



Choroby rozrostowe krwi – analiza transkryptomu z zastosowaniem mikromacierzy DNA

Luiza Handschuh^{1,2}, Krzysztof Lewandowski¹, Maciej Kaźmierczak¹, Mieczysław Komarnicki¹, Marek Figlerowicz²

¹ Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań

² Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

Blood proliferative diseases – application of the DNA microarrays for transcriptome analysis

Summary

Hematopoiesis is a complex process precisely regulated by a wide spectrum of cooperating factors. Dysfunction of hematopoietic cell proliferation, differentiation or maturation usually leads to the malignant transformation. The DNA microarray-based transcriptome analysis helped to revise the traditional classification of hematological disorders, predict their outcome, test potential therapeutic agents and better understand basic mechanisms underlying cancer origin and development. Here, the results of gene expression profiling in myelo- and lymphoproliferative diseases such as leukemia, lymphoma and myelodysplastic syndromes, are presented. Two microarray technologies were applied in this area of research: Affymetrix gene chips and cDNA microarrays. Among them, Lymphochip is a prominent example of a specialized cDNA microarray tool designed to investigate gene expression in the immunological system and hematological diseases. It seems that typical problems connected with microarray results analysis – small number of patients, loss of reproducibility can be overcome by increasing the number of samples and application of identical protocols, equipment and reagents in different laboratories.

Key words:

proliferative diseases, leukemia, lymphoma, myelodysplastic syndromes, transcriptome, gene expression profiling, microarrays.

Adres do korespondencji

Luiza Handschuh,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
Centrum Doskonałości
CENAT,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań;
e-mail:
luizahan@ibch.poznan.pl

biotechnologia

3 (86) 22–43 2009

1. Wstęp

Różnicowanie się komórek hematopoetycznych jest złożonym, wieloetapowym procesem, precyzyjnie regulowanym przez szereg czynników współgrających ze sobą w czasie i przestrzeni (1). Zaburzenia przebiegu procesu hematopoezy prowadzą do rozwoju całego spektrum chorób nowotworowych układu krwiotwórczego, odmiennych biologicznie i klinicznie. Uważa się, że w przypadku tej grupy nowotworów głównym mechanizmem sprawczym są nabyte zmiany w strukturze genomu (translokacje chromosomalne, mutacje, delecje). Defekty wrodzone mają znaczenie marginalne (2).

Przez wiele lat diagnostyka chorób rozrostowych układu krwiotwórczego opierała się głównie na ocenie cytologicznej / histologicznej komórek krwi, szpiku, śledziony lub innych tkanek zajętych przez nowotwór. Obecnie dla określenia typu nowotworu i planowania terapii stosuje się szereg zaawansowanych technik laboratoryjnych. Wiadomo bowiem, że efektywność terapii zależy nie tylko od wybranej metody leczniczej, ale także od właściwości biologicznych samych komórek nowotworowych. Wyniki terapii u indywidualnych pacjentów mogą znacząco różnić się pomimo identycznego typu i podobnego stopnia zaawansowania choroby nowotworowej. Istnieją dowody potwierdzające możliwość występowania wielu molekularnych podtypów choroby o tym samym obrazie klinicznym i morfologicznym.

Poznanie struktury ludzkiego genomu oraz opracowanie technologii mikromacierzy stworzyło nowe możliwości w zakresie diagnostyki onkologicznej, w tym i hematologicznej (3-5). Zastosowanie macierzy w porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH, ang. *Comparative Genomic Hybridization*) nie tylko ułatwiło, ale i poprawiło rozdzielczość wykrywania dużych zmian w strukturze genomu – translokacji, insercji, delecji czy duplikacji chromosomów lub ich fragmentów (6). Jeszcze większą rozdzielczość oferują mikromacierze SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*, Handschuh i wsp. ten sam zeszyt, 7) i dachówkowe (8), pozwalające na detekcję takich zmian w genomie jak pojedyncze mutacje czy mikrodelecje. Przy użyciu mikromacierzy SNP stwierdzono m. in. utratę heterozygotyczności (LOH, ang. *Loss of Heterozygosity*) w genomach osób chorych na ostre i przewlekłe białaczki i zespoły mielodysplastyczne (9) oraz disomię jednorodzicielską w zespołach mieloproliferacyjnych (10). Mikromacierze SNP umożliwiły również wykrycie delecji i mutacji w genie ABL1 we wczesnym etapie przewlekłej białaczki limfocytowej (11,12).

Poznanie pełnej sekwencji genomu pacjenta nie wystarcza jednak do pełnego scharakteryzowania stanu czynnościowego jego tkanek. Odzwierciedleniem tego, co dzieje się w komórkach jest przede wszystkim obraz transkryptomu i proteomu. Do analizy każdego z nich służą odpowiednie narzędzia. Skład proteomu określa się najczęściej metodami elektroforezy dwukierunkowej i/lub spektrometrii mas. Transkryptom z kolei bada się za pomocą metody RT-PCR (ang. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) oraz mikromacierzy. Stosowane w tym celu mikromacierze DNA zawierają zazwyczaj zestaw sond komplementarnych do wszystkich sekwencji

kodujących białka, a znakowaniu poddaje się całkowity RNA lub mRNA wyizolowany z tkanki.

W opracowaniu tym przedstawiono wybrane przykłady wykorzystania mikromacierzy w badaniach chorób rozrostowych krwi. Uzyskiwane w ten sposób informacje umożliwiają lepsze poznanie podstaw procesów chorobotwórczych i dodatkowo służą do opracowania nowych metod diagnostycznych, pozwalających na indywidualny dobór terapii i ocenę jej efektów. Informacje płynące z analiz profilu ekspresji genów są szczególnie cenne w przypadkach, gdy kariotyp nie odbiega wcale lub tylko nieznacznie różni się od prawidłowego. Taka sytuacja ma miejsce w około 50% przypadków ostrej białaczki szpikowej (2,13,14). Wówczas metody cytogenetyczne, cechujące się i tak sporym odsetkiem błędów, są mało przydatne.

2. Lymphochip – uniwersalne narzędzie do badania ekspresji genów w komórkach układu immunologicznego i krwiotwórczego

Zdecydowana większość publikacji genomicznych poświęconych nowotworom krwi powstała na bazie komercyjnych mikromacierzy wysokiej gęstości produkowanych przez firmę Affymetrix. Są to tzw. chipy DNA, na których każdy gen reprezentowany jest przez serię krótkich sond oligonukleotydowych (www.affymetrix.com). Macierze te ewoluowały wraz z postępem projektu sekwencjonowania ludzkiego genomu. Alternatywne mikromacierze cDNA, nie wymagające znajomości pełnej sekwencji genomu, stopniowo tracą popularność, przynajmniej w odniesieniu do badań komórek ludzkich. Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat powstały jednak liczne prace, w których wykorzystano także ten rodzaj mikromacierzy do analizy ekspresji genów w komórkach układu krwiotwórczego i chorobach rozrostowych krwi (15-19). Klasycznym przykładem takiej macierzy jest Lymphochip (17). Publikacja, w której opisano jego konstrukcję pochodzi z końca lat 90. ubiegłego wieku, kiedy genom ludzki nie był jeszcze poznany, a na rynku zaczęły dopiero pojawiać się pierwsze mikromacierze Affymetrix. Alizadeh i wsp. (17) zaprojektowali i przetestowali macierz cDNA przeznaczoną do badania ekspresji genów związanych z funkcjonowaniem ludzkiego układu immunologicznego i transformacją nowotworową. Znalazło się na niej blisko 18 tys. sond, w tym ponad 14 tys. klonów cDNA pochodzących z bibliotek limfocytów B, zarówno zdrowych komórek jak i specyficznych dla różnych typów białaczek i chłoniaków. Pozostałe sondy reprezentowały geny, których udział w różnicowaniu komórek limfatycznych, aktywacji limfocytów B i T przez mitogeny i cytokiny, odpowiedzi immunologicznej i schorzeniach układu immunologicznego został już wcześniej potwierdzony (20). Na macierzy umieszczono także sondy specyficzne dla wybranych genów wirusowych (wirusa Epstein-Barr, HTLV, HIV i wirusa opryszczki) (17).

Stosując Lymphochip przeprowadzono eksperymenty mikromacierzowe na 96 próbkach mRNA wyizolowanych z oczyszczonych subpopulacji prawidłowych limfo-

cytów oraz linii komórkowych chłoniaków i białaczek (16). Wykorzystując algorytm grupowania hierarchicznego bez jakiegokolwiek wiedzy *a priori* (tzw. podejście nieukierunkowane) prawidłowo sklasyfikowano prawie wszystkie jednostki chorobowe, z których pochodziły próbki. Na podstawie analizy danych wykazano istotną zależność pomiędzy profilem ekspresji genów znajdujących się na chipie a typem schorzenia i/lub stanem fizjologicznym komórek. Grupowaniu poddano nie tylko próbki biologiczne, ale również same geny, otrzymując w ten sposób tzw. sygnatury genowe, czyli profile ekspresji genów charakteryzujące poszczególne procesy czy stany, w jakich znajdują się komórki. Wyodrębniono sygnaturę genową procesu proliferacji, sygnaturę genową limfocytów B znajdujących się w tzw. ośrodkach rozmnażania (ang. *Germinal Center B-Cells*) ulokowanych w grudkach limfatycznych, sygnaturę genową aktywowanych komórek B, komórek T czy węzłów chłonnych. Dla przykładu próbki pochodzące od chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową (CLL, ang. *Chronic Lymphocytic Leukemia*) i chłoniaka grudkowego (FL, ang. *Follicular Lymphoma*) zostały zgrupowane w pobliżu próbek z limfocytów B w stanie spoczynku (ang. *Resting B-Cell Samples*) ze względu na niski wskaźnik proliferacji komórek. Rozróżnienie pomiędzy przewlekłą białaczką limfocytową a chłoniakiem grudkowym było możliwe dzięki genom z sygnatury charakterystycznej dla limfocytów B obecnych w ośrodkach rozmnażania, które znajdują się w odmiennym stadium różnicowania niż pozostałe komórki tego typu. Z kolei próbki chłoniaka DLBCL (ang. *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*) były zdecydowanie różne od CLL i FL, wykazując profil ekspresji genów podobny do prawidłowych komórek węzłów chłonnych i migdałków. Wśród genów wyróżniających tę grupę dominowały te kodujące markery monocytów, makrofagów i komórek NK (ang. *Natural Killer*), a także geny decydujące o strukturze macierzy zewnątrzkomórkowej.

