

Znaczenie prognostyczne zaburzeń molekularnych u chorych na ostrą białaczkę szpikową z prawidłowym kariotypem

Prognostic significance of molecular abnormalities
in acute myeloid leukemia patients with normal karyotype

Krzysztof Lewandowski

Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego,
Uniwersytetu Medyczny, Poznań

Streszczenie

Ostra białaczka szpikowa (AML) jest chorobą bardzo zróżnicowaną pod względem przebiegu klinicznego oraz charakterystyki immunofenotypowej i molekularnej blastów białaczkowych. Zgodnie z obowiązującą klasyfikacją rokowniczą przypadki z prawidłowym kariotypem (ok. 50% wszystkich chorych) cechuje pośrednie ryzyko niepomyślnego przebiegu choroby. Zauważono jednak, że także w obrębie tej grupy można wyodrębnić pacjentów o niekorzystnym rokowaniu. U dużej części z nich potwierdzono występowanie aberracji molekularnych w obrębie genów odpowiedzialnych za przebieg i kontrolę procesów proliferacji i różnicowania prekursorowych komórek hematopoezy. Okazało się także, że ich obecność u poszczególnych pacjentów cechujących się pośrednim ryzykiem cytogenetycznym istotnie zmienia odpowiedź na zastosowaną terapię, a także przebieg choroby. Również nieprawidłowa ekspresja niektórych genów istotnie modyfikuje rezultaty terapii i rokowanie u chorych z AML. Przedmiotem niniejszej pracy jest prognostyczne znaczenie obecności zaburzeń molekularnych oraz zaburzonej ekspresji wybranych genów u chorych na AML.

Hematologia 2012; 3, 3: 231–242

Słowa kluczowe: ostra białaczka szpikowa, prawidłowy kariotyp, zaburzenia molekularne, znaczenie rokownicze

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is very heterogenous disorder in term of clinical outcome, immunophenotypic and molecular characteristics of leukemic blasts. According recent prognostic classification patients with normal karyotype (about 50% of all patients) are considered as an intermediate risk group of unfavorable disease outcome. It was noticed however, that even in this group there are patients with unfavorable prognosis. In significant proportion of them the presence of molecular abnormalities in genes responsible for process of control of proliferation and differentiation of hematopoietic precursor cells was confirmed.

Adres do korespondencji: Krzysztof Lewandowski, Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego, Uniwersytet Medyczny, 60–569 Poznań, ul. Szamarzewskiego 84, tel.: 61 854 93 45, e-mail: krzysztof.lewandowski@skpp.edu.pl

It was also documented, that its presence in individual patients with intermediate cytogenetic risk significantly affect the applied therapy results and disease outcome. Also, abnormal expression of some genes may significantly modify the therapy results and prognosis in AML patients. Prognostic significance of molecular abnormalities presence and abnormal expression of chosen genes in AML patients is a topic of this paper.

Hematologia 2012; 3, 3: 231–242

Key words: acute myeloid leukemia, normal karyotype, molecular abnormalities, prognostic significance

Wprowadzenie

Według aktualnie obowiązujących standardów diagnostyka ostrych białaczek szpikowych (AML, *acute myeloid leukemia*), obok oceny morfologicznej komórek białczkowych, obejmuje ocenę cytoplazmatycznej aktywności mieloperoksydazy lub nieswoistych esteraz i obecności charakterystycznych dla określonych postaci morfologicznych białaczek błonowych/wewnątrzkomórkowych antygenów różnicowania (CD, *cluster of differentiation antigens*) na komórkach białczkowych (np. cMPO, CD34, CD33, CD13). Ocena wyników wymienionych badań pozwala na wyróżnienie postaci morfologicznych AML (od M0 do M7) na podstawie klasyfikacji FAB (*French-American-British*). Standardem diagnostyki AML jest także wykonanie badania kariotypu. Potwierdzenie obecności określonych zaburzeń cytogenetycznych w komórkach białczkowych jest powiązane z niektórymi postaciami morfologicznymi AML według klasyfikacji FAB, na przykład t(8;21)(q22;q22) lub odpowiadającego aberracji genu fuzyjnego *AMLETO* w badaniu molekularnym w AML typu M2 według FAB czy też t(15;17)(q22;q12) lub odpowiadającego aberracji genu fuzji *PML/RARA* w AML typu M3. Obserwacje te stały się podstawą propozycji klasyfikacji AML według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*). Wykazano również, że obecność niektórych pojedynczych zaburzeń cytogenetycznych [t(9;21), t(15;17), inv16, t(16;16)] jest powiązana ze względnie dobrym rokowaniem. Z kolei wykazanie innych niż wymienione aberracji cytogenetycznych (np. chromosomu 7 lub obecności kompleksowych zmian cytogenetycznych) wpływa wyraźnie niekorzystnie na rokowanie i wyniki terapii (tab. 1) [1]. Duże znaczenie w prognozowaniu ryzyka niekorzystnego przebiegu choroby ma również potwierdzenie technikami biologii molekularnej obecności w komórkach AML zaburzeń struktury genu(ów) oraz ich ekspresji.

Dotychczasowe obserwacje pozwoliły na uznanie obecności zaburzeń kariotypu za najbardziej

Tabela 1. Cytogenetyczne grupy ryzyka u chorych na ostrą białaczkę szpikową (źródło [1])

Table 1. Cytogenetic risk group in patients with acute myeloid leukemia (source [1])

Grupa ryzyka	Zaburzenie cytogenetyczne
Korzystne	
Potwierdzone	t(8;21); inv(16)/t(16;16); t(15;17)
Pośrednie	
Potwierdzone	Kariotyp normalny; -Y
Prawdopodobne	del(7q); del(9q); t(9;11); del(11q), izolowana +8, +11, +13, +21, del(20q)
Niekorzystne	
Potwierdzone	Kompleksowe; inv(3)/t(3;3); -7
Prawdopodobne	t(6;9); t(6;11); t(11;19)(q23;p13.3), -5; del5q

istotny czynnik prognostyczny, powiązany z odpowiednią na terapię indukcyjną, a także z przeżyciem całkowitym (OS, *overall survival*). Obecność zaburzeń w klasycznym badaniu cytogenetycznym potwierdzono u około 55% osób z rozpoznaniem AML [2, 3]. Ustalono także, że u młodszych chorych, na podstawie lokalizacji i rodzaju zaburzeń cytogenetycznych, można wyodrębnić trzy zasadnicze grupy ryzyka przebiegu choroby: pomyślnego, pośredniego i niepomyślnego [4–7]. Określenie niepomyślnego ryzyka przebiegu choroby u osób z rzadko występującymi zaburzeniami cytogenetycznymi (np. del7q, izolowana +8, del9q, t(v;11)(v;q23) z wyłączeniem t(9;11), i del20q jest trudne z powodu niewielkiej liczby chorych poddawanych ocenie oraz różnicom wynikającym z zastosowanych metod terapii.

Odrębny problem stanowią chorzy ze złożonymi zaburzeniami kariotypu, tj. trzema lub więcej, w niektórych badaniach powyżej pięcioma, z wyłączeniem osób z obecną t(8;21), inv(16) lub t(16;16) oraz t(15;17), t(9;11) lub t(v;11), inv(3), lub t(3;3), a także t(6;9). Przypadki te (10–12% wszystkich pacjentów z AML) cechuje wyjątkowo niepomyślne rokowanie [8, 9].

