+$ ćelija i povećane ekspresije *BCL2*. Dugoživeće $CD34^+$ ćelije su najraniji pluripotentni progenitori hematopoeze, sa velikom sposobnošću samo-obnavljanja i visokom rezistencijom na apoptotske stimuluse. Visoka ekspresija *BCL2* kod ove ćelijske populacije je primećena i u normalnoj kostnoj srži i kod obolelih od AML (Andreeff M, 1999; Karakas T, 1998; Suarez L, 2004). Nalaz da je povećana ekspresija *BCL2* prisutna u prognostički nepovoljnoj grupi kao i među $CD34^+$ pacijentima, govori o tome da se prognostički značaj ekspresije *BCL2* može posmatrati i sa stanovišta povezanosti ekspresije *BCL2* i maturacije ćelija. Naime, $CD34^+$ pacijenti inače imaju lošu prognozu, a kako $CD34^+$ ćelije povećano

ekspimiraju *BCL2*, očekivano je da povišena *BCL2* ekspresija bude povezana sa lošom prognozom (Lee EJ, 1992).

Iako je naša analiza ukupnog preživljavanja obolelih od AML (Kaplan Mayer analiza, kod koje slučajevi sa smrtnim ishodom bivaju isključeni iz jednačine verovatnoće ukupnog preživljavanja) pokazala da pacijenti sa povećanom ekspresijom *BCL2* nemaju skraćeno vreme preživljavanja, mora se istaći veliki broj smrtnih ishoda u grupi visoko *BCL2* ekspimirajućih pacijenata (62,5%). Nalazi u malobrojnim studijama, uključujući našu, su kontradiktorni (Kornblau SE, 1999 i 2000; Karakas T, 1998). Jedan od razloga je sigurno „cut-off“ vrednost koja se ne može porediti u svim studijama, kao i drugačija klasifikacija pacijenata u prognostičke grupe. Naime Karakas T i saradnici su „visoko ekspimirajuću“ grupu pacijenata podelili na one mlađe i starije od 60 godina, i tek tada su u grupi mlađih pacijenata dobili značajnu povezanost ekspresije *BCL2* sa nižim ukupnim preživljavanjem, odnosno sa učestalijom pojavom relapsa bolesti (Karakas T, 1998). Takođe, Kornblau SM i saradnici su u svoje dve studije primenili princip spajanja citogenetski povoljne i intermedijerne prognostičke grupe u jednu, povoljnu prognostičku grupu, i u tom slučaju je ekspresija *BCL2* bila značajan prognostički marker u univariјantnoj i multivariјantnoj analizi (Kornblau SM, 1999; Kornblau SM, 2000). Međutim, ovakav princip klasifikacije pacijenata doneo je i neke apsurdne rezultate, a to je da je smanjena ekspresija *BCL2* u lošoj prognostičkoj grupi povezana sa smanjenim preživljavanjem ovih pacijenata. U pokušajima da se objasni ovaj kontraverzni nalaz išlo se dotle da je pretpostavljeno postojanje različite funkcije *BCL2* u povoljnoj i nepovoljnoj prognostičkoj grupi (Kornblau SM, 1999). Umesto postavljanja ovako radikalnih pretpostavki, drugi autori su ovu pojavu pokušali da objasne time da kod pacijenta iz loše prognostičke grupe neki drugi prognostički faktori (starost, nepovoljan kariotip itd) „prevladavaju“ uticaj ekspresije *BCL2*, i svejedno dovode do nepovoljnog ishoda.

Takođe, u drugim tipovima leukemija, ALL, HLL, kao i kod nekih solidnih tumora, povećana ekspresija *BCL2* je povezana sa boljom prognozom (Charpin C, 1998; Robrtson LE, 1996; Coustan-Smith E, 1996). Ovakvi nalazi se možda mogu objasniti postranslacionom modifikacijom *BCL2*, jer za obavljanje anti-apoptotske uloge u ćeliji *BCL2* protein mora biti fosforilisan od strane PKC α (klasične forme) (Ruvolo PP, 1998). U prilog ovome govore i nalazi povećane ekspresije PKC α u leukemičnim ćelijama pedijatrijskih ALL pacijenata, koji su

pokazivali rezistenciju na indukcionu terapiju (Volm M, 1998). Postavlja se pitanje u koliko meri modulacija funkcije BCL2 fosforilacijom utiče na prognostički značaj nivoa BCL2 ekspresije. Ne treba zaboraviti da i mnogi drugi članovi BCL2 familije kao i članovi IAP („inhibitor of apoptosis“) familije mogu modifikovati „signal“ koji šalje BCL2, a izvesnog uticaja mogu imati i „nizvodne“ kaspaze za koje je pokazano da imaju prognostički značaj (Estrov Z, 1998).

Ista heterogenost *BCL2* ekspresije koja pronađena među AML pacijentima, bila je prisutna i kod 12 pedijatrijskih pacijenata obolelih od ALL. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima drugih autora (Coustan-Smith E, 1996; Uckun FM, 1997). U nekim istraživanjima primećeno je povećanje ekspresije *BCL2*, pa tako Salomons GS i saradnici u 35% slučajeva dečije ALL pronalaze da je *BCL2* ekspresija bila jednaka ili ispod nivoa zdravih kontrola (Salomons GS, 1997).

Smatra se da osnova za širok opseg ekspresije *BCL2* leži u heterogenosti porekla leukemija, odnosno da li se radi o T- ili B-ALL. Nađeno je da je nivo ekspresije *BCL2* niži u T-ALL a viši u pre-B ALL koja potiče od pre-pre-B ćelija i pre-B ćelija, ukazujući da nivo *BCL2* ekspresije ima veze sa stadijumom diferencijacije ćelija (Salomons GS, 1997). Ovo nije objašnjenje za heterogenost naših rezultata jer smo u našem istraživanju imali veoma homogenu grupu pacijenata od 11 B-ALL a samo jedan pacijent je bio T-ALL. Međutim, kao i u slučaju AML, veći opseg nivoa ekspresije može biti odraz različitog diferencionog statusa u B- i T-ćelijskom razvoju.

Za razliku od ćelija mijeloidne loze gde je pokazano da i normalni i leukemični rani progenitori ekspimiraju više BCL2, u slučaju limfoidne loze pokazano je da je BCL2 nivo ekspresije u pre-B leukemijama mnogo viši nego u normalnim pre-B ćelijama (Campana D, 1993). Zbog toga se pretpostavlja da stadijum diferencijacije nije jedina determinanta ekspresije BCL2 u ALL.

Naše istraživanje na malom broju ALL pacijenata nije utvrdilo postojanje korelacije između nivoa ekspresije *BCL2* i ishoda bolesti, odnosno ukupnog preživljavanja. Ovo je sve u saglasnosti sa brojnim studijama uključujući studiju na 43 adultne ALL (Campos L, 1996), studije na 40 dečijih i adultnih ALL (Gala LJ, 1994) kao i studije koje su izvršene samo na dečijim ALL uključujući 52 (Coustan-Smith, 1996) odnosno 338 pacijenata (Uckun, 1997).

