



---

**НАЦИОНАЛНА СПЕЦИАЛИЗИРАНА БОЛНИЦА  
ЗА АКТИВНО ЛЕЧЕНИЕ  
НА ХЕМАТОЛОГИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ**

---

**д-р Бранимир Владимиров Спасов**

**ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ КЛИНИКО-  
БИОЛОГИЧНАТА ЗНАЧИМОСТ НА  
ЕКСПРЕСИЯТА НА ТУМОРНИЯ ГЕН НА  
WILMS ПРИ ПАЦИЕНТИ С ОСТРА  
МИЕЛОИДНА ЛЕВКЕМИЯ**

*Дисертационен труд  
за присъждане на образователната и научна степен  
“ДОКТОР”*

*Научна специалност: “Хематология и преливане на кръв”, шифър 03.01.39*

**Научен ръководител: доц. д-р Дончо Байчев Пейчев**

**Научни консултанти: доц. д-р Маргарита Любенова Генова  
доц. д-р Георги Николаевич Балаценко**

**София, 2013**

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....</b>	<b>5</b>
<b>ВЪВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>7</b>
<b>I. АНАЛИЗ НА ИЗСЛЕДВАНИЯТА ПО ПРОБЛЕМА.....</b>	<b>8</b>
Исторически преглед.....	8
Структура на WT1.....	8
Експресия на WT1.....	10
Регулация на експресията на WT1.....	12
Посттранслационни модификации на wt1.....	14
WT1 и диференциация.....	14
WT1 и контрол на клетъчния цикъл.....	15
WT1 и апоптоза.....	16
Таргетни гени на WT1.....	17
Протеинни партньори на WT1.....	21
WT1 като тумор-супресорен ген.....	22
WT1 като потенциален онкоген.....	23
Експресия на WT1 в хемопоеични прогенитори от здрави индивиди.....	24
Експресия на WT1 при възрастни пациенти с остри левкемии.....	25
WT1 като тумор-супресорен ген при пациенти с ОМЛ.....	26
WT1 като онкоген при пациенти с ОМЛ.....	27
Мутации в WT1 при пациенти с ОМЛ.....	27
Клинична значимост на WT1 при пациенти с ОМЛ.....	28
<b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....</b>	<b>31</b>
<b>III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....</b>	<b>32</b>
Характеристики на пациентите.....	32
Цитостатична и заместителна терапия при пациенти с ОМЛ.....	33
Критерии за терапевтичен отговор и рецидив.....	36
Методи.....	37
Цитологичен, биохимичен, цитохимичен и флоуцитометричен анализ.....	37
Цитогенетичен и молекулярно-биологичен анализ.....	37
Полимеразно-верижна реакция след обратна транскрипция (RT-PCR).....	38
1. Изолиране на моноклеарни клетки.....	38
2. Екстракция на РНК.....	38
3. Обратна транскрипция и синтез на комплементарна ДНК.....	39
4. Характеризиране на качеството на изолираната РНК и ефективността на обратната транскрипция чрез контролна амплификация на $\beta$ -актиновия ген.....	40
5. Изследване експресията на WT1 посредством PCR.....	40
6. Изследване експресията на сурвивин посредством PCR.....	41
7. Изследване експресията на MDR1 посредством PCR.....	42
8. Изследване наличието на FLT3-ITD посредством PCR.....	43
Имуноблот.....	44
1. Замразяване на клетъчни проби.....	44
2. Лизиране и денатуриране на клетъчните проби.....	44
3. Подготовка на протеиновите проби за гел-електрофореза в полиакриламиден гел.....	45
4. Подготовка на електрофорезната камера.....	46
5. Електротрансфер на протеините от гела върху PVDF-мембрана.....	46
6. Имунологична обработка на мембраните.....	47
7. Визуализиране на комплексите антиген-антитяло.....	48

8. Отстраняване на антителата от мембраните.....	49
9. Изследване експресията на wt1 посредством имуноблот.....	49
10. Изследване експресията на NF-kB посредством имуноблот.....	50
Статистически методи.....	51
<b>IV. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>52</b>
Експресия на WT1 mRNA и wt1 при пациенти с ОМЛ.....	52
1. Експресия на wt1- протеина и WT1 при здрави индивиди и пациенти с нехематологични заболявания.....	52
2. Експресия на WT1 при пациенти с ОМЛ към момента на диагнозата, установена посредством RT-PCR.....	52
3. Експресия на wt1 при пациенти с ОМЛ към момента на диагнозата, установена посредством WB.....	53
Корелация на експресията на WT1 mRNA с основни клинично-лабораторни показатели при пациенти с ОМЛ.....	55
1. Експресия WT1 в корелация с основни характеристики на пациентите с ОМЛ.....	55
2. Корелация между експресията WT1 и основни цитогенетични/молекулярни характеристики на пациентите с ОМЛ.....	58
3. Корелация между експресията на WT1 и основни имунофенотипни характеристики на бластната популация при пациенти с ОМЛ.....	59
Експресия на ключови молекулярни маркери при пациенти с ОМЛ.....	62
1. Изследване на експресията на FLT3-ITD при пациенти с ОМЛ чрез RT-PCR.....	62
2. Изследване на експресията на сурвивин при пациенти с ОМЛ чрез RT-PCR.....	63
3. Изследване на експресията на MDR1-гена при пациенти с ОМЛ чрез RT-PCR.....	65
4. Изследване на експресията на NF-kB протеин чрез WB при пациенти с ОМЛ.....	65
Корелация на изследваните маркери с експресията на WT1 или wt1 при пациенти с ОМЛ към момента на поставяне на диагнозата.....	66
1. Корелация между наличието на FLT3-ITD и експресията на WT1.....	66
2. Корелация между експресията на гените сурвивин и WT1.....	67
3. Корелация между експресията на гените MDR1 и WT1.....	67
4. Корелация между експресията на NF-kB и тази на wt1.....	68
Корелация между комбинираната експресия на WT1 или wt1 и изследваните ключови молекулярни маркери и клинично-лабораторни параметри при пациенти с ОМЛ към момента на поставяне на диагнозата.....	69
1. Корелация между експресията на WT1 и наличието на FLT3-ITD при пациенти с нормален кариотип и основни клинично-лабораторни параметри.....	69
2. Корелация между ко-експресията на WT1 и сурвивин при пациенти и основни клинично-лабораторни параметри.....	71
3. Корелация между ко-експресията на WT1- и MDR1-гените при пациенти с ОМЛ с основни клинично-лабораторни параметри.....	72
4. Корелация между експресията на wt1- и NF-kB протеина и основни клинично-лабораторни параметри при пациенти с ОМЛ.....	73
Прогностична стойност на експресията на WT1 mRNA при пациенти с ОМЛ.....	74
1. Прогностична стойност на експресията на WT1 mRNA за постигане на CR.....	74
2. Прогностична стойност на експресията на WT1 mRNA за продължителността на OS.....	74
3. Прогностична стойност на експресията на WT1 mRNA за продължителността на DFS.....	75
Прогностична стойност на експресията на останалите ключови молекулярни маркери при пациенти с ОМЛ.....	77

1. Прогностична стойност на експресията на останалите ключови молекулярни маркери за постигане на CR.....	77
2. Прогностична стойност на експресията на останалите ключови молекулярни маркери за продължителността на OS.....	77
3. Прогностична стойност на експресията на останалите ключови молекулярни маркери за продължителността на DFS.....	78
Прогностична стойност на едновременната експресия на WT1 и наличието на FLT3-ITD при пациенти с ОМЛ.....	79
Регресионен анализ на Sox.....	83
<b>V. ОБСЪЖДАНЕ.....</b>	<b>85</b>
<b>VI. ОБОБЩАВАЩИ ИЗВОДИ.....</b>	<b>99</b>
<b>VII. БИБЛИОГРАФИЯ.....</b>	<b>100</b>

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AML1-ETO	acute myeloid leukemia-1 transcription factor and the eight-twenty-one corepressor (остра миелоидна левкемия-1 транскрипционен фактор и осемдесет-едно корепресор)
ABL	Abelson protooncogene (протоонкоген на Abelson)(9q34)
BFU-E	Erythroid burst-forming units; еритроидни образуващи единици
CBF $\beta$ -MYH11	Core-binding factor beta-smooth muscle myosin heavy chain 11.
CCR	Continuing complete remission (продължаваща пълна ремисия)
CD	Cluster of differentiation (клъстер на диференциация)
CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CFU-GEMM	Colony-forming units granulocyte-erythrocyte-monocyte-megakaryocyte; гранулоцитно-еритроцитно-моноцитно-мегакариоцитна колонио-образуващи единици
CFU-GM	Colony-forming units granulocyte-macrophage; гранулоцитно-макрофагеална колонио-образуващи единици
CI	Confidence interval (интервал на доверителност)
CR	Complete remission (пълна ремисия)
CREB	cAMP-response element-binding protein
DFS	Disease-free survival (преживяемост, свободна от заболяване)
EGR1	Early growth response gene 1
FAB	French-American-British (френска-американска-британска)
FLAG	Терапевтичен протокол, включващ прилагането на Флударабин, Цитозар и гранулоцитен растежен фактор
FLT3-ITD	Fms-like tyrosine kinase 3 – internal tandem duplication (вътрешни тандемни дубликация на Fms-подобна тирозин киназа 3)
GATA-1	Еритроиден транскрипционен фактор
HAM	Терапевтичен протокол, включващ прилагането на високи дози Цитозар и стандартни дози Митоксантрон
HRP	Horseshoe peroxidase (хрян пероксидаза)
ID	Induction death (индукционна смъртност)
IDA-FLAG	Терапевтичен протокол, включващ прилагането на Идарубицин, Флударабин, Цитозар и гранулоцитен растежен фактор
I $\kappa$ B $\alpha$	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (инхибитор на енхансера на гена за леката полипептидна верига на ядрения фактор капа при В-клетките)
MDR1	Multidrug resistance gene1 (ген на множествена лекарствена резистентност 1)
MITO-FLAG	Терапевтичен протокол, включващ използването на Митоксантрон, Флударабин, Цитозар и гранулоцитен растежен фактор
MLL	Myeloid/Lymphoid, или Mixed-Lineage, Leukemia
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus (миши левкемичен вирус)
mRNA/ и.РНК	Информационна рибонуклеинова киселина

NF-kB	Nuclear factor kB (ядрен фактор kB)
OS	Overall survival (обща преживяемост)
PAR4	Prostate apoptosis response factor 4
PAX2	Paired box gene 2
PAX8	Paired box gene 8
PCR	Polymerase chain reaction (полимеразно-верижна реакция)
q-RT-PCR	Количествена Reverse transcription PCR (PCR след обратна транскрипция)
RD	Resistant disease (резистентна болест)
RT	Reverse transcription (обратна транскрипция)
RT-PCR	Reverse transcription PCR (PCR след обратна транскрипция)
Sp1	Specificity Protein 1
SRY	Sex determining region Y (пол-определящ регион Y)
STAT3	signal transducers and activators of transcription 3 (сигнални трансдюсери и активатори на транскрипцията 3)
TBE	Tris/Borate/EDTA
WB	Western blot
WT1	Wilms' tumor gene 1 (туморен ген на Wilms 1)
wt1	Wilms' tumor protein (туморен протеин на Wilms 1)
ЕДТА	етилен диамин тетра-ацетатна киселина
ИХХ	Имунохистохимия
ЛДХ	Лактат-дехидрогеназа
МДС	Миелодиспластичен синдром
МРБ	Минимална резидуална болест
НСБАЛХЗ	Национална Специализирана Болница за Активно Лечение на Хематологични Заболявания
НЦХТ	Национален Център по Хематология и Трансфузиология
ОМЛ	Остра миелоидна левкемия
ОПЛ	Остра промиелоцитна левкемия
ПХТ	Полихимиотерапия
РНК	Рибонуклеинова киселина
СЗО	Световна Здравна Организация
ц.АМФ	цикличен Аденозин Монофосфат

## Въведение

Острата миелоидна левкемия (ОМЛ) е клонално, малигнено заболяване на хематопоеичната тъкан, което се характеризира с пролиферация на патологични бласти, предимно в костния мозък и нарушено образуване на нормални кръвни клетки. В патогенезата на ОМЛ участват разнообразни молекулни нарушения. Някои намират широко приложение в клиничната практика като маркери с диагностична или прогностична стойност. В допълнение, наличието на тези молекулярни аномалии единствено в клетките от малигнената популация позволява мониторирането на промените в туморния обем и съответно - отчитане на терапевтичния отговор. Особено перспективни в тази насока са нарушения с висока честота на разпространение.

Един от молекулярни маркери с клинична значимост при ОМЛ е Wilms' tumor gene 1 (туморен ген на Wilms; WT1). При много пациенти с ОМЛ се наблюдава свръхекспресия на този ген, като се счита че нарушената функция на WT1 играе важна роля в патогенезата на заболяването.

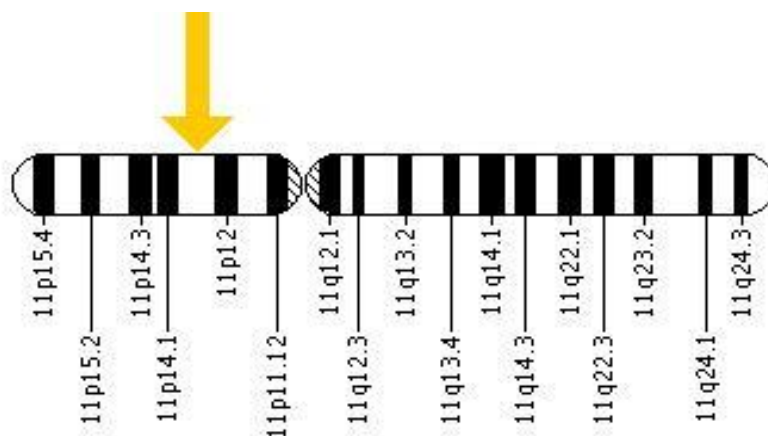
## I. АНАЛИЗ НА ИЗСЛЕДВАНИЯТА ПО ПРОБЛЕМА

### *Исторически преглед*

Max Wilms (1868-1918) е германски хирург, който е изучавал задълбочено бъбречните тумори в детска възраст. Той е автор на монографията - *Die Mischgeschwülste der Niere* (смесените бъбречни тумори), публикувана през 1899 година. Нефробластомът представлява злокачествено новообразувание на бъбрека и се нарича още тумор на Wilms. През 1990 година, почти 100 години след публикуването на неговата монография, два изследователски екипа успяват да клонират гена, свързан със специфична мутация - делеция на хромозомната област 11p13 (Gessler et al, 1990; Haber et al, 1990). Делециите на тази хромозомна област се установяват при около 10% от пациентите с нефробластом, като новооткритият ген е наречен Wilms tumor gene 1 (туморен ген на Вилмс; WT1).