Po wykonaniu analizy na Lymphochipie dwóch próbek pobranych w odstępie 18 miesięcy od tego samego pacjenta, cierpiącego na przewlekłą białaczkę limfocytową, wykazano, że cechują się one najwyższym stopniem korelacji spośród wszystkich badanych próbek biologicznych. Znaczenie cech indywidualnych pacjenta maleje jednak wraz ze wzrostem liczby próbek w badanej grupie (16).

Lymphochip posłużył również do poszukiwania genów regulowanych przez jeden z głównych represorów transkrypcji, BCL-6 (18).

3. Białaczki

Mianem białaczki określa się chorobę nowotworową, w której dochodzi do nadmiernej proliferacji leukocytów we krwi i szpiku. Dzieje się tak na skutek zaburzeń procesów wzrostu, różnicowania, dojrzewania i apoptozy komórek. Ze względu na przebieg kliniczny wyodrębniono białaczki ostre i przewlekłe. Biorąc natomiast pod uwagę rodzaj komórek, które uległy transformacji nowotworowej wyróżniono białaczki szpikowe i limfocytowe, przy czym limfocytowe zalicza się do chłoniaków

(21). Każdy rodzaj białaczki dzieli się ponadto na szereg podtypów różniących się charakterystyką morfologiczną, rokowaniem i sposobem leczenia. Wielu z nich towarzyszą określone aberracje chromosomalne (13). W rutynowej diagnostyce wciąż obowiązują dwie klasyfikacje białaczek. Pierwsza, oparta na kryteriach morfologicznych i cytochemicznych, to tzw. klasyfikacja francusko-amerykańsko-brytyjska (FAB, ang. *French-American-British*) opracowana w latach 70-80. ubiegłego wieku (22,23). Druga, klasyfikacja WHO, ustanowiona w 2001 r. przez Światową Organizację Zdrowia (ang. *World Health Organization*), uwzględnia przede wszystkim linie i stadia rozwojowe komórek, które uległy transformacji nowotworowej oraz nieprawidłowości genetyczne najczęściej stwierdzane u chorych na białaczkę (21).

W tym samym roku, kiedy Alizadeh i wsp. opublikowali pracę o Lymphochipie (17) Golub i wsp. (24) wykazali, że macierze oligonukleotydom Affymetrix mogą służyć do klasyfikacji dwóch rodzajów ostrej białaczki – limfoblastycznej (ALL) i szpikowej (AML). Na podstawie przeprowadzonych analiz zidentyfikowali ponad tysiąc genów, ulegających zróżnicowanej ekspresji w obu chorobach. Następnie spośród tych genów wyodrębnili pięćdziesiąt o najwyższej „sile predykcji”. Tak opracowany klasyfikator praktycznie bezbłędnie kwalifikował każdą próbkę. W jego skład wchodziły geny kodujące białka powierzchniowe typowe dla komórek linii mieloidalnej i limfoidalnej, geny regulujące transkrypcję, cykl komórkowy, geny odpowiedzialne za modyfikacje chromatyny, adhezję komórek, a także znane onkogeny. Stwierdzili również, że translokacja i związana z nią podwyższona ekspresja genu homeotycznego HOXA9 stanowi wskaźnik przemawiający za niepomyślnym rokowaniem. Autorzy ci opracowali także klasyfikator rozróżniający dwa podtypy ostrej białaczki limfoblastycznej: T-ALL i B-ALL (24).

Podobne badania przeprowadzono z zastosowaniem mikromacierzy cDNA na grupie blisko 140 dzieci (25). Wykazano, że na podstawie profilu ekspresji genów można łatwo odróżnić komórki białaczkowe od zdrowych komórek hematopoetycznych oraz zidentyfikować geny różnicujące poszczególne odmiany cytogenetyczne białaczek. Stwierdzono, że wspólną cechą ostrych białaczek jest obniżona ekspresja genów odpowiedzialnych za adhezję komórek i odpowiedź immunologiczną. Poziom ekspresji genów, których produkty wiążą RNA, zaangażowanych w kontrolę transkrypcji i metabolizm kwasów nukleinowych był podwyższony w ostrej białaczce limfoblastycznej, w odróżnieniu od ostrej białaczki szpikowej, gdzie zwiększonej ekspresji ulegały przede wszystkim geny związane z metabolizmem węglowodorów i lipidów.

Prawdziwie globalne podejście do problemu diagnostyki białaczek zaprezentował w 2005 r. Haferlach i wsp. (26). Rekordową liczbę próbek od blisko 900 chorych na różne podtypy białaczek (ostre i przewlekłe) zbierano przez 6 lat i przeanalizowano korzystając z macierzy oligonukleotydowych Affymetrix. Stosując algorytmy uczenia maszyn wyselekcjonowano po 100 genów wyróżniających każdą z badanych chorób, uzyskując tzw. generalny klasyfikator o skuteczności 95%. Niektóre typy białaczek, takie jak ostra białaczka szpikowa z translokacją chromosomalną t(15;17),

ostra białaczka szpikowa z inwersją *inv(16)* i przewlekła białaczka limfocytowa, klasyfikowane były poprawnie w 98-100% przypadków. Autorzy przekonują, że analiza mikromacierzowa może być dobrym narzędziem diagnostycznym, a ewentualne błędy fałszywie pozytywne można wykluczyć stosując klasyczne metody diagnostyczne (26).

Kompleksowa analiza ekspresji genów pozwala nie tylko odróżnić od siebie znane podtypy choroby, ale także zidentyfikować nowe. Uwidacznia też, że dysfunkcja jednego genu, zwłaszcza gdy jest to regulator transkrypcji, nieodzwrotnie pociąga za sobą zmiany ekspresji szeregu innych genów. Przykładem może być ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) z translokacją genu *MLL* (ang. *Mixed-Lineage Leukemia*). Gen ten koduje histonową transferazę metylową, pozytywny regulator ekspresji genów homeotycznych, współodpowiedzialny również za prawidłowy przebieg hematopozy. Profil ekspresji genów w tej grupie chorych tak bardzo wyróżniał się na tle pozostałych, że zaproponowano, by traktować ją jako odrębną jednostkę chorobową o nazwie *MLL* (27). Zwiększonej ekspresji w *MLL* ulegał przede wszystkim gen kodujący kinazę tyrozynową *FLT3* oraz geny homeotyczne będące wskaźnikami niekorzystnego rokowania. Z kolei obniżona ekspresja markerów wczesnego stadium limfocytów B i genów wymaganych dla dalszego ich rozwoju może świadczyć o tym, że białaczka typu *MLL* powstaje na skutek blokady różnicowania komórek linii limfoidalnej we wcześniejszej fazie niż ma to miejsce w przypadku klasycznej ALL. Ekspresja genów typowych dla innych niż limfocyty komórek hematopoetycznych, zwłaszcza komórek linii mieloidalnej jest bezpośrednim dowodem na istnienie cech wspólnych pomiędzy *MLL* a *AML*. Z analizy profilu ekspresji genów wyraźnie wynika, że *MLL* jest jednostką pośrednią pomiędzy ALL i *AML* (27).

Sygnaturę ekspresji genów wspólną dla pacjentów z chimerycznym genem *MLL* opisała także Ross i wsp. (28). Analizując próbki pochodzące od blisko trzystu dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną wyodrębniła dwa podtypy choroby z rearanżacją genu *MLL* (*MLL-Re-ALL*), identyczne pod względem klinicznym, lecz różniące się rokowaniem (3).

3.1. Ostra białaczka limfoblastyczna

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL, ang. *Acute Lymphoblastic Leukemia*) stanowi najpowszechniej występujący nowotwór u dzieci. Pomimo generalnie dobrego rokowania istnieją odmiany ALL wyraźnie różniące się odpowiedzią na chemioterapię. Ze względu na pochodzenie komórek nowotworowych wyróżnia się dwa główne podtypy ostrej białaczki limfoblastycznej: T-ALL (wywodzące się z linii limfocytów T) i B-ALL (wywodzące się z linii limfocytów B). B-ALL dzieli się ponadto na pięć dodatkowych podtypów: 1) z rearanżacją genu *MLL*; 2) z translokacją *t(1;19)(E2A-PBX1)*; 3) hiperdiploidalny – z ponad 50 chromosomami; 4) *t(9;22)(BCR-ABL)*; 5) *t(12;21)(TEL-AML1)*. Na podstawie badań mikromacierzowych przeprowadzonych na dużej grupie pacjentów

(ponad 300 osób) można było wyodrębnić kolejny, nie znany wcześniej podtyp B-ALL (29,30). Opisano także sygnaturę ekspresji genów charakterystyczną dla pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną podtypu TEL-AML1, u których w trakcie rutynowo stosowanej terapii dochodziło do rozwoju ostrej białaczki szpikowej (31).