Može se zaključiti da, iako BCL2 predstavlja supresor apoptoze, i kod ALL, kao i kod AML, on predstavlja samo jedan od brojnih faktora koji određuju krajnju sudbinu ćelije.

V 4.2.b) Ekspresija BAX

Ispitivanje nivoa ekspresije drugih gena BCL2 familije, kao što je pro-apoptotski BAX, može dati kompletniju sliku o smeru u kome će ćelija odreagovati na apoptotski stimulus. Naime poznato je da su BCL2 i BAX sposobni da stvaraju homo- i hetero-dimere i da na taj način vrše modulaciju apoptotskog procesa.

U ovom radu, ekspresija *mRNK* za BAX gen je praćena kod AML i ALL pacijenata.

Ekspresija BAX gena kod obolelih od AML je bila nešto niža u poređenju sa ekspresijom u zdravim kontrolama, ali bez statističke značajnosti. Među pedijatrijskim ALL pacijentima ekspresija BAX se uopšte nije razlikovala od one nađene kod zdravih kontrola.

Kao i u slučaju ekspresije BCL2 gena, primećena je izuzetna heterogenost u nivou ekspresije BAX gena, tako da nije bilo značajnih razlika gledano po FAB grupama. Slično je i kada su u pitanju grupe pacijenata sa različitim kariotipom, osim u grupi t(15/17) pozitivnih pacijenata, gde je primećena snižena ekspresija BAX gena. Kako ovi pacijenti spadaju u prognostički povoljnu grupu, očekivano je postojanje statistički značajnog sniženja ekspresije BAX u ovoj prognostičkoj grupi u odnosu na druge prognostičke grupe.

Iako je pokazana značajna korelacija između smanjene ekspresije BAX i povoljne prognoze, analiza ukupnog preživljavanja obolelih od AML nije pokazala veću verovatnoću preživljanja pacijenata sa niskom ekspresijom BAX. Ovaj rezultat je možda posledica toga što u analizu nisu uključeni t(15/17) pozitivni pacijenti, koji zbog visoko specifične terapije inače bolje preživljavaju, ali naknadna analiza koja je uključila i ove pacijente nije promenila rezultat.

Prethodne studije praćenja ekspresije BAX kod AML pacijenata pokazale su kontraverzne rezultate. Pa tako je u studiji Ong Y i saradnika povećana ekspresija BAX proteina predstavljala nezavisni faktor povoljne prognoze, dok je u drugim studijama, gde je ekspresija BAX praćena na nivou *mRNK*, pokazano da povećanje ekspresije BAX ima

potpuno suprotan efekat na prognozu (Kohler T, 2002; Hess CJ, 2007). Nivo transkripcije gena *BCL2*-familije u potpunosti odgovara nivou ekspresije odgovarajućih proteina (potvrđeno u studijama Karakas T, 1998; Andreeff M, 1999; Hess CH, 2007), pa različit pristup praćenja ekspresije *BAX* nije mogao usloviti ovako velike razlike po pitanju njegovog prognostičkog značaja. Potvrda ovakvom načinu razmišljanja bile su studije koje su pratile nivo ekspresije *BAX* proteina u ALL, HLL, različitim solidnim kancerima kao i neke studije rađene na AML pacijentima koje su pokazale inverznu korelaciju ekspresije *BAX* i bolje prognoze (Srinivas G, 2000; Friess H, 1998; Kornblau SM, 2000).

Neočekivana povezanost povišene ekspresije pro-apoptotskog *BAX* gena i loše prognoze može biti posledica različitih dešavanja u ćeliji. Naime, kod 21% humanih hematopoetskih linija primećeno je postojanje tzv. „loss-of-function“ mutacija u *BAX* genu, pa je povećanje ekspresije predstavljalo kompenzacioni mehanizam ćelije (Meijerink JPP, 1998). Takođe, pored uloge u apoptozi *BAX* ima ulogu i u proliferaciji, pa je moguće da je kod AML pacijenata sa povećanom ekspresijom *BAX* došlo do pomeranja uloge *BAX* u pravcu proliferacije (Bradly HJ, 1996).

V 4.2.c) Uticaj *BCL2/BAX* odnosa

Kako su rezultati ispitivanja ekspresije *BCL2* i *BAX* gena pojedinačno doveli do konfliktnih rezultata u mnogim studijama, istraživači su se okrenuli ispitivanju njihovog relativnog odnosa. Pro-apoptotski *BAX* heterodimerizuje sa *BCL2* i umanjuje njegovu anti-apoptotsku ulogu. Pa tako, teorijski gledano, što je veći odnos *BCL2/BAX*, to je apoptoza više inhibirana.

U našem istraživanju razlika u *BCL2/BAX* odnosu između AML odnosno pedijatrijskih ALL pacijenata i zdravih kontrola, primećena je tendencija postojanja višeg *BCL2/BAX* odnosa kod obolelih. Nije primećena značajna razlika u *BCL2/BAX* odnosu između različitih FAB grupa, kao ni kod različitih citogenetskih grupa. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim studijama (Andreeff M, 1999; Del Poeta G, 2003).

Suprotno poznatim rezultatima, *BCL2/BAX* odnos (nakon primene „cut-off“ vrednosti i podele na pacijente sa niskim i visokim *BCL2/BAX* odnosom) je bio najviši u povoljnoj

prognostičkoj grupi AML pacijenata, dok je u druge dve grupe, nepovoljnoj i intermedijernoj, broj pacijenata sa visokim i niskim *BCL2/BAX* odnosom bio podjednak.

Kaplan-Majer analiza nije utvrdila postojanje statistički značajne veze između visokog *BCL2/BAX* odnosa i veće verovatnoće preživljavanja među AML pacijentima, što se poklapa sa rezultatima Kohler T i saradnika, kao i studija rađenih na drugim tipovima leukemija i solidnim kancerima, gde takođe nije utvrđeno postojanje bilo kakve veze između visine *BCL2/BAX* odnosa i prognoze bolesti (Kohler T, 2002; Srinivas G, 2000; Friess H, 1998).

S druge strane, kod pedijatrijskih ALL, pacijenti sa nižim *BCL2/BAX* odnosom imali su duže preživljavanje. Uzrok ove razlike između AML i ALL pacijenata najverovatnije leži u mnogo kraćem vremenu praćenja ALL pacijenata.

Ekspresija *BCL2* i *BAX* gena na nivou *mRNK* je retko praćena upotrebom qPCR metode. Jedan takav primer je rad Kohler T i saradnika, dok je u ranijim istraživanjima (Kohler T, 2002; Kornblau SM, 2000; Andreeff M, 1999) nivo ekspresije *BCL2* i *BAX* meren imunohistohemijski i Western-blot analizama, koje su i od strane samih autora bile okarakterisane kao nedovoljno precizne za određivanje *BCL2/BAX* odnosa (Ong Y, 2000). Del Poeta G i saradnici su ekspresiju pratili primenom kvantitativne protočne citometrije koja jedina po svojoj preciznosti može da se meri sa qPCR metodom, ali njihovi rezultati nisu kompatibilni sa našim. Razlozi prvenstveno leže u nestandardizovanoj „cut-off“ vrednosti, na osnovu koje se određuje vrednost visokog odnosno niskog *BCL2/BAX* odnosa. Uprkos tome, nalaz da je visok *BCL2/BAX* odnos direktno proporcionalan sa prisustvom CD34⁺ ćelija bio je isti kao i u našoj studiji. Poređenjem rezultata ekspresije *BCL2*, *BAX* kao i *BCL2/BAX* odnosa brojnih studija čini se da prediktivna važnost *BCL2/BAX* odnosa leži na strani anti-apoptotskog člana *BCL2* familije, tj. na strani *BCL2* (Del Poeta G, 2003).

