

Received: 2007.06.12
Accepted: 2007.08.29
Published: 2007.10.02

Profile ekspresji genów w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci i dorosłych*

Gene expression profiles in acute lymphoblastic leukemia in children and adults

Joanna Szczepanek^{1,2}, Jan Styczyński¹, Olga Haus^{3,4}, Andrzej Tretyn², Mariusz Wysocki¹

¹ Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika

² Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu

³ Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika

⁴ Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie

Ostre białaczki limfoblastyczne (acute lymphoblastic leukemia – ALL) stanowią heterogenną grupę chorób układu białokrwinkowego. Określono dla nich wiele czynników biologicznych i klinicznych o znaczeniu prognostycznym, jednak dotychczasowa stratyfikacja pacjentów jest nadal niewystarczająca. Wciąż istnieje potrzeba dokładniejszego poznania i zrozumienia biologii ALL, a tym samym reklasifikacji, rozwoju nowych terapii opartych o precyzyjne przyporządkowanie pacjentów do grup ryzyka. Opracowana i rozwijana w ostatnich dwóch dekadach technika mikromacierzy budzi coraz większe nadzieje na zrewolucjonizowanie badań klinicznych chorób nowotworowych. Jej ogromny potencjał wynika z możliwości analizy setek sekwencji genowych w jednym eksperymencie. Tworzone na podstawie kompleksowych danych profile ekspresji genów mogą mieć zastosowanie w wielu aspektach analizy ostrej białaczki limfoblastycznej. Badania wzorców ekspresji genów u pacjentów z ALL dostarczają nowych informacji o biologii poszczególnych podgrup białaczek. Dzięki tej metodzie można dokładniej ocenić ryzyko wśród pacjentów z ALL we wszystkich grupach wiekowych; możliwe jest poszukiwanie nowych markerów o znaczeniu diagnostycznym oraz prognostycznym, a także przydatnych w reklasifikacji, można również odkrywać nowe cząsteczki docelowe dla zindywidualizowanej terapii. Do 2007 r. opublikowano dużą liczbę prac dotyczących wykorzystania technologii macierzy ekspresyjnych w badaniach nowotworów hematologicznych. W prezentowanej pracy przedstawiono obecny poziom wiedzy dotyczącej profili ekspresji genów w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci oraz u dorosłych.

Słowa kluczowe:

ostra białaczka limfoblastyczna • mikromacierz • profile ekspresji genów • lekooporność

Summary

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a heterogeneous group of white blood cell malignancies. Though a number of clinical and biological prognostic factors have been determined, the current patient stratification in this disease is still not satisfactory. Better knowledge and understanding of

* Praca finansowana ze środków na naukę MNiSW w latach 2007–2010, jako projekt badawczy nr N407 078 32/2964.

the biology of ALL is necessary for re-classification and risk-adapted therapy. Microarray technology, developed over last two decades, provides a potential for revolutionary changes in the diagnosis and monitoring of malignant diseases. Hundreds of genomic sequences can be analyzed in a single microarray experiment. A large amount of data have been obtained by microarray technology in hematological malignancies. Gene expression profiles based on this technology are currently being extensively studied in patients with ALL, and new data are being obtained in specific subgroups of patients. New markers based on gene expression might be identified and used to stratify patients and to individualize therapy. As the biology of ALL differs with respect to age, microarray technology can improve the determination of risk factors in each age group. This review presents the current status of knowledge on gene expression profiles in ALL in children and adults.

Key words: acute lymphoblastic leukemia • microarray • gene expression profile • drug resistance

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11271.pdf

Word count: 5138

Tables: 4

Figures: 1

References: 63

Adres autora: dr hab. n. med. Jan Styczyński, Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika, ul. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz; e-mail: jstyczynski@cm.umk.pl

WPROWADZENIE

Znaczący postęp genetyki molekularnej, związany z ukończeniem projektu sekwencjonowania ludzkiego genomu (Human Genome Project), umożliwia prowadzenie kompleksowych analiz funkcji różnych genów człowieka, zwłaszcza pod kątem ich udziału w procesach chorobowych [5,19,24]. Zrewolucjonizował również charakterystykę ostrych białaczek [12,42]. Główną techniką służącą analizie profili genetycznych stały się tzw. mikromacierze [5,39]. Odróżnienie poszczególnych typów nowotworów jest możliwe obecnie nie tylko na podstawie ich cech ogólnych, takich jak np. morfologia, cechy biochemiczne, zmiany w strukturze (translokacje, delecje) i liczbie (hipo- i hiperdiploidia) chromosomów, ale również poprzez określanie molekularnych mechanizmów patofizjologicznych, identyfikację genów zaangażowanych w procesy leukemogenezy [3,42]. Profilowanie ekspresji w obrębie całego genomu nie tylko stwarza możliwość zastąpienia pracochłonnych i często niewygodnych technik klasycznych, ale umożliwia uzyskanie dodatkowych informacji, które pozwolą zanalizować szczegółowo i poprawić protokoły leczenia w stosunku do oceny ryzyka [42]. Analiza profilu aktywności genów może dostarczyć znacznie więcej użytecznych informacji niż klasyczne metody badań komórek nowotworowych.

Ostra białaczka limfoblastyczna u dzieci i dorosłych

Ostre białaczki limfoblastyczne (acute lymphoblastic leukemia – ALL) stanowią heterogenną grupę chorób nowotworowych, występujących u dzieci i dorosłych, przy czym częstość zachorowań maleje wraz z wiekiem [37,54,62]. Cechują się występowaniem niedojrzałych komórek limfoidalnych w szpiku kostnym, krwi oraz tworzących nacieki w różnych organach [18,21,35]. ALL występują głównie

u dzieci i stanowią 80% wszystkich białaczek w tej grupie wiekowej. U dorosłych ALL stanowią 20% wszystkich ostrych białaczek, zaś ich występowanie obserwuje się przeważnie przed 30 rokiem życia [35]. U dzieci ostra białaczka limfoblastyczna cechuje się większą podatnością na leczenie niż u dorosłych. Za różnice biologiczne i kliniczne mogą być odpowiedzialne odrębne zmiany genetyczne występujące w limfoblastach [22].

Ostrą białaczkę limfoblastyczną charakteryzują liczne zaburzenia genetyczne, które definiują jej poszczególne podtypy, różniące się od siebie pod względem cytomorfologii, immunofenotypu oraz aberracji chromosomowych i genowych, a także odpowiedzi na terapię oraz ryzykiem nawrotu [29,37,43,48,62]. Na podstawie charakterystyki immunofenotypowej wyróżnia się B-prekursorową ALL oraz ostrą białaczkę limfoblastyczną z linii komórek T (T-ALL). W ALL linii B-komórkowej często stwierdza się występowanie kilku podklas genetycznych takich jak: z występowaniem hiperdiploidii >50 chromosomów, t(12;21)(TEL-AML1), z obecnością rearanżacji MLL, t(1;19)(E2A-PBX1), t(9;22)(BCR-ABL) [21,43,48,62]. Częstości poszczególnych podtypów ALL są odmienne w różnych grupach wiekowych [9,43,45,54]. Dotychczas zidentyfikowano wiele aberracji i fuzji genowych charakterystycznych dla tego typu nowotworów, zaś liczne prowadzone badania koncentrują się na analizie transkryptomu blastów białaczkowych i możliwościach opracowania profili genetycznych, użytecznych klinicznie [12,16].

Ze względu na łatwość pozyskiwania próbek do analizy oraz izolacji homogennej puli komórek z krwi obwodowej czy szpiku kostnego w nowotworach hematologicznych, pierwsze badania ekspresji z wykorzystaniem technologii mikromacierzy dla tkanek nowotworowych, przeprowadzano w białaczkach [16,39].



Tabela 1. Charakterystyka głównych typów macierzy genowych (opracowanie własne)

Cecha	Macierze cDNA		Macierz oligonukleotydowa GeneChip
	Makromacierz	Mikromacierz	
Podłoże	membrana nylonowa lub celulozowa	szkło, plastik	szkło, krzem
Typ sondy	klony cDNA, produkty PCR		oligonukleotydy
Długość sondy	10–5000 zasad/sekwencję 1 sekwencja/1 gen		10–75 zasad/sekwencję (najczęściej 25). Wiele sekwencji/1 gen
Sposób syntezy	nakrapianie na podłoże z wykorzystaniem robota		fotolitografia
Zagęszczenie	1–100/cm ²	>5000/cm ²	64.000–1.000.000/cm ²
Typ znakowania	radioizotopowe, chemiluminescencyjne	fluorescencyjne	fluorescencyjne
Czułość (%)	<0,01	0,5×10 ⁻⁶ –10 ⁻⁵	2×10 ⁻⁴ –2×10 ⁻⁴
Wymagana ilość RNA (µg)	25	50–200	25–150
Zastosowanie	analiza zróżnicowanej ekspresji genów, identyfikacja nowych powiązań szlaków metabolicznych		wykrywanie mutacji, badanie SNP, odkrywanie genów oraz mapowanie

Technika macierzy ekspresyjnych: budowa i założenia metody

Technika macierzy DNA (biochipów) należy do najszerzej stosowanych w badaniach molekularnych metod transkryptomiki. Macierze DNA to zminiaturyzowany układ hybrydacyjny, na który składają się uporządkowane zestawy genów lub części ich fragmentów (tzw. sond molekularnych) w postaci oligonukleotydów lub sekwencji cDNA, unieruchomione na stałym podłożu (szkiełko podstawowe, nylonowa, nitrocelulozowa lub plastikowa membrana, krzemowa płytka) w ściśle określonym porządku [19,24,52,56]. Typową mikromacierz stanowi prostokątna płytka, o powierzchni od jednego do kilkudziesięciu cm² [16], na której unieruchomionych jest obok siebie 200–500 tys. sond molekularnych (tabela 1) [5]. Poprzez numer kolumny i wiersza są definiowane pozycje genów.

Ze względu na różnice w kilku parametrach (tabela 1) macierze ekspresyjne klasyfikuje się jako makromacierze, mikromacierze, macierze oligonukleotydowe o dużej gęstości (GeneChips) oraz macierze mikroelektroniczne [1,56].

We wszystkich odmianach tej technologii wyróżnić można kilka wspólnych etapów [8,16,56]. Przeprowadzenie analizy ekspresji genów wymaga przede wszystkim wyizolowania puli całkowitego RNA lub mRNA wysokiej jakości, zarówno z materiału badanego jak i referencyjnego. Materiał genetyczny jest następnie wykorzystywany do syntezy znakowanego (najczęściej barwnikami fluorescencyjnymi) cDNA lub cRNA, który w kolejnym etapie poddaje się reakcji hybrydyzacji z sondami na wybranym typie macierzy [46,47,52]. Pomiar intensywności sygnału zhybrydowanych prób jest wykonywany z zastosowaniem odpowiednich detektorów (np. laser w przypadku znaczników fluorescencyjnych) [24,46]. Intensywność sygnału jest następnie korelowana z wyjściowym stężeniem mRNA

w analizowanym materiale, co pozwala na porównawczą ocenę genów ulegających nadekspresji lub wyciszeniu, pozostających na niezmiennym poziomie, czy też nieobecnych (ryc. 1) [5,19,24,56].

Dzięki mikromacierzom możliwe jest ocenienie ekspresji tysięcy genów w sposób jakościowy jak i ilościowy [24,25]. Technika ta wyróżnia się bardzo wysoką czułością: dzięki niej można wykryć obecności 1 kopii mRNA na komórkę. Do przeprowadzenia analizy wymagana jest stosunkowo niewielka ilość RNA (0,1–40 µg) [5,16,19].

