

Damian Szatkowski

**Mutacje w obrębie genu *KIT* w komórkach
blastycznych w ostrych białaczkach.**

(rozprawa doktorska)

Z Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantologii
promotor: Prof. dr hab. n. med. Andrzej Hellmann

Wydział Lekarski Akademii Medycznej w Gdańsku

Gdańsk 2008

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	3
2. WSTĘP.....	8
2.1. Ostre białaczki	8
2.2. Ostre białaczki limfoblastyczne.....	9
2.3. Ostre białaczki szpikowe.....	10
2.4. Ostra białaczka bifenotypowa	16
2.5. Ostra białaczka biklonalna	16
2.6. Zmiany genetyczne w ostrych białaczkach.....	16
2.7. Leczenie ostrych białaczek.....	22
2.8. Zmienność materiału genetycznego.....	24
2.9. Kinazy tyrozynowe	26
2.10. Gen KIT.....	32
3. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	38
4. MATERIAŁ I METODY.....	40
4.1. Materiał	40
4.2. Metody	41
4.2.1. Analiza immunocytometryczna.....	41
4.2.2. Izolacja DNA.....	41
4.2.3. Oznaczanie stężenia DNA.....	42
4.2.4. Amplifikacja DNA.....	43
4.2.5. Elektroforeza kapilarna	46
4.2.6. Polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (SSCP).	47
4.2.7. Denaturująca wysokosprawną chromatografię cieczową (DHPLC).	48
4.2.8. Sekwencjonowanie produktów PCR	49
4.3. Aparatura i odczynniki.....	51
4.3.1. Aparatura.....	51
4.3.2. Odczynniki	51
4.3.3. Roztwory.....	53
4.4. Analiza statystyczna uzyskanych wyników	54
5. WYNIKI	55
5.1. Ekspresja antygenu KIT w ostrych białaczkach szpikowych w zależności od podtypu w klasyfikacji FAB.	55
5.2. Stopień ekspresji CD117 w zależności od charakteru ostrej białaczki.....	56
5.3. Zmiany genetyczne w obrębie genu KIT w ostrych białaczkach szpikowych.....	57
5.3.1. Zmiany w obrębie eksonu 8	57
5.3.2. Zmiany w obrębie eksonu 10	57
5.3.3. Zmiany w obrębie eksonu 11	60
5.3.4. Zmiany w obrębie eksonu 17	62
5.4. Zmiany genetyczne w obrębie genu KIT w zależności od podtypu FAB	63
5.5. Zmiany genetyczne w obrębie genu KIT w zależności od poziomu ekspresji CD117.....	64
6. DYSKUSJA.....	67
7. WNIOSKI.....	74
8. STRESZCZENIE.....	75
8.1. Abstract	76
9. ANEKS.....	77
10. PIŚMIENNICTWO.....	80

1. WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AATYK2	(ang. <i>lemur tyrosine kinase 2 gene LMTK2</i>) gen <i>LMTK2</i>
ABL1	(ang. <i>v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>) gen <i>ABL1</i>
ACK1	(ang. <i>tyrosine kinase, non-receptor, 2</i>) niereceptorowa kinaza tyrozynowa 2 - ACK1
AHSA1	(ang. <i>AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 [yeast]</i>) aktywator białka szoku termicznego 90kDa
AKT1	(ang. <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 AKT1</i>) onkogen <i>AKT1</i>
ALK	(ang. <i>anaplastic lymphoma kinase [Ki-1]</i>) kinaza chłoniaka anaplastycznego
ALL	(ang. <i>acute lymphoblastic leukemia</i>) ostra białaczka limfoblastyczna
ANLL	(ang. <i>acute nonlymphoblastic leukaemia</i>) ostra białaczka nie-limfoblastyczna
AML	(ang. <i>acute myeloid leukaemia</i>) ostra białaczka szpikowa
AML1/EA	(ang. <i>AML 1 oncogene/ribosomal protein L22</i>) gen <i>AML1/EA</i>
AML1/EVII	(ang. <i>AML 1 oncogene/ecotropic viral integration site1</i>) gen <i>AML1/EVII</i>
AML1/ETO	(ang. <i>AML 1 oncogene/ eighth twenty one gene</i>) gen <i>AML1/ETO</i>
AML1/MDS	(ang. <i>AML 1 oncogene/myelodysplasia syndrome 1</i>) gen <i>AML1/MDS</i>
AF-4/MML	(ang. <i>AF4/FMR2 family member 1/ myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia</i>) gen fuzyjny <i>AF-4/MML</i>
APL	(ang. <i>acute promyelocytic leukaemia</i>) ostra białaczka promielocytowa
APS	nadsiarczan amonu
ARG	(ang. <i>v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 [ARG, Abelson-related gene]</i>) gen <i>ABL2</i>
ATP7A	(ang. <i>ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide (Menkes syndrome)</i>) ATP'aza ATP7A
ATRA	(ang. <i>all-trans retinoic acid</i>) kwas <i>all-trans</i> retinowy
AXL	(ang. <i>AXL receptor tyrosine kinase AXL</i>) receptor kinazy AXL
BCR/ABL	(ang. <i>breakpoint cluster region/Abelson gene</i>) gen <i>BCR/ABL</i>
BFU-E	(ang. <i>burst forming unit erythroid</i>) mniej zróżnicowana, prekursorowa komórka erytroidalna
BLK	(ang. <i>B lymphoid tyrosine kinase</i>) kinaza tyrozynowa BLK
BMX	(ang. <i>BMX non-receptor tyrosine kinase</i>) niereceptorowa kinaza tyrozynowa BMX
BRK	(ang. <i>bone morphogenetic protein receptor, type II [serine/threonine kinase]</i>) gen receptora <i>BRK (BMPR2)</i>
BTK	(ang. <i>Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase</i>) kinaza tyrozynowa BTK
CALLA	(ang. <i>common acute lymphoblastic leukemia antigen</i>) antygen CALLA
CBF	(ang. <i>core binding factor</i>) czynnik wiążący rdzeń
CCK	(ang. <i>receptor-interacting serine-threonine kinase 2 RIPK2</i>) białko CCK
CCK4	(ang. <i>PTK7 protein tyrosine kinase 7</i>) kinaza tyrozynowa 7
CSF1R	(ang. <i>colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog</i>) receptor dla czynnika stymulującego kolonie

CSK	(ang. <i>c-src tyrosine kinase</i>) kinaza tyrozynowa c-src
DDR1	(ang. <i>discoidin domain receptor family, member 1 DDR1</i>) gen <i>DDR1</i> z rodziny receptorów domeny dyskoidyny
DEK/CAN	(ang. <i>DEK oncogene/ Nuclear pore complex protein Nup214</i>) gen fuzyjny <i>DEK/CAN</i>
DIC	(ang. <i>disseminated intravascular coagulation</i>) rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe
DNA	kwasy dezoksyrybonukleinowe
E2A/PBX	(ang. <i>transcription factor 3 [E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47]/ pre-B-cell leukemia homeobox 1</i>) gen fuzyjny <i>E2A/PBX</i>
ERBB	(ang. <i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog [avian]</i>) wirusowy homolog onkogenu białaczki erytroblastycznej
EGFR	(ang. <i>epidermal growth factor receptor [erythroblastic leukemia viral {v-erb-b} oncogene homolog, avian]</i>) gen receptora dla naskórkowo pochodnego czynnika wzrostu
EPHA1	EPH receptor A1
FAB klasyfikacja	Francusko-Amerykańsko-Brytyjska klasyfikacja
FAK	(ang. <i>PTK2 protein tyrosine kinase 2</i>) białko PTK2
FER	(ang. <i>fer [fps/fes related] tyrosine kinase [phosphoprotein NCP94]</i>) kinaza FER
FES	(ang. <i>feline sarcoma oncogene</i>) onkogen kocięcego mięsaka <i>FES</i>
FGFR	(ang. <i>fibroblast growth factor receptor</i>) receptor czynnika wzrostu fibroblastów
FGR	(ang. <i>Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog</i>) onkogen <i>FGR</i>
FLT3	(ang. <i>fms-like tyrosine kinase</i>) gen <i>FLT3</i>
FRK	(ang. <i>fyn-related kinase gene</i>) gen <i>FRK</i>
FYN	(ang. <i>FYN oncogene related to SRC, FGR, YES</i>) onkogen <i>FYN</i>
GAB	(ang. <i>GRB2-associated binding protein GAB</i>) białko GAB
GAP	(ang. <i>GTP-ase activating protein</i>) białko aktywujące GTPazę
G-CSF	(ang. <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>) czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
GIST	(ang. <i>gastrointestinal stromal tumour</i>) guz podścieliska przewodu pokarmowego
GM-CSF	(ang. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>) czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
GRB2	(ang. <i>growth factor receptor-bound protein 2 GRB2</i>) białko GRB2
HCK	(ang. <i>hemopoietic cell kinase</i>) kinaza HCK
HGFR	(ang. <i>met proto-oncogene [hepatocyte growth factor receptor]</i>) protoonkogen <i>MET</i>
Igκ/MYC	(ang. <i>immunoglobulin kappa locus/myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>) gen fuzyjny <i>Igκ/MYC</i>
IL-3	interleukina 3
IL-3/IgH	(ang. <i>interleukin 3/immunoglobulin heavy locus</i>) gen fuzyjny <i>IL-3/IgH</i>
IL-6	interleukina 6
INSRR	(ang. <i>insulin receptor-related receptor</i>) gen receptora spokrewnionego z receptorem dla insuliny
ITK	(ang. <i>IL2-inducible T-cell kinase</i>) kinaza ITK
JAK	(ang. <i>Janus family kinases</i>) białko JAK, kinazy Janusa

kbp	(ang. <i>kilo base pair</i>) kilo par zasad
<i>KIT</i>	gen <i>KIT</i>
<i>KIT</i>	białko <i>KIT</i>
<i>KITLG</i>	ligand <i>KIT</i> ligand, czynnik wzrostowy komórek pnia, czynnik Steel
<i>LCK</i>	(ang. <i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>) kinaza <i>LCK</i>
<i>LTK</i>	(ang. <i>leukocyte tyrosine kinase</i>) kinaza tyrozynowa leukocytów
<i>LYN</i>	(ang. <i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog</i>) onkogen <i>LYN</i>
<i>LYL1</i>	(ang. <i>lymphoblastic leukemia derived sequence 1</i>) gen <i>LYL1</i>
<i>MAP</i>	(ang. <i>mitogen-activated protein kinases</i>) kinazy białkowe aktywowane mitogenami
<i>MATK</i>	(ang. <i>megakaryocyte-associated tyrosine kinase</i>) kinaza <i>MATK</i>
<i>MDR1</i>	(ang. <i>multidrug resistance gene</i>) gen oporności wielolekowej
<i>MER</i>	(ang. <i>c-mer proto-oncogene tyrosine kinase MERTK</i>) protoonkogen kinazy <i>MERTK</i>
<i>MET</i>	(ang. <i>met proto-oncogene [hepatocyte growth factor receptor]</i>) protoonkogen <i>MET</i>
<i>MLL</i>	(ang. <i>mixed lineage leukaemia</i>) gen <i>MLL</i>
mRNA	(ang. <i>messenger ribonucleic acid</i>) matrycowy kwas rybonukleinowy
<i>MTS1</i>	(ang. <i>multiple tumor-suppressor gene 1</i>) gen <i>MTS1</i> , synonim <i>CDKN2</i> <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> , obecnie <i>S100A4 - S100 calcium</i> <i>binding protein A4</i>
<i>MUSK</i>	(ang. <i>muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase</i>) mięśniowa, szkieletowa receptorowa kinaza tyrozynowa <i>MUSK</i>
<i>MYC/IgH</i>	(ang. <i>myelocytomatosis viral oncogene homolog/immunoglobulin</i> <i>heavy locus</i>) gen fuzyjny <i>MYC/IgH</i>
<i>MYC/Igλ</i>	(ang. <i>myelocytomatosis viral oncogene homolog/immunoglobulin</i> <i>lambda locus</i>) gen fuzyjny <i>MYC/Igλ</i>
NCBI	(ang. <i>National Centre for Biotechnology Information</i>) Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej USA
<i>NGFR</i>	(ang. <i>low affinity neurotrophin receptor p75NTR</i>) receptor dla neurotropiny
<i>NPM</i>	(ang. <i>nucleophosmin</i>) gen <i>NPM</i>
<i>NRTK</i>	(ang. <i>nonreceptor tyrosine kinase</i>) niereceptorowe kinazy tyrozynowe
<i>NUP98/HOXA9</i>	(ang. <i>nucleoporin 98kDa/homeobox A9</i>) białko <i>NUP98/HOXA9</i>
<i>PAS</i>	(ang. <i>periodic acid Schiff</i>) odczynnik Schiffa
<i>PDGF</i>	(ang. <i>platelet derived growth factor</i>) płytkowopochodny czynnik wzrostu
<i>PDGFR</i>	(ang. <i>platelet derived growth factor receptor</i>) receptor dla płytkowopochodnego czynnika wzrostu
<i>PEBP2α</i>	(ang. <i>polyomavirus enhancer-binding protein 2 alpha</i>) gen <i>PEBP2α</i>
<i>PI3K</i>	(ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>) kinaza fosfatydyloinozytolu
<i>PIK3R1</i>	(ang. <i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 [p85 alpha]</i>) regulatorowa podjednostka 1 (p85) kinazy fosfoinozytolu
<i>PLCG1</i>	(ang. <i>phospholipase C, gamma 1</i>) fosfolipaza C gamma1
<i>PLZF</i>	(ang. <i>promyelocytic leukaemia zinc finger</i>) gen <i>PLZF</i>
<i>PML/RARα</i>	(ang. <i>promyelocytic leukemia/retinoid acid receptor type alpha</i>) gen fuzyjny <i>PML/RARα</i>
<i>POCH</i>	Polskie Odczynniki Chemiczne

PTPN6	(ang. <i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6 PTPN6</i>) fosfataza tyrozynowa PTPN6
PTPN11	(ang. <i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 [Noonan syndrome 1] PTPN11</i>) fosfataza tyrozynowa PTPN11
PYK2	(ang. <i>PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta PTK2B</i>) białko PTK2B
RAB3IL1	(ang. <i>RAB3A interacting protein [rabin3]-like 1 RAB3IL1</i>) białko RAB3IL1
RAC1	(ang. <i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 [rho family, small GTP binding protein Rac1] RAC1</i>) białko RAC1
RAR1	białko RAR1
RAS	(ang. <i>transforming protein RAS</i>) onkogen RAS
RET	(ang. <i>ret proto-oncogene</i>) protoonkogen RET
RON MST1R	(ang. <i>macrophage stimulating 1 receptor [c-met-related tyrosine kinase] MST1R</i>) gen receptora stymulującego makrofagi
ROR1	(ang. <i>receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1</i>) receptor ROR1
ROR2	(ang. <i>receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2</i>) receptor ROR2
ROS1	(ang. <i>v-ros UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1 [avian]</i>) homolog onkogenu wirusa mięsaka UR2, gen ROS1
RTK	(ang. <i>receptor tyrosine kinase</i>) receptorowe kinazy tyrozynowe
RYK	(ang. <i>RYK receptor-like tyrosine kinase</i>) receptoropodobna kinaza tyrozynowa RYK
SCF	(ang. <i>stem cell factor SCF, Steel factor</i>) czynnik wzrostowy komórek pnia, czynnik Steel, ligand KIT
SH2	(ang. <i>Src homology 2</i>) domena SH2
SHC1	(ang. <i>SHC [Src homology 2 domain containing] transforming protein 1 SHC1</i>) białko SHC1
SH2D1A	(ang. <i>SH2 domain protein 1A, Duncan disease associated protein</i>) domena 1A SH2
sIg	(ang. <i>surface immunoglobulin</i>) powierzchniowe immunoglobuliny
SIL	(ang. <i>stem cell leukemia interrupting locus</i>) gen SIL
SMMHC	(ang. <i>smooth muscle myosin heavy chain gene</i>) gen łańcuchów ciężkich miozyny mięśni gładkich
SOCS1	(ang. <i>suppressor of cytokine signaling 1 SOCS1</i>) supresor sygnałów cytokin 1
SOS	białko SOS
SRC	(ang. <i>v-src sarcoma [Schmidt-Ruppin A-2] viral oncogene homolog [avian] SRC</i>) onkogen SCR
SRMS	(ang. <i>src-related kinase lacking C-terminal regulatory tyrosine and N-terminal myristylation sites</i>) kinaza SRMS
STAT	(ang. <i>signal transducers and activators of transcription</i>) przekaźniki sygnałów i aktywatory transkrypcji
STIL	(ang. <i>SCL/TAL1 interrupting locus</i>) gen SCL/TAL1
SYK	(ang. <i>spleen tyrosine kinase</i>) kinaza tyrozynowa SYK
TAL1	(ang. <i>T-cell acute lymphocytic leukemia 1</i>) gen TAL1
TAL2	(ang. <i>T-cell acute lymphocytic leukemia 2</i>) gen TAL2
TAL(SCL)/TCR $\lambda\delta$	(ang. <i>T cell acute lymphocytic leukaemia 1; stem cell leukemia/Tcell receptor$\lambda\delta$</i>) gen fuzyjny TAL1(SCL)/TCR $\lambda\delta$
TCR	(ang. <i>T cell receptor</i>) receptor komórek T
TdT	(ang. <i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i>) terminalna transferaza deoksyrybonukleotydowa

TEC	(ang. <i>tec protein tyrosine kinase</i>) kinaza tyrozynowa TEC
TEK	(ang. <i>TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal)</i>) kinaza tyrozynowa TEK
TEL/AML1	(ang. <i>ets variant gene 6 [TEL oncogene]/ runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene)</i>) gen fuzyjny TEL/AML1
TEMED	tetrametylenoetylenodiamina
TIE	(ang. <i>tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1 TIE</i>) kinaza tyrozynowa z domenami podobnymi do naskórkowo pochodnego czynnika wzrostu
TNK1	(ang. <i>tyrosine kinase, non-receptor, 1</i>) niereceptorowa kinaza tyrozynowa 1 - TNK1
TRKA	(ang. <i>neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1 gene NTRK1</i>) gen TRKA
TRKC	(ang. <i>neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3 NTRK3</i>) gen TRKC
TXK	(ang. <i>TXK tyrosine kinase</i>) kinaza tyrozynowa TXK
TYRO3	(ang. <i>TYRO3 protein tyrosine kinase</i>) kinaza proteinowa TYRO3
VAV1	(ang. <i>vav 1 oncogene VAV1</i>) onkogen VAV1
VEGFR	(ang. <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>) receptor czynnika wzrostu śródbłonkowego
WT	(ang. <i>wild type</i>) typ dziki
YES1	(ang. <i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1</i>) onkogen YES1
ZAP70	(ang. <i>zeta-chain [TCR] associated protein kinase 70kDa</i>) białko ZAP70

2. WSTĘP

2.1. Ostre białaczki

Ostre białaczki są heterogenną grupą złośliwych chorób nowotworowych komórki macierzystej hematopoezy (Haase i wsp., 1995). Klasyfikacja ostrych białaczek oparta jest na morfologicznych, cytochemicznych i immunofenotypowych właściwościach komórek nowotworowych, które niezbędne są do określenia ich pochodzenia i stopnia dojrzałości (Vardiman i wsp. 2002). Podstawowym kryterium rozpoznawczym ostrej białaczki pozostaje obecność przynajmniej 20 procent blastów spośród wszystkich komórek jądrzastych szpiku kostnego lub krwi obwodowej (Vardiman i wsp. 2002). W obrazie klinicznym ostrych białaczek dominują burzliwe objawy chorobowe wynikające z niewydolności prawidłowego utkania szpikowego, co skutkuje cytopenią prawidłowych komórek we krwi obwodowej. Polegać mogą na znacznej anemizacji, powtarzających się infekcjach o ciężkim przebiegu i objawach skazy krwotocznej. Większość ostrych białaczek charakteryzuje się podwyższoną leukocytozą we krwi obwodowej, może być ona też obniżona lub pozostawać w normie. Szpik kostny najczęściej pozostaje hiperplastyczny, ale spotyka się również normo- i hipoplastyczny, szczególnie w postaciach wtórnych. Do rozpoznania ostrej białaczki niezbędne jest wykonanie badania morfologicznego krwi obwodowej z rozmazem, biopsji aspiracyjnej szpiku kostnego poszerzonego o ewentualną trepanobiopsję, badania cytochemicznego i immunofenotypowego komórek szpiku i badania cytogenetycznego. Przebieg kliniczny, rokowanie, odpowiedź na leczenie w ostrych białaczkach zależą od wieku pacjenta, wyników badań laboratoryjnych w momencie rozpoznania, zmian cytogenetycznych i rodzaju białaczki. Jedną z najbardziej rozpowszechnionych i nadal, po części stosowanych klasyfikacji ostrych białaczek, jest klasyfikacja FAB (Francusko-Amerykańsko-Brytyjska) z 1976 r. (Bennett i wsp. 1976). Opiera się ona bezpośrednio na morfologii i barwieniach cytochemicznych komórek blastycznych. Najnowsza klasyfikacja, według WHO (Vardiman i wsp. 2002) zawiera wiele kryteriów rozpoznawczych stosowanych przez grupę FAB.

Bazując na pochodzeniu komórek blastycznych z poszczególnych linii komórkowych, ostre białaczki dzieli się na limfoblastyczne (ALL ang. *Acute Lymphoblastic Leukaemia*) i szpikowe określane również mianem nielimfoblastycznych (AML ang. *Acute Myeloid Leukaemia*, ANLL ang. *Acute Nonlymphocytic Leukaemia*). W klasyfikacji FAB wydzielono trzy podtypy ostrych

białaczek limfoblastycznych na podstawie wielkości komórek, kształtu jąder komórkowych, liczby jąderek i względnej objętości cytoplazmy: L1, L2 i L3. Wśród ostrych białaczek szpikowych klasyfikacja FAB wyróżnia osiem wariantów różniących się między sobą pochodzeniem linii komórkowej i stopniem dojrzałości. Białaczki M0, M1, M2, M3 pochodzą z toru dojrzewania granulocytarnego, M4 z granulocytarnego i monocytowego, M5a i b monocytowego, M6 erytroidalnego i M7 megakariocytarnego. Obecna klasyfikacja według WHO wyróżnia wiele więcej podtypów ostrej białaczki szpikowej i wobec części z nich należących do grupy ostrej białaczki szpikowej nieokreślonej cytogenetycznie, nadal proponuje wykorzystanie części klasyfikacji na podstawie kryteriów FAB.

2.2. Ostre białaczki limfoblastyczne

Ostre białaczki limfoblastyczne są najczęstszymi złośliwymi chorobami nowotworowymi występującymi u dzieci. Dotyczą one ok. 30% zachorowań na nowotwory złośliwe u dzieci (Young i Miller, 1975). Szacuje się, że stanowią ok. 20% wszystkich ostrych białaczek występujących u dorosłych. Zachorowalność wynosi 0,7 na 100000 osób w ciągu roku. W wieku dorosłym mediana zachorowania na ostrą białaczkę limfoblastyczną wynosi 30 – 40 lat. Kryterium rozpoznawcze ostrej białaczki limfoblastycznej to obecność powyżej 20% limfoblastów w szpiku kostnym. Cytochemicznie blasty nie wykazują dodatniej reakcji z peroksydazą i Sudanem czarnym B. Wykazują w części przypadków dodatnią reakcję z PAS (ang. *Periodic Acid Schiff*), która może mieć charakter gruboziarnisty, a niekiedy blokowy. Ostre białaczki limfoblastyczne są heterogenną grupą chorób zawierającą podtypy różniące się między sobą patogenezą, właściwościami biologicznymi i klinicznymi. Możliwość identyfikacji właściwości biologicznych i klinicznych ostrych białaczek pozwala zakwalifikować chorych do określonych grup ryzyka i zastosować zoptymalizowaną terapię. Immunofenotypowo rozróżniamy ostre białaczki limfoblastyczne pochodzące z limfocytów B lub T, z których każda dalej może być zakwalifikowana do poszczególnych podgrup wyróżnionych na podstawie stopnia dojrzałości komórek limfoblastycznych (Foon i Todd, 1986, Pui i wsp. 1993). Większość chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną stanowią chorzy, u których doszło do rozrostu B-komórkowego - 85%. Chorzy z rozrostem T-komórkowym stanowią 15% przypadków (Cabrera, 1990). Kolejna klasa antygenów pozwala wyodrębnić białaczki z obecnością antygenu CD10 (CALLA, ang. *common ALL*

antigen) zwane CALLA(+)*ALL* i odpowiednio „null-cell” *ALL* w przypadku braku CD10. Klony białaczkowe pochodzące z komórek T różnią się od pochodzących z komórek B rzadszą ekspresją antygeny CD10 (CALLA) i HLA-DR, rzadziej są PAS pozytywne, mają zwiększoną aktywność fosfatazy kwasnej (Ritz i wsp, 1981, Moretta i wsp. 1982). Charakterystyczne są dla nich antygeny CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 i CD8. Dojrzałe komórki B wyróżniają się ekspresją i obecnością antygenów CD19, CD20, CD21, CD22, CD23 i CD24. Czułość antygenów CD19 i CD24 jest porównywalna do HLA-DR, ale są one bardziej swoiste dla wyróżniania białaczki B-komórkowej. CD20 i CD22 charakteryzuje wysoka swoistość a mniejsza czułość w identyfikacji rozrostów B-komórkowych. CD10 (CALLA) jest znajdowany na ok. 90 % blastów pochodzenia z linii B (Pullen i wsp. 1984).

W zależności od stopnia dojrzałości komórki B wyróżnia się następujące podtypy ostrej białaczki limfoblastycznej: early pre-B-cell *ALL* (najczęstsza, stanowi ok. 50% przypadków *ALL* u ludzi dorosłych), pre-B-cell *ALL*, B-cell *ALL*.

2.3. Ostre białaczki szpikowe

Ostre białaczki szpikowe występują w każdym wieku, najczęściej jednak dotyczą dorosłych i znacznie zwiększa się ich częstość w wieku podeszłym. Wydaje się, że na patogenezę ostrej białaczki szpikowej mają wpływ czynniki środowiskowe, zawodowe i genetyczne (Linnet 1985, Sandler i Ross 1997). Średnia roczna zachorowalność na ostrą białaczkę szpikową wynosi 2,25 na 100000 osób i dotyczy poniżej 1 osoby na 100000 w wieku poniżej 30 roku życia i 17 na 100000 w wieku 75 lat. Częściej występuje u mężczyzn. (Kinlen, 1994). Leukocytoza w momencie rozpoznania jest podwyższona u ponad połowy pacjentów. Patognomoniczne dla rozpoznania ostrej białaczki szpikowej jest występowanie pałeczek Auera w komórkach blastycznych (Boggs i wsp. 1962). Ostrą białaczkę promielocytową (AML-M3 wg FAB) charakteryzuje znacznie częściej niż inne podtypy zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC – ang. *disseminated intravascular coagulation*). (Gralnick i wsp.1972, Hillestad 1957) spowodowany wydzielaniem przez ziarnistości azurofilne czynników podobnych do tkankowych prokagulantów. (Bauer i Rosenberg 1984, Lisiewicz 1978). Tendencja do krwawień może być tu również spowodowana przez zwiększoną fibrynolizę i wydzielaniem większych ilości interleukiny-1 przez komórki nowotworowe (Bennett i wsp. 1989, Cozzolino i wsp. 1988). Przerost dziąseł spowodowany naciekami białaczkowymi

w ich obrębie najczęściej dotyczy podtypów monoblastycznych (AML-M4 i AML-M5 wg FAB).

Kryterium rozpoznawcze ostrej białaczki szpikowej jest takie samo jak w przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej i stanowi 20% komórek o morfologii blasta w rozmazie szpiku kostnego lub krwi obwodowej (Vardiman i wsp. 2002). Jedną z metod pozwalających odróżnić poszczególne podtypy stanowią reakcje cytochemiczne lub cytoenzymatyczne. Reakcja z mieloperoksydazą jest charakterystyczna dla komórek linii granulocytarnej, bywa słabo-dodatnia w komórkach linii monocytowej. Limfocyty i komórki erytroidalne są peroksydazoujemne. Bardziej czułą, pozwalającą na odróżnienie ostrej białaczki szpikowej od limfoblastycznej, jest reakcja z Sudanem czarnym B. Niektóre komórki blastyczne nie wykazujące dodatniej reakcji z mieloperoksydazą mogą wykazywać słabo dodatnią reakcję z Sudanem. Do odróżnienia linii monoidalnej od pozostałych pomocna jest reakcja esterazowa, przy czym reakcja nieswoista zachodzi również -, oprócz monocytów - w limfocytach T, megakariocytach, promielocytach. W celu wyodrębnienia linii monoidalnej stosuje się zahamowanie reakcji związkami fluoru w obrębie tej linii. Reakcja esterazowa swoista zachodzi w granulocytach. Immunofenotypowo pochodzenie klonu chorobowego z linii szpikowej może charakteryzować występowanie antygenów CD13, CD14, CD15, CD33, antygenów linii czerwonomórkowej (glikoforyna A) i megakariocytowej (CD41, CD42b, CD61) (Kaplan i wsp. 1989, Jennings i Foon 1997). Marker komórek pnia CD34 jest obecny na komórkach blastycznych u 40 do 60% przypadków ostrych białaczek szpikowych (Robertson i Ritz 1994). Nie znaleziono pełnej i jednoznacznej korelacji między antygenami powierzchniowymi komórek blastycznych a klasyfikacją FAB. Nie doszukano się również związku pomiędzy ekspresją tych antygenów a rokowaniem ostrej białaczki. Ponad 90% przypadków ostrych białaczek szpikowych wykazuje dodatnią ekspresję antygeny CD33 lub CD13, około 80% HLA-DR i ok. 60% CD15. Bardziej niejednorodnie występują antygeny CD11b i CD14, ale są one charakterystyczne dla linii monocytowych (Robertson i Ritz 1994). Niektóre z antygenów powierzchniowych występują w ściśle określonych podtypach morfologicznych i cytogenetycznych, np. CD2 w AML M4Eo (z eozynofilią z inwersją chromosomu 16), CD19, CD34 i CD56 w AML-M2 z translokacją (8;21), brak HLA-DR w AML-M3 z translokacją (15;17) (Paietta i wsp. 1993a, Paietta i wsp. 1993b, Paietta i wsp. 1994, Kita i wsp. 1992).