V 4.2.d) Ekspresija *BCL2L12*

U proučavanju ekspresije gena vezanih za proces apoptoze, u našu studiju, pored već izučavanih *FAS*, *FAS-L*, *BCL2* i *BAX* gena, uvrstili smo novog člana *BCL2* familije, *BCL2L12* gen. Pokušali smo da odredimo da li visina njegove ekspresije može biti značajan faktor prognoze kod obolelih od AML.

Iako se njegova tačna funkcija još uvek ne zna, značaj *BCL2L12*, pa čak i njegove kraće forme *BCL2L12-A* u sprovođenju apoptotskih signala je potvrđena u najnovijim studijama, u kojima je ovaj novi član *BCL2* familije zaštićen od proteozomalne degradacije na taj način što interaguje direktno sa „heat shock“ proteinom HSP70, sa jedne, i sa ubikvitin-proteozomalnim sistemom (UPS) sa druge strane (Yang J, 2009). Takođe, skoro je pronađen i okarakterisan prirodni antisens transkript *BCL2L12*. Prirodni antisens transkripti su *RNK* transkripti koji su komplementarni sa drugim *RNK* transkriptima unutar ćelije (Osato N, 2007). Ove antisens *RNK*, koje mogu biti protein-kodirajuće ili nekodirajuće, imaju značajnu ulogu u genskoj regulaciji. U slučaju *BCL2L12* gena, pokazano je da sekvenca 1 egzona odgovara antisens lancu *RNK* transkripta za interferon regulatorni faktor 3 (IRF3). Prirodni antisens transkripti su nađeni i kod drugih članova *BCL2* familije, sugerišući na zaključak da prirodni antisens transkripti mogu imati ulogu regulatornih faktora u procesu apoptoze. (Zhang H, 2009).

Ekspresija *mRNK BCL2L12* gena među našim AML pacijentima bila je snižena, ali ne značajno u odnosu na nivo ekspresije kod zdravih kontrola, ukazujući na pro-apoptotsku ulogu *BCL2L12* u AML. Ovaj nalaz se razlikuje od drugih studija u kojima je ekspresija *BCL2L12* ispitivana u drugim malignitetima, kao što su kancer kolona i glioblastom (Kontos CK, 2009; Stegh AH, 2007). U ovim studijama uočeno je značajno povećanje ekspresije *BCL2L12* u svim stadijumima kancera, pa su njihovi autori spekulisali o mogućoj anti-apoptotskoj ulozi *BCL2L12*.

Pojava da jedan protein ima i anti- i pro-apoptotsku ulogu nije neuobičajena. Čak i *BCL2* protein, koji pokazuje izrazito anti-apoptotsko ponašanje, u nekim slučajevima može delovati pro-apoptotski (Wang NS, 2001; Uhlmann EJ, 1998). Postoji mogućnost da *BCL2L12*, kao i *BCL2*, pod uticajem nekih nepoznatih faktora ili kao rezultat tkivne specifičnosti, može imati pro-, odnosno anti-apoptotsku ulogu. Izrazita specifičnost strukturne organizacije *BCL2L12* ide u prilog ovoj pretpostavci. Naime, *BCL2L12* kao član *BCL2* familije proteina poseduje BH2 domen, ali i netipičan BH3 domen koji se naziva „BH3-like“ motiv (Scorilas A, 2001). Prisustvo BH3 domena je odlika pro-apoptotskih članova *BCL2* familije, ali činjenica da *BCL2L12* ima netipačan BH3 domen može biti razlog za njegovu funkcionalnu specifičnost. U prilog pro-apoptotskom delovanju *BCL2L12* idu i rezultati kliničkih studija

obavljenih na obolelima od kancera dojke (Thomadaki H, 2007; Talieri M, 2003) i kanceru kolona (Kontos CK, 2008).

Poznato je da povećana ekspresija BCL2 blokira sprovođenje apoptotskog signala tako što sprečava aktivaciju kaspaza (Cohen GM, 1997). U ćelijama glioblastoma BCL2L12 inhibira aktivaciju kaspaze-3, delujući nizvodno od mitohondrija (Stegh AH, 2008b). Mogući mehanizam uticaja ekspresije BCL2L12 na ishod obolelih od leukemija može biti nagomilavanje velikih količina neaktivirane kaspaze-2 i kaspaze-3, za koje je već pokazano da imaju nepovoljan prognostički značaj kod obolelih od AML (Estrov Z, 1998). Bez obzira na sve navedeno, uloga BCL2L12 u AML nije jasna i potrebno je izvršiti dodatna istraživanja kako bi se odredila njegova tačna uloga u procesima apoptoze leukemijskih ćelija.

Ono što je pokazala univarijantna analiza ekspresije BCL2L12 kod naših AML pacijenata jeste da su BCL2L12⁺ pacijenti u odnosu na BCL2L12⁻ pacijente u većem riziku od relapsa bolesti i pojave smtnog ishoda. U multivarijantnoj analizi BCL2L12⁻ pacijenti su pokazali mnogo duže ukupno preživljavanje kao i duže trajanje kompletne remisije.

Svi navedeni rezultati idu u prilog tome da BCL2L12 može biti posmatran kao nov, značajan prognostički marker među obolelima od AML. Dalja istraživanja veličine ekspresije BCL2L12 kod većeg broja pacijenata kao i istraživanja usmerena u pravcu otkrivanja tačnog mehanizma dejstva BCL2L12 u leukemijama su neophodna, kako bi se doneo jasan zaključak o njegovom prognostičkom značaju i kako bi se oformile nove terapijske strategije lečenja obolelih od AML.

V - 4.3. Leukemije i ekspresija gena uključenih u apoptozu

Bilo je mnogo pokušaja da se ekspresija pro- i anti-apoptotskih gena poveže sa kliničkom slikom i ishodom leukemija. U samo nekoliko studija ova veza je zaista i pokazana, ali su te studije izvršene na relativno malom broju pacijenata sa često potpuno kontraverznim rezultatima. Smatra se da potencijalni prognostički značaj ekspresije apoptotskih gena tek treba dokazati, i to u velikim retrospektivnim studijama koristeći metodologiju koja je kvantitativna, polu-automatska i sposobna za obradu velikog broja uzoraka (npr. qPCR i „micro-array“), pri čemu će biti ispitan i veliki broj gena. Početak ovakvih istraživanja jeste

studija Hass CJ i saradnika u kojoj je ispitano 120 uzoraka pacijenata obolelih od AML kod kojih je RT-MLPA („reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification“) metodom praćena ekspresija 31 apoptotskog gena. Takođe u slučaju pedijatrijske ALL na 190 uzoraka izvršena je „micro-array“ analiza za 70 apoptotskih gena, otkrivajući sasvim nove članove BCL2 familije (BCL2L13) za koje je pokazano da imaju prognostički značaj (Holleman A, 2006).