W szerokogenomowych analizach ekspresji genów najczęściej wykorzystuje się macierze cDNA oraz macierze oligonukleotydowe [42,56]. Skonstruowano również mikromacierz przeznaczoną do analizy prawidłowych i chorobowych stanów układu immunologicznego, tzw. lymphochip. Chip ten zawiera 15 tysięcy sond (klonów cDNA z biblioteki ludzkich komórek immunologicznych), odpowiadających 3000 genów o dobrze znanej funkcji [52]. Po zakończeniu sekwencjonowania genomu ludzkiego opracowano macierz wysokiej gęstości HGU-133 Set firmy Affymetrix, zawierająca całą znaną sekwencję człowieka. Obecnie z jej użyciem prowadzona jest większość badań dotyczących ekspresji genów w ostrych białaczkach oraz innych chorobach nowotworowych. Golub i wsp. [28] jako pierwsi wprowadzili technikę mikromacierzy do badań ostrych białaczek limfoblastycznych.

Zastosowanie techniki mikromacierzy w charakterystyce chorób nowotworowych

Technika wykorzystywana jest przede wszystkim w określaniu profilu ekspresji genów, czyli analiz transkryptomu (puli cząsteczek RNA) [8]. Profilem ekspresji określa się zestaw kompleksowych danych otrzymanych tą metodą. Wzór ekspresji opracowany dla ograniczonej grupy genów

stanowi podpis/sygnaturę molekularną. Klasyfikatory molekularne to dane służące klasyfikacji tkanek.

Biochipy są coraz powszechniej stosowane w badaniach naukowych, mających na celu poznanie biologii nowotworów, poszukiwanie nowych biomarkerów wczesnych stadiów rozwoju choroby, molekularne klasyfikowanie nowotworów oraz postawienie odpowiednio wczesnej i prawidłowej diagnozy. Określanie najbardziej charakterystycznych elementów profilu i korelowanie ich z rokowaniami ma szansę na zrewolucjonizowanie właściwego doboru leczenia, jak również poznawania czynników wpływających na przebieg choroby i stosowanej terapii, ocenę prawdopodobieństwa wystąpienia przerzutów czy nawrotów [8,16,19,24,25,46,52,56,61]. Możliwości, jakie daje technika mikromacierzy, budzą nadzieje przede wszystkim na lepsze poznanie i zrozumienie patogenyzy ostrych białaczek. Dzięki identyfikacji nowych szlaków metabolicznych zaangażowanych w proces leukemogenezy oraz leżących u podstaw zjawiska oporności na chemioterapię być może w przyszłości stanie się możliwe opracowanie potencjalnych dróg nowoczesnej, zindywidualizowanej terapii [12,42,45,61].

ZASTOSOWANIE TECHNIKI CHIPÓW GENOWYCH W KLASYFIKACJI TYPÓW BIAŁACZEK

Klasyfikacja nowotworów odgrywa ważną rolę we współczesnej onkologii [63]. Od 10 lat technikę tę często wykorzystuje się w badaniach nowotworów hematologicznych (tabela 3) [28,53]. Bardzo duże znaczenie w leczeniu ostrych białaczek ma zaliczenie pacjentów do właściwych grup ryzyka, co umożliwia zarówno maksymalizację efektywności terapii jak i minimalizację jej toksyczności [28,48,57]. Obecnie dokładna stratyfikacja pacjentów do odpowiednich podklas genetycznych, a zatem i grup ryzyka jest wciąż pracochłonnym i kosztownym procesem diagnostycznym, obejmującym kompleksowe analizy morfologii, immunofenotypu, cytogenetyki, odpowiedzi na terapię indukcyjną oraz badania genetyczne [25,30,35,60,62]. Obecnie w ostrej białaczce limfoblastycznej możliwe jest przeprowadzenie kilku rodzajów klasyfikacji. Główne z nich to:

- (a) klasyfikacja morfologiczna FAB, wyróżniająca trzy podtypy ALL (L1-L3);
- (b) klasyfikacja cytochemiczna;
- (c) klasyfikacja immunologiczna, obejmująca 7 podtypów ALL;
- (d) klasyfikacja cytogenetyczna oraz
- (e) klasyfikacja molekularna.

Taka klasyfikacja jest nadal niezadowolająca, gdyż do większości wznów dochodzi w grupie pośredniego i standardowego ryzyka [12,41]. Profilowanie ekspresji genów umożliwia precyzyjną klasyfikację znanych podtypów ostrych białaczek, stąd też pierwsze analizy transkryptomu w ostrych białaczkach miały na celu ich reklasyfikację [42]. Molekularna klasyfikacja w oparciu o metodę profilowania ekspresji genów pozwala na określenie profilu genetycznego nowotworów mieloidalnych i limfoidalnych, B-liniowej i T-liniowej ALL, jak również wyszczególnienie podklas w obrębie podtypów białaczek [4,10,15,26,48,58,62]. Na podstawie analiz mikromacierzowych, wykazano korelację między immunofenotypem i zaburzeniami chromosomowymi a różnymi wzorcami ekspresji genów we wszystkich podtypach ostrych białaczek [37].

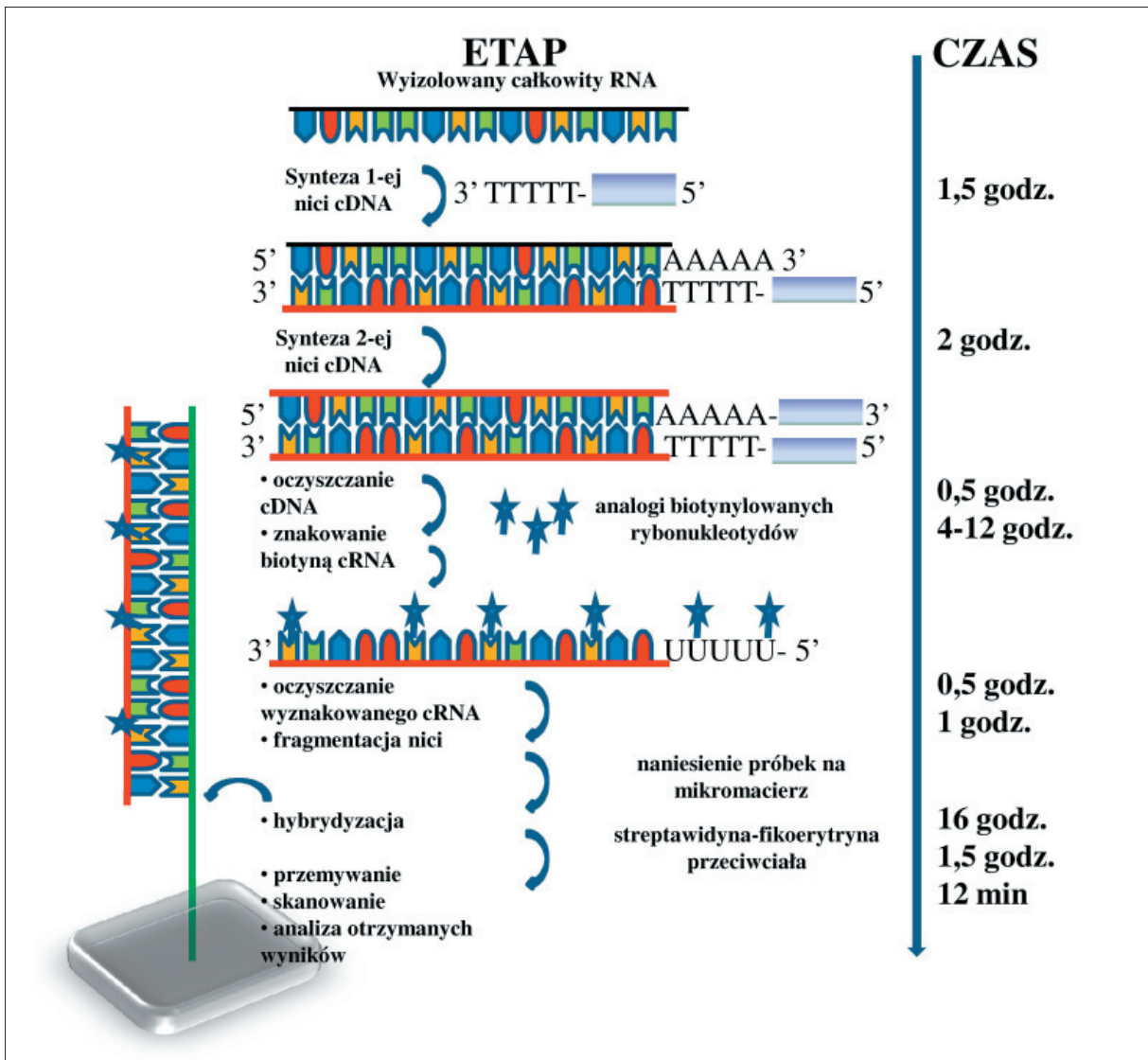
Różnice w profilu genetycznym między ostrą białaczką limfoblastyczną a mieloblastyczną

Golub i wsp. [28] wprowadzili do klasyfikacji chorób nowotworowych koncepcję „odkrywania klas” (class discovery), to jest identyfikacji wcześniej nieznanymi podtypów nowotworów oraz „przewidywania klas” (class prediction); określenia przynależności nowotworów do określonych, dobrze zdefiniowanych klas w oparciu o profil ekspresji [28]. Na podstawie tych badań wykazano, iż możliwe jest molekularne klasyfikowanie poszczególnych przypadków choroby bez konieczności znajomości *a priori* danej podklasy, a nawet odkrywanie nowych klas i podtypów białaczek o znaczeniu biologicznym jak i klinicznym [16,28]. Zróznicowanie ostrej białaczki szpikowej i ostrej białaczki limfoblastycznej jest możliwe w odniesieniu do danych dotyczących profilu zaledwie kilkudziesięciu genów. Zidentyfikowano 50 genów (w tym *CD11c*, *CD33*, *MB-1*, *Op18*, *MCM3*, *RbAp48*, *SNF2*, *TF2Eβ*, *c-MYB*, *E2A*, *HOXA9*, gen receptora leptyn), ulegających wyraźnie różnej ekspresji u pacjentów z AML i ALL. Odróżnienie tych dwu podklas ostrych białaczek można wykonać na podstawie jednego badania. Badacze ci podkreślili, iż tak szczegółowe dane stanowią nie tylko wygodne narzędzie klasyfikacji linii komórek hematopoetycznych, ale również dostarczają nowego spojrzenia na patogenę oraz farmakologię ostrych białaczek. Armstrong i wsp. [4] przeanalizowali przypadki ostrych białaczek z obecnością i bez rearanżacji *MLL*. Translokacja między chromosomem 4 a 11, angażująca *locus* genu *MLL* od regionu 11q23, skutkuje koekspresją markerów, które towarzyszą zarówno ALL, jak i AML, utrudniając tym samym precyzyjną diagnozę. Wykazano, iż przypadki z rearanżacją *MLL* znacznie różnią się wzorem ekspresji od podtypów ALL i AML. Grupowanie w oparciu o profil ekspresji ujawniło, iż możliwe jest (z 95% dokładnością) odróżnienie *MLL* (mixed-lineage leukemia – *MLL*) od pozostałych typów ostrej białaczki [4]. Stwierdzono, że około 1000 genów jest nieaktywnych albo bardzo słabo aktywnych w komórkach *MLL* w porównaniu z ALL. Natomiast prawie 200 genów wykazuje nadmierną ekspresję. Zaobserwowane różnice dotyczyły przede wszystkim nadekspresji genów zaangażowanych w nowotworową transformację komórek szpiku: *HOXA9* i *PRGI* oraz powodujących zatrzymanie dojrzewania komórek we wczesnym stadium [4].