W wielu pracach mikromacierzowych poświęconych ostrej białaczce limfoblastycznej porusza się kwestię uniwersalności sygnatur genowych. Ross i wsp. (30) wykazali, że opracowany przez nich klasyfikator, wyznaczony na podstawie wyników uzyskanych z próbek pobranych od dzieci, równie dobrze sprawdza się w diagnostyce ALL u osób dorosłych, pomimo wielu różnic cechujących rozwój i przebieg tej choroby w zależności od wieku. Zdarza się jednak, że opracowane klasyfikatory w odniesieniu do innej grupy pacjentów są mało skuteczne, a różnice pogłębiają się jeszcze, kiedy porównuje się wyniki uzyskane przez różne laboratoria. Dla przykładu Catchpoole i wsp. (32) podjęli próbę klasyfikacji dziecięcych ALL na podstawie sygnatury ekspresji dwudziestu genów wyznaczonej wcześniej przez Moos i wsp. (33) na podobnej grupie dzieci. Okazało się, że jedynie trzy spośród dwudziestu genów wytypowanych przez Moos i wsp. niezawodnie rozdzielały B-ALL od T-ALL w grupie pacjentów badanych przez Catchpoole – antygen CD3D, klasyczny marker złośliwych komórek T, oraz dwa geny zgodności tkankowej MHC (ang. *Major Histocompatibility Complex*) (32). Endogлина, jeden z genów w sygnaturze opisanej przez Moos znalazł się w sporządzonym przez Catchpoole rankingu genów różnicujących B-ALL od T-ALL dopiero na 238 miejscu. Okazał się jednak świetnym markerem odpowiedzi na terapię.

Przyczyn niezgodności wyników publikowanych przez różnych autorów może być wiele: stosowanie odmiennych platform mikromacierzowych, różnych procedur izolacji, znakowania i hybrydyzacji próbek RNA oraz metod analizy wyników, a także zbyt mała liczebność przebadanych grup pacjentów. Jednym ze sposobów uporania się z tym ostatnim problemem jest tzw. metaanaliza, czyli poddanie wspólnej analizie wyników uzyskanych przez różne laboratoria, zdeponowanych w ogólnodostępnych bazach danych. Hoffmann i wsp. (34) przeanalizowali ponownie opublikowane dane własne (35) oraz Ross i wsp. (30). Pochodziły one łącznie ze 104 eksperymentów mikromacierzowych, przeprowadzonych na próbach pobranych od pacjentów reprezentujących sześć podtypów ostrej białaczki limfoblastycznej. W efekcie uzyskano klasyfikator złożony z zaledwie 30 sond, pozwalający na rozróżnienie wymienionych sześciu podtypów ALL ze skutecznością rzędu 98%. 30 wyselekcjonowanych sond odpowiadało 26 genom, spośród których 70% nigdy przedtem nie zostało opisanych jako istotne dla identyfikacji podtypów ALL.

Znaczna liczba prac poświęconych białaczkom i wykonanych przy zastosowaniu mikromacierzy powstała jeszcze przed opublikowaniem kompletnej sekwencji genomu ludzkiego, kiedy korzystano z niepełnych, prototypowych macierzy. Ciekawe rozwiązanie tego problemu zaproponowali Ross i wsp. (30), którzy dysponując materiałem klinicznym zebrany od trzystu pacjentów wybrali ponad sto najbardziej reprezentatywnych próbek i poddali je ponownej analizie z użyciem chipów wyż-

szej generacji, zawierających trzykrotnie większą liczbę sond. Wykorzystano do tego celu zamrożone w -80°C roztwory hybrydyzacyjne z poprzednich eksperymentów. Dzięki temu wyłoniono cały szereg nowych markerów genetycznych, w tym kodujących białka o nieznannej funkcji.

3.2. Ostra białaczka szpikowa

Ostra białaczka szpikowa (AML, ang. *Acute Myeloid Leukemia*) jest chorobą heterogenną, powstającą w wyniku transformacji nowotworowej progenitorowych komórek hematopoetycznych, zazwyczaj linii granulocytarnej i monocytarnej. Jedną z przyczyn rozwoju ostrej białaczki szpikowej są nabyte zmiany genetyczne, stąd też ryzyko zachorowania rośnie wraz z wiekiem (2,13,36). Blok różnicowania i dojrzewania może wystąpić na różnych etapach hematopoezy, dlatego istnieje wiele podtypów tej choroby. W klasyfikacji FAB wyróżnia się 9 podtypów AML o odmiennym przebiegu i rokowaniu (22). Niektóre z nich związane są z obecnością specyficznych rearanżacji chromosomalnych (translokacji i/lub inwersji), jednakże w co najmniej 40-50% przypadków AML kariotyp pacjenta jest prawidłowy (tzw. AML-CN, ang. *Normal Cytogenetics*), co ogranicza przydatność badań cytogenetycznych (2-4,14). W grupie AML-CN wyodrębniono niedawno podtypy molekularne związane z pojedynczymi mutacjami w takich genach jak FLT3, CEBPA czy NMP1 (2). Klasyfikacja pacjentów oparta na danych uzyskiwanych w eksperymentach mikromacierzowych w dużej mierze pokrywa się z podziałem FAB (19,28,37-39). Pozwoliła ona również wyłonić i scharakteryzować nowe podtypy molekularne ostrej białaczki szpikowej (19,39,40).

Sygnatury ekspresji genów charakterystyczne dla podtypów cytogenetycznych FAB opisali m. in. Schoch i wsp. (37). Na podstawie analizy 37 próbek AML na mikromacierzach Affymetrix wyłoniono uniwersalny zestaw 36 genów służący do klasyfikacji podtypów ostrej białaczki szpikowej. W zestawie tym znalazły się m.in. geny MYH11 i ETO. Ich zwiększoną ekspresję odpowiednio w podtypie z $\text{inv}(16)$ i $\text{t}(8;21)$ opisano już wcześniej (41,42)

Również za pomocą chipów Affymetrix Virtaneva i wsp. (43) porównali profile ekspresji genów w dwóch cytogenetycznych odmianach ostrej białaczki szpikowej – z trisomią chromosomu ósmego, tzw. $\text{AML}(+8)$, oraz z kariotypem prawidłowym. Uzyskane wyniki pozwalały bezbłędnie oddzielić próbki zdrowe od białaczkowych, zidentyfikowano również geny unikatowe dla każdej z badanych odmian ostrej białaczki. Część genów różnicujących $\text{AML}(+8)$ od AML-CN i zdrowych komórek CD34^+ to geny ułożone na chromosomie ósmym. Generalnie w obu typach białaczki geny kodujące białka wiążące RNA wykazywały niską ekspresję, wyższą natomiast cechowały się geny zaangażowane w proces adhezji komórek. Geny związane z apoptozą były silnie obniżone w próbkach $\text{AML}(+8)$, co pozwoliło wyjaśnić dlaczego leczenie pacjentów z trisomią chromosomu ósmego cytarabiną (związkiem indukującym apoptozę) nie daje pożądanego efektów.

Ross i wsp. (28) na podstawie wyników mikromacierzowych ze 150 eksperymentów wyróżnili pięć podgrup AML odpowiadających w większości podtypom cytogenetycznym: t(8;21), inv(16), t(15;17), grupie z chimerycznym genem MLL oraz podtypowi M7 wg FAB z translokacją t(1;22). W przypadku ostatniego profil ekspresji genów nie był dotąd znany.

Bullinger i wsp. (19) wykazali istnienie co najmniej siedmiu odmiennych sygnatur ekspresji genów w ostrej białaczce szpikowej, jednakże tylko częściowo wspólnych z podtypami cytogenetycznymi FAB, np. t(8;21) czy inv(16). Stosując macierze cDNA przeprowadzili oni analizę ponad stu próbek krwi lub szpiku pochodzących od pacjentów z typowymi dla ostrej białaczki szpikowej aberracjami chromosomalnymi. Pacjentów z prawidłowym kariotypem udało się podzielić na dwie odmienne rokowniczo grupy. Z korzystnym rokowaniem powiązano m.in. gen FOXO1A, regulator apoptozy i cyklu komórkowego, a z negatywnym wysoką ekspresję m.in. genów homeotycznych oraz FLT3.