### *Структура на WT1*

WT1 е картиран върху късото рамо на 11 хромозома (11p13) и се състои от 10 екзона (Call et al, 1990). Той е разположен от базова двойка 32,409,320 до базова двойка 32,457,080 върху хромозома 11. Схематично разположението на WT1 е представено на фиг. 1



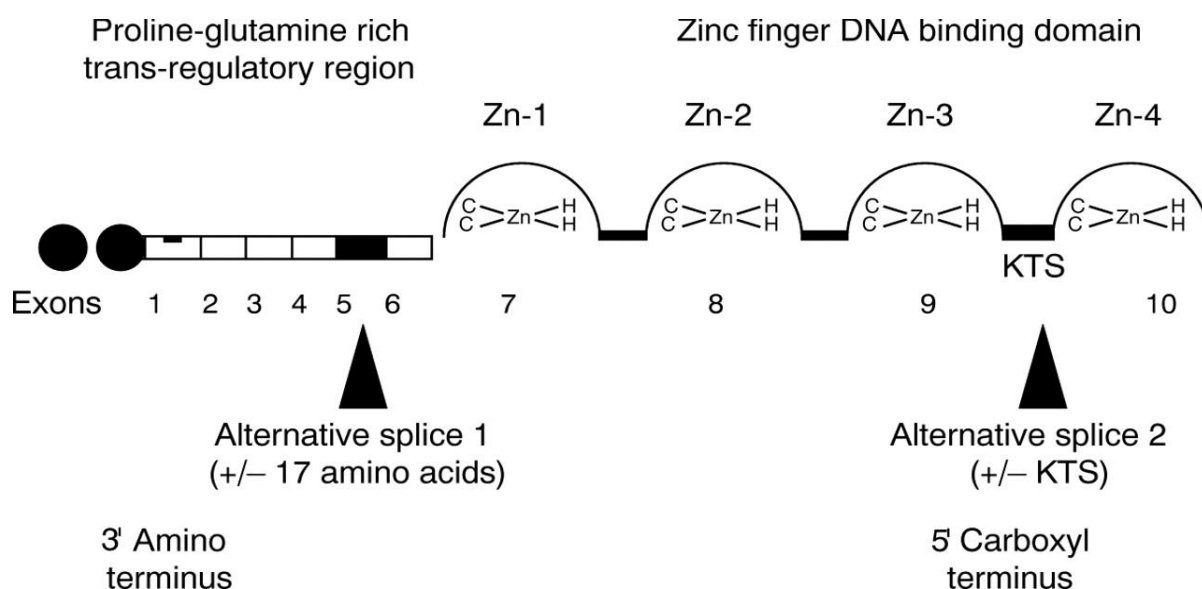
**Фиг. 1** Схематично представяне на разположението на WT1 върху хромозома 11

WT1 обхваща 50,000 нуклеотидни двойки и се състои от 10 екзона, които кодират синтезата на и.РНК, състояща се от 3,200 нуклеотидни двойки. N-терминалният домейн на WT1 се състои от последователности, богати на пролин и

глутамин и участва във взаимодействия с множество РНК и белтъчни молекули. Този регион е от изключителна важност, тъй като чрез него WT1 генът осъществява своята транскрипционно-регулаторна функция.

С-терминалният домейн на WT1 се състои от четири Krüppel-подобни “zinc finger”- региони, които са богати на цистеин и хистидин. Чрез този домейн WT1 се свързва с множество таргетни ДНК последователности, както и участва във взаимодействия с множество РНК и белтъчни молекули.

Получената в резултат на транскрипция и.РНК е подложена на алтернативен сплайсинг, при което се образуват четири сплайсингови форми (Фиг.2).



**Фиг.2. Схематично представяне на сплайсинговите форми на WT1.**

Първият алтернативен сплайсинг засяга целия екзон 5 и води до наличието или липсата на 17 аминокиселини (17aa), проксимално от първия от четирите “zinc finger”-региона. Вторият алтернативен сплайсинг води до инсерция на 3 аминокиселини – лизин, треонин и серин (KTS) в 3’ края на екзон 9, между третия и четвъртия “zinc finger”-регион, в резултат на което се нарушава разстоянието помежду им и се променя специфичността на свързване между образувания wt1-протеин и ДНК. Най-често срещаният вариант на WT1 и.РНК е този, при който са

налице и двете инсерции (+17 aa и + KTS), а най-рядко - този, при който липсват и двете инсерции (-17aa и - KTS).

В зависимост от липсата или наличието на двете сплайс-инсерции, wt1 протеините имат молекулни маси 52-54 kDa. При wt1(-/-) с маса от 52 kDa не се установява нито една от сплайс-инсерциите, докато при wt1(+/-) с молекулно тегло 54 kDa се доказват и двете сплайс-инсерции. Wt1 протеини, съдържащи само екзон 5 сплайс-инсерция (+17aa), се означават като wt1 (+/-), докато тези, съдържащи инсерцията от трите аминокиселини (+ KTS) - като wt1 (-/+) (Haber et al, 1991).

Съществуват и допълнителни функционални wt1 белтъчни изоформи, които се образуват чрез промяна в РНК-последователността на кодон 280, като по този начин левцинът се замества от пролин в белтъчната молекула (Sharma et al, 1994).

Нова изоформа, наречена small wt1 (swt1), поради малкия си размер (35-37 kDa) е била открита преди няколко години. При тази протеинна изоформа е налице втори промотер, който е разположен в първия интрон и който води до образуването на по-къса и.РНК. Последната кодира синтеза на swt1 протеин, при който не се установява репресионен домейн. Този домейн се открива обикновено в N-края на белтъчните молекули с нормална дължина. Експресията на sWT1 се установява много често в проби от пациенти, страдащи от левкемии. Тази молекула има изразени онкогенни свойства, тъй като активира значително по-силно определени таргентни гени на WT1, в сравнение с изоформите с нормална дължина на веригата (Hosain et al, 2006).

### ***Експресия на WT1***

Wt1 представлява важна регулаторна молекула, която участва в клетъчния растеж и развитие. В хода на развитието на индивида експресията на молекулярния маркер се локализира в определени тъкани. При развиващия се ембрион експресията на WT1 се установява предимно в урогениталната система (Menke et al, 1998; Rivera et al, 2005).

Съотношението между +KTS и -KTS изоформите в бъбречната тъкан на здравия фетус или при пациенти с нефробластом без наличие на мутации в WT1 е около 2:1 (Haber et al, 1991; Klamt et al, 1998). Двете белтъчни изоформи имат различен модел на разпределение в ядрото. wt1 (-KTS) изоформата се разпределя

дифузно, докато wt1 (+KTS) изоформата е концентрирана в определени участъци в ядрото (Dutton et al, 2006). Установено е, че wt1 (+KTS) се свързва предимно с верига на РНК, докато wt1 (+KTS) има по-голям афинитет към свързване с ДНК (Bor et al, 2006; Caricasole et al, 1996; Nurmemmedov et al, 2006).

Wt1 е транскрипционен фактор, чиято нуклеотидна последователност е много сходна между различните животински видове. Двете изоформи +KTS и -KTS се установяват както при рибите, така и при бозайниците (Kent et al, 1995; Miles et al, 1998; Semba et al, 1996). Съотношението между +KTS/-KTS изоформите е от голямо значение за правилното развитие на бъбреците и гонадите и нарушението в това съотношение води до нарушения в тези тъкани (Fallat et al, 2006). Различни мутации в „zinc-finger” региона на WT1 води до нарушено сексуално развитие и нарушена бъбречна функция при пациенти със синдрома на Denys-Drash (Poulat et al, 1993).

Екзон 5 (17AA) на WT1 се установява единствено при бозайниците, но вероятно той не е от голямо значение за нормалното сексуално развитие на мишките (Natoli et al, 2002). Функционалната роля на екзон 5 е неясна, но pag-4 взаимодейства с +17AA домейна, при което екзон 5 се превръща в регион с транскрипционна активност, което най-вероятно оказва ефект върху клетъчната пролиферация и преживяемост (Richard et al, 2001). Конституционалната експресия на +17AA изоформите потиска апоптозата в левкемичните клетъчни линии, третирани с цитостатици, което подсказва, че наличието на тези изоформи удължава левкемичната клетъчна преживяемост (Ito et al, 2006).

Проучванията върху модела на експресия на WT1 и РНК в хода на развитието на човека, плъха и мишката подсказват, че WT1 е тъканно-специфичен ген с пространствена и времева вариация в нивата на експресия в хода на развитието. Експресията на WT1 се установява предимно в уrogenиталната система, централната нервна система и тъканите, свързани с хемопоезата, като костен мозък и лимфни възли, слезка, сърце, черен дроб и тимус (Menke et al, 1998; Scharnhorst et al, 2001; Lee & Haber, 2001). Според някои автори определени WT1 сплайс варианти се експресират преимуществено и имат важна роля в хода на

развитието на ганглионните клетки в ретината и олфакторния епител (Wagner et al, 2002; Wagner et al, 2005).

Важната роля на wt1-протеините в хода на развитието се доказва при WT1-кнокаут мишки, при които и двата алела са инактивирани (WT1<sup>-/-</sup>). При тези мишки се наблюдава вътрематочна смърт и средна преживяемост от около 14 дни *in utero*. Установяват се отклонения в сърдечните и мезотелни структури, както и липса на органогенеза на бъбреците, гонадите и слезката (Moore et al, 1999; Herzer et al, 1999).

При ембрионите, които са WT1<sup>-/-</sup>, се установява по-висока степен на програмирана клетъчна смърт в сравнение с нормалните ембриони. Вероятно липсата на органогенеза зависи поне частично от повишеното ниво на апоптозата.

При възрастните индивиди експресията на WT1 се установява при подоцитите на бъбрека, Сертолиевите клетки на тестиса и епителните клетки на яйчниците (Scharnhorst et al, 2001; Srichai et al, 2004; Rao et al, 2006). Повишена експресия на WT1 се наблюдава през ранните фази на бремеността в хода на диференциацията на ендометриалните стромални клетки в децидуални клетки (Makrigiannakis et al, 2001). Експресията на WT1 се установява при малка част от CD34-положителните клетки-прогенитори. В хода на диференциацията на тези клетки се наблюдава рязко намаляване в експресията на молекулярния маркер, което предполага неговата роля в тяхната регулация (Frazier et al, 1995; Baird et al, 1997; Maurer et al, 1997; Hosen et al, 2002). Само един изследователски колектив съобщава за експресия на WT1 при зрели кръвни клетки (Ellisen et al, 2001).

### ***Регулация на експресията на WT1***

Промоторът на WT1 е богат на гуанин и цитозин. В неговата структура не се установат ТАТА и ССААТ-последователности (Hofmann et al, 1993; Gessler et al, 1993; Fraizer et al, 1994). Проксималният промотер на WT1 е транскрипционно активен в няколко клетъчни линии, независимо от експресията на гена. Следователно тъканно-специфичната експресия на WT1 трябва да се определят от допълнителни регулаторни елементи (Fraizer et al, 1994). Механизмите, определящи тъканно-специфичната транскрипционна регулация на WT1, в голяма степен са неизяснени.

Счита се, че еритроидният транскрипционен фактор GATA-1 участва в регулацията на експресията на WT1 в хематопоеичните клетки (Zhang et al, 1997; Siehl et al, 2003; Wu et al, 1995). Наблюдавана е корелация между нивата на PAX2 и експресията на WT1 при пациенти с ОМЛ (Siehl et al, 2003), което предполага, че PAX2 е активатор на WT1 при част от болните с това заболяване. Според някои научни колективи PAX2 регулира дейността на промотера на WT1 (McConnell et al, 1997; Dehbi et al, 1996). Други транскрипционни фактори, за които се счита, че участват в регулацията на WT1, включват Sp1, WT1 (негативна авторегулация), PAX8 и NF- $\kappa$ B (Cohen et al, 1997; Campbell et al, 1994; Dehbi et al, 1996; Dehbi et al, 1998).

Описани са две хематопоеични ехансерни последователности в структурата на WT1. Първата ехансерна последователност се активира от GATA-1 и е установена в клетъчна линия K562 и при проби от пациенти с ОМЛ, при които се установява положителна корелация между нивата на WT1 и GATA-1 и РНК (Wu et al, 1995; Furuhashi et al, 2009). Тази ехансерна последователност е активна при клетки с еритроиден фенотип (Zhang et al, 1997). Втората ехансерна последователност, която е разположена между 3'-края на екзон 2 и началото на интрон 3, може да бъде активирана от GATA-1 и транскрипционния фактор c-Myc.

Транскрипцията на WT1 се осъществява посредством взаимодействие между p300 (хистон ацетилтрансфераза) и c-Myc, които оказват въздействие върху промотера и интронния ехансер на гена (Shao et al, 2005). Възможно обяснение за тази регулация е ацетилиране на хистоновите белтъци в тези участъци посредством p300, което води до транскрипция на WT1.

Счита се, че в хода на нефрогенезата експресията на WT1 може да бъде контролирана посредством WT1-antisense транскрипт, комплементарен на нуклеотидни последователности в интрон 1 (Campbell et al, 1994; Eccles et al, 1994; Malik et al, 1995).

Транскрипционен сайленсър, който съдържа Alu повтаряеми последователности, е разположен в третия интрон на WT1 и потиска експресията на WT1 в клетъчни линии с небъбречен произход (Hewitt et al, 1995).

### ***Посттранслационни модификации на wt1***

Установено е, че wt1 взаимодейства с модифицираща E2-лигаза, убиквитин-конюгиращ ензим 9, който понастоящем е известен като SUMO-1 E2-лигаза (Wang et al, 1996). Този ензим представлява убиквитин-свързан протеин, който се свързва ковалентно със специфични таргетни протеини, което води до промяна на тяхното взаимодействие с други протени, промяна в тяхната локализация и стабилност (Wilkinson et al, 2010). Счита се, че SUMO-1 E2-лигаза може да блокира убиквитинизацията и по този начин да предотврати разграждането на протеините. N-краят на wt1 съдържа две свързващи места за SUMO-1 E2-лигаза, като на този етап тяхната функция не е изяснена.

Фосфорилирането на C-края на wt1 ц.АМФ зависима протеин киназа А (ПКА) нарушава способността на wt1 да се свързва с ДНК последователности, но се запазва способността за свързване с РНК последователности (Sakamoto et al, 1997; Ye et al, 1996). Фосфорилираната полипептидна верига на wt1 се открива само в цитоплазмата на клетката (Bellon et al, 2008). По този начин посттранслационните модификации на wt1 вероятно модулират функцията на WT1.

### ***WT1 и диференциация***

Установено е, че заедно с инхибиране на апоптозата в хода на развитието експресията на WT1 спомага за диференциацията на развиващите се клетки. Например в хода на развитието на невроните нивото на wt1 намалява под действието на невронния растежен фактор (NCF). Намаленото ниво на wt1 води до диференциация на невроните, поради слаба активация на рецептора на епидермалния растежен фактор (Liu et al, 2001).

Друг пример е рецепторът на инсулин-подобния растежен фактор 1 (IGF1-R), който се контролира директно от wt1. Липсата на wt1 води до постоянна експресия на IGF1-R, което от своя страна допринася за развитието на нефробластом, поради нарушената диференциация на метанефрогенната бластема в бъбречен епител (Roberts et al, 1996).

Установено е, че експресията на WT1 води до забавяне на клетъчното делене при примитивните хемопоеични клетки и до стимулиране на диференциацията на

линейно-комитираните прекурсори в миело-моноцитни клетки. По този начин експресията на WT1 потенцира диференциацията на някои клетки, като потиска клетъчното делене, което благоприятства матурацията на клетките (Svedberg et al, 2001; Ellisen et al, 2001).

Ефектът на WT1 върху диференциацията на левкемичните бласти се проучва много интензивно. Наблюдавано е, че индуцирането на диференциация в левкемични клетъчни линии като HL60, K562 и NB4 с помощта съответно на диметил сулфоксид, 12-*O*-тетрадеcanoил-форбол-13-ацетат (ТПА) и ретиноева киселина, е свързано с намаляване експресията на WT1 и РНК (Deuel et al, 1999; Gu et al, 2005; Phelan et al, 1994). Липсата на чувствителност на левкемичните бласти (с изключение на левкемичните промиелоцити) към действието на ретиноевата киселина може да бъде свързано с потискане на експресията на RAR $\alpha$  от WT1 (Goodyer et al, 1995). Съществуват обаче пациенти с ОМЛ, при които се установява ниска експресия на WT1 и повишена експресия на RAR $\alpha$ . Вероятно добавянето на ретиноева киселина към терапевтичната схема на тези пациенти, би довело до подобряване на тяхната дългосрочна прогноза.

Експресията на WT1 в клетъчна линия U937 с произход хистиоцитен лимфом води до блокиране на диференциацията на клетки. Приложението на ретиноева киселина или витамин Д3 не води до моноцитна диференциация на клетъчната линия U937, при която експериментално е предизвикана експресия на WT1 (Svedberg et al, 1998). Предизвиканата експресия на WT1 не блокира, обаче, хемин- или ТПА- индуцираната диференциация на клетъчна линия K562 (Svedberg et al, 1999). Тези различия се дължат най-вероятно на различия в генната експресия между двете клетъчни линии.

### ***WT1 и контрол на клетъчния цикъл***

Установено е, че експресията на WT1 може да контролира клетъчния цикъл. Например свръхекспресията на WT1 при миша клетъчна линия NIH 3T3 рано през G1-фазата, води до блокиране на клетъчния цикъл в S-фазата. Възможно обяснение за блокиране на клетъчния цикъл е способността на WT1 да променя експресията на множество гени, кодиращи синтезата на циклини и циклин-зависими кинази

(Kudoh et al, 1995). Освен това WT1 потиска директно транскрипцията на гена на циклин E (Loeb et al, 2002).