Zróznicowane profile ekspresji genów między T-ALL i B-prekursorową ALL

Chiaretti i wsp. [15] wykazali, iż między 2 liniami komórkowymi limfoblastów istnieją znaczące różnice w ekspresji 792 genów. T-komórkowa ALL charakteryzowała się przede wszystkim homogennością ekspresji antygenów *CD3δ* i *CD3ζ*. Natomiast B-liniowa ALL cechuje się zmianami w ekspresji takich genów jak: *MHC klasy II*, *CD19*, immunoglobulin, przy czym stwierdzono heterogenność tego typu ostrej białaczki [15]. Willenbrock i wsp. [60] wytypowali jako element różnicujący 29 genów, za pomocą których ze znaczną dokładnością, wyodrębnili podtypy dziecięcej ALL zgodnie z immunofenotypem (pre-B, T-ALL). Dla dziewięciu genów stwierdzono zgodność danych o ekspresji z uprzednio otrzymanymi przez Ross i wsp. [48]. Ponadto wykazano, iż profil ekspresji genów, jest wysoce swoisty nawet w próbkach szpiku kostnego mających niski odsetek komórek białaczkowych [60]. Cecha ta nie-





Ryc. 1. Schemat przebiegu doświadczenia analizy ekspresji genów na przykładzie macierzy oligonukleotydowej (na podstawie GeneChip® Expression Analysis Technical Manual firmy Affymetrix, zmodyfikowane)

wątpliwie może usprawnić immunofenotypowanie ostrych białaczek. Holleman i wsp. [34] wykazali, iż pomiędzy T- i B-liniową ALL istnieją wyraźne różnice w ekspresji 44 z 70 analizowanych genów apoptotycznych.

Próby porównawczej analizy przeprowadzone na liniach komórkowych przez Andersson i wsp. [2], pozwoliły na określenie różnic pomiędzy AML a ALL oraz pomiędzy ostrą białaczką limfoblastyczną B- a T-liniową. W pierwszym przypadku zmiany dotyczyły 367 genów, w drugim 88 genów. W przypadku AML najsilniejszą ekspresję odnotowano dla takich genów jak: *CEBPA*, *MEIS2*, zaś w ALL dla: *CBFB*, *LEF1*. Komórki linii B cechowały się przede wszystkim podwyższonym poziomem transkryptów *PAX5*, w porównaniu z komórkami T, w których nadekspresję odnotowano dla *GATA3* oraz *CD3G*. Wykazano, że w komórkach hematopoetycznych program transkrypcyjny jest stabilny, gdyż w oparciu o profile ekspresji linie komórkowe klasyfikowano zgodnie z podtypem klinicznym oraz obecnością pierwotnych aberracji genetycznych komórek.

Zarówno w badaniach Andersson i wsp. [2] jak i Fine'a i wsp. [27] w większości przypadków wzorec ekspresji genów w komórkach pochodzących z hodowli oraz pobranych bezpośrednio od pacjentów również był zgodny.

Klasyfikacja znanych podtypów ostrych białaczek limfoblastycznych w oparciu o profile ekspresji genów

Jak wskazują badania przeprowadzone przez Yeoh i wsp. [62], na 360 przypadkach dziecięcej ALL, każdy z 6 głównych podtypów ALL ma odmienny, charakterystyczny profil ekspresji. Większość różnic dotyczyła zaburzeń onkogenetycznych, a nie immunofenotypowego stadium dojrzewania blastów. Wyodrębniono jednak 14 przypadków ALL bez aberracji cytogenetycznych, które charakteryzowały się zdecydowanie odmiennym, unikalnym wzorcem ekspresji genów. W grupie tej obserwowano przede wszystkim nadekspresję genów: *PTPRM* i *LHFPL2*. U pacjentów z hiperdiploidią 70% genów jest umiejscowionych na chromosomach 21 i X, których trisomie są w HD >50 najczęst-

Tabela 2. Dokładność przewidywania klas na przykładzie analiz różnymi typami macierzy ekspresyjnych (na podstawie [40], zmodyfikowane)

Typ chipu	Klasyfikowana podklasa ALL	Dokładność (%)	Czułość (%)	Swoistość (%)
HGU95Av2	hiperdiploidia	97	80	100
	<i>MLL-AF4</i>	100	100	100
	<i>TEL-AML1</i>	91	67	97
Hu6800	<i>T-ALL</i>	95	100	90
HuGene FL	<i>TEL-AML1</i>	86	79	100
	<i>E2A-PBX1</i>	96	50	100
	<i>T-ALL</i>	100	100	100
cDNA	<i>TEL-AML1</i>	87	83	88
	<i>MLL-AF4</i>	98	50	100
	<i>T-ALL</i>	98–100	86–100	100
HGU-133A	hiperdiploidia	94	86	100
	<i>T-ALL</i>	100	100	100

sze. Nadekspresja genów na chromosomie X występowała niezależnie od trisomii tego chromosomu. Yeoh i wsp. [62] wykazali, że dzięki zastosowaniu odpowiedniego algorytmu analizy danych o ekspresji zaledwie jednego genu możliwe jest sklasyfikowanie *T-ALL* (*CD3D*) albo np. *E2A-PBX1* ALL (*PBX1*), zaś w innych podgrupach wymagane jest oszacowanie ekspresji 7-20 genów. Yeoh i wsp. [62] uzyskali również korelację poziomu ekspresji dla 5 wybranych genów techniką mikromacierzy z analizami metodą Q-PCR oraz ekspresją odpowiedniego białka określonego metodą cytometrii przepływowej. Dokładność identyfikacji dobrze znanych podtypów ALL w pojedynczym doświadczeniu sięga 96% (tabela 2) [16,40]. Co więcej, tego rodzaju klasyfikację cechuje większa dokładność od obecnie stosowanych metod konwencjonalnych. Na przykład u 4 na 327 diagnozowanych pacjentów stwierdzono obecność rearanżacji *TEL-AML1*, której nie wykryto w standardowej analizie [62].

Profile genetyczne analizowanych podtypów genetycznych ALL nie odzwierciedlają jednak stadium różnicowania blastów. Nie udało się również opracować wzorca ekspresji genów korelującego z immunofenotypowym stadium różnicowania B-prekursorowej ALL.

Późniejsze badanie tej samej grupy badaczy, ale na bardziej zaawansowanym technicznie chipie, zawierającym liczniejszy zestaw genów (HGU-133 Set) nie tylko potwierdziły istnienie różnic pomiędzy 6 analizowanymi podklasami ostrych białaczek, ale pozwoliły również na wyodrębnienie nowej, nieznannej dotąd podgrupy białaczek w linii B-komórkowej [48]. W obrębie znanych podtypów genetycznych stworzono profile charakteryzujące każdy z nich. Dla poszczególnych klas liczba genów różnicujących wyniosła odpowiednio: *T-ALL* – 2063; *E2A-PBX1* – 1059; *TEL-AML1* – 805; *BCR-ABL* – 201; *MLL* – 726; hiperdiploidia >50 chromosomów – 994 [48]. Widoczne różnice w liczbie genów danego profilu sugerują znaczące różnice w globalnych profilach ekspresji genów białaczek, prawdopodobnie zależnych od swoistych zaburzeń gene-

tycznych, biorących udział w inicjacji procesu leukemogenezy. Kohlemann i wsp. [37] porównali wyniki swoich badań dorosłych pacjentów z wzorami ekspresji genów u dzieci [62] i stwierdzili, iż za pomocą wzorców genetycznych, opracowanych dla dziecięcej ALL, można różnicować również podtypy białaczek u dorosłych.

Chiaretti i wsp. [14], na podstawie analizy ekspresji 131 genów, sklasyfikowali przypadki *T-ALL* u dorosłych w 2 grupach. Pierwsza z nich objęła mniej zróżnicowane postaci pre-*T-ALL*, w drugiej zaś sklasyfikowano białaczki z fenotypem limfocytów T w późnych stadiach dojrzewania. Późniejsze badania tej samej grupy badaczy doprowadziły do opracowania profilu genetycznego dla podgrup ALL u dorosłych [15]. Dla *MLL-AF4* wyselekcjonowano grupę 50 genów. W przypadku rearanżacji *E2A-PBX1* zaobserwowano nadekspresję 35 genów, najsilniejszą *PBX1*, *FAT*, *NID2*, *KANK* oraz genów kinaz *PRKCZ*, *BLK*, *MERTK*. Wzorzec ekspresji dla podtypu *BCR-ABL* charakteryzował się znaczną heterogennością i obejmował prawie 70 genów. Różnice dotyczyły przede wszystkim genów kinaz tyrozynowych (*ABL*, *FYN*, *YES1*) oraz genów związanych z przebiegiem cyklu komórkowego (*CCDN2*, *E2F2*). Wyniki otrzymane przez dwie grupy badawcze dla B-prekursorowej ALL z rearanżacjami *E2A-PBX1* oraz *MLL-AF4*, są zbieżne u dzieci i u dorosłych [15,62].

Odróżnienie poszczególnych podtypów ALL jest możliwe również w odniesieniu do danych o ekspresji ograniczonego zestawu genów. Holleman i wsp. [34] w analizach zawężonych do grupy 70 genów apoptotycznych wykazali, iż pomiędzy ALL o fenotypie hiperdiploidalnym istnieją różnice w poziomie ekspresji 22 genów w stosunku do prawidłowego kariotypu. Natomiast rearanżacji *TEL-AML1* towarzyszą zmiany w poziomie transkryptów 16 genów, zaś komórki, w których występowała rearanżacja *E2A-PBX1* wykazywały różnice ekspresji dla 13 genów. Co więcej wyniki badania ekspresji wielu genów, były zgodne z prezentowanymi przez Armstronga i wsp. [4], Ross i wsp. [48] oraz Yeoha i wsp. [62].



Kees i wsp. [36] oraz Fine i wsp. [27] wykazali, iż podobny profil genetyczny, związany z występowaniem translokacji *TEL-AML1*, *BCR-ABL* lub *MLL*, charakteryzuje zarówno linie komórkowe jak i limfoblasty pacjentów. Wyniki ekspresji dla wielu genów były zgodne z wcześniejszymi pracami [4,48,62]. Wykazano również, iż dla translokacji *BCR/ABL* można określić jedynie heterogeny wzór ekspresji [27].

Wykorzystanie analizy ekspresji genów w poszczególnych grupach białaczek z różnymi aberracjami chromosomowymi, potwierdziło wcześniejsze przypuszczenia, iż specyficzne zaburzenia charakteryzują poszczególne podklasy w obrębie omawianej grupy nowotworów [3]. Wzorce ekspresji genów, w porównaniu z analizą obecności charakterystycznych aberracji genetycznych, umożliwiają bardziej precyzyjną stratyfikację pacjentów (tabela 2) [62].

Identyfikacja nowych genów zaangażowanych w leukemogenezę

Technologia mikromacierzy DNA umożliwia identyfikację nowych genów o znaczeniu prognostycznym, biorących udział w powstawaniu nowotworów [45,61,62]. De Pitta i wsp. [20] stosując mikromacierze cDNA wytypowali 2 nowe geny, tj. *EMCN* i *USP33*, ulegające podwyższonej ekspresji w B-prekursorowej ALL w porównaniu z T-ALL. Również Yeoh i wsp. [62], stwierdzili, że rearanżacji *E2A-PBX1* towarzyszy nadekspresja receptora kinazy tyrozynowej *MERTK*, natomiast rearanżację *MLL* charakteryzuje wysoki poziom *HOXA9* oraz *MEIS1*. Z kolei podwyższona ekspresja *MTG16* występuje w przypadkach *TEL-AML1*. Golub i wsp. [28] zaobserwowali zmiany w ekspresji 2 genów (dla zykliny oraz receptora leptyny), których fizjologiczna rola w komórkach hematopoetycznych była dotychczas nieznaną. Fine i wsp. [27] zidentyfikowali kilka genów korelujących z występowaniem określonych translokacji, którym nie przypisywano roli w patofizjologii ALL. Jako przykład podali *EPOR* (gen receptora erytropoetyny), którego nadekspresja towarzyszyła *TEL-AML1*. W badaniach Holleman i wsp. [33] wśród 124 analizowanych pod kątem mechanizmu lekooporności genów o zróżnicowanej ekspresji, aż 121 nie było dotychczas wiązanych z występowaniem tego zjawiska. Song i wsp. [50], na podstawie analizy transkryptomu komórek białaczkowych, wytypowali 32 geny, za pomocą których można sklasyfikować białaczki jako ostre lub przewlekłe. Spośród nich 22 geny nie były dotychczas wiązane z udziałem w rozwoju choroby białaczkowej.