Podobne wyniki uzyskali Valk i wsp. (39) na podstawie analizy profilu ekspresji genów u blisko trzystu pacjentów, z wykorzystaniem chipów Affymetrix. Valk i wsp. zidentyfikowali metodą grupowania hierarchicznego aż szesnaście podgrup ostrej białaczki szpikowej i tylko część z nich odpowiadała klasyfikacji cytogenetycznej. Na przykład wszystkie próbki z inv(16) znalazły się w jednej grupie, w której głównym genem różnicującym był MYH11. Podobnie wszystkie próbki z translokacją t(8;21) skupione zostały w jednej grupie. W tym przypadku najbardziej różnicującym genem był ETO. Jednakże pacjenci, u których wykryto mutacje w genie CEBPA zostali zaliczeni do dwóch różnych grup, a pacjenci z duplikacją w genie FLT3 (FLT3-ITD, ang. *Internal Tandem Duplication*) zostali rozdzieleni aż do trzech grup. Chorzy z prawidłowym kariotypem również zostali zaklasyfikowani do różnych podgrup. Aż cztery grupy o unikatowych profilach ekspresji genów nie odpowiadały żadnemu ze znanych podtypów AML. Wyodrębnionym grupom przypisano także znaczenie rokownicze (39). Ci sami autorzy wykazali później, że wśród genów różnicujących podtypy ostrej białaczki szpikowej nieprzypadkowo znajduje się wiele tzw. genów VIS (ang. *Virus Integration Site Genes*), zlokalizowanych w potencjalnych miejscach integracji retrowirusów, których udział w mutagenezie prowadzącej do rozwoju nowotworów, w tym białaczek, udowodniono wcześniej na modelach mysich (44).

Wilson i wsp. (40) poddali analizie na macierzach Affymetrix 170 dorosłych pacjentów (średnia wieku 65 lat) z ostrą białaczką szpikową (siedem podtypów FAB: M0, M1, M2, M4, M5, M6 i M7). Stosując podejście nieukierunkowane w procesie grupowania hierarchicznego uzyskali wyraźny podział na sześć klas różniących się opornością na terapię (RD, ang. *Resistant Disease*), odsetkiem uzyskiwanych remisji całkowitych (CR, ang. *Complete Remission*) i długością czasu przeżycia wolnego od choroby (DFS, ang. *Disease-Free Survival*). Podział ten był niezależny od wieku, płci i momentu pobrania próbki (białaczka *de novo* kontra wznowa), natomiast w sposób znaczący korelował ze stopniem dojrzałości i mieloidalnym lub monocytarnym po-

chodzeniem komórek, a częściowo również z podtypami FAB. Jedną z wyznaczonych klas składała się prawie wyłącznie z podtypów M4 i M5, w innej dominował podtyp M2, ale pozostałe cztery klasy stanowiły mozaikę wielu podtypów, w tym M0 i M1, o tzw. normalnym kariotypie.

Pacjenci z ostrą białaczką szpikową i prawidłowym kariotypem stanowią obiekt szczególnego zainteresowania badaczy, ponieważ jest to grupa niejednorodna i często trudna do leczenia. Ma to związek m. in. z obecnością mutacji w takich genach jak MLL, CEBPA czy FLT3 (14). Za pomocą mikromacierzy określono sygnatury ekspresji genów towarzyszące mutacjom w genach MLL i CEBPA (14,27,28). Niedawne odkrycie stosunkowo częściej u pacjentów z prawidłowym kariotypem mutacji w genie kodującym nukleofozminę (NPM) sprawiło, że podjęto prace zmierzające do określenia profilu ekspresji genów typowych dla chorych na ostrą białaczkę szpikową nosicieli tej mutacji. Nukleofozmina to białko odpowiedzialne m. in. za biogenezę rybosomów, regulację transkrypcji, supresję nowotworów i odpowiedź na stres (2). Alcalay i wsp. (45) wykazali, że istnieje ścisła zależność pomiędzy obecnością mutacji w genie NPM a poziomem ekspresji ponad trzystu genów, w tym wielu genów homeotycznych. Interesujące jest, że nie zaobserwowano zmian w ilości mRNA kodującego nukleofozminę. Przyczyną zaburzeń funkcji białka powstającego na matrycy zmutowanego genu jest nieprawidłowa lokalizacja wewnątrzkomórkowa (w cytoplazmie zamiast w jąderku, NPMc+) (46). Wyniki mikromacierzowe sugerują, że ostra białaczka szpikowa z mutacją NPMc+ stanowi odrębną podjednostkę chorobową (40,46). Stwierdzono też, że obecność mutacji w genie nukleofozminy, przy jednoczesnym braku wewnętrznej tandemowej duplikacji w genie FLT3, jest pozytywnym wskaźnikiem rokowniczym (46,47). FLT3 koduje receptorową kinazę tyrozynową, wielofunkcyjne białko niezbędne dla prawidłowego przebiegu hematopoezy, biorące udział w procesach proliferacji, różnicowania i apoptozy komórek hematopoetycznych (2). Dla chorych z mutacjami w genie FLT3 nie udało się dotąd wyznaczyć unikatowej sygnatury genowej (13,14,40,45), mimo że zarówno mutacje jak i wewnętrzna tandemowa duplikacja (FLT3-ITD) w sekwencji tego genu należą do najczęściej spotykanych zaburzeń w genomach osób chorych na AML (48-50). Zmiany te prowadzą zazwyczaj do wysokiej konstytutywnej ekspresji kinazy FLT3, z czym wiąże się niekorzystne rokowanie (2,13).

Odpowiedź na terapię jest niezwykle ważnym aspektem badań genomicznych chorób nowotworowych. Badania wpływu induktorów różnicowania – ATRA (ang. *All-Trans Retinoic Acid*) i witaminy D3 stosowanych w leczeniu białaczek, prowadzone na liniach komórkowych oraz hodowlach komórek pobranych od pacjentów, pozwoliły na selekcję 111 genów związanych z wrażliwością bądź opornością na terapię (51). Mikromacierze okazały się pomocne także w identyfikacji genów, których ekspresja zmienia się u osób z translokacją w genie receptora kwasu retinowego (podtyp AML M3). Z badań tych wynika, że rodzaj białka fuzyjnego, jakie powstaje w wyniku translokacji, determinuje wrażliwość bądź oporność na retinoidy, podstawowe chemioterapeutyki stosowane w leczeniu ostrych białaczek.

Odmienny przebieg kliniczny cechuje chorych z białaczką powstałą w wyniku transformacji zespołu mielodysplastycznego (MDS) oraz chorych z białaczką wtórną po przebytej terapii przeciwnowotworowej (TRL, ang. *Therapy-Related Acute Leukemia*). Rokowanie w tych przypadkach, w odróżnieniu od ostrej białaczki szpikowej *de novo*, jest złe (52). Mikromacierzowe badania porównawcze pozwoliły skonstruować klasyfikator genowy rozróżniający AML *de novo* bez symptomów dysplazji, AML z dysplazją (AML-MDL, ang. *AML with Multilineage Dysplasia*) i AML na bazie zespołu mielodysplastycznego (MDS-AML) (4,52). Przy okazji stwierdzono, że korzystne w rokowaniu zmiany kariotypowe, t(8;21) i inv(16), towarzyszyły wyłącznie przypadkom ostrej białaczki szpikowej bez dysplazji.

Napawa optymizmem fakt, że wyniki badań mikromacierzowych dotyczących ostrej białaczki szpikowej, publikowane przez różnych autorów i uzyskane na podstawie różnych grup wiekowych pacjentów, wykazują wiele cech wspólnych. Szczególnie wyraźnie widać to w odniesieniu do zdefiniowanych cytogenetycznych podtypów tej choroby, wspomnianych już t(8;21) i inv(16). Ponadto wyniki analizy na chipach Affymetrix stu próbek pochodzących od dzieci z ostrą białaczką szpikową pozwoliły na identyfikację pięciu klasyfikatorów sprawdzających się równie dobrze w odniesieniu do dorosłych pacjentów (28). Nie jest to jednak regułą – Yagi i wsp. (38) na podstawie wyników analiz profilu ekspresji genów w ostrej białaczce szpikowej u dzieci wyselekcjonowali zestaw 35 genów informujących o rokowaniu, w większości nie pokrywający się z opisanymi sygnaturami wyznaczonymi dla dorosłych.

3.3. Zespoły mielodysplastyczne

Pod nazwą zespołu mielodysplastycznego (MDS, ang. *Myelodysplastic Syndrome*) kryje się heterogenna grupa chorób układu krwiotwórczego, o odmiennym przebiegu klinicznym i rokowaniu, najczęściej rozwijających się u osób dorosłych (53-55). MDS charakteryzuje się nieefektywną hematopoezą z obecnością cytopenii we krwi obwodowej i zmianami morfologicznymi komórek szpiku. W większości przypadków MDS dochodzi do transformacji w kierunku ostrej białaczki w ciągu kilku-kilkunastu miesięcy (53,56). Jedną z pierwszych prac poświęconą zmianom ekspresji genów towarzyszącym zespołom mielodysplastycznym powstała na bazie niewielkiej grupy osób (57). Przy zastosowaniu macierzy Affymetrix zidentyfikowano ponad 160 genów o silnie obniżonym poziomie ekspresji w komórkach CD34⁺ w przypadku MDS niskiego ryzyka (ocena wg IPSS, ang. *International Prognostic Scoring System*, 58). Jedną piątą stanowiły geny zaangażowane w procesy wzrostu komórek i przekazywanie sygnałów. Pięciokrotnie podwyższoną ekspresję zaobserwowano m. in. dla genów regulujących przebieg hematopoezy. Z kolei MDS wysokiego ryzyka można było odróżnić od MDS niskiego ryzyka na podstawie poziomu ekspresji 49 genów, głównie regulatorów procesów proliferacji i różnicowania komórek hematopoetycznych. Ostatecznie wyselekcjonowano uniwersalny zestaw, złożony

z zaledwie jedenastu genów, umożliwiającą rozróżnienie pomiędzy dwoma wymienionymi odmianami MDS i zdrowymi komórkami szpiku.

Na podstawie analizy 21 próbek od pacjentów z MDS na macierzach cDNA wykazano m.in. podwyższoną ekspresję genów promujących proliferację komórek, a obniżoną ekspresję genów antyapoptotycznych (59).