Nivoi ekspresije pro- i anti-apoptotskih gena su međusobno komplementarne odlike istog mehanizma ćelijske smrti koji je izmenjen u toku maligne transformacije ćelije. U prilog ovome govori i novo definisan koncept „pripreme za smrt“ („primed to death“)(Certo M, 2006). Ovaj koncept razlikuje 3 vrste ćelija na osnovu njihovog apoptotskog statusa: žive, mrtve ćelije i ćelije koje su „pripremljene za smrt“, ali su još uvek „žive“ kao rezultat balansa u ekspresiji pro- i anti-apoptotskih članova BCL2 familije koji postoji u njima. Prema ovom konceptu, povećana ekspresija anti-apoptotskih proteina vodi ka povećanom vezivanju pro-apoptotskih proteina za njih, a to zauzvrat izaziva povećanu ekspresiju „BH3-only“ pro-apoptotskih proteina, koji narušavaju „apoptotsku ravnotežu“ koja postoji u ćeliji, i dovodi do smrti. Stanje ćelije „pripremljene za smrt“ je kontinuum, jer količina „BH3-only“ proteina kontinuirano varira sve dok ne premaši količinu anti-apoptotske rezerve, kada ćelija biva predodređena za smrt.

VI – ZAKLJUČCI

FLT3 u leukemogenezi

a) Mutacije u FLT3 genu

- ✓ Ispitivanjem zastupljenosti *FLT3* mutacija kod obolelih od adultne AML je pokazano da su bile prisutne u 25% slučajeva; *FLT3/ITD* u 17,4%, a *FLT3/D835* u 7,6% slučajeva.
- ✓ Prisustvo *FLT3/ITD* mutacije je poveznano sa povećanim brojem leukocita, većim procentom blasta u perifernoj krvi, CD34⁺ statusom i normalnim kariotipom.
- ✓ Pokazano je da prisustvo *FLT3* mutacija predstavlja nepovoljan prognostički faktor, jer nosioci *FLT3* mutacija imaju nižu stopu postizanja kompletne remisije, a nosioci *FLT3/ITD* mutacije imaju značajno kraće ukupno preživljavanje.
- ✓ Dužina *FLT3/ITD* duplikacije kao i veličina odnosa *ITD/wt* nisu povezani sa određenom kliničkim karakteristikama, niti imaju bilo kakvog uticaja na prognozu i ishod bolesti.
- ✓ Kod dečijih AML pacijenta *FLT3* mutacije su detektovane u 9,5% slučajeva, a frekvencije *FLT3/ITD* i *FLT3/D835* mutacija bile su podjednake, 4,7%.
- ✓ I kod dečije AML, je pokazano da *FLT3*⁺ pacijenti imaju značajno nižu stopu postizanja kompletne remisije, čime je potvrđeno da prisustvo *FLT3* mutacija predstavlja nepovoljan faktor prognoze bolesti.

b) Ekspresija FLT3 gena

- ✓ Ispitivanje ekspresije FLT3 gena kod adultinih AML i pedijatrijskih ALL pacijenata je pokazalo da je ekspresija ovog gena kod obolelih znatno viša od one detektovane kod zdravih kontrola.
- ✓ Pokazana je značajna povezanost visokog nivoa ekspresije FLT3 sa nepovoljnom prognozom.
- ✓ Ispitivanjem nivoa ekspresije FLT3 gena u različitim vremenskim periodima u toku trajanja bolesti, pokazano je da FLT3 ekspresija ima veliki potencijal kao marker za praćenje minimalne rezidualne bolesti.

NPM1 mutacije u leukemogenezi

- ✓ Ispitivanjem zastupljenosti NPM1 mutacija kod obolelih od adultne AML je pokazano da su bile prisutne u 18,5% slučajeva, dok je kod pedijatrijskih AML bolesnika, učestalost ovih mutacija iznosila 2,7%.
- ✓ Detektovane NPM1 mutacije kod adultnih pacijenata su najčešće bile A tipa (88,2%), dok je kod pedijatrijskih pacijenata, detektovana retka mutacija Q tipa.
- ✓ Postojanje očigledne razlike u frekvenciji i u tipu NPM1 mutacija između adultne i pedijatrijske AML, govori u prilog pretpostavci o postojanju različite biologije i etiologije AML kod ove dve grupe pacijenata.
- ✓ Pokazano je da je prisustvo NPM1 mutacija značajno povezano sa normalnim kariotipom i prisustvom FLT3 mutacija.

- ✓ U našoj grupi pacijenata prisustvo *NPM1* mutacije je predstavljalo nepovoljan prognostički faktor. *NPM1*⁺ pacijenti su imali nižu stopu postizanja kompletne remisije, smanjenu dužinu trajanja remisije i ukupnog preživljavanja.

Udruženost mutacija u leukemogenezi (potvrda „2 hit“ hipoteze nastanka leukemija)

- ✓ Udruženost *FLT3* i *NPM1* mutacija je bila veoma ušestala (53%). Mutacije u genu za *NPM1* dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, poremećaja u apoptozi i do povećanja genomske nestabilnosti ćelije, dok *FLT3* mutacije obezbeđuju visok proliferativni kapacitet i selektivnu prednost već mutiranih ćelija.
- ✓ U slučaju pacijenta kod koga je okarakterisana retka *NUP98/HOXC13* fuzija, detektovano i istovremeno prisustvo *FLT3/ITD* mutacije. Prisustvo *NUP98/HOXC13* fuzije obezbeđuje zastoj u procesu diferencijacije ćelije, dok prisustvo *FLT3/ITD* mutacija dovodi do povećane proliferacije, čime se obezbeđuje selektivna prednost neophodna za potpunu dominaciju leukemijskog klona.

Ekspresija *FAS* i *FAS-L* gena

- ✓ Praćenjem ekspresije gena za *FAS* i *FAS-L* kod obolelih od AML i pedijatrijske ALL, primećena je izrazita heterogenost.
- ✓ Nizak nivo ekspresije *FAS* je bio povezan sa CD34⁺ statusom, ali nije imao uticaja na prognozu i ishod bolesti.
- ✓ Nivo ekspresije *FAS-L* je bio izrazito nizak, naročito kod obolelih od ALL, i bez uticaja na prognozu i ishod bolesti.

- ✓ Heterogenost rezultata dobijenih ispitivanjem veličine odnosa *mFAS/sFAS* transkripta, doprinose zaključku da poremećaj FAS-indukovane apoptoze nije esencijalan za proces leukemogeneze.