WYKORZYSTANIE PROFILOWANIA GENETYCZNEGO W IDENTYFIKACJI CZYNNIKÓW PROGNOSTYCZNYCH BIAŁACZEK

Nowotwór jest heterogenną chorobą, stąd też obserwuje się różne wyniki leczenia u pacjentów ze zbliżonym rozpoznaniem histopatologicznym, stadium rozwoju i przy zastosowaniu podobnego protokołu leczenia. Stąd ogromne znaczenie prawidłowej stratyfikacji pacjentów do grup wysokiego ryzyka wystąpienia nawrotu choroby (zastosowanie intensywniejszego leczenia) oraz pacjentów niskiego ryzyka (uniknięcie toksyczności terapii) [6,16,53]. Dotychczasowa stratyfikacja nie spełnia wyżej wspomnianych oczekiwań, dlatego duże nadzieje pokłada się w możliwościach badań metodami genomiki i transkryptomiki [10,16,58].

Zasadniczo dotychczasowa stratyfikacja opiera się o czynniki prognostyczne, takie jak wiek pacjenta czy początkowa leukocytoza. Ze względu na to, iż jest ona niewystarczająca proponuje się zastąpienie jej stratyfikacją opartą na profilu cytogenetycznym i białkowym (microarray i protein array).

Ocena ryzyka w ALL opiera się na charakterystyce klinicznej, wynikach badań laboratoryjnych oraz na specyfikacji blastów białaczkowych [32,38,48]. Za najważniejsze czynniki prognostyczne są uważane obecnie odpowiedź kliniczna na 7-dniową monoterapię prednizolonem, profil oporności *in vitro* na cytostatyki, obecność minimalnej choroby resztkowej oraz występowanie rearanżacji *BCR-ABL* [44,55,62]. Wiele uwagi poświęca się możliwości wykorzystania profilu ekspresji jako wskaźnika prognozy [42]. Niektórzy badacze pozostają sceptyczni wobec tych analiz i nie uznają profilu ekspresji jako czynnika prognostycznego [42].

Badania ekspresji genów mogą być również stosowane do identyfikacji pacjentów obciążonych zwiększonym ryzykiem wtórnych nowotworów, co wykazano w przypadku pacjentów, u których po leczeniu ALL rozpoznano wtórne guzy mózgu [23]. Na podstawie wyodrębnionych genetycznych podklas ostrych białaczek możliwe jest wyróżnienie genotypów prognostycznie korzystnych i niekorzystnych [58]. Valk i wsp. [58] wykazali istnienie 16 grup ekspresyjnych, wśród 285 przypadków AML. Część z nich korelowała ze zdefiniowanymi podgrupami cytogenetycznymi oraz grupami klasyfikacji FAB. Ujawniono również istnienie kilku nowych grup [58]. Bullinger i wsp. [10] przeanalizowali poziom ekspresji w 116 przypadkach AML u dorosłych i na jego podstawie stworzyli model 133 genów dokładnie charakteryzujący długość przeżycia.

Chiaretti i wsp. [14], dzięki analizie profilu ekspresji w T-ALL u dorosłych, opracowali jednolity wzór ekspresji dla komórek opornych, charakteryzujący się nadekspresją zaledwie jednego genu, tj. interleukiny 8 (IL-8) oraz wyliczeniem ekspresji genów kodujących białka histonowe (*H1FO*, *H2AFL*) oraz genów, których białkowe produkty biorą udział w adhezji komórkowej (*CR2*, *SELL*) i progresji cyklu komórkowego (*GFII*, *BCL6*). Natomiast obecność w komórkach białaczkowych grupy 30 genów o znaczącej nadekspresji koreluje z uzyskaniem całkowitej remisji przez pacjentów dorosłych. Niemniej jednak nie udało się stworzyć wyraźnego wzorca ekspresji dla komórek wrażliwych na chemioterapię. Ta sama grupa badawcza w oparciu o otrzymane dane z eksperymentu mikromacierzowego opracowała 3-genowy model (*AHNAK*, *CD2*, *TTK*), na podstawie którego była w stanie przyporządkowywać pacjentów do grup dobrego i złego rokowania. Model ten pozwolił na dokładniejszą ocenę ryzyka niż standardowo stosowane parametry [14]. Dane otrzymane za pomocą mikromacierzy zostały dodatkowo potwierdzone za pomocą reakcji ilościowego PCR (Q-PCR). Wykazano, że na podstawie olbrzymiej ilości złożonych danych o ekspresji można wyselekcjonować niewielką liczbę genów, związanych z niepowodzeniem terapii u danego pacjenta. Późniejsze analizy tej grupy badawczej doprowadziły do wyselekcjonowania kilku grup genów związanych z możliwością wystąpienia nawrotu choroby. Do najważniejszych genów należały: odpowiedzialne za ruchliwość komórki, interak-

cje komórkowe oraz organizację cytoszkieletu (*SDFR1*, *DAAM1*, *IQGAP1*, *ADD3*, *TLN1*, *ITGB1*, *LGALS8*, *CAPZB*, *DNC12*, *LSP1*); antygeny błonowe (*CD24*, *CD45*, *CD62L*, *CD79a*, *CD79b*, *CD85D*); związane z opornością na cytostatyki (*ASNS*, *CROP*, *MVP*); biorące udział w metabolizmie kwasów nukleinowych (*HIST1H2BD*, *HIST1H2AC*, *ATRX*, *ATR*) [15].

Problem przewidywania rokowania na podstawie profilu ekspresji podjęli również Yeoh i wsp. [62], którzy stwierdzili, że przyporządkowanie danego przypadku ALL do odpowiedniej podgrupy nie umożliwia precyzyjnego określenia powodzenia stosowanej terapii. Dane te prawdopodobnie świadczą o istnieniu kilku mechanizmów odpowiedzialnych za niepowodzenie leczenia w ostrych białaczkach. Yeoh i wsp. [62], po przeanalizowaniu przypadków ALL, w których dochodziło do rozwoju AML indukowanej terapią, w oparciu o dane o ekspresji obejmującej 20 genów (w tym *RSU1* i *MSH3*) opracowali model korelujący z wystąpieniem takich powikłań u pacjentów z rearanżacją *TEL-AML1*. U pacjentów z hiperdiploidią stwierdzono silną korelację między występowaniem trisomii a nadekspresją większości genów zlokalizowanych na trisomicznych chromosomach [42,62]. Dzięki połączeniu badań nowoczesną metodą mikromacierzy i konwencjonalnej cytogenetyki znacznie usprawniono diagnostykę liczbowych aberracji chromosomowych. Duży krok w kierunku wprowadzenia metody profilowania ekspresji do rutynowej diagnostyki stanowi uznanie przez Children's Oncology Group obecności potrójnej trisomii 4, 10 i 17 jako czynnika stratyfikacyjnego, korzystnego rokowniczo w obrębie grupy HD>50 [42].

Udział niedużej liczby genów odpowiedzialnych za możliwość wystąpienia powikłań w ALL potwierdzili jako jedni z pierwszych Staal i wsp. [51]. Na podstawie profilu ekspresji genów w blastach pochodzących od pacjentów z T-ALL i pre-B ALL, Beesley i wsp. [6] zasugerowali istnienie podobnego mechanizmu występowania nawrotów choroby w ostrej białaczce limfoblastycznej. Mimo istnienia odrębnych profili ekspresji pomiędzy 2 liniami limfoblastów [62], otrzymano podobne zmiany w poziomie transkryptów genów odpowiedzialnych za niekorzystne rokowanie. Ponadto wykazano, iż zmiany genetyczne dotyczą szlaków progresji cyklu komórkowego, onkogenezy, lekooporności oraz metastazy, nie są natomiast powiązane z opornością wielolekową. Zarówno Staal i wsp. [51], jak i Beesley i wsp. [6] stwierdzili nadekspresję w obrębie podobnych grup genów, mimo stosowania różnego typu macierzy ekspresyjnych.

Pionierskie analizy przeprowadził zespół Edicka i wsp. [23], który określił korelacje profilu ekspresji genów w limfoblastach z możliwością wystąpienia wtórnych nowotworów mózgu. Wyodrębniono 5 współdziałających genów: *FGFR1*, *HNRPL*, *KPNBI*, *NFIC*, *STAT4*, których zmieniona ekspresja świadczy o możliwości wystąpienia powikłań po radioterapii. Tym samym udowodniono, iż zastosowanie techniki mikromacierzy umożliwia przewidywanie odpowiedzi na spowodowany przez mutagenne leczenie stres genotoksyczny w innych tkankach.

Niezależna od klasycznych metod identyfikacja nowych grup prognostycznych daje nadzieję na stworzenie nowo-

czesnej optymalnej strategii terapii dobranej dla indywidualnego pacjenta. Znaczna ilość danych otrzymywanych techniką mikromacierzy dostarcza nowego spojrzenia na patogenezę ALL, a w konsekwencji może doprowadzić do rozwoju nowoczesnej diagnostyki oraz spersonalizowanej strategii leczenia [16].

PRZEWIDYWANIE LEKOOPORNOŚCI W OSTRYCH BIAŁACZKACH NA PODSTAWIE PROFILU EKSPRESJI GENÓW

Prawidłowe przyporządkowanie pacjentów do grup ryzyka wyznacza kolejne zadanie, jakim jest zastosowanie odpowiedniej terapii [48]. Przewidywanie odpowiedzi na zastosowany lek jest wyzwaniem we współczesnej onkologii [47]. ALL u dzieci jest wyleczalna prawie w 80% przypadków, a u dorosłych zaledwie w 40% [9,29,43,45,54]. Kilka grup badawczych podjęło próby poszukiwania zestawów genów zaangażowanych w niepowodzenie terapii [1,38]. Przy założeniu, iż zjawisko lekooporności jest pierwotną cechą blastów białaczkowych możliwe jest przewidywanie nieskuteczności leczenia [11]. Omawiana technika coraz częściej znajduje zastosowanie w badaniach tak wieloczynnikowego zjawiska jak lekooporność, ze względu na możliwość jednoczesnego przeanalizowania najważniejszych genów dla tego procesu [47]. Na mechanizm lekooporności składa się wiele zjawisk oraz złożonych procesów, wzajemnie na siebie zachodzących, obejmujących przede wszystkim: zmianę funkcji receptorów, heterogenność populacji komórek nowotworowych, mikrośrodowisko tkanki, interakcje międzykomórkowe, zaburzenia w transporcie i przekazywaniu sygnału oraz zmianę ekspresji kluczowych genów [1]. Wciąż nie są jednak dobrze poznane genetyczne podstawy oporności na chemioterapię [33]. Wynika stąd konieczność globalnego wglądu w zjawisko niepowodzeń stosowanych metod leczenia, gdyż poszukiwanie pojedynczych markerów jest ograniczone. Na podstawie profilu genetycznego możliwe jest przewidywanie odpowiedzi na zastosowane leczenie dzięki ustaleniu korelacji pomiędzy ekspresją określonych grup genów a wrażliwością/opornością na dany czynnik przeciwnowotworowy lub efektywnością stosowanego leczenia [16,47]. Tego typu podejście zostało zastosowane w systemach *in vitro* przez National Cancer Institute i jest realizowane przez wiele publicznych i prywatnych laboratoriów na całym świecie [47].