Високата експресия на WT1 води до стимулиране на клетъчния цикъл и клетъчна пролиферация на карциномните клетки на рака на гърдата, експресиращи HER2 онкогена (Tuna et al, 2005).

### ***WT1 и апоптоза***

Счита се, че експресията на WT1 има както стимулиращ, така и инхибиращ ефект върху апоптозата. Установено е, че експресията на молекулярния маркер оказва транскрипционен контрол върху клетъчни рецептори, като IGF-1R и рецептора на епидермалния растежен фактор, които модулират експресията на множество гени, регулиращи апоптозата, като bcl-2, bak и др. (Mayo et al, 1999; Morrison et al, 2005).

WT1 има способност да инхибира p-53 медираната апоптоза, причинена от радиация, посредством свързване и функционална инактивация на p53 протеина (Maheswaran et al, 1995). Когато WT1 се експресира едновременно с дивия тип на p53 в Saos-2 клетъчна линия, с произход остеобластен остеосарком и която не експресира p53, се наблюдава повишение в стабилността и полуживота на p53 (Maheswaran et al, 1995). След прилагане на UV-лъчение не настъпва p53-медирана апоптоза, като по този начин клетките могат да избегнат UV-индуцирана клетъчна смърт. Протеолизата на wt1 от сериновата протеаза HtrA2/Omi, която се установява предимно в митохондриите на клетката, води до повишено ниво на апоптоза (Hartkamp et al, 2010).

Ектопичната експресия на WT1 в левкемични клетъчни линии потиска апоптозата, причинена от цитостатични вещества като етопозид и доксорубицин (Ito et al, 2006; Mayo et al, 1999). Установено е обаче, че само клетките, притежаващи WT1 +екзон 5 изоформата, са резистентни към действията на цитостатичните препарати. Клетъчната линия K562 с произход еритролевкемия, която свръхекспресира WT1, има повишена резистентност спрямо иматиниб-индуцирана апоптоза (Svensson et al, 2007). Липсата на експресия на WT1 при WT1-/- мишки или третирането на някои клетки с WT1 antisense олигонуклеотиди води до повишени нива на апоптоза (Ito et al, 2006; Algar et al, 1996).

Екзогенната експресия на WT1 в клетъчни линии MDAMB-468 и MCF-7 с произход карцином на млечна жлеза, както и в K562, може да активира промотора на c-Мус и да стимулира клетъчната пролиферация (Han et al, 2004). Продължителната експресия на WT1 в G401 клетъчна линия с произход рабдоиден тумор води до повишена ендогенна синтеза на bcl-2 протеина (Mayo et al, 1999).

Съществуват и множество данни, които показват, че експресията на WT1 води до активиране на проапоптотичните процеси. Например експресията на WT1 води до повишаване на апоптозата при множество клетъчни линии като Hep2B, U2OS и Saos-2 (Englert et al, 1995; Menke et al, 1997). В клетъчни линии HeLa с произход епителиален карцином експресията на WT1 води до потискане на промотора на c-Мус (Hewitt et al, 1995) и стимулиране на апоптотични процеси. Друг важен пример е анти-апоптотичния ген bcl-2. Преходната ко-трансфекция на WT1 и промотора на Bcl-2 в клетъчни линии DHL-4 с произход фоликуларен лимфом и HeLa води до потискане на промотора на Bcl-2 (Heckman et al, 1997).

Представените данни показват сложността на ролята и функцията на WT1 в регулацията на диференциацията, клетъчното делене и апоптозата. Някои данни показват WT1 като тумор-супресорен ген, който потиска появата на неопластични процеси, докато други данни доказват неговата роля като онкоген с потенциал да стимулира клетките към пролиферация, като по този начин повишава риска от малигнена трансформация.

### ***Таргетни гени на WT1***

Установено е, че WT1 е мощен транскрипционен регулатор, поради наличието на четири “zinc finger”- региона в С-терминалния домейн на гена. Сред таргетите на WT1 са множество гени, необходими за клетъчния растеж и метаболизъм. WT1 регулира функцията на компоненти на извънклетъчния матрикс, растежни фактори и други транскрипционни фактори (табл. 1).

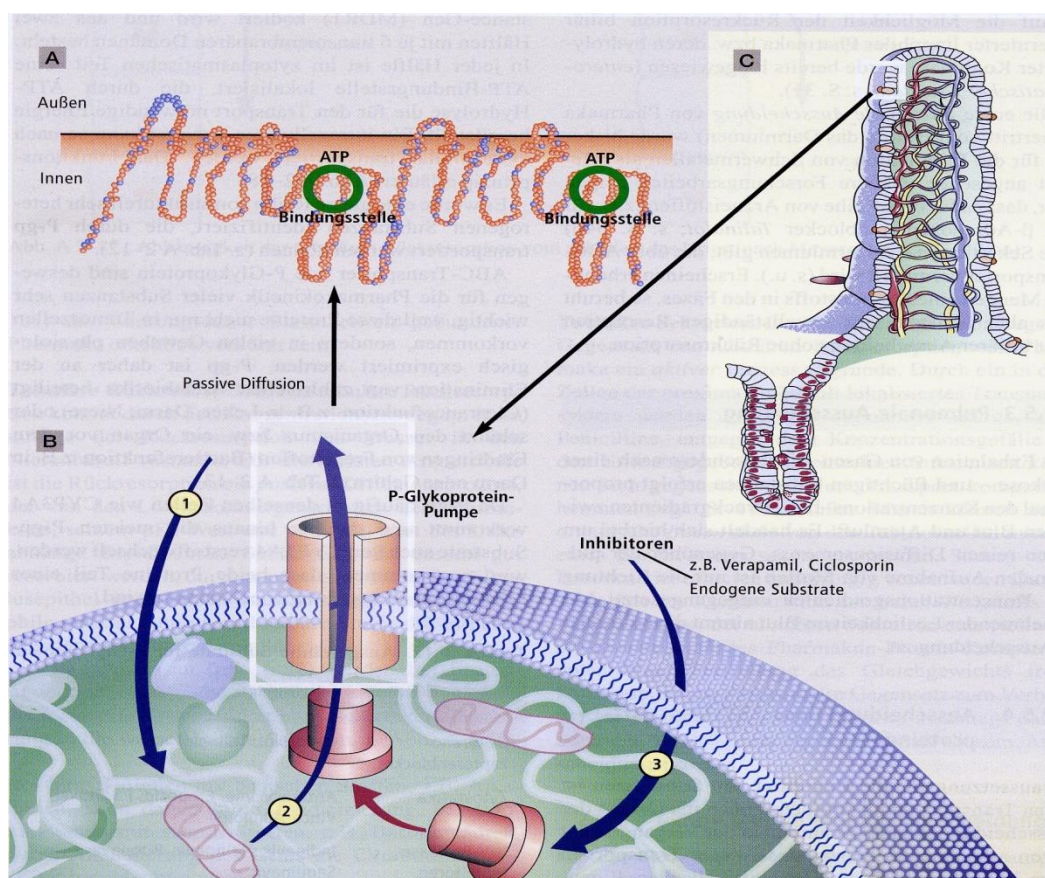
Посредством трансфекция е установено, че WT1 може да активира или да потиска експресията на специфични таргетни гени. Действието на WT1 като активатор или супресор зависи от нивото на неговата експресия, изоформата на WT1 (+KTS или -KTS), както и от клетъчната линия, в която се провежда експериментът (Reddy et al, 1995; Wang et al, 1995; Laity et al, 2000).

WT1 притежава сходни нуклеотидни последователности с тези на EGR1 гена и разпознава еднакви ДНК-свързващи нуклеотидни консенсусни последователности (Cao et al, 1990; Pavletich et al, 1991). Други идентифицирани ДНК-свързващи консенсусни последователности включват богати на ТС последователности, които често се откриват в промотерите на различни гени, свързани с клетъчния растеж. Нуклеотидната последователност 5'-GCGTGGGAGT-3' се класифицира като свързваща последователност с висок афинитет и се нарича WTE (Nakagama et al, 1995).

**Табл.1 Транскрипционни ефекти на WT1 върху някои таргетни молекули**

<i>Таргет</i>	<i>Ефект</i>	<i>Изследователски колектив</i>
<i>Растежни фактори</i>		
Амфирегулин	Активиране	Lee et al, 1999
Колонио-стимулиращ фактор-1	Потискане	Harrington et al, 1993
Инсулин растежен фактор II	Активиране/ Потискане	Nichols et al, 1995; Ward et al, 1995; Drummond et al, 1992
Тромбоцитен растежен фактор	Потискане/ Активиране	Wang et al, 1993; Wang et al, 1992; Gashler et al, 1992
Еритропоетин	Активиране	Dame et al, 2006
<i>Рецептори</i>		
Рецептор за андрогени	Потискане	Zaia et al, 2001
Рецептор за епидермален растежен фактор	Потискане	Menke et al, 1997; Englert et al, 1995
Рецептор за инсулин	Потискане	Menke et al, 1997; Webster et al, 1997
Рецептор алфа за ретиноева киселина	Потискане	Goodyer et al, 1995
<i>Транскрипционни фактори</i>		
c-Мус	Активиране/ Потискане	Han et al, 2004; Hewitt et al, 1995; Udtha et al, 2003
c-Муб	Потискане	McCann et al, 1995
Циклин E	Потискане	Loeb et al, 2002
<i>Ензими</i>		
Орнитин декарбоксилаза	Потискане	Li et al, 1999; Moshier et al, 1996
<i>Други</i>		
E-кадхерин	Активиране	Hosono et al, 2000
Тромбоспондин 1	Потискане	Dejong et al, 1999
Синдекан 1	Активиране	Cook et al, 1996
Wnt-4	Активиране	Sim et al, 2002
Vcl-2	Активиране/ Потискане	Hewitt et al, 1995; Heckman et al, 1997; Mayo et al, 1999

Интерес представлява взаимодействието между WT1 и *mdr1* протеина. Наличието на множествена лекарствена резистентност е една от основните причини за неуспех при лечението на малигнените заболявания (Thottassery et al, 1997). Смята се, че появата ѝ до голяма степен се определя от функцията на MDR1, кодиращ синтез на мембранен транспортен гликопротеин (P-gp 170), който представлява ксенобиотична помпа с широк спектър на субстратите си. Експресията на този “ATP-Binding Cassette”- мембранен транспортер е отговорна за експортирането на цитотоксични лекарства с различна химична структура – напр. антрациклини, платинови комплекс, винка-алкалоиди и др. (Фиг. 3).



**Фиг. 3. Схематично представяне структурата на MDR1**

MDR1 (gp170) се локализира в 7-ма хромозома. Протеинът като хомодимер образува канал за експорт на ксенобиотици, съставен от 12 хидрофобни мембранни домена и 2 хидрофилни вътреклетъчни домена за свързване на АТФ.

Представлява филогенетично стар механизъм за детоксикация, поради наличната хомология с подобни протеини при бактериите. Отличава се с малка

субстратна специфичност. Среца се в тъкани със засилен метаболизъм на ксенобиотици и такива със специфични предпазни функции: проксимални тубули в бъбреците, епител на жлъчните пътища, чревна лигавица, кръвоносни съдове на кръвно-мозъчната бариера.

Високата експресия на MDR1 върви паралелно с експресията на CD34 при хемопоетичните стволови клетки и това вероятно е физиологичен феномен за предпазване на столово-клетъчната популация.

Според Galimberti et al. (2004), wt1 взаимодейства *in vitro* с промотора на MDR1, поради което при пациенти с висока експресия на WT1 се установява и висока експресия на MDR1. Едновременната експресия на WT1 и MDR1 не повлиява статистически значимо постигането на пълна ремисия при ОМЛ. Все пак при наличие на данни за индукция на MDR1 е целесъобразно разширяването на полихимиотерапевтичната схема с цитостатици, които не са субстрат на този ABC-транспортър.

### ***Протеинни партньори на WT1***

Част от таргетните гени на WT1 кодират синтезата на протеини, функциониращи като партньори на WT1, които имат способност да повишават или понижават транскрипционната активност на WT1. Например транскрипционният фактор SRY, който играе роля в процесите на половото определяне, се активира транскрипционно от WT1. Протеинът SRY, заедно със стероидогенния фактор 1 (SF-1), взаимодействат с wt1 и играят важна роля в процесите на полова диференциация (Matsuzawa-Watanabe et al, 2003; Nachtigal et al, 1998).

Друг важен протеинен синергизъм е директното взаимодействие между wt1 и ко-активатора на CREB-свързващия белтък, който улеснява и модулира трансактивацията на wt1 и вероятно допринася за протеинното взаимодействие между wt1 и тумор-супресорния ген p53 (Maheswaran et al, 1995; Maheswaran et al, 1993).

Известно е, че само един протеин простатно-апоптотичен фактор 4 (Par-4) взаимодейства с 17-те аминокиселини, разположени в N-края на wt1. Par-4 функционира като транскрипционен ко-активатор, когато е свързан с wt1 домейна, съдържащ 17-те аминокиселини (Richard et al, 2001). Par-4 протеинът може и да

потиска транскрипционната активност на WT1. Потискането на WT1-медирана транскрипция е в пряка зависимост от участъка на Par-4, който се свързва с нуклеотидната верига на WT1 (Johnstone et al, 1996).

При друг експериментален модел е установено, че въвеждането на wt1 +/-, не wt1 -/-, в клетъчна линия с произход човешки ембрионален бъбрек, може да предпази клетките от настъпването на клетъчна смърт, вследствие на UV-лъчение или действие на етопозид. Изследователите предполагат, че това се дължи на взаимодействието между Par-4 и 17 аминокиселинна последователност в структурата на wt1-изоформата, тъй като се наблюдава повишена експресия на Par-4 в третираните клетки.

Установено е, че нивото на Par-4 е високо при нормалните CD34 положителни клетки, докато при левкемичните бласти, експресиращи WT1, то е ниско или липсва (Valk et al, 2004). Това отчасти може да обясни оцеляването на левкемичните бласти в условията на висока експресия на WT1.

### ***WT1 като тумор-супресорен ген***

WT1 е открит първоначално като тумор-супресорен ген при деца, страдащи от тумора на Wilms. Това бъбречно неопластично заболяване засяга 1:10000 деца. Мутациите на WT1, свързани с тумора на Wilms, се откриват предимно в спорадичната форма на заболяването с относително ниска честота (~15%) – Little et al, 1997. Тези генетични дефекти представляват големи делеции и вътрегенни мутации (с честота 10% и 5%, съответно от всички случаи). По-голямата част от болните, страдащи от тумора на Wilms, експресират дивия тип на WT1 (Rivera et al, 2005). Тези данни предполагат, че мутациите в WT1 имат значение само при малка част от болните с това заболяване. Все още не е установено дали постоянната експресия на дивия тип на WT1 има значение към развитието на туморното заболяване или просто отразява туморната онтогенеза.

Способността на WT1 да потиска клетъчния растеж у мишки също подчертава ролята му като тумор-супресорен ген (Smith et al, 2000; Fraizer et al, 2004; Luo et al, 1995). Например ектопичната експресия на WT1 в клетъчна линия RM1 с произход простатен карцином води до намален брой колонии в клетъчни култури (Haber et al, 1993). Въвеждането на wt1 +/- изоформи в клетъчна линия

G401, която не еспресира ендогенен WT1, води до промяна в клетъчната морфология и намалява образуването на туморна тъкан в атимични голи мишки (McMaster et al, 1995). Експресията на WT1 в клетъчни линии Saos-2 and U2OS с произход остеосарком може да промени сигналните пътища и да предизвика апоптоза (Menke et al, 1997; Englert et al, 1995).

Най-вероятно WT1 може директно да регулира апоптотичните сигнални пътища посредством активиране експресията на проапоптотичните гени като ВАК (Morrison et al, 2005). Експресията на WT1 също така може да доведе до потискане на синтезата на рецепторите за растежните фактори, като рецептора за епидермалния растежен фактор и този за инсулина, като по този начин се индуцира клетъчна смърт (Menke et al, 1997).

#### ***WT1 като потенциален онкоген***

В последните години проучванията на действието на wt1 върху различни малигнени клетки са довели до установяване на потенциалната роля на WT1 като онкоген. Вероятно WT1 участва активно в процесите на карциногенезата. Като доказателство за това са наблюденията за свръхекспресия на WT1 при множество малигнени заболявания от хематологичен и нехематологичен произход (табл. 2).