Ekspresija gena BCL2 familije

- ✓ Posmatrajući celokupan uzorak AML i ALL pacijenata, primećena je izuzetna heterogenost u nivou ekspresije anti-apoptotskog *BCL2* gena.
- ✓ Povećanje ekspresije *BCL2* bilo je povezano sa citogenetski nepovoljnom prognostičkom grupom i CD34⁺ statusom.
- ✓ Uočena je značajna veza između povećane ekspresije *BCL2* i smrtnog ishoda bolesti.
- ✓ Primećena je izuzetna heterogenost u nivou ekspresije pro-apoptotskog *BAX* gena.
- ✓ Nivo ekspresije *BAX* gena je bio niži ili se nije razlikovao od nivoa detektovanog u zdravim kontrolama, bez značajnih razlika između pacijenata različitih FAB grupa i pacijenata sa različitim kariotipom.
- ✓ Pokazana je značajna korelacija između smanjene ekspresije *BAX* i povoljne prognoze.
- ✓ Rezultati dobijeni određivanjem vrednosti odnosa ekspresije *BCL2/BAX* su doprineli zaključku da, iako pojedinačno *BCL2* i *BAX* predstavljaju snažne supresore, odnosno aktivatore procesa apoptoze, oni predstavljaju samo jedan od brojnih faktora koji određuju krajnju sudbinu ćelije.
- ✓ Ekspresija *BCL2L12* gena među našim AML pacijentima bila je blago snižena u odnosu na nivo ekspresije kod zdravih kontrola.

- ✓ Pokazano je da povećana ekspresija *BCL2L12* gena predstavlja nezavisan nepovoljan faktor prognoze i ishoda bolesti. U multivarijantnoj analizi, pacijenti sa visokom *BCL2L12* ekspresijom nalaze u većem riziku od relapsa bolesti i pojave smtnog ishoda.

Budućnost izučavanja akutnih leukemija

- ✓ Buduće studije koje za svoj cilj imaju izučavanje ekspresije pojedinih gena kod obolelih od akutne leukemije, pored potrebe da budu urađene na velikom broju pacijenata, moraju biti zasnovane na korišćenju metodologija koje su u potpunosti standardizovane, kako bi dobijeni rezultati bili međusobno uporedivi i iskorišćeni u pravcu detekcije novih markera bolesti i stvaranju novih protokola lečenja, a sve za dobrobit pacijenata.
- ✓ Različiti načini klasifikacije leukemija koje se danas primenjuju nisu zadovoljavajući, prvenstveno zbog toga što za posledicu imaju izrazitu heterogenost na nivou osnovnih ćelijskih procesa unutar iste grupe leukemija (prema važećoj klasifikaciji). Neophodna je nova, „tačnija“, klasifikacija koja će uzimati u obzir nova saznanja o molekularnoj osnovi bolesti, kako bi se omogućila primena specifičnih terapeutika koji će direktno delovati na poremećene ćelijske procese, odnosno na osnovne uzroke pojave leukemija.

VII – LITERATURA

1. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA. Genomic structure of human FLT3: Implications for mutational analysis. *Br J Haematol* 2001;113:1076-1089.
2. Adams JM and Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-1326.
3. Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem cell maintenance. *Blood* 2005;106:899-902.
4. Andreeff M, Jiang S, Zhang X. Expression of Bcl2-related genes in normal and AML progenitors: changes induced by chemotherapy and retinoic acid. *Leukemia* 1999;13:1881-1892.
5. Argiropoulos B & Humphries RK. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* 2007;26:6766-6776.
6. Armstrong SA, Mabon ME, Silverman LB. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;113:103:41-47.
7. Arrigoni P, Berreta C, Silvestri D. FLT3 internal tandem duplication in childhood acute myeloid leukemia: association with hyperleukocytosis in acute promyelocytic leukemia. *Br J Haematol* 2003;120:89-92.
8. Bacher U, Haferlach C, Kern W. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters – an analysis of 3082 patients. *Blood* 2008;111:2527-2537.
9. Beltinger C, Kurtz E, Böhler T. CD95 (APO-1/Fas) mutations in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998;91:3943-3951.
10. Beltinger C, Böhler T, Karawajew L. Mutation analysis of CD95 (Apo-1/Fas) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 1998;102:722-728.
11. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT. Proposals for the classification of the acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias. *Br J Haematol* 1976;33:451-458.
12. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT. proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: A report of the French- American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:620-629.
13. Boissel N, Renneville A, Biggio V. Prevalence, clinical profile and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood* 2005;106:3618-3620.
14. Brady HJ, Gil-Gomez G, Kirberg J. Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *EMBO J* 1996;15:6991-6999.

15. Britos-Bray M, Ramirez M, Cao W. CBF-SMMHC expressed in M4Eo acute myeloid leukemia reduces p53 induction and slows apoptosis in hematopoietic cells exposed to DNA-damaging agents. *Blood* 1998;92:4344-4352.
16. Buzyn A, Petit F, Ostankovich M. Membrane-bound Fas (Apo-1/CD95) ligand on leukemic cells: a mechanism of tumor immune escape in leukemia patients. *Blood* 1999;94:3135-3140.
17. Campana D, Coustan-Smith E, Manabe A. Prolonged survival of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells is accompanied by overexpression of bcl-2 protein. *Blood* 1993;81:1025-1031.
18. Campos L, Sabido O, Sebban C. Expression of BCL-2 proto-oncogene in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1996;10:434-438.
19. Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* 1996;87:1089-1096.
20. Cazzaniga G, Dell'Oro MG, Mecucci C. Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *Blood* 2005;106:1419-1422.
21. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic Bcl2 family members. *Cancer Cell* 2006;9:351-365.
22. Chang JH & Olson MO. Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. *J Biol Chem* 1990;265:18227-18233.
23. Charpin C, Garcia S, Bonnier P. Bcl2 automated and quantitative immunohistochemical assays in breast carcinomas: correlation with 10-year follow-up. *J Clin Oncol* 1998;16:2025-2031.
24. Chen D, Kon N, Li M. ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumorsuppressor. *Cell* 2005;121:1071-1083.
25. Cheng J, Zhou T, Liu C. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994;263:1759-1764.
26. Chou WC, Tang JL, Lin LI. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Res* 2006;66:3310-3316.
27. Chou WC, Tang JL, Wu SJ. Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (NPM1) mutations. *Leukemia* 2007;21:998-1004.
28. Choudhary C, Schwable J, Brandts C. AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood*;106:265-273.
29. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
30. Colombo E, Bonetti P, Iazzerini Denchi E. Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Mol Cell Biol* 2005;25:8874-8886.

32. Coustan-Smith E, Kitanaka A, Pui CH. Clinical relevance of BCL-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996;87:1140-1146.
33. Čolović N, Tošić N, Aveić S. Importance of early detection and follow-up of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2007;86:741-747.
34. Del Poeta G, Venditti A, Pel Principe MI. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2003;101:2125-2131.
35. Dicker F, Haferlach C, Kern W. Trisomy 13 is strongly associated with AML1/RUNX1 mutations and increased FLT3 expression in acute myeloid leukemia. *Blood* 2007;110:1308-1316.
36. Di Giuseppe JA, Le Beau P, Augenbraun J. Multiparameter low-cytometric analysis of bcl-2 and Fas expression in normal and neoplastic hematopoiesis. *Am J Clin Pathol* 1996;106:345-351.
37. Dohner K, Schlenk RF, Habdank M. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interactions with other gene mutations. *Blood* 2005;106:3740-3746.
38. Dunphy CH. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:1004-1022.
39. Erin-Lopez JM, Frenhlick LJ, Ausio J. Long-term evolution and functional diversification in the members of the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Genetics* 2006;173:1835-1850.
40. Estrov Z, Thall PF, Talpaz M. Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictor of survival in acute myeloid leukemia. *Blood* 1998;92:3090-3097.
41. Fhroling S, Scholl C, Gilliland DG. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetics and clinical implications. *J Clin Oncol* 2005;23:6285-6295.
42. Friess H, Lu Z, Graber HU. Bax but not Bcl2 influences the prognosis of human pancreatic cancer. *Gut* 1998;43:414-421.
43. Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H. Involvement of the CD95 (Apo-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995;182:1223-1230.
44. Gale RE, Green C, Allen C. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:2776-2784.
45. Gilliland GD and Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002;100:1532-1542.
46. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia* 2006;20:1103-1108.
47. Grignani F, Ferrucci PF, Testa G. The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR α fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* 1993;74:423-431.