Znaczące zmiany w profilu ekspresji genów w komórkach podścieliska szpiku zaobserwowano także u dzieci z objawami MDS oraz z ostrą białaczką szpikową powstałą na bazie MDS (MDS-AML) (55). Przy użyciu macierzy cDNA wykazano, że zespoły mielodysplastyczne u dzieci charakteryzują się przede wszystkim obniżoną ekspresją genów związanych z przekazywaniem sygnałów, funkcjonowaniem cytoszkieletu i macierzy zewnątrzkomórkowej oraz transportem. Zestaw genów biorących udział w procesie endocytozy i sekrecji białek wykorzystano do rozróżnienia MDS od MDS-AML. Obecność w tym zestawie genów odpowiedzialnych za transport leków i zjawisko oporności wielolekowej wyjaśnia problem niskiej skuteczności stosowanej dotychczas terapii zespołu mielodysplastycznego.

Zespołom mielodysplastycznym często towarzyszy aneuploidia i inne nieprawidłowości cytogenetyczne. W jednej z prac porównano profile ekspresji genów w komórkach CD34⁺ pobranych od pacjentów z dwoma najczęstszymi w MDS aneuploidiami: monosomią chromosomu 7 oraz trisomią chromosomu 8 (54). Zidentyfikowano wiele genów, których poziom ekspresji był zmieniony w porównaniu ze zdrową kontrolą. W przypadku trisomii chromosomu 8 zaobserwowano podwyższoną ekspresję przede wszystkim genów uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej, a obniżoną – inhibitorów apoptozy. Monosomii chromosomu 7 towarzyszyła z kolei podwyższona ekspresja genów odpowiedzialnych za transformację nowotworową i apoptozę. Supresji podlegały geny kontrolujące wzrost i różnicowanie komórek. Wyniki mikromacierzowe potwierdzono metodami PCR w czasie rzeczywistym i cytometrii przepływowej. Na podstawie odmiennych profili ekspresji genów w wymienionych typach MDS sugeruje się, że w patogenezę MDS u tych grup pacjentów zaangażowane są odrębne mechanizmy.

3.4. Przewlekła białaczka szpikowa

U ponad 95% chorych z przewlekłą białaczką szpikową (CML, ang. *Chronic Myeloid Leukemia*) stwierdza się przemieszczenie fragmentu genu ABL z chromosomu 9 do locus genu BCR na chromosomie 22 (translokacja t(9;22), tzw. chromosom Ph). Obecność tej rearanzacji, wykrywana również w niektórych przypadkach ostrej białaczki limfoblastycznej, prowadzi do translacji białek fuzyjnych (BCR-ABL) o różnej wielkości, wykazujących konstytutywną aktywność kinazy tyrozynowej (3,60,61). W efekcie obserwuje się szereg zaburzeń funkcjonowania szlaków przekazywania sygnałów, m.in. indukcję aktywatorów transkrypcji takich jak c-Myb, c-Myc i c-Jun, co prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek macierzystych Ph(+).

Na podstawie analizy CML z użyciem mikromacierzy cDNA wykazano ponad czterokrotne różnice w poziomie ekspresji blisko trzystu genów w porównaniu ze zdrowymi komórkami (60). Wśród genów różnicujących zidentyfikowano przede wszystkim geny związane z przekazywaniem sygnałów za pośrednictwem kinazy BCR/ABL, ale także z regulacją cyklu komórkowego, apoptozą, różnicowaniem, adhezją komórek do podścieliska szpiku, modyfikacją struktury chromatyny, naprawą DNA i transformacją nowotworową. Kierunek zmian ekspresji niektórych genów był jednak sprzeczny z oczekiwaniami. Na przykład w grupie genów związanych z apoptozą zaledwie dziesięć wykazywało zmianę ekspresji w przypadku CML, przy czym dwa geny o aktywności proapoptotycznej były podwyższone, a wśród genów antyapoptotycznych cztery były obniżone i cztery podwyższone. Tego typu rozbieżności często sprawiają trudności w interpretacji biologicznej wyników uzyskanych metodami genomicznymi.

Na podstawie analizy transkryptomu chorych na CML stwierdzono, że konsekwencją rozwoju tej choroby jest generalnie obniżona odporność, zaobserwowano bowiem supresję wielu genów odpowiedzi na atak patogenów (60). Wyłoniono także sygnatury ekspresji genów odpowiadające dwóm stadiom CML – fazie przewlekłej (CML-CP, ang. *Chronic Phase*) oraz tzw. przełomowi blastycznemu (CML-BC, ang. *Blast Crisis*), o obrazie klinicznym przypominającym ostre białaczki. Ponadto wykazano rozbieżności w poziomie ekspresji blisko pięciuset genów pomiędzy komórkami krwi obwodowej i szpiku kostnego pochodzącymi od tych samych pacjentów – komórki krwi prezentowały bardziej „agresywny” fenotyp niż ich odpowiedniki ze szpiku. Część spośród wyłonionych genów różnicujących odpowiada za chemotaksję, oddziaływania międzykomórkowe i z macierzą zewnątrzkomórkową, a także odporność na stres. Z kolei podwyższona ekspresja genów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA w przypadku CML najprawdopodobniej jest przyczyną oporności lekowej (60).

Jednym z leków stosowanych w leczeniu CML jest imatinib, inhibitor kinaz tyrozynowych, w tym wadliwego białka fuzyjnego BCR-ABL (62,63). Jego stosowanie prowadzi do zahamowania wzrostu i różnicowania nieprawidłowych komórek Ph(+) i w efekcie zaniku charakterystycznych dla CML metafaz Ph(+) w badaniu cytogenetycznym. Jest to tzw. całkowita odpowiedź cytogenetyczna (CCR, ang. *Complete Cytogenetic Response*), którą obserwuje się u około 80% pacjentów ze świeżo zdiagnozowaną chorobą w fazie przewlekłej (64). W celu poznania mechanizmów oporności na imatinib przeprowadzono analizy ekspresji genów na macierzach oligonukleotydowych Affymetrix (64). Materiał biologiczny pobrano bezpośrednio przed leczeniem, a następnie po dziewięciu miesiącach od osób, u których uzyskano remisję, a po roku od tych, u których leczenie nie odniosło skutku. Okazało się, że różnice w ekspresji genów u pacjentów odmiennie reagujących na imatinib są niezwykle subtelne. Zidentyfikowano zaledwie piętnaście genów różnicujących, opartych na tzw. uczącym zestawie próbek, jednakże nie udało się go potwierdzić w odniesieniu do niezależnego zestawu testowego. Inne metody analizy prowadziły

raczej do segregacji próbek ze względu na pochodzenie (materiał gromadzono w dwóch różnych klinikach) niż w związku z odpowiedzią na terapię. Zaobserwowano też różnice pomiędzy metodami przygotowania próbek oraz między komórkami wyizolowanymi z krwi obwodowej i ze szpiku (64). W dwóch wcześniejszych opracowaniach określono wprawdzie sygnatury ekspresji genów charakteryzujące pacjentów odmiennie reagujących na terapię CML (65,66), jednakże wyniki te nie pokrywały się ze sobą ani też z wynikami opisanymi przez Crossman i wsp. (64). Najprawdopodobniej przyczyną tych rozbieżności były zbyt małe grupy pacjentów.

Sukcesem natomiast zakończyła się analiza 32 próbek, pobranych przed i po podaniu leku od chorych na CML (62). Przeprowadzono ją na macierzach cDNA zawierających 6,5 tys. sond specyficznych dla genów związanych z nowotworzeniem. Wyłoniono zestaw 46 genów o zróżnicowanym poziomie ekspresji u osób odmiennie reagujących na terapię. Znalazły się w nim geny związane z adhezją komórek, metabolizmem leków, geny kodujące kinazy tyrozynowe i fosfatazy. Spośród 46 genów wybrano 6, na podstawie których można przewidzieć prawdopodobieństwo uzyskania odpowiedzi cytogenetycznej u chorych na CML ze skutecznością 80% (62).

Badania na podobnej grupie pacjentów (34 osoby), lecz z zastosowaniem chipów Affymetrix, zaowocowały opracowaniem liczniejszej sygnatury genowej odpowiedzi na imatinib (63). Wśród blisko 130 genów tworzących sygnaturę u pacjentów opornych na terapię zidentyfikowano przede wszystkim geny związane z apoptozą, naprawą DNA i ochroną przed stresem oksydacyjnym.

4. Chłoniaki

Chłoniaki powstają poprzez rozrost komórek limfoidalnych, początkowo w obrębie węzłów chłonnych, a w późniejszej fazie w innych narządach – wątrobie, śledzionie, płucach, szpiku kostnym. Chłoniaki złośliwe dzieli się na dwie duże grupy: chłoniaki ziarnicze reprezentowane głównie przez ziarnicę złośliwą (chłoniak Hodgkina) i chłoniaki niezziarnicze (ang. *non-Hodgkin lymphomas*). Wśród chłoniaków niezziarniczych zdecydowana większość to chłoniaki B-komórkowe, do których należą m. in. chłoniak grudkowy, chłoniak z komórek płaszczka, chłoniak rozlany olbrzymiokomórkowy, szpiczak mnogi, a także przewlekła białaczka limfocytowa (21,67).