Najwcześniejsze z analiz dotyczyły wpływu na komórke metotreksatu i merkaptopuryny oraz kombinacji tych leków; Cheok i wsp. [13], stwierdzili występowanie różnic w ekspresji 124 genów. W odpowiedzi na stosowane leczenie zmiany w ekspresji zachodziły w obrębie genów odpowiedzialnych za apoptozę (*BAX*, *GADD45*), reakcję na stres (*CTSG*, defensyna), metabolizm kwasów komórkowych (*MLH1*, *MRE11*), kontrolę cyklu komórkowego (*ATM*, *E2F5*, *CDKN1B*, *RBBP8*), transdukcję sygnału, metabolizm komórkowy, transport. Cheok i wsp. [13] zasugerowali, iż analiza profilu genetycznego komórki, odzwierciedlającego odmienną naturę biologicznej odpowiedzi na stosowane leczenie, stwarza możliwość na optymalizację chemioterapii oraz ułatwia poszukiwanie nowych cząstek docelowych dla leków [13].

Opublikowane w 2005 r. wyniki grupy BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) wskazują, że na podstawie profilu eks-



presji genetycznej można przewidzieć odpowiedź na zastosowane leczenie [11]. Porównanie uzyskanych wzorców genetycznych z wielkością minimalnej choroby resztkowej po zakończeniu indukcji remisji i przed rozpoczęciem leczenia konsolidującego remisję pozwoliło na identyfikację 54 genów, które różnicują ALL na wrażliwe i odporne na leczenie [11]. Wśród transkryptów, których poziom ekspresji uległ największemu obniżeniu w białaczkach opornych znalazły się przede wszystkim geny związane z apoptozą (*E2F1*, *GRIM19*, *SIVA*, *TNF*), kontrolą podziałów komórki oraz progresją cyklu komórkowego (*CDCA1*, *CDCA4*, *E2F1*, *E2F6*, *MCM5*, *MYBL2*, *PARD3*, *TTK*), co sugeruje ich największy udział tego typu regulacji w powstawaniu oporności. Otrzymane wyniki są zbliżone do prezentowanych uprzednio przez Chiaretti i wsp. [14], co wskazuje na podobieństwa odpowiedzi na leczenie między dziecięcą B-prekursorową ALL, a ALL T-komórkową, występującą u dorosłych. Badania te mogą sugerować wspólne podłoże mechanizmu lekooporności w tym podtypie ostrej białaczki limfoblastycznej [11,14]. Wyniki uzyskane po zastosowaniu macierzy genowych korelowały również z wynikami badań wrażliwości na cytostatyki *in vitro*. U pacjentów z opornością krzyżową na leki najczęściej stosowane w leczeniu ALL, takie jak prednizolon (PRD), winkrystyna (VCR), L-asparaginaza (ASP) i daunorubicyna (DNR), komórki białaczkowe cechował swoisty profil ekspresji 45 genów [38]. Chiaretti i wsp. [14] dokonali analizy porównawczej profilu ekspresji opracowanych dla grupy dorosłych pacjentów z T-ALL z wynikami prezentowanymi przez Yeoha i wsp. [62], dla pacjentów pediatrycznych z ostrą białaczką T-komórkową. Na podstawie zestawienia genów zidentyfikowanych jako odpowiedzialne za wystąpienie nawrotu choroby nie stwierdzono powtarzalności wyników u dzieci i dorosłych. Dane te sugerują inny genetyczny mechanizm wystąpienia zjawiska lekooporności u dzieci i dorosłych z ostrą białaczką limfoblastyczną T-komórkową. Dlatego też wywnioskowano, iż u podłoża osiągnięcia remisji leżą zmiany w ekspresji innych genów, co nie jest zaskakujące przy występujących różnicach w biologii omawianego typu białaczek. Precyzyjna stratyfikacja pacjentów do odpowiednich grup ryzyka znacznie zwiększa szanse trwałego wyleczenia, co ma istotne znaczenie w terapii chorób nowotworowych.

Określono również ekspresję genów w komórkach białaczkowych pod względem oporności i wrażliwości *in vitro* na specyficzne leki przeciwbiałaczkowe (prednizolon, winkrystynę, L-asparaginazę oraz daunorubicynę) oraz ich kombinacje. Zidentyfikowano geny, dla których zmiany w ekspresji korelowały z wystąpieniem lekooporności na jeden z 4 głównych leków przeciwbiałaczkowych. Zaobserwowano istotne zmiany w poziomie ekspresji 124 genów; 33 związanych z wystąpieniem oporności na prednizolon, 40 na winkrystynę, 35 na L-asparaginazę oraz 20 na daunorubicynę [33]. W badaniach tych wykazano, iż za mechanizm lekooporności odpowiadają różne grupy funkcjonalne genów. Wśród genów odpowiedzialnych za wrażliwość komórek na działanie prednizolonu dominowały przede wszystkim geny związane z metabolizmem węglowodanów, a oporności na ten lek towarzyszyła nadekspresja *MCL1* (genu antyapoptotycznego) oraz obniżenie poziomu ekspresji genów biorących udział w regulacji procesu transkrypcji (*SMARCB1*, *PRPF18*, *CTCF*). W grupie genów, związanych z podatnością limfoblastów na winkry-

stynę, znalazły się przede wszystkim geny zaangażowane w metabolizm kwasów nukleinowych, a oporność korelowała ze zmianami w ekspresji genów kodujących elementy cytoszkieletu i macierzy zewnątrzkomórkowej (*TMSB10*, *PDLIM1*, *DSC3*). W komórkach wrażliwych na L-asparaginazę odnotowano wysoki poziom ekspresji genów metabolizmu białek, a w komórkach opornych obserwowano nadekspresję genów białek rybosomalnych (*RPL3*, *RPL4*, *RPL5*, *RPL6*, *RPL11*). W kolejnej analizie określono fenotyp odpowiedzialny za zjawisko oporności na 2 lub więcej leków jednocześnie, związanego z bardzo złym rokowaniem u pacjentów [38]. Model oporności krzyżowej *de novo* opracowano w oparciu o zróżnicowaną ekspresję 45 genów, przede wszystkim związanych z transkrypcją, transportem komórkowym oraz cyklem komórkowym. Za wystąpienie zjawiska niezgodnej oporności na winkrystynę i L-asparaginazę odpowiadały zmiany w ekspresji 139 genów, głównie związanych z biosyntezą białek (białka rybosomalne, translacyjne czynniki elongacji). W analizie porównawczej transkryptomu komórek niewrażliwych na indywidualne leki z wykazującymi oporność krzyżową stwierdzono zgodność jedynie dla 15% analizowanych genów (w przypadku PRD – 12 genów, DNR – 5, ASP – 3, VCR – 0), co świadczy o odmiennym mechanizmie lekooporności w rozpatrywanych przypadkach. Geny związane z opornością na wyżej wymienione leki, które znacząco korelowały ze wzrostem ryzyka nawrotu w przebadanej grupie pacjentów oraz w niezależnej grupie 98 pacjentów leczonych w ten sam sposób. W badaniach Hollemana i wsp. [34] dotyczących analizy ekspresji genów związanych z apoptozą, wykazano, iż zmiany towarzyszące oporności na prednizolon i L-asparaginazę dotyczyły zaledwie 2–3 genów szlaku apoptotycznego. Z kolei brak wyraźnej korelacji zmian w ekspresji analizowanej grupy genów z opornością na winkrystynę i daunorubicynę, sugeruje iż za mechanizm lekooporności nie odpowiadają zmiany w poziomie transkryptów genów proapoptotycznych. Powyższe dane wskazują również, że wynik leczenia dziecięcej ALL jest zależny od innych szlaków metabolicznych niż apoptoza.

ZASTOSOWANIE MIKROMACIERZY DO OPRACOWYWANIA NOWYCH LEKÓW PRZECIWBIAŁACZKOWYCH

Technika mikromacierzy może być również stosowana w poszukiwaniu celu molekularnego, w projektowaniu leku, określeniu wpływu *in vitro* i *in vivo* leku na globalny poziom ekspresji genów, identyfikacji mechanizmów działania, wykrywaniu potencjalnej toksyczności oraz określeniu efektu farmakodynamicznego [3,8,16,17,19,47,49]. Farmakogenomika nowotworów (dziedzina zajmująca się oceną wrodzonych genetycznych uwarunkowań odmiennego działania leków) umożliwi odkrywanie nowych leków przeciwnowotworowych oraz genetycznych celów dla nich na podstawie dobrze sprecyzowanego mechanizmu onkogenezy [9,47]. Technika mikromacierzy stała się jednym z ważniejszych narzędzi farmakogenomiki.

Dzięki możliwościom tej techniki do uzyskania „molekularnego portretu” komórki nowotworowej, najprawdopodobniej możliwe będzie w niedalekiej przyszłości jej włączenie w diagnozowanie, prognozowanie oraz przewidywanie odpowiedzi na terapię. Z kolei identyfikacja i pomiar ekspresji genów odpowiedzialnych za oporność

Tabela 3. Badania ekspresji genów w ostrych białaczkach limfoblastycznych u dzieci i dorosłych (opracowanie własne)