***Табл.2 Експресия на WT1 при хематологични и нехематологични заболявания***

<b><i>Тумор</i></b>	<b><i>Метод на изследване</i></b>	<b><i>Изследователски екип</i></b>
Астроцитни тумори	RT-PCR, ИХХ	Oji et al, 2004
Белодробен карцином	Q-RT-PCR, ИХХ	Oji et al, 2002
Дуктален панкреасен аденокарцином	ИХХ, блот	Oji et al, 2003
Колоректален аденокарцином	Q-RT-PCR	Oji et al, 2003
Костни и мекотъканни саркоми	Q-RT-PCR, ИХХ	Ueda et al, 2003
Левкемии	RT-PCR, блот	Miwa et al, 1992; Menssen et al, 1995
Мозъчни тумори	ИХХ	Nakatsuka et al, 2006
Невробластоми	RT-PCR, секвениране	Dennis et al, 2002
Серозни овариални карциноми	ИХХ	Waldstrom et al, 2005;
Рак на гърдата	RT-PCR, блот	Loeb et al, 2001

STAT3, един от протеновите партньори на WT1, играе важна роля в процесите на клетъчна пролиферация. WT1 повишава транскрипционната активност на STAT3 в клетъчните линии, което е доказано при първични нефробластоми. Повишената клетъчна пролиферация вероятно допринася за карциногенезата (Rong et al, 2006).

WT1 също така оказва транскрипционна регулация във функцията на множество растежни фактори и техните рецептори, като по този начин участва в процесите на клетъчна пролиферация и диференциация.

Високите нива на WT1 в тъкани, които нормално не експресират този маркер, са доказателство за онкогенната му функция. Променената клетъчна локализация на WT1, от ядрото в цитоплазмата, вероятно отразява онкогенния му потенциал.

#### ***Експресия на WT1 в хемопоеични прогенитори от здрави индивиди***

Експресията на WT1 в костния мозък на здрави индивиди се установява в изключително ниски нива. Предполага се, че ниските нива на WT1 в нормалните прогениторни клетки се дължат на факта, че само определени субпопулации от тях експресират този ген. Това предположение е изказано от Baird и Simmons (1997), които откриват, че експресията на WT1 се установява при хематопоетични прогениторни клетки с фенотип CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, като нивата на експресия между тези прогениторни клетки и левкемичните бласти са съизмерими (Hosen N et al, 2002).

Inoue et al. (1997) с помощта на количествен RT-PCR показват, че експресията на WT1 при CD34<sup>+</sup>-хемопоеични прогениторни клетки е около 10 пъти по-малка от тази, при левкемичните бласти. По-високи нива на експресия на WT1 при левкемични клетки са установени и от други автори (Maurer U et al, 1997; Baird et al, 1997, Fraizer et al, 1995).

За да се установи действието на WT1 върху тези клетъчни популации, са проведени множество експериментални изследвания. Генетичното отстраняване на WT1 в мишките води до летален изход още в ембрионалния стадий, който обаче не се дължи на хематопоетичен дефект. Установено е също така, че фетални хепатоцити от WT1 дефицитни животни могат да възстановят кръвотворната

система на облъчени възрастни мишки. Това показва, че тези клетки са способни да пролиферират и да се диференцират (Alberta et al, 2003; King-Underwood et al, 2005). Според Alberta et al, 2003, WT1 играе важна роля в самообновяването на ранните хемопоетични клетки при мишките. Тези данни се потвърждават от Nishida et al, 2006, които предизвикват експресия на WT1 в хематопоетични прогениторни клетки на мишки. Това води до повишен костно-мозъчен целуларитет и повишен брой на BFU-E, CFU-GM and CFU-GEMM, като образуването на зрели клетки е нормално при тези мишки. При тези мишки не се наблюдавало появата на спонтанна левкемия. Мишките развивали левкемия, когато били инфектирани с вирус, носител на AML1-ETO. Авторите заключават, че при този експериментален модел експресията на WT1 служи за поддръжане на самообновяването на клетките, докато наличието на “second hit – втори удар” блокира диференциацията на клетките, което води до развитие на левкемия.

Счита се, че WT1 представлява тумор-супресорен ген, когато той се експресира в хематопоетичните клетки на човека. Свръхекспресията на WT1 в костния мозък води до спиране на клетъчния растеж и намалено образуване на клетъчни колонии (Ellisen et al, 2001; Svedberg et al, 2001). Това се дължи на неговите „zinc-finger” региони, тъй като делецията на „zinc-finger” участъците премахва този ефект на WT1 (Svensson et al, 2005).

Очевидно е, че експресията на WT1 не е строго-специфична по отношение на малигнено-трансформираните левкемични клетки, а е част от фенотипа на някои нормални хемопоетични прекурсори. Поради това може да се заключи, че клинична значимост би имало динамичното проследяване на нивата на експресия при отделния пациент.

### ***Експресия на WT1 при възрастни пациенти с остри левкемии***

За пръв път участието на WT1 в патогенезата на левкемиите е установено от Call et al, 1990. В първите разработки, при които е бил прилаган Northern blot за детекция на РНК, специфична за WT1, се съобщава, че 14-68% от левкемичните клетки експресират WT1 в повишена степен. При използването на по-чувствителни методи, каквато е качествената обратно транскрипционна полимеразна верижна реакция (RT-PCR), свръхекспресия на WT1 се наблюдава към момента на

диагнозата в 73-100% от болните с ОМЛ. При рецидив свръхекспресия се отчита при 88% от болните. С помощта на количествена “real-time” RT-PCR почти всички случаи на остра левкемия при възрастни индивиди показват експресия на WT1 (Kreuzer et al, 2001).

Отсъствието на експресия на WT1 при хронична лимфоцитна левкемия, косматоматозната левкемия и плазматично-клетъчна левкемия води до предположението, че експресията на WT1 се наблюдава предимно при хематологични неоплазии с ниска степен на диференциация. За по-рядка честота или по-ниско ниво на WT1 експресия при ОМЛ M5-M7 по French-American-British (FAB) класификация се съобщава в повечето, но не във всички досега проведени проучвания (Schmid et al, 1997; Bergmann et al, 1997; Menssen et al, 1995). Чрез поточно-цитометрично изследване е установена по-висока експресия на Wt1 при по-диференцирани бласти- CD34(-), CD33(+). Корелацията между експресията на WT1 и CD33 при хемопоеични клетки е установена от Miyagi et al (1993). Тези данни подкрепят идеята, че съществува обратна зависимост между експресията на WT1 и клетъчната диференциация. Освен това е установено, че експресията на WT1 е по-висока при ОМЛ в сравнение с острата лимфобластна левкемия (ОЛЛ).

#### ***WT 1 като тумор-супресорен ген при пациенти с ОМЛ***

Функцията на WT1 като тумор-супресорен ген при ОМЛ се подкрепя от следните наблюдения. Според King-Underwood L, et al, 1996 при 10-15% (4/36) от пациентите с ОМЛ се установяват мутации в нуклеотидната последователност на WT1. Тези мутации представляват най-често нуклеотидни инсерции в екзон 5 или 7, водещи до образуването на къса или променена полипептидна верига. В това проучване, обаче, не се отбелязва експресията на WT1 или Wt1 в левкемичните бласти, съдържащи тези мутации. Засега не е известно дали тези мутации допринасят за развитието на заболяването.

При по-диференцираните форми на ОМЛ се наблюдава много ниска експресия на WT1. Valk et al, 2004 изследват проби от 285 пациенти с ОМЛ посредством микрочипове. Те установяват много ниска или липсваща експресия на WT1 при някои подгрупи пациенти. Това може да се обясни посредством инхибиращия ефект на WT1 върху клетъчния растеж. Например когато WT1 KTS

(+) изоформата се експресира в WT1-отрицателна левкемична клетъчна линия – M1 и когато тези клетки бъдат инжектирани в кръвта на имунокомпроментирани мишки, се наблюдава намалено образуване на туморни клетки (Smith et al, 2000).

### ***WT 1 като онкоген при пациенти с ОМЛ***

Експресията на WT1 се установява в значително по-висока степен в костния мозък или периферната кръв на пациентите с остри левкемии в сравнение с клетките на костния мозък или хематопоеичните стволови клетки на здрави индивиди. Експресията на WT1 варира между различните видове и форми левкемии. При хроничната миелоидна левкемия, по време на хроничната фаза нивата на WT1 експресия са ниски. Експресията на WT1 се повишава, когато заболяването прогресира в акселериралата фаза или фазата на бластна криза. Повишена експресия на WT1 може да бъде установена при пациенти с остра лимфобластна или остра миелоидна левкемия. Експресията на WT1 се установява при около 74% от пациентите с ОМЛ и при 66% от пациентите с ОЛЛ (Miyagi et al, 1993; Miwa et al, 1992; Menssen et al, 1995; Ostergaard et al, 2004; Brieger et al, 1994; Schmid et al, 1997; Chiusa et al, 2006). Високи нива на експресия на WT1 са установени при различни форми на МДС (Tamaki et al, 1999). При пациенти с МДС повишената експресия на WT1 е свързана с по-висок брой бласти и предвещава по-ранна прогресия на МДС в ОМЛ.

### ***Мутации в WT1 при пациенти с ОМЛ***

При пациенти с ОМЛ се установява както свръхекспресия на WT1, така и мутации в неговата генетична структура. Честотата на мутациите в WT1 при пациенти с ОМЛ са около 15%, като тези генетични аномалии водят до резистентност към прилаганата полихимиотерапия, по-кратка OS и DFS (King-Underwood L, Pritchard-Jones K, 1998). Според други автори честотата на WT1-мутациите при Пациенти с нормален кариотип е около 10% (Summers et al, 2007; Paschka et al, 2008; Virappane et al, 2008). WT1-мутациите не се установяват при пациенти с благоприятни цитогенетични аномалии, като t(15;17)(q22;q12), t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22) или t(16;16)(p13;q22), които имат относително добра прогноза (Abbas et al, 2010). До този момент не са установени синергични взаимодействия между WT1-мутациите и други молекулярни маркери с

прогностично значение при пациенти с ОМЛ, като нуклеофосмин 1 (NPM1), СЕВРА или MLL. Пациенти с WT1-мутации имат агресивен ход на заболяването, повишен риск от рецидив и настъпване на смърт (Owen et al, 2010). WT1-мутациите при пациенти с ОМЛ и нормален кариотип имат независима неблагоприятна прогностична стойност, тъй като при тези болни се постига по-рядко хематологична и цитогенетична ремисия и се наблюдава по-често резистентност към приложената полихимиотерапия. При част от пациентите с нормален кариотип се установило едновременно наличие на WT1-мутации и FLT3-ITD, което довело до неблагоприятен клиничен ход на заболяването при тези болни (Gaidzik et al, 2009). При деца с ОМЛ, честотата на WT1 мутациите е около 12%, докато при тези с нормален кариотип – 22% (Hollink et al, 2009). Най-често мутациите в WT1 представляват делеции и инсерции, което води до образуването на трупкиран белтък, губещ способността си да се свързва с ДНК-последователности (Virappane et al, 2008; Hollink et al, 2009). Мутациите най-често са локализирани в екзони 7 и 9.

#### ***Клинична значимост на WT1 при пациенти с ОМЛ***

Някои данни показват, че повишената експресия на WT1 при пациенти с ОМЛ след стандартна химиотерапия би могла да бъде неблагоприятен прогностичен маркер.

Bergmann et al, 1997 изследват експресията на WT1 при 139 пациенти с ОМЛ под 60-годишна възраст, при които е проведена стандартна ПХТ. Вероятността за 3-годишна OS при Пациенти с ниска експресия на WT1 е била 59%, докато при Пациенти с висока експресия на молекулярния маркер е била 21%. Тези данни са в противоречие с данните, установени от Schmid et al, 1997, според които липсва статистически значима корелация между нивото на Експресията на WT1 и DFS или честотата на постигане на пълна ремисия. Различията в данните на двата изследователски екипа вероятно се дължат на различия в методологията на измерване нивото на WT1 експресията, пациентските популации, както и вида и интензивността на прилаганата ПХТ.

Karakas et al, 2002 изследват едновременната експресия на WT1, заедно с тази на протоонкогена bcl-2, като прогностични маркери при пациенти с ОМЛ. При пациенти под 60-годишна възраст, лекувани със стандартна ПХТ високата

експресия на WT1 и bcl-2 води до кратка OS и висока честота на рецидив. При пациенти над 60-годишна възраст, тези маркери нямат такава прогностична стойност. Тези наблюдения се дължат най-вероятно на различната биология на ОМЛ при възрастните пациенти, както и на прилагането на по-слабо интензивна ПХТ при тази група болни. Karakas et al, 2002 установяват статистически значима корелация между експресията на двата молекулярни маркера, потвърждавайки наблюденията, че експресията на WT1 води до повишаване на експресията на bcl-2 (Mauro et al, 1999). Наблюдават се случаи, при които експресията на WT1 е висока, докато тази на bcl-2 е ниска, или обратно. Това предполага, че в някои случаи високата експресия на WT1 и bcl-2 са свързани, докато в други случаи са независими събития.

Според други автори с по-голямо прогностично значение е динамиката в експресията на WT1 след приложена индукционна химиотерапия (иХТ). В подкрепа на това становище са и данните на Ostergaard et al. (2004), че след проведена иХТ хематологичен рецидив настъпва при около 25% от пациентите, при които е постигнато понижение на WT1 експресията с повече от 100 пъти, докато рецидив се наблюдава при 86% от пациентите, при които намалението на експресията на WT1 е по-малко от 100 пъти.

От изложените литературни данни се очертават няколко групи нерешени и спорни проблеми, чието изследване би имало значение при болните с ОМЛ. Това е особено важно за нашата страна, където все още липсват системни проучвания върху експресията на този молекулярен маркер.

*Какво е разпространението на WT1 при болни с ОМЛ и какво е прогностичното значение на високата експресия на този молекулярен маркер при отделните болни?*

*По какъв терапевтичен начин може да се повлияе оптимално експресията на WT1?*

*Какво е взаимодействието на WT1 с други ключови молекулярни маркери от различни сигнални пътища и какво е тяхното комбинирано прогностично значение при пациентите с ОМЛ?*

*Дали WT1 оказва въздействие като тумор-супресорен ген или като онкоген?*

## **II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **Цел**

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучи клинико-биологичната значимост на експресия на туморния ген на Wilms (WT1) при пациенти с de novo остра миелоидна левкемия и да се определи неговото прогностично значение.

### **Задачи**

1. Да се проучи експресията на WT1 и wt1 при пациенти с de novo остра миелоидна левкемия към момента на диагнозата.
2. Да се проучат клинико-лабораторни характеристики на пациенти с de novo остра миелоидна левкемия в зависимост от експресията на WT1.
3. Да се проучат корелациите между експресията на WT1 и други ключови биомаркери при пациенти с de novo остра миелоидна левкемия.
4. Да се проучи значението на експресията на WT1 и на изследваните молекулярни маркери за терапевтичния отговор и продължителността на свободната от болест и обща преживяемост при пациенти с de novo остра миелоидна левкемия.
5. Да се определи независимата прогностична стойност на изследваните към момента на диагнозата биомаркери при пациенти с de novo остра миелоидна левкемия.

### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПАЦИЕНТИТЕ:

В настоящото проучване са включени 110 (сто и десет) пациенти с de novo ОМЛ. Пациентите са диагностицирани и лекувани в НСБАЛХЗ – София в периода между м.октомври 2003 и м.септември 2010 година. Заболяването е диагностицирано съгласно критериите на класификационните системи на работните групи на ФАБ (Bennett et al, 1976; Bennett et al, 1985) и СЗО – Jaffe et al, 2001. Пациенти с първична или вторична остра промиелоцитна левкемия са изключени от това проучване и са лекувани по протокол РЕТНЕМА LPA99 (Sanz et al, 2008).

Основните характеристики на пациентите са обобщени в табл. 3.