Tabela 2. Częstość zaburzeń molekularnych oraz ich wpływ na rokowanie u chorych na ostrą białaczkę szpikową z prawidłowym kariotypem w badaniu techniką GTG [zmodyfikowano wg 19]**Table 2.** Frequency of molecular abnormalities and its prognostic impact in patients with acute myeloid leukemia with normal karyotype in the GTG analysis [according 19, modified]

Gen	Częstość defektu u chorych na AML-NK (%)	Charakter zaburzenia	Rokowanie
<i>NPM1</i>	50–60	Mutacje	Korzystne
<i>FLT3-ITD</i>	30–40	Mutacje	Niekorzystne
<i>FLT3-Asp835</i>	5–10	Mutacje	Nieokreślone
<i>BAALC</i>	65	Nadmierna ekspresja	Niekorzystne
<i>MN1</i>	50	Nadmierna ekspresja	Niekorzystne
<i>MLL-PTD</i>	7	Mutacje/nadmierna ekspresja	Niekorzystne
<i>CEBPA</i>	15–20	Mutacje	Korzystne
<i>ERG-1</i>	25	Nadmierna ekspresja	Niekorzystne
<i>AFlq</i>	75	Nadmierna ekspresja	Niekorzystne

(AML-NK, acute myeloid leukemia-normal karyotype) — chorzy na ostrą białaczkę szpikową z prawidłowym kariotypem

Należy pamiętać, że wśród aberracji obecnych u chorych ze złożonym kariotypem dominują te obejmujące utratę materiału genetycznego, między innymi dotyczące 5q-, 17p-, 7q-, a także 8q-, 11q- oraz 21q- [10–12]. Ostatnio postuluje się wyjątkowo niekorzystny wpływ defektów o typie monosomii, szczególnie w przypadkach ze współwystępującymi dodatkowymi aberracjami o typie monosomii lub innymi defektami strukturalnymi w obrębie innych chromosomów, z wyłączeniem defektów obejmujących gen *CBF* (core binding factor) [12].

Największe zainteresowanie budzą przypadki AML z prawidłowym kariotypem stwierdzonym na podstawie oceny metafaz komórkowych uzyskanych w hodowli komórek szpiku i określonym metodami klasycznej cytogenetyki. Stanowią one blisko 50% przypadków wszystkich AML. W przeprowadzonych badaniach klinicznych wykazano, że ryzyko niepomyślnego przebiegu choroby ma charakter pośredni między ryzykiem dotyczącym pacjentów cechujących się korzystnym i niepomyślnym ryzykiem cytogenetycznym. Wkrótce jednak okazało się, że pacjentów z prawidłowym kariotypem (AML-NK, normal karyotype) i tak ocenionym pośrednim ryzykiem cytogenetycznym cechuje duża różnorodność indywidualnego przebiegu choroby wyraźnie różna od stwierdzanego w innych cytogenetycznych grupach ryzyka.

Defekty molekularne u chorych na AML-NK

Defekty pojedyncze

Ocena obecności aberracji molekularnych u chorych na AML przed rozpoczęciem terapii ma istotne znaczenie dla oceny dalszego przebiegu choroby [13].

Do najczęściej stosowanych technik służących ocenie obecności defektów molekularnych w komórkach AML należą łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR, polymerase chain reaction) oraz — w przypadku poszukiwania określonych aberracji molekularnych — technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, fluorescence *in-situ* hybridization). Zastosowanie tych technik pozwala między innymi na wykrycie defektów genu *fms*-podobnej kinazy tyrozynowej 3 (*FLT3*), nukleofozminy 1 (*NPM1*), czynnika transkrypcyjnego *CEBPA* (*CCAAT/enhancer binding protein alpha*), genu *MLL* (myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia) czy onkogenu *NRAS* [13, 14]. W celach poznawczych stosuje się inne, bardziej pracochłonne i kosztowne techniki, w tym między innymi ocenę profilu ekspresji genów (GEP, gene expression profile) [15], analizę ekspresji microRNA [16], reakcję odwrotnej transkrypcji (RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction) [17], technikę analizy obecności polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP, single nucleotide polymorphism) [12], ocenę profilu metylacji genów i analizę sekwencji całego genomu [18]. Częstość występowania, charakter defektów oraz ich wpływ na rokowanie u chorych na AML z prawidłowym kariotypem przedstawiono w tabeli 2 [19].

Obecność mutacji w obrębie genu nukleofozminy 1

Występowanie mutacji *NPM1* potwierdzono u 50–60% dorosłych chorych na AML-NK [20, 21]. Gen *NPM1* koduje sekwencję białka nukleocytoplazmatycznego regulującego szlak supresji guza ARF-p53 [22, 23]. Obecność aberracji w obrębie genu nukleofozminy jest powiązana z wieloliniową dysplazją, utratą bądź brakiem ekspresji CD34 na nie-

dojrzałych komórkach mieloidalnych. Często obecności mutacji w obrębie *NPM1* towarzyszą defekty genu *FLT3* [21, 23–25]. Odsetki całkowitych remisji hematologicznych, a także przeżycia wolnego od zdarzeń (EFS, *event-free survival*), przeżycia wolnego od choroby (DFS, *disease-free survival*) oraz OS są znacząco lepsze u pacjentów z obecną mutacją *NPM1* (*NPM1mut*) z nieobecną *FLT3*-ITD (ITD, *internal tandem duplication*) [26–28]. Sugeruje się, że efekt ten jest także widoczny u pacjentów w wieku ponad 70 lat [29] oraz że jego obecność łagodzi negatywne skutki rokownicze obecności *FLT3* w przypadkach AML-NK z obecnością *FLT3*-ITDmut/*NPM1mut* [30]. Zastosowanie standardowej terapii w grupie chorych *NPM1mut/FLT3*-ITDneg umożliwia uzyskanie 4-letnich przeżyć u 60% chorych [13]. Ostatnio podjęto także próbę odpowiedzi na pytanie, czy obecność aberracji molekularnych w obrębie genu *NPM1* jest czynnikiem rokowniczym niezależnym od obecności dysplazji wieloliniowej (MLD, *multilineage dysplasia*). Okazało się, że OS oraz EFS u chorych na AML z obecnością *NPM1mut* nie różnią się niezależnie od obecności lub braku MLD [31]. W kolejnym badaniu opracowano model prognostyczny pozwalający przewidzieć rokowanie u chorych na AML. W próbie tej okazało się, że stan mutacyjny *NPM1* — obok wyniku badania kariotypu, wieku pacjenta, liczby leukocytów, aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH, *lactate dehydrogenase*) we krwi oraz ekspresji CD34 na komórkach białaczkowych — jest niezależnym czynnikiem rokowniczym u chorych na AML [32].