Zakres badań	Pacjenci	Rodzaj chipu	Wyniki	Piśm.
Odkrywanie i przewidywanie klas ostrych białaczek	27 zdiagnozowanych przypadków ALL oraz 11 AML	macierz oligonukleotydowa o wysokiej gęstości (Affymetrix), 6817 genów	wykazano różnice w ekspresji prawie 1100 genów, przy czym ustalono, iż na podstawie modelu 50 genów można precyzyjnie klasyfikować ALL i AML	[28]
Wykorzystanie profilu ekspresji w klasyfikacji i ocenie ryzyka w ALL u dzieci	360 przypadków ALL u dzieci, wszystkie podtypy genetyczne	macierz oligonukleotydowa HGU95aV2 (Affymetrix), 12625 sond, 9600 genów	wykazano, iż na podstawie profilu ekspresji można precyzyjnie identyfikować każdą podgrupę ALL	[62]
Opracowanie profili genetycznych pozwalających na odróżnienie: AML od ALL; B-liniową ALL od T-liniowej ALL; grup ryzyka w obrębie B-liniowej ALL; B-liniową ALL z rearanzacją <i>TEL-AML1</i> od ALL bez charakterystycznych aberracji	51 pacjentów pediatrycznych	Macierz cDNA, 4608 genów	wytypowano zestawy 20 genów, za pomocą których sklasyfikowano z dużą dokładnością ALL w obrębie analizowanych podgrup. Wykazano użyteczność techniki mikromacierzy zarówno w diagnostyce jak i ocenie ryzyka u pacjentów	[41]
Identyfikacja nowych szlaków onkogenezy w ALL T-komórkowej na podstawie wzorca ekspresji genów	59 przypadków T-ALL u dzieci i u dorosłych	macierz oligonukleotydowa HU6800 (Affymetrix)	otrzymano kilka odmiennych wzorców ekspresji genów korelujących z zatrzymaniem tymocytów w różnym stadium dojrzałości	[26]
Klasyfikacja dziecięcych ostrych białaczek limfoblastycznych na podstawie profilu ekspresji genów	132 przypadki ALL występującej u dzieci; wszystkie podtypy genetyczne	macierz oligonukleotydowa HGU-133A (Affymetrix), 22283 sondy	opracowano profile genetyczne charakteryzujące poszczególne podtypy ALL. Dodatkowa wyodrębniono nową podgrupę ALL o odmiennym wzorcu ekspresji	[48]
Określenie zmian w ekspresji genów w odpowiedzi na stosowane leczenie metotreksatem, merkaptopuryną lub kombinacją tych 2 leków	77 pacjentów z ALL	macierz oligonukleotydowa HGU95A (Affymetrix), 9 600 genów	wykazano różnice w ekspresji 124 genów pomiędzy 4 różnymi sposobami leczenia. Poziomie ekspresji 14% genów ulegał zmianie w przypadku leczenia pojedynczymi lekami i ich kombinacją.	[13]
Opracowanie profilu ekspresji T-ALL u dorosłych pozwalającego na identyfikację pacjentów z różną reakcją na terapię i zdolnością osiągnięcia remisji	33 pacjentów ze zdiagnozowaną ALL T-komórkową	macierz oligonukleotydowa HGU95aV2 (Affymetrix)	zidentyfikowano 3 geny (<i>AHNAK</i> , <i>CD2</i> , <i>TTK</i>) za pomocą, których można poprawnie przewidywać zdolność osiągnięcia remisji w 71% przypadków	[15]
Wykorzystanie macierzy cDNA w określaniu immunofenotypu, odpowiedzi na leczenie oraz ryzyka nawrotu w ALL u dzieci	45 przypadków ALL u dzieci	Focus Array GeneChip (Affymetrix), 8763 genów	wykazano, iż profile ekspresji są obiecującym narzędziem przewidywania nawrotu choroby oraz odpowiedzi na leczenie	[60]
Zastosowanie profilu ekspresji genów w stratyfikacji pacjentów	31 pacjentów pediatrycznych	macierz oligonukleotydowa HGU-133A (Affymetrix)	nie udało się stworzyć precyzyjnego modelu genetycznego pozwalającego na szacowanie ryzyka w oparciu o wzorec ekspresji	[57]
Identyfikacja wzorów ekspresji związanych z występowaniem translokacji chromosomowych w ALL	7 różnych linii komórkowych oraz próbki kliniczne B-ALL (38 pacjentów)	macierze cDNA, 19 000 i 31 000 genów	udowodniono, iż komórki pobrane bezpośrednio od pacjentów, jak i z hodowli komórkowych mają wspólny wzorec ekspresji	[27]
Klasyfikacja ALL występujących w dorosłych na podstawie wzorca ekspresji genów	34 pacjentów – wszystkie podtypu białaczki linii B- i T-komórkowej	macierz oligonukleotydowa HGU-133A (Affymetrix),	potwierdzono, iż metoda mikromacierzy jest precyzyjnym narzędziem klasyfikacji odmiennych podtypów ALL	[37]
Określenie wzorca ekspresji dla lekoopornych limfoblastów	173 przypadki B-liniowej ALL u dzieci	macierz oligonukleotydowa HGU-133A (Affymetrix), 22 283 sondy	zidentyfikowano grupy genów, dla których różnice w poziomie ekspresji powiązane z opornością na leczenie prednizolonem (33 geny), winkrystyną (40 genów), asparaginazą (35 genów) oraz daunorubicyną (20 genów)	[33]



Tabela 3 c.d. Badania ekspresji genów w ostrych białaczkach limfoblastycznych u dzieci i dorosłych (opracowanie własne)

Zakres badań	Pacjenci	Rodzaj chipu	Wyniki	Piśm.
Określenie wzoru ekspresji genów skorelowanego z występowaniem lekooporności na chemioterapię	51 pacjentów – 21 zaklasyfikowano do grupy MRD-HR, 30 do grupy MRD-SR	macierz cDNA typu Stanford, 43 000 sond odpowiadających 30 000 genów	identyfikacja 54 genów, ulegających zróżnicowanej ekspresji. Dokładność 84%	[11]
Identyfikacja nowych genów zaangażowanych w leukemogenezę	18 przypadków dziecięcej ALL	macierz cDNA, do analiz białaczek; 4760 genów	zidentyfikowano grupę 30 genów pozwalających na precyzyjne rozróżnienie 3 podtypów białaczki (T-ALL, B-ALL oraz B-ALL z obecnością rearanzacji <i>MLL-AF4</i>)	[20]
Wykorzystanie profilu ekspresji genów w komórkach linii limfoidalnej w celu przewidywania możliwości wystąpienia przerzutów do mózgu	52 przypadki dziecięcej ALL, wszyscy pacjenci z wysokiej grypy ryzyka, poddani terapii wg identycznego protokołu	HGU95Av2 GeneChip (Affymetrix)	na podstawie informacji o ekspresji 5 genów w limfoblastach określono ryzyko pojawienia się guza mózgu, jako wtórnego po ALL nowotworu. Wykazano, iż profil ekspresji komórek nowotworu pierwotnego koreluje z wystąpieniem indukowanego terapią nowotworu w odległej tkance	[23]
Identyfikacja genów wpływających na wystąpienie <i>de novo</i> oporności krzyżowej na chemioterapię	441 pacjentów pediatricznych z B-liniową ALL	macierz oligonukleotydowa HGU-133A (Affymetrix)	wyselekcjonowano 45 genów, ulegających zróżnicowanej ekspresji, związanych z opornością krzyżową na 4 leki (PRD, VCR, ASP, DNR) oraz 139 genów korelujących z wystąpieniem przeciwstawnej oporności VCR i ASP	[38]
Charakterystyka wzorca ekspresji komórek białaczkowych związanego ze znanymi zaburzeniami chromosomowymi w ALL u dorosłych	128 przypadków ALL u dorosłych (33 – T-liniowa ALL, 95 – B-liniowa)	macierz oligonukleotydowa HGU95aV2 (Affymetrix)	opracowano jednorodny wzorec ekspresji dla T-ALL. Dla podtypów ALL B-komórkowej z rearanzacjami <i>MLL-AF4</i> oraz <i>E2A-PBX1</i> stwierdzono podobieństwo profilu ekspresji zarówno u dzieci jak i dorosłych	[14]
Określenie profilu genetycznego w obrębie białaczkowych linii komórkowych zawierających charakterystyczne aberracje chromosomowe	40 linii komórkowych (14 należących do podtypu B-ALL oraz 3 T-ALL)	macierz cDNA (Swegene), 25 648 sond	niemal wszystkie linie komórkowe posegregowano zgodnie z ich specyficznym podtypem klinicznych, co potwierdziło stabilność wzorca ekspresji	[2]
Określenie profilu ekspresji związanego z wystąpieniem nawrotów w ALL	72 pacjentów z pre-B ALL oraz 22 z T-ALL	macierz oligonukleotydowa HGU-133A (Affymetrix)	odnotowana nadekspresję genów związanych przede wszystkim z proliferacją i cyklem komórkowy. Ponadto otrzymano podobny profil genetyczny dla 2 analizowanych podklas ALL.	[6]
Zastosowanie profili ekspresji w diagnostyce białaczek	892 przypadków obejmujących 4 grupy białaczek: CLL, CML, ALL, AML	macierze oligonukleotydowe HGU-133 Set (Affymetrix)	z dużą dokładnością sklasyfikowano białaczki w 13 podtypach o znaczeniu prognostycznym. Potwierdzono użyteczność techniki mikromacierzy jako narzędzia diagnostycznego	[31]
Analiza ekspresji 70 genów proapoptotycznych w odniesieniu do pochodzenia komórek, podtypu genetycznego, oporności <i>in vitro</i> , prognozy	190 przypadków dziecięcej ALL	macierz oligonukleotydowa HGU-133A (Affymetrix)	na podstawie unikalnego wzorca ekspresji genów apoptotycznych możliwe jest analizowanie wielu parametrów limfoblastów	[34]
Określenie wzorca ekspresji genów powiązanego z ryzykiem nawrotu ALL	35 pacjentów pediatricznych z ALL	macierz oligonukleotydowa HGU-133A (Affymetrix)	na podstawie odmiennych wzorców genetycznych stwierdzono możliwość występowanie odmiennych mechanizmów leżących u podstaw wczesnych i późnych nawrotów choroby	[7]
Poszukiwanie genów markerowych, umożliwiających przewidywanie i identyfikację 4 podstawowych typów białaczek	65 dorosłych pacjentów z AML, ALL, CML, CLL	macierz DNA, Platinum Biochip™ Human 8.3K (GenoCheck), 5800 genów	dla każdego z typów białaczki określono unikalny wzorec ekspresji. Poszczególne typy białaczki można klasyfikować w oparciu o ekspresję 49 genów (AML-14, ALL-8, CML-12, CLL-15). Wykazano, iż odróżnienie białaczek ostrych od przewlekłych wymaga danych o ekspresji 32 genów	[50]

na leki w próbkach klinicznych umożliwia zarówno przewidywanie reakcji komórek nowotworowych na leczenie, jak również selekcję najbardziej odpowiednich leków lub ich zestawów [11,47]. Budzi to nadzieje na indywidualizację intensywności i strategii leczenia [47,53]. W literaturze funkcjonuje już termin „profil farmakogenetyczny” pacjenta [24]. Obecnie kilka leków dla docelowych cząstek wytypowanych za pomocą mikromacierzy znajduje się we wczesnej fazie badań klinicznych, np. inhibitor kinazy tyrozynowej FLT3 [12] czy inhibitory kinaz białkowych ZAP70 i ERBB2 [2].

Zestawienie dotychczasowych badań ostrych białaczek limfoblastycznych za pomocą techniki macierzy ekspresyjnych przedstawiono w tabeli 3.

PODSUMOWANIE

Metodyka badań z wykorzystaniem macierzy DNA znajduje się w fazie szybkiego rozwoju. Technika ta jest wciąż ulepszana i staje się coraz bardziej czuła. Na macierzach producenci umieszczają coraz większą liczbę sond dla różnych genów, w niektórych przypadkach nawet kilkaset tysięcy. Technika ta wyznacza ważne i obiecujące kierunki poszukiwań badawczych. Być może coraz lepsza znajomość mechanizmów i przebiegu choroby nowotworowej, postęp w dziedzinie genetyki i biologii molekularnej oraz rozwój czułych metod analitycznych umożliwią w niedalekiej przyszłości dokładną ocenę ich rzeczywistego związku z odległymi wynikami onkologicznymi. Badania profili genetycznych w poszczególnych etapach kancerogenezy mogą doprowadzić do lepszego zrozumienia samego pro-

cesu chorobowego, a także doprowadzić do rozwoju nowoczesnej klasyfikacji oraz skuteczniejszej terapii. Bez wątpienia technika macierzy ekspresyjnych jest ważnym narzędziem w onkologii.

Technika o tak ogromnym potencjale dostarcza nowego spojrzenia na przebieg molekularnych ścieżek prowadzących do rozwoju nowotworu oraz molekularnej patogenezы ostrych białaczek. Przeprowadzone w ostatnim dziesięcioleciu analizy transkryptomu limfoblastów wykazały, iż nowotwory hematologiczne mogą być precyzyjnie klasyfikowane w oparciu o profil ekspresji, który ma związek z morfologicznymi, immunofenotypowymi, genetycznymi oraz innymi cechami komórek. Nie mniej jednak wprowadzenie macierzy ekspresyjnych do rutynowej diagnostyki i terapii stanowi wyzwanie oraz wymaga dalszego dopracowania przede wszystkim standardów wykonywania analiz. W tej dziedzinie dużym osiągnięciem są zbieżne wyniki analiz różnych zespołów badawczych otrzymywane na niezależnych grupach pacjentów z ALL. Jest to możliwe mimo przeprowadzenia eksperymentu w różnych warunkach i przy odmiennych parametrach, w niezależnych laboratoriach diagnostycznych. Pojawiła się wobec tego możliwość wykorzystania mikromacierzy w klasyfikacji i ocenie grup ryzyka w przypadku ostrych białaczek limfoblastycznych.