4.1. Ziarnica złośliwa

Ziarnica złośliwa (choroba Hodgkina, ang. *Hodgkin's lymphoma*) to nowotwór o wyjątkowo korzystnym rokowaniu. Może dlatego prac mikromacierzowych, w których opisuje się ten rodzaj chłoniaka jest stosunkowo niewiele, a większość z nich powstała na podstawie macierzy tkankowych. Obecnie ponad 90% chorych

udaje się wyleczyć stosując chemio- i/lub radioterapię (68). Ze względu na niewielki odsetek niepowodzeń przedmiotem badań genomicznych w tej dziedzinie jest głównie poszukiwanie przyczyn oporności na terapię i testowanie nowych cytostatyków (68-71). W liniach komórkowych wywodzących się z ziarnicy złośliwej zaobserwowano zaburzenia w ekspresji genów regulujących apoptozę i cykl komórkowy, m. in. wysoki poziom ekspresji cykliny D2 (69,70). Komórki podatne na leczenie cechowały się ekspresją genów kodujących markery komórek B, interleukinę IL26 oraz obniżoną ekspresją genu cFLIP, inhibitora kaspazy 8 (70,71). W liniach opornych na leki cytotoksyczne zidentyfikowano wysoką ekspresję genów receptorów cytokin (IL5RA, IL13RA1), antygenów powierzchniowych (CD40, CD80), białek odpowiedzialnych za lekooporność i antygeny nowotworowego PRAME (68). Wykazano, że klasyczny chłoniak Hodgkina różni się pod względem ekspresji genów od chłoniaka typu TCRBCL (ang. *T-Cell Rich B-Cell Lymphoma*) (71). Podjęto także próby określenia poziomu ekspresji genów w wyizolowanych z tego chłoniaka komórkach Reed-Sternberga (72,73). W jednej z prac wykazano, że tę subpopulację komórek charakteryzuje odrębny profil ekspresji genów, głównie z grupy czynników transkrypcyjnych (73), w innej stwierdzono podobieństwo do profilu ekspresji genów w ośrodkach rozmnażania komórek B z zaburzoną zdolnością do apoptozy (72). Podejrzewa się, że podobnie jak w komórkach B, z których wywodzi się chłoniak Hodgkina, zahamowanie apoptozy następuje w wyniku upośledzenia procesu przekazywania sygnałów przez CD40 i aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB (69,72).

4.2. Przewlekła białaczka limfocytowa

Przewlekła białaczka limfocytowa (CLL, ang. *Chronic Lymphocytic Leukemia*), charakteryzująca się ekspansją monoklonalnych limfocytów B, jest najczęstszą białaczką wśród mieszkańców zachodniej półkuli. Chorobie tej często towarzyszą mutacje somatyczne w regionach zmiennych genów kodujących immunoglobuliny (IgV) (74,75). W wyniku przeprowadzonych badań mikromacierzowych dowiedziono, że w przypadku tej białaczki istotne zmiany w poziomie ekspresji dotyczą niewielkiej liczby genów.

Na podstawie analizy porównawczej komórek nowotworowych typowych dla CLL i szpiczaka plazmocytozowego (MM) na macierzach oligonukleotydowych Affymetrix wykazano, że te dwie klasy nowotworowo zmienionych dojrzałych limfocytów B mają odrębne profile ekspresji genów (76). Zidentyfikowano 25 genów różnicujących CLL od MM, w tym m. in. geny związane z apoptozą i geny kodujące białka receptorowe. Informacja na temat poziomu ekspresji zaledwie dziesięciu genów okazała się wystarczająca do odróżnienia komórek nowotworowych od zdrowych limfocytów i innych komórek szpiku. Stwierdzono również, że obecność w błonie komórkowej antygeny powierzchniowego CD38 wiąże się z gorszym rokowaniem, zarówno w przypadku CLL jak i szpiczaka.

W dwóch niezależnych badaniach mikromacierzowych próbowano odróżnić od siebie dwie podgrupy CLL: M-CLL (z mutacją) i UM-CLL (bez mutacji). Zadanie okazało się trudne – początkowo możliwe było jedynie odróżnienie komórek CLL od prawidłowej populacji limfocytów i innych nowotworowych komórek linii limfoidalnej (3). Dopiero drastyczne ograniczenie liczby potencjalnych genów różnicujących do trzech pozwoliło na skuteczną w 100% separację podgrup M-CLL i UM-CLL. Najlepszym markerem okazał się gen ZAP-70, którego poziom ekspresji nie tylko pozwalał na odróżnienie zmutowanych komórek B od niezmutowanych, ale także – w sposób całkowicie niezależny – na przewidywanie dalszego przebiegu choroby (3,74). Wykazano ponadto, że ekspresję genu ZAP-70 można z powodzeniem badać bezpośrednio we krwi obwodowej, bez potrzeby izolacji limfocytów B. Identyfikacja idealnego, pojedynczego markera molekularnego pozwoliła w tym przypadku zastąpić kosztowne i skomplikowane narzędzie, jakim są mikromacierze, prostszymi i tańszymi metodami, takimi jak ilościowy PCR i cytometria przepływowa (75).

4.3. Chłoniak rozlany z limfocytów B

Chłoniak rozlany z limfocytów B (chłoniak rozlany olbrzymiokomórkowy, DLBCL, ang. *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*,) to najpowszechniejsza odmiana chłoniaka niezmierniczego (3). W wyniku analizy przebiegu klinicznego tej choroby u pacjentów zdiagnozowanych na podstawie klasyfikacji REAL (ang. *Revised European-American Lymphoma Classification*) wykazano istnienie indywidualnych różnic warunkujących odpowiedź na terapię. W części przypadków uzyskuje się trwałą remisję hematologiczną, w niektórych stwierdza się oporność na leczenie, a jeszcze w innych szybką wznowę po zaprzestaniu terapii. W badaniach ekspresji genów z zastosowaniem Lymphochipa potwierdzono istnienie co najmniej trzech podgrup chłoniaka, różniących się pochodzeniem komórek, stopniem ich zróżnicowania, a także indeksem proliferacyjnym (16). Zróżnicowanej ekspresji w DLBCL ulegały głównie geny należące do tzw. sygnatury proliferacji, sygnatury komórek T i sygnatury różnicowania komórek B (3,16). Wyraźny podział DLBCL na dwie grupy – chłoniak olbrzymiokomórkowy komórek centrów rozmnażania (GC-DLBCL) i chłoniak olbrzymiokomórkowy komórek aktywowanych (A-DLBCL) – uzyskano gdy do grupowania próbek użyto jedynie genów z sygnatury zarodkowych komórek B. Wśród genów wyróżniających GC-DLBCL znalazły się m.in. te kodujące antygeny powierzchniowe, czynniki transkrypcyjne, enzym naprawczy DNA oraz białka z rodziny BCL (w tym BCL-6 – znany marker komórek zarodkowych). Niektóre z nich często podlegają translokacjom w DLBCL i innych nowotworach linii limfoidalnej. Sygnatura A-DLBCL zawierała inne geny ulegające translokacjom w komórkach nowotworowych oraz geny kodujące białka o aktywności antyapoptotycznej, takie jak FLIP i BCL-2.

Klasyfikację DLBCL na dwie wymienione podgrupy można było skorelować ze zróżnicowaną odpowiedzią na terapię. Podtyp GC-DLBCL odznaczał się korzystniejszej

szym rokowaniem (16,77). Na podstawie analizy czasu przeżycia chorych z DLBCL przeprowadzonej z udziałem większej grupy pacjentów (240 osób) można było stworzyć klasyfikator dzielący pacjentów na trzy podgrupy (74). Analiza ekspresji genów pozwoliła także na identyfikację profilu ekspresji specyficznego dla PMBL (ang. *Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma*), odmiany DLBCL, której nie udawało się wyróżnić na tle innych typów tego chłoniaka za pomocą rutynowych testów molekularnych. W przeprowadzonych badaniach mikromacierzowych wykazano jednocześnie wiele cech wspólnych PMBL z chłoniakiem Hodgkina.

4.4. Chłoniak z komórek płaszczka

Chłoniak z komórek płaszczka (MCL, ang. *Mantle Cell Lymphoma*) to nowotwór o niskiej złośliwości „histologicznej”, progresywnym przebiegu choroby i małej wrażliwości na dotychczas stosowane metody leczenia. Średni czas życia chorych nie przekracza 3 lat (3). Jedną z głównych przyczyn rozwoju choroby jest translokacja t(11;14), prowadząca do nadmiernej ekspresji genu cykliny D1 i w konsekwencji zaburzeń cyklu komórkowego. Zastosowanie mikromacierzy do badania MCL oprócz podwyższonej ekspresji genu cykliny D1 wykazało zaburzenia w ekspresji genów związanych z apoptozą, migracją limfocytów, różnicowaniem i wzrostem komórek (78-80). Określono różne sygnatury genowe o znaczeniu rokowniczym (81,82), przy czym jedna z nich składała się w dużej mierze z genów związanych z procesem proliferacji (81). Wyłoniono także grupę pacjentów z MCL rozpoznanym na podstawie wyniku badania histologicznego i badań cytometrycznych, ale nie wykazujących podwyższonej ekspresji cykliny D1. U jednej trzeciej tych pacjentów wykryto delecję w genie ATM (ang. *Ataxia Telangiectasia Mutated Gene*), kodującym kinazę regulującą cykl komórkowy, wzrost i podział komórek oraz proces naprawy DNA. W badaniach DNA genomowego na mikromacierzach SNP wykazano, że w grupie 120 chorych na chłoniaki częstość występowania mutacji w obrębie sekwencji genu ATM jest najwyższa właśnie w chłoniaku z komórek płaszczka (83).