Odrębnym problemem do rozwiązania jest określenie wpływu stanu mutacyjnego na podejmowanie decyzji terapeutycznych u chorych na AML. W wyniku badań eksperymentalnych potwierdzono, że *NPM1* jest korepresorem zależnej od kwasu trans-retinowego (ATRA, *all-trans retinoic acid*) regulacji procesu transkrypcji [33]. W jednej z analiz okazało się, że dodanie ATRA do standardowego schematu terapii wpływa korzystnie na odsetek uzyskiwanych remisji całkowitych (CR, *complete remission*), OS oraz EFS u chorych w podeszłym wieku z AML inną niż ostra białaczka promielocytowa. W analizie retrospektywnej wyników tego badania stwierdzono, że korzyści odnoszą wyłącznie chorzy *NPM1mut/FLT3*-ITDneg [34].

Defekty genu *FLT3*

Mutacje genu *FLT3* są najczęstszymi pojedynczymi aberracjami genetycznymi u chorych na AML. Obecność przynajmniej jednej z opisanych mutacji tego genu potwierdzono u 25–45%

pacjentów [35]. Kinaza tyrozynowa 3 fms-podobna, należąca do klasy III receptorów dla kinaz tyrozynowych, podlega ekspresji w komórkach progenitorowych i odgrywa istotną rolę w procesach proliferacji, różnicowania i przeżycia wczesnych prekursorów hematopoetycznych [36, 37]. Wśród defektów *FLT3* można wyróżnić dwa zasadnicze typy — duplikacje tandemowe w obrębie obszaru kodującego sekwencję domeny przezbłonowej ITD zlokalizowane w egzonach 14 i 15 oraz mutacje w obrębie domeny kinazowej (TKD, *tyrosine kinase domain*).

FLT3-ITD

Obecność *FLT3*-ITD prowadzi do konstytutywnej aktywacji białka *FLT3*, która promuje aktywację STAT. Defekt ten prowadzi również do aktywacji wielu innych szlaków przekazywania sygnału, w tym RAS, MAPK oraz PI3K/AKT [38, 39]. Wielkość duplikacji jest zmienna (od 3 do setek nukleotydów) i związana z OS pacjentów obciążonych defektem [40]. Obecność *FLT3*-ITD prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek hematopoetycznych. Aberracja ta jest obecna u około 30% chorych na AML-NK [41], a jej wystąpienie jest powiązane z gorszym rokowaniem, ponieważ wpływa niekorzystnie na EFS, przeżycie wolne od wznowy (RFS, *relapse free survival*) oraz OS. Stwierdzono także, że wysoka ilościowa zawartość zmutowanego allelu oraz większa długość duplikacji niekorzystnie wpływają na OS [42–44]. Również zawartość allelu typu dzikiego ma istotne znaczenie prognostyczne. Chorych bez ekspresji allelu typu dzikiego także cechuje gorsze rokowanie [45, 46]. Lokalizacja insercji też wydaje się wpływać na szanse uzyskania CR u chorych na AML — lokalizacja ITD w obrębie miejsca integracji w *beta-1-sheet* niekorzystnie wpływa na prawdopodobieństwo uzyskania CR [47]. Podobnie negatywny wpływ na OS chorych na AML-NK, nawet przy braku *FLT3*-ITD, ma nadekspresja *FLT3* w komórkach białaczkowych [48].

Co interesujące, negatywny wpływ *FLT3* uwiadcza się nawet w przypadkach *NPM1mut*, ponieważ wykazano, że u pacjentów *FLT3* typu dzikiego (wt, *wild-type*)/*NPM1mut* RFS jest znacząco dłuższe, a odsetek 5-letnich OS — znacząco wyższy niż w przypadku chorych *FLT3*--ITD/*NPM1mut* [13]. Co więcej, chorzy na AML-NK z *FLT3wt/NPM1mut* wydają się nie odnosić istotnych korzyści w zakresie RFS w przypadku allogenicznego przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HSCT, *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*) w pierwszej CR. Z kolei, wykonanie allo-HSCT

u chorych *FLT3*mut jest powiązane z 40-procentowym zmniejszeniem ryzyka wznowy lub zgonu związanego z białaczką [13]. Rola i znaczenie autologicznego przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych (auto-HSCT, *autologous hematopoietic stem cell transplantation*) w tej grupie pacjentów nie są jasne. W jednym z opublikowanych badań przeprowadzenie auto-HSCT u chorych *FLT3*mut w pierwszej CR korzystnie wpływało na DFS w porównaniu z chorymi poddanymi chemioterapii konsolidującej. Nie wpływało jednak na przedłużenie OS [49].

FLT3-TKD

Najczęściej defekty tego rodzaju są zlokalizowane w obrębie pętli aktywacyjnej w obszarze kodonów 835–836. Ich obecność potwierdzono u 7–10% pacjentów z AML-NK [41, 46].

Wpływ obecności *FLT3*-TKD na rokowanie u chorych na AML-NK nie jest do końca poznany. W jednej z metaanaliz potwierdzono negatywny wpływ występowania defektu na DFS, w innym badaniu natomiast rokowanie u chorych z *FLT3*-TKDmut było lepsze niż u pacjentów *FLT3*-ITDmut [50, 51].

Gen MLL-PTD

Gen *MLL* często podlega rearanzacji u chorych na AML. Rearanzacja ta najczęściej prowadzi do nie zrównoważonej translokacji i utraty materiału genetycznego. Możliwa jest jednak także nadekspresja genu *MLL* zlokalizowanego w chromosomie 11q23. Podobnie jak w przypadku genu *FLT3*, w genie *MLL* także może dochodzić do duplikacji tandemowej (*MLL*-PTD, *partial tandem duplications of mixed lineage leukemia gene*) w obrębie egzonów 5–11 lub egzonów 5–12. Prowadzi to do wydłużenia struktury białka i zmiany jego właściwości. Dzięki zachowaniu domeny wiążącej DNA oraz domeny represji transkrypcji białko to, na nieznaną drogę, hamuje ekspresję allelu niezmutowanego. W blastach białaczkowych ekspresję *MLL* można zahamować, stosując inhibitory metylotransferazy oraz inhibitory deacetylazy histonowej. Stwarza to nowe możliwości terapeutyczne w grupie chorych z *MLL*-PTD [52].

Znaczenie rokownicze obecności *MLL*-PTD po raz pierwszy opisano w 2007 roku [53]. Co interesujące, u 30–40% chorych z *MLL*-PTD współwystępuje *FLT3*-ITD. Wyjątkowo rzadko natomiast obecności *MLL*-PTD towarzyszą mutacje *CEBPA* czy też *NPM1* [13]. Jak dotąd potwierdzono, że obecność *MLL*-PTD jest powiązana z krótszym czasem trwania CR oraz gorszym EFS. Niestety, nie udało się udowodnić wpływu obecności tego defektu

na OS [45]. Podkreśla się jednak korzystny wpływ przeprowadzenia auto-HSCT u młodszych chorych na AML-NK z obecną *MLL*-PTDmut w pierwszej CR [54].

Gen CEBPA

Czynnik transkrypcyjny *CEBPA* jest zaangażowany w proces różnicowania komórek mieloidalnych [55]. Białko, będące rezultatem działania zmutowanego czynnika transkrypcyjnego, blokuje proces różnicowania prekursorów mieloidalnych poprzez związanie z DNA lub transaktywację genów docelowych. Obecność mutacji *CEBPA* potwierdzono u około 15% chorych na AML-NK [56]. Występowanie mutacji *CEBPA* jest powiązane z dłuższymi okresami CR, RFS, a także OS [57–59].