Przy próbie powiązania ekspresji poszczególnych antygenów na komórkach blastycznych ze znaczeniem prognostycznym należy zawsze kierować się innymi czynnikami klinicznymi. Wiadomo jednak, że np. antygen CD34 jest charakterystyczny dla komórek mniej zróżnicowanych (M0, M1) i jest również częściej spotykany w liniach monoidalnych (M5) niż granulocytarnych (Dubosc-Marchenay i wsp. 1992, Campos i wsp. 1989, Geller i wsp. 1990, Lee i wsp. 1992). Jego występowanie jest raczej złym czynnikiem prognostycznym, szczególnie jeśli dotyczy zachorowania w dorosłym wieku, zachorowanie jest konsekwencją wcześniejszej mielodysplazji i współwystępuje z genem oporności wielolekowej (MDR1 – ang. *multidrug resistance gene*) (Geller i wsp. 1990, Borowitz i wsp. 1989, Leith i wsp. 1997). W przypadku, kiedy jego ekspresja dotyczy ostrej białaczki szpikowej M2 t(8;21) lub M4Eo inv(16), gdzie występuje często, jest wtedy dobrym czynnikiem prognostycznym (Adriaansen i wsp. 1993, Porwit-MacDonald i wsp. 1996). Występowanie antygenów charakterystycznych dla ostrej białaczki limfoblastycznej z komórek T (CD2) i z komórek B (CD19) związane jest często z dobrym rokowaniem (Ball i wsp. 1991), ale w przypadku antygeny CD19 tylko w przypadku obecności innych dobrych czynników prognostycznych. Koekspresja CD19 i CD34 jest złym czynnikiem rokowniczym. (Solary i wsp. 1992). Antygen CD7, przeważnie występujący na dojrzałych komórkach linii T i NK, obecny w ok. 20% ostrych białaczek szpikowych, jest złym czynnikiem prognostycznym występując na podtypach mniej dojrzałych (AML-M0, AML-M1) łącznie z antygenem CD34, MDR1, TdT (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase*) (Robertson i Ritz 1994, Jensen i wsp. 1991, Kita i wsp. 1993).

Na podstawie klasyfikacji FAB wyróżniamy następujące podtypy ostrej białaczki szpikowej:

- Minimalnie zróżnicowana AML-M0. Komórki blastyczne w tym podtypie białaczki morfologicznie ani cytochemicznie nie wykazują cech pochodzenia z linii szpikowej. Komórki są bezziańiste i nie wykazują obecności pałeczek Auera. Mniej niż 3% komórek wykazuje dodatnią reakcję mieloperoksydazową i z Sudanem czarnym B. Ponad 20% komórek w badaniu immunofenotypowym wykazuje ekspresję antygenów charakterystycznych dla pochodzenia szpikowego: CD13, 33, 34 przy jednoczesnej nieobecności antygenów limfoidalnych (Bennett i wsp. 1991). W praktyce dość często spotyka się ekspresję antygenów

limfoidalnych i TdT w AML-M0 (Venditti i wsp. 1994, Cuneo i wsp. 1995, Venditti i wsp. 1997). Podtyp ten dotyczy często starszych pacjentów, mediana zachorowań to 60 rok życia. Zmiany cytogenetyczne dotyczą najczęściej chromosomów 5 i 7, podobnie jak w mielodysplazji i białaczkach wtórnych, chromosomu 8 i 13 (Cuneo i wsp. 1995, Venditti i wsp. 1997). Odsetek osiągniętych całkowitych remisji i przeżywalność jest mniejsza niż w innych podtypach ostrej białaczki szpikowej (Cuneo i wsp. 1995, Venditti i wsp. 1997, Stasi i wsp. 1994, Amadori i wsp. 1996).

- Bez cech dojrzewania AML-M1, gdzie więcej niż 90% mieloblastów nie wykazuje cech dojrzewania. Pałeczki Auera występują dość rzadko. Co najmniej 3% blastów wykazuje dodatnią reakcję z Sudanem czarnym lub mieloperoksydazą. Blasty wykazują ekspresję antygenów szpikowych CD13, 14, 33. AML-M1 stanowi 10-20% przypadków ostrej białaczki szpikowej. Częściej występuje u dorosłych, mediana zachorowania przypada na 45-50 rok życia (Stanley i wsp. 1985, French Registry of Acute Leukemia 1987). Nie ma ściśle określonych charakterystycznych zmian cytogenetycznych. Dość często dochodzi do występowania objawów dodatkowych. Hepatosplenomegalia i limfadenopatia dotyczy 1/3 pacjentów z AML-M1.
- Z cechami dojrzewania AML-M2, o typowej morfologii komórek z pałeczkami Auera, możliwą eozynofilią w szpiku. Dotyczy 30 do 45% chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej (Brunnering i McKenna 1994, Nucifora i Rowley 1995). Immunofenotypowo, oprócz charakterystycznych antygenów linii szpikowej, można obserwować zwiększoną ekspresję antygenów CD56, CD19 i CD34 (Kita i wsp. 1992, Porwit-MacDonald i wsp. 1996, Hurwitz i wsp. 1992). U około 40% chorych z AML-M2 stwierdza się charakterystyczne zmiany cytogenetyczne pod postacią translokacji t(8;21) (Nucifora i Rowley 1995). Obecność translokacji t(8;21) predysponuje do dobrej odpowiedzi na chemioterapię, z wysokim odsetkiem osiągniętych całkowitych remisji (Swansbury i wsp. 1994).
- Promielocytowa AML-M3 (APL- ang. *acute promyelocytic leukaemia*), dotycząca 5-10% chorych z AML (Warrell i de The 1993, Grignani i wsp. 1994). Mediana zachorowania wynosi 30-38 lat (Brunnering i McKenna 1994).

Immunofenotypowo AML M3 charakteryzuje się ekspresją antygenów CD13 i CD33 i brakiem ekspresji HLA-DR. Klinicznie w ostrej białaczce promielocytowej często dochodzi do rozwinięcia zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego wraz z powikłaniami krwotocznymi (Hillestad 1957, Cordonnier i wsp. 1985, Stone i Mayer 1990). Cechą charakterystyczną AML M3 jest występowanie translokacji t(15;17), w której dochodzi do powstania genu fuzyjnego *PML/RAR α* (ang. *promyelocytic leukemia/retinoid acid receptor type alpha*). Komórki, w których doszło do powstania i ekspresji genu *PML/RAR α* są wrażliwe na działanie kwasu *all-trans*retinowego (ATRA), którego zastosowanie w terapii ostrej białaczki promielocytowej zmieniło sposób postępowania i znacznie poprawiło rokowanie tego podtypu białaczki (Warrell i de The 1993, Grignani i wsp. 1994, Stone i Mayer 1990, Head i wsp. 1995, Fenaux i wsp. 1997).

- Mielomonocytowa AML-M4 dotycząca łącznie 5-10% chorych z ostrą białaczką szpikową. Mediana zachorowania wynosi 40-45 lat. Immunofenotypowo AML-M4 charakteryzuje się ekspresją antygenów CD13, CD34, ze zmiennym występowaniem CD14, CD33, CD11b, CD11c. Często dochodzi do ekspresji antygeny CD2, jak również HLA-DR (Adriaansen i wsp. 1993). Cechą charakterystyczną jest również występowanie organopatii i hiperleukocytozy powyżej 100 G/L. Najczęstszym wariantem tego podtypu jest ostra białaczka szpikowa typu M4 ze współwystępującą eozynofilią i inwersją chromosomu 16. Liczba całkowitych odpowiedzi na terapię indukcyjną w ostrej białaczce szpikowej M4 z inv(16) przewyższa liczbę w pozostałych podtypach ostrej białaczki szpikowej, wobec czego allogeniczną transplantację szpiku proponuje się u pacjentów nie w pierwszej remisji (Brunning i McKenna 1994, Larson i wsp. 1986, Koefler 1987, Holmes i wsp. 1985).
- Monoblastyczna AML-M5, stanowi 2-10% ostrych białaczek szpikowych (Koefler 1987, Tobelem i wsp. 1980). Rozróżnia się dwa warianty powyższego podtypu: M5a (mało dojrzała, 80% komórek monoidalnych stanowią monoblasty) i M5b (z cechami dojrzewania, komórki monoidalne stanowią monocyty i promonocyty) (Peterson i Levine 1987). Zachorowanie na ostrą białaczkę monocytową występuje w każdym wieku, ze szczególną

tendencją do występowania postaci M5a wśród pacjentów młodych poniżej 25 roku życia (Brunning i McKenna 1994). Immunofenotypowo AML-M5 można odróżnić od pozostałych postaci AML, za wyjątkiem M4 za pomocą antygenów CD14, CD4, CD68. Cytogenetycznie często dochodzi do translokacji, w których zaangażowane są chromosomy 9, 11, 19. Klinicznie może dochodzić do organopatii, nacieków w obrębie dziąseł i częściej niż w innych podtypach nacieków w obrębie centralnego układu nerwowego. Obserwowano również stosunkowo często zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego i hiperleukocytozę. Rokowanie jest gorsze niż w innych podtypach ze względu na obecność niekorzystnych czynników prognostycznych (Peterson i Levine 1987, Scott i wsp. 1988), ale wydaje się mniej niekorzystne u pacjentów, gdzie spotyka się t(9;11) (Kalwinsky i wsp. 1990, Martinez-Climent i wsp. 1995).

- Erytroleukemia, AML-M6. Występuje u mniej niż 5% przypadków ostrych białaczek szpikowych. W morfologii szpiku kostnego więcej niż 50% komórek stanowią erytroblasty. W większości preparatów widoczne mogą być pałeczki Auera. (Brunning i McKenna 1994). AML-M6 występuje głównie u osób powyżej 50 roku życia, częściej dotyczy mężczyzn (Peterson i Levine 1987). Zmiany cytogenetyczne dotyczą chromosomu 5 i 7, a u ok. 70% chorych spotyka się aneuploidię (Rowley i wp. 1981, Scott i wsp. 1988). Wśród objawów klinicznych AML-M6 dominują objawy związane z niedokrwistością, a u 1/3 pacjentów mamy do czynienia z nasilonymi bólami kostnymi (Peterson i Levine 1987). W tej grupie w badaniach laboratoryjnych często stwierdza się dodatni odczyn Coombsa, czynnik reumatoidalny, przeciwciała przeciwjądrowe (Hetzl i Gee 1978). Rokowanie wśród pacjentów z erytroleukemią jest gorsze niż wśród chorych na inne ostre białaczki szpikowe szczególnie z uwagi na bardziej zaawansowany wiek chorych i częstsze występowanie tego podtypu jako choroby wtórnej.
- Megakarioblastyczna, AML-M7. Dotyczy mniej niż 5% zachorowań na ostre białaczki szpikowe (Brunning i McKenna 1994, Peterson i Levine 1987, Huang i wsp. 1984, Koike 1984). Morfologicznie może być podobna do ALL-L2 lub AML-M1. Z uwagi na możliwość włóknienia szpiku kostnego, biopsja aspiracyjna szpiku może być nieudana.

Immunofenotypowo rozpoznanie ostrej białaczki megakariocytowej powinno być postawione na podstawie obecności charakterystycznych antygenów jak CD41, CD42b, CD61 na komórkach blastycznych. Cytogenetycznie zmiany najczęściej dotyczą chromosomów 8 i 21, jeśli choroba jest wtórna – chromosomu 5 i 7. (Rowley i wsp. 1981, Peterson i Levine 1987, Chan i wsp. 1983, Sariban i wsp. 1984, Simon i wsp. 1987). Objawy kliniczne AML-M7 nie odbiegają od występujących w innych podtypach. Rokowanie w ostrej białaczce megakariocytowej jest złe.

2.4. Ostra białaczka bifenotypowa

Termin ostrej białaczki bifenotypowej został zarezerwowany dla takiej choroby, w której komórki nowotworowe wykazują równocześnie ekspresję antygenów charakterystycznych zarówno dla linii szpikowej jak i limfoidalnej. Z uwagi na fakt, że ok 20% ostrych białaczek szpikowych wykazuje obecność co najmniej jednego antygeny linii limfoidalnej, a 5 - 46% ostrych białaczek limfoblastycznych antygeny linii mieloidalnej, większość autorów pozostaje zgodna, że ostrą białaczkę bifenotypową należy rozpoznawać w przypadku ekspresji więcej niż jednego niespodziewanego antygeny charakterystycznego dla drugiej grupy (Garand i wsp, 1994, Del Vecchio i wsp. 1989, Dinndorf i wsp. 1986, Bene i wsp. 1995).

2.5. Ostra białaczka biklonalna

Ostra białaczka biklonalna charakteryzuje się obecnością więcej niż jednego klonu komórkowego wśród komórek nowotworowych. U jednego chorego stwierdza się więc obecność klonu zarówno ostrej białaczki szpikowej jak i limfoblastycznej.

2.6. Zmiany genetyczne w ostrych białaczkach

Ostre białaczki są pod względem fenotypowym i genetycznym chorobami heterogennymi. Jak inne nowotwory złośliwe, są konsekwencją więcej niż jednej mutacji (Gilliland i wsp. 2004). Zmiany genetyczne występujące w ostrych białaczkach mogą być widoczne w postaci zmiany liczby lub budowy chromosomów, rearanżacji genów czy mutacji punktowych. Niektóre ze stwierdzanych zmian genetycznych są charakterystyczne dla poszczególnych

podtypów ostrych białaczek i wiążą się z określonymi predyspozycjami patofizjologicznymi.

W ostrej białaczce limfoblastycznej u 20-30% dzieci i u 5-12% pacjentów dorosłych dochodzi do zwielokrotnienia liczby chromosomów (Third International Workshop 1983, Look i wsp. 1982, Secker-Walker i wsp. 1982, Walters i wsp. 1990, Raimondi 1993, Petkovic i wsp. 1996). Poliploidia jest często obserwowana w early pre-B-ALL, rzadziej w pre-B-ALL, B-cell-ALL, T-cell-ALL (Pui i wsp. 1988, Raimondi i wsp. 1988, Uckun i wsp. 1989). W przypadku, kiedy zmiany dotyczą zwielokrotnienia liczby pojedynczego chromosomu zaangażowane są najczęściej chromosomy 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20, 21 i X (Raimondi 1993). Hiperdiploidia jest korzystnym czynnikiem prognostycznym (Secker-Walker i wsp. 1982, Bloomfield i wsp. 1989, Williams i wsp. 1982, Trueworthy i wsp. 1992) w przeciwieństwie do np. tetraploidii – niekorzystnego czynnika prognostycznego (Pui i wsp. 1990).

Translokacje chromosomów częściej dotyczą pre-B-ALL, B-cell-ALL, T-cell-ALL niż early pre-B-ALL (Pui i wsp. 1988). Translokacja (12;21) jest najczęstszą dotyczącą dziecięcego typu B-cell-ALL, występuje u 30% dzieci i 3,4% dorosłych z powyższym podtypem ALL (McLean i wsp. 1996). W wyniku t(12;21)(p13;q22) dochodzi do powstania genu fuzyjnego *TEL/AML1* (ang. *TEL oncogene/acute myeloid leukemia 1 oncogene*), który początkowo został opisany w ostrej białaczce szpikowej (Golub i wsp. 1995, Shurtleff i wsp. 1995, Romana i wsp. 1995, McLean i wsp. 1996). Występowanie genu fuzyjnego *TEL/AML1* jest dobrym czynnikiem prognostycznym. U 8% pacjentów z ALL dochodzi do translokacji (4;11)(q21;q23) (Third International Workshop 1983, Arthur i wsp. 1982, Parkin i wsp. 1982). Dochodzi do powstania genu fuzyjnego *AF-4/MML* (ang. *AF4/FMR2 family member 1/ myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia*). Immunofenotypowo komórki blastyczne z powyższą translokacją wykazują cechy zarówno komórek pochodzenia limfoidalnego jak i mieloidalnego - obecność CD19, CD15, CDw65, HLA-DR, brak CD24, antygenu CALLA i powierzchniowych immunoglobulin (Mirro i wsp. 1986, Raimondi i wsp. 1989, Borowitz i wsp. 1993). Klinicznie ALL z t(4;11) charakteryzuje się wysoką leukocytozą przy rozpoznaniu, organopatią i stosunkowo krótkim czasem trwania remisji (Third International Workshop 1983, Bloomfield i wsp. 1989). Kolejną charakterystyczną translokacją dla ostrej białaczki limfoblastycznej B-komórkowej jest t(5;14)(q31;q32) występująca szczególnie często u chorych z towarzyszącą eozynofilią (Tono-oka

i wsp. 1984). W wyniku translokacji powstaje gen *IL-3/IgH* (ang. *interleukin 3/immunoglobulin heavy locus*), w którym gen dla interleukiny 3 zostaje przeniesiony w okolice promotora genu łańcuchów ciężkich immunoglobulin i zwiększenie ekspresji IL-3 przez ten promotor powoduje niekontrolowany wzrost komórek nowotworowych (Meeker i wsp. 1990). Kolejne 5% pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną, szczególnie z podtypem pre-B posiada karyotyp $t(1;19)(q23.3;p13.3)$ (Carroll i wsp. 1984, Raimondi i wsp. 1990). Obecność genu *E2A/PBX* (ang. *transcription factor 3 [E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47]/ pre-B-cell leukemia homeobox 1*) predysponuje do wystąpienia wczesnej wznowy choroby przy standardowym postępowaniu leczniczym. Podobna translokacja występuje również w ostrej białaczce szpikowej (Troussard i wsp. 1995). W ostrej białaczce limfoblastycznej B-komórkowej dochodzi do translokacji, w których główną rolę odgrywa chromosom 8. Najczęstszą jest $t(8;14)(q24;q32)$ – występująca również w chłoniaku Burkitta. Pozostałe znane translokacje to $t(2;8)(p11-13;q24)$ i $t(8;22)(q24;q11)$ (Klein 1983). We wszystkich z wymienionych translokacji kluczową rolę odgrywa gen *C-MYC* zlokalizowany na ramionach długich chromosomu 8. Powstające w wyniku rearanżacji geny, odpowiednio *MYC/IgH* (ang. *myelocytomatosis viral oncogene homolog/immunoglobulin heavy locus*), *Igκ/MYC* (ang. *immunoglobulin kappa locus/myelocytomatosis viral oncogene homolog*) i *MYC/Igλ* (ang. *myelocytomatosis viral oncogene homolog/immunoglobulin lambda locus*) mają bezpośredni związek z transformacją nowotworową (Dalla-Favera i wsp, 1983). Klinicznie obecność którejkolwiek z wymienionych translokacji wiąże się z częstszym występowaniem pozaszpikowych ognisk choroby, oporności na klasyczną chemioterapię i szybką progresję choroby. Wśród pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej T-komórkowej znaleziono przynajmniej 9 protoonkogenów, gdzie kluczową rolę odgrywają różne rearanżacje w obrębie genów *TCR* (ang. *T-cell receptor*) (Raimondi i wsp. 1988). Dla przykładu translokacja $(1;14)(p32;q11)$ powoduje powstanie genu fuzyjnego *TAL1(SCL)/TCRλ/δ* (ang. *T cell acute lymphocytic leukaemia 1; stem cell leukemia/ T-cell receptorλ/δ*) obecnego u około 3% pacjentów z T-komórkową ALL. Wraz z pojawieniem się możliwości badań molekularnych okazało się, że dalsze 25% chorych z powyższym rozpoznaniem, bez stwierdzanych zmian cytogenetycznych, ma zmiany w obrębie genu *TAL1*

polegające na delecji części DNA, które zostaje przeniesione o 90 do 100 kbp powyżej locus genu *TAL*. Delecja ta skutkuje wzajemną wymianą genu *TAL* i locus *SIL* (ang. *stem cell leukemia interrupting locus*) nazywane obecnie *STIL* (ang. *SCL/TAL1 interrupting locus*). Gen *TAL1* i pokrewne mu *TAL2* (ang. *T-cell acute lymphocytic leukemia 2*) i *LYL1* (ang. *lymphoblastic leukemia derived sequence 1*) występują u ponad 60% chorych z T-cell-ALL niezależnie od stwierdzanych zmian cytogenetycznych i odgrywają zasadniczą rolę w patogenezie tego podtypu ostrej białaczki (Bash i wsp. 1995). Zmiany w obrębie genu *TAL* są korzystnym czynnikiem prognostycznym (Kikuchi i wsp. 1993). Kolejne translokacje dość często występujące w T-komórkowych ostrych białaczkach to t(11;14)(p13;11), t(10;14)(q24;q11) (Yoffe i wsp. 1989, Raimondi i wsp. 1987). Około 20% ALL u dorosłych charakteryzuje występowanie translokacji (9;22)(q34;q11) czyli tzw. chromosomu Philadelphia (Third International Workshop 1983, Watlers i wsp. 1990, Crist i wsp. 1990, Westbrook i wsp. 1992, Russo i wsp. 1991). Produktem powstałego genu fuzyjnego *BCR-ABL* jest białko BCR-ABL o charakterze kinazy tyrozynowej (Melo, 1996). Około 50% pacjentów z obecnością chromosomu Philadelphia posiada dodatkowe zmiany cytogenetyczne. Występowanie translokacji (9;22) nie wiąże się z charakterystycznym obrazem immunofenotypowym (Bloomfield i wsp. 1989, Crist i wsp. 1990), morfologicznie odpowiada ALL L2. Klinicznie *BCR-ABL* dodatnie ostre białaczki limfoblastyczne charakteryzują się znaczną leukocytozą przy rozpoznaniu, wysoką agresywnością, opornością na klasyczną chemioterapię, występowaniem wczesnych wznów choroby po osiągnięciu remisji. U kolejnych 10% chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej stwierdza się zmiany w obrębie krótkich ramion chromosomu 9 (Murphy i wsp. 1989). Badaniami molekularnymi częstość opisanych zmian sięga 29% (Diaz i wsp. 1990). Delecje, rzadziej mutacje punktowe w rejonie 9p21 prowadzą tutaj do utraty bądź inaktywacji genu supresorowego (antyonkogenu) p16 (synonimy: *MTS1*; *CDKN2*) (ang. *multiple tumor-suppressor gene 1*; *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) (Duro i wsp. 1996, Quesnel i wsp. 1995). Immunofenotypowo inaktywacja genu *MTS1* dotyczy aż 80% T-komórkowych ostrych białaczek limfoblastycznych i jest najczęstszą zmianą cytogenetyczną znajdowaną w tym podtypie ostrej białaczki limfoblastycznej (Fizotti i wsp. 1995). ALL z towarzyszącymi zmianami w obrębie ramion krótkich chromosomu 9 charakteryzuje się klinicznie wysoką leukocytozą przy rozpoznaniu, obecnością

ognisk pozaszpikowych i wysokim odsetkiem wznów, szczególnie miejscowych (Fizzotti i wsp. 1995).

W ostrej białaczce szpikowej zmiany chromosomalne w obrębie klonu mogą dotyczyć zarówno linii szpikowej jak i erytroidalnej czy megakariocytowej (Keinanen i wsp. 1988). W przeciwieństwie do ALL rzadko dochodzi do znacznych odchyleń w liczbie chromosomów. Najczęstszą zmianą liczbową jest trisomia chromosomu 8 (Yunis i wsp. 1984, Woods i wsp. 1985), skutkująca wysokim odsetkiem osiąganych remisji i średnim okresem ich trwania. Monosomia chromosomu 7 lub skrócenie długich ramion chromosomu 7 jest skorelowane ze złą odpowiedzią na terapię (Woods i wsp. 1985, Kalwinsky i wsp. 1990, Schiffer i wsp. 1989). Monosomia chromosomu 5 lub delecja 5q- jest również spotykana w ostrej białaczce szpikowej (Schiffer i wsp. 1989). Zmiany liczbowe innych chromosomów niż opisanych wyżej należą w tym schorzeniu do kazuistyki. Wśród zmian strukturalnych chromosomów w ostrej białaczce szpikowej do najczęstszych należą cztery główne grupy: translokacje genu czynnika wiążącego rdzeń (ang. *core binding factor CBF*), translokacje genu receptora kwasu retinowego, kinaz tyrozynowych i genów odpowiedzialnych za funkcje porów w błonie jądrowej (ang. *nuclear pore*). Do pierwszej grupy zmian CBF należą dwie zasadnicze: translokacja t(8;21) i inwersja inv(16). Translokacja (8;21) jest spotykana u około 20% ostrych białaczek szpikowych i jest charakterystyczna dla podtypu M2. U około 7% chorych z t(8;21) rozpoznaje się jednak ostrą białaczkę mielomonocytową AML M4 (Löffler i wsp. 1995). W wyniku translokacji powstaje gen fuzyjny *AML1/ETO* (ang. *AML 1 oncogene/ eighth twenty one gene*) (Ericsson i wsp. 1994). Gen *AML1* inaczej zwany również *CBF α* (ang. *core binding factor type α*) lub *PEBP2 α* (ang. *polyomavirus enhancer-binding protein 2 alpha*) koduje podjednostkę alfa czynnika transkrypcyjnego znanego jako czynnik wiążący rdzeń (CBF) i odgrywa ważną rolę w hematopoezie. Fuzje z udziałem genu *AML1* z chromosomu 21 stwierdza się również w innych zespołach chorobowych poza ostrą białaczką szpikową i są charakterystyczne dla zespołu mielodysplastycznego i kryzy blastycznej przewlekłej białaczki szpikowej - t(3;21) i wspomnianej wyżej ostrej białaczki limfoblastycznej - t(12;21). W wyniku translokacji t(3;21), w zależności od miejsca fuzji może dochodzić do powstania trzech różnych genów *AML1/EV11* (ang. *AML 1 oncogene/ecotropic viral integration site1*), *AML1/EAP* (ang. *AML 1 oncogene/ribosomal protein L22*), *AML1/MDS1* (ang. *AML 1*

oncogene/myelodysplasia syndrome 1) (Sawyers, 1997). Kolejnym genem należącym do grupy CBF jest gen *CBF β* zaangażowany w kolejnej opisywanej zmianie cytogenetycznej w ostrej białaczce szpikowej, inwersji lub delecji części ramion długich chromosomu 16 (Liu i wsp. 1993). Podjednostka beta CBF jest niezbędna do połączenia się podjednostki alfa z docelową sekwencją DNA. W przypadku występowania inwersji, C-koniec *CBF β* zostaje połączony z produktem genu *SMMHC* (ang. *smooth muscle myosin heavy chain gene*), powstały produkt *CBF β /SMMHC* uniemożliwia prawidłowe oddziaływanie AML1 z DNA i tym samym transkrypcje genów, na które oddziałuje (Sawyers, 1997). *Inv(16)* jest charakterystyczna dla ostrej białaczki mielomonocytoewj M4 z eozynofilią (Yunis i wsp. 1984, Arthur i wsp. 1983, Le Beau i wsp. 1983). Może dotyczyć nawet do 50% chorych z tą postacią białaczki. Klinicznie nie ma różnicy między inwersją *inv(16)(p13;q22)* i delecją *del(16)(q22)*. Występowanie zmian cytogenetycznych w obrębie genów CBF, *t(8;21)*, *inv(16)* wiąże się z dobrymi czynnikami prognostycznymi choroby (Schiffer i wsp. 1989, Swansburry i wsp. 1994, Yunis i wsp. 1984, Larson i wsp. 1986). Kolejną ważną grupą zmian cytogenetycznych w ostrej białaczce szpikowej są translokacje dla receptorów kwasu retinowego. Dotyczą one praktycznie tylko podtypu M3, ostrej białaczki promielocytowej. Do klasycznego przedstawiciela grupy należy translokacja *t(15;17)*. Molekularnie dochodzi do połączenia genu receptora dla kwasu retinowego *RAR α* (ang. *retinoic acid receptor*) z chromosomu 17 z genem *PML* (ang. *promyelocytic leukaemia*) z chromosomu 15, co prowadzi do kodowania nieprawidłowego receptora a w konsekwencji do zaburzeń dojrzewania komórek nowotworowych. (Borrow i wsp. 1990, de The i wsp. 1990, Longo i wsp. 1990, Dyck i wsp. 1994, Koken i wsp. 1994, Weis i wsp. 1994). U części chorych z ostrą białaczką promielocytową stwierdza się występowanie innych rearanżacji genu *RAR α* , mianowicie z genem *PLZF* (ang. *promyelocytic leukaemia zink finger*) i *NPM* (ang. *nucleophosmin*), gdzie dochodzi do wytworzenia genów fuzyjnych *PLZF/RAR α* i odpowiednio *NPM/RAR α* . Powstanie genu *PLZF/RAR α* odpowiada translokacji *t(11;17)*, której występowanie jest równoznaczne z kliniczną opornością na kwas *all-transretinowy*. Rola *NPM/RAR α* pozostaje nadal nieznaną. (Redner i wsp. 1996, Licht i wsp. 1996, Dong i wsp. 1996, Licht i wsp. 1995). Przedstawicielem kolejnej grupy zmian strukturalnych w obrębie chromosomów skutkujących określonym

patomechanizmem ostrej białaczki szpikowej jest translokacja t(6;9)(p23;q34). Występuje u około 2% AML, szczególnie w podtypach M1, M2 i M4. Zmiana ta dotyczy przeważnie młodych pacjentów klinicznie źle odpowiadających na leczenie. W wyniku rearanzacji chromosomów dochodzi do wytworzenia genu fuzyjnego *DEK/CAN* (ang. *DEK oncogene/ Nuclear pore complex protein Nup214*). Produkt genu *CAN* odpowiada jako część składowa kompleksu porów w błonie jądrowej za transport RNA i białek przez błonę jądrową (von Lindner i wsp. 1992, Kraemer i wsp. 1994, Heim i wsp. 1986, von Lindern i wsp. 1990, Kraemer i wsp. 1994). Kolejną zmianą, gdzie dochodzi do upośledzenia transportu przezbłonowego w jądrze komórkowym jest translokacja t(7;11). W wyniku fuzji genów dochodzi do powstania białka NUP98/HOXA9 (ang. *nucleoporin 98kDa/homeobox A9*) (Borrow i wsp. 1996, Nakamura i wsp. 1996). Zmiany strukturalne dotyczące ramion długich chromosomu 11 występują u około 5% chorych z ostrą białaczką szpikową, szczególnie w podtypie M5, M4 i M2 (Berger i wsp. 1982). Do zmian tych należą translokacje: t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(q22;q23), t(10;11)(p11-15;q13-23), t(11;19)(q23;p13). t(4;11) najczęściej dotyczy ostrej białaczki limfoblastycznej, t(9;11) szpikowej, natomiast t(10;11) biklonalnej. Gen zaangażowany w powyższe zmiany z ramienia długiego chromosomu 11 został nazwany *MLL* (ang. *mixed lineage leukaemia*) (Secco i wsp. 1996, Tkachuk i wsp. 1992, Gu i wsp. 1992, Thirman i wsp. 1993).