4.5. Szpiczak mnogi (plazmocytowy)

Szpiczak mnogi (MM, ang. *Multiple Myeloma*) cechuje się ekspansją nowotworowych komórek plazmatycznych, wydzielających w większości przypadków monoklonalne immunoglobuliny, utrudniając rozwój prawidłowych przeciwciał i funkcjonowanie układu immunologicznego. Średni czas życia chorych wynosi 3 lata (3). W pierwszej pracy opartej na wynikach badań mikromacierzowych szpiczaka mnogiego wykazano, że na podstawie profilu ekspresji genów można nie tylko rozróżnić komórki MM od prawidłowych komórek plazmatycznych, ale także wyróżnić cztery podgrupy tej choroby (84). Zaobserwowano korelację pomiędzy profilem eks-

presji genów a obecnością w komórkach szpiczaka określonych translokacji (w tym w genach immunoglobulin) oraz pochodzeniem transformowanych komórek plazmatycznych (komórki B migdałka, komórki plazmatyczne migdałka, komórki plazmatyczne szpiku kostnego) (84-86).

Stwierdzono, że dwa geny kodujące białka enzymatyczne, ABL (ang. *Abelson Murine Leukemia*) i β -syntazę cystationiny (CBS), zidentyfikowane za pomocą mikromacierzy jako ulegające podwyższonej ekspresji w komórkach szpiczaka, mogą stać się potencjalnymi celami terapeutycznymi (87). Znacząco podwyższony poziom ekspresji genu DKK1, kodującego białko sekrecyjne, zaobserwowano u chorych na MM ze zmianami patologicznymi w osteoblastach (88). Porównanie szpiczaka plazmocytozy z CLL wykazało, że unikatową cechą komórek MM jest również wysoka ekspresja genu CD38 (76). Natomiast wysoki poziom β -2-mikroglobuliny w szpiczaku mnogim jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym (76).

5. Podsumowanie

Z opracowania tego wynika, że mikromacierze znajdują coraz szersze zastosowanie w badaniach chorób rozrostowych krwi. Decyduje o tym z jednej strony powszechność zachorowań na ten rodzaj nowotworów, z drugiej – łatwa dostępność materiału do badań (często wystarczy próbka krwi). Wyniki badań genomicznych umożliwiły wgląd w patogenezę chorób układu krwiotwórczego, reklasyfikację typów cytogenetycznych, odkrycie nowych podklas molekularnych, precyzyjne przewidywanie rokowania i śledzenie postępów leczenia. Wbrew powszechnej euforii trzeba zdać sobie sprawę, że nie zawsze korzyści wynikające z przeprowadzenia eksperymentu mikromacierzowego są większe niż przy stosowaniu klasycznych metod diagnostycznych. Zazwyczaj skuteczność opracowanych klasyfikatorów jest wysoka w odniesieniu do podgrup o określonej aberracji cytogenetycznej, którą łatwo można wykryć prostszymi metodami.

Należy również pamiętać, że badania mikromacierzowe niosą z sobą pewne ograniczenia. Największym z nich jest liczebność próbek – z punktu widzenia statystyki idealną sytuacją byłoby posiadanie zbioru tak liczego jak liczba genów, których ekspresję bada się z użyciem mikromacierzy, a jest to zadanie praktycznie nieosiągalne (32). Nie zawsze też wyniki publikacji opracowanych przez różne laboratoria, nawet na stosunkowo dużych grupach chorych, pokrywają się ze sobą. Wychodząc naprzeciw temu problemowi powołano międzynarodowy program standaryzacji badań profilu ekspresji genów w diagnostyce białaczek, tzw. MILE (ang. *Microarray Innovations in Leukemia*) (89). Pierwsze, obiecujące, wyniki fazy wstępnej opublikowano w czerwcu 2008 r. W programie wzięło udział 11 różnych laboratoriów, które wyposażono w identyczny sprzęt, odczynniki i materiał biologiczny (dwie linie komórkowe i trzy preparaty pochodzące od pacjentów: CML, CLL i AML M2). Nad przebiegiem eksperymentów mikromacierzowych w każdym laboratorium

czuwał specjalnie przeszkolony technik. Stosując te same metody analizy statystycznej uzyskano bardzo powtarzalne rezultaty. Wydaje się zatem, że mikromacierze DNA będą nadal szeroko wykorzystywane w badaniach chorób rozrostowych krwi, a być może już niedługo znajdą także zastosowanie w praktyce klinicznej.

Opracowanie powstało w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego: numer PBZ-MNIl-2/1/2005.

Literatura

1. Rupa J., Lewandowski K., (2006), *Acta Haematol. Pol.*, 4, 485-504.
2. Döhner H., (2007), *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 412-419.
3. Margalit O., Somech R., Amariglio N., Rechavi G., (2005), *Blood Rev.*, 19, 223-234.
4. Mano H., (2004), *Int. J. Hematol.*, 80, 389-394.
5. Ebert B. L., Golub T. R., (2004), *Blood*, 104(4), 923-932.
6. Żmieńko A., Handschuh L., Góralski M., Figlerowicz M., (2008), *Biotechnologia*, 4, 39-53.
7. Kim S., Misra A., (2007), *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 9, 289-320.
8. Żmieńko A., Guzowska-Nowowiejska M., Płader W., Figlerowicz M., (2008), *Biotechnologia*, 4, 101-114.
9. Young B. D., Skoulakis S., Debernardi S., Lillington D. M., Chaplin T., Foot N. J., Lister A., Raghavan M., (2005), *Hematology*, 1, 31-35.
10. Gondek L. P., Dunbar A. J., Szpurka H., McDevitt M. A., Maciejewski J. P., (2007), *PLoS ONE*, 2(11), e1225.
11. Lehmann S., Ogawa S., Raynaud S. D., Sanada M., Nannya Y., Ticchioni M., Bastard C., Kawamata N., Koeffler H. P., (2008), *Cancer*, 112(6), 1296-1305.
12. George Priya Doss C., Sudandiradoss C., Rajasekaran R., Purohit R., Ramanathan K., Sethumadhavan R., (2008), *J. Biomed. Inform.*, 41(4), 607-612.
13. Kumar D., (2008), *Genomics and Clinical Medicine*, Oxford University Press.
14. Baldus C. D., Bullinger L., (2008), *Sem. Oncol.*, 35(4), 356-364.
15. Schena M., Shalon D., Heller R., Chai A., Brown P. O., Davis R. W., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 10614-10619.
16. Alizadeh A. A., Eisen M. B., Davis R. E., Ma C., Lossos I. S., Rosenwald A., Boldrick J. C., et al., (2000), *Nature*, 403, 503-511.
17. Alizadeh A. A., Eisen M. B., Davis R. E., Ma C., Sabet H., Tran T., Powell J. I., et al., (1999), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 64, 71-78.
18. Schaffer A. L., Yu X., He Y., Boldrick J., Chan E. P., Staudt L. M., (2000), *Immunity*, 13, 199-212.
19. Bullinger L., Döhner K., Bair E., Fröhling S., Schlenk R. F., Tibshirani R., Döhner H., Pollack J. R., (2004), *N. Engl. J. Med.*, 350, 1605-1616.
20. Alizadeh A., Eisen M., Botstein D., Brown P. O., Staudt L. M., (1998), *J. Clin. Immunol.*, 18, 373-379.
21. Jaffe E. S., Harris N. L., Stein H., Vardiman J. W., (2001), *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, IARC Press, Lyon, France.
22. Bennett J. M., Catovsky D., Daniel M. T., Flandrin G., Galton D. A., Gralnick H. R., Sultan C., (1976), *Br. J. Haematol.*, 33, 451-458.
23. Bennett J. M., Catovsky D., Daniel M. T., et al., (1985), *Ann. Intern. Med.*, 103, 620-625.
24. Golub T. R., Slonim D. K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J. P., et al. (1999), *Science*, 286, 531-537.
25. Andersson A., Olofsson T., Lindgren D., Nilsson B., Ritz C., Eden P., Lassen C., et al., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 52, 19069-19074.
26. Haferlach T., Kohlmann A., Schnittger S., Dugas M., Hiddemann W., Kern W., Schoch C., (2005), *Blood*, 106(4), 1189-1198.