Znaczący postęp techniczny nie idzie jeszcze w parze z badaniami klinicznymi. Ogromna liczba analiz technicznych i statystycznych, jak również konieczność przeniesienia tych złożonych danych do rutynowych badań klinicznych, ich zrozumienie oraz wcielenie w praktykę kliniczną stanowi wciąż ogromne wyzwanie.

Tabela 4. Słownik nazw genów występujących w publikacji

Symbol genu	Angielska nazwa genu	Klasyfikacja/rola produktu genu
<i>ABL</i>	<i>Abelson murine leukemia</i>	kinaza tyrozynowa
<i>ADD3</i>	<i>adducin 3 (gamma)</i>	białko cytoszkieletu
<i>AHNAK</i>	<i>AHNAK nucleoprotein</i>	nukleoproteina
<i>ASNS</i>	<i>asparagine synthetase</i>	regulator cyklu komórkowego
<i>ATM</i>	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>	kinaza serynowa
<i>ATR</i>	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>	kinaza białkowa
<i>ATRX</i>	<i>alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>	helikaza
<i>BAX</i>	<i>BCL2-associated X protein</i>	regulator apoptozy
<i>BCL6</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 6</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>BLK</i>	<i>B lymphoid tyrosine kinase</i>	kinaza tyrozynowa
<i>CAPZB</i>	<i>capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta</i>	F-aktyna
<i>CBFB</i>	<i>core-binding factor, beta subunit</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>CD11c</i>	<i>integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)</i>	antygen powierzchniowy leukocytów
<i>CD19</i>	<i>CD19 molecule</i>	antygen limfocytów B
<i>CD2</i>	<i>CD2 molecule</i>	antygen, receptor komórek T
<i>CD24</i>	<i>CD24 molecule</i>	antygen limfocytów B oraz granulocytów
<i>CD33</i>	<i>CD33 molecule</i>	antygen powierzchniowy komórek mieloidalnych
<i>CD3D (CD3δ)</i>	<i>CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)</i>	antygen, receptor komórek T
<i>CD3G (CD3ζ)</i>	<i>CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)</i>	antygen, receptor komórek T
<i>CD45</i>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>	antygen, fosfataza tyrozynowa
<i>CD62L (SELL)</i>	<i>selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)</i>	antygen, udział w adhezji
<i>CD79a (MB-1)</i>	<i>CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha</i>	antygen, receptor komórek B
<i>CD79b</i>	<i>CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta</i>	antygen, receptor komórek B
<i>CD85D (LILRB2)</i>	<i>leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2</i>	receptor immunoglobulin



Tabela 4 c.d. Słownik nazw genów występujących w publikacji

Symbol genu	Angielska nazwa genu	Klasyfikacja/rola produktu genu
<i>CDCA1</i>	<i>cell division cycle associated 1</i>	element kinetochoru
<i>CDCA4</i>	<i>cell division cycle associated 4</i>	regulator cyklu komórkowego
<i>CDKN1B</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>	regulator cyklu komórkowego
<i>CEBPA</i>	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha</i>	udział w metabolizmie DNA
<i>c-MYB</i>	<i>v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)</i>	białko onkogenne
<i>CR2</i>	<i>complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2</i>	receptor limfocytów B
<i>CRP</i>	<i>cisplatin resistance-associated overexpressed protein</i>	udział w metabolizmie DNA
<i>CTCF</i>	<i>CCCTC-binding factor (zinc finger protein)</i>	represor transkrypcji
<i>CTSG</i>	<i>cathepsin G</i>	peptydaza
<i>DAAM1</i>	<i>dishevelled associated activator of morphogenesis 1</i>	aktywator morfogenezy
<i>DNC12</i>	<i>dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2</i>	białko cytoplazmatyczne
<i>DSC3</i>	<i>desmocollin 3</i>	udział w adhezji
<i>E2A</i>	<i>transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>E2F1</i>	<i>E2F transcription factor 1</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>E2F2</i>	<i>E2F transcription factor 2</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>E2F5</i>	<i>E2F transcription factor 5, p130-binding</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>E2F6</i>	<i>E2F transcription factor 6</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>EMCN</i>	<i>endomucin</i>	udział w adhezji
<i>EPOR</i>	<i>erythropoietin receptor</i>	receptor erytropoetyny
<i>FAT</i>	<i>FAT tumor suppressor homolog 1</i>	białko przeźłonowe
<i>FGFRI</i>	<i>fibroblast growth factor receptor1</i>	receptor czynnika wzrostu
<i>FYN</i>	<i>FYN oncogene related to SRC, FGR, YES</i>	kinaza tyrozynowa
<i>GADD45</i>	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible</i>	udział w metabolizmie DNA
<i>GATA3</i>	<i>GATA binding protein 3</i>	udział w metabolizmie DNA
<i>GFI1</i>	<i>growth factor independent 1</i>	czynnik wzrostu
<i>GRIM19</i>	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 13</i>	regulator apoptozy
<i>H1FO</i>	<i>H1 histone family, member 0</i>	białko histonowe
<i>H2AFL (HIST1H2AC)</i>	<i>histone cluster 1, H2ac</i>	białko histonowe
<i>HIST1H2BD</i>	<i>histone cluster 1, H2bd</i>	białko histonowe
<i>HNRPL</i>	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L</i>	udział w metabolizmie DNA
<i>HOXA9</i>	<i>homeobox A9</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>IL-8</i>	<i>interleukin 8</i>	interleukina
<i>IQGAP1</i>	<i>IQ motif containing GTPase activating protein 1</i>	udział w adhezji
<i>ITGB1</i>	<i>integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)</i>	receptor integrzyn
<i>KANK</i>	<i>ankyrin repeat domain 15</i>	udział w karcynogenezie
<i>LEF1</i>	<i>lymphoid enhancer-binding factor 1</i>	udział w metabolizmie DNA
<i>LGALS8</i>	<i>lectin, galactoside-binding, soluble, 8 (galactin 8)</i>	element cytoskieletu
<i>LHFPL2</i>	<i>lipoma HMGIC fusion partner-like 2</i>	udział w przekazywaniu sygnałów
<i>LSP1</i>	<i>lymphocyte-specific protein 1</i>	element cytoskieletu
<i>MCL1</i>	<i>myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)</i>	regulator apoptozy
<i>MCM5</i>	<i>minichromosome maintenance complex component 5</i>	udział w metabolizmie DNA
<i>MEIS1</i>	<i>Meis homeobox 1</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>MEIS2</i>	<i>Meis homeobox 2</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>MERTK</i>	<i>c-mer proto-oncogene tyrosine kinase</i>	kinaza tyrozynowa
<i>MHC klasy II</i>	<i>major histocompatibility complex, class II</i>	udział w prezentacji antygeny
<i>MLH1</i>	<i>mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2</i>	udział w naprawie DNA
<i>MRE11</i>	<i>MRE11 meiotic recombination 11</i>	udział w metabolizmie DNA
<i>MSH3</i>	<i>mutS homolog 3</i>	udział w naprawie DNA
<i>MTG16</i>	<i>core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3</i>	represor transkrypcji
<i>MVP</i>	<i>major vault protein</i>	udział w transporcie
<i>MYBL2</i>	<i>v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2</i>	białko onkogenne
<i>NFIC</i>	<i>nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor)</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>NID2</i>	<i>nidogen 2 (osteonidogen)</i>	udział w adhezji
<i>PARD3</i>	<i>par-3 partitioning defective 3 homolog</i>	regulator cyklu komórkowego
<i>PAX5</i>	<i>paired box gene 5 (B-cell lineage specific activator)</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>PBX1</i>	<i>pre-B-cell leukemia homeobox 1</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>PRG1</i>	<i>p53-responsive gene 1</i>	regulator cyklu komórkowego
<i>PRKCZ</i>	<i>protein kinase C, zeta</i>	kinaza serynowa

Tabela 4 c.d. Słownik nazw genów występujących w publikacji

Symbol genu	Angielska nazwa genu	Klasyfikacja/rola produktu genu
<i>PRPF18</i>	<i>PRP18 pre-mRNA processing factor 18 homolog</i>	udział w splicingu pre-mRNA
<i>PTPRM</i>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, M</i>	fosfataza tyrozynowa
<i>RbAp48</i>	<i>retinoblastoma binding protein 4</i>	udział w metabolizmie DNA
<i>RBBP8</i>	<i>retinoblastoma binding protein 8</i>	regulator cyklu komórkowego
<i>RPL11</i>	<i>ribosomal protein L11</i>	białko rybosomalne
<i>RPL3</i>	<i>ribosomal protein L3</i>	białko rybosomalne
<i>RPL4</i>	<i>ribosomal protein L4</i>	białko rybosomalne
<i>RPL5</i>	<i>ribosomal protein L5</i>	białko rybosomalne
<i>RPL6</i>	<i>ribosomal protein L6</i>	białko rybosomalne
<i>RSU1</i>	<i>ras suppressor protein 1</i>	białko supresorowe
<i>SDFR1</i>	<i>stromal cell derived factor receptor 1</i>	receptor czynnika wzrostu
<i>SIVA</i>	<i>SIVA1, apoptosis-inducing factor</i>	regulator apoptozy
<i>SMARCB1</i>	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1</i>	regulator transkrypcji
<i>SNF2</i>	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2</i>	regulator transkrypcji
<i>STAT4</i>	<i>signal transducer and activator of transcription 4</i>	czynnik transkrypcyjny
<i>TLN1</i>	<i>talin 1</i>	element cytoszkieletu
<i>TMSB10</i>	<i>thymosin, beta 10</i>	aktyna
<i>TNF</i>	<i>tumor necrosis factor</i>	regulator cyklu komórkowego
<i>TTK</i>	<i>tramtrack protein kinase</i>	kinaza treoninowa
<i>USP33</i>	<i>ubiquitin specific peptidase 33</i>	peptydaza
<i>YES1</i>	<i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1</i>	kinaza tyrozynowa, białko onkogenne

PIŚMIENICTWO

[1] Alaoui-Jamali M.A., Dupré I., Qiang H.: Prediction of drug sensitivity and drug resistance in cancer by transcriptional and proteomic profiling. *Drug Resist. Updat.*, 2004; 7: 245–255

[2] Andersson A., Edén P., Lindgren D., Nilsson J., Lassen C., Heldrup J., Fontes M., Borg Å., Mitelman F., Johansson B., Höglund M., Fioretto T.: Gene expression profiling of leukemic cell lines reveals conserved molecular signatures among subtypes with specific genetic aberrations. *Leukemia*, 2005; 19: 1042–1050

[3] Armstrong S.A., Look A.T.: Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 6306–6315

[4] Armstrong S.A., Staunton J.E., Silverman L.B., Pieters R., den Boer M.L., Minden M.D., Sallan S.E., Lander E.S., Golub T.R., Korsmeyer S.J.: MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat. Genet.*, 2002; 30: 41–47

[5] Barrett J.C., Kawasaki E.S.: Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression. *Drug Discov. Today*, 2003; 8: 134–141

[6] Beesley A.H., Cummings A.J., Freitas J.R., Hoffmann K., Firth M.J., Ford J., de Klerk N.H., Kees U.R.: The gene expression signature of relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia: implications for mechanisms of therapy failure. *Br. J. Haematol.*, 2006; 131: 447–456

[7] Bhojwani D., Kang H., Moskowitz N.P., Min D.J., Lee H., Potter J.W., Davidson G., Willman C.L., Borowitz M.J., Belitskaya-Levy I., Hunger S.P., Raetz E.A., Carroll W.L.: Biological pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*, 2006; 108: 711–717