48. Griffith J, Black J, Faerman C. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 2004;13:169–178.
49. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking classic t(15;17): results of the European Working Party. *Blood* 2000;96:1297-1232.
50. Grisendi S, Mecicci C, Falini B. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:493-505.
51. Guo A, Salomoni P, Luo J. Role of PML in p53-dependent apoptosis. *Nature Cell Biol* 2000;2:730–736.
52. Falini B & Mason DY. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* 2002;99:409-426.
53. Falini B, Mecucci C, Tiacci E. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *N Engl J Med* 2005;352:254-266.
54. Falini B, Boli N, Shan J. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin mutants in NPMc⁺ AML. *Blood* 2006;107:4541-4523.
55. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+AML). Biologic and clinical features. *Blood* 2007;109:874-885.
56. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-777.
57. Hess CJ, Berkhof J, Denkers F. Activated intrinsic apoptotic pathway is a key related prognostic parameter in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2007;25:1209-1215.
58. Hingorani K, Szebeni A, Olson MO. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem* 2000;275:24451-24457.
59. Holleman A, den Boer M, de Menezes R. The expression of 70 apoptosis genes in relation to lineage, genetic subtype, cellular drug resistance, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006;107:769-776.
60. Iijima N, Miyamura, Itou T. Functional expression of Fas (CD95) in acute myeloid leukemia cells in the context of CD34 and CD38 expression: possible correlation with sensitivity to chemotherapy. *Blood* 1997;90:4901-4909.
61. Inaba H, Komada Y, Li QS. mRNA expression of variant Fas molecules in acute leukemia cells. *Am J Hematol* 1999;62:150-158.
62. Iwai K, Miyawaki T, Takizawa T. Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes and neutrophils. *Blood* 1994;84:1201-1208.
63. Iwai T, Yokota S, Nakao M. Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1999;13:38-43.
64. Kainz B, Fanatsch C, Schwarzhinger I. limited value of FLT3 mRNA expression in the bone marrow for prognosis and monitoring of patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2005;90:695-696.

65. Kamihira S, Yamada Y, Hirakata Y. Quantitative characterization and potential function of membrane Fas/APO-1 (CD95) receptors on leukemic cells from chronic B and T lymphoid leukemias. *Br J Haematol* 1997;99:858-865.
66. Kamihira S, Yamada Y, Tomonaga M. Discrepant expression of membrane and soluble isoforms of Fas (CD95/APO-1) in adult T-cell leukemia: soluble Fas isoform is an independent risk factor for prognosis. *Br J Haematol* 1999;107:851-860.
67. Kang HJ, Hong SH, Kim IH. Prognostic significance of FLT3 mutations in pediatric non-promyelocytic acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2005;29:617-623.
68. Karakas T, Mauer U, Weidmann CC. High expression of bcl2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Ann Oncology* 1998;9:159-165.
69. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N. Expression and function of Fas and Fas ligand on peripheral blood lymphocytes in normal subjects. *J Lab Clin Med* 1998;132:404-413.
70. Kitada S, Takayama S, DeRiel K. Reversal of chemoresistance of lymphoma cells by antisense-mediated reduction of bcl2 gene expression. *Antisense Res Dev* 1994;4:71-79.
71. Kiyoi H, Naoe T, Yokota S. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 1997;11:1447-1452.
72. Kiyoi H, Towatari M, Yokota S. Internal tandem duplication of FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998;12:1333-1337.
73. Klampfer L, Zhang J, Zelenetz AO. The AML1/ETO fusion protein activates transcription of bcl-2 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14059-14063.
74. Knudson AG Jr, Hethcote HW, Brown BW. Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence in retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:5116-5120.
75. Kohler T, Schill C, Deininger MW. High Bax and Bcl-2 expression correlate with negative outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia* 2002;16:22-29.
76. Kontos CJ, Papadopoulos IN, Scorilas A. Quantitative expression analysis and prognostic significance of the novel apoptosis-related gene BCL2L12 in colon cancer. *Biol Chem* 2008;389:1467-1475.
77. Kornblau SM, Thall PF, Estrov Z. The prognostic impact of BCL2 protein expression in acute myelogenous leukemia varies with cytogenetics. *Clin Cancer Res* 1999;5:1758-1766.
78. Kornblau SM, Vu HT, Ruvolo P. BAX and Bcl-2 modulate the prognostic impact of BCL2 expression in acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*, 2000;6:1401-1409.
79. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME. The presence of FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001;98:1752-1759.

80. Kuchenbauer F, Kern W, Schoch C. Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2005;90:1617-1625.
81. Kušec R, Jakšić O, Ostojić S. More on prognostic significance of FLT3/ITD size in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006;108:405-406.
82. Lambert B, Buckle M. Characterization of the interface between nucleophosmin (NPM) and p53: potential role in p53 stabilization. *FEBS Lett* 2006;6580:345-350.
83. Lee EJ, Yang J, Leavitt RD. The significance of CD34 and TdT determinations in patients with untreated de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1992;6:1203-1209.
84. Li Q, Tsurda K, Sugahara K. Qualitative and quantitative characterization of Fas (CD95) expression and its role in primary human acute leukemia cells. *Leukemia Res* 2000;24:437-444.
85. Liang DC, Shih LY, Hung IJ. Clinical relevance of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer* 2002;94:3292-3298.
86. Liang DC, Shih LY, Hung IJ. FLT3-TKD mutation in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003;17:883-886.
87. Libura M, Asnafi V, Tu A. FLT3 and MLL intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress. *Blood* 2003;102:2198-2204.
88. Lickliter JD, Kratzke RA, Nguyen PL. Fas ligand is highly expressed in acute leukemia and during the transformation of chronic myeloid leukemia to blast crisis. *Exp Hematol* 1999;27:1519-1527.
89. Lisovsky M, Estrov Z, Zhang X. Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells; regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood* 1996;88:3987-3997.
90. Liu C, Cheng J, Mountz J. Differential expression of human Fas mRNA species upon peripheral blood mononuclear cell activation. *Biochem J* 1995;310:957-963.
91. Liu JH, Wei S, Lamy T. Blockade of Fas dependent apoptosis by soluble Fas in LGL leukemia. *Blood* 2002;100:1449-1453.
92. Livak KL & Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ddCt} method. *Methods* 2001;25:402-408.
93. Lyman SD. Biology of flt3 ligand and receptor. *Int J Hematol* 1995;62:63-73.
94. Maciejewski J, Selleri C, Anderson S. Fas antigen expression on CD34⁺ human marrow cells is induced by interferon γ and tumor necrosis factor α and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood* 1995;85:3183-3190.
95. Mandal M, Maggirwar SB, Sharma N. Bcl2 prevents CD95(Fas/Apo-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose)polymerase and restores the NF- κ B signaling pathway. *J Biol Chem* 1996;271:30354-30359.
96. Marcucci G, Stock W, Dai G. Phase I study of oblimersen sodium and antisense to Bcl2 in untreated older patients with AML. *J Clin Oncol*, 2005;23:3404-3411.
97. Mathews W, Jordan CT, Wiegand GW. A receptor kinase specific to hematopoietic stem cell and progenitor cell enriched populations. *Cell* 1991;65:1143-1152.