27. Armstrong S. A., Staunton J. E., Silverman L. B., Pieters R., den Boer M., Minden M. D., Sallan S. E., et al., (2002), *Nature Genet.*, 30, 41-47.
28. Ross M. E., Mahfouz R., Onciu M., Liu H. C., Zhou X., Song G., Shurtleff S. A., et al., (2004), *Blood*, 104(12), 3679-3687.
29. Yeoh E. J., Ross M. E., Shurtleff S. A., Williams W. K., Patel D., Mahfouz R., et al., (2002), *Cancer Cell*, 1, 133-143.
30. Ross M. E., Zhou X., Song G., Shurtleff S. A., Girtman K., Williams W. K., Liu H. C., et al., (2003), *Blood*, 102(8), 2951-2959.
31. Ramaswamy S., Ross K. N., Lander E. S., Golub T. R., (2003), *Nat. Genet.*, 33(1), 49-54.
32. Catchpoole D., Lail A., Guo D., Chen Q-R., Khan J., (2007), *Leukemia Res.*, 31, 1741-1747.
33. Moos P. J., Raetz E. A., Carlson M. A., Szabo A., Smith F. E., Willman C., et al., (2000), *Clin. Cancer Res.*, 8, 3118-3130.
34. Hoffmann K., Firth M. J., Beesley A. H., de Klerk N. H., Kees U. R., (2006), *BMC Cancer*, 6, 229-239.
35. Kees U. R., Ford J., Watson M., Murch A., Ringner M., Walker R. L., Meltzer P., (2003), *Mol. Cancer Ther.*, 2 (7), 671-677.
36. Erba H. P., (2007), *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 420-428.
37. Schoch C., Kohlmann A., Schnittger S., Brors B., Dugas M., Mergenthaler S., Kern W., et al., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(15), 10008-10013.
38. Yagi T., Morimoto A., Eguchi M., Hibi S., Sako M., Ishii E., Mizutani S., et al., (2003), *Blood*, 102(5), 1849-1856.
39. Valk P. J., Verhaak R. G., Beijen M. A., Eipelinck C. A., van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S. B., Boer J. M., Beverloo H. B., et al., (2004), *N. Engl. J. Med.*, 350, 1617-1628.
40. Wilson C. S., Davidson G. S., Martin S. B., Andries E., Potter J., Harvey R., Ar K., et al., (2006), *Blood*, 108(2), 685-696.
41. Miller J. D., Stacy T., Liu P. P., Speck N. A., (2001), *Blood*, 97, 2248-2256.
42. Gelmetti V., Zhang J., Fanelli M., Minucci S., Pelicci P. G., Lazar M. A., (1998), *Mol. Cell Biol.*, 18, 7185-7191.
43. Virtaneva K., Wright F. A., Tanner S. M., Yuan B., Lemon W. J., Caligiuri M. A., Bloomfield C. D., et al., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(3), 1124-1129.
44. Erkeland S. J., Verhaak R. G. W., Valk P. J. M., Delwel R., Löwenberg B., Touw I. P., (2006), *Cancer Res.*, 66(2), 622-626.
45. Alcalay M., Tiacci E., Bergomas R., Bigerna B., Venturini E., Minardi S. P., Meani N., et al., (2005), *Blood*, 106(3), 899-902.
46. Falini B., Nicoletti I., Martelli M. F., Mecucci C., (2007), *Blood*, 109(3), 874-885.
47. Verhaak R. G. W., Goudswaard C. S., van Putten W., Bijl M. A., Sanders M. A., Hagens W., Uitterlinden A. G., Eipelinck C. A. J., Delwel R., Lowenberg B., Valk P. J. M., (2005), *Blood*, 106(12), 3747-3754.
48. Rupa J., Lewandowski K., (2006), *Acta Haematol. Pol.*, 1, 17-32.
49. Mrózek K., Bloomfield C. D., (2006), *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 169-177.
50. Small D., (2006), *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 178-184.
51. Tagliafico E., Tenedini E., Manfredini R., Grande A., Ferrari F., Roncaglia E., Biciato S., (2006), *Leukemia*, 20, 1751-1758.
52. Tsutsumi C., Ueda M., Miyazaki Y., Yamashita Y., Choi Y. L., Ota J., Kaneda R., et al., (2004), *Exp. Hematol.*, 32, 828-835.
53. Pellagatti A., Fidler C., Wainscoat J. S., Boulwood J., (2005), *Haematology*, 10(4), 281-287.
54. Chen G., Zeng W., Miyazato A., Billings E., Maciejewski J. P., Kajigaya S., Sloand E. M., Young N. S., (2004), *Blood*, 104(13), 4210-4218.
55. Roela R. A., Carraro D. M., Brentani H. P., Kaiano J. H. L., Simao D. F., Guarnieiro R., Lopes L. F., et al., (2007), *Leukemia Res.*, 31, 579-589.
56. Mano H., (2006), *Leuk. Lymphoma*, 47(1), 9-14.
57. Hofman W.-K., de Vos S., Komor M., Hoelzer D., Wachsmann W., Koeffler H. P., (2002), *Blood*, 100(10), 3553-3560.

58. Hasle H., Baumann I., Bergsträsser E., Fenu S., Fischer A., Kardos G., Kerndrup G., (2004), *Leukemia*, 18, 2008-2014.
59. Pellagatti A., Esoof N., Watkins F., Langford C. F., Vetrie D., Campbell L. J., Fidler C., et al., (2004), *Br. J. Haematol.*, 10(4), 281-287.
60. Nowicki M. O., Pawlowski P., Fischer T., Hess G., Pawlowski P., Skorski T., (2003), *Oncogene*, 22, 3952-3963.
61. Branford S., (2007), *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 376-383.
62. Villuendas R., Steegman J. L., Pollan M., Tracey L., Granda A., Fernandez-Ruiz E., Casado L. F., et al., (2006), *Leukemia*, 20, 1047-1054.
63. Frank O., Brors B., Fabarius A., Li L., Haak M., Merk S., Schwindel U., Zheng C., et al., (2006), *Leukemia*, 20, 1400-1407.
64. Crossman L. C., Mori M., Hsieh Y. C., Lange T., Paschka P., Harrington C. A., Krohn K., et al., (2005), *Haematologica*, 90(4), 459-464.
65. Kaneta Y., Kagami Y., Katagiri T., Tsunoda T., Jin-nai I., Taguchi H., et al., (2002), *Jpn. J. Cancer Res.*, 93, 849-856.
66. McLean, Gathmann I., Capedeville R., Polymeropoulos M. H., Dressman M., (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10, 155-165.
67. Warzocha K., Krykowski E., Robak T., (2000), *Onkol. Pol.*, 3, 137-147.
68. Staeger M. S., Banning-Eichenseer U., Weissflog G., Volkmer I., Burdach S., Richter G., Mauz-Körholz C., Föll J., Körholz D., (2008), *Exp. Hematol.*, 36(7), 886-896.
69. Zhao X., Qiu W., Kung J., Zhao X., Peng X., Yegappan M., Yen-Lieberman B., Hsi E. D., (2008), *Leuk. Res.*, 32(2), 275-285.
70. Foell J. L., Max D., Giersberg C., Korholz D., Staeger M. S., (2008), *Anticancer Res.*, 28 (2A), 887-894.
71. Chetaille B., Bertucci F., Finetti P., Esterni B., Stamatoullas A., Picquetot J. M., Copin M. C., et al., (2008), *Blood*, 2008 Dec. 18, Epub.
72. Cossman J., (2001), *J. Histochem. Cytochem.*, 49(6), 799-800.
73. Küppers R., Klein U., Schwering I., Distler V., Bräuninger A., Cattoretti G., Tu Y., et al., (2003), *J. Clin. Invest.*, 111(4), 529-537.
74. Rosenwald A., Alizadeh A., Widhopf G., Simon R., Davis R., Yu X., et al., (2001), *J. Exp. Med.*, 194, 1639-1647.
75. Browning R. L., Geyer S., Johnson A. J., Jelinek D. F., Tschumper R. C., Call T. G., Shanafelt T. D., et al., (2007), *Leukemia Res.*, 31, 1737-1740.
76. Zent C. S., Zhan F., Schichman S. A., Bumm K. H. W., Lin P., Chen J. B., Shaughnessy J. D., (2003), *Leukemia Res.*, 27, 765-774.
77. Staudt L. M., (2001), *Trends Immunol.*, 22, 35-40.
78. Rizzatti E. G., Falcao R. P., Panepucci R. A., Proto-Siqueira R., Anselmo-Lima, Okamoto O. K., Zago M. A., (2005), *Br. J. Haematol.*, 130, 516-526.
79. Hofmann W. K., de Vos S., Tsukasaki K., Wachsmann W., Pinkus J. W., Said J. W., et al., (2001), *Blood*, 98, 787-794.
80. Ek. S., Hogerkorp C. M., Dictor M., Ehinger M., Borrebaeck C. A., (2002), *Cancer Res.*, 62, 4398-4405.
81. Rosenwald A., Wright G., Wiestner A., Chan W. C., Connors J. M., Campo E., et al., (2003), *Cancer Cell*, 3, 185-197.
82. Martinez N., Camacho F. I., Algara P., Rodriguez A., Dopazo A., Ruiz-Ballesteros E., et al., (2003), *Blood*, 101, 8226-8232.
83. Fang N. Y., Greiner T. C., Weisenburger D. D., Chan W. C., Vose J. M., Smith L. M., et al., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 5372-5377.
84. Zhan F., Hardin J., Kordsmeier B., Bumm K., Zheng M., Tian E., et al., (2002), *Blood*, 99, 1745-1757.
85. Zhan F., Tian E., Bumm K., Smith R., Barlogie B., Shaughnessy Jr J., (2003), *Blood*, 101, 1128-1140.
86. Claudio J. O., Masih-Khan E., Stewart A. K., (2004), *Curr. Hematol. Rep.*, 3, 67-73.
87. de Vos J., Thykjaer T., Tarte K., Ensslen M., Raynaud P., Requirand G., et al., (2002), *Oncogene*, 21, 6848-6857.

88. Tian E., Zhan F., Walker R., Rasmussen E., Ma Y., Barlogie B., et al., (2003), *N. Engl. J. Med.*, 349, 2483-2494.
89. Kohlman A., Kipps T. J., Rassenti L. Z., Downing J. R., Shurtleff S. A., Mills K. I., Gilkes A. F., et al., (2008), *Br. J. Haematol.*, 142, 802-807.