*Табл. 3 Характеристики на пациентите с ОМЛ, включени в настоящото проучване*

Пациенти	
<i>Възраст - години</i>	
Медиана (Обхват)	51 (19-76)
<i>Пол – брой пациенти (%)</i>	
Мъже	61 (55,5%)
Жени	49 (44,5%)
<i>Брой левкоцити (<math>\times 10^9/l</math>) (n=106)</i>	
Медиана (Обхват)	28,2 (0,5-337)
<i>Ниво на хемоглобина (gr/l) (n=106)</i>	
Медиана (Обхват)	92 (49-145)
<i>Брой тромбоцити (<math>\times 10^9/l</math>) (n=105)</i>	
Медиана (Обхват)	58,2 (5-397)
<i>Ниво на лактат дехидрогеназа (Е/л) (n=102)</i>	
Медиана (Обхват)	817 (140-6945)
<i>Бластни клетки в костния мозък (%) (n=102)</i>	
Медиана (Обхват)	86 (23-100)
<i>Бластни клетки в периферната кръв (%) (n=103)</i>	
Медиана (Обхват)	63 (0-100)
<i>ФАБ класификация – брой пациенти (%)</i>	
M0	5 (4,5%)
M1	22 (20%)
M2	17 (15,5%)
M4	25 (22,7%)
M5	27 (24,5%)
M6	2 (1,8%)
Липсващи данни	12 (10,9%)
<i>СЗО класификация – брой пациенти (%)</i>	
ОМЛ с повтарящи се генетични нарушения	18 (16,4%)
ОМЛ с миелодисплазия-свързани промени	18 (16,4%)
ОМЛ, неklasифицируема другаде	74 (67,3%)

*Цитостатична и заместителна терапия при пациенти с ОМЛ*

Индукционното лечение беше проведено при 44 от пациентите с ОМЛ под 60-годишна възраст, при които беше изследвана експресията на WT1. То включваше прилагане на един или два курса - комбинация на Цитозин-арабинозид (Cytosar – 100 mg/m<sup>2</sup>/ден; в продължение на пет или седем дни); антрациклинов антибиотик – [Idarubicin (12 mg/m<sup>2</sup>/ден), Farmorubicin (45 mg/m<sup>2</sup>/ден) или Novantrone 10 mg/m<sup>2</sup>/ден в продължение на два или три дни]; с или без приложение на Etoposide (100 mg/m<sup>2</sup>/ден); в продължение на три или пет дни) –Wiernik et al, 1992; Neil et al, 2004; Гигов и сътр., 2000. При 8 от пациентите (18,2%) беше приложена 24-часова инфузия на Cytosar в хода на индукционната терапия, докато при останалите 36 (81,8%) – цитостатикът беше приложен като 3-часови инфузии двукратно през деня.

При пациентите под 60-годишна възраст с ОМЛ, резистентна на конвенционалната индукционна терапия (n=17), беше проведено високодозово индукционно лечение, което включваше прилагане на терапевтични курсове по схема FLAG, IDA-FLAG, MITO-FLAG, HAM или интермедиерни дози Cytosar в комбинация с Митоксантрон (Visani et al, 1994; Steinmetz HT et al, 1999; Hänel M et al, 2001; Hiddemann et al, 1987; Sternberg et al, 2000). Най-често прилаганият курс беше MITO-FLAG, използван при 52,9% (9/17) от болните. Пациенти, при които не беше постигната пълна ремисия след високо-дозовата индукционна терапия, бяха проследявани само по отношение на общата преживяемост.

Пълна ремисия беше регистрирана при 56,8% (25/44) от пациентите с ОМЛ. При трима пациенти (12%) не беше проведена консолидираща терапия поради следните причини: поява на хепатит В вирусна инфекция, продължаване на лечението в друго лечебно заведение, настъпване на летален изход. При други двама пациенти (8%) статистическото наблюдение беше прекратено преди провеждането на консолидиращата терапия. При останалите 80% (20/25) от тези болни бяха проведени различни цитостатични консолидиращи курсове (табл. 4)

**Табл. 4** Разпределение на пациентите с ОМЛ, постигнали пълна ремисия, според проведената консолидираща терапия:

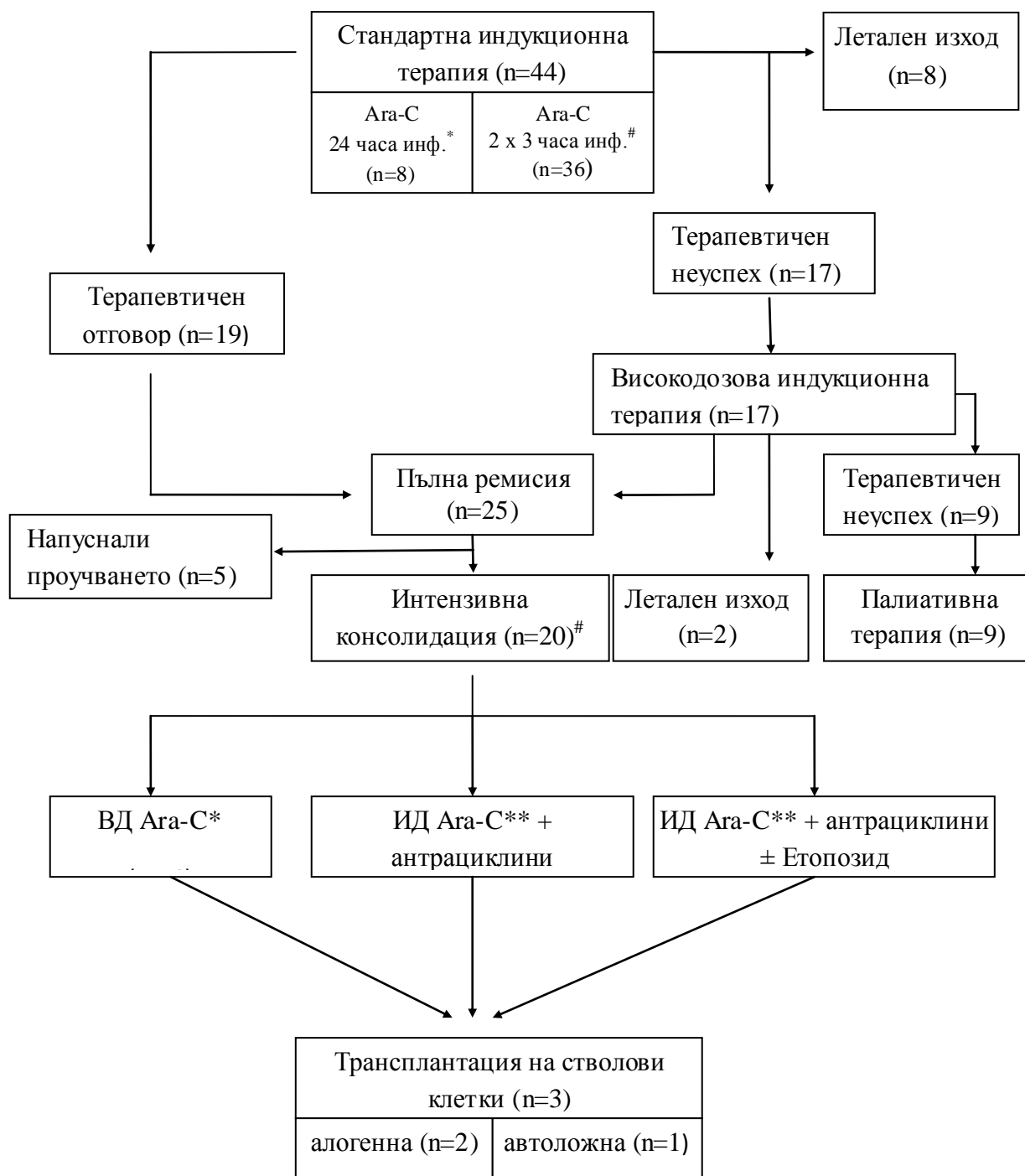
Цитостатична консолидираща терапия	Брой пациенти % (n=20)
Високи дози Cytosar	3 (15%)
Интермедиерни дози Cytosar ± антрациклин	10 (50%)
Стандартни дози Cytosar ± антрациклини ± етопозид	7 (35%)

При 50% (10/20) от пациентите бяха проведени консолидиращи курсове с интермедиерни дози Cytosar (2 x 1 гр/м<sup>2</sup> 1-4 ден) с или без приложение на антрациклини (Farmorubicin 45 мг/м<sup>2</sup> или Idarubicin 12 мг/м<sup>2</sup> 5-6 ден) (Heil et al, 2004). Седем пациенти (35%) бяха консолидирани с терапевтични курсове, съдържащи комбинации от стандартни дози цитозар, антрациклинови антибиотици и/или епиподофилотоксинови производни. При трима заболели (15%) бяха проведени консолидиращи курсове с високи дози Cytosar (2 x 3 гр/м<sup>2</sup> 1;3;5 ден) – Mayer et al, 1994.

При трима от пациентите (15%) след проведената цитостатична консолидираща терапия беше осъществена трансплантация на хемопоетични стволови клетки (СКТ). Алогенна СКТ беше приложена при двама пациенти (10%), докато автоложна СКТ беше проведена при един болен (5%).

Терапевтичният подход, прилаган при пациенти с ОМЛ в НСБАЛХЗ в периода 2003-2010 година, може да бъде схематично представен на фиг. 4.

Профилактичното прилагане на тромбоцитни концентрати се осъществяваше при тромбоцитен брой под  $20 \times 10^9 / L$  или в случаите на хеморагична диатеза. Еритроцитни концентрати се преливаха при пациенти с ниво на хемоглобина под 65 g/L. При наличието на фебрилитет (телесна температура  $\geq 38^\circ C$ ) или други клинични белези за инфекция, пациентите бяха лекувани със широкоспектърни антибиотици и антимиотици. Прилагането на тези препарати беше преустановявано, когато пациентът беше афебрилен в продължение на 48 часа.



Фиг. 4 Терапевтична стратегия за лечение на пациенти с ОМЛ, прилагана в НСБАЛХЗ между 2003 и 2010 год.

\* 24-часова инфузия на Cytosar; # 3- часова инфузия на Cytosar два пъти на ден;

\* ВД Ara-C високи дози Cytosar (2 x 3000 мг/м<sup>2</sup>/ден 1, 3, 5 ден)

\*\* ИД Ara-C интермедиерни дози Cytosar (500 – 1000 мг/м<sup>2</sup>/ден)

# двама пациенти не са провели консолидираща терапия поради прекратяване на статистическото наблюдение.

### *Критерии за терапевтичен отговор и рецидив*

Отчитането на терапевтичния отговор се осъществяваше най-често между 15<sup>-тия</sup> и 28<sup>-мия</sup> ден след началото на първия индукционен курс и след завършване на втория индукционен курс. При по-голяма част от пациентите терапевтичният отговор беше проследяван между 21-вия и 28-мия ден след началото на курса и беше дефиниран като  $\geq 50\%$ -но намаление на левкемичната популация в костния мозък, в сравнение с нивото на левкемична инфилтрация в костния мозък преди провеждането на индукционната терапия (Schlenk et al, 2003). При другата част от пациентите терапевтичният отговор беше отчитан на 15<sup>-тия</sup> ден от началото на индукционния курс. При пациенти с хипопластен костен мозък, бластна популация  $< 5\%$  и липса на екстрамедуларна левкемия беше отчитан добър терапевтичен отговор (good responders), докато при останалите пациенти беше регистриран незадоволителен терапевтичен отговор (bad responders) – Neil et al, 2004.

Пълната ремисия беше дефинирана като състояние, при което се установяват  $< 5\%$  бласти в костния мозък, липса на бласти с Ауерови пръчици и отсъствие на екстрамедуларна левкемия, абсолютен неутрофилен брой  $> 1000/\mu\text{L}$  и тромбоцитен брой  $> 100,000/\mu\text{L}$  (Cheson et al, 2003)

Причините за терапевтичен неуспех бяха подразделени в две категории: (i) рефрактерна левкемия (РЛ) и (ii) смъртен изход, настъпил по-малко от 7 дни след завършването на първия индукционен курс (ранна смърт, РС), или смъртен изход, настъпил по време на терапевтично-индуцираната костно-мозъчна хипоплазия (хипопластична смърт, ХС) – Schlenk et al, 2003.

Рецидив беше дефиниран като състояние, при което се установяват повече от 10% бласти в две поредни миелограми, проведени в рамките на 14 дни, или поява на екстрамедуларна левкемия при пациенти с документирана пълна ремисия.

## МЕТОДИ

### *Цитологичен, биохимичен, цитохимичен и флоуцитометричен анализ*

Цитологичният, биохимичният, цитохимичният и флоуцитометричен анализ към момента на поставяне на диагнозата бяха проведени в клиничната лаборатория и лабораторията по хематопатология и имунология към НСБАЛХЗ, като част от анализа беше проведен в Центъра за върхови постижения – ТРАНСЛИРАЩИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ХЕМАТОЛОГИЯТА. Проби от костен мозък и/или периферна кръв бяха оцветявани по Романовски-Гимза и впоследствие наблюдавани на светлинен микроскоп. При цитохимичния анализ най-често използваните ензими бяха миелопероксидаза или Судан Шварц и алфа-неспецифичната естераза. При флоуцитометричното изследване беше използван панел от Т-клетъчни (CD3, CD4, CD7, CD8, CD5, CD2), В-клетъчни (CD10, CD19, CD20, CD22, CD79b), миелоидни (CD13, CD14, CD15, CD16, CD33, CD64) и други маркери (CD34, CD38, CD117, CD56, CD45, гликофорин А, HLA-DR).

### *Цитогенетичен и молекулярно-биологичен анализ*

Хромозомният и молекулярно-биологичният анализи към момента на поставяне на диагнозата бяха проведени в лабораторията по цитогенетика и молекулярна биология към НСБАЛХЗ, като част от анализите беше проведен в Центъра за върхови постижения – ТРАНСЛИРАЩИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ХЕМАТОЛОГИЯТА. Изследвани бяха проби от костен мозък или периферна кръв, които бяха поставяни в епруветки с хепарин или ЕДТА. Успешна кариотипизация беше постигната при 76,4% от изследваните пациенти (84/110). Цитогенетичният анализ беше проведен върху метафазни хромозоми след култивиране върху краткотрайни култури в продължение на 24 или 48 часа. Хромозомните аномалии са представени в съответствие с препоръките на International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2009). Успоредно с цитогенетичния анализ беше проведена и RT-PCR за установяване на най-честите хромозомни аберации при пациентите с ОМЛ - *AML1-ETO*, *CBFb-MYH11*, *PML-RARa*, *M-BCR-ABL* и *t-BCR-ABL*, съгласно програмата BIOMED-I (van Dongen et al, 1999).

Стратификацията на пациентите беше осъществена въз основа на цитогенетичните (Grimwade et al, 2010)/ и/или молекулярно-биологичните

отклонения, установени към момента на поставяне на диагнозата. Рисковите групи при пациентите с ОМЛ бяха дефинирани по следния начин:

- **Нисък риск** – установява се при пациенти с  $t(8;21)$  и  $inv(16)$  или техните молекулярни еквиваленти.
- **Интермедиерен риск** – налице е при болни с нормален кариотип или други цитогенетични аномалии, които не принадлежат към цитогенетичните аномалии с нисък или висок риск.
- **Висок риск** – установява се при пациенти с цитогенетични отклонения в дългото рамо на трета хромозома (3q), с изключение на  $t(3;5)(q25;q34)$ ;  $inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)$ ,  $add(5q)/del(5q)$ ,  $-5$ ,  $-7$ ,  $add(7q)/del(7q)$ ,  $t(6;11)(q27;q23)$ ,  $t(10;11)(p11\text{ приблизително }13;q23)$ , други  $t(11q23)$  (с изключение на  $t(9;11)(p21\text{ приблизително }22;q23)$  и  $t(11;19)(q23;p13)$ ),  $t(9;22)(q34;q11)$ ,  $-17$ , и отклонения в късото рамо на 17-та хромозома или техните молекулярни еквиваленти. Висок риск се наблюдава и при болни с комплексен кариотип (наличие на 3 или повече хромозомни аномалии).

### **ПОЛИМЕРАЗНО-ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ СЛЕД ОБРАТНА ТРАНСКРИПЦИЯ (RT-PCR)**

#### **1. *Изолране на моноклеарни клетки (МНК)***

МНК бяха изолирани от венозна кръв или костен мозък, взети с EDTA или хепарин, до третия час от получаването им с помощта на градиентно центрофугиране. Два обема кръв или костен мозък бяха наслоени върху един обем Polysep (Pharmachim) или Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) и центрофугирани на 1500 g в продължение на 20 минути при стайна температура. Пръстенът, съдържащ МНК, беше отделен, промит двукратно с фосфатен за отстраняване на тромбоцитите и утаен чрез центрофугиране на 300 g в продължение на 10 минути.