2.7. Leczenie ostrych białaczek

Ostre białaczki są schorzeniami trudnymi do leczenia. Klasyczne leczenie przeprowadzane jest w oparciu o intensywną polichemioterapię. Wyróżnia się 3 zasadnicze fazy leczenia ostrych białaczek:

- leczenie indukcyjne
- leczenie konsolidujące
- leczenie postremisyjne

Celem leczenia indukcyjnego jest osiągnięcie przez chorego tzw. remisji hematologicznej. Uzyskanie remisji uwarunkowane jest zredukowaniem liczby komórek blastycznych do poziomu, przy którym możliwa jest normalizacja wyników badań morfologii krwi obwodowej. W szpiku kostnym nie może pozostać więcej niż 5% komórek blastycznych. Uważa się, iż w momencie rozpoznania ostrej białaczki ilość komórek blastycznych w ustroju wynosi 10^{12} , co stanowi ok. 1 kg

guza nowotworowego. Leczenie indukcyjne polega na kilkudniowej intensywnej polichemioterapii, po której następuje okres aplazji postterapeutycznej. Regeneracja hematologiczna i ewentualna remisja może zostać osiągnięta w okresie 3 do 6 tygodni od zakończenia pierwszej fazy leczenia. Leczenie to jest w stanie zredukować ilość komórek blastycznych o 3 logarytmy do poziomu 10^9 , co odpowiada 1 g guza. Po jej osiągnięciu przeprowadzane jest leczenie konsolidujące, w przypadku częściowej – powtarzane leczenie indukcyjne. Przy braku efektów leczenia, najczęściej na skutek odrostu klonu białaczkowego po okresie aplazji lub pierwotnej oporności choroby, przeprowadza się ponowne leczenie indukcyjne, oparte na innym schemacie chemioterapii niż pierwotnie zastosowany. Leczenie konsolidujące polega na zastosowaniu wysokodawkowanej powtarzanej kilkukrotnie polichemioterapii u chorych w okresie remisji. Szacuje się, że po zastosowaniu leczenia indukcyjnego i osiągnięciu całkowitej remisji hematologicznej pozostała w organizmie chorego ilość komórek białaczkowych znacznie przekracza możliwości układu obronnego dla zapobieżenia szybkiemu nawrotowi choroby i utrzymania długotrwałej remisji. Celem leczenia konsolidującego jest więc wyeliminowanie tzw. choroby resztkowej i uzyskanie trwałej remisji hematologicznej. Po zakończonym leczeniu konsolidującym stosuje się kolejny etap, tzw. leczenie postremisyjne, zapobiegające ponownemu rozplemowi komórek białaczkowych. Zalicza się tu trzy możliwości terapeutyczne: alloprzeszczep szpiku kostnego, autoprzeszczep szpiku kostnego, cyklicznie powtarzana przez określony przedział czasowy (najczęściej 2 lata) polichemioterapia. Największą szansę na wyleczenie stwarza obecnie transplantacja szpiku kostnego. W przypadku allotransplantacji przeżycie wolne od choroby po 5 latach od rozpoznania uzyskać można u 45-60% chorych, ok. 10-20% mniej w przypadku autotransplantacji. Wyniki cyklicznie powtarzanej chemioterapii są znacznie gorsze i sięgają najwyżej 10-15% chorych. Klasyczne metody leczenia ostrych białaczek wydają się niewystarczające. Wiązą się również z dużym ryzykiem ciężkich powikłań w trakcie leczenia. Prowadzone są próby zastosowania bardziej wybiórczych metod leczenia. Szczególne nadzieje należy wiązać z coraz doskonalszymi metodami immunoterapii, m. in. zastosowanie przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z np. substancjami cytotoksycznymi, radioizotopami przeciwko odpowiednim antygenom różnicowania, np. anty-CD33. Prowadzone na wielką skalę badania podstawowe mające na celu wyjaśnienie patomechanizmów

ostrzych białaczek i innych nowotworów mogą zaowocować wprowadzeniem do programów nowych leków opartych na zasadzie celu molekularnego zaprojektowanego dla określonego zestawu genów lub ich produktów. Szczególne zainteresowanie dotyczy więc możliwości zahamowania sygnałów wewnątrzkomórkowych, genów oporności wielolekowej i angiogenezy. Przykładem takiego leku I generacji wprowadzonym do leczenia w ostatnich latach pozostaje imatinib, inhibitor kinazy tyrozynowej BCR-ABL powstałej w wyniku translokacji t(9;22) i charakterystycznej głównie dla przewlekłej białaczki szpikowej, ale obecnej również u ok. 20% ostrzych białaczek limfoblastycznych i 1% ostrzych białaczek szpikowych. Imatinib charakteryzuje się wysoką skutecznością w hamowaniu nieprawidłowej kinazy BCR-ABL, jego działanie nie ogranicza się do tego jednego białka. Oddziałuje również hamująco na kinazę ABL, receptor dla płytkotwopochodnego czynnika wzrostu PDGFR (*ang. platelet derived growth factor receptor*), białko KIT (CD117) (Druker i wsp. 2001, Goldman i Melo 2001, Hellmann i Prejzner 2001). Kinazy tyrozynowe mogą pełnić rolę jednego z molekularnych celów w leczeniu ostrzych białaczek.

2.8. Zmienność materiału genetycznego

Organizm posiadający fenotyp prawidłowy, charakterystyczny dla danego gatunku, określany jest jako typ dziki. Organizm o fenotypie zmienionym w wyniku mutacji nazywany jest mutantem. Mutacje są to ilościowe lub jakościowe zaburzenia materiału genetycznego komórki. Dotyczyć mogą one liczby i/lub struktury chromosomów, genów bądź ich fragmentów. Mogą w sposób istotny zaburzać procesy transkrypcji i translacji powodując zmiany poziomu ekspresji lub funkcji produktu danego genu. Spotyka się również mutacje nie wpływające w jakikolwiek sposób na czynności ich własnych produktów.

Aberracje chromosomowe dotyczą zaburzeń liczby i/lub struktury chromosomów. Aneuploidia polega na niewielkich odchyleniach od podstawowej liczby chromosomów. Poliploidia to zwiększenie lub zmniejszenie liczby chromosomów o wielokrotność całkowitej haploidalnej ich liczby. Tak zwane duże rearanżacje genowe polegają na duplikacjach, polegających na powieleniu fragmentu DNA w obrębie genu, insercjach, polegających na wstawieniu do genu sekwencji zwykle pochodzących spoza jego obszaru lub delecjach polegających na braku genu lub jego

fragmentu. Mutacje punktowe polegają na zmianie pojedynczego nukleotydu w obrębie kodonu. Można wśród nich wyróżnić:

-insercje - wstawienie pojedynczego nukleotydu do sekwencji genu.

-delecje - ubytku pojedynczego nukleotydu w sekwencji genu.

-substytucje - zastąpienie jednego nukleotydu innym (tranzycja to zamiana puryny na purynę lub pirymidyny na pirymidynę, transwersja — zamiana pirymidyny na purynę i odwrotnie).

Wyróżnia się następujące typy mutacji punktowych:

-mutacje zmiany sensu: w obrębie kodonu dochodzi do zmiany pojedynczego nukleotydu. Przekłada się to na zmianę pojedynczego aminokwasu w sekwencji białka. W efekcie funkcja takiego białka może być nieprawidłowa.

-mutacje nonsensowne: zmiana nukleotydów prowadzi do przedwczesnego pojawienia się kodonu kończącego translację. W efekcie powstaje niepełnej długości produkt, najczęściej o nieprawidłowej strukturze i funkcji.

-mutacje nieme: dochodzi do zmiany trzeciej zasady kodonu i najczęściej nie następuje zmiana aminokwasu w polipeptydzie z powodu degeneracji kodu genetycznego. W przypadku niektórych kodonów może to dotyczyć również drugiej zasady w kodonie.

-mutacje zmiany ramki odczytu: polegają na zjawisku insercji lub delecji w regionie kodującym genu. Prowadzi to do zmiany ramki odczytu mRNA i błędnego odczytania kolejnych kodonów. Taka nieprawidłowa translacja prowadzi do syntezy produktu często o całkowicie zmienionej sekwencji aminokwasów.

-mutacje transkrypcyjne: dotyczą obszarów promotorowych i/lub regulatorowych genów. Ich konsekwencją może być obniżony poziom transkrypcji danego genu i niedostateczna ekspresja produktu białkowego lub odwrotnie, zwiększony poziom transkrypcji i nadmierna ekspresja produktu.

Polimorfizm genetyczny oznacza występowanie w populacji dwóch lub więcej form danego genu, czyli alleli z częstością większą niż oczekiwana, wynikającą z ogólnej częstości mutacji w danej populacji. Z uwagi na fakt, że częstość mutacji w danej populacji jest trudna do sprecyzowania, przyjęto, że o polimorfizmie można mówić, gdy najrzadszy wariant allelu w danym locus występuje z częstością większą niż 1%. Polimorfizm, podobnie jak mutacja, jest efektem zmian sekwencji DNA.

W zależności od zmian sekwencji DNA wyróżnia się następujące rodzaje polimorfizmów:

-polimorfizm powtórzeń wielokrotnych - dotyczy fragmentów niekodujących i polega na polimorfizmie krótkich powtórzeń tandemowych (ang. short tandem repeat polymorphism, STRP) - występowanie segmentów DNA o długości do 1kpz (zawierających różną liczbę powtórzeń krótkich sekwencji; zmienna liczba powtórzeń tandemowych (ang. *variable number of tandem repeats*, VNTR) - występowanie segmentów DNA o długości od 1 kpz do 30 kpz, zawierających różną liczbę powtórzeń bardziej złożonych wielonukleotydowych sekwencji.

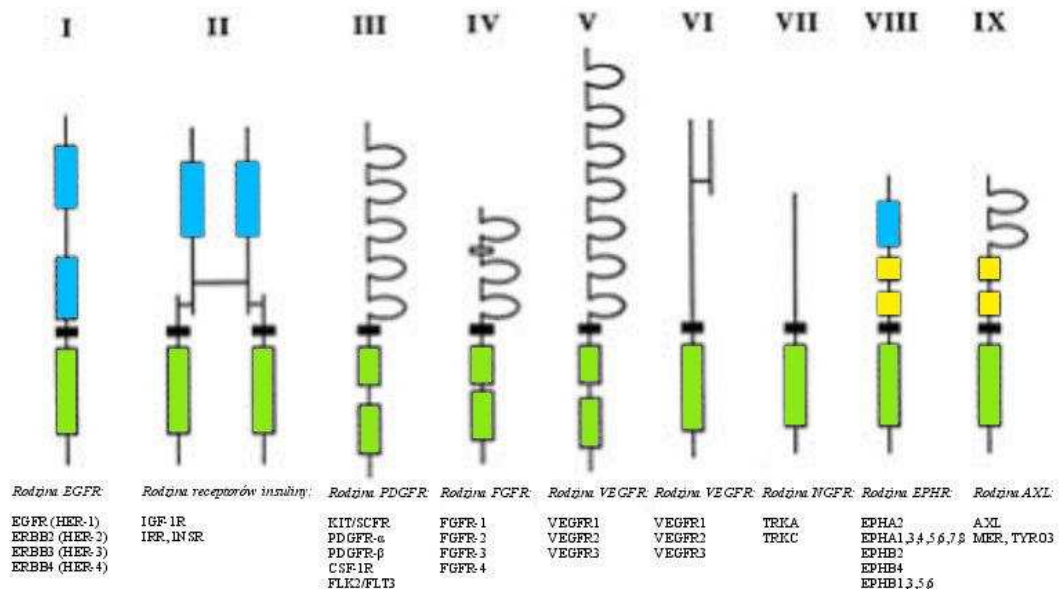
-polimorfizm pojedynczych nukleotydów, analogicznie jak mutacja punktowa może polegać na insercji, delecji lub substytucji pojedynczych nukleotydów. Zlokalizowane mogą być one w części kodującej lub niekodującej genu. Następstwa tej zmienności mogą być nieme lub dotyczyć zmian budowy aminokwasowej produktu lub poziomu jego ekspresji.

2.9. Kinazy tyrozynowe

Kinazy tyrozynowe stanowią dużą grupę ewolucyjnie konserwatywnych białek odgrywających zasadniczą rolę w procesach dojrzewania, wzrostu i różnicowania komórek. Liczne zaburzenia polegające na nadekspresji, mutacjach punktowych, rearanżacjach genów kodujących kinazy stanowią patogenezę wielu chorób i zaburzeń rozwojowych. Zmienione kinazy tyrozynowe odgrywają zasadniczą rolę w procesie nowotworzenia. Wydają się być doskonałym molekularnym celem dla nowej grupy leków przeciwnowotworowych, inhibitorów kinaz tyrozynowych. W ludzkim genomie zidentyfikowano 518 genów kodujących kinazy proteinowe. Stanowi to łącznie 1.7% wszystkich genów. (Manning i wsp. 2002). Spośród nich 90 stanowią geny kodujące białka o aktywności kinaz tyrozynowych, z czego 58 o charakterze receptora (RTK, ang. *receptor tyrosine kinase*) i pozostałe 32 niereceptorowe (NRTK, ang. *nonreceptor tyrosine kinase*). Poszczególne kinazy tyrozynowe przyporządkowano do określonych podgrup w zależności od budowy. Obecnie wyróżnia się 30 podrodzin kinaz tyrozynowych, z czego 20 przypada na receptorowe i 10 na niereceptorowe (Robinson i wsp. 2000). Cechy wspólne receptorowych kinaz tyrozynowych to zewnątrzkomórkowa część wiążąca ligand, przezłonowa hydrofobowa domena, domena cytoplazmatyczna, w skład której wchodzi silnie konserwatywny ewolucyjnie rdzeń pełniący funkcję

centrum aktywnego enzymu i inne dodatkowe sekwencje regulatorowe. Na rycinie 1 przedstawiono schemat budowy dziewięciu typów rodzin kinaz tyrozynowych receptorowych.

Ryc. 1. Schemat budowy receptorowych kinaz tyrozynowych (Na podstawie Fantl i wsp. 1993).

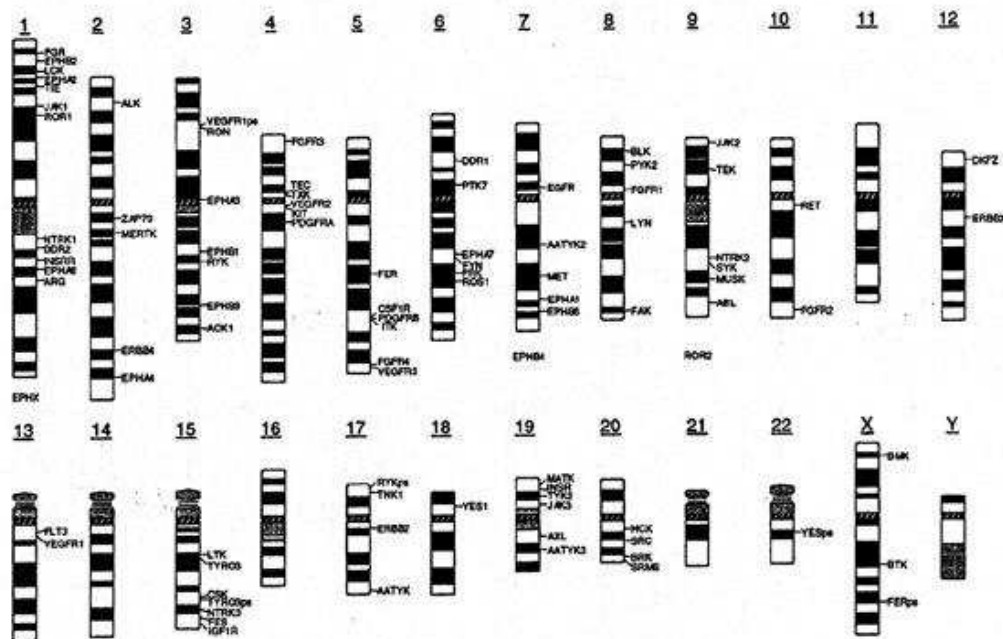


Związanie części zewnątrzplazmatycznej z ligandem powoduje dimeryzację lub oligomeryzację receptora, fosforylację tyrozyny w części wewnątrzplazmatycznej tworząc miejsce wiążące domenę SH2 (ang. *Src homology 2*) różnych białek przekąźnikowych, np. układów kinazy Janusa JAK2, fosfolipazy C γ , GAP (ang. *GTP-ase activating protein*), kinazy fosfatydoinozytolu 3' (PI-3K), Stat1, Ras (Heldin 1995, Rottapel i wsp. 1991, Ullrich i Schlessinger 1990). Wymienione wyżej czynniki pośrednie przekazują sygnały do jądra komórkowego, gdzie wpływają na ekspresję różnych genów poprzez modyfikację czynników transkrypcyjnych.

Kinazy tyrozynowe odgrywają zasadniczą rolę w transformacji nowotworowej komórek. Geny kodujące te białka są potencjalnymi protoonkogenami. Na rycinie 2 przedstawiono lokalizację genów poszczególnych kinaz tyrozynowych na chromosomach u człowieka.

Zaburzenia ekspresji bądź mutacje genów kinaz tyrozynowych mogą przyczynić się do transformacji nowotworowej. Prowadzi do tego szereg poznanych mechanizmów.

Ryc. 2. Lokalizacja genów wybranych kinaz tyrozynowych na chromosomach człowieka (Na podstawie Robinson i wsp. 2000).



Zwiększona amplifikacja lub nadekspresja genów kinaz tyrozynowych powoduje wzrost aktywności enzymatycznej z towarzyszącym zwiększonym przekazywaniem sygnałów wewnątrzkomórkowych. Rearanżacje chromosomów mogą z kolei prowadzić do powstania genów fuzyjnych kodujących białka o charakterze kinaz tyrozynowych wykazujących się konstytutywną aktywnością. Mutacje typu zmiany funkcji lub delecje dotyczące domeny zewnątrzplazmatycznej lub cytoplazmatycznej mogą również powodować konstytutywne kodowanie aktywnego enzymu. Aktywację potencjalnych protoonkogenów należących do kinaz tyrozynowych wywołać może wreszcie auto- lub parakryna aktywacja przez nieprawidłowe lub nadprodukowane ligandy wiążące dany receptor. Wykazano, że duża część nowotworów jest związana z szeroko rozumianymi nieprawidłowościami w obrębie kinaz tyrozynowych (Madhusudan i Ganesan, 2004). W tabeli 1 na następnej stronie przedstawiono rodziny kinaz tyrozynowych receptorowych wraz z przedstawicielami towarzyszącymi poszczególnym typom nowotworów. Kolejna tabela poświęcona jest zależnościom występowania określonych typów nowotworów w przypadkach uszkodzeń kinaz tyrozynowych niereceptorowych.

Tab. 1. Zależności występowania różnych typów nowotworów od receptorowych kinaz tyrozynowych (Na podstawie Madhusudan i Ganesan, 2004).

Typ kinazy	Nowotwory i patologie towarzyszące
Rodzina EGFR	
EGFR (HER-1)	rak sutka, jajnika, płuc, glejak wielopostaciowy i in.
ERBB2 (HER-2)	rak sutka
ERBB3 (HER-3)	rak sutka
ERBB4 (HER-4)	rak sutka, rak jajnika z warstwy ziarnistej pęcherzyka Graafa
Rodzina receptorów insuliny	
IGF-1R	rak szyjki macicy, jasnokomórkowy nerki, mięsaki i in.
IRR, INSR	-
Rodzina PDGFR	
PDGFR- α	glejaki, rak jajnika
PDGFR- β	przewlekła białaczka mielomonocytoza, glejak
CSF-1R	przewlekła białaczka mielomonocytoza, glejak, złośliwa histiocytoza, nowotwór endometrium
KIT/SCFR	GIST, AML, mielodysplazja, mastocytoza, nasieniak, rak płuca
FLK2/FLT3	AML
Rodzina VEGFR	
VEGFR1	angiogeneza nowotworowa
VEGFR2	angiogeneza nowotworowa
VEGFR3	angiogeneza nowotworowa, mięsak Kaposiego, złośliwy śródbłoniak krwionośny
Rodzina FGFR	
FGFR-1	AML, chłoniaki, różne rodzaje guzów litych
FGFR-2	rak żołądka, sutka, gruczołu krokowego
FGFR-3	szpiczak mnogi
FGFR-4	-
Rodzina KLG/CCK(CCK4)	
Rodzina NGFR	
TRKA	rak brodawkowy tarczycy, neuroblastoma
TRKC	wrodzone włókniakomięsaki, AML
Rodzina HGFR	
MET	rak brodawkowy tarczycy, pierwotny wątroby, nerki, mięśniakomięsak prążkowany
RON	rak okrężnicy, pierwotny wątroby
Rodzina EPHR	
EPHA2	czerniak
EPHA1,3,4,5,6,7,8	-
EPHB2	rak żołądka, przełyku, okrężnicy
EPHB4	rak sutka
EPHB1,3,5,6	-

Rodzina AXL	
AXL	AML
MER, TYRO3	-
Rodzina TIE	
TIE	rak żołądka, hemangioblastoma
TEK	angiogeneza nowotworowa
Rodzina RYK	
RYK	rak jajnika
Rodzina DDR	
DDR1	rak sutka, jajnika
DDR2	rak sutka, jajnika
Rodzina RET	
RET	rak brodawkowy i rdzeniasty tarczycy, zespoły MEN
Rodzina ROS	
ROS	glejaki, gwiazdziaki
Rodzina LTK	
ALK	chłoniaki nieziarnicze
LTK	-
Rodzina ROR	
ROR1	-
ROR2	-
Rodzina MUSK	
MUSK	-
Rodzina LMR	
AATYK2	-
AATYK3	-

Tab. 2 Zależności występowania różnych typów nowotworów od niereceptorowych kinaz tyrozynowych (Na podstawie Madhusudan i Ganesan, 2004).

Typ kinazy	Nowotwory i patologie towarzyszące
Rodzina ABL	
ABL	przewlekła białaczka szpikowa, AML, ALL, przewlekła białaczka mielomonocytoza
ARG	-
Rodzina FRK	
BRK	rak sutka
FRK	
SRMS	
Rodzina JAK	
JAK1	białaczki
JAK2	AML, ALL, przewlekłe zespoły mieloproliferacyjne, atypowa postać przewlekłej białaczki szpikowej
JAK3	białaczki, nowotwory wywodzące się z komórek B
JAK4	-

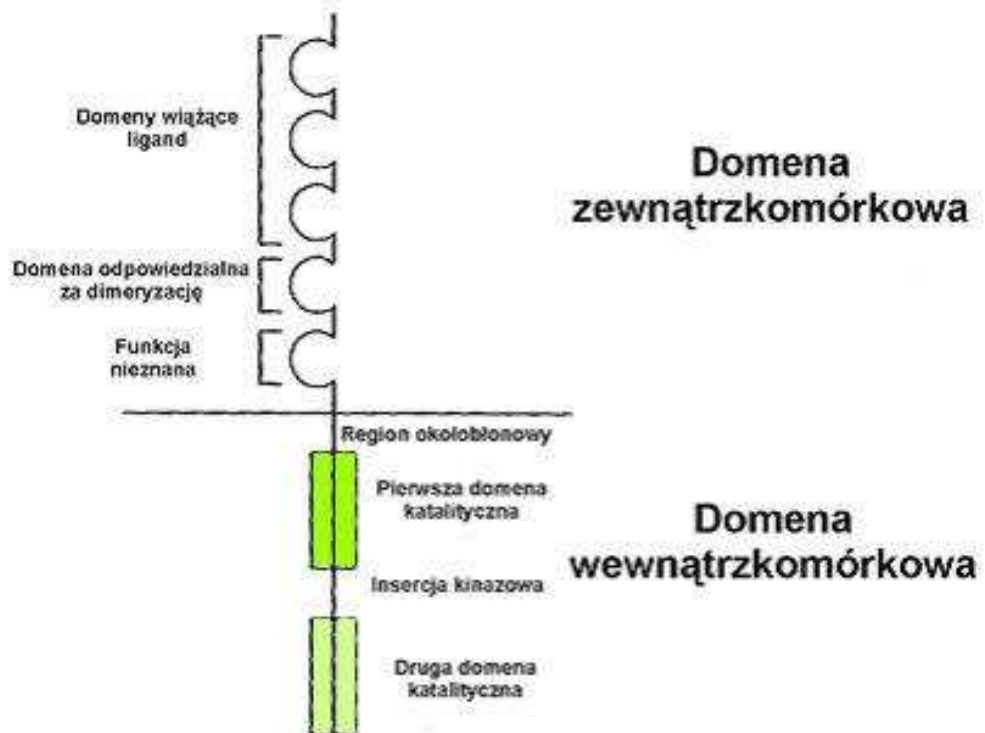
Rodzina SRC-A	
FGR	AML, przewlekła białaczka limfocytowa, chłoniaki
FYN	-
SRC	rak okrężnicy, sutka, trzustki, neuroblastoma
YES1	rak okrężnicy, czerniak
Rodzina SRC-B	
BLK	-
HCK	-
LCK	ALL T-komórkowa, przewlekła białaczka limfocytowa
LYN	-
Rodzina SYK	
SYK	rak sutka
ZAP70	-
Rodzina FAK	
FAK	adhezja, przerzutowanie i inwazyjność licznych nowotworów
PYK2	adhezja, przerzutowanie i inwazyjność licznych nowotworów
Rodzina ACK	
ACK1	-
TNK1	-
Rodzina CSK	
CSK	-
MATK	-
Rodzina FES	
FER	-
FES	-
Rodzina TEC	
BMX	-
BTK	-
ITK	-
TEC	-
TXK	-

Wśród kinaz tyrozynowych związanych szczególnie z występowaniem nowotworów w obrębie komórek hematopoetycznych wyróżnia się szczególnie, należące do III klasy, geny: *KIT*, *PDGFR* (ang. *platelet derived growth factor receptor*), *FLT3* (ang. *fms-like tyrosine kinase*).

2.10. Gen *KIT*

KIT (CD117) to przezbłonowe białko o masie 145 kD zbudowane z 976 aminokwasów o charakterze receptora, należące do rodziny kinaz tyrozynowych typu III (Yarden i wsp. 1987). Jest produktem genu *KIT* zlokalizowanego na ramieniu długim chromosomu 4 (q12) zawierającego 21 eksonów (Besmer i wsp. 1986, Giebel i wsp. 1992, Qui i wsp. 1988). Pierwotnie został zidentyfikowany jako onkogen pochodzenia wirusowego (*v-kit*) odpowiedzialny za aktywność transformującą kociego wirusa mięsaka (Besmer i wsp. 1986). Charakterystyczną cechą strukturalną kinaz tyrozynowych typu III jest występowanie domeny zewnątrzkomórkowej, śródbłonowej i cytoplazmatycznej. Budowa białka *KIT* schematycznie przedstawiona na rycinie 3.

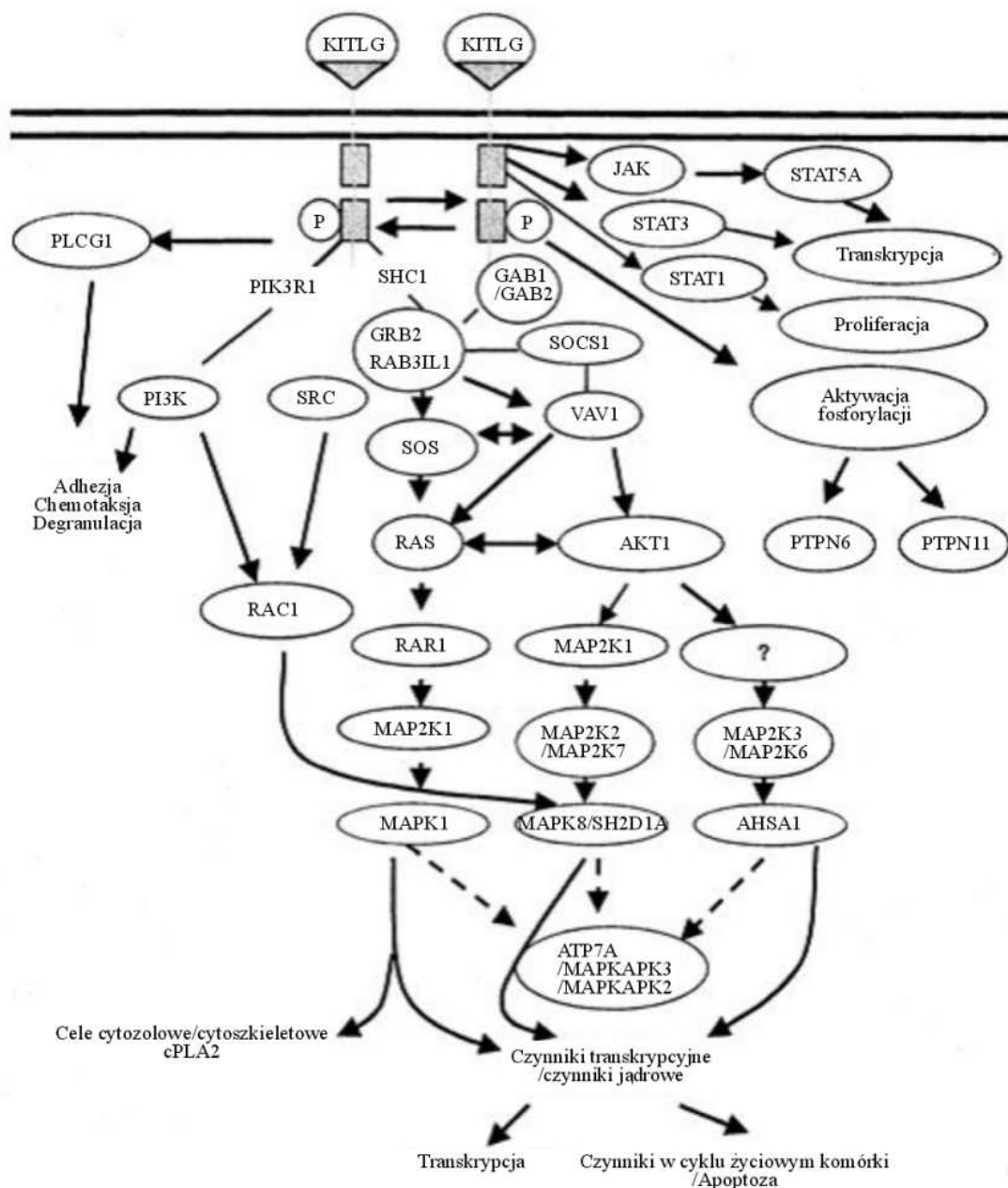
Ryc. 3. Schemat budowy receptora *KIT* (Na podstawie Linnekin 1999).