Ocena OS u chorych z mutacjami *CEBPA* wykazała, że jest ono podobne do stwierdzanego u chorych z białaczką *CBF* (*core binding factor*). Odsetek OS po 96 miesiącach w tej grupie pacjentów oszacowano na około 60%. W licznych badaniach potwierdzono także, że odsetek odpowiedzi na standardową terapię indukującą remisję jest zadawalający. Korzystny wpływ obecności mutacji *CEBPA* potwierdzono również w odniesieniu do EFS, DFS oraz OS. Według licznych autorów doniesień korzystny efekt obecności mutacji nie zależy od obecności innych czynników ryzyka, takich jak *FLT3*-ITD oraz *MLL*-PTD [57, 59–62]. Dane te musiały jednak ulec reewaluacji, gdyż stwierdzono, że u pacjentów z monoalleliczną postacią mutacji *CEBPA* (*moCEBPA*) nie ma różnic w przebiegu AML-NK w porównaniu z chorymi bez mutacji genu *CEBPA* (*wild-type CEBPA*). Na podstawie analizy wyników badania AMLCG 1999 stwierdzono, że obecność mutacji *NPM1* korzystnie modyfikuje wartość prognostyczną *moCEBPA* w odniesieniu do OS oraz EFS. Efektu tego nie potwierdzono w odniesieniu do chorych z mutacją *FLT3*-ITD. Z kolei *moCEBPA* nie wpływa na rokowanie (OS, EFS) u chorych z dzikim typem genu *NPM1* [63]. Ostatnio zaobserwowano, że wpływ obecności mutacji *CEBPA* na rokowanie u chorych na AML-NK jest bardziej widoczny w przypadku obecności dwóch kopii zdefektowanego genu (*CEBPA*double-mut) [61, 62], a także, że w tych przypadkach nie występuje znaczący efekt nakładania w odniesieniu do parametrów odzwierciedlających przeżycie u chorych na AML-NK z obecnością innych defektów molekularnych, w tym *FLT3*-ITD lub *MLL*-PTD. Z tego powodu wysunięto przypuszczenie, że obecność mutacji *CEBPA* definiuje nową kategorię AML-NK. Uznano także, że dotychczasowe obserwacje pozwalają na stwierdzenie, że prawdopodobieństwo współwy-

stępowania *CEBPA*double-mut oraz *FLT3*-ITD u chorych na AML, a tym samym — utraty efektu obecności *CEBPA*double--mut, jest niskie.

Także hipermetylacja genu *CEBPA* wydaje się odgrywać istotną rolę w procesie leukomogenezy u chorych na AML-NK, szczególnie w przypadkach z nieobecnościami defektami *FLT3*-ITD oraz *NPM1*. Prognostyczne znaczenie tego stanu nie jest jednak jeszcze określone [64].

Jak dotąd, nie wypracowano strategii leczenia chorych z mutacjami *CEBPA*. Rola transplantacji w leczeniu pacjentów, którzy uzyskają CR, także nie została określona.

Gen *WT1*

Rola genu *WT1* (*Wilm's tumor 1 gene*) w patogenezie AML nie jest w pełni poznana. Przypuszcza się, że zakłócenie funkcji genu *WT1* może sprzyjać nadmiernej proliferacji komórek macierzystych szpiku oraz hamować ich różnicowanie [65, 66]. Obecność mutacji genu *WT1* potwierdzono u 10–12% chorych na AML oraz u 7% pacjentów z AML-NK [67, 68].

W badaniach CALGB (*Cancer and Leukemia Group B*) oraz MRC (*Medical Research Council*) potwierdzono negatywny wpływ obecności mutacji *WT1* na RFS, a także na OS [69, 70]. Różnic tych nie udało się potwierdzić w badaniu AMLSG [71].

Dodatkowe analizy potwierdziły jednak, że u chorych *WT1*mut/*FLT3*-ITDmut odsetek CR jest niższy, a RFS i OS są gorsze niż u pacjentów *WT1*mut/*FLT3*-ITDneg. Próba wytłumaczenia odmiennych wyników przedstawionych badań doprowadziła do stwierdzenia, że postrzegane różnice są wynikiem różnic w intensywności prowadzonej terapii konsolidującej (w badaniu AMLSG sumaryczna liczba dużych dawek arabinozydu cytozyny była wyższa). Fakt ten może stanowić przesłankę do stwierdzenia, że negatywny wpływ obecności *WT1*mut można przełamać, intensyfikując stosowaną terapię indukującą. Ostatnio opublikowano dane wskazujące na to, że nieobecność *WT1*mut oraz występowanie jednonukleotydowego polimorfizmu genu *WT1* (SNP rs16754) ma związek z korzystnym czasem trwania RFS i OS u chorych na AML-NK [72]. Z tego powodu ocena znaczenia obecności aberracji molekularnych genu *WT1* u chorych na AML-NK powinna się stać przedmiotem dalszych badań.

Onkogen *RAS*

Białko Ras należy do rodziny białek związanych z błoną komórkową regulujących proces proliferacji, różnicowania i apoptozy komórek. Występowanie

mutacji genu *RAS* potwierdzono u 9–10% chorych na AML-NK [13]. Mimo sugerowanego związku obecności mutacji *RAS* z rokowaniem u chorych na AML-NK, ich prognostycznego znaczenia nie potwierdzono w dwóch dużych badaniach klinicznych [73, 74]. Należy jednak wspomnieć, że chorzy z obecnością mutacji *RAS* wydają się odnosić korzyść z intensywnych form leczenia konsolidującego. Jak wykazali Neubauer i wsp. [75], zastosowanie dużych dawek arabinozydu cytozyny w leczeniu konsolidującym poprawia rokowanie w tej grupie chorych.

Gen *IDH*

Gen *IDH* koduje sekwencję dehydrogenazy izocytrynianowej (*IDH*, *isocitrate dehydrogenase*). Enzym ten występuje w dwóch izoformach — *IDH1* i *IDH2*. Oba uczestniczą w komórkowych mechanizmach odpowiedzi na stres oksydacyjny. Obecność mutacji genu *IDH1* potwierdzono u 6,6–16% chorych na AML, głównie z prawidłowym kariotypem oraz pacjentów z +8 [76–78]. Mimo wstępnych danych, negujących prognostyczne znaczenie obecności mutacji R132 genu *IDH1* u chorych na AML, w późniejszych doniesieniach potwierdzono negatywny wpływ obecności *IDH1*mut na EFS, skumulowaną częstość wznów (RR, *relapse rate*), a także trend w kierunku gorszego OS. Efekt ten był wyraźny u osób poniżej 60. roku życia z *NPM1*wt [79]. Marcucci i wsp. [80] wykazali, że DFS u chorych na AML z *NPM1*wt/*FLT3*-ITDneg/*IDH1*mut jest gorsze niż u pacjentów *NPM1*wt/*FLT3*-ITDneg/*IDH*wt. Potwierdzeniem znaczenia obecności mutacji *IDH1* u chorych na AML było udokumentowanie wpływu jej obecności na rokowanie u pacjentów *NPM1*mut/*FLT3*-ITDneg, a także *CEBPA*mut/*FLT3*-ITDneg [81–83]. Do ciekawych wniosków doprowadziła także analiza związku obecności *IDH1*mut z innymi defektami molekularnymi. Po stratyfikacji chorych na AML zależnie od obecności *FLT3*-ITD okazało się, że obecność mutacji *IDH1* jest niezależnym czynnikiem prognostycznym u chorych *FLT3*-ITDneg oraz czynnikiem poprawiającym rokowanie u chorych *FLT3*-ITDmut. Wykazanie tych zależności stało się podstawą do wysunięcia hipotezy, że obecność mutacji *IDH1* może wpływać na zjawisko chemiooporności komórek białaczkowych [84].