#### **2. *Екстракция на РНК (Chomczynski & Sacchi, 1987)***

РНК беше екстрахирана с TRIzol (Gibco BRL), следвайки препоръките на производителя. За целта, около  $10^7$  от утаените МНК бяха лизирани с 1 ml TRIzol за 5-10 минути на стайна температура. Полученият клетъчен лизат беше смесен с 200

µl хлороформ (Fluka) в епруветки с обем 1,5 ml (тип Епендорф) и центрофугиран на 12000 g в продължение на 20 минути на 4°C в хладилна центрофуга Hettich EBA 12R. Към надстоящата прозрачна фаза с разтворената РНК беше прибавен 0,5 ml изопропилов алкохол (Promega) и епруветките бяха инкубирани при 4°C в продължение на 10 минути. РНК беше утаена чрез центрофугиране на 12000 g в продължение на 10 минути на 4°C и промита с 1 ml 75% етилов алкохол. Впоследствие утаената РНК беше изсушена на стайна температура в продължение на 30 минути, разтворена в 20 µl дестилирана вода (H<sub>2</sub>O), предварително обработена с диетилопиракарбонат [Diethylpyrocarbonat (DEPS)] - H<sub>2</sub>O-DEPS (Promega).

Концентрацията на РНК беше определена на спектрофотометър СФ-26 Ломо при дължина на вълната 260 nm, след разреждане на разтворената РНК с дестилирана вода по формулата:  $C [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = 40 \times \text{ОП} \times \text{ФР}$ , където ФР е фактор на разреждането (500), а ОП е намерената оптична плътност. След допълнително разреждане с H<sub>2</sub>O-DEPS, концентрацията на получената РНК беше стандартизирана на 1 µg/µl. Чистотата на РНК беше анализирана по съотношението на ОП, измерени при 260 nm и 280 nm.

### ***3. Обратна транскрипция и синтез на комплементарна ДНК (Reverse transcription)***

Комплементарната ДНК (кДНК) беше синтезирана съгласно протокола, предложен от van Dongen et al, 1999. Беше използвано 1 µg РНК в реакционна среда с краен обем 20 µl, която съдържаше: 1 x буфер, 200 U MMLV обратна транскриптаза (Abgene, Surrey, UK), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM от всеки дезоксинуклеотидтрифосфат [desoxynucleotide triphosphate (dNTP): dATP, dCTP, dGTP, dTTP], 20 U рибонуклеазен инхибитор (RNAsin) (Promega Corporation, Madison, WI, USA) и 5.0 µM хексамерни олигонуклеотиди (random hexamers) (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). кДНК беше синтезирана чрез последователно инкубиране на пробите при 37°C в продължение на 60 минути и при 99°C в продължение на 3 минути.

**4. Характеризиране на качеството на изолираната РНК и ефективността на обратната транскрипция чрез контролна амплификация на  $\beta$ -актиновия ген.**

Два микролитра кДНК бяха амплифицирани в 25  $\mu$ l реакционна смес, която съдържаше: 1 x PCR буфер; 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>; 1.0 U Prime Taq ДНК полимераза (Genet Bio, Cheonan, Korea); 200  $\mu$ M от всяко dNTP (Promega) и по 0.4 pM от следните праймери: forward праймер 5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3' и reverse праймер, 5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3' (Alpha DNA, Montreal, QC, Canada). PCR-реакцията беше проведена в термосайкълър Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) при следните температурни режими: [1] Начална денатурация в продължение на 2 минути при 94°C, [2] 31 цикъла на амплификация: денатурация при 94°C в продължение на 30 секунди; хибридизация при 60°C в продължение на 1 минута; екстензия при 72°C в продължение на 1 минута и [3] Финална екстензия: 72°C в продължение на 5 минути. Като положителна контрола беше използвана кДНК от клетъчна линия K562, докато като отрицателна контрола беше използвана PCR сместа без матричната кДНК. Продуктите на реакцията бяха анализирани чрез електрофореза в 2% агарозен гел (Sigma), оцветен с 10 mg/ml етидиев бромид (Sigma) в 0,5 x TBE буфер [0.89 M Tris (Merck); 0.89 M борова киселина (Фармахим); 25 mM EDTA (Fluka)] при напрежение от 80 V в продължение на 60 минути. Въвеждането им в гела беше извършено посредством 3  $\mu$ l среда, съдържаща 50% глицерол, 1,0 mM EDTA, 0.25% бромфенолблау и 0,25% ксиленцианол FF (Fluka). При облъчване с ултравиолетови лъчи продуктите на амплификацията бяха визуализирани като отчетливи бандове, дължината на които беше определена спрямо молекулярен маркер – 1 Kb DNA Ladder (Gibco BRL) или PCR molecular weight marker (Amersham Life Science).

**5. Изследване експресията на WT1 посредством PCR**

Изследване експресията на WT1 беше осъществено съгласно протокола, предложен от Wagner et al, 2002. Два микролитра кДНК бяха подложени на амплификация в 16  $\mu$ l реакционна смес, която съдържаше: 1 x PCR буфер (Invitrogen); 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen); 0.5 U Prime Taq ДНК полимераза (Invitrogen); 0.2 mM от всяко dNTP (Invitrogen) и по 0.62 mM от следните праймери:

forward праймер 5'-AAG CTG TCC CAC TTA CAG ATG-3' и reverse праймер 5'-CAG CTG GAG TTT GGT CAT GTT-3' (Alpha DNA, Montreal, QC, Canada). PCR-реакцията беше проведена в термосайкълър Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) при следните температурни режими: [1] Начална денатурация в продължение на 1 минута при 94°C, [2] 40 цикъла на амплификация: денатурация при 94°C в продължение на 45 секунди; хибридизация при 56°C в продължение на 45 секунди; екстензия при 72°C в продължение на 45 секунди и [3] Финална екстензия: 72°C в продължение на 5 минути. Бяха използвани всички предпазни мерки за избягване възможността от поява на фалшиво-положителни резултати. Приготвянето на реакционната смес и анализът на амплифицираните продукти бяха проведени в различни стаи. Продуктите на реакцията бяха анализирани чрез електрофореза в 2% агарозен гел (Sigma), оцветен с етидиев бромид и визуализирани с ултравиолетова светлина.

Като положителна контрола беше използвана клетъчна линия K562, докато като отрицателна – реакционна смес без матричната ДНК.

Силата на реакцията беше полуколичествено характеризирана въз основа на интензивността на видимия банд: (-) отрицателна реакция, липса на видим банд – липсваща експресия; (+) слабо до умерено видим банд, по-слаб по интензивност от банда на положителната контрола – ниска експресия; (++)/ (++++) силно или много силно видим банд, сходен или по-силен по интензивност от банда на положителната контрола – висока експресия.

Установено е, че концентрацията на WT1 и.РНК в пробите на пациенти със силна експресия на гена е 1-2 log10 по-висока в сравнение с пробите на болни, при които се установява липсваща или слаба експресия на гена (Karakas et al, 2002).

Затова при провеждане на статистическия анализ на данните пациентите с ОМЛ бяха разделени на две групи: с липсваща или слаба експресия на WT1 (WT1-отрицателни пациенти) и със силна експресия на WT1 (WT1-положителни пациенти).

#### **6. Изследване експресията на сурвивин посредством PCR**

Изследване експресията на сурвивин беше осъществено съгласно протокола, предложен от Ryan et al, 2005. Два микролитра кДНК бяха подложени на амплификация в 25 µl реакционна смес, която съдържаше: 1 x PCR буфер; 2.0 mM

MgCl<sub>2</sub>; 1.25 U Prime Taq ДНК полимераза (Genet Bio, Cheonan, Korea); 250 μM от всяко dNTP (Promega) и по 0.4 pM от следните праймери: forward праймер 5'-GCATGGGTGCCCCGACGTTG-3' и reverse праймер, 5'-GCTCCGGCCAGAGGCCTCAA-3' (Alpha DNA, Montreal, QC, Canada). PCR-реакцията беше проведена в термосайкълър Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) при следните температурни режими: [1] Начална денатурация в продължение на 2 минути при 94°C, [2] 31 цикъла на амплификация: денатурация при 94°C в продължение на 30 секунди; хибридизация при 60°C в продължение на 1 минута; екстензия при 72°C в продължение на 1 минута и [3] Финална екстензия: 72°C в продължение на 5 минути.

Бяха използвани всички предпазни мерки за избягване възможността от поява на фалшиво-положителни резултати. Приготвянето на реакционната смес и анализът на амплифицираните продукти бяха проведени в различни стаи. Продуктите на реакцията бяха анализирани чрез електрофореза в 2% агарозен гел (Sigma), оцветен с етидиев бромид и визуализирани с ултравиолетова светлина.

Като положителна контрола беше използвана клетъчна линия U937, докато като отрицателна контрола беше използвана реакционната смес без матричната кДНК.

Силата на реакцията беше полуколичествено характеризирана въз основа на интензивността на видимия банд: (-) отрицателна реакция, липса на видим банд – липсваща експресия; (+) слабо до умерено видим банд, по-слаб по интензивност от банда на положителната контрола – ниска експресия; (++)/+++ силно или много силно видим банд, сходен или по-силен по интензивност от банда на положителната контрола – висока експресия.

## **7. Изследване експресията на MDR1 посредством PCR**

Изследване експресията на MDR1 беше осъществено съгласно протокола, предложен от Veelken et al, 1998 и Valatzenko et al, 2002. Като вътрешна контрола беше използван β<sub>2</sub>-микроглобулин. Два микролитра кДНК бяха подложени на амплификация в 25 μl реакционна среда, която съдържаше: 1 x PCR буфер; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1.0 U Prime Taq ДНК полимераза (Genet Bio, Cheonan, Korea); 200 μM от всяко dNTP (Promega) и по 0.4 pM от праймери TL9 и TL10, необходими за амплификацията на MDR1, заедно с праймери B2-M1 и B2-M2, необходими за

синтезата на  $\beta_2$ -микроглобулин: (Alpha DNA, Montreal, QC, Canada). PCR-реакцията беше проведена в термосайкълър Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) при следните температурни режими: [1] Начална денатурация в продължение на 5 минути при 94°C, [2] 28 цикъла на амплификация: денатурация при 94°C в продължение на 30 секунди; хибридизация при 57°C в продължение на 30 секунди; екстензия при 72°C в продължение на 30 секунди и [3] Финална екстензия: 72°C в продължение на 10 минути. Бяха използвани всички предпазни мерки за избягване възможността от поява на фалшиво-положителни резултати. Приготвянето на реакционната смес и анализът на амплифицираните продукти бяха проведени в различни стаи. Като положителна контрола беше използвана РНК от пациент с остра лимфобластна левкемия (FAB L3 подтип), при когото клинически беше наблюдавана лекарствена резистентност и имунологично беше доказано високо ниво на експресия на Р-гликопротеин. Като отрицателна контрола бяха използвани РНК от здрави кръводарители. Продуктите на реакцията бяха анализирани чрез електрофореза в 3% агарозен гел (Sigma), оцветен с етидиев бромид, и визуализирани с ултравиолетова светлина. Нормална експресия на MDR1 (MDR-отрицателни проби) беше отчетена при всички проби, при които беше наблюдаван само един видимо отчетлив „банд“, съответстващ на  $\beta_2$ -микроглобулинова РНК. Свръхекспресия на MDR1 (MDR1-положителни проби) беше отчетена при всички проби, при които беше наблюдаван видимо отчетлив продукт на MDR1 с интензивност по-ниска, еквивалентна или по-висока от тази на  $\beta_2$ -микроглобулинова РНК.

#### **8. Изследване наличието на FLT3-ITD посредством PCR**

Изследване наличието на FLT3-ITD беше осъществено съгласно протокола, предложен от Nakaо et al, 1996. Пет микролитра кДНК бяха подложени на амплификация в 25  $\mu$ l реакционна среда, която съдържаше: 1 x PCR буфер; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,8 U Taq полимераза (ABgene, Epsom, UK); 200  $\mu$ M от всяко dNTP (Promega) и по 0.4 pM от следните праймери: R5, 5'-TGTCGAGCAGTACTCTAAACA-3' и R6, 5'-ATC-CTAGTACCTTCCCAAACTC-3'. PCR-реакцията беше проведена в термосайкълър Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) при следните температурни режими: [1] Начална денатурация в продължение на 5 минути при 94°C, [2] 37 цикъла на амплификация: денатурация

при 94°C в продължение на 60 секунди; хибридизация при 59°C в продължение на 60 секунди; екстензия при 72°C в продължение на 60 секунди и [3] Финална екстензия: 72°C в продължение на 10 минути. Продуктите на реакцията бяха анализирани чрез електрофореза в 2.5% агарозен гел (Amresco, Solon, OH, USA), оцветен с етидиев бромид, и визуализирани с ултравиолетова светлина.

**ИМУНОБЛОТ** – за провеждане на имуноблота бяха осъществени следните процедури:

### ***1. Замразяване на клетъчни проби***

След изолиране на мононуклеарни клетки и определяне на клетъчната им гъстота, от всяка проба се взема обем, съдържащ  $2-4 \times 10^6$  клетки и се прехвърля в отделна центрофужна епруветка. Клетките се центрофугират 5 мин. при стайна температура при  $600 \times g$  (3 000 об./мин с ротор F-45-12-11). Надстоящата течност се отстранява с вакуум-помпа и клетките се ресуспендират в стерилен фосфатен буфер, като се спазва следното правило:  $2 \times 10^6$  клетки се суспендират в 2 мл фосфатен буфер. Епруветките отново се центрофугират 5 минути при  $600 \times g$  (3 000 об./мин с ротор F-45-12-11), като надстоящата течност отново се отстранява с вакуум-помпа. Клетъчните пелети се замразяват веднага в течен азот ( $-180^\circ\text{C}$ ) с цел бързо замразяване. Замразените проби се съхраняват във фризер при  $-80^\circ\text{C}$  до момента на употреба.

### ***2. Лизиране и денатуриране на клетъчните проби***

При фракциониране на протеини чрез денатурационната електрофореза в полиакриламиден гел (SDS-PAGE) скоростта на придвижване на протеините зависи от молекулната им маса, тъй като тя е линейна функция на дължината на полипептидната верига. За тази цел протеините трябва да бъдат предварително денатурирани и редуцирани до гъвкави нишки с равномерно разпределен отрицателен заряд на единица дължина. Това се постига чрез предварителна обработка на изследваните клетъчни проби с лизиращ разтвор, който съдържа денатуриращи и редуциращи агенти. Натриевият додецилсулфат (SDS) е анионно повърхностно активно вещество (ПАВ), което разрушава водородните връзки, пречи на хидрофобните взаимодействия и така денатурира в значителна степен третичната и вторичната белтъчна структура, което води до намаляване на

разликите в молекулната форма на отделните протеини. Освен това натриевият додецилсулфат маскира разликите между изоелектричните точки на отделните белтъци, като им придава силен отрицателен заряд, чиято стойност не зависи от аминокиселинния състав на белтъчната молекула, а само от дължината ѝ. Белтъците могат да бъдат напълно денатурирани чрез прилагане на редуциращ агент, например дитиотрейтол (DTT) или меркаптоетанол, който разрушава всички дисулфидни връзки. Преди лизиране пробите се суспендират в подходящ за целта буфер и след това се лизират в еквивалентно количество лизиращ буфер.

Обработката на клетъчни проби за фракциониране в SDS-PAGE беше извършена по следния начин:

Приготвят се суспензионен и лизиращ буфер. Термостат с вибрационна платформа или PCR-машина за 1.5 милилитрови епруветки тип "Eppendorf" се загрява до 99°C. Върху лед се размразяват аликвотни проби с разтвори на протеазните инхибитори: Aprotinin, PMSF, леупептин и натриев ванадат или се използва готова смес от такива (Complete), която се разтваря и порционира.

Пробите се обработват една по една, като се изважда само пробата, която ще се лизира в момента. Все още замръзналата проба се ресуспендира в суспензионния буфер. Към суспендираната проба се добавя еквивалентно количество лизиращ буфер, предварително обогатен с протеазни инхибитори и DTT. Съдържанието на пробата се хомогенизира добре с пипета и пробата се поставя за инкубиране при 99°C в термостат с вибрационна платформа, програмирана за 1000 оборота/мин. или на загрятата платформа на PCR-машина. Пробите се оставят на високата температура за 10-15 минути.