[8] Blohm D.H., Guiseppe-Elie A.: New developments in microarray technology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001; 12: 41–47

[9] Brenner T.L., Pui C.H., Evans W.E.: Pharmacogenomics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2001; 3: 567–578

[10] Bullinger L., Dohner K., Bair E., Fröhling S., Schlenk R.F., Tibshirani R., Döhner H., Pollack J.R.: Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 350: 1605–1616

[11] Cario G., Stanulla M., Fine B.M., Teuffel O., Neuhoff N.V., Schrauder A., Flohr T., Schäfer B.W., Bartram C.R., Welte K., Schlegelberger B., Schrappe M.: Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2005; 105: 821–826

[12] Carroll W.L., Bhojwani D., Min D.-J., Moskowitz N., Raetz E.A.: Childhood acute lymphoblastic leukemia in the age of genomics. *Pediatr. Blood Cancer*, 2006; 46: 570–578

[13] Cheok M.H., Yang W., Pui C.H., Downing J.R., Cheng C., Naeve C.W., Relling M.V., Evans W.E.: Treatment-specific changes in gene expression discriminate *in vivo* drug response in human leukemia cells. *Nat. Genet.*, 2003; 34: 85–90

[14] Chiaretti S., Li X., Gentleman R., Vitale A., Vignetti M., Mandelli F., Ritz J., Foa R.: Gene expression profile of adult T-cell acute lymphocytic leukemia identifies distinct subsets of patients with different response to therapy and survival. *Blood*, 2004; 103: 2771–2778

[15] Chiaretti S., Li X., Gentleman R., Vitale A., Wang K.S., Mandelli F., Foa R., Ritz J.: Gene expression profiles of B-lineage adult acute lymphocytic leukemia reveal genetic patterns that identify lineage derivation and distinct mechanisms of transformation. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 7209–7219

[16] Chung C.H., Levy S., Chaurand P., Carbone D.P.: Genomics and proteomics: Emerging technologies in clinical cancer research. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2007; 61: 1–25

[17] Clarke P.A., te Poole R., Workman P.: Gene expression microarray technologies in the development of new therapeutic agents. *Eur. J. Cancer*, 2004; 40: 2560–2591

[18] Colby-Graham M.F., Chordas C.: The childhood leukemias. *J. Pediatr. Nurs.*, 2003; 18: 87–95

[19] Cussenot O.: DNA microarrays in clinical practice: present or future? *Eur. J. Intern. Med.*, 2002; 13: 225–226

[20] De Pitta C., Tombolan L., Campo Dell'Orto M., Accordi B., Te Kronnie G., Romualdi C., Vitulo N., Basso G., Lanfranchi G.: A leukemia-enriched cDNA microarray platform identifies new transcripts with relevance to the biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2005; 90: 890–898

[21] Downing J.R., Mullighan C.G.: Tumor-specific genetic lesions and their influence on therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2006; 1: 118–122

[22] Downing J.R., Shannon K.M.: Acute leukemia: A pediatric perspective. *Cancer Cell*, 2002; 2: 437–445

[23] Edick M.J., Cheng C., Yang W., Cheok M., Wilkinson M.R., Pei D., Evans W.E., Kun L.E., Pui C.H., Relling M.V.: Lymphoid gene expression as a predictor of risk of secondary brain tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005; 42: 107–116



- [24] Fernandez Zapico M.E., Ahmad U.S., Urrutia R.: DNA microarrays: Revolutionary insight into the living genome. *Surgery*, 2001; 130: 403–407
- [25] Ferrando A.A., Look A.T.: Gene expression profiling: will it complement or replace immunophenotyping? *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2003; 16: 645–652
- [26] Ferrando A.A., Neuberger D.S., Staunton J., Loh M.L., Huard C., Raimondi S.C., Behm F.G., Pui C.H., Downing J.R., Gilliland D.G., Lander E.S., Golub T.R., Look A.T.: Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, 2002; 1: 75–87
- [27] Fine B.M., Stanulla M., Schrappe M., Ho M., Viehmann S., Harbott J.P., Boxer L.M.: Gene expression patterns associated with recurrent chromosomal translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2004; 103: 1043–1049
- [28] Golub T.R., Slonim D.K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J.P., Coller H., Loh M.L., Downing J.R., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D., Lander E.S.: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 1999; 286: 531–537
- [29] Greaves M.: Science, medicine, and the future: Childhood leukemia. *BMJ*, 2002; 324: 283–287
- [30] Haferlach T., Kern W., Schnittger S., Schoch C.: Modern diagnostics in acute leukemias. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2005; 56: 223–234
- [31] Haferlach T., Kohlmann A., Schnittger S., Dugas M., Hiddemann W., Kern W., Schoch C.: Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood*, 2005; 106: 1189–1198
- [32] Hoffmann K., Firth M.J., Beesley A.H., de Klerk N.H., Kees U.R.: Translating microarray data for diagnostic testing in childhood leukemia. *BMC Cancer*, 2006; 6: 229
- [33] Holleman A., Cheok M.H., den Boer M.L., Yang W., Veerman A.J., Kazemier K.M., Pei D., Cheng C., Pui C.H., Relling M.V., Janka-Schaub G.E., Pieters R., Evans W.E.: Gene expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 351: 533–542
- [34] Holleman A., den Boer M.L., Menezes R.X., Cheok M.H., Cheng C., Kazemier K.M., Janka-Schaub G.E., Gobel U., Graubner U.B., Evans W.E., Pieters 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
- [35] Jabbour E.J., Faderl S., Kantarjian H.M.: Adult acute lymphoblastic leukemia. *Mayo Clin. Proc.*, 2005; 80: 1517–1527
- [36] Kees U.R., Ford J., Watson M., Murch A., Ringnér M., Walker R.L., Meltzer P.: Gene expression profiles in a panel of childhood leukemia cell lines mirror critical features of the disease. *Mol. Cancer Ther.*, 2003; 2: 671–677
- [37] Kohlmann A., Schoch C., Schnittger S., Dugas M., Hiddemann W., Kern W., Haferlach T.: Pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) gene expression signatures classify an independent cohort of adult ALL patients. *Leukemia*, 2004; 18: 63–71
- [38] Lugthart S., Cheok M.H., den Boer M.L., Yang W., Holleman A., Cheng C., Pui C.H., Relling M.V., Janka-Schaub G.E., Pieters R., Evans W.E.: Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, 2005; 7: 375–386
- [39] Margalit O., Somech R., Amariglio N., Rechavi G.: Microarray-based gene expression profiling of hematologic malignancies: basic concepts and clinical applications. *Blood Rev.*, 2005; 19: 223–234
- [40] Mitchell S.A., Brown K.M., Henry M.M., Mintz M., Catchpoole D., LaFleur B., Stephan D.A.: Inter-Platform comparability of microarrays in acute lymphoblastic leukemia. *BMC Genomics*, 2004; 5: 71
- [41] Moos P.J., Raetz E.A., Carlson M.A., Szabo A., Smith F.E., Willman C., Wei Q., Hunger S.P., Carroll W.L.: Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 3118–3130
- [42] Mullighan C.G., Flotho C., Downing J.R.: Genomic assessment of pediatric acute leukemia. *Cancer J.*, 2005; 11: 268–282
- [43] Pui C.H., Evans W.E.: Drug therapy: Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 1998; 339: 605–615
- [44] Pui C.H., Evans W.E.: Drug therapy: treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2006; 354: 166–178
- [45] Pui C.H., Relling M.V., Downing J.R.: Mechanisms of disease: Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 350: 1535–1548
- [46] Quackenbush J.: Microarray analysis and tumor classification. *N. Engl. J. Med.*, 2006; 354: 2463–2472
- [47] Robert J., Vekris A., Pourquier P., Bonnet J.: Predicting drug response based on gene expression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2004; 51: 205–227
- [48] Ross M.E., Zhou X., Song G., Shurtleff S.A., Girtman K., Williams W.K., Liu H.C., Mahfouz R., Raimondi S.C., Lenny N., Patel A., Downing J.R.: Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood*, 2003; 102: 2951–2959
- [49] Scherf U., Ross D.T., Waltham M., Smith L.H., Lee J.K., Tanabe L., Kohn K.W., Reinhold W.C., Myers T.G., Andrews D.T., Scudiero D.A., Eisen M.B., Sausville E.A., Pommier Y., Botstein D., Brown P.O., Weinstein J.N.: A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat. Genet.*, 2000; 24: 236–244
- [50] Song J.H., Kim H.J., Lee C.H., Kim S.J., Hwang S.Y., Kim T.S.: Identification of gene expression signatures for molecular classification in human leukemia cells. *Int. J. Oncol.*, 2006; 29: 57–64
- [51] Staal F.J., van der Burg M., Wessels L.F., Barendregt B.H., Baert M.R., van den Burg C.M., van Huffel C., Langerak A.W., van der Velden V.H., Reinders M.J., van Dongen J.J.: DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers. *Leukemia*, 2003; 17: 1324–1332
- [52] Staudt L.M.: Gene expression physiology and pathophysiology of the immune system. *Trends Immunol.*, 2001; 22: 35–40
- [53] Stegmaier K.: Genomic approaches in acute leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2006; 19: 263–268
- [54] Styczyński J., Gil L.: Ostra białaczka limfoblastyczna: różnice pomiędzy dziećmi i dorosłymi. *Acta Haematol. Pol.*, 2006; 37: 185–201
- [55] Styczyński J., Wysocki M.: Is the *in vitro* drug resistance profile the strongest prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia? *J. Clin. Oncol.*, 2004; 22: 963–964
- [56] Szczepanek J., Budzyński T., Jackowski M., Tretyn A.: Budowa, zasady działania i zastosowanie chipów DNA w biologii i medycynie. *Med. Biol. Sci.*, 2006; 20: 47–56
- [57] Teuffel O., Dettling M., Cario G., Stanulla M., Schrappe M., Bühlmann P., Niggli F.K., Schäfer B.W.: Association of gene expression profiles with risk stratification in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2004; 89: 801–808
- [58] Valk P.J., Verhaak R.G., Beijnen M.A., Erpelinck C.A., Barjesteh van Waalwijk van Doorn Khosrovani S.B., Boer J.M., Beverloo H.B., Moorhouse M.J., van der Spek P.J., Löwenberg B., Delwel R.: Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 350: 1617–1628
- [59] van Delft F.W., Bellotti T., Luo Z., Jones L.K., Patel N., Yiannikouris O., Hill A.S., Hubank M., Kempinski H., Fletcher D., Chaplin T., Foot N., Young B.D., Hann I.M., Gammerman A., Saha V.: Prospective gene expression analysis accurately subtypes acute leukaemia in children and establishes a commonality between hyperdiploidy and t(12;21) in acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 2006; 130: 26–35
- [60] Willenbrock H., Juncker A.S., Schmiegelow K., Knudsen S., Ryder L.P.: Prediction of immunophenotype, treatment response, and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia using DNA microarrays. *Leukemia*, 2004; 18: 1270–1277
- [61] Willman C.L.: Discovery of novel molecular classification schemes and genes predictive of outcome in leukemia. *Hematol. J.*, 2004; 5(Suppl.3): S138–S143
- [62] Yeoh E.J., Ross M.E., Shurtleff S.A., Williams W.K., Patel D., Mahfouz R., Behm F.G., Raimondi S.C., Relling M.V., Patel A., Cheng C., Campana D., Wilkins D., Zhou X., Li J., Liu H., Pui C.H., Evans W.E., Naeve C., Wong L., Downing J.R.: Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*, 2003; 1: 133–143
- [63] Zhang X., Ke H.: ALL/AML cancer classification by gene expression data using SVM and CSVM approach. *Genome Informatics*, 2000; 11: 237–239