Domena zewnątrzkomórkowa zbudowana jest z pięciu pętli immunoglobulinopodobnych, z których trzy pierwsze odpowiadają za wiązanie się z ligandem, kolejna czwarta za dimeryzację receptora, funkcja piątej nie została dotychczas poznana. Domena śródbłonowa łączy domenę zewnątrzkomórkową z domeną wewnątrzkomórkową (cytoplazmatyczną). Część cytoplazmatyczna receptora zbudowana jest z domeny okołobłonowej, odgrywającej kluczową rolę

w autoregulacji fosforylacji receptora i domeny o aktywności kinazy tyrozynowej. W obrębie tej ostatniej wyróżnić można kinazę tyrozynową I (region wiążący ATP) i kinazę tyrozynową II (region fosfotransferazy), obie oddzielone hydrofilową wstawką. Całość zakończona jest C-końcem. (Giebel i wsp. 1992, Fantl i wsp. 1993). Aktywność kinazy tyrozynowej KIT jest regulowana przez ligand KIT (ang. *stem cell factor SCF, Steel factor, mast cell growth factor*). Związanie się receptora CD117 z ligandem powoduje jego dimeryzację, fosforylację tyrozyny w części wewnątrzplazmatycznej tworząc miejsce Tyr-719 wiążące domenę SH2 (ang. *Src homology 2*) białek przekąźnikowych kinazy fosfatydyloinozytolu 3' (PI-3K), układów kinaz Janusa JAK/STAT (ang. *Janus family kinases/signal transducers and activators of transcription*), fosfolipazy C γ , kinaz rodziny Src (ang. *Src kinases family*), Ras, MAP (ang. *mitogen-activated protein kinases*). (Heldin, 1995, Rottapel i wsp. 1991, Ullrich i Schlessinger, 1992, Taylor i Metcalfe, 2000). Aktywacja receptora KIT prowadząc do aktywacji sygnalizacji wewnątrzkomórkowej reguluje procesy proliferacji, apoptozy, adhezji. Na rycinie 4 przedstawiono mechanizmy wewnątrzkomórkowe aktywowane przez receptor KIT.

Ryc. 4 Mechanizmy wewnątrzkomórkowe i szlaki sygnałowe aktywowane przez receptor CD117 (Na podstawie Taylor i Metcalfe 2000).



Białko CD117 odgrywa zasadniczą rolę w procesie hematopoezy, melanogenezy i gametogenezy (Besmer i wsp. 1993). Jego obecność wykazano zarówno na komórkach szpiku kostnego (Ashman i wsp. 1991), jak i innych, np. melanocytach, komórkach śródbłonna, nabłonka gruczołu piersiowego, ślinianek, gruczołów potowych, astrocytach, komórkach kanalika nerkowego, śródmiaższu jąder i jajników, komórkach Cajala (Broudy i wsp. 1994, Lammie i wsp. 1994,

Mayrhofer i wsp. 1987, Natali wsp. 1992). Blisko 70% CD34 pozytywnych komórek szpiku prezentuje również białko KIT (Ashman i wsp. 1991). CD117 jest obecny na komórkach progenitorowych hematopoezy (Ogawa i wsp. 1991). Gęstość receptorów KIT występujących na zdrowych komórkach blastycznych maleje wraz z dojrzewaniem. Dojrzałe komórki wywodzące się z układu limfoidnego i mielopoetycznego nie wykazują obecności CD117, za wyjątkiem komórek tucznych, części komórek NK, megakariocytów i aktywnych płytek krwi (Metcalf i Nicola 1991).

W trakcie hodowli komórek KIT pozytywnych uzyskuje się populacje komórek tworzących kolonie, natomiast brak lub unieczynnienie CD117 powoduje niemożność ich tworzenia się (Bridgel i wsp. 1992, Ogawa i wsp. 1991). Ligand KIT jest uznawany za czynnik wzrostu hematopoezy działający na wczesnych jej etapach. Samodzielnie nie pobudza mielopoezy, natomiast znacznie zwiększa działanie innych czynników wzrostu, jak czynnik stymulujący kolonie granulocytarne (G-CSF, ang. *granulocyte colony stimulating factor*), czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagowe (GM-CSF, ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), interleukina 3 (IL-3) i interleukina 6 (IL-6) na komórki linii mieloidalnych. W obecności erytropetyny stymuluje formowanie się mniej zróżnicowanych prekursorowych komórek erytroidalnych BFU-E (ang. *burst-forming unit – erythroid*) (McNiece i wsp. 1991). Zastosowanie u dorosłego osobnika przeciwciał monoklonalnych anti-KIT powoduje pancytopenię i znaczny spadek komórkowości szpiku kostnego (Ogawa i wsp. 1991). Może to pośrednio świadczyć o tym, że ciągła aktywność kinazy tyrozynowej KIT może być niezbędna do prawidłowej hematopoezy w szpiku. Istnieje dość silna negatywna regulacja ekspresji KIT w trakcie hematopoezy. KIT zaangażowany jest zarówno w odnowę komórek progenitorowych szpiku kostnego jak i dojrzewanie linii szpikowej i limfoidalnej. W miarę pojawiania się form bardziej dojrzałych, poziom ekspresji KIT spada. Wyjątek stanowią tutaj komórki tuczne, gdzie wraz z dojrzewaniem zwiększa się gęstość receptora CD117 na ich powierzchni (Akin i Metcalfe, 2004).

Znanych jest szereg mutacji w obrębie genu *KIT*. Konstrytywne obserwowane są w rodzinnym albinizmie zlokalizowanym (ang. *piebaldism*) (Giebel i Spritz, 1991). Mutacje w obrębie genu *KIT*, można podzielić na dwie zasadnicze grupy: dotyczące centrum aktywnego kinazy i regulujące jej ekspresję lub powodujące uniezależnienie od liganda *KIT*. Większość mutacji somatycznych

genu *KIT* stanowią pojedyncze substytucje nukleotydowe, których wynikiem jest najczęściej zmiana w sekwencji aminokwasowej białka. Mutacje typu zmiany ramki odczytu (ang. *frame-shift mutations*) oraz mutacje nonsensowne (ang. *nonsense*), w wyniku których dochodzi do przedwczesnego pojawienia się kodonu STOP (TAG, TAA, TGA), prowadząc do wcześniejszego zakończenia translacji, są obserwowane w przypadku *KIT* zdecydowanie rzadziej. Również mutacje *null*, do których należą delecje i insercje oraz mutacje nonsensowne (ang. *nonsense mutations*) prowadzące najczęściej do powstania nieprawidłowego produktu białkowego nie są spotykane w *KIT* tak często, jak mutacje punktowe. Uważa się, że mutacje somatyczne w obrębie *KIT* mogą inicjować proces nowotworzenia. Występują w różnych typach nowotworów, np. w nasieniaku, rozrodczaku, guzach podścieliska przewodu pokarmowego (ang. *gastrointestinal stromal tumours GIST*), czerniaku, zespołach mieloproliferacyjnych i ostrej białaczce szpikowej (Hirota i wsp. 1998, Nakata i wsp. 1995, Gari i wsp. 1999, Furitsu i wsp. 1993, Went i wsp. 2004, Singer i wsp. 2003). Lokalizacja mutacji w poszczególnych eksonach może być charakterystyczna dla określonych typów nowotworów. W przypadkach rozrodczaków i nasieniaków dotyczą one eksonu 17 (Tian i wsp. 1999). Lokalizacja mutacji punktowych w guzach podścieliska przewodu pokarmowego jest zróżnicowana i dotyczy najczęściej eksonów 9, kodującego domenę zewnątrzkomórkową, 11, kodującego domenę okołobłonową, 13, 14 i 17 kodujących podjednostki wewnątrzkomórkowe o aktywności kinazy tyrozynowej (Hirota i wsp. 1998, Lasota i wsp. 2000, Lux i wsp. 2000, Rubin i wsp. 2001, Andersson i wsp. 2002). Dla chłoniaków z limfocytów T i NK wywodzących się z górnych dróg oddechowych znaleziono charakterystyczną mutację w obrębie eksonu 17 dotyczącą kodonu 825 (Val825Ala) (2474T>C) (Jaffe i wsp. 1999). Chorobami, wśród których często stwierdza się mutacje punktowe w obrębie genu *KIT* są stany patologiczne dotyczące rozplemu mastocytów, włączając białaczki mastocytowe. Zaangażowane są wtedy najczęściej eksony 11 - kodon 560 (Val560Gly) (1679T>G), 17 – kodon 816 i 839 (Asp816Val [2447A>T] i Glu839Lys [2515G>A]) (Ma i wsp. 1999, Furitsu i wsp. 1993, Nagata i wsp. 1995). Obecność mutacji punktowej w obrębie kodonu 52 w eksonie 2 (Asp52Asn) (154G>A) stwierdzono w zespołach mieloproliferacyjnych jak przewlekła białaczka szpikowa i mielofibroza. Nie znaleziono do tej pory znaczenia funkcjonalnego takiej zamiany, co może sugerować ograniczone znaczenie tego typu zmian w patogenezie chorób mieloproliferacyjnych. (Kimura i wsp. 1997, Nakata

i wsp. 1995, Longley i wsp. 2001). Wydaje się jednak, że jednym z potencjalnych źródeł transformacji nowotworowej w AML mogą być mutacje w obrębie genu *KIT*. Niektóre z nich powodują dimeryzację i autofosforylację w części cytoplazmatycznej receptora bez wcześniejszej jego reakcji z ligandem SCF (Furitsu i wsp. 1993, Kanakura i wsp. 1993), co sugeruje aktywację *KIT* na zasadzie autokrynnej, inne, dotyczące części zewnątrzplazmatycznej receptora są mutacjami aktywującymi receptor w nieznanym mechanizmie (Gari i wsp. 1999). W ostrej białaczce szpikowej mutacje wykrywa się najczęściej w eksonach 8, 10, 17. W przypadku eksonu 8 dotyczą one wtedy najczęściej AML-M2 z translokacją (8;21) i AML-M4 z inwersją chromosomu 16. Polegają na delecji i insercji fragmentów różnej długości, najczęściej bez zmiany ramki odczytu, w obrębie kodonu 419 dla kwasu asparaginowego. (Gari i wsp. 1999). Mutacja w eksonie 10, kodującym część przezbłonową białka, polegała zwykle na zamianie waliny na izoleucynę (Val530Ile) w kodonie 530 (1588G>A) (Longley i wsp. 2001). Najbardziej charakterystyczną, wykrywaną w obrębie eksonu 17, jest mutacja punktowa dotycząca kodonu 816 prowadząca do zamiany kwasu asparaginowego na walinę (Asp816Val) (2447A>T) (Ning i wsp. 2001). Dwa pierwsze opisane wyżej rodzaje mutacji wykryte w ostrych białaczkach szpikowych należą do mutacji aktywujących i bezpośrednio nie dotyczą centrum aktywnego kinazy, w przeciwieństwie do ostatniej, będącej klasycznym przykładem mutacji zmieniającej konformację centrum aktywnego enzymu, również aktywującej. Rozróżnienie podtypu mutacji może mieć ważne implikacje terapeutyczne. Przy próbach zastosowania specyficznych inhibitorów kinaz tyrozynowych można spodziewać się oporności w przypadku występujących mutacji w obrębie centrum aktywnego kinazy (Kindler i wsp. 2004). Wykazano również, że w części nowotworów, mimo że nie stwierdza się mutacji w obrębie genu *KIT*, ekspresja receptora pozostaje wysoka (Went i wsp. 2004). Może to sugerować, że nadekspresja i aktywacja genu *KIT* wywołana jest innymi mechanizmami molekularnymi prowadzącymi do modyfikacji ekspresji tego genu. W ostrej białaczce szpikowej ekspresję CD117 wykazano na wszystkich jej morfologicznych podtypach, jednak dotychczasowe prace nie wykazały jednoznacznej korelacji między podtypem AML wg klasyfikacji FAB a stopniem ekspresji *KIT*. Funkcja CD117 w ostrych białaczkach szpikowych nadal pozostaje nie w pełni poznana.

3. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Zaburzenia regulacji sygnałów wewnątrzkomórkowych zależnych od kinaz tyrozynowych odgrywają ważną rolę w karcynogenezie. Jednym z pierwszych inhibitorów kinaz tyrozynowych jakie zostały wprowadzone do leczenia był imatinib. Pierwotnie jego skuteczność udowodniono w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej, gdzie celem molekularnym leku pozostaje produkt genu fuzyjnego *BCR/ABL* o charakterze kinazy tyrozynowej. Ponieważ lek ten wykazywał również działanie hamujące wobec innych kinaz tyrozynowych, szczególnie białka KIT, podjęto szereg badań mających na celu oszacowanie częstości występowania tego białka na komórkach w różnych typach nowotworów. Wśród wysegregowanych nowotworów, w których stwierdzono podwyższoną ekspresję KIT przeprowadzono próby zastosowania imatinibu jako potencjalnej substancji o charakterze przeciwnowotworowym. Znaczące odpowiedzi kliniczne osiągnięto u pacjentów z nowotworami podścieliska przewodu pokarmowego (*ang.* GIST), nawet w bardzo zaawansowanym stadium (Joensuu i wsp. 2002, Demetri i wsp. 2002, Joensuu i wsp. 2001). Jednocześnie ukazały się doniesienia prezentujące fakt, że nie wszyscy pacjenci z wysoką ekspresją białka KIT odnosili korzyści z zastosowania inhibitorów kinaz tyrozynowych. Również próby podawania tego leku chorym na inne nowotwory nie przynosiły spodziewanych rezultatów, mimo wysokiej ekspresji białka KIT (Johnson i wsp. 2003). Przedstawione dane sugerowały, że odpowiedź na inhibitory kinaz zależy głównie od obecności mutacji w obrębie genu *KIT* i potencjalnie również od lokalizacji i typu tych mutacji (Kemmer i wsp. 2004, Longley i wsp. 2001). Chorzy z obecnością mutacji w obrębie eksonu 11 odpowiadali na terapię lepiej niż ci, u których stwierdzano zmiany genetyczne w obrębie eksonu 9. Odpowiedź u osób, u których nie stwierdzano obecności mutacji w obrębie badanego genu pozostawała minimalna (Heinrich i wsp. 2002). Białko KIT (CD117) zostało poznane jednocześnie jako antygen, który w dość dobry sposób wyróżnia komórki pochodzenia szpikowego. Podwyższona ekspresja CD117 dotyczy praktycznie wszystkich podtypów ostrej białaczki szpikowej. Kwestią otwartą pozostaje mechanizm, który odpowiada za wzrost ekspresji antygeny KIT w tej chorobie. Jednym z możliwych mechanizmów jest powstawanie mutacji w obrębie samego genu *KIT*. Przy założeniu, że nadekspresja produktu genu KIT może być związana z mutacją lub mutacjami w jego obrębie, można przypuszczać, że wyższa

ekspresja CD117 będzie świadczyła o częstszym występowaniu mutacji w obrębie genu *KIT*. Wobec pojawiania się coraz nowszych, dostępnych do zastosowania substancji o charakterze inhibitorów kinaz tyrozynowych, w tym białka KIT, i wobec faktu niezadowalających odpowiedzi na te inhibitory u pacjentów bez mutacji, celowe wydaje się określanie obecności takich zmian genetycznych w populacji chorych. Wyselekcjonowanie odpowiedniej grupy pacjentów, u której celowe byłoby zastosowanie tego typu nowoczesnego leczenia byłoby niezmiernie potrzebne z uwagi również na bardzo wysokie koszty takiej potencjalnej terapii.

Sformułowano następujące cele pracy:

1. Określenie częstości występowania antygenu KIT (CD117) na komórkach blastycznych w ostrych białaczkach.
2. Porównanie częstości występowania badanego antygenu w zależności od podtypu ostrej białaczki w klasyfikacji FAB.
3. Określenie częstości występowania mutacji w obrębie genu *KIT* w ostrych białaczkach.
4. Określenie korelacji między poszczególnymi rodzajami mutacji a poziomem ekspresji antygenu CD117 na komórkach blastycznych w ostrych białaczkach.

4. MATERIAŁ I METODY

4.1. Materiał

Badaniami objęto 75 chorych na ostrą białaczkę szpikową, limfoblastyczną, bifenotypową i biklonalną nowo-zdiagnozowanych i pozostających pod opieką Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantologii Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 1999-2003. Materiał do badań stanowił szpik kostny uzyskany biopsją aspiracyjną, w części przypadków (8 na 75), kiedy uzyskanie szpiku nie było możliwe, krew obwodowa – oba z dodatkiem wersenianu dwusodowego jako antykoagulantu. U części pacjentów, u których materiał do badań uzyskiwano retrospektywnie wykorzystano materiał archiwalny w postaci zabezpieczonych wcześniej rozmazów szpiku na szkiełkach podstawowych (10 na 75) archiwizowanych w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantologii Akademii Medycznej w Gdańsku. Do przeprowadzonych badań wykorzystano materiał uzyskany rutynowo w celu postawienia rozpoznania.

Rozpoznanie ostrej białaczki postawiono na podstawie klinicznych, morfologicznych i cytochemicznych kryteriów wg klasyfikacji francusko-amerykańsko-brytyjskiej (FAB) (Bennett i in. 1976).

Badania cytometryczne wykonano w Pracowni Cytometrii Przepływowej Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantologii Akademii Medycznej w Gdańsku (kierownik pracowni dr Krzysztof Lewandowski). W pracy analizowano dane 51 ostrych białaczek szpikowych i 16 ostrych białaczek limfoblastycznych. Analizie poddano 1 przypadek AML M0, 13 przypadków M1, 12 - M2, 3 - M3, 17 - M4, 5 - M5 (1 M5a i 4 M5b), 16 ALL, 1 ostrej białaczki bifenotypowej i 1 ostrej białaczki biklonalnej.

Badania molekularne wykonałem w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Akademii Medycznej w Gdańsku (kierownik – prof. dr hab. Janusz Limon). Analizę mutacji przeprowadzono w obrębie tych eksonów, w których wcześniejsze doniesienia wskazywały na możliwość wystąpienia zmian genetycznych, czyli eksonów 8, 10, 11, 17 genu *KIT*. Materiał pochodził od 75 pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki, z czego rozpoznanie AML M0 stanowiło 1 przypadek, M1 – 13 przypadków, M2 – 12, M3 – 7, M4 – 18, M5 – 6, ALL 16 przypadków, ostra białaczka bifenotypowa - 1 przypadek i ostra białaczka biklonalna - 1 przypadek. Z uwagi na możliwość wykorzystania materiału archiwalnego w postaci szkiełek z rozmazem postanowiono analizę prowadzić w oparciu o DNA.

4.2. Metody

4.2.1. Analiza immunocytometryczna

Przygotowanie zawiesin do badania immunofenotypowego wykonano zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Grupy Roboczej ds. Cytometrii Przepływowej i Analizy Obrazowej (Rothe i Schmitz, 1996). Oznaczenia powierzchniowych antygenów CD117 przeprowadzano przeciwciałami anti-CD117 (Pharmingen, USA) sprzężonymi z fikoerytryną stosując technikę dwukolorowych barwień. Analizy dokonywano przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton-Dickinson, USA) z firmowym oprogramowaniem Cell-QUEST. Poziom nieswoistego wiązania przeciwciał ustalano w oparciu o odpowiednią kontrolę izotypową. Każdorazowo analizowano co najmniej 10000 komórek zawiesiny. Oznaczenie antygenowe przeprowadzono na komórkach w bramce obejmującej komórki jednojądrzaste. Za ekspresję antygenu CD117 przyjmowano jego obecność na co najmniej 10% badanych komórek.

4.2.2. Izolacja DNA

Do badania obecności i rodzaju mutacji genu *KIT* wykorzystano DNA wyizolowane z komórek jądrzastych

- 5 ml szpiku kostnego z dodatkiem wersenianu dwusodowego (n = 57) lub
- 10 ml krwi obwodowej z dodatkiem wersenianu dwusodowego (n = 8) lub
- materiału uzyskanego ze szkiełek podstawowych z rozmazu szpiku kostnego (n = 10)

Izolację DNA genomowego przeprowadzano za pomocą standardowej metody z użyciem proteiny K, ekstrakcji fenolowo-chloroformowej i precypitacji etanolem.

Do zabezpieczonego wcześniej materiału (szpiku kostnego lub krwi obwodowej z dodatkiem wersenianu dwusodowego) dodawano 5 ml roztworu lizującego 1xRBC i wirowano w 3220 x g w temperaturze 4°C przez 10 minut. Czynność powtarzano do czasu uzyskania białawego osadu na dnie próbówki. Supernatant zlewano, do osadu dodawano 3-5 ml roztworu NaCl/EDTA, silnie wstrząsano i dodawano kolejno 500 µl 10% SDS i 12 µl proteiny K (20mg/ml). Całość inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Następnego dnia do strawionego materiału dodawano 3 ml fenolu, wstrząsano przez 30 minut, wirowano w 3220 x g

w temperaturze 4°C przez 15 minut. Górną warstwę przenoszono do nowej probówki, dodawano 5 ml mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy (24:1), wytrząsano przez 30 minut a następnie wirowano w 6300 x g w temperaturze 4°C przez 10 minut. Czynność powtarzano trzykrotnie. Uzyskaną górną warstwę po raz kolejny przenoszono do nowej probówki, dodawano 5 ml izopropanolu i precypitowano co najmniej przez 1 godzinę w temperaturze – 20°C. Wirowano w 6300 x g w temperaturze 4°C przez 10 minut, usuwano izopropanol i osad przepłukiwano 70% etanolem. Czynność powtarzano trzykrotnie. Probówki ze strąconym DNA wirowano w 6300 x g w temperaturze 4°C przez 30 minut, następnie supernatant usuwano i uzyskany w ten sposób materiał suszono pod digestorium do całkowitego odparowania płynu. DNA zawieszano w 100 µl podwójnie destylowanej wody i umieszczano w -20°C.

W przypadku izolacji z rozmazu szpiku kostnego, resztki olejku immersyjnego usuwano płuczając szkiełka ksylenem a następnie etanolem o malejącym stężeniu (96%, 96%, 70%, 70%). Materiał suszono i jałowym skalpelem zeskrobywano do 1,5 ml probówki. Dodawano 300 µl buforu TE, 12.5 µl 20% SDS i następnie 50 µl proteiny K (2mg/ml). Całość inkubowano przez kilkanaście godzin w temperaturze 56°C. Ze strawionym materiałem postępowano analogicznie jak przy izolacji z krwi obwodowej lub szpiku kostnego używając odpowiednio mniejszej objętości dodawanych roztworów (400 µl fenolu, 600 µl mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy, 1 ml izopropanolu i 70% etanolu). Uzyskane wysuszone DNA zawieszano w 50 µl podwójnie destylowanej wody i umieszczano w -20°C.

4.2.3. Oznaczanie stężenia DNA

Pomiary stężenia wyizolowanego wcześniej DNA wykonywano przy użyciu spektrofotometru Helios. Wynik odczytywano przy długości fali 260 nm i 280 nm. Porównując wyniki sprawdzano równocześnie stopień czystości DNA. Po uzyskaniu wyniku próbki rozcieńczano do uzyskania stężenia DNA 50 ng/µl.

4.2.4. Amplifikacja DNA

Eksony 8, 10, 11, 17 genu *KIT* zostały zamplifikowane w łańcuchowej reakcji polimerazy, do której użyto starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji badanego genu wg Giebel i in. 1992 i dostępnej w bazie *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pod numerami: *164920, NM000222, NM001093772. W przypadku eksonu 8 i 17 używano dwóch różnych par starterów dla każdego z nich, pierwszej wykorzystywanej do denaturacyjnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej i bezpośredniego sekwencjonowania i drugiej – znakowanej 5'-FAM wykorzystywanej do elektroforezy kapilarnej dla eksonu 8 i odpowiednio do polimorfizmu jednoniciowych fragmentów DNA dla eksonu 17. Sekwencje starterów i wielkości produktów reakcji amplifikacji z poszczególnymi parami starterów przedstawia tabela nr 3.

Tab. 3. Sekwencja starterów i oczekiwana długość produktów reakcji PCR eksonów 8, 10, 11 i 17 genu *KITC*.

Nazwa startera/ Ekson genu <i>KITC</i>	Sekwencja (5' – 3')	Długość produktu (pz)
CKITex8F1	CCATTTCTGTTTTCTGTAGCAA	88
CKITex8R1	GAATCCTGCTGCCACACAT	
CKITex8F2	GCTGAGGTTTTCCAGCACTC	200
CKITex8R2	TGCATTATAAGCAGTGCCAAA	
CKITex10F2	TGCCAAAGTTTGTGATTCCA	180
CKITex10R2	GAGCACTCTGGAGAGAGAACAA	
CKITex11F2	CCAGAGTGCTCTAATGACTG	215
CKITex11R2	AGCCCCTGTTTCATACTGAC	
CKITex17F1	CCTCCAACCTAATAGTGTAT	168
CKITex17R1	AGGACTGTCAAGCAGAGAAT	
CKITex17F2	CTCTTTACAAGTTAAAATGAA	219
CKITex17R2	AATCCTTTGCAGGACTGTCA	

Reakcję PCR przeprowadzano w objętości 25 μ l. Mieszanina reakcyjna zawierała około 50ng genomowego DNA. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 4.

Tab. 4. Skład mieszaniny w reakcji PCR do amplifikacji eksonów genu *KITC*

Składnik mieszaniny	Stężenie początkowe	Objętość (μ l)
Bufor do reakcji PCR	10x	2,5
MgCl ₂	25 mM	1,25
dNTPs	10 mM	0,8
Starter F	10 mM	0,8
Starter R	10 mM	0,8
Polimeraza Taq	5 U/ μ l	0,2
Woda	–	16,65
DNA	50 ng/ μ l	2
Razem	–	25

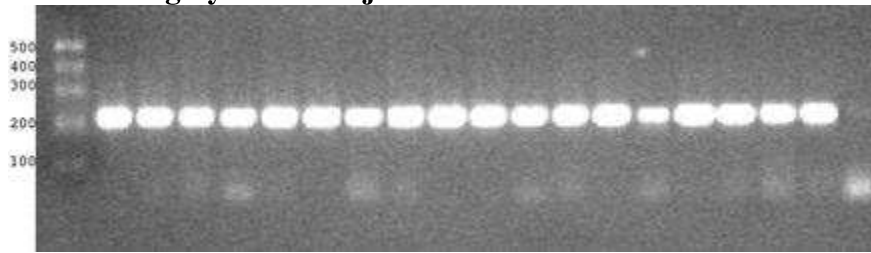
Mieszaninę zawierającą wszystkie składniki do reakcji PCR (tabela 4), z wyjątkiem matrycowego DNA, rozdzielano do probówek do PCR o objętości 200 μ l, następnie dodawano matrycowe DNA. W każdej reakcji stosowano kontrolę pozytywną i negatywną w celu potwierdzenia prawidłowego przebiegu reakcji i wiarygodności przeprowadzonej reakcji. Kontrolę pozytywną stanowiło DNA o znanej zdolności do amplifikacji metodą PCR. Jako kontrolę negatywną stosowano zamiast DNA taką samą objętość podwójnie destylowanej wody. Probówki po odwirowaniu umieszczano w termocyklerze i prowadzono reakcję PCR o profilu temperaturowym podanym w tabeli 5. Warunki reakcji ustalono empirycznie.

Tab. 5. Profil temperaturowy reakcji PCR do amplifikacji eksonów genu *KIT*.

Etap	Temperatura (°C)	Czas (sek.)	Liczba cykli
wstępna denaturacja	95	300	–
denaturacja	95	30	39
przyłączanie starterów	50	30	
wydłużanie	72	30	
końcowe wydłużanie	72	600	–

Efektywność amplifikacji sprawdzano przy użyciu elektroforezy agarozowej. Próbkę ponownie wirowano i z każdej pobierano 5 μ l mieszaniny, do których dodawano 1 μ l buforu obciążającego i nanoszono, obok wzorca masowego DNA na przygotowany 2% żel agarozowy przygotowany z bromkiem etydyny. Rozdział prowadzono w buforze TBE, przy napięciu 120V przez 30 minut. Wizualizację wyników przeprowadzono w świetle UV przy użyciu transluminatora. Na rycinie 5 przedstawiono wynik reakcji PCR po rozdziale elektroforetycznym.

Rycina 5 Przykładowy żel agarozowy przygotowany z bromkiem etydyny. W pierwszej ścieżce marker wielkości od 50 do 500 pz, w kolejnych zamplifikowany produkt – eksonu 11 genu *KIT* o długości 215pz. W ostatniej kontrola negatywna reakcji.