Znaczenie obecności mutacji *IDH2* u chorych na AML-NK jest mniej poznane. Ich występowanie potwierdzono u 19% chorych [80]. Wpływ mutacji *IDH2* na rokowanie u chorych na AML jest obecnie przedmiotem badań, a ich wstępne wyniki są rozbieżne. Chou i wsp. [85] potwierdzili korzystny wpływ obecności mutacji *IDH2* na rokowanie u cho-

rych na AML. Wyniki innych badań nie wykazały wpływu defektów na rokowanie oraz odsetek uzyskiwanych odpowiedzi na terapię [86], a nawet dowiodły negatywnego wpływu obecności mutacji *IDH2* na rokowanie niezależnie od obecności lub nie aberracji *FLT3* [84–86].

Rozbieżności te próbuje się tłumaczyć różnym wpływem na rokowanie poszczególnych typów defektów *IDH2*. Obecność substytucji *IDH2-R140* znacząco częściej stwierdza się u chorych *NPM1*mut, a *IDH2-R172* — u pacjentów z innymi rodzajami aberracji molekularnych [87]. Ponadto okazało się, że obecność substytucji *IDH2-R140* jest korzystnym, niezależnym czynnikiem prognostycznym w odniesieniu do OS u pacjentów z AML. Z kolei obecność substytucji *IDH2-R172* wpływa niekorzystnie na przebieg choroby [88].

Niekorzystny wpływ obecności mutacji *IDH1* i *IDH2* na rokowanie u chorych z *de novo* AML-NK potwierdzono ostatnio także w raporcie hiszpańskiej grupy CETLAM. W badaniu tym obecność mutacji *IDH1* lub *IDH2* była powiązana z istotnie krótszym OS. Wpływ mutacji był nawet bardziej widoczny u chorych z obecnymi mutacjami *NPM1* lub *CEBPA/FLT3*wt. Co ciekawe, w każdym z analizowanych przypadków *IDH1*mut lub *IDH2*mut obecny był także niezmutowany allel. Spostrzeżenie to wydaje się potwierdzać hipotezę, że w obu przypadkach ich mutanty mają charakter onkogenów dominujących [89].

Mutacje *DNMT3A*

Ludzkie geny *DNMT1*, *DNMT3A* oraz *DNMT3B* kodują sekwencję metylotransferaz DNA. Enzymy te katalizują proces metylacji cytozyny w obrębie dinukleotydów CpG. Nadmierna metylacja jest obecnie uznawana za czynnik wspomagający ekspresję niektórych genów u chorych na AML-NK (np. genu *EVII*). Wyniki badań eksperymentalnych wykazały, że nadmierna ekspresja genu *EVII* sprzyja obecności innych aberracji molekularnych u chorych na AML-NK (np. w obrębie promotorów genów, genów supresorowych, czynników transkrypcyjnych) [90]. W 2008 roku Ley i wsp. [91] opisali mutacje genu *DNMT3* u chorych na AML-NK prowadzącą do zmiany ramki odczytu. Dwa lata później ten sam zespół przedstawił 18 innych mutacji istotnie zmieniających funkcję genu *DNMT3*. Szczegółowa ocena potwierdziła, że mutacje te są obecne u 36,7% chorych na AML-NK i praktycznie nieobecne u pacjentów z korzystnym profilem zaburzeń cytogenetycznych [92]. Okazało się, że obecność mutacji *DMNT3* jest niezależnym czynnikiem prognostycznym powiązanim z krótszym OS oraz niższym odsetkiem uzyskiwanych CR [93].

Onkogen *TET2*

Onkogen *TET2* (*tet oncogene family member 2* lub *ten-eleven translocation 2*) należy do rodziny genów odpowiedzialnych za kontrolę epigenetyczną oraz podtrzymanie życia zarodkowych komórek macierzystych. W 2009 roku Tefferi i wsp. [94] potwierdzili częste występowanie mutacji *TET2* prowadzących do utraty funkcji genu u chorych na AML, zespołem mielodysplastycznym oraz przewlekłą białaczką mielomonocytową. Dane początkowe nie potwierdzały negatywnego prognostycznego znaczenia obecności mutacji *TET2* u chorych na AML, u których uzyskano CR [89]. Dopiero Metzeler i wsp. [95] wykazali niekorzystny wpływ obecności defektu na rokowanie u chorych na AML-NK oraz korzystnym genotypem (*NPM1*mut/*FLT3-ITD*neg lub *CEBPA*mut). Także w badaniach Chou i wsp. [96] potwierdzono negatywny wpływ mutacji *TET2* na rokowanie u chorych na AML-NK. Co interesujące, obecność *TET2*mut okazała się pogarszać rokowanie również u pacjentów z *FLT3-ITD* oraz z *NPM1*wt.

Wpływ nadmiernej ekspresji genu na rokowanie u chorych na AML-NK

Wysoką ekspresję genu *BAALC* (*brain and acute leukemia, cytoplasmic*) potwierdzono w komórkach progenitorowych hematopoezy. W warunkach prawidłowych ekspresja *BAALC* maleje wraz ze stopniem zróżnicowania komórek mieloidalnych. Wstępne badania, w których oceniano ekspresję *BAALC*, wskazywały na zmienną ekspresję genu w komórkach białaczkowych u poszczególnych chorych na AML z prawidłowym kariotypem [97, 98]. Wkrótce jednak okazało się, że wysoka ekspresja *BAALC* jest niezależnym czynnikiem prognostycznym u chorych na AML-NK. U chorych z wyższą niż średnia ekspresją *BAALC* w komórkach białaczkowych DFS oraz OS były krótsze niż u pacjentów niską ekspresją *BAALC*. Prognostyczne znaczenie wysokiej ekspresji *BAALC* było jednak widoczne jedynie w przypadkach jednoczesnego niewystępowania defektów genów *CEBPA* oraz *FLT3-ITD* [98, 99].