След това пробите се поставят веднага в лед, за да се предотврати ренатурирането на белтъците, което може да се случи при бавно охлаждане. Така приготвените проби могат да се подложат веднага на денатурираща белтъчна гел-електрофореза или да се съхраняват в хладилник при 4°C (но не повече от 2 месеца).

### ***3. Подготовка на протеиновите проби за гел-електрофореза в полиакриламиден гел***

Преди да се нанесат, лизатите се обработват допълнително със специален буфер за нанасяне (Loading Buffer, LB), който съдържа синьо багрило (бром-

фенолово синьо) за визуализиране на пробите и глицерин за повишаване на плътността им. Обикновено за фракциониране се нанасят проби, които съдържат между 30 и 50  $\mu\text{g}$  протеини или съответстват на 250 000 лизирани клетки. Молекулната маса на протеините след фракциониране се сравнява с тази на готов протеинов маркер, съдържащ смес от, оцветени в различен цвят, протеини с известна молекулна маса.

#### **4. Подготовка на електрофорезната камера**

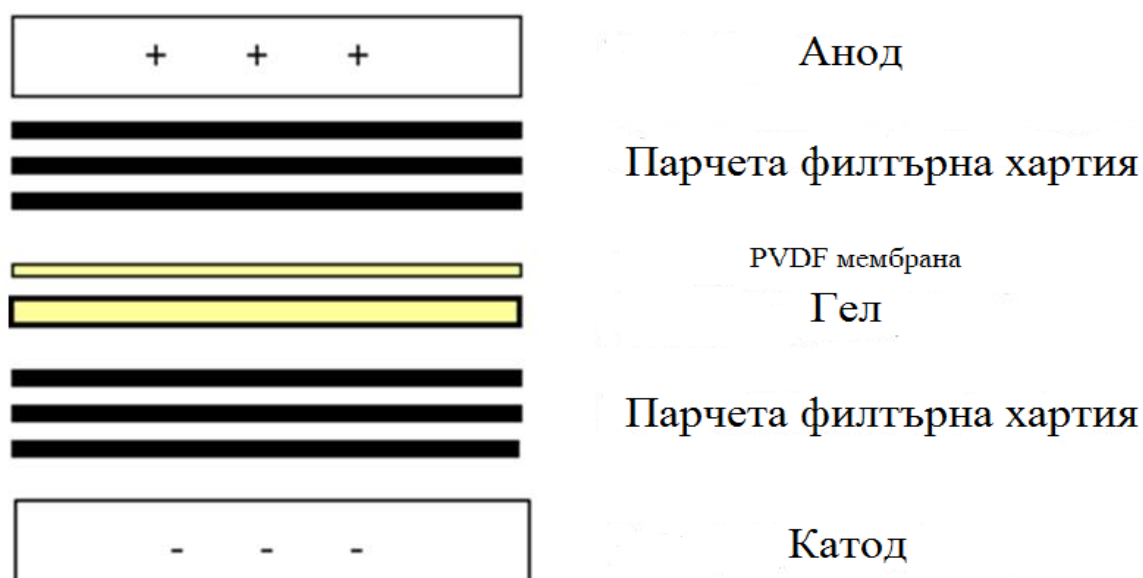
Електрофорезната камера се приготвя за предстоящата електрофореза по време на центрофугирането на лизатите. Това става по следния начин:

Геловите се монтират в електрофорезната камера. Горният и долният резервоари на електрофорезната камера се пълнят с  $1\times$  електрофорезен буфер. Ако търсеният протеин е с молекулна маса над 30-40 kDa, се предпочита MOPS-съдържащият електрофорезен буфер. В противен случай се предпочита MES-съдържащият електрофорезен буфер. Гребените се изваждат внимателно и джобовете на геловите се изплакват с електрофорезен буфер с помощта на спринцовка и подходящо за целта връхче. От всяка лизирана и денатурирана клетъчна проба се взема количество, съдържащо 30  $\mu\text{g}$  общ белтък, и се поставя в отделна епруветка. Към него се добавя три пъти по-малък обем буфер за нанасяне на пробите. Така приготвените проби се пренасят без остатък в съответните джобове на гела, като се използва пипета с подходящо за целта връхче. В един джоб на всеки гел се нанасят 7,5  $\mu\text{l}$  маркер за определяне на молекулната маса на протеините. Ако между отделните проби остане свободен джоб, той се натоварва с буфер за нанасяне на пробите, за да не се отклонят встрани протеините от съседните проби. Поставя се капакът на камерата и тя се свързва с охлаждащата система (ако използваният тип камера е предназначен за работа с такава) и с трансформатора. Разделянето на протеините се осъществява при 200V, за 35-50 мин.

#### **5. Електротрансфер на протеините от гела върху PVDF-мембрана**

След приключване на електрофорезата геловите се изваждат от камерата. Пластмасовите рамки на геловите се отварят – за целта може да се използва скалпел или тънка шпатула, която се промушва в процепа между двете пластмасови плочки.

Частта от геловите покрай джобовете се изрязва внимателно със скалпел под права линия и се изхвърля. Геловите се промиват 30 минути с трансферен буфер. За всеки гел се изрязва PVDF-мембрана с размерите на гела (обичайно 8 на 6,5 cm). Мембраните се активират 1-2 секунди в метанол, промиват се 2 минути в дестилирана вода и се накисват 15 минути в трансферен буфер. За всеки гел се изрязват 13 парчета филтърна хартия Whatman с размерите на гела (обичайно 8 на 6,5 cm). Филтърните хартии се напояват с трансферен буфер. Филтърните хартии, мембраните и геловите се нареждат в хоризонтална блот-камера, както е показано на фиг. 5. При подреждането се внимава да не останат въздушни мехури между слоевете, защото иначе се нарушава трансферът. Трансферът се провежда или за 1,5 часа при  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  и стайна температура, или за една нощ при  $0,4 \text{ mA/cm}^2$  и  $4^\circ\text{C}$ .



*Фиг. 5 Схема на постановката за електротрансфер*

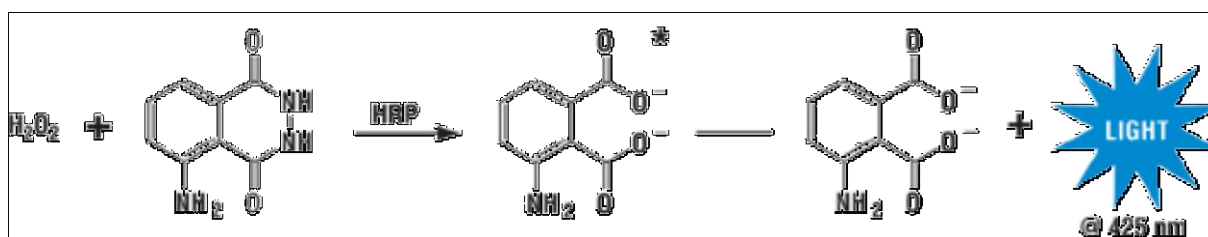
#### **6. Имунологична обработка на мембраните**

Всяка мембрана се слага в отделен съд и се залива с 10-15 ml блокиращ разтвор. Мембраните се разклащат с разтвора в продължение на 1 час при стайна температура. Първичните антитела се разреждат в маркиращия разтвор в съотношение от 1:200 до 1:1000 в зависимост от указанията на производителя или в резултат на оптимизация с предварителни експерименти. Всяка мембрана се залива

с 6-10 ml разреден разтвор на избраното първично антитяло. Мембраните се разклащат с разтвора в продължение на 2 часа при стайна температура или за една нощ при 4°C. Мембраните се промиват последователно 4 пъти по 5 минути с миещ разтвор. Съответните вторични антители се разреждат с маркиращ разтвор – антимишето в съотношение 1:3000, а антикозето и антизаешкото в съотношение 1:5000. Всяка мембрана се залива с 6-10 ml разреден разтвор на съответното вторично антитяло. Мембраните се разклащат с разтвора в продължение на 45 мин. при стайна температура. Мембраните се промиват последователно 4 пъти по 5 минути с миещ разтвор. Мембраните за кратко се изплакват с дестилирана вода.

#### 7. *Визуализиране на комплексите антиген-антитяло*

Веднага след последното изплакване всяка мембрана се обработва 1 минута с 1,5 ml хемилуминесцентен реактив, приготвен непосредствено преди това. Под действие на пероксидазата от хрян, конюгиран към вторичното антитяло, започва да протича следната реакция:



Мембраните се поставят за кратко с обратната си страна върху попивателна хартия, за да се отстрани излишното количество хемилуминесцентен реактив. Мембраните се опаковат в полипропиленово фолио и се поставят в рентгенови касети, като се закрепват стабилно с помощта на лепенки. В тъмна стая върху мембраните се поставя фотографски филм и касетите се затварят плътно. Изчаква се известно време (от 2 секунди до 1 час в зависимост от видимия интензитет на луминесценцията), касетата се отваря и филмът се проявява. Ако се окаже, че филмът е преекспониран или недостатъчно експониран, се прави втора снимка, като времето на експозиция съответно се намалява или увеличава. Филмите се сканират и се архивират в електронен вид. Интензитетите на отделните бандове и съответно относителните нива на протеините в пробите се определят денситометрично чрез програмата Quantity One. За всяка проба се изчисляват съотношенията между денситометрично определените интензитети на бандовете на

търсените про-теини и съответния интензитет за контролния протеин за групата от проби (най-често  $\beta$ -актин). В повечето случаи е практически тези съотношения в една от пробите (контролната) да се приемат за единици и останалите да се приравнят спрямо тях. Така се вижда колко пъти по-високи или по-ниски са нивата на търсените протеини в пробите в сравнение с контролата.

#### **8. *Отстраняване на антителата от мембраните (стрипиране)***

Стрипиране на мембраните се прави, когато се иска мембрана, маркирана с антитяло срещу един протеин, да се използва за определяне на друг протеин със съответно друго антитяло.

Приготвя се стрипиращ разтвор. Разпределя се по 25 ml в 50-милилитрови епруветки, според броя на мембраните. Разтворът се загрява до 56°C. Във всяка епруветка се поставя по една мембрана. Лицевата страна на мембраната трябва да е обърната към вътрешността на епруветката, за да е в контакт с разтвора, а не със стената на епруветката. Епруветките се разклащат с въртеливо движение около надлъжната им ос, при 56°C в продължение на 30 мин. За целта се използва клатачна машина със съответните характеристики. Мембраните се промиват последователно 2 пъти по 5 минути с миеш разтвор.

#### **9. *Изследване експресията на wt1 посредством имуноблот***

За получаване на лизати от цели клетки клетъчните пелети, съдържащи  $2 \times 10^6$  клетки, бяха ресуспендирани в буфер [0.1 M NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH=8.0), 0.001 M EDTA (pH= 8.0), 25% (v/v) глицерол, 10% (v/v) бета-меркаптоетанол, 1 mM фенилметилсулфонил флуорид, 50  $\mu$ g/ml апротинин, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , и 2 mg/ml леупептидин]. След като бяха поставени на вортех, беше добавен SDS буфер за нанасяне (loading buffer) и клетъчните пелети бяха отново поставени на вортекс. Пробите бяха варени в продължение на 5 минути на 100°C и центрофугирани със скорост 13 000 rpm (13 600 g) в продължение на 10 минути на стайна температура. Пробите, в които се съдържаха 300 000 клетки бяха нанесени, върху 12% SDS полиакриламиден гел, подложени на електрофореза и прехвърлени върху поливинилидендифлуоридна мембрана. Мембраната беше обработена с 5% (w/v) обезмаслено мляко и инкубирана с първично мише моноклонално антитяло WT1 (F-6): sc-7385, разрежено (1:400) в маркиращия разтвор [1 X PBS, 0.5% (w/v)

обезмаслено мляко и 0.5% (v/v) Тритон X-100] в продължение на 2 часа върху машина с подвижна платформа. След това тя беше промита четирикратно с миеш разтвор [1% (w/v) обезмаслено мляко и 1% (v/v) Тритон X-100], като впоследствие бяха добавени и HRP-конюгирани вторични антитела: (козе антимише антитяло IgG-HRP: sc-2005 и козе антизаешко антитяло IgG-HRP: sc-2004), разредени (1:2000) в маркиращия разтвор и инкубирани в продължение на 45 минути върху машина с подвижна платформа. Имуноблотът беше обработен с помощта на хемилуминисцентен разтвор и впоследствие проявен върху рентгенови снимки. Всички антитела и хемилуминисцентни реактиви бяха закупени от Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

Силата на реакцията беше полуколичествено характеризирана въз основа на интензивността на видимия банд: (-) отрицателна реакция, липса на видим банд – липсваща експресия; (+) слабо до умерено видим банд, по-слаб по интензивност от банда на положителната контрола – ниска експресия; (++) силно или много силно видим банд, сходен или по-силен по интензивност от банда на положителната контрола – висока експресия.

Установено е, че концентрацията на wt1 в пробите на пациенти със силна експресия на белтъка е 1-2 log<sub>10</sub> по-висока в сравнение с пробите на болни, при които се установява липсваща или слаба експресия на протеина (Karakas et al, 2002).

Затова при провеждане на статистическия анализ на данните пациентите с ОМЛ бяха разделени на две групи: с липсваща или слаба експресия на wt1 (wt1-отрицателни пациенти) и със силна експресия на wt1 (wt1-положителни пациенти).

#### **10. Изследване експресията на NF-κB посредством имуноблот**

За получаване на лизати от цели клетки клетъчните пелети, съдържащи  $2 \times 10^6$  клетки, бяха ресуспендирани в буфер [0.1 M NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH=8.0), 0.001 M EDTA (pH= 8.0), 25% (v/v) глицерол, 10% (v/v) бета-меркаптоетанол, 1 mM фенолметилсулфонил флуорид, 50 μg/ml аprotинин, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, и 2 mg/ml леупептидин]. След като бяха поставени на вортех, беше добавен SDS буфер за нанасяне и клетъчните пелети бяха отново поставени на вортекс. Пробите бяха варени в продължение на 5 минути на 100°C и центрофугирани със скорост 13 000 rpm (13 600 g) в продължение на 10 минути на стайна температура. Клетъчните

лизати, в които се съдържаха 300 000 клетки, бяха нанесени върху 12% SDS полиакриламиден гел, подложени на електрофореза и прехвърлени върху поливинилидендифлуоридна мембрана. Мембраната беше обработена с 5% (w/v) обезмаслено мляко и инкубирана с първично заешко поликлонално антитяло NFκB p65 (C-20): sc-372, разредено (1:400) в маркиращия разтвор [1 X PBS, 0.5% (w/v) обезмаслено мляко и 0.5% (v/v) Тритон X-100] в продължение на 2 часа върху машина с подвижна платформа. След това, тя беше промита четирикратно с миеш разтвор [1% (w/v) обезмаслено мляко и 1% (v/v) Тритон X-100], като впоследствие бяха добавени и HRP-конюгирани вторични антитела: (козе антимише антитяло IgG-HRP: sc-2005 и козе антизаешко антитяло IgG-HRP: sc-2004), разредени (1:2000) в маркиращия разтвор и инкубирани в продължение на 45 минути върху машина с подвижна платформа. Имуноблотът беше обработен с помощта на хемилуминисцентен разтвор и впоследствие проявен върху рентгенови снимки. Всички антитела и хемилуминисцентни реактиви бяха закупени от Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

### ***Статистически методи***

Статистическият анализ на данните бе осъществен посредством готов статистически програмен пакет SPSS v 16.0 (for Windows). За сравнение на разпределението на дискретните клинични и биологични характеристики на изследваните подгрупи болни беше използван Fisher's exact test. За сравнение на разпределението на непрекъснати величини между две групи болни беше приложен непараметричен анализ по метода на Mann Whitney's U test, а при повече от две групи за сравнение беше прилаган тестът Kruskal Wallis. Общата преживяемост (OS) беше изчислена от датата на поставяне на диагнозата до датата на настъпване на смъртта. Преживяемостта, свободна от заболяване (DFS), беше изчислена от датата на постигане на пълна ремисия до датата на регистриран рецидив или датата на настъпване на летален изход. Продължителността на OS и DFS бяха анализирани посредством метода на Kaplan-Meier, като различията между отделните групи пациенти статистически бяха оценени чрез log rank теста. За ниво на статистическа значимост бе приета p-value <0,05.