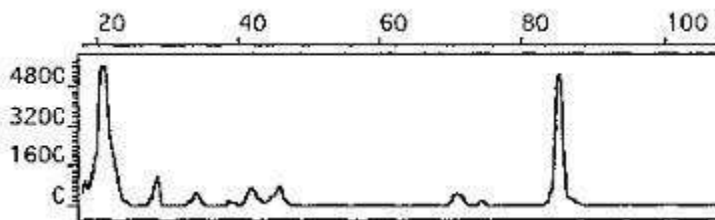


4.2.5. Elektroforeza kapilarna

Do wstępnej analizy eksonu 8 wykorzystano metodę elektroforezy kapilarnej z uwagi na fakt, że dotychczasowe prace wykazywały mutacje typu delecji/insercji w obrębie tego eksonu, w związku z czym różna długość produktu reakcji PCR byłaby wskazówką do dalszej analizy za pomocą sekwenatora. Do analizy mieszano po 1 μl produktu reakcji PCR eksonu 8 badanego genu znakowanego FAM, uzupełniono wodą do objętości 20 μl i mieszano z 12 μl dejonizowanego formamidu oraz 0.5 μl markera wielkości znakowanego TAMRA GeneScan-500. Próbkę denaturowano w temperaturze 95°C przez 3 minuty i chłodzono do temperatury 4°C. Elektroforezę prowadzono w temperaturze 60°C w automatycznym sekwenatorze ABI Prism310. Rozdział przeprowadzano przez 24 minuty przy napięciu 15 kV i natężeniu prądu poniżej 8 μA . Intensywność fluorescencji odczytywano z użyciem filtra C i zapisywano przy pomocy programu komputerowego ABI Prism GeneScan 3.1 zintegrowanego z sekwenatorem.

Przy analizie wyników porównywano sygnały pochodzące z DNA prawidłowego z sygnałami pochodzącymi z DNA wyizolowanego od osób chorych. Zwracano uwagę na kształt i liczbę pików. Przypadek uznawano za nieinformacyjny, jeżeli w próbce pochodzącej od osoby chorej widoczny był tylko jeden szczyt fluorescencji wielkości 88 par zasad. Przykładowy elektorforogram przedstawiono na rycinie 6.

Ryc. 6. Przykładowy elektroforogram produktu badanego fragmentu eksonu 8 *KIT*.



4.2.6. Polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (SSCP).

Analizie za pomocą polimorfizmu jednoniciowych fragmentów DNA (SSCP, ang. *single strand conformation polymorphism*) poddano produkty amplifikacji eksonów 11 i 17 genu *KIT*. Metoda ta opiera się na różnej szybkości migracji jednoniciowej cząsteczki DNA w żelu poliakrylamidowym w zależności od jej konformacji przestrzennej. Fragmenty DNA o takiej samej sekwencji nukleotydów i wielkości przyjmują identyczną konformację i migrują w żelu z taką samą prędkością. W przypadku zmiany sekwencji, ułożenie przestrzenne zostaje zmienione, co może bezpośrednio wpływać na prędkość migracji w żelu i w efekcie dawać zmianę obrazu elektroforetycznego.

Pozytywną kontrolę stanowił materiał wyizolowany z komórek HML-1 (ang. *Human Mast Cell Leukemia type 1*) ze znanymi wcześniej mutacjami w obrębie badanego genu - Val560Gly, Asp816Val. Komórki HML-1 pochodziły od dr Masao Mizuki z Uniwersytetu Osace w Japonii. Negatywną kontrolę stanowiły zamplifikowane fragmenty badanych eksonów, w których w wyniku bezpośredniego sekwencjonowania nie stwierdzono obecności mutacji.

Do przygotowania 5 ml żelu poliakrylamidowego używano 2 ml wody podwójnie destylowanej, 2 ml 30% akrylamidu (stosunek akrylamidu do bisakrylamidu 50:1), 500 μ l 10xTBE, 500 μ l 50% glicerolu, 50 μ l APS i 12.5 μ l TEMED'u. Przy pomocy wirówki próżniowej zmniejszono objętość zamplifikowanego produktu do 5 μ l. Mieszano z 5 μ l dejonizowanego formamidu, następnie denaturowano w temperaturze 95°C przez 5 minut i schładzano do temperatury 4°C. Dodawano 2 μ l buforu obciążającego i całość наносono na przygotowany wcześniej żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w chłodni w temperaturze 4°C przy stałym napięciu 200V w środowisku 1xTBE przez 4 godziny. Po zakończonej elektroforezie, żel mieszano

w 10% roztworze kwasu octowego przez 20 minut, później po wypłukaniu przez kolejne 30 minut w roztworze azotanu srebra buforowanym formaliną (500 µl 20% azotanu srebra, 150 µl formaliny, woda podwójnie destylowana do 100 ml). Obraz na żelu wywoływano 3% roztworem węglańu sodu buforowanego formaliną o stężeniu jak wyżej.

Analizowano obraz powstałych na elektorforogramie prążków i ich wzór porównywano ze wzorem kontroli pozytywnej i negatywnej. Wszystkie próbki ze wzorem innym niż kontroli negatywnej kierowano do dalszego sekwencjonowania.

4.2.7. Denaturująca wysokosprawna chromatografia cieczowa (DHPLC).

Określenie obecności mutacji w obrębie wszystkich badanych eksonów genu *KIT* przeprowadzano również przy użyciu denaturującej wysokosprawnej chromatografii cieczowej DHPLC (ang. *denaturing high performance liquid chromatography*). Jest ono pośrednią metodą, pozwalającą na szybką i w pełni zautomatyzowaną detekcję mutacji i wariantów polimorficznych z bardzo dużą czułością i specyficznością. W metodzie wykorzystana zostaje temperaturozależna analiza heterodupleksów. W przypadku, gdy badane DNA posiada mutację lub polimorfizm o charakterze heterozygotycznym podczas denaturacji a następnie renaturacji powstaje mieszanina homo- i heterodupleksów. DNA osób homozygotycznych pod względem allelu polimorficznego lub mutacji tworzy odpowiednio jeden rodzaj homodupleksów. Homo- i heterodupleksy mają różny czas retencji, co jest uwidaczniane jako inny obraz pików na wykresie. Heterodupleksy są szybciej eluowane z kolumny w gradiencie acetonitrylu niż homodupleksy, co daje możliwość precyzyjnego ich odróżnienia.

Analizę metodą DHPLC wykonano dla wszystkich badanych próbek w obrębie eksonów 8, 10, 11 i 17. Po reakcji PCR wykonywano elektroforezę agarozową w celu sprawdzenia efektywności reakcji. Zasadniczą analizę amplifikowanego fragmentu DNA metodą DHPLC przeprowadzano przy użyciu urządzenia Transgenomic WAVE System 3500 (*Transgenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis System*) używając kolumny rozdzielającej. Produkt PCR w ilości 10 µl denaturowano przez 3 minuty w temperaturze 95°C, następnie pozostawiano go w temperaturze pokojowej przez około 25 minut celem stopniowej renaturacji.

Produkt rozdzielano przy przepływie 0,9 ml/min przez liniowy gradient acetonitrylu. Analiza jednej próbki trwała około 10 minut. Optymalne warunki przeprowadzania reakcji (temperatura, przesunięcie czasowe) ustalono używając zaleceń producenta (*Transgenomic*). Zastosowano następujące temperatury rozdziału dla poszczególnych eksonów: ekson 8 - 57,8°C, ekson 10 - 56°C, 56,5°C, 58,5°C, ekson 11 - 54,5°C, ekson 17 - 57,8°C, 58,8°C i 60,8°C. Dla poszczególnych wariantów polimorficznych i mutacji otrzymywano odmienne krzywe. Poszczególne chromatogramy analizowano z zastosowaniem oprogramowania *Navigator Software*.

4.2.8. Sekwencjonowanie produktów PCR

W celu określenia charakteru zmian, próbki wykazujące zmieniony profil wzoru w analizie SSCP i elucji w analizie DHPLC poddano procedurze bezpośredniego sekwencjonowania. DNA wybranych do sekwencjonowania próbek amplifikowano w celu uzyskania produktu PCR. Efektywność reakcji sprawdzano za pomocą elektroforezy agarozowej, następnie materiał oczyszczano za pomocą zestawu Gel-Out firmy A&A Biotechnology postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Spektrofotometrycznie określano stężenie matrycowego DNA i następnie określoną jego ilość wykorzystywano do sekwencjonowania, stosując zarówno starter sensowny jak i antysensowny. Skład mieszaniny do reakcji sekwencjonowania przedstawiono w tabeli numer 6.

Tab. 6. Skład mieszaniny do reakcji sekwencjonowania

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Objętość/próbkę (μl)
BigDye™ Terminator Ready Reaction mix v. 3.1	2
5 x stężony bufor	4
Starter sekwencyjny (1 μM)	2
Dejonizowana woda	5
Matrycowe DNA (25ng)	7

Profil termiczny i warunki reakcji amplifikacji do sekwencjonowania były zgodne z zaleceniami firmy Applied Biosystems. Warunki te przedstawiono w tabeli numer 7.

Tab. 7. Profil temperaturowy reakcji sekwencjonowania

Temperatura (°C)	Czas (sek.)	Liczba cykli
96	120	–
96	10	25
50	5	
60	240	
4	∞	–

W celu usunięcia nadmiaru znakowanych dideoksynukleotydów (ddNTPs) produkt reakcji czyszczono stosując dwukrotną precypitację izopropanolem i etanolem. Do próbki dodawano podwójną objętość izopropanolu i następnie inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu i dokładnym zebraniu supernatantu dodawano 75% etanol, ponownie wirowano i suszono na powietrzu. Osad rozpuszczano w 25 μl podwójnie destylowanej wody. Próbkę denaturowano przy użyciu termocyklera w temperaturze 95°C przez 2 minuty i natychmiast chłodzono do temperatury 4°C. W ten sposób przygotowane próbki analizowano w automatycznym sekwenatorze ABI Prism 310 przy użyciu odpowiednich programów komputerowych (*ABI PRISM 310 Data Collection Software v3.1.0* i *ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software v3.7*). Elektroforogramy otrzymane z sekwenatora automatycznego porównywano z prawidłową sekwencją wg Giebel i wsp. 1992 i uzyskaną z bazy danych NCBI.

4.3. Aparatura i odczynniki

4.3.1. Aparatura

• Aparat do elektroforezy agarozowej	Bio-Rad
• Aparat do elektroforezy poliakrylamidowej	Bio-Rad
• Cytometr przepływowy FACSCalibur	Becton-Dickinson
• Kapilara 36cm x 50µm	Applied Biosystems
• Lodówkozamrażarka -20°C	Elektrolux
• Sekwencjator automatyczny ABI Prism 310	Applied Biosystems
• Spektrofotometr Helios	Thermo Scientific
• System dokumentacji żeli GelDoc	Bio-Rad
• Termoblok	Eppendorf
• Termocyklery	MJ Research
	Applied Biosystems
• Vortex	IKA
• Waga elektroniczna	Sartorius
• Wirówka 5415C, 5810R	Eppendorf
• Wirówka do liofilizacji Centriva Concentrator	Labconco
• Zestaw DHPLC, WAVE System 3500	Transgenomic

4.3.2. Odczynniki

• Agaroz	Prona
• Akrylamid	Bio-Rad
• Albumina cielęca	Sigma-Aldrich
• Alkohol etylowy	POCH
• Alkohol izoamylowy	MP Biochemicals
• Azotan srebra	Sigma-Aldrich
• Bisakrylamid	Bio-Rad
• Błękit bromofenolowy	Sigma-Aldrich
• Bromek etydyny	Sigma-Aldrich
• Bufor PCR	Fermentas
• Chlorek magnezu	Fermentas
• Chlorek potasu	Sigma-Aldrich
• Chlorek sodu	Serva

• Chlorek amonu	Sigma-Aldrich
• Chloroform	Merck
• Cyjanol ksylenu	Sigma-Aldrich
• dNTPs	Promega
• Dodecylosiarczan sodu (SDS)	Sigma-Aldrich
• Fenol	MP Biochemicals
• Formaldehyd	Sigma-Aldrich
• Formamid dejonizowany	Sigma-Aldrich
• GeneAmp 100mM dNTP	Applied Biosystems
• GeneScan-500 TAMRA	Applied Biosystems
• Izopropanol	Merck
• Ksylen	Sigma-Aldrich
• Kwas borowy	Sigma-Aldrich
• Nadsiarczan amonu (APS)	Sigma-Aldrich
• Octan sodu	Sigma-Aldrich
• PBS cell wash	BD Bioscience
• Polimer POP-4	Applied Biosystems
• Polimer POP-6	Applied Biosystems
• Polimeraza Taq	MBI Fermentas
• Polimeraza Taq Gold	Applied Biosystems
• Przeciwciało anty-CD117, klon 104D2	Pharmingen
• Sacharoza	Sigma-Aldrich
• Startery	IBB PAN
• Template Suppression Reagent TSR)	Applied Biosystems
• Tetrametylenoetylenodiamina (TEMED)	Sigma-Aldrich
• Tris-HCl	Sigma-Aldrich
• Węglan sodu	Sigma-Aldrich
• Wersenian dwusodowy (EDTA)	Sigma-Aldrich
• Woda podwójnie destylowana	Milipore system
• Wodorowęglan potasu	Sigma-Aldrich
• Zestaw odczynników WAVE Optimized Pak™	Transgenomic

4.3.3. Roztwory

- 6x bufor obciążający 0.25% Cyjanol ksylenu
40% sacharoza
- 10xEDTA bufor Applied Biosystems
- 25mM MgCl₂ Fermentas
- 10x *Taq* Bufor z (NH₄)₂SO₄ Fermentas
- 5xRBC chlorek amonu 20.73g
wodorowęglan potasu 2.3g
0.5 M EDTA 10ml
woda destylowana 500ml
- 5x Sequencing Buffer Applied Biosystems
- 5xTBE Tris 54 g
Kwas borowy 27.5 g
0.5 M EDTA, pH=8.0 20ml
woda destylowana do 1000ml
- BigDye Terminators v. 3.1 cycle sequencing kit Applied Biosystems
- Bufor do proteinyzy K 100 mM NaCl
10 mM Tris HCl, pH=8.0
25 mM EDTA, pH=8.0
0.5% SDS
- Chloroform/alkohol izoamyłowy 24:1
- GeneAmp 10x PCR Gold Buffer Applied Biosystems
- NaCl/EDTA NaCl 4.37 g
0.5 M EDTA 2ml
woda destylowana do 1000ml
- Roztwór proteinyzy K 20 mg/ml
- Roztwór roboczy (bufor PBS) PBS roztwór macierzysty 1000ml
Albumina cielęca 2.0g

4.4. Analiza statystyczna uzyskanych wyników

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu pakietu StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com. We wszystkich analizach za statystycznie znamienne przyjęto wartość $p \leq 0.05$.

5. WYNIKI

5.1. Ekspresja antygenu KIT w ostrych białaczkach szpikowych w zależności od podtypu w klasyfikacji FAB.

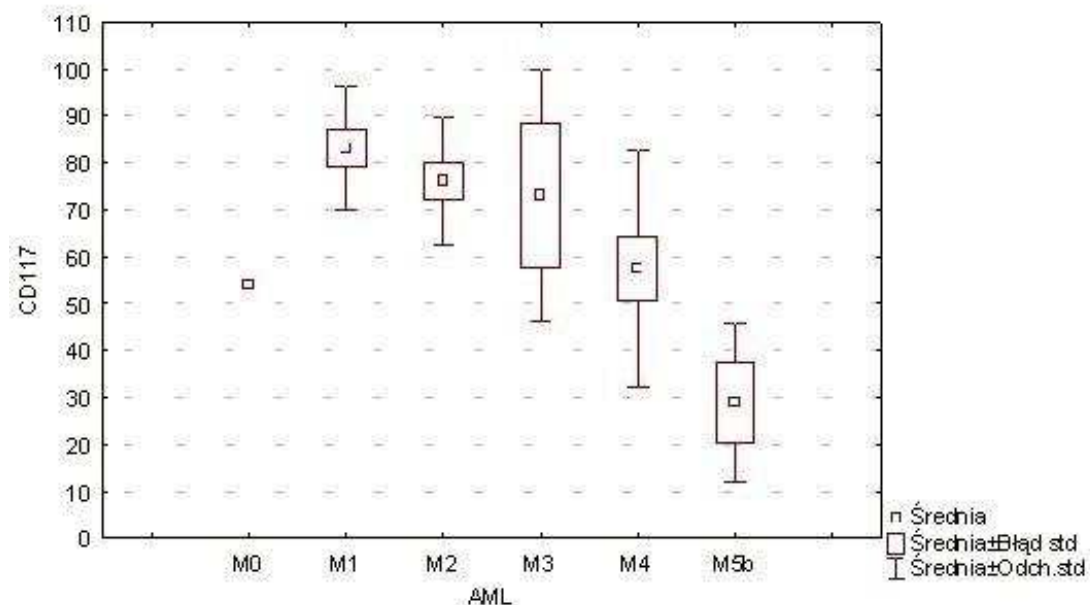
Obecność antygenu CD117 wykazano u 45 osób na 51 analizowanych, co stanowiło 88%. Antygen KIT był obecny na średnio 67% (± 24) komórek. Tabela 8 podsumowuje częstość występowania antygenu CD117 w zależności od podtypu ostrej białaczki szpikowej.

Tab. 8. Ekspresja białka KIT w ostrej białaczce szpikowej w zależności od podtypu wg klasyfikacji FAB.

Typ AML	Liczba chorych z ekspresją KIT>10% / liczba chorych w podtypie	Ekspresja białka C-KIT	
		Średnia dla KIT>10% (min – max)	odchylenie standardowe
M0	1/1	54	
M1	12 / 13	83 (58 - 93)	13
M2	11 / 12	76 (53 - 95)	13
M3	3 / 3	73 (43 - 95)	27
M4	14 / 17	57 (19 - 100)	25
M5a	0 / 1		
M5b	4 / 4	29 (10 - 51)	17
Sumarycznie	45 / 51	67 (19 - 100)	24

Średnią liczbę KIT-dodatnich komórek w każdym z podtypów FAB schematycznie przedstawiono na Ryc. 7. Antygen KIT występował na komórkach blastycznych AML M0 (w 100%), w 12 spośród 13 przypadkach zdiagnozowanej AML M1 (92%), 11 z 12 AML M2 (92%), 3 z 3 AML M3 (100%), 14 z 17 przypadków AML M4 (82%), 4 z 5 AML M5 (w tym nie występował w AML M5a i występował w 4 na 4 AML M5b [100%]). Nie analizowano żadnego przypadku AML M6 ani AML M7.

Ryc. 7. Średni odsetek antygenu CD117 na KIT-pozytywnych komórkach blastycznych z zależności od podtypu FAB.



Za pomocą testu Kruskala-Wallisa dla porównań wielokrotnych (dwustronnych) wykazano statystycznie znamienne różnice ($p < 0.05$) w sile ekspresji KIT między typem M1 a M5b. Pozostałe różnice nie są statystycznie znamienne.

5.2. Stopień ekspresji CD117 w zależności od charakteru ostrej białaczki

Białko KIT obecne było na średnio 60% (± 30) komórek w ostrej białaczce szpikowej i na 10% (± 30) blastów w ostrej białaczce limfoblastycznej. Za pomocą testu U Manna-Whitney'a stwierdzono istotną statystycznie różnicę między tymi grupami ($p < 0,001$).

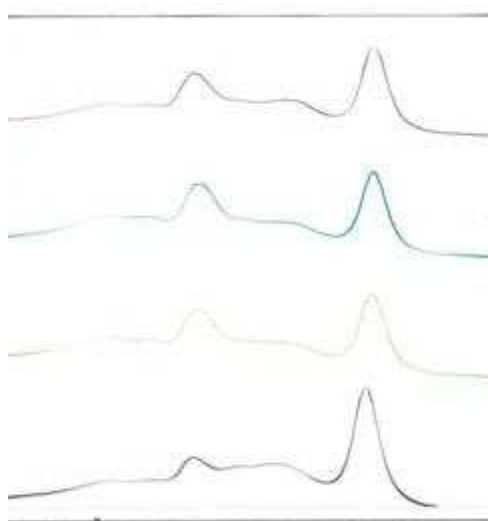
5.3. Zmiany genetyczne w obrębie genu *KIT* w ostrych białaczkach szpikowych

5.3.1. Zmiany w obrębie eksonu 8

Obecność zmian genetycznych w zakresie eksonu 8 badano za pomocą elektroforezy kapilarnej i następnie wysokosprawnej denaturującej chromatografii cieczonej.

Elektroforezą kapilarną nie wykazano obecności zmian typu insercji i/lub delecji. We wszystkich próbkach uzyskano pojedyncze piki charakterystyczne dla produktu o wielkości 88 pz, jak w typie dzikim genu *KIT* (ryc. 6). DHPLC nie wykazała również zmiany kształtu krzywej, co świadczy o nieobecności punktowych zmian genetycznych. Przykładowe chromatogramy trzech pacjentów przedstawiono na rycinie 7.

Ryc. 7. Chromatogram DHPLC eksonu 8 genu *KIT* u wybranych pacjentów.



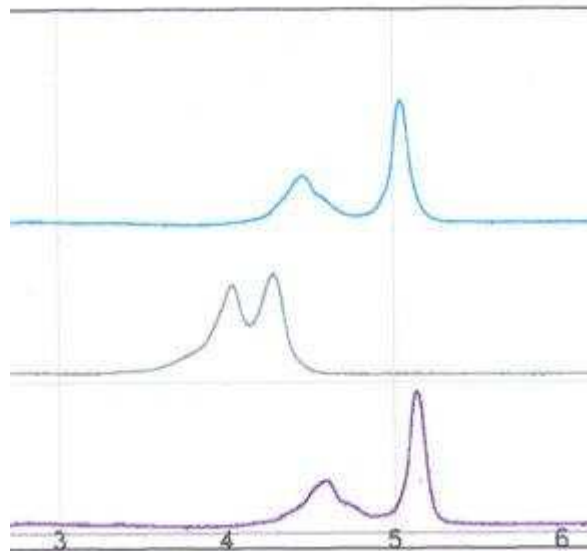
Losowo wybrane próbki zostały poddane procedurze sekwencjonowania, która nie wykazała obecności zmian genetycznych w obrębie badanego eksonu.

5.3.2. Zmiany w obrębie eksonu 10

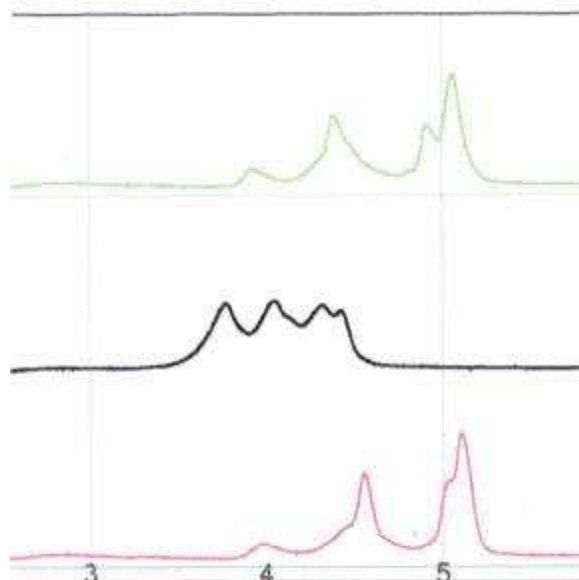
Wysokosprawną denaturującą chromatografią cieczową wykazano obecność 3 różnych wzorów krzywych uzyskanych na poniższych wykresach. Ryciny 8, 9 i 10

przedstawiają przykładowe wzory chromatogramów w temperaturze 56°C (krzywe najwyżej położone), 56.5°C (krzywe środkowe), 58.5°C (krzywe najniżej położone).

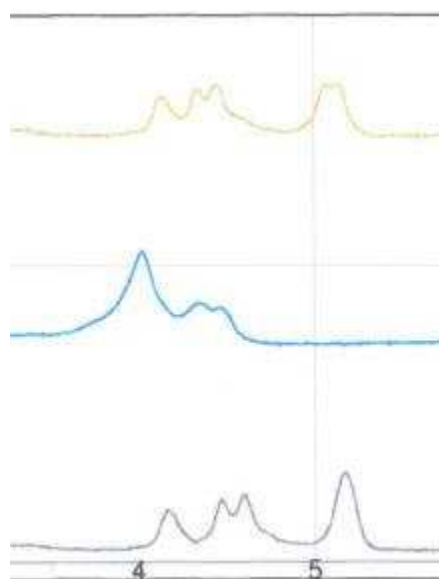
Ryc. 8. Chromatogram DHPLC eksonu 10 w temperaturach 56°C (górna linia), 56.5°C (środkowa linia), 58.5°C (dolna linia) u pacjenta bez zmian genetycznych.



Ryc. 9. Chromatogram DHPLC eksonu 10 w temperaturach 56°C (górna linia), 56.5°C (środkowa linia), 58.5°C (dolna linia) u pacjenta z polimorfizmem Met541Leu (1621A>C).



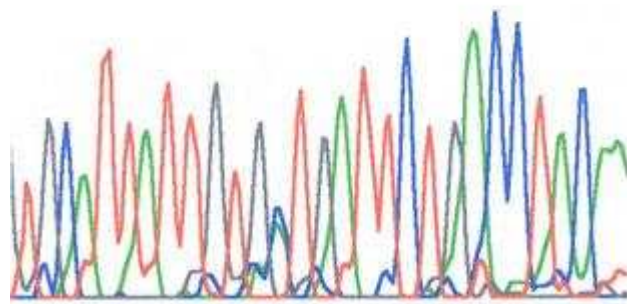
Ryc. 10. Chromatogram DHPLC eksonu 10 w temperaturach 56°C (górną linią), 56.5°C (środkową linią), 58.5°C (dolną linią) u pacjenta z polimorfizmem Lys546Lys (1638A>G).



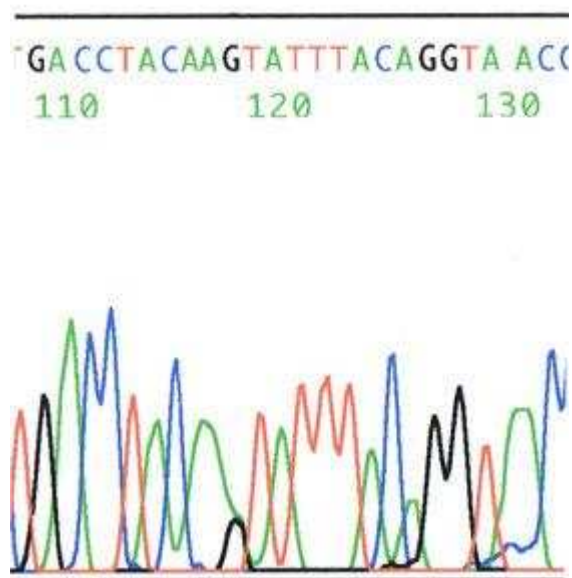
Wyselekcjonowane w ten sposób grupy próbek zsekwenconowano. Najczęściej występujący wzór odpowiadał typowi dzikiemu DNA (u 59 na 75 przebadanych). Wykazano obecność polimorfizmu Met541Leu (1621A>C) w ośmiu próbkach AML, jednej białaczki bifenotypowej, jednej limfoblastycznej (rycina 11) oraz Lys546Lys (1638A>G) w czterech AML, jednej biklonalnej i jednej ALL (rycina 12).

Ryc.11. Fragment zsekwenconowanego eksonu 10 ze zmianą Met541Leu.

T C A T T A T T G T G N T G A T T C T G A C C T A C A A
 80 90 100



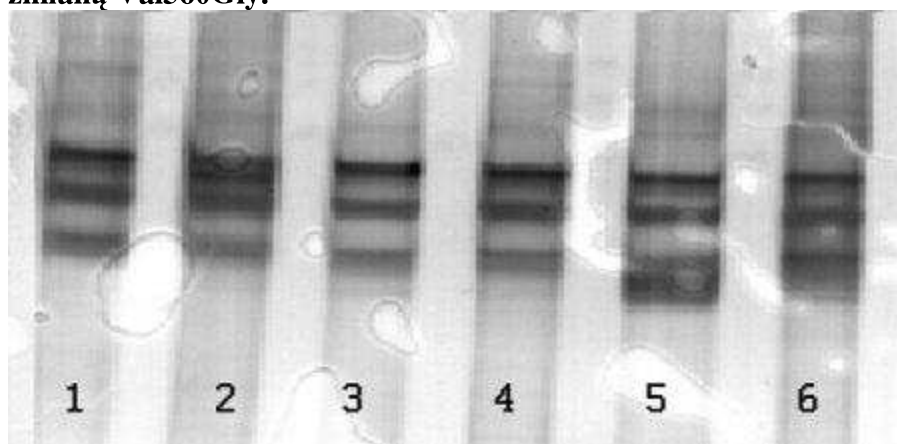
Ryc. 12. Fragment zsekwencjonowanego eksonu 10 ze zmianą Lys546Lys



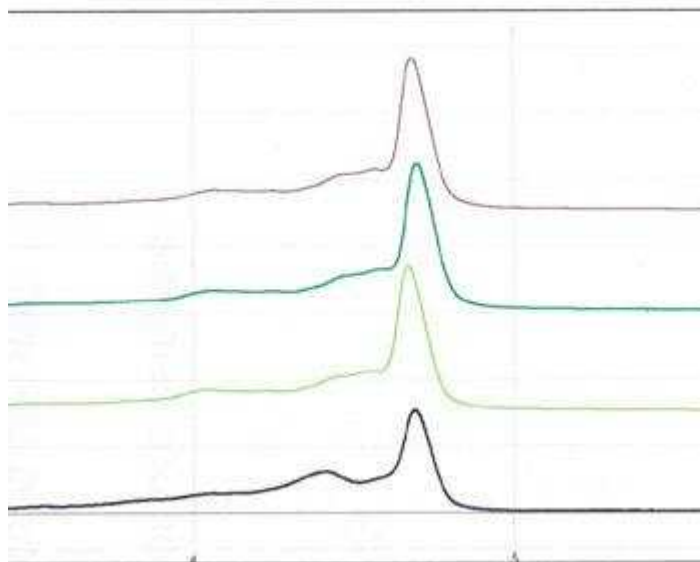
5.3.3. Zmiany w obrębie eksonu 11

Analizą za pomocą polimorfizmu jednonuciowych fragmentów DNA (SSCP) i wysokosprawną denaturującą chromatografią cieczową wykazano obecność dwóch różnych wzorów, odpowiednio na żelu poliakrylamidowym i wykresie krzywej chromatograficznej. Rycina 13 przedstawia wynik SSCP na żelu poliakrylamidowym, rycina 14 przykładowe wzory chromatogramów DHPLC.