98. Meijerink JPP, Mensink EJB, Wang K. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of bax. *Blood* 1998;91:2991-2997.
99. Mei Zhou, Susan D. Demo, Thida N. A Novel Splice Variant of the Cell Death-promoting Protein BAX. 1998;273:11930-11936.
100. Meshinchi S, Wood WG, Stirewalt DL. Prevalence and prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:89-94.
101. Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood* 2006;108:3654-3661.
102. Min YH, Lee S, Lee JW. Expression of Fas antigen in acute myeloid leukemia is associated with therapeutic response to chemotherapy. *Br J Haematol* 1996;93:928-930.
103. Minami Y, Yamamoto K, Kiyoi H. Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia. *Blood*, 2003;102:2969-2975.
104. Miyashita T, Reed JC. Bcl2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in human leukemia cell line. *Blood* 1993;81:151-157.
105. Mullighan CG, Kennedy A, Zhou X. Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterised by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. *Leukemia* 2007;21:2000-2009.
106. Nagata S & Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-1455.
107. Nakao M, Yokota S, Iwai T. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1911-1918.
108. Neiborowska-Skorska M, Wasik MA, Slupianek A. Signal transducer and activation of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact SRC homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. *J Exp Med* 1999;189:1229-142.
109. Nishimura Y, Ohkubo T, Furuichi Y. Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;66:2239-2249.
110. Nguyen M, Branton PE, Walton PA. Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus. *J Biol Chem* 1994;269:16521-16524.
111. Okuda M. The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene* 2002;21:6170-6174.
112. Oltvai ZN, Milman CL, Korsmeyer SJ. Bcl2 heterodimerizes in vivo with conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619.
113. Ong YL, McMullin MF, Bailie KEM. High bax expression is a good prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 2000;111:182-189.
114. Osato N, Suzuki Y, Ikeo K. Transcriptional interferences *in cis* natural antisense transcripts of humans and mice. *Genetics* 2007;176:1299-1306.

- 115.Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y. Biological and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* 2004;103:1901-1908.
- 116.Papadaki C, Dufour A, Seibl M. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. *Br J Haematol* 2008;144:517-523.
- 117.Peyton JE, Grieselhuber NR, Chang LW. High-throughoutput digital quantification of mRNA abundance in primary human acute myeloid leukemia samples. *J Clin Invest*, 2009;119:1714-1726.
- 118.Pineault N, Abramovich C, Ohta H. Differential and common leukemogenic potential of multiple NUP98-HOX fusion proteins alone or with Meis1. *Mol Cell Biol* 2004;24:1907-1917.
- 119.Ponziani V, Gianfaldoni G, Mannelli F. The size of tandem duplication does not add to the prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006;20:2074-2076.
- 120.Reichmann E. The biological role of the Fas/FasL system during tumor formation and progression. *Cancer Biol* 2002;12:309-315.
- 121.Reilly JT. Receptor tyrosine kinases in normal and malignant hematopoiesis. *Blood Rev* 2003;17:241-248.
- 122.Robertson LE, Plunkett W, McConnell. Bcl2 overexpression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* 1996;10:456-459.
- 123.Rombouts WJ, Blokland I, Lowenberg B. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene. *Leukemia* 2000;14:675-683.
- 124.Rozenfeld-Granot G, Toren A, Amariglio N. Mutation analysis of the FAS and TNFR apoptotic cascade genes in hematological malignancies. *Experimental Hematology* 2001;29:228-233.
- 125.Rosnet O, Buhring HJ, Marchetto S, et al. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosin kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* 1996;10:238-248.
- 126.Rosnet O, Marchetto S, deLapeyriere O. Murine Flt3 gene, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene* 1991;6:1641-1650.
- 127.Rossi D & Gaidani G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* 2003;88:212-218.
- 128.Ruvolo PP, Deng X, Carr B. A functional role for mitochondrial protein kinase c- α in bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:25436-25442.
- 129.Ryan AE, Lane S, Shanahan F. Fas ligand expression in human and mouse cancer cell lines; a caveat on over-reliance on mRNA data. *J Carcinogenesis* 2006;5:5.
- 130.Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-5467.

131. Salomons GS, Hugh J, Brady M. The Bax:Bcl-2 ratio modulates the response to dexamethasone in leukaemic cells and is highly variable in childhood acute leukaemia. *Int J Cancer* 1997;71:959-965.
132. Schnittger S, Schoch C, Kern W. Analysis of the FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlations to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker of the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002;100:59-66.
133. Schnittger S, Schoch C, Kern W. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *Blood* 2005;106:3733-3739.
134. Shimada A, Taki T, Kubota C. No nucleophosmin mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative study group. *Leukemia* 2007;21:1307.
135. Scorilas A, Kyriakopoulou L, Yousef GM. Molecular cloning, physical mapping and expression analysis of a novel gene BCL2L12, encoding a proline-rich protein with a highly conserved BH2 domain of the Bcl2 family. *Genomics* 2001;72:217-221.
136. Silva FPG, Lind A, Brouwer-Mandema G. Trisomy 13 correlates with RUNX1 mutation and increased FLT3 expression in AML-M0 patients. *Haematologica* 2007;92:1123-1126.
137. Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Am Soc Hematol Educ program* 2006;178-184.
138. Srinivasa SP and Doshi PD. Extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways cooperate in mediating cytokine-induced proliferation of a leukemic cell line. *Leukemia* 2002;16:244-253.
139. Srinivas G, Kusumakumary P, Nair MK. Mutant p53 protein and Bcl2/Bax ratio and apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:62-67.
140. Stegh AH, Kin H, Bachoo RM. Bcl2L12 inhibits post-mitochondrial apoptosis signaling in glioblastoma. *Genes & Dev* 2007;21:98-111.
141. Stegh AH, Chin L, Louis DN. What drives intense apoptosis resistance and propensity for necrosis in glioblastoma? A role for Bcl2L12 as a multifunctional cell death regulator. *Cell Cycle* 2008;7:2833-2839.
142. Stegh AH, Kesari S, Mahoney JE. Bcl2L12-mediated inhibition of effector caspase-3 and caspase-7 via distinct mechanisms in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10703-10708.
143. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:3589-3595.
144. Stirewalt DL and Radich JP. The role of FLT3 in hematopoietic malignancies. *Nature Rev Cancer* 2003;3:650-665.

145. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006;107:3724-3726.
146. Suarez L, Vidriales MB, Garcia-Larana J. CD34⁺ cells from acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes and normal bone marrow display different apoptosis and drug resistance-associated phenotypes. *Clin Cancer Res* 2004;10:7599-7606.
147. Sugimoto M, Kuo ML, Roussel MF. Nucleolar Arf tumorsupressor inhibits ribosomal RNA processing. *Mol Cell* 2003;11:1415-1424.
148. Sumantran VN, Ealogueva MW, Nunez G. Overexpression of Bcl-Xs sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1995;55:2507-2510.
149. Suminoe A, Matsuzaki A, hattori H. mRNA expression of apoptosis-associated genes in infant acute lymphoblastic leukemia: low Fas expression is an independent predictor for poor prognosis. *Leukemia* 2004;18:365-368.
150. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;106:2854-2861.
151. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden JHV. Minimal residual disease. *Lancet Oncol* 2001;2:409-417.
152. Takayama H, Takakuwa T, Dong Z. Fas gene mutations in prostatic intraepithelial neoplasia and concurrent carcinoma: analysis of laser capture microdissected specimens. *Laboratory investigations* 2001;81:283-288.
153. Talieri M, Diamandis EP, Katsaros N. Expression of Bcl2L12, a new member of apoptosis-related genes, in breast tumors. *Thromb Hemost* 2003;89:1081-1088.
154. Tamiya S, Etoh K, Suzushima H. Mutations of CD95 (Fas/Apo-1) gene in adult T-cell leukemia cells. *Blood* 1998;91:3935.
155. Tanaka S, Saito K and Reed JC. Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival. *J Biol Chem* 1993;268:10920-10926.
156. Tang D, Lahti JM, Kidd V. Caspase-8 activation and bid cleavage contributes to MCF7 cellular execution in a casapase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:9303-9307.
157. Thiede C, Steudel C, mohr B. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002;99:4326-4335.
158. Thiede C, Koch S, Creutzig E. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006;107:4011-4020.
159. Thiede C, Creutzig E, Reinhardt D. Different types of NPM1 mutations in children and adults: evidence for an effect of patient age on the prevalence of the TCTG-tandem duplication in NPM1-exon 12. *Leukemia* 2007;21:366-367.

160. Thomadaki H, Talieri M, Scorilas A. Prognostic value of the apoptosis related genes Bcl2 and Bcl2L12 in breast cancer. *Cancer lett* 2007;247:48-55.
161. Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
162. Tse KF, Mukherjee G, Small D. Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* 2000;14:1766-1776.
163. Tsujimoto Y and Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5214-5218.
164. Tsui KH, Cheng AJ, Chang PL. Association of nucleophosmin/B23 mRNA expression with clinical outcome in patients with bladder carcinoma. *Urology* 2004;64:839-844.
165. Tošić N, Stojiljković M, Čolović N. Acute myeloid leukemia with NUP98-HOXC13 fusion and FLT3 internal tandem duplication mutation: case report and literature review. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;193:98-103.
166. Uckun FM, Yang Z, Sather H. Cellular expression of antiapoptotic Bcl-2 oncoprotein in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: A children's cancer group study. *Blood* 1997;89:3769-3777.
167. Uhlmann EJ, Subramanian T, Vater CA. A potent cell death activity associated with transient high level expression of Bcl2. *J Biol Chem* 1998;273:17926-17932.
168. Van Der Vliet HJ, Wever PC, Van Diepen FN. Quantification of Bax/Bcl-2 ratios in peripheral blood lymphocytes, monocytes and granulocytes and their relation to susceptibility to anti-Fas (anti-CD95)-induced apoptosis. *Clin Exp Immunol* 1997;110:324-328.
169. Van Stijn A, van der Pol MA, Kok A. Differences between the CD34+ and CD34- blast compartments in apoptosis resistance in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2003;88:497-508.
170. 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;106:3747-3754.
171. Volm M, Zintl F, Edler L. Prognostic value of protein kinase C, proto-oncogene products and resistance-related proteins in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1998;28:117-126.
172. Wang NS, Unkila MT, Reineks EZ. Transient expression of wild-type or mitochondrially targeted Bcl2 induces apoptosis, whereas transient expression of endoplasmic reticulum-targeted Bcl2 is protective against Bax-induced cell death. *J Biol Chem* 2001;276:44117-44128.
173. Warner JK, Wang JCY, Hope KJ. Concepts of human leukemic development. *Oncogene* 2004;23:7164-7177.

174. Weisberg E, Roesel J, Bold G. Antileukemic effects of the novel, mutant FLT3 inhibitor NVP-AST487: effects on PKC412-sensitive and -resistant FLT3-expressing cells. *Blood* 2008;112:5161-5170.
175. Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD. 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* 2008;111:552-559.
176. Wood CM, Goodman PA, Vassilev AO. CD95 (APO-1/FAS) deficiency in infant acute lymphoblastic leukemia: detection of novel soluble Fas splice variants. *Eur J Haematol* 2003;70:156-171.
177. Wuchter C, Karawajew L, Ruppert V. Constitutive expression levels of CD95 and Bcl2 as well as CD95 function and spontaneous apoptosis *in vitro* do not predict the response to induction chemotherapy and relapse rate in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2000;110:154-160.
178. Xu F, Taki T, Yang HW. Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukemia in children. *Br J Haematol* 1999;105:155-162.
179. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y. Activating mutation D835 with the activation loop of the FLT3 in human hematological malignancies. *Blood* 2001;97:2434-2439.
180. Yang J, Hong Y, Wang W. HSP70 protects BCL2L12 and BCL2L12-A from N-terminal ubiquitination-mediated proteasomal degradation. *FEBS Lett* 2009;583:1409-1414.
181. Ye K. Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2005;4:918-923.
182. Yoneda Kato N, Look AT, Kirstein MN. The t(3;5)(q25;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene NPM-MLF1. *Oncogene* 1996;12:265-275.
183. Yu Y, Maggi LB Jr, Brady SN. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Mol Cell Biol* 2006;26:3798-3809.
184. Yun JP, Chew JC, Liew CT. Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. *J Cell Biochem* 2003;90:1140-1148.
185. Zhang S, Mantel C, Broxmeyer H. Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and Shc in Baf3/Flt3 cells. *J Leukocyte Biol* 1999;65:372-380.
186. Zhang S, Fukuda S, Lee Y. Essential role of signal transducer and activator of transcription STAT5a but not STAT5b for Flt3-dependent signaling. *J Exp Med* 2000;192:719-728.
187. Zhang S, Gao S, De Geyter C. A natural antisense transcript, BOKAS, regulates the pro-apoptotic activity of human Bok. *Int J Oncol* 2009;34:1135-1138.
188. Zheng R, Levis M, Piloto O. FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2004;103:267-274.

189. Zhong S, Salomoni P, Ronchetti S. Promyelocytic Leukemia (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med* 2000;191:631–639.
190. Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP. FLT3 internal tandem mutations in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood* 2003; 102:2387-2394.

Универзитет у Београду
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА ФИЗИОЛОГИЈУ И БИОХЕМИЈУ
БИБЛИОТЕКА
Инв. бр. 50078
БЕОГРАД