## IV. РЕЗУЛТАТИ

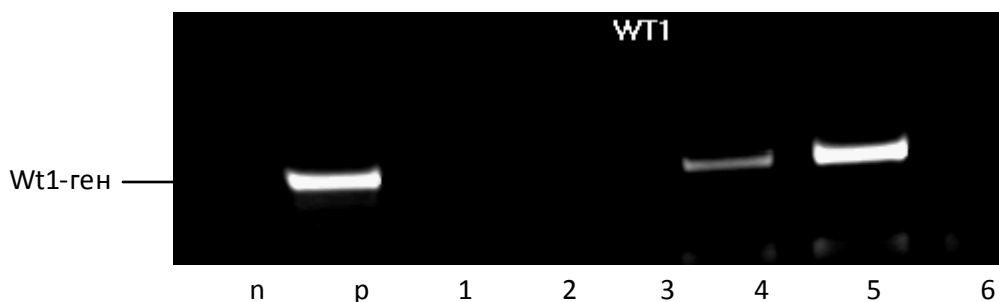
### Експресия на WT1 mRNA и wt1 при пациенти с ОМЛ

#### **1. Експресия на wt1 и WT1 при здрави индивиди и пациенти с нехематологични заболявания**

При изследване експресията на WT1 и wt1 посредством съответно RT-PCR и WB, в периферната кръв на десет здрави кръводарителя не беше установено наличие на този молекулярен маркер. В четирите проби от костен мозък на пациенти с нехематологични заболявания, изследвани посредством WB, не беше наблюдавана експресия на wt1. В три от пробите на тези болни, изследвани посредством RT-PCR, не беше регистрирана експресия на WT1, докато при четвъртата - беше наблюдавана много ниска експресия на транскрипционния фактор.

#### **2. Експресия на WT1 при пациенти с ОМЛ към момента на диагнозата, установена посредством RT-PCR**

При 81 пациенти с de novo ОМЛ беше изследвана експресията на WT1 посредством RT-PCR – фиг. 6.

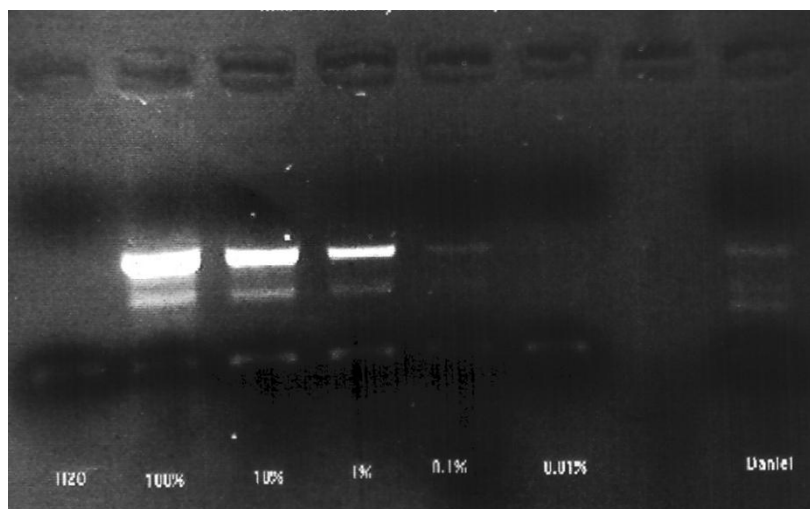


n – отрицателна контрола, p – положителна контрола (клетъчна линия K562), проба 5 – силно положителна, проба 4 – слабо положителна, проби 1, 2, 3 и 6 – отрицателни

**Фиг. 6 Експресия на WT1, установена посредством RT-PCR.**

Анализът на серийни разреждания на клетъчна линия K562 установи чувствителност на реакцията от  $10^{-3}$  (фиг. 7). Видим банд се долавя при 1000-кратно разреждане на клетъчната линия K562.

RT-PCR позволи идентифициране на отчетлив сигнал от амплификацията на WT1 и РНК при общо 72,8% (59/81) от изследваните пациенти и липса на амплификация при съответно 27,2% (22/81). В допълнение, резултатите ясно демонстрираха хетерогенност на установения сигнал. Направена беше полуколичествена оценка на продукта при отделните болни, които в зависимост от възприетите критерии за оценка бяха разпределени в следните групи: болни с висока експресия 45,7% (37/81); болни с ниска експресия 27,16% (22/81) и 27,16% (22/81) – пациенти, не експресиращи РНК.

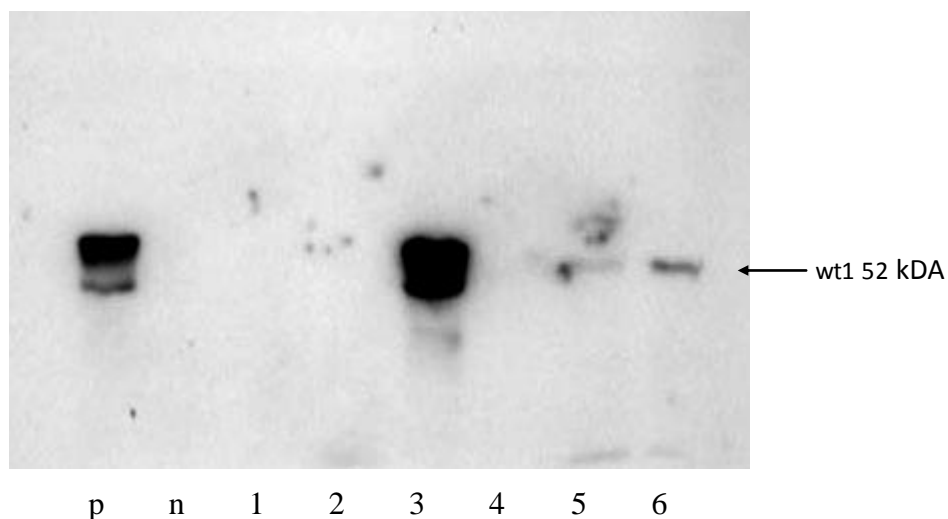


**Фиг. 7 Чувствителност на WT1- специфичната RT-PCR**

Чувствителността на реакцията беше определена посредством серийни разреждания на клетъчна линия K562. Видим банд се долавя при 1000-кратно разреждане на клетъчната линия.

### **3. Експресия на wt1 при пациенти с ОМЛ към момента на диагнозата, установена посредством WB**

При общо 42 от включените в проучването пациенти беше изследвана и експресията на wt1 към момента на поставяне на диагнозата посредством WB – фиг. 8.



p – положителна контрола (клетъчна линия K562), n – негативна контрола (клетъчна линия U937), проби 1, 2, 4 – отрицателни, проба 3 – силно положителна (++/+++), проби 5 и 6 – слабо положителни (+)

**Фиг. 8** Експресия на wt1-протеин, установена посредством WB.

Отчетлива експресия на wt1 беше установена при 50% (21/42) от пациентите, като силна експресия на белтъка беше регистрирана при общо 28,6% (12/42), а при 21 болни изследването показва липса на белтък.

Сравнителният анализ показва много добра корелация (Pearson chi-square,  $p < 0,001$ ) между резултатите на mRNA и протеиново ниво, получени съответно чрез RT-PCR и WB. Данните от сравнителния анализ са представени в табл. 4.

**Табл. 4** Сравнителен анализ между степента на експресия на WT1 и wt1 – белтъка, изследвани съответно чрез RT-PCR и WB.

		Протеин (WB)			Общо
		wt1 ++	wt1 +	wt1-	
Ген/РНК	WT1++	12	5	1	18
	WT1+	0	4	9	13
	WT1-	0	0	11	11
	Общо	12	9	21	<b>Chi square p &lt; 0,001</b>

**Корелация на експресията на WT1 mRNA с основни клинично-лабораторни показатели при пациенти с ОМЛ**

***1. Експресия WT1 в корелация с основни характеристики на пациентите с de novo ОМЛ***

Този сравнителен анализ има за цел изясняване на някои възможни особености в биологичното разнообразие на ОМЛ и произтичащите от това насоки в цялостното клинично поведение. Табл. 5 съдържа основни клинично-лабораторни параметри при новооткрити и нелекувани болни, в зависимост от експресията на WT1, оценена посредством RT-PCR.

Статистическият анализ на данните показва, че пациенти, чиито левкемични бласти са морфологично диференцирани (ОМЛ-M2 и ОМЛ-M5) експресират WT1 значително по-рядко в сравнение с останалите болни (Pearson chi-square,  $p=0,046$ ). Беше установена статистически достоверна разлика в нивото на WT1 между пациенти, страдащи от de novo ОМЛ с рекурентни генетични аномалии и останалите болни (Fisher's exact test,  $p=0,036$ ).

**Табл. 5** *Експресията на WT1 при пациенти с ОМЛ според пола и възрастта на пациентите, FAB и СЗО подтипа на заболяването*

	WT1 (+) пациенти	%	Статистическа значимост (p)
Общ брой пациенти	59/81	72,8	
Възраст (n=81)			
< 60 години	43/59	72,9	
≥ 60 години	16/22	72,2	1,0*
Пол (n=81)			
Мъже	38/50	76	
Жени	21/31	67,7	0,450 <sup>#</sup>
FAB подтип (n=89)			
M <sub>0</sub>	1/2	50	
M <sub>1</sub>	16/20	80	
M <sub>2</sub>	8/13	61,5	
M <sub>4</sub>	16/19	84,2	
M <sub>5</sub>	10/17	58,8	
M <sub>6</sub>	1/1	100	
Неустановен подтип	7/9	77,8	0,046 <sup>##</sup>
СЗО <sup>^</sup> подтип (n=81)			
ОМЛ с рекурентни генетични аномалии	6/13	46,1	
ОМЛ с МДС промени	11/13	84,6	
ОМЛ, некласифицируема другаде	42/55	76,4	0,036 <sup>^^</sup>

\*Не се открива значима разлика в Експресията на WT1 в зависимост от възрастта на пациентите (Fisher's exact test, p=1,0).

<sup>#</sup> Не се установява значима разлика в Експресията на WT1 в зависимост от пола на пациентите с ОМЛ (Fisher's exact test, p=0,450).

<sup>##</sup> При пациенти, страдащи от ОМЛ-M<sub>2</sub> и ОМЛ-M<sub>5</sub>, се установява значително по-рядко експресия на WT1 в сравнение с останалите болни (Pearson chi-square, p=0,046).

<sup>^^</sup> Установява се статистически достоверна разлика в експресията на WT1 между пациенти, страдащи от ОМЛ с рекурентни генетични аномалии, и останалите болни (Fisher's exact test, p=0,036).

Високата експресия на WT1 също беше установена значително по-рядко при пациенти de novo ОМЛ и рекурентни генетични аномалии в сравнение с останалите болни (Fisher's exact test, p=0,004) - табл. 6.

**Табл. 6 Висока експресия на WT1 при пациенти с ОМЛ според СЗО подтипа**

СЗО <sup>^</sup> подтип (n=81)	WT1 (+) пациенти*	%	Статистическа значимост (p)
ОМЛ с рекурентни генетични аномалии	1/13	7,7	
ОМЛ с МДС промени	7/13	53,8	
ОМЛ, неклассифицируема другаде	29/55	52,7	0,004 <sup>^</sup>

\*WT1 (+) пациенти: пациенти с висока експресия на WT1

<sup>^</sup> При пациенти с ОМЛ и рекурентни генетични аномалии се установява значително по-рядко висока експресия на WT1 в сравнение с останалите болни (Fisher's exact test, p=0,004).

Не беше установена статистически значима разлика между експресията на WT1 и възрастта и пола на пациентите с de novo ОМЛ.

Анализът на основните лабораторни показатели в зависимост от WT1-статуса не показва статистически значими корелации между експресията на молекулярния маркер и изследваните лабораторни показатели, като левкоцитен и тромбоцитен брой, ниво на хемоглобин, концентрация на ЛДХ, бластна инфилтрация на костния мозък и периферната кръв.

При пациенти с висока експресия на WT1, беше установено статистически достоверно по-висок тромбоцитен брой (p=0,031) и по-висок % бласти в периферната кръв (p=0,031) и костния мозък (p=0,053) към момента на поставяне на диагнозата в сравнение с пациентите с ниска или липсваща експресия на молекулярния маркер – табл. 7.

**Табл. 7 Стойности на лабораторните показатели в зависимост от високата експресия на WT1 при пациенти с ОМЛ**

Лабораторен показател	WT1(+) пациенти*	WT1(-) пациенти <sup>^</sup>	Статистическа значимост (p)
<b>Брой левкоцити (10<sup>9</sup>/L) (n=79)</b>			
Медиана	46,3	22,2	0,166
Обхват	1,6-298	0,95-211	
<b>Ниво на хемоглобин (g/L) (n=79)</b>			
Медиана	93	90,5	0,559
Обхват	49-145	50-157	
<b>Брой тромбоцити (10<sup>9</sup>/L) (n=78)</b>			
Медиана	68,5	40	0,031 <sup>#</sup>
Обхват	9-313	5-177	
<b>ЛДХ (Е/л) (n=77)</b>			
Медиана	1128	911	0,348
Обхват	140-4033	166-6945	
<b>% бласти в костен мозък (n=75)</b>			
Медиана	89	82,5	0,053 <sup>^^</sup>
Обхват	35-100	25,5-100	
<b>% бласти в периферна кръв (n=78)</b>			
Медиана	69	52,5	0,031 <sup>##</sup>
Обхват	10-100	0-90	

\* WT1(+) пациенти – пациенти с висока експресия на WT1

<sup>^</sup>WT1(-) пациенти – пациенти с ниска или липсваща експресия на WT1

<sup>#</sup> При WT1(+) пациенти се наблюдава достоверно по-висок тромбоцитен брой в сравнение с WT1(-) болни (p=0,031).

<sup>##</sup> При WT1(+) пациенти се наблюдава достоверно по-висока бластна инфилтрация в периферната кръв в сравнение с WT1(-) болни (p=0,031).

<sup>^^</sup> При WT1(+) пациенти се наблюдава тенденция към по-висока бластна инфилтрация в костния мозък в сравнение с WT1(-) болни (p=0,053).

## **2. Корелация между експресията на WT1 и основни цитогенетични/молекулярни характеристики на пациентите с ОМЛ**

Анализирана беше експресията на WT1 в зависимост от цитогенетичния/молекулярния риск при болните с de novo ОМЛ. Успешна кариотипизация беше осъществена при 75,3% (61/81) от тях. Анализът показа, че

при пациенти с цитогенетични или молекулярни аномалии, свързани с нисък риск, достоверно по-рядко се наблюдава експресия на WT1 в сравнение с тези, свързани с интермедиерен или висок риск (Fisher's exact test,  $p=0,024$ ) - табл. 8.

**Табл. 8 Експресия на WT1 в зависимост от цитогенетичния риск на пациенти с ОМЛ**

Цитогенетичен/молекулярен риск	WT1(+) пациенти	%	Статистическа значимост (p)
Нисък	4/11	36,4	
Интермедиерен	35/45	77,8	0,012 <sup>#</sup>
Висок	9/10	90	0,023 <sup>#</sup>
Неустановен (непроведен анализ или липса на годни за анализ метафазни пластини)	11/15	73,3	

<sup>#</sup> При пациенти с нисък цитогенетичен/молекулярен риск се установява статистически достоверно по-рядко експресия на WT1 в сравнение с болните с интермедиерен цитогенетичен/молекулярен риск (Fisher's exact test,  $p=0,012$ ) и висок цитогенетичен/молекулярен риск (Fisher's exact test,  $p=0,023$ ).

Анализът на данни показва, че високата експресия на WT1 се наблюдава значително по-рядко при пациентите с цитогенетични/молекулярни аномалии, свързани с нисък риск, отколкото при болни с интермедиерен (Fisher's exact test,  $p=0,0015$ ) и висок цитогенетичен риск (Fisher's exact test,  $p=0,0010$ ).

### **3. Корелация между експресията на WT1 и основни имунофенотипни характеристики на бластната популация при пациенти с de novo ОМЛ**

Фенотипът на бластната популация беше изследван при 75 болни с de novo ОМЛ (табл. 9). Не бяха наблюдавани корелации между експресията на WT1 и изследваните имунологични маркери (CD7, CD33, CD34, CD56, HLA-DR, CD117 и CD14).

**Табл. 9 WT1-експресия в зависимост от имунологичния маркер на бластната популация при