Ryc. 13. Wyniki analizy SSCP eksonu 11 genu KIT. Ścieżki 1, 3, 4 przedstawiają wzór DNA niezmutowanego, ścieżki 2, 5, 6 DNA ze zmianą Val560Gly.



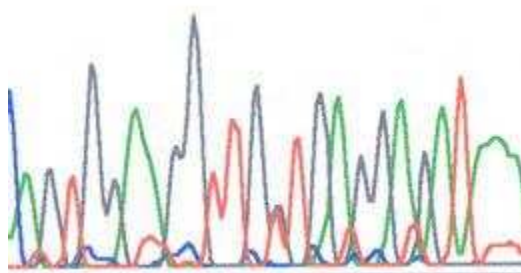
Ryc. 14. Chromatogram DHPLC eksonu 11 genu *KIT* u wybranych pacjentów. Trzy górne krzywe charakterystyczne dla DNA niezmutowanego, dolna krzywa odpowiada zmianie Val560Gly.



Próbki odpowiadające każdemu typowi wzoru zsekwencjonowano. Wykazano obecność DNA niezmutowanego u 76 na 77 przebadanych i mutację typu Val560Gly (1679T>G) w przypadku ostrej białaczki biklonalnej. Rycina 15 przedstawia wynik sekwencjonowania fragmentu eksonu 11 u chorego ze zmianą Val560Gly.

Ryc. 15. Fragment zsekwencjonowanego eksonu 10 ze zmianą Val560Gly

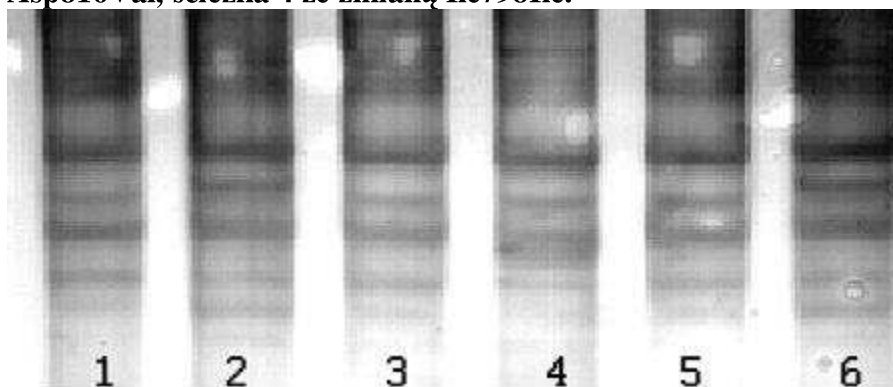
AGTGAAGGTTGNGAGGAGATAA
60 70 80



5.3.4. Zmiany w obrębie eksonu 17

Analizą za pomocą polimorfizmu jednonuciotowych fragmentów DNA (SSCP) i wysokosprawną denaturującą chromatografią cieczową wykazano obecność 3 różnych wzorów zarówno na żelu poliakrylamidowym jak i wykresie krzywej chromatograficznej. Rycina 16 przedstawia wynik SSCP na żelu poliakrylamidowym, gdzie wzór na ścieżkach 1, 3, 5 odpowiada DNA niezmutowanemu, 2, 6 mutacji Asp816Val, a 4 polimorfizmowi Ile798Ile.

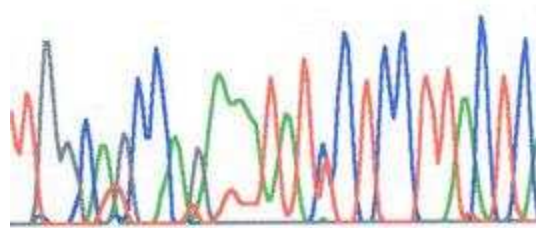
Ryc. 16. Wyniki analizy SSCP eksonu 17 genu KIT. Ścieżki 1, 3, 5 przedstawiają wzór DNA niezmutowanego, ścieżki 2, 6 DNA ze zmianą Asp816Val, ścieżka 4 ze zmianą Ile798Ile.



Próbki odpowiadające każdemu typowi wzoru zsekwencjonowano. Wykazano obecność DNA niezmutowanego u 70 na 75 przebadanych próbek, polimorfizm Ile798Ile (2394C>T) w trzech przypadkach ostrej białaczki szpikowej i mutację Asp816Val (2447A>T) w dwóch. Fragmenty odpowiednich sekwencji wraz ze zmianami przedstawiono na rycinach 17 i 18.

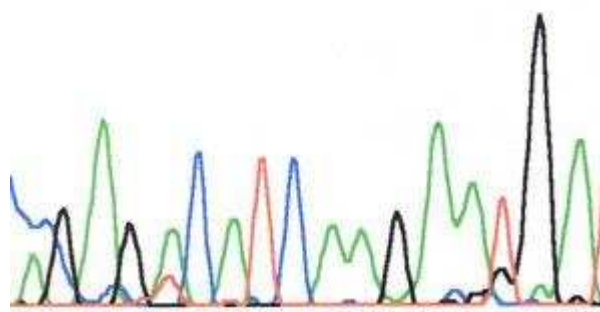
Ryc. 17. Fragment zsekwencjonowanego eksonu 17 ze zmianą Ile798Ile

TCCAGCCGAAATCCTCCTTACTCA
40 50 60



Ryc. 17. Fragment zsekwencjonowanego eksonu 17 ze zmianą Asp816Val

CCGAGACATCAAG AATGAT
70 80



5.4. Zmiany genetyczne w obrębie genu *KIT* w zależności od podtypu FAB

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic między występowaniem zmian genetycznych w obrębie badanych eksonów a podtypem wg klasyfikacji FAB ostrej białaczki szpikowej. Występowanie zmian genetycznych w poszczególnych podtypach przedstawiono w tabeli numer 9.

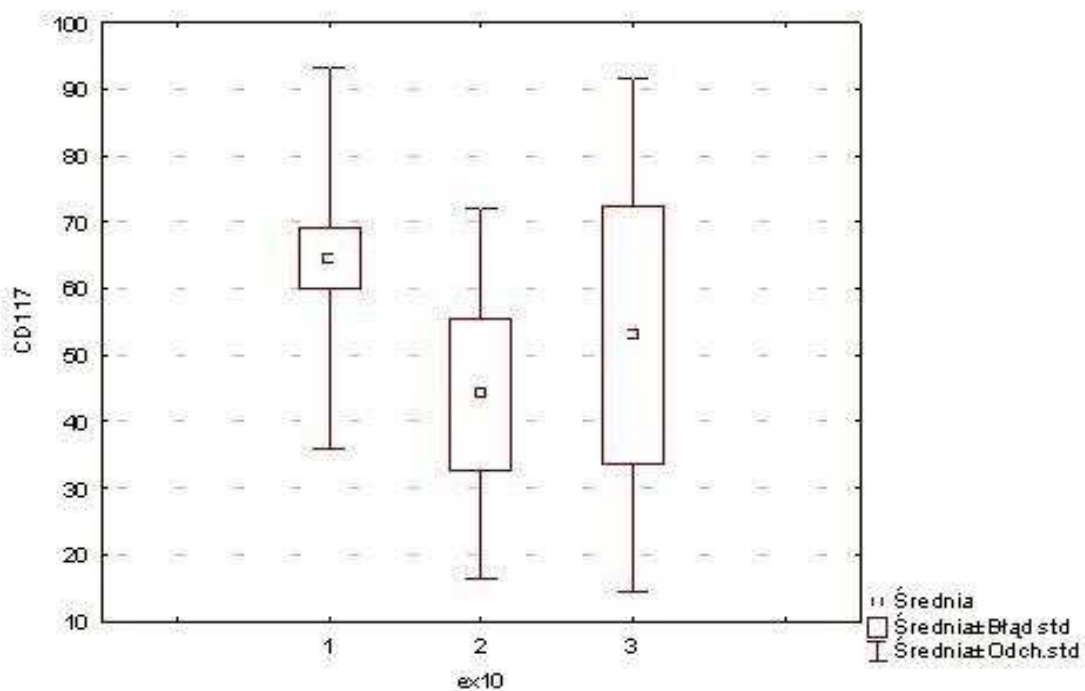
Tab. 9. Zmiany genetyczne w eksonach 8, 10, 11, 17 genu *KIT* w zależności od podtypu przebadanej ostrej białaczki.

Typ ostrej białaczki	Liczba przebadanych chorych	Ekson 10			Ekson 11		Ekson 17		
		Met541Leu	Lys546Lys	typ dziki	Val560Gly	typ dziki	Ile798Ile	Asp816Val	typ dziki
AML M0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
AML M1	13	0	1	12	0	13	1	1	11
AML M2	12	2	1	9	0	12	1	1	11
AML M3	7	0	0	7	0	7	0	0	7
AML M4	18	2	2	14	0	18	1	0	17
AML M5a	2	2	0	0	0	2	0	0	2
AML M5b	4	2	0	2	0	4	0	0	4
AML M6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ALL	16	1	1	14	0	16	0	0	16
Biklonalna	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Bifenotypowa	1	1	0	0	0	0	0	0	1

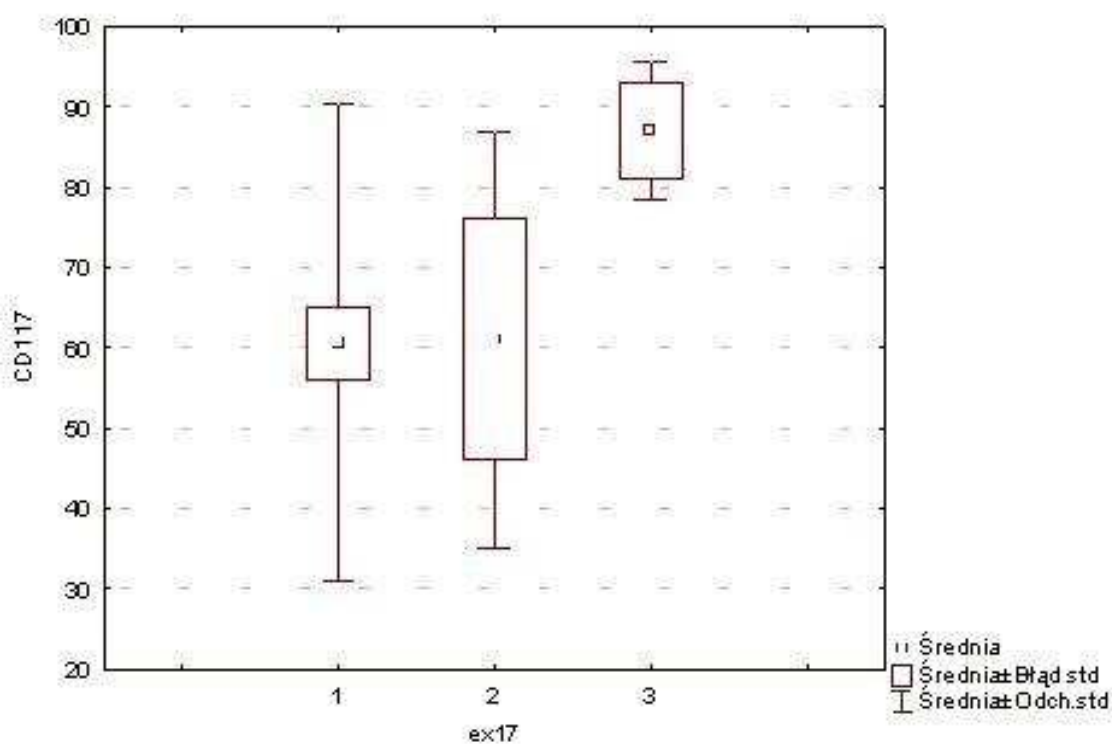
5.5. Zmiany genetyczne w obrębie genu *KIT* w zależności od poziomu ekspresji CD117

Badano występowanie poszczególnych zmian genetycznych w zależności od siły ekspresji CD117 na komórkach blastycznych w ostrych białaczkach szpikowych. Zależności między poziomem ekspresji *KIT* a poszczególnymi typami zmian genetycznych w AML przedstawiają ryciny 19 i 20. Sumarycznie dane wszystkich analizowanych osób znajdują się w aneksie.

Ryc.19. Występowanie zmian genetycznych o obrębie genu *KIT* w zależności od poziomu ekspresji produktu tego genu na komórkach. 1- typ niezmutowany, 2 – polimorfizm Met541Leu, 3 - polimorfizm Lys546Lys



Ryc. 20. Występowanie zmian genetycznych o obrębie genu *KIT* w zależności od poziomu ekspresji produktu tego genu na komórkach. 1- typ niezmutowany, 2 – polimorfizm Ile789Ile, 3 - mutacja Asp816Val



Za pomocą testu Kruskala-Wallisa nie wykazano istotności statystycznej obserwowanych różnic.

Łącznie wykazano zmiany genetyczne w obrębie badanych eksonów u 15 osób z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej (26.3%), przy czym dwie osoby posiadały dwie zmiany genetyczne jednocześnie (mutację Asp816Val [2447A>T] w obrębie eksonu 17 i polimorfizm Lys546Lys [1638A>G] w obrębie eksonu 10 pierwsza osoba z AML M2 i mutację Asp816Val [2447A>T] i polimorfizm Met541Leu [1621A>C] w tych samych eksonach druga – z AML M1), dwie zmiany w ostrej białaczce biklonalnej (polimorfizm Lys546Lys [1638A>G] w obrębie eksonu 10 i mutacja typu Val560Gly [1679T>G] dotycząca eksonu 11), polimorfizm Met541Leu [1621A>C] w eksonie 10 w ostrej białaczce bifenotypowej i limfoblastycznej (6.3% zbadanych) i polimorfizm Lys546Lys (1638A>G) w ostrej białaczce limfoblastycznej (6.3%).

Analizując częstość występowania poszczególnych zmian genetycznych w ostrych białaczkach szpikowych wykazano obecność:

- polimorfizmu Met541Leu (1621A>C) w obrębie eksonu 10 w 14% przypadków (n=8)
- polimorfizmu Lys546Lys (1638A>G) w obrębie eksonu 10 w 7% przypadków (n=4)
- polimorfizmu Ile798Ile (2394C>T) w obrębie eksonu 17 w 5,3% przypadków (n=3)
- mutacji Asp816Val (2447A>T) w obrębie eksonu 17 w 3,5% przypadków (n=2)

6. DYSKUSJA

Kinaza tyrozynowa typu III *KIT* należy do protoonkogenów, które odgrywają ważną rolę w indukowaniu klonu nowotworowego w ostrych białaczkach. W pracy potwierdziłem jej szczególną rolę w patomechanizmie ostrej białaczki szpikowej. Ekspresja antygenu CD117 pozostaje wysoka we wszystkich podtypach ostrej białaczki szpikowej w przeciwieństwie do ostrej białaczki limfoblastycznej, gdzie obserwuje się sporadyczne występowanie tego antygenu. Wśród komórek blastycznych podtypów mniej zróżnicowanych ekspresja tego antygenu pozostaje większa. Stwierdziłem jednocześnie obecność zmian genetycznych w obrębie badanego genu o charakterze zmian punktowych, zarówno w postaci mutacji jak i polimorfizmów. Zmiany te nie były jednak częste i ich występowanie pozostawało bez statystycznego związku z poziomem ekspresji białka *KIT*.

Ekspresję badanego antygenu wykazałem u jednego pacjenta z ostrą białaczką limfoblastyczną na 11 zbadanych, co stanowiło 9% przebadanych chorych. Jest to zgodne z doniesieniami innych autorów, których znaczna większość wykazuje brak ekspresji lub ekspresję u pojedynczych pacjentów w badanych grupach (Valverde i wsp. 1996, Crosier i wsp. 1993, Ikeda i wsp. 1991, Reuss-Borst i wsp. 1994). Jedno z najliczniejszych opracowań, gdzie zebrano materiał pochodzący od 407 chorych na ALL wykazało, że komórki CD117+ występują u 5.4% zbadanych osób z ostrą białaczką limfoblastyczną (Tsao i wsp. 2004). Istnieją również publikacje, w których wykazano obecność antygenu *KIT* na komórkach w ostrych białaczkach limfoblastycznych u 33% do 59% w zależności od podtypu, gdzie podkreśla się jego korelację z antygenem pochodzenia szpikowego CD13 (Knapp i wsp. 1994, Nishii i wsp. 1992). W moim materiale nie wykazałem korelacji między tymi antygenami (dane nie przedstawione w pracy), może jednak wynikać to z małej grupy przebadanych pacjentów i pojedynczego pozytywnego wyniku antygenu CD117, co uniemożliwia wnioskowanie statystyczne.

W pracy wykazałem, że antygen *KIT* występuje stosunkowo często na komórkach blastycznych w ostrych białaczkach szpikowych. Jego rola w tej chorobie nadal pozostaje nie w pełni poznana. Doniesienia dotyczące klinicznego znaczenia antygenu *KIT* są sprzeczne. Niektórzy autorzy uważają obecność CD117 za zły czynnik prognostyczny (Ashman i wsp. 1988), według innych nie ma on znaczenia prognostycznego (Reuss-Borst i wsp. 1994). Istnieją również doniesienia

traktujące obecność KIT jako pozytywny czynnik prognostyczny (Auewarakul i wsp. 2006, Tsao i wsp. 2004).

Częstość występowania CD117 w badanym materiale chorych (88%) była zgodna z wcześniejszymi doniesieniami innych autorów, chociaż uzyskałem jeden z najwyższych wyników wśród prac o podobnej tematyce. Potwierdziłem również dane opublikowane wcześniej przez nasz zespół na mniejszej grupie chorych (Szatkowski i wsp. 2002). W większości prac obserwowano dodatnią ekspresję KIT na poziomie ok. 60-80% (Bene i wsp. 1998, Cascavilla i wsp. 1998, Muroi i wsp. 1995, Muroi i wsp. 1998, Nomdedeu i wsp. 1999, Reuss-Borst i wsp. 1994, Sperling i wsp. 1997, Wells i wsp. 1996). Niektórzy (Bene i wsp. 1998, Muroi i wsp. 1998) za dodatnią ekspresję antygenu przyjmowali jego obecność na co najmniej 20% komórek blastycznych, co może tłumaczyć stosunkowo częstszą ekspresję wykazaną u naszych chorych. Ustalając granicę dodatniej ekspresji antygenu KIT na poziomie 10% kierowałem się tym, że fizjologicznie u zdrowych osób na komórkach szpiku kostnego wykazano dość niską ekspresję antygenu CD117. Podobna zależność dotyczy antygenu CD34. Większość autorów podobnych opracowań ustala granicę dodatnich ekspresji powyższych antygenów na poziomie 10 lub 20%. Zdarzają się również publikacje, w których dodatnią ekspresję KIT ustalono na poziomie 5% (Uckan i wsp. 2000). Pozostałe antygeny linii szpikowej uważa się za dodatnie przy ekspresji rzędu 20%.

Dane przedstawiające wysoki stopień ekspresji KIT na komórkach blastycznych w AML M1 i AML M2 (92% komórek CD117+) wydają się być potwierdzone w innych opracowaniach (Bene i wsp. 1998, Cascavilla i wsp. 1998, Muroi i wsp. 1998, Sperling i wsp. 1997). Na uwagę zasługuje również fakt wysokiego poziomu ekspresji KIT w AML M3 (73%) u wszystkich analizowanych pacjentów CD117+ (n=3) w mojej analizie. W dostępnej literaturze obecność białka KIT wykazywano u 50 do 100% badanych pacjentów z AML M3. Według części autorów (Ashman i wsp. 1988, Knapp i wsp. 1994) antygen CD117 w ostrej białaczce promielocytowej nie jest spotykany często. W większości prac liczebność grupy z rozpoznaniem AML M3 nie przekraczała 10 osób wobec czego dosyć trudne jest porównywanie opracowanych wyników. Wydaje się, że najbliższa powinna być obserwacja, gdzie autorzy zebrali 59 przypadków AML M3, z czego 37 stanowiły przypadki KIT dodatnie (62%) (Bene i wsp. 1998). W mojej pracy nie analizowałem wszystkich pacjentów AML M3, u których dostępny był wynik CD117, a jedynie

tych, u których uzyskałem odpowiednią ilość dobrego jakościowo materiału do dalszych badań genetycznych. Analizowana grupa nie była więc grupą w pełni reprezentatywną. Nie wykazałem, w przeciwieństwie do Cascavilla i współautorów (Cascavilla i wsp. 1998), że CD117 może być dobrym wyróżnikiem między podtypem AML M5a i AML M5b. Autorzy sugerowali, że antygen KIT występuje w większości przypadków M5a, natomiast z reguły jest nieobecny w M5b. W badaniu nie wykazałem podobnych współzależności. Wydaje się więc, że według powyższych wyników KIT nie jest znacznikiem umożliwiającym rozróżnienie podtypu M5a od M5b. Poziom ekspresji CD117 wyraźnie niższy, niż w podtypach M1 i M2 był zgodny z tym, co zaobserwowali inni autorzy (Tsao i wsp. 2004, Di Noto i wsp. 1996, Valverde i wsp. 1996). W pracy nie analizowałem podtypu M6, z uwagi na brak wystarczającej ilości materiału do opracowania molekularnego.

W pracy nie znalazłem mutacji genu *KIT* w obrębie eksonu 8. Pozostaje to w sprzeczności z jedną z pierwszych prac poświęconych tematyce badanego genu jako potencjalnego protoonkogenu w ostrej białaczce szpikowej. Gari i współautorzy znaleźli i opisać mutacje typu insercji/delecji w obrębie tego eksonu, dotyczące delecji kodonu dla kwasu asparaginowego w pozycji 419 i insercji innych par zasad w to miejsce (Gari i wsp. 1999). Dotyczyły one trzech pacjentów spośród przebadanych 60, głównie u chorych tych występowała inwersja chromosomu 16 lub translokacja (8;21). Po przebadaniu kolejnych 31 pacjentów z *inv*(16) stwierdzono, że łącznie mutacje te występują u 7.7% chorych z AML i aż u 33% chorych z *inv*(16). Inną zauważoną mutacją przez tych samych badaczy była zmiana Val530Ile (1588G>A) w obrębie eksonu 10, której również nie zidentyfikowałem w pracy. Dotyczyła tylko jednego pacjenta. W cytowanym artykule zidentyfikowano również szereg polimorfizmów: Met541Leu (potwierdziłem w pracy), Thr798Ile, Leu862Leu (2586G>C), Lys546Lys (1638A>G). Mimo porównywalnej liczby przebadanych pacjentów (60v57) uzyskałem nieco inne wyniki. Zbieżność dotyczyła jedynie polimorfizmu w kodonie 541. W przeciwieństwie do cytowanego artykułu, stwierdziłem również występowanie mutacji w obrębie eksonu 17. Zarówno mutacja w obrębie eksonu 8 jak i 10 należy do mutacji aktywujących i bezpośrednio nie dotyczy centrum aktywnego kinazy. Rozbieżności w dwóch porównywanych pracach mogą być spowodowane brakiem możliwości uzyskania wyników badań cytogenetycznych u naszych chorych z okresu prowadzonych badań, wobec czego

nie była znana liczba chorych z $inv(16)$ lub $t(8;21)$, gdzie zmiany w obrębie eksonu 8 były najczęstsze.

W jednym z większych opracowań na temat mutacji w obrębie genów wybranych kinaz tyrozynowych (Meshinchi i wsp. 2003) przebadano 91 chorych dzieci na ostrą białaczkę szpikową. Wykazano mutację Asp816Val (2447A>T) w obrębie eksonu 17 u 3 pacjentów. Nie wykryto innych mutacji, ale przebadano dodatkowo tylko ekson 11. Odsetek stwierdzonych mutacji w obrębie eksonu 17 w mojej pracy jest podobny do odsetka stwierdzanego w pracy Meshinchi i współautorów. W kolejnym opracowaniu zbadano 27 próbek pochodzących od pacjentów z ostrą białaczką szpikową pod kątem zmian w eksonie 17 (Ning i wsp. 2001b). Stwierdzono obecność pojedynczej mutacji Asp816Asn (2446G>A). Innych zmian, w przeciwieństwie do mojej pracy, nie odnotowano.

Polimorfizm Met541Leu (1621A>C), opisany wcześniej, występował w populacji europejskiej z częstością 80% homozygot z allelem A, 17.5% heterozygot i 2.5% homozygot z allelem C (Riva i Larizza, 1996). Przebadanych zostało 40 osób. Z uwagi na brak w moim opracowaniu populacji zdrowych ochotników w odpowiedniej liczbie, trudne jest porównywanie obu wyników. W całej przebadanej przeze mnie populacji, na którą składali się chorzy z ostrą białaczką szpikową, limfoblastyczną, bifenotypową i biklonalną częstość występowania heterozygoty wynosiła 13%, a homozygoty AA 87%. Nie znaleziono homozygoty CC.

Kolejny polimorfizm, tym razem nie powodujący zmiany aminokwasów w białku KIT, stwierdzono w eksonie 17 - Ile798Ile (2394C>T). Zmianę o takim samym charakterze, interpretowaną jako niemą mutację, opisano wcześniej u kobiet z przedwczesnym wygasaniem czynności jajników (Shibanuma i wsp. 2002). Z wykrytą zmianą nie wiązano jakichkolwiek współzależności z jednostkami chorobowymi.

Polimorfizm Lys546Lys (1638 A>G) opisano dotychczas w literaturze w pracy Gari i wsp. 1999. Jest to zmiana, która została znaleziona przeze mnie w 7% przypadków spośród ostrej białaczki szpikowej, limfoblastycznej i biklonalnej, jako zmiana heterozygotyczna. Z uwagi na swój charakter nie zmieniający kolejności ułożenia aminokwasów w białku nie powinna ona mieć jakichkolwiek zależności z badanymi białaczkami. W porównywanej pracy znaleziono dwa razy mniej zmian o tym samym charakterze.

Mutację typu Val560Gly (1679T>G) znalazłem w moim materiale w ostrej białaczce biklonalnej. Mutacja tego typu znajdowana była dotychczas najczęściej w ostrej białaczce mastocytowej, mastocytozach uogólnionych i guzach podścieliska przewodu pokarmowego (GIST, ang. *gastrointestinal stromal tumor*) (Buttner i wsp. 1998, Kanakura i wsp. 1994, Hou i wsp. 2004, Morey i wsp. 2002).

Wobec braku zadowalających rezultatów leczenia ostrych białaczek klasycznymi metodami i z uwagi na fakt coraz bardziej wyrafinowanych, czułych i dostępnych metod analizy genetycznej, możliwość zastosowania w strategii leczniczej inhibitorów celów molekularnych wydaje się coraz bardziej realna. W przypadku ostrej białaczki szpikowej istnieje zatem teoretyczna możliwość zahamowania procesu nowotworzenia poprzez zastosowanie inhibitorów receptora KIT. Mesters i współautorzy (Mesters i wsp. 2001) osiągnęli stabilną remisję hematologiczną u chorej we wznowie AML M4 po 12-tygodniowym zastosowaniu inhibitora receptora kinazy tyrozynowej VEGF i KIT - SU5416. Skuteczność eliminacji komórek KIT dodatnich inhibitorami KIT – SU66668, SU5416, - udowodniono także na hodowlach komórkowych linii białaczkowych i komórek blastycznych (Heinrich i wsp. 2000). Dostępne jest również wiele prac, w których w leczeniu ostrej białaczki szpikowej wykorzystano najczęściej używany obecnie w hematologii inhibitor kinaz tyrozynowych – imatinib. Opisano szereg pacjentów, u których po zastosowaniu imatinibu uzyskano nawet całkowitą remisję hematologiczną, mimo że u większości z nich była to pierwsza lub kolejna wznowa choroby po klasycznej chemioterapii (Kindler i wsp. 2003, Kindler i wsp. 2004, Nanri i wsp. 2005, Schittenhelm i wsp. 2003). Niestety wyniki innych autorów nie są tak zadowalające i znane są również prace sugerujące niewielkie szanse na uzyskanie poprawy w przebiegu ostrej białaczki szpikowej za pomocą samego imatinibu (Cortes i wsp. 2003, Cairoli i wsp. 2005). Można oczekiwać, że odpowiedź na leczenie z zastosowaniem inhibitorów kinaz tyrozynowych będzie większa u chorych z większą ekspresją CD117. Z uwagi jednak na dane sugerujące niewielki odsetek odpowiedzi u chorych na różne nowotwory z wysoką ekspresją niezmutowanego białka KIT i zwiększenie odsetka odpowiedzi u pacjentów z pewnymi typami mutacji, celowe wydaje się rutynowe oznaczanie zarówno ekspresji jak i mutacji KIT w ostrych białaczkach szpikowych. Każdy rodzaj mutacji dotyczący innego miejsca kinazy niż centrum aktywne sugeruje, że komórki powinny być wrażliwe na zastosowanie inhibitorów kompetycyjnych. Wrażliwość

poszczególnych kinaz tyrozynowych na zastosowane inhibitory zależy zarówno od typu inhibitora jak i typu mutacji w obrębie kodującego go genu. Zauważono, że mutacja Asp816Val (2447A>T) w obrębie eksonu 17 *KIT* unieważnia komórki na działanie imatinibu, natomiast mutacja Val560Gly (1679T>G) w eksonie 11 przeciwnie, powoduje większą ich wrażliwość na działanie tej substancji w stosunku do sekwencji niezmutowanej (Frost i wsp. 2002). Dasatinib z kolei pozostaje aktywny wobec białka *KIT* nawet w przypadku obecności mutacji Asp816Val (2447A>T) (Schittenhelm i wsp. 2003, Shah i wsp. 2006). Działanie nilotinibu w stosunku do mutantów Asp816Val (2447A>T) występuje tylko przy wysokich stężeniach tego związku (Verstovsek i wsp. 2005, Gotlib 2006).