Langer i wsp. [100] wykazali, że wysoka ekspresja *BAALC* u młodych chorych na AML-NK jest powiązana z niskim odsetkiem uzyskiwanych CR oraz krótszym przeżyciem (po dopasowaniu do statusu mutacyjnego genów *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA* oraz liczby leukocytów). Podobny wpływ obecności *BAALC* na rokowanie potwierdzono także u starszych chorych na AML-NK [101]. Wpływ ekspresji *BAALC* na rokowanie u chorych na AML-NK po-

twierdzili również w swych obserwacjach Santamaria i wsp., którzy stwierdzili znacznie wyższy odsetek oporności na leczenie indukujące remisję, a także znacznie niższy odsetek uzyskiwanych CR u chorych na AML-NK z wysoką ekspresją *BAALC* poddanych terapii ratunkowej [102]. Określenie ekspresji *BAALC* w blastach białaczkowych wydaje się przydatne w przypadku podejmowania decyzji o sposobie leczenia po uzyskaniu remisji. Wykazano bowiem, że odsetek nawrotów u chorych z wysoką ekspresją *BAALC* poddanych allo-HSCT jest znacząco niższy niż w przypadku pacjentów leczonych jedynie auto-HSCT [97].

Onkogen *ERG*

Onkogen *ERG* (*ETS-related gene*) koduje czynnik transkrypcyjny odgrywający istotną rolę w szlakach przekazywania sygnałów regulujących procesy proliferacji komórkowej i różnicowania. Nadmierną ekspresję *ERG* potwierdzono w wielu nowotworach, w tym także u chorych na AML-NK [103–105]. W badaniach tych ekspresja *ERG* powyżej 75% w komórkach białaczkowych była związana z niższym odsetkiem skumulowanych odpowiedzi i gorszym OS niż u pacjentów z niższą ekspresją *ERG*.

Gen *MNI*

Gen *MNI* (*meningioma 1 oncogene*) koduje sekwencję białka uczestniczącego w kompleksie genowym regulującym proces transkrypcji inicjowany przez jądrowy receptor dla retinoidów (RAR-RXR) lub receptor dla witaminy D [106, 107]. Nadexpresja genu *MNI* u chorych na AML-NK jest powiązana z niższym odsetkiem CR oraz gorszym OS [108]. Negatywny wpływ wysokiej ekspresji *MNI* na rokowanie u chorych na AML-NK okazał się widoczny nawet po uwzględnieniu obecności mutacji genu *WT1* i *NPM1*, *FLT3*-ITD oraz liczby leukocytów we krwi [109]. Stwierdzono także, że u chorych z niską ekspresją *MNI* leczonych ATRA okresy EFS oraz OS są dłuższe niż u chorych z niską ekspresją *MNI* nieotrzymujących ATRA, jak również u chorych z wysoką ekspresją *MNI* leczonych z dodatkiem ATRA lub bez niego [110].

Gen *AF1q*

Początkowo sądzono, że *AF1q* jest genem partnerskim dla *MLL*. Pogląd ten był wynikiem potwierdzenia jego obecności u dzieci z białaczką mielomonocytową z obecną $t(1;11)(q21;q23)$. Wkrótce potem wyniki badań eksperymentalnych potwierdziły wysoką ekspresję *AF1q* w liniach komórek białaczkowych oraz w komórkach CD34+ [111]. Wyniki

badania przeprowadzonych u chorych na AML-NK dowiodły, że u pacjentów z niską ekspresją *AF1q* (*AF1qlow*) odsetek uzyskiwanych CR jest wyższy, a DFS oraz OS — dłuższe niż u pacjentów z wysoką ekspresją *AF1q* (*AF1qhigh*). Ponadto stwierdzono, że u chorych z *AF1qhigh* znacząco częściej stwierdza się współwystępowanie *FLT3*-ITD [112].

Podobnie jak w przypadku ekspresji *BAALC*, u osób *AF1qhigh* leczonych za pomocą allo-HSCT, DFS jest znacząco dłuższe niż u pacjentów leczonych auto-HSCT. Spostrzeżenia te potwierdzają niekorzystne prognostyczne znaczenie wysokiej ekspresji *AF1q* w komórkach białaczkowych u pacjentów z AML-NK.

Gen *EVII*

Pierwszą insercją retrowirusową, której obecność zidentyfikowano w komórkach mysiej białaczki, był gen *EVII* (*ecotropic viral integration site 1*) [113]. Nieprawidłową ekspresję *EVII* u ludzi potwierdzono w przypadkach AML z $inv(3)(q21q26.2)$ lub $t(3;3)(q21;q26.2)$. Wysoką ekspresję *EVII* wykazano u około 8% chorych na AML *de novo*. Co ciekawe, dotyczyło to także pacjentów z AML bez wymienionych zaburzeń genetycznych. Wyniki pierwszych badań klinicznych wskazywały na niekorzystny wpływ wysokiej ekspresji *EVII* na odsetek uzyskiwanych CR, czas trwania EFS oraz OS [114, 115]. Wyniki późniejszej analizy, przeprowadzonej przez Groschel i wsp. [116], jednoznacznie potwierdziły, że wysoka ekspresja *EVII* u pacjentów z AML poniżej 60. roku życia jest niekorzystnie powiązana z odsetkiem uzyskiwanych CR, DFS oraz EFS. Wpływ ten okazał się szczególnie widoczny u chorych na AML-NK [116].

Podsumowanie

Obecność różnorodnych zaburzeń molekularnych u poszczególnych chorych na AML z prawidłowym kariotypem jest prawdopodobnie przyczyną różnic w jej indywidualnym przebiegu klinicznym. Ich występowanie może również tłumaczyć różnice w odsetkach uzyskiwanych odpowiedzi na zastosowane leczenie. Zidentyfikowanie określonych aberracji umożliwia ponadto śledzenie obecności choroby resztkowej u pacjentów w remisji hematologicznej i cytometrycznej, a w nie-których przypadkach — kwalifikację do badań klinicznych z zastosowaniem leków celowanych molekularnie. Z wymienionych powodów w każdym przypadku AML wykonanie badań molekularnych w chwili rozpoznania jest obecnie standardem postępowania diagnostycznego.