W pracy wykazałem, że wobec zarówno wysokiej ekspresji antygenu CD117 na komórkach blastycznych w ostrej białaczce szpikowej jak i stosunkowo rzadkiego występowania mutacji w obrębie badanego genu celowe wydają się próby zastosowania inhibitorów kinaz tyrozynowych III typu do leczenia tych schorzeń po wcześniejszym wykonaniu badań molekularnych. Celowość wykonywania wcześniejszych badań molekularnych wynika również z charakteru zmian, które znalazłem u naszych chorych. Część z nich może prowadzić do oporności na niektóre typy inhibitorów, niektóre wręcz przeciwnie, "uwrażliwiają" na ich działanie, stąd celowa wydawałaby się analiza genu przed próbą zastosowania potencjalnych substancji anty-*KIT*. Wśród analizowanych przez mnie chorych w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantologii w Akademii Medycznej w Gdańsku podjęliśmy próbę zastosowania imatinibu u pacjenta K-O podczas kolejnej wznowy i nabytej oporności na konwencjonalną chemioterapię. Nie posiadaliśmy jeszcze wtedy wyników badań molekularnych. Ekspresja CD117 była na poziomie 77%. Niestety lek okazał się nieskuteczny. W świetle przedstawionych wyników badań, retrospektywnie zastosowanie inhibitorów kinaz tyrozynowych mogłoby przynieść być może efekty u pacjentów J-W, M-B (mutacja Asp816Val) i H-W (mutacja Val560Gly), przy czym pacjentowi H-W możnaby zaproponować imatinib, natomiast pacjentom J-W i M-B jedynie dasatinib z uwagi na obecność mutacji powodującej oporność na imatinib. Nadzieje dla chorych jakie niesie za sobą szybki rozwój nauk podstawowych a w szczególności genetyki, proteomiki, modelowania molekularnego w farmakologii, stawiają również coraz wyższe wymagania co do diagnostyki i zaplanowania optymalnej dla danego chorego terapii.

Obecnie bardzo pomocne przy podejmowaniu decyzji o celowanej terapii anty-KIT u osób z wysoką ekspresją CD117 wydaje się określenie zarówno rodzaju mutacji w obrębie genu jak i poziom ekspresji produktu tego genu.

7. WNIOSKI

1. Częstość występowania antygenu CD117 na komórkach blastycznych w ostrej białaczce szpikowej jest podwyższona. Białko KIT występuje sporadycznie na komórkach w ostrej białaczce limfoblastycznej.
2. Poziom ekspresji białka KIT w ostrej białaczce szpikowej różni się w zależności od podtypu według klasyfikacji FAB. Jest on wyraźnie wyższy na komórkach blastycznych postaci mniej dojrzałych. Średni poziom ekspresji badanego białka był najwyższy w postaci M1, M2 i M3, najniższy w M5b.
3. Mutacje w obrębie genu *KIT* w ostrych białaczkach występują dość rzadko, średnio u mniej niż 5% chorych. Zjawiskiem stosunkowo częstszym jest występowanie polimorfizmów, których rola w rozwoju i przebiegu ostrych białaczek nie została do końca wyjaśniona. Z uwagi jednak na coraz większe możliwości zastosowania u wybranych chorych inhibitorów kinaz tyrozynowych jako leczenia niestandardowego oraz konieczność wytypowania odpowiedniej grupy chorych potencjalnie wrażliwych na takie leczenie, wydaje się celowe badanie w kierunku mutacji w obrębie genu *KIT* u chorych na ostre białaczki.
4. Nie ma korelacji między występowaniem i rodzajami mutacji w obrębie genu *KIT* a zwiększonym poziomem ekspresji badanego białka. Wydaje się, że zwiększony poziom ekspresji CD117 jest zależny od innych mechanizmów molekularnych niż mutacje w obrębie samego genu.

8. STRESZCZENIE

Ostre białaczki są pod względem fenotypowym i genetycznym chorobami heterogennymi. Zmiany genetyczne występujące w ostrych białaczkach mogą być widoczne w postaci zmiany liczby lub budowy chromosomów, rearanżacji genów czy mutacji punktowych. Kinazy tyrozynowe stanowią dużą grupę ewolucyjnie konserwatywnych białek odgrywających zasadniczą rolę w procesach dojrzewania, wzrostu i różnicowania komórek. Liczne zaburzenia polegające na nadekspresji, mutacjach punktowych, rearanżacjach genów kodujących kinazy odgrywają rolę w patogenezie wielu chorób i zaburzeń rozwojowych. Zmienione kinazy tyrozynowe odgrywają zasadniczą rolę w procesie nowotworzenia. Białko CD117 odgrywa zasadniczą rolę w procesie hematopoezy, melanogenezy i gametogenezy. Jego obecność wykazano zarówno na komórkach szpiku kostnego, jak i innych, np. melanocytach, komórkach śródbłonna. CD117 jest obecny na komórkach progenitorowych hematopoezy. Gęstość receptorów KIT występujących na zdrowych komórkach blastycznych maleje wraz z dojrzewaniem. Znanych jest szereg mutacji w obrębie genu *KIT*. Mutacje w obrębie genu *KIT* można podzielić na dwie zasadnicze grupy: dotyczące centrum aktywnego kinazy i regulujące jej ekspresję lub powodujące uniezależnienie od liganda *KIT*. Uważa się, że mutacje somatyczne w obrębie *KIT* mogą inicjować proces nowotworzenia. Celem pracy było określenie częstości występowania mutacji w obrębie eksonów 8, 10, 11 i 17 genu *KIT* w ostrych białaczkach i próba znalezienia korelacji między obecnością mutacji a poziomem ekspresji receptora KIT na komórkach blastycznych w ostrych białaczkach. Przebadano łącznie 75 chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki. Wykazano obecność jednej mutacji Val560Gly w eksonie 11, dwóch mutacji Asp816Val w eksonie 17, dziesięciu polimorfizmów Met541Leu i sześciu Lys546Lys w eksonie 10, trzech polimorfizmów Ile798Ile w eksonie 17. Nie znaleziono zmian w obrębie egzonu 8. Mimo występowania podwyższonej ekspresji białka KIT na komórkach białaczkowych, nie wykazano związku podwyższonej ekspresji białka z występującymi zmianami w obrębie genu *KIT*.

8.1. Abstract

Acute leukaemias are phenotypically and genetically heterogenic group of diseases. Genetic changes, which are observed in acute leukaemia can be seen as chromosome number and structure disturbances, genes' recombinations or point mutations. Tyrosine kinases are large family of evolutionary conservative proteins which play fundamental role in maturation, growth and differentiation of cells. Multiple disturbances as hyperexpression, point mutations, recombination of tyrosine kinase genes determine pathogenesis of many diseases and development disturbances. Damaged tyrosine kinases play crucial role in tumorigenicity. CD117 plays an important role in haematopoiesis, melanogenesis and gametogenesis. It's presence was observed not only on bone marrow cells, but also on others as melanocytes, endothelial cells. KIT expression on healthy blastic cells decreases during maturation. Several *KIT* gene mutations are known. They can be divided for two main groups: enzymatic pocked and regulatoty type mutations. Somatic *KIT* gene mutations are able to initiate tumorigenicity. Aim of this work was to establish frequency *KIT* mutations in exon 8, 10, 11 and 17 and try to determine the correlation between presence of mutation with CD117 expression level on the blasitic cells in acute leukemia. 75 patients with acute leukemia were entered to the study. The presence of one Val560Gly mutation in exon 11, two Asp816Val in exon 17, ten polymorphisms Met541Leu, and six Lys546Lys in exon 10, three polymorphisms Ile798Ile in exon 17 were established. No changes in exon 8 were discovered. There were no correlation between level of KIT overexpression on blastic cells and genetic changes in *KIT* gene in acute leukemia.

9. ANEKS

Typ białaczki	Inicjały pacjenta	Wiek	Stopień ekspresji CD117 w %	Zmiany genetyczne
AML M0	I-A	49	54	nie
AML M1	K-O	17	77	nie
AML M1	E-W	57	91	nie
AML M1	E-E	61	76	Ile798Ile
AML M1	S-K	62	58	nie
AML M1	A-L	65	84	nie
AML M1	H-S	60	91	nie
AML M1	J-W	33	93	Lys546Lys, Asp816Val
AML M1	A-C	30	6	nie
AML M1	R-P	54	92	nie
AML M1	M-J	51	90	nie
AML M1	E-E	46	91	nie
AML M1	A-R	26	96	nie
AML M1	I-P	53	59	nie
AML-M2	J-B	65	53	nie
AML-M2	M-G	34	53	Lys546Lys
AML-M2	A-K	48	80	nie
AML-M2	M-B	42	76	Ile789Ile
AML-M2	M-D	68	90	nie
AML-M2	K-S	46	82	nie
AML-M2	M-B	26	81	Met541Leu, Asp816Val
AML-M2	P-M	34	85	nie
AML-M2	I-S	49	95	nie
AML-M2	O-K	20	7	nie
AML-M2	L-B	45	72	nie
AML-M2	T-L	44	71	Met541Leu

AML-M3	M-P	31	43	nie
AML-M3	M-R	19	95	nie
AML-M3	H-D	55	81	nie
AML-M3	S-O	64	bd	nie
AML-M3	B-C	55	bd	nie
AML-M3	E-R	60	bd	nie
AML-M3	T-K	51	bd	nie
AML-M4	J-C	51	100	nie
AML-M4	Z-C	52	65	nie
AML-M4	A-I	68	68	nie
AML-M4	R-R	50	8	nie
AML-M4	H-S	60	65	Lys546Lys
AML-M4	L-O	43	55	nie
AML-M4	Z-C	42	40	nie
AML-M4	S-T	39	67	nie
AML-M4	D-D	29	17	nie
AML-M4	D-K	23	54	nie
AML-M4	W-M	60	1	Lys546Lys
AML-M4	H-M	43	94	nie
AML-M4	J-P	52	80	nie
AML-M4	K-W	58	4	nie
AML-M4	A-W	41	bd	Met541Leu
AML-M4	J-S	50	49	Met541Leu
AML-M4	Z-K	43	31	Ile789Ile
AML-M4	R-O	44	19	nie
AML-M5a	M-K	18	9	Met541Leu
AML-M5a	B-O	40	bd	Met541Leu
AML-M5b	M-F	44	29	Met541Leu
AML-M5b	K-D	37	51	nie
AML-M5b	M-S	22	26	Met541Leu
AML-M5b	B-K	52	10	nie
ALL	K-P	45	bd	nie

ALL	D-G	57	0	nie
ALL	S-G	61	0	nie
ALL	T-M	74	0	nie
ALL	M-M	27	bd	nie
ALL	M-M	30	0	Met541Leu
ALL	M-S	19	bd	nie
ALL	M-W	25	bd	nie
ALL	D-Z	25	bd	nie
ALL	M-R	53	94	nie
ALL	R-M	21	2	nie
ALL	K-S	51	bd	Lys546Lys
ALL	Ł-R	21	1	nie
ALL	K-P	22	bd	nie
ALL	M-P	46	bd	nie
ALL	W-S	73	bd	nie
Bifenotypowa	T-K	23	1	Met541Leu
Biklonalna	H-W	43	4	Lys546Lys, Val560Gly

10. PIŚMIENICTWO

1. Adriaansen HJ, te Boekhorst PA, Hagemeyer AM, van der Schoot CE, Delwel HR, van Dongen JJ. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood*. 1993; 81: 3043-51.
2. Akin C, Metcalfe DD. The biology of Kit in disease and the application of pharmacogenetics. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 114: 13-19.
3. Amadori S, Venditti A, Del Poeta G, Stasi R, Buccisano F, Bruno A, Tamburini A, Cox MC, Maffei L, Aronica G, Simone MD, Adorno G, Masi M, Tribalto M, Papa G. Minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): a distinct clinico-biologic entity with poor prognosis. *Ann Hematol*. 1996; 72: 208-15.
4. Andersson J, Sjogren H, Meis-Kindblom JM, Stenman G, Aman P, Kindblom LG. The complexity of KIT gene mutations and chromosome rearrangements and their clinical correlation in gastrointestinal stromal (pacemaker cell) tumors. *Am J Pathol*. 2002; 160: 15-22.
5. Arthur DC, Bloomfield CD. Partial deletion of the long arm of chromosome 16 and bone marrow eosinophilia in acute nonlymphocytic leukemia: a new association. *Blood*. 1983; 61: 994-98.
6. Arthur DC, Bloomfield CD, Lindquist LL, Nesbit ME Jr. Translocation 4; 11 in acute lymphoblastic leukemia: clinical characteristics and prognostic significance. *Blood*. 1982; 59: 96-99.
7. Ashman L. K., Cambareri A. C., To L. B., Levinsky R. J., Juttner C. A. Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood*. 1991; 78: 30-37.

8. Ashman LK, Roberts MM, Gadd SJ, Cooper SJ, Juttner CA. Expression of a 150-kD cell surface antigen identified by monoclonal antibody YB5.B8 is associated with poor prognosis in acute non-lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res.* 1988; 12: 923-28.
9. Auewarakul CU, Lauhakirti D, Promsuwicha O, Munkhetvit C. C-kit receptor tyrosine kinase (CD117) expression and its positive predictive value for the diagnosis of Thai adult acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2006; 85: 108-112.
10. Ball ED, Davis RB, Griffin JD, Mayer RJ, Davey FR, Arthur DC, Wurster-Hill D, Noll W, Elghetany MT, Allen SL, et al. Prognostic value of lymphocyte surface markers in acute myeloid leukemia. *Blood.* 1991; 77: 2242-50.
11. Bash RO, Hall S, Timmons CF, Crist WM, Amylon M, Smith RG, Baer R. Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study. *Blood.* 1995; 86: 666-76.
12. Bauer KA, Rosenberg RD. Thrombin generation in acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1984; 64: 791-96.
13. Bene M. C., Bernier M., Casasnovas R. O., Castoldi G., Knapp W., Lanza F., Ludwig W. D., Matutes E., Orfao A., Sperling C., van't Veer M. B. The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. *Blood* 1998; 92: 596-99.
14. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 1995; 9: 1783-86.
15. Bennett B, Booth NA, Croll A, Dawson AA. The bleeding disorder in acute promyelocytic leukaemia: fibrinolysis due to u-PA rather than defibrination. *Br J Haematol.* 1989; 71: 511-17.

16. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976; 33: 451-58.
17. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol.* 1991; 78: 325-9.
18. Berger R, Bernheim A, Sigaux F, Daniel MT, Valensi F, Flandrin G. Acute monocytic leukemia chromosome studies. *Leuk Res.* 1982; 6: 17-26.
19. Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, Bachvarova RF. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: Pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl.* 1993; 125-37.
20. Besmer P., Murphy J. E., George P. C., Qui F., Bergold P. J., Ledermann L., Synder H. W., Brodeur D., Zuckermann E. E., Hardy W. D. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* 1986; 320: 415-21.
21. Birg F, Courcoul M, Rosnet O, Bardin F, Pebusque MJ, Marchetto S, Tabilio A, Mannoni P, Birnbaum D. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood.* 1992; 80: 2584-93.
22. Bloomfield CD, Secker-Walker LM, Goldman AI, Van Den Berghe H, de la Chapelle A, Ruutu T, Alimena G, Garson OM, Golomb HM, Rowley JD, et al. Six-year follow-up of the clinical significance of karyotype in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1989; 40: 171-85.
23. Boggs DR., Wintrobe MM., Cartwright GE. The acute leukemias. Analysis of 322 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1962; 41: 163-225.

24. Borowitz MJ, Carroll AJ, Shuster JJ, Look AT, Behm FG, Pullen DJ, Land VJ, Steuber P, Crist WM. Use of clinical and laboratory features to define prognostic subgroups in B-precursor acute lymphoblastic leukemia: experience of the Pediatric Oncology Group. *Recent Results Cancer Res.* 1993; 131: 257-67.
25. Borowitz MJ, Gockerman JP, Moore JO, Civin CI, Page SO, Robertson J, Bigner SH. Clinicopathologic and cytogenetic features of CD34 (My 10)-positive acute nonlymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 1989; 91: 265-70.
26. Borrow J, Goddard AD, Sheer D, Solomon E. Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science.* 1990; 249: 1577-80.
27. Borrow J, Shearman AM, Stanton VP Jr, Becher R, Collins T, Williams AJ, Dube I, Katz F, Kwong YL, Morris C, Ohyashiki K, Toyama K, Rowley J, Housman DE. The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat Genet.* 1996; 12: 159-67.
28. Briddel R. A., Broudy V. C., Bruno E., Brandt J. E., Srour E. F., Hoffman R. Further phenotypic characterization and isolation of human hematopoietic progenitor cells using a monoclonal antibody to the c-kit receptor. *Blood* 1992; 79: 3159-67.
29. Broudy V. C., Kovach N. L., Bennett L. G., Lin N., Jacobsen F. W., Kidd P. G. Human umbilical vein endothelial cells display high-affinity c-kit receptors and produce a soluble form of the c-kit receptor. *Blood* 1994; 83: 97-111.
30. Brunning RD, McKenna RW. Acute leukemias. *Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the Bone Marrow.* Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology. 1994: 19-142
31. Buttner C, Henz BM, Welker P, Sepp NT, Grabbe J. Identification of activating c-kit mutations in adult-, but not in childhood-onset indolent mastocytosis: a possible explanation for divergent clinical behavior. *J Invest Dermatol.* 1998; 111: 1227-31.

32. Cabrera ME. Immunologic classification of acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1990 Fall; 12: 283-91.
33. Cairoli R, Beghini A, Morello E, Grillo G, Montillo M, Larizza L, Morra E. Imatinib mesylate in the treatment of Core Binding Factor leukemias with KIT mutations. A report of three cases. *Leuk Res.* 2005; 29: 397-400.
34. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, Devaux Y, Treille D, Larese A, Maupas J, Gentilhomme O, Ehram A, Fiere D. Surface marker expression in adult acute myeloid leukaemia: correlations with initial characteristics, morphology and response to therapy. *Br J Haematol.* 1989; 72: 161-66.
35. Carroll AJ, Crist WM, Parmley RT, Roper M, Cooper MD, Finley WH. Pre-B cell leukemia associated with chromosome translocation 1;19. *Blood.* 1984; 63: 721-24.
36. Cascavilla N, Musto P, D'Arena G, Melillo L, Carella AM, Petrilli M, Sanpaolo G, Carotenuo M. CD117 (c-kit) is a restricted antigen of acute myeloid leukemia and characterizes early differentiative levels of M5 FAB subtype. *Haematologica* 1998; 83: 392-97.
37. Chan WC, Brynes RK, Kim TH, Verras A, Schick C, Green RJ, Ragab AH. Acute megakaryoblastic leukemia in early childhood. *Blood.* 1983; 62: 92-98.
38. Cordonnier C, Vernant JP, Brun B, Heilmann MG, Kuentz M, Bierling P, Farcet JP, Rodet M, Duedari N, Imbert M, et al. Acute promyelocytic leukemia in 57 previously untreated patients. *Cancer.* 1985; 55: 18-25.
39. Cortes J, Giles F, O'Brien S, Thomas D, Albitar M, Rios MB, Talpaz M, Garcia-Manero G, Faderl S, Letvak L, Salvado A, Kantarjian H. Results of imatinib mesylate therapy in patients with refractory or recurrent acute myeloid leukemia, high-risk myelodysplastic syndrome, and myeloproliferative disorders. *Cancer.* 2003; 97: 2760-66.

40. Cozzolino F, Torcia M, Miliani A, Carossino AM, Giordani R, Cinotti S, Filimberti E, Saccardi R, Bernabei P, Guidi G, et al. Potential role of interleukin-1 as the trigger for diffuse intravascular coagulation in acute nonlymphoblastic leukemia. *Am J Med.* 1988; 84: 240-50.
41. Crist W, Carroll A, Shuster J, Jackson J, Head D, Borowitz M, Behm F, Link M, Steuber P, Ragab A, et al. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group study. *Blood.* 1990; 76: 489-94.
42. Crosier PS, Ricciardi ST, Hall LR, Vitas MR, Clark SC, Crosier KE. Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia. *Blood.* 1993; 82: 1151-58.
43. Cuneo A, Ferrant A, Michaux JL, Boogaerts M, Demuyneck H, Van Orshoven A, Criel A, Stul M, Dal Cin P, Hernandez J, et al. Cytogenetic profile of minimally differentiated (FAB M0) acute myeloid leukemia: correlation with clinicobiologic findings. *Blood.* 1995; 85: 3688-94.
44. Dalla-Favera R, Martinotti S, Gallo RC, Erikson J, Croce CM. Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas. *Science.* 1983; 219: 963-67.
45. Del Vecchio L, Schiavone EM, Ferrara F, Pace E, Lo Pardo C, Pacetti M, Russo M, Cirillo D, Vacca C. Immunodiagnosis of acute leukemia displaying ectopic antigens: proposal for a classification of promiscuous phenotypes. *Am J Hematol.* 1989; 31: 173-80.
46. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med.* 2002; 347: 472-80.

47. de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature*. 1990; 347: 558-61.
48. Diaz MO, Rubin CM, Harden A, Zieminska S, Larson RA, Le Beau MM, Rowley JD. Deletions of interferon genes in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1990; 322: 77-82.
49. Dinndorf PA, Andrews RG, Benjamin D, Ridgway D, Wolff L, Bernstein ID. Expression of normal myeloid-associated antigens by acute leukemia cells. *Blood*. 1986; 67: 1048-53.
50. Di Noto R, Lo Pardo C, Schiavone EM, Manzo C, Vacca C, Ferrara F, Del Vecchio L. Stem cell factor receptor (c-kit, CD117) is expressed on blast cells from most immature types of acute myeloid malignancies but is also a characteristic of a subset of acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1996; 92: 562-64.
51. Dong S, Zhu J, Reid A, Strutt P, Guidez F, Zhong HJ, Wang ZY, Licht J, Waxman S, Chomienne C, Chen Z, Zelent A, Chen SJ. Amino-terminal protein-protein interaction motif (POZ-domain) is responsible for activities of the promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor-alpha fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 3624-29.
52. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1038-42. Erratum in: *N Engl J Med* 2001; 345: 232.
53. Dubosc-Marchenay N, Lacombe F, Dumain P, Marit G, Montastruc M, Belloc F, Reiffers J. Role of blast cell immunophenotyping for the diagnosis and prognosis of acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol*. 1992; 10: 235-49.

54. Duro D, Bernard O, Della Valle V, Leblanc T, Berger R, Larsen CJ. Inactivation of the P16INK4/MTS1 gene by a chromosome translocation t(9;14)(p21-22;q11) in an acute lymphoblastic leukemia of B-cell type. *Cancer Res.* 1996; 56: 848-54.
55. Dyck JA, Maul GG, Miller WH Jr, Chen JD, Kakizuka A, Evans RM. A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell.* 1994; 76: 333-43.
56. Erickson PF, Robinson M, Owens G, Drabkin HA. The ETO portion of acute myeloid leukemia t(8;21) fusion transcript encodes a highly evolutionarily conserved, putative transcription factor. *Cancer Res.* 1994; 54: 1782-86.
57. Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem.* 1993; 62: 453-81.
58. Fenaux P, Chomienne C, Degos L. Acute promyelocytic leukemia: biology and treatment. *Semin Oncol.* 1997; 24: 92-102.
59. Fizzotti M, Cimino G, Pisegna S, Alimena G, Quartarone C, Mandelli F, Pelicci PG, Lo Coco F. Detection of homozygous deletions of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (p16) gene in acute lymphoblastic leukemia and association with adverse prognostic features. *Blood.* 1995; 85: 2685-90.
60. Foon KA, Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood.* 1986; 68: 1-31.
61. French registry of acute leukemia and myelodysplastic syndromes. Age distribution and hemogram analysis of the 4496 cases recorded during 1982-1983 and classified according to FAB criteria. Groupe Francais de Morphologie Hematologique. *Cancer.* 1987; 60: 1385-94.

62. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther.* 2002; 1: 1115-24.
63. Furitsu T., Tsujimura T., Tono T., Ikeda H., Kitayama H., Koshimizu U., Sugahara H., Butterfield J. H., Ashman L. K., Kanayama Y., Matzuzawa Y., Kitamura Y., Kanakura Y. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* 1993; 92: 1736-44.
64. Garand R, Bene MC. A new approach of acute lymphoblastic leukemia immunophenotypic classification: 1984-1994 the GEIL experience. *Groupe d'Etude Immunologique des Leucemies. Leuk Lymphoma.* 1994; 13 Suppl 1:1-5.
65. Gari M., Goodeve A., Wilson G., Winship P., Langabeer S., Linch D., Vandenberghe E., Peake I., Reilly J. C-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 105: 894-900.
66. Geller RB, Zahurak M, Hurwitz CA, Burke PJ, Karp JE, Piantadosi S, Civin CI. Prognostic importance of immunophenotyping in adults with acute myelocytic leukaemia: the significance of the stem-cell glycoprotein CD34 (My10) *Br J Haematol.* 1990; 76: 340-47.
67. Giebel LB, Spritz RA. Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88: 8696-99.
68. Giebel LB, Strunk KM, Holmes SA, Spritz RA. Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. *Oncogene.* 1992; 7: 2207-17.

69. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004; 80-97.
70. Goldman JM, Melo JV. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1084-86.
71. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray-Ward P, Morgan E, Raimondi SC, Rowley JD, Gilliland DG. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92: 4917-21.
72. Gotlib J. KIT mutations in mastocytosis and their potential as therapeutic targets. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006; 26: 575-92.
73. Gralnick HR, Marchesi S, Givelber H. Intravascular coagulation in acute leukemia: clinical and subclinical abnormalities. *Blood*. 1972; 40: 709-18.
74. Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP, Donti E, Biondi A, Lo Coco F, Grignani F, Pelicci PG. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood*. 1994; 83: 10-25.
75. Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, Croce CM, Canaani E. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene. *Cell*. 1992; 71: 701-08.
76. Haase D, Feuring-Buske M, Konemann S, Fonatsch C, Troff C, Verbeek W, Pekrun A, Hiddemann W, Wormann B. Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at the level of early hematopoietic stem cells by cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations. *Blood*. 1995; 86 :2906-12.
77. Head D, Kopecky KJ, Weick J, Files JC, Ryan D, Foucar K, Montiel M, Bickers J, Fishleder A, Miller M, et al. Effect of aggressive daunomycin therapy on survival in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1995; 86: 1717-28.

78. Heim S, Kristoffersson U, Mandahl N, Mitelman F, Bekassy AN, Garwicz S, Wiebe T. High resolution banding analysis of the reciprocal translocation t(6;9) in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1986; 22: 195-201.
79. Heinrich MC, Corless CL, Blanke C, et al: KIT mutational status predicts clinical response to STI 571 in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Proc Am Soc Clin Oncol* 21: 2a, 2002 (abstr 6).
80. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 2000; 96: 925-31.
81. Heldin C. H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 1995; 80: 213-23.
82. Hellmann A, Prejzner W. Aktualne możliwości leczenia przewlekłej białaczki szpikowej. *Acta Haemat Pol.* 2001; 32: 5-14.
83. Hetzel P, Gee TS. A new observation in the clinical spectrums of erythroleukemia. A report of 46 cases. *Am J Med.* 1978; 64: 765-72.
84. Hillestad LK. Acute promyelocytic leukemia. *Acta Med Scand.* 1957; 159: 189-94.
85. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 1998; 279: 577-80.
86. Holmes R, Keating MJ, Cork A, Broach Y, Trujillo J, Dalton WT Jr, McCredie KB, Freireich EJ. A unique pattern of central nervous system leukemia in acute myelomonocytic leukemia associated with inv(16)(p13q22). *Blood.* 1985; 65: 1071-78.

87. Hou YY, Tan YS, Sun MH, Wei YK, Xu JF, Lu SH, A-Ke-Su SJ, Zhou YN, Gao F, Zheng AH, Zhang TM, Hou WZ, Wang J, Du X, Zhu XZ. C-kit gene mutation in human gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol*. 2004; 10: 1310-14.
88. Huang MJ, Li CY, Nichols WL, Young JH, Katzmann JA. Acute leukemia with megakaryocytic differentiation: a study of 12 cases identified immunocytochemically. *Blood*. 1984; 64: 427-39.
89. Hurwitz CA, Raimondi SC, Head D, Krance R, Mirro J Jr, Kalwinsky DK, Ayers GD, Behm FG. Distinctive immunophenotypic features of t(8;21)(q22;q22) acute myeloblastic leukemia in children. *Blood*. 1992; 80: 3182-88.
90. Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, Kanayama Y, Yonezawa T, Tarui S, Griffin JD. Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood*. 1991; 78: 2962-68.
91. Jaffe ES, Krenacs L, Kumar S, Kingma DW, Raffeld M. Extranodal peripheral T-cell and NK-cell neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 1999; 111(Suppl. 1): S46-55.
92. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*. 1997; 90: 2863-92.
93. Jensen AW, Hokland M, Jorgensen H, Justesen J, Ellegaard J, Hokland P. Solitary expression of CD7 among T-cell antigens in acute myeloid leukemia: identification of a group of patients with similar T-cell receptor beta and delta rearrangements and course of disease suggestive of poor prognosis. *Blood*. 1991; 78: 1292-300.
94. Joensuu H, Fletcher C, Dimitrijevic S, Silberman S, Roberts P, Demetri G. Management of malignant gastrointestinal stromal tumours. *Lancet Oncol*. 2002; 3: 655-64.

95. Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, Silberman S, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B, Demetri GD. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1052-56.
96. Johnson BE, Fischer T, Fischer B, Dunlop D, Rischin D, Silberman S, Kowalski MO, Sayles D, Dimitrijevic S, Fletcher C, Hornick J, Salgia R, Le Chevalier T. Phase II study of imatinib in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 5880-87.
97. Kalwinsky DK, Raimondi SC, Schell MJ, Mirro J Jr, Santana VM, Behm F, Dahl GV, Williams D. Prognostic importance of cytogenetic subgroups in de novo pediatric acute nonlymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 1990; 8: 75-83.
98. Kanakura Y, Furitsu T, Tsujimura T, Butterfield JH, Ashman LK, Ikeda H, Kitayama H, Kanayama Y, Matsuzawa Y, Kitamura Y. Activating mutations of the c-kit proto-oncogene in a human mast cell leukemia cell line. *Leukemia.* 1994; 8 Suppl 1: S18-22.
99. Kanakura Y., Ikeda H., Kitayama H., Sugahara H., Furitsu T. Expression, function and activation of the proto-oncogene c-kit product in human leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 1993; 10: 35-41.
100. Kaplan SS, Penchansky L, Stolc V, Contis L, Krause JR. Immunophenotyping in the classification of acute leukemia in adults. Interpretation of multiple lineage reactivity. *Cancer.* 1989; 63: 1520-27.
101. Keinanen M, Griffin JD, Bloomfield CD, Machnicki J, de la Chapelle A. Clonal chromosomal abnormalities showing multiple-cell-lineage involvement in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1988; 318: 1153-58.
102. Kemmer K, Corless CL, Fletcher JA, McGreevey L, Haley A, Griffith D, Cummings OW, Wait C, Town A, Heinrich MC. KIT mutations are common in testicular seminomas. *Am J Pathol.* 2004; 164: 305-13.

103. Kikuchi A, Hayashi Y, Kobayashi S, Hanada R, Moriwaki K, Yamamoto K, Fujimoto J, Kaneko Y, Yamamori S. Clinical significance of TAL1 gene alteration in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Leukemia*. 1993; 7: 933-38.
104. Kimura A, Nakata Y, Katoh O, Hyodo H. C-KIT point mutation In patients with myeloproliferative disorders. *Leukemia and Lymphoma*. 1997; 25: 281-87.
105. Kindler T, Breitenbuecher F, Marx A, Beck J, Hess G, Weinkauff B, Duyster J, Peschel C, Kirkpatrick CJ, Theobald M, Gschaidmeier H, Huber C, Fischer T. Efficacy and safety of imatinib in adult patients with c-kit-positive acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004; 103: 3644-54.
106. Kindler T, Breitenbuecher F, Marx A, Hess G, Gschaidmeier H, Gamm H, Kirkpatrick CJ, Huber C, Fischer T. Sustained complete hematologic remission after administration of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate in a patient with refractory, secondary AML. *Blood*. 2003; 101:2960-62.
107. Kinlen LJ. Leukaemia. *Cancer Surv*. 1994; 19-20: 475-91.
108. Kita K, Miwa H, Nakase K, Kawakami K, Kobayashi T, Shirakawa S, Tanaka I, Ohta C, Tsutani H, Oguma S, et al. Clinical importance of CD7 expression in acute myelocytic leukemia. The Japan Cooperative Group of Leukemia/Lymphoma. *Blood*. 1993; 81: 2399-405.
109. Kita K, Nakase K, Miwa H, Masuya M, Nishii K, Morita N, Takakura N, Otsuji A, Shirakawa S, Ueda T, et al. Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia associated with the t(8;21)(q22;q22) chromosomal abnormality: frequent expression of immature B-cell antigen CD19 together with stem cell antigen CD34. *Blood*. 1992; 80: 470-77.
110. Klein G. Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men. *Cell*. 1983; 32: 311-15.

111. Knapp W, Strobl H, Majdic O. Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry*. 1994; 18: 187-98.
112. Koefler HP. Syndromes of acute nonlymphocytic leukemia. *Ann Intern Med*. 1987; 107: 748-58.
113. Koike T. Megakaryoblastic leukemia: the characterization and identification of megakaryoblasts. *Blood*. 1984; 64: 683-92.
114. Koken MH, Puvion-Dutilleul F, Guillemain MC, Viron A, Linares-Cruz G, Stuurman N, de Jong L, Szostecki C, Calvo F, Chomienne C, et al. The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO J*. 1994; 13: 1073-83.
115. Kraemer D, Wozniak RW, Blobel G, Radu A. The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91: 1519-23.
116. Lammie A., Drobnjak M., Gerald W., Saad A., Cote R., Cordon-Cardo C. Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*. 1994; 42: 1417-25.
117. Larson RA, Williams SF, Le Beau MM, Bitter MA, Vardiman JW, Rowley JD. Acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils and inv(16) or t(16;16) has a favorable prognosis. *Blood*. 1986; 68: 1242-49.
118. Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Kordek R, Nassar A, Sobin LH, Miettinen M. Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *Am J Pathol*. 2000; 157: 1091-95.

119. Le Beau MM, Larson RA, Bitter MA, Vardiman JW, Golomb HM, Rowley JD. Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia. A unique cytogenetic-clinicopathological association. *N Engl J Med.* 1983; 309: 630-36.
120. Lee EJ, Yang J, Leavitt RD, Testa JR, Civin CI, Forrest A, Schiffer CA. The significance of CD34 and TdT determinations in patients with untreated de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1992; 6: 1203-39.
121. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, Head DR, Appelbaum FR, Willman CL. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood.* 1997; 89: 3323-29.
122. Licht JD, Chomienne C, Goy A, Chen A, Scott AA, Head DR, Michaux JL, Wu Y, DeBlasio A, Miller WH Jr, et al. Clinical and molecular characterization of a rare syndrome of acute promyelocytic leukemia associated with translocation (11;17). *Blood.* 1995; 85: 1083-94.
123. Licht JD, Shaknovich R, English MA, Melnick A, Li JY, Reddy JC, Dong S, Chen SJ, Zelent A, Waxman S. Reduced and altered DNA-binding and transcriptional properties of the PLZF-retinoic acid receptor-alpha chimera generated in t(11;17)-associated acute promyelocytic leukemia. *Oncogene.* 1996; 12: 323-36.
124. Linet MS. *The leukemia: Epidemiologic aspects.* New York: Oxford University Press, 1985
125. Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999; 31: 1053-74.
126. Lisiewicz J. Mechanisms of hemorrhage in leukemias. *Semin Thromb Hemost.* 1978; 4: 241-67.

127. Liu P, Tarle SA, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Siciliano MJ, Collins FS. Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science*. 1993; 261: 1041-44.
128. Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y. Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res*. 2001; 25: 571-76.
129. Longo L, Pandolfi PP, Biondi A, Rambaldi A, Mencarelli A, Lo Coco F, Diverio D, Pegoraro L, Avanzi G, Tabilio A, et al. Rearrangements and aberrant expression of the retinoic acid receptor alpha gene in acute promyelocytic leukemias. *J Exp Med*. 1990; 172: 1571-75.
130. Look AT, Melvin SL, Williams DL, Brodeur GM, Dahl GV, Kalwinsky DK, Murphy SB, Mauer AM. Aneuploidy and percentage of S-phase cells determined by flow cytometry correlate with cell phenotype in childhood acute leukemia. *Blood*. 1982; 60: 959-67.
131. Löffler H, Gassmann W, Haferlach T. AML M1 and M2 with eosinophilia and AML M4Eo: diagnostic and clinical aspects. *Leuk Lymphoma*. 1995; 18 Suppl 1: 61-63.
132. Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, Xiao S, Singer S, Fletcher CD, Fletcher JA. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol*. 2000; 156: 791-95.
133. Ma Y, Longley BJ, Wang X, Blount JL, Langley K, Caughey GH. Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *J Invest Dermatol* 1999, 112: 165-70.
134. Madhusudan S, Ganesan TS. Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clin Biochem*. 2004; 37: 618-35.

135. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002; 298: 1912-34.
136. Martinez-Climent JA, Lane NJ, Rubin CM, Morgan E, Johnstone HS, Mick R, Murphy SB, Vardiman JW, Larson RA, Le Beau MM, et al. Clinical and prognostic significance of chromosomal abnormalities in childhood acute myeloid leukemia de novo. *Leukemia*. 1995; 9: 95-101.
137. Mayrhofer G., Gadd S. J., Spargo L. D. J., Ashman L. K. Specificity of a mouse monoclonal antibody raised against acute myeloid leukaemia cells for mast cells in human mucosal and connective tissues. *Immunol Cell Biol*. 1987; 65: 241-50.
138. McLean TW, Ringold S, Neuberg D, Stegmaier K, Tantravahi R, Ritz J, Koefler HP, Takeuchi S, Janssen JW, Seriu T, Bartram CR, Sallan SE, Gilliland DG, Golub TR. TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996; 88: 4252-58.
138. McNiece I. K., Langley K. E., Zsebo K. M. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and Epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp Hematol* 1991; 19: 226-31.
140. Meeker TC, Hardy D, Willman C, Hogan T, Abrams J. Activation of the interleukin-3 gene by chromosome translocation in acute lymphocytic leukemia with eosinophilia. *Blood*. 1990; 76: 285-89.
141. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*. 1996; 88: 2375-84.
142. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, Zhang Q, Sweetser DA, Woods WG, Bernstein ID, Arceci RJ, Radich JP. Activating mutations of RTK/ras signal transduction pathway in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2003; 102: 1474-79.

143. Mesters RM, Padro T, Bieker R, Steins M, Kreuter M, Goner M, Kesley S, Scigalla P, Fiedler W, Buchner T, Berdel WE. Stable remission after administration of the receptor tyrosine kinase inhibitor SU5416 in patient with refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001; 98: 241-43.
144. Metcalf D., Nicola N. A. Direct proliferative actions of stem cell factor on murine bone marrow cells in vitro: Effects of combination with colony-stimulating factors. *Proc National Acad Sci USA*. 1991; 88: 6239-43.
145. Mirro J, Kitchingman G, Williams D, Lauzon GJ, Lin CC, Callihan T, Zipf TF. Clinical and laboratory characteristics of acute leukemia with the 4;11 translocation. *Blood*. 1986; 67: 689-97.
146. Moretta L, Mingari MC, Moretta A, Fauci AS. Human lymphocyte surface markers. *Semin Hematol*. 1982; 19: 273-84.
147. Morey AL, Wanigesekera GD, Hawkins NJ, Ward RL. C-kit mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Pathology*. 2002; 34: 315-19.
148. Muroi K, Nakamura M, Amemiya Y, Suda T, Miura Y. Expression of c-kit receptor (CD117) and CD34 in leukemic cells. *Leuk Lymphoma*. 1995; 16: 297-305.
149. Muroi K, Suda T, Kawano C, Amemiya Y, Eguchi M, Miura Y., Ozawa K. Analysis of C-KIT, TIE and HTK expression on leukemic cells using flow cytometry: a preliminary report. *Leukemia Res*. 1998; 22: 827-30.
150. Murphy SB, Raimondi SC, Rivera GK, Crone M, Dodge RK, Behm FG, Pui CH, Williams DL. Nonrandom abnormalities of chromosome 9p in childhood acute lymphoblastic leukemia: association with high-risk clinical features. *Blood*. 1989; 74: 409-15.

151. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, Metcalfe DD. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-KIT in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 10560-64.
152. Nakamura T, Largaespada DA, Lee MP, Johnson LA, Ohyashiki K, Toyama K, Chen SJ, Willman CL, Chen IM, Feinberg AP, Jenkins NA, Copeland NG, Shaughnessy JD Jr. Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat Genet*. 1996; 12: 154-58.
153. Nakata Y, Kimura A, Katoh O, Kawaishi K, Hyodo H, Abe K, Kuramoto A, Satow Y. c-kit point mutation of extracellular domain in patients with myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*. 1995; 91:661-63.
154. Nanri T, Matsuno N, Kawakita T, Mitsuya H, Asou N. Imatinib mesylate for refractory acute myeloblastic leukemia harboring inv(16) and a C-KIT exon 8 mutation. *Leukemia*. 2005; 19: 1673-5.
155. Natali P. G., Nicotra M. R., Sures I., Santoro E., Bigotti A., Ullrich A. Expression of c-kit receptor in normal and transformed human nonlymphoid tissues. *Cancer Res* 1992; 52: 6139-43.
156. Ning ZQ, Li J, Arceci RJ. Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit-mediated cytokine –independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood*. 2001; 97: 3559-67.
157. Ning ZQ, Li J, Arceci RJ. Activating mutations of c-kit at codon 816 confer drug resistance in human leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 2001; 4: 513-22.

158. Nishii K, Kita K, Miwa H, Kawakami K, Nakase K, Masuya M, Morita N, Omay SB, Otsuji N, Fukumoto M, et al. c-kit gene expression in CD7-positive acute lymphoblastic leukemia: close correlation with expression of myeloid-associated antigen CD13. *Leukemia*. 1992; 6: 662-68.
159. Nomdedeu JF, Mateu R, Altes A, Llorente A, Rio C, Estivill C, Lopez O, Ubeda J, Rubiol E. Enhanced myeloid specificity of CD117 compared with CD13 and CD33. *Leukemia Res* 1999; 23: 341-47.
160. Nucifora G, Rowley JD. AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1995; 86:1-14.
161. Ogawa M., Matsuzaki Y., Nishikawa S., Hayashi S., Kunisada T., Sudo T., Kina T., Nakauchi H., Nishikawa S. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med*. 1991; 174: 63-71.
162. Paietta E, Andersen J, Gallagher R, Bennett J, Yunis J, Cassileth P, Rowe J, Wiernik PH. The immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL): an ECOG study. *Leukemia*. 1994; 8: 1108-12.
163. Paietta E, Wiernik PH, Andersen J, Bennett J, Yunis J. Acute myeloid leukemia M4 with inv(16) (p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood*. 1993; 82: 2595.
164. Paietta E, Wiernik PH, Andersen J. Immunophenotypic features of t(8;21) (q22;q22) acute myeloid leukemia in adults. *Blood*. 1993; 81: 1975.
165. Parkin JL, Arthur DC, Abramson CS, McKenna RW, Kersey JH, Heideman RL, Brunning RD. Acute leukemia associated with the t(4;11) chromosome rearrangement: ultrastructural and immunologic characteristics. *Blood*. 1982; 60: 1321-31.

166. Peterson BA, Levine EG. Uncommon subtypes of acute nonlymphocytic leukemia: clinical features and management of FAB M5, M6 and M7. *Semin Oncol.* 1987; 14: 425-34.
167. Petkovic I, Josip K, Nakic M, Kastelan M. Cytogenetic, cytomorphic, and immunologic analysis in 55 children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1996; 88: 57-65.
168. Porwit-MacDonald A, Janossy G, Ivory K, Swirsky D, Peters R, Wheatley K, Walker H, Turker A, Goldstone AH, Burnett A. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. IV. CD34 overexpression in acute myelogenous leukemia M2 with t(8;21). *Blood.* 1996; 87: 1162-69.
169. Pui CH, Behm FG, Crist WM. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1993; 82: 343-62.
170. Pui CH, Carroll AJ, Head D, Raimondi SC, Shuster JJ, Crist WM, Link MP, Borowitz MJ, Behm FG, Land VJ, et al. Near-triploid and near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood.* 1990; 76: 590-96.
171. Pui CH, Williams DL, Roberson PK, Raimondi SC, Behm FG, Lewis SH, Rivera GK, Kalwinsky DK, Abromowitch M, Crist WM, et al. Correlation of karyotype and immunophenotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 1988; 6: 56-61.
172. Pullen DJ, Boyett JM, Crist WM, Falletta JM, Roper M, Dowell B, Van Eys J, Jackson JF, Humphrey GB, Metzgar RS, i in. Pediatric oncology group utilization of immunologic markers in the designation of acute lymphocytic leukemia subgroups: influence on treatment response. *Ann N Y Acad Sci.* 1984; 428: 26-48.
173. Quesnel B, Preudhomme C, Philippe N, Vanrumbeke M, Dervite I, Lai JL, Bauters F, Wattel E, Fenaux P. p16 gene homozygous deletions in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1995; 85: 657-63.

174. Qui F., Ray P., Brown K., Barker P. E., Jhanwar S., Ruddle F. H., Besmer P. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family- oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EBMO*. 1988; 7: 1003-11.
175. Raimondi SC. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993; 81: 2237-51.
176. Raimondi SC, Behm FG, Roberson PK, Pui CH, Rivera GK, Murphy SB, Williams DL. Cytogenetics of childhood T-cell leukemia. *Blood*. 1988; 72: 1560-66.
177. Raimondi SC, Behm FG, Roberson PK, Williams DL, Pui CH, Crist WM, Look AT, Rivera GK. Cytogenetics of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia with emphasis on prognostic implications of the t(1;19). *J Clin Oncol*. 1990; 8: 1380-8.
178. Raimondi SC, Peiper SC, Kitchingman GR, Behm FG, Williams DL, Hancock ML, Mirro J Jr. Childhood acute lymphoblastic leukemia with chromosomal breakpoints at 11q23. *Blood*. 1989; 73: 1627-34.
179. Raimondi SC, Pui CH, Behm FG, Williams DL. 7q32-q36 translocations in childhood T cell leukemia: cytogenetic evidence for involvement of the T cell receptor beta-chain gene. *Blood*. 1987; 69: 131-4.
180. Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ. The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood*. 1996; 87: 882-86.
181. Reuss-Borst MA, Buhring HJ, Schmidt H, Muller CA. AML: immunophenotypic heterogeneity and prognostic significance of c-kit expression. *Leukemia*. 1994; 8: 258-63.
182. Ritz J, Nadler LM, Bhan AK, Notis-McConarty J, Pesando JM, Schlossman SF. Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) by lymphomas of B-cell and T-cell lineage. *Blood*. 1981; 58: 648-52.

183. Riva P, Larizza L. A novel potentially diagnostic polymorphism (4894 A/C) in exon 10 of the human c-kit proto-oncogene. *Mol Cell Probes*. 1996 Oct;10: 387-8.
184. Robertson MJ, Ritz J. Prognostic significance of the surface antigens expressed by leukemic cells. *Leuk Lymphoma*. 1994;13 Suppl 1:15-22.
185. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*. 2000; 19: 5548-57.
186. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, Macintyre EA, Berger R, Bernard OA. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1995; 86: 4263-69.
187. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996; 10: 877-95.
188. Rottapel R., Reedijk M., Williams D. E., Lyman S. D., Andreson D. M., Pawson T., Bernstein A. The Steel/W transduction pathway: kit autophosphorylation and its association with a unique subset of cytoplasmic signaling proteins is induced by Steel factor. *Mol Cell Biol*. 1991; 11: 3043-51.
189. Rowley JD, Golomb HM, Vardiman JW. Nonrandom chromosome abnormalities in acute leukemia and dysmyelopoietic syndromes in patients with previously treated malignant disease. *Blood*. 1981; 58: 759-67.
190. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*. 2001; 61: 8118-21.
191. Russo C, Carroll A, Kohler S, Borowitz M, Amylon M, Homans A, Kedar A, Shuster J, Land V, Crist W, et al. Philadelphia chromosome and monosomy 7 in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 1991; 77: 1050-56.

192. Sandler DP, Ross JA. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin Oncol.* 1997; 24: 3-16.
193. Sariban E, Oliver C, Corash L, Cossman J, Whang-Peng J, Jaffe ES, Gralnick HR, Poplack DG. Acute megakaryoblastic leukemia in childhood. *Cancer.* 1984; 54: 1423-28.
194. Sawyers CL. Molecular genetics of acute leukemia. *Lancet.* 1997; 349: 196-200.
195. Schiffer CA, Lee EJ, Tomiyasu T, Wiernik PH, Testa JR. Prognostic impact of cytogenetic abnormalities in patients with de novo acute nonlymphocytic leukemia. *Blood.* 1989; 73: 263-70.
196. Schittenhelm M, Aichele O, Krober SM, Brummendorf T, Kanz L, Denzlinger C. Complete remission of third recurrence of acute myeloid leukemia after treatment with imatinib (STI-571). *Leuk Lymphoma.* 2003; 44: 1251-53.
197. Scott CS, Stark AN, Limbert HJ, Master PS, Head C, Roberts BE. Diagnostic and prognostic factors in acute monocytic leukaemia: an analysis of 51 cases. *Br J Haematol.* 1988; 69: 247-52.
198. Secco C, Wiernik PH, Bennett JM, Paietta E. Acute leukemia with t(10;11)(p11-p15;q13-q23). *Cancer Genet Cytogenet.* 1996; 86: 31-4.
199. Secker-Walker LM, Swansbury GJ, Hardisty RM, Sallan SE, Garson OM, Sakurai M, Lawler SD. Cytogenetics of acute lymphoblastic leukaemia in children as a factor in the prediction of long-term survival. *Br J Haematol.* 1982; 52: 389-99.
200. Shah NP, Lee FY, Luo R, Jiang Y, Donker M, Akin C. Dasatinib (BMS-354825) inhibits KITD816V, an imatinib-resistant activating mutation that triggers neoplastic growth in most patients with systemic mastocytosis. *Blood.* 2006; 108: 286-91.

201. Shibamura K, Tong ZB, Vanderhoof VH, Vanevski K, Nelson LM. Investigation of KIT gene mutations in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. *BMC Womens Health*. 2002; 2: 8.
202. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, Rubnitz JE, Raimondi SC, Hancock ML, Chan GC, Pui CH, Grosveld G, Downing JR. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*. 1995; 9: 1985-89.
203. Simon JH, Tebbi CK, Freeman AI, Brecher ML, Green DM, Sandberg AA. Acute megakaryoblastic leukemia associated with mosaic Down's syndrome. *Cancer*. 1987; 60: 2515-20.
204. Singer G, Schraml P, Belgard C, Raggi A, Dirnhofer S, Went P, Mihatsch MJ, Moch H. KIT in ovarian carcinoma: disillusion about a potential therapeutic target. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95: 1009-10.
205. Solary E, Casasnovas RO, Campos L, Bene MC, Faure G, Maingon P, Falkenrodt A, Lenormand B, Genetet N. Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia: correlation of CD19+, CD34+ and CD14+/DR--phenotypes with shorter survival. *Groupe d'Etude Immunologique des Leucemies (GEIL)*. *Leukemia*. 1992;6: 393-99.
206. Sperling C., Schwartz S., Buchner T., Thiel E., Ludwig W. D. Expression of the Stem Cell Factor Receptor (CD117) in acute leukemias. *Haematologica*. 1997; 82: 617-21.
207. Stanley M, McKenna RW, Ellinger G, Brunning RD. Classification of 358 cases of acute myeloid leukemia by FAB criteria: Analysis of clinical and morphologic features. Bloomfield CD, ed. *Chronic and acute leukemias in adults*. Boston: Martinus Nijhoff. 1985: 147-74.

208. Stasi R, Del Poeta G, Venditti A, Masi M, Stipa E, Dentamaro T, Cox C, Dallapiccola B, Papa G. Analysis of treatment failure in patients with minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). *Blood*. 1994; 83: 1619-25.
209. Stone RM, Mayer RJ. The unique aspects of acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 1990; 8: 1913-21.
210. Swansbury GJ, Lawler SD, Alimena G, Arthur D, Berger R, Van den Berghe H, Bloomfield CD, de la Chappelle A, Dewald G, Garson OM, et al. Long-term survival in acute myelogenous leukemia: a second follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1994; 73: 1-7.
211. Szatkowski D., Lewandowski K., Prejzner W., Hellmann A. Ekspresja protoonkogenu c-kit na komórkach blastycznych w ostrych białaczkach szpikowych. *Acta Haematol Pol*. 2002; 33: 431-441.
212. Taylor ML, Metcalfe DD. Kit signal transduction. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000; 14: 517-35.
213. Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia. Chromosomal abnormalities and their clinical significance in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 1983; 43: 868-73.
214. Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H, Ziemin-van der Poel S, Kaneko Y, Morgan R, Sandberg AA, et al. Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med*. 1993; 329: 909-14.
215. Tian Q, Frierson HF Jr, Krystal GW, Moskaluk CA. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. *Am J Pathol*. 1999; 154: 1643-47.
216. Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. Involvement of a homolog of *Drosophila* trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell*. 1992; 71: 691-700.

217. Tobelem G, Jacquillat C, Chastang C, Auclerc MF, Lechevallier T, Weil M, Daniel MT, Flandrin G, Harrousseau JL, Schaison G, Boiron M, Bernard J. Acute monoblastic leukemia: a clinical and biologic study of 74 cases. *Blood*. 1980; 55: 71-6.
218. Tono-oka T, Sato Y, Matsumoto T, Ueno N, Ohkawa M, Shikano T, Takeda T. Hypereosinophilic syndrome in acute lymphoblastic leukemia with a chromosome translocation [t(5q;14q)]. *Med Pediatr Oncol*. 1984; 12: 33-7.
219. Troussard X, Rimokh R, Valensi F, Leboeuf D, Fenneteau O, Guitard AM, Manel AM, Schillinger F, Leglise C, Brizard A, et al Heterogeneity of t(1;19)(q23;p13) acute leukaemias. French Haematological Cytology Group. *Br J Haematol*. 1995; 89: 516-26.
220. Trueworthy R, Shuster J, Look T, Crist W, Borowitz M, Carroll A, Frankel L, Harris M, Wagner H, Haggard M, et al. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1992; 10: 606-13.
221. Tsao AS, Kantarjian H, Thomas D, Giles F, Cortes J, Garcia-Manero G, Huh Y, Yang Y, Shen Y, Albitar M, Estey E. C-kit receptor expression in acute leukemias-association with patient and disease characteristics and with outcome. *Leuk Res*. 2004; 28: 373-8.
222. Uckan D., Hicsonmez G., Yetgin S., Gurgey A., Cetin M., Karaagaoglu E., Okur H., Tuncer A. M. CD34/CD117 co-expression in childhood acute leukemia. *Leukemia Res* 2000; 24: 201-6.
223. Uckun FM, Gajl-Peczalska KJ, Provisor AJ, Heerema NA. Immunophenotype-karyotype associations in human acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1989; 73: 271-80.

224. Ullrich A., Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990; 61: 203-12.
225. Valverde LR, Matutes E, Farahat N, Heffernan A, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Catovsky D. C-kit receptor (CD117) expression in acute leukemia. *Ann Hematol*. 1996; 72: 11-15.
226. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002; 100: 2292-302.
227. Venditti A, Del Poeta G, Stasi R, Masi M, Bruno A, Buccisano F, Cox C, Coppetelli U, Aronica G, Simone MD, et al. Minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0): cytochemical, immunophenotypic and cytogenetic analysis of 19 cases. *Br J Haematol*. 1994; 88: 784-93. Erratum in: *Br J Haematol* 1995; 89: 692.
228. Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox MC, Stasi R, Bruno A, Aronica G, Maffei L, Suppo G, Simone MD, Forte L, Cordero V, Postorino M, Tuffilli V, Isacchi G, Masi M, Papa G, Amadori S. Minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): comparison of 25 cases with other French-American-British subtypes. *Blood*. 1997; 89: 621-29.
229. Verstovsek S, Akin C, Giles FJ, et al. Effects of AMN107, a novel aminopyrimidine tyrosine kinase inhibitor, on human mast cells bearing wild-type or mutated codon 816 c-kit. *Blood*. 2005; 106: 985a.
230. von Lindern M, Poustka A, Lerach H, Grosveld G. The (6;9) chromosome translocation, associated with a specific subtype of acute nonlymphocytic leukemia, leads to aberrant transcription of a target gene on 9q34. *Mol Cell Biol*. 1990; 10: 4016-26.
231. von Lindern M, van Baal S, Wiegant J, Raap A, Hagemeijer A, Grosveld G. Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol*. 1992; 12: 3346-55.

232. Walters R, Kantarjian HM, Keating MJ, Estey EH, Trujillo J, Cork A, McCredie KB, Freireich EJ. The importance of cytogenetic studies in adult acute lymphocytic leukemia. *Am J Med.* 1990; 89: 579-87.
233. Wang C, Curtis JE, Geissler EN, McCulloch EA, Minden MD. The expression of the proto-oncogene C-kit in the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia.* 1989; 3: 699-702.
234. Warrell RP Jr, de The H, Wang ZY, Degos L. Acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med.* 1993; 329: 177-89.
235. Weis K, Rambaud S, Lavau C, Jansen J, Carvalho T, Carmo-Fonseca M, Lamond A, Dejean A. Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell.* 1994; 76: 345-56.
236. Wells SJ, Bray RA, Stempora LL, Farhi DC. CD117/CD34 expression in leukemic blasts. *Am J Clin Pathol.* 1996; 106: 192-195.
237. Went PT, Dirnhofer S, Bundi M, Mirlacher M, Schraml P, Mangialaio S, Dimitrijevic S, Kononen J, Lugli A, Simon R, Sauter G. Prevalence of KIT expression in human tumors. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 4514-22.
238. Westbrook CA, Hooberman AL, Spino C, Dodge RK, Larson RA, Davey F, Wurster-Hill DH, Sobol RE, Schiffer C, Bloomfield CD. Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study (8762). *Blood.* 1992; 80: 2983-90.
239. Williams DL, Tsiatis A, Brodeur GM, Look AT, Melvin SL, Bowman WP, Kalwinsky DK, Rivera G, Dahl GV. Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1982; 60: 864-71.

240. Woods WG, Nesbit ME, Buckley J, Lampkin BC, McCreadie S, Kim TH, Piomelli S, Kersey JH, Feig S, Bernstein I, et al. Correlation of chromosome abnormalities with patient characteristics, histologic subtype, and induction success in children with acute nonlymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 1985; 3: 3-11.
241. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 1987; 6: 3341-51.
242. Yoffe G, Schneider N, Van Dyk L, Yang CY, Siciliano M, Buchanan G, Capra JD, Baer R. The chromosome translocation (11;14)(p13;q11) associated with T-cell acute lymphocytic leukemia: an 11p13 breakpoint cluster region. *Blood.* 1989; 74: 374-79.
243. Young YL, Miller RW. Incidence of malignant tumors in U.S. children. *J Pediatr.* 1975; 86: 254-58.
244. Yunis JJ, Brunning RD, Howe RB, Lobell M. High-resolution chromosomes as an independent prognostic indicator in adult acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 1984; 311: 812-18.