Piśmiennictwo

- Gregory T.K., Wald D., Chen Y., Vermaat J.M., Xiong Y., Tse W. Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *J. Hematol. Oncol.* 2009; 2: 23–33.
- Mrózek K., Heerema N.A., Bloomfield C.D. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.* 2004; 18: 115–136.
- Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Hematol.* 2001; 14: 497–529.
- Grimwade D., Walker H., Oliver F. i wsp. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 1998; 92: 2322–2333.
- Slovak M.L., Kopecky K.J., Cassileth P.A. i wsp. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study. *Blood* 2000; 96: 4075–4083.
- Byrd J.C., Mrózek K., Dodge R.K. i wsp. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002; 100: 4325–4336.
- Grimwade D., Hills R., Moorman A.V. i wsp. Refinement of cytogenetic classification in AML: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities amongst 5635 younger adults treated in the UK MRC trials *Haematologica* 2009; 94: abstrakt 0533.
- Marcucci G., Mrózek K., Ruppert A.S. i wsp. Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 5705–5717.
- Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A. i wsp. The 2008 revision of the WHO Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937–951.
- Mrózek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin. Oncol.* 2008; 358: 365–377.
- Schoch C., Haferlach T., Bursch S. i wsp. Loss of genetic material is more common than gain in acute myeloid leukemia with complex aberrant karyotype: a detailed analysis of 125 cases using conventional chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization including 24-color FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35: 20–29.
- Rücker F.G., Bullinger L., Schwaben C. i wsp. Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray based molecular characterization. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 3887–3894.
- Schlenk R.F., Dohner K., Krauter J. i wsp. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358: 1909–1918.
- Gaidzik V., Döhner K. Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Semin. Oncol.* 2008; 35: 346–355.
- Handschuh L., Lewandowski K., Kaźmierczak M., Komarnicki M., Figlerowicz M. Choroby rozrostowe krwi — analiza transkryptomu z zastosowaniem mikromacierzy DNA. *Biotechnologia* 2009; 3: 22–43.
- Marcucci G., Maharry K., Radmacher M.D. i wsp. Prognostic significance of gene and microRNA expression signatures associated with CEBPA mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 5078–5087.
- Marcucci G., Baldus C.D., Ruppert A.S. i wsp. Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: A Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 9234–9242.
- Ley T.J., Minx P.J., Walter M.J. i wsp. A pilot study of high throughput, sequence-based mutational profiling of primary human acute myeloid leukemia cell genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 14275–14280.
- Estey H., Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006; 368: 1894–1890.
- Verhaak R.G., Goudswaard C.S., van Putten W. i wsp. 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.
- Chen W.G., Rassidakis G.Z., Medeiros L.J. Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2006; 130: 1687–1692.
- Falini B., Mecucci C., Tiacci E. i wsp. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 254–266.
- Falini B., Nicoletti I., Martelli M.F., Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biological and clinical features. *Blood* 2007; 109: 874–885.
- Grisendi S., Mecucci C., Falini B. i wsp. Nucleophosmin and cancer. *Nat. Rev.* 2006; 6: 493–505.
- Falini B., Nicoletti I., Bolli N. i wsp. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Hematologica* 2007; 92: 519–532.
- Schnittger S., Schoch C., Kern W. i wsp. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 3733–3739.
- Thiede C., Koch S., Creutzig E. i wsp. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; 107: 4011–4020.
- Dohner K., Schlenk R.F., Habdank M. i wsp. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005; 106: 3740–3746.
- Becker H., Marcucci G., Maharry K. i wsp. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and MicroRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 596–604.
- Gale R.E., Green C., Allen C. i wsp. 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: 2776–2884.
- Falini B., Maciejewski K., Weiss T. i wsp. Multilineage dysplasia has no impact on biologic, clinicopathologic, and prognostic features of AML with mutated nucleophosmin (NPM1). *Blood* 2010; 115: 3776–3786.
- Rollig C., Thiede C., Gramatzki M. i wsp. A novel prognostic model in elderly patients with acute myeloid leukemia—results of

- 909 patients entered into the prospective AML96 trial. *Blood* 2006; 116: 971–978.
33. Liu H., Tan B.C., Tseng K.H. i wsp. Nucleophosmin acts as a novel AP2 alpha binding transcriptional corepressor during cell differentiation. *EMBO Rep.* 2007; 8: 394–400.
 34. Schlenk R.F., Dohner K., Kneba M. i wsp. Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica* 2009; 94: 54–60.
 35. Stirewalt D.L., Radlich J.P. The role FLT3 in hematopoietic malignancies. *Natl. Rev. Cancer* 2003; 3: 350–665.
 36. Kiyoi H., Naoe T. Biology, clinical relevance, and molecularly targeted therapy in acute leukemia with FLT3 mutation. *Int. J. Hematol.* 2006; 83: 301–308.
 37. Dohner H. Implications of the molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2007: 412–419.
 38. Zheng R., Small D. Mutant FLT3 signaling contributes to a Block in myeloid differentiation. *Leuk. Lymphoma* 2005; 46: 1679–1687.
 39. Rupa J., Lewandowski K. Przydatność rokownicza defektów fms-podobnej kinazy tyrozynowej 3 (FLT3) w chorobach limfoidnej mieloproliferacyjnych. *Acta Hematol. Pol.* 2005; 36: 17–32.
 40. Agadjanyan E.L., Linsley J., Slovak M.L., Willman C.L., Radich J.P. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107: 3724–3726.
 41. Frohling S., Schlenk R.F., Breittruck J. i wsp. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002; 100: 4372–4380.
 42. Kainz B., Heintel D., Marculescu R. i wsp. Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16). *Hematol. J.* 2002; 3: 283–289.
 43. Ciolli S., Vannucchi A.M., Leoni F. i wsp. Internal tandem duplications of Flt3 gene (Flt3/ITD) predicts a poor post-remission outcome in adult patients with acute non-promyelocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2004; 45: 73–78.
 44. Bienz M., Ludwig M., Leibundgut E.O. i wsp. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 1416–1424.
 45. Whitman S.P., Archer K.J., Feng L. i wsp. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res.* 2001; 61: 7233–7239.
 46. Thiede C., Steudel C., Mohr B. i wsp. 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.
 47. Kayser S., Schlenk R.F., Londono M.C. i wsp. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* 2009; 114: 2386–3292.
 48. Ozeki K., Kiyoi H., Hirose Y. i wsp. Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103: 1901–1908.
 49. Singh H., Werner L.L., Asali S. i wsp. Comparison of autologous stem cell transplantation versus consolidation chemotherapy for patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia (CN-AML) and FLT3ITD. *Am. J. Hematol.* 2011; 86: 625–627.
 50. Yanada M., Matsuo K., Suzuki T. i wsp. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Leukemia* 2005; 19: 1345–1349.
 51. Mead A.J., Linch D.C., Hills R.K. i wsp. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110: 1262–1270.
 52. Whitman S.P., Liu S., Vukosavljevic T. i wsp. The MLL partial tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular-targeted therapy. *Blood* 2005, 106: 345–352.
 53. Mrozek K., Dohner H., Bloomfield C.D. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Curr. Opin. Hematol.* 2007; 14: 106–114.
 54. Whitman S.P., Ruppert A.S., Marcucci G. i wsp. Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 2007; 109: 5164–5167.
 55. Piorunkiewicz M., Lewandowski K. Prognostyczne znaczenie obecności mutacji genu CEBPA u chorych na ostrą białaczkę szpikową. *Współ. Onkol.* 2010; 14: 363–371.
 56. Pabst T., Mueller B.U., Zhang P. i wsp. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (CEBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* 2001; 3: 263–270.
 57. Frohling S., Schlenk R.F., Stolze I. i wsp. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 624–633.
 58. Bienz M., Ludwig M., Leibundgut E.O. i wsp. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 1416–1424.
 59. van Waalwijk B., van Doorn-Khosrovani S., Erpelinc C., Meijer J. i wsp. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol. J.* 2003; 4: 31–40.
 60. Marcucci G., Maharry K., Radmacher M.D. i wsp. Prognostic significance of gene and microRNA expression signatures associated with CEBPA mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 5078–5087.
 61. Wouters B., Löwenberg B., Erpelinc-Verschueren C. i wsp. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009; 113: 3088–3091.
 62. Taskesen E., Bullinger L., Corbacioglu A. i wsp. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood* 2011; 117: 2469–2475.
 63. Dufour A., Schneider F., Hoster E. i wsp. for the AML CG study group. Monoallelic CEBPA mutations in normal karyotype acute myeloid leukemia: independent favorable prognostic factor within NPM1 mutated patients. *Ann. Hematol.* 2012; 91: 1051–1063.

64. Lu Y., Chen W., Chen W. i wsp. C/EBPA gene mutation and C/EBPA promoter hypermethylation in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Am. J. Hematol.* 2010; 85: 426–430.
65. Ariyaratana S., Loeb D.M. The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis. *Expert Rev. Mol. Med.* 2007; 9: 1–17.
66. Kelly L.M., Gilliland D.G. Genetics of myeloid leukemias. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2002; 3: 179–198.
67. King-Underwood L., Pritchard-Jones K. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood* 1998; 91: 2961–2968.
68. Hou H., Huang T., Lin L. i wsp. WT1 mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: Stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system. *Blood* 2010; 115: 5222–5231.
69. Virappane P., Gale R., Hills R. i wsp. Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: The United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 5429–5435.
70. Paschka P., Marcucci G., Ruppert A.S. i wsp. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 4595–4602.
71. Gaidzik V., Döhner K. Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Semin. Oncol.* 2008; 35: 346–355.
72. Damm F., Heuser M., Morgan M. i wsp. Single nucleotide polymorphism in the mutational hotspot of WT1 predicts favorable outcome in patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2011; 28: 578–585.
73. Bacher U., Haferlach T., Schoch C. i wsp. Implication of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 2006; 107: 3847–3853.
74. Bowen D.T., Frew M.E., Hills R. i wsp. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood* 2005; 106: 2113–2119.
75. Neubauer A., Maharry K., Mrozek K. i wsp. Patients with acute myeloid leukemia and RAS mutations benefit most from postremission high-dose cytarabine: a Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 4603–4609.
76. Mardis E.R., Ding L., Dooling D.J. i wsp. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361: 1058–1066.
77. Chou W.C., Hou H.A., Chen C.Y. i wsp. Distinct clinical and biological characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation. *Blood* 2010; 115: 2749–2754.
78. Zhou K.G., Jiang L.J., Shang Z., Wang J., Huang L., Zhou J.F. Potential application of IDH1 and IDH2 mutations as prognostic indicators in non-promyelocytic acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leuk. Lymphoma* 2012 Jun 18 [złożono do druku].
79. Schnittger S., Haferlach C., Ulke M. i wsp. IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood* 2010; 116: 5486–5496.
80. Marcucci G., Maharry K., Wu Y. i wsp. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 2348–2355.
81. Boissel N., Nibourel O., Renneville A. i wsp. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 3717–3723.
82. Paschka P., Schlenk R., Gaidzik V. i wsp. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 3636–3643.
83. Abbas S., Lugthart S., Kavelaars F.G. i wsp. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood* 2010; 116: 2122–2126.
84. Green C.L., Evans C.M., Hills R.K. i wsp. The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status. *Blood* 2010; 116: 2779–2782.
85. Chou W.C., Lei W.C., Ko B.S. i wsp. The prognostic impact and stability of isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2011; 25: 246–253.
86. Thol F., Damm F., Wagner K. i wsp. Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; 116: 614–616.
87. Green C.L., Evans C.M., Hills R.K. i wsp. The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status. *Blood* 2010; 116: 2779–2782.
88. Green C.L., Evans C.M., Zhao L. i wsp. The prognostic significance of IDH2 mutations depends on the location of the mutation. *Blood* 2011; 118: 409–412.
89. Nibourel O., Kosmider O., Cheok M. i wsp. Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission. *Blood* 2010; 116: 1132–1135.
90. Lugthart S., Figueroa M.E., Bindels E. i wsp. Aberrant DNA hypermethylation signature in acute myeloid leukemia directed by EVI1. *Blood* 2011; 117: 234–241.
91. Ley T.J., Mardis E.R., Ding L. i wsp. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 2008; 456: 66–72.
92. Ley T., Ding L., Walter M. i wsp. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363: 2424–2433.
93. Thol F., Damm F., Lüdeking A. i wsp. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 2889–2896.
94. Tefferi A., Lim K.H., Abdel-Wahab O. i wsp. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia* 2009; 23: 1343–1345.
95. Metzeler K.H., Maharry K., Radmacher M.D. i wsp. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 1373–1381.
96. Chou W.C., Chou S.C., Liu C.Y. i wsp. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood* 2011; 118: 3803–3810.
97. Baldus C.D., Thiede C., Soucek S. i wsp. BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 790–797.

98. Baldus C.D., Tanner S.M., Ruppert A.S. i wsp. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 2003; 102: 1613–1618.
99. Beinz M., Ludwig M., Leibundgut E.O. i wsp. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 1416–1424.
100. Langer C., Radmacher M.D., Ruppert A.S. i wsp. High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood* 2008; 111: 5371–5379.
101. Schwind S., Marcucci G., Maharry K. i wsp. BAALC and ERG expression levels are associated with outcome and distinct gene and microRNA-expression profiles in older patients with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 2010; 116: 5660–5669.
102. Santamaria C., Chillón M.C., Garcia-Sanz R. i wsp. BAALC is an important predictor of refractoriness to chemotherapy and poor survival in intermediate-risk acute myeloid leukemia (AML). *Ann. Hematol.* 2010; 89: 453–458.
103. Marcucci G., Baldus C.D., Ruppert A.S. i wsp. Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: A Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 9234–9242.
104. Marcucci G., Maharry K., Whitman P. i wsp. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 3337–3343.
105. Metzeler K.H., Dufour A., Benthaus T. i wsp. ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 5031–5038.
106. van Wely K.H.M., Molijn A.C., Buijs A. i wsp. The MN1 oncoprotein synergizes with coactivators RAC3 and p300 in RAR-RXR-mediated transcription. *Oncogene* 2003; 22: 699–709.
107. Sutton A.L.M., Zhang X., Ellison T.I. i wsp. The 1,25(OH)2D3-regulated transcription factor MN1 stimulates vitamin D receptor-mediated transcription and inhibits osteoblastic cell proliferation. *Mol. Endocrinol.* 2005; 19: 2234–2244.
108. Heuser M., Beutel G., Krauter J. i wsp. High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood* 2006; 108: 3898–3905.
109. Langer C., Marcucci G., Holland K.B. i wsp. Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 3198–3204.
110. Heuser M., Argiropoulos B., Kuchenbauer F. i wsp. MN1 overexpression induces acute myeloid leukemia in mice and predicts ATRA resistance in patients with AML. *Blood* 2007; 110: 1639–1647.
111. Tse W., Zhu W., Chen H.S., Cohen A. A novel gene, AF1q, fused to MLL in t(1;11) (q21;q23), is specifically expressed in leukemic and immature hematopoietic cells. *Blood* 1995; 85: 650–656.
112. Strunk C.J., Platzbecker U., Thiede C. i wsp. Elevated AF1q expression is a poor prognostic marker for adult acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics. *Am. J. Hematol.* 2009; 84: 308–309.
113. Morishita K., Parker D.S., Mucenski M.L. i wsp. Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell* 1988; 54: 831–840.
114. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S., Erpelinck C., van Putten W.L. i wsp. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 2003; 101: 837–845.
115. Lugthart S., Van Drunen E., Van Norden Y. i wsp. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood* 2008; 11: 4329–4337.
116. Groschel S., Lugthart S., Schlenk R.F. i wsp. High EVEN expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 2101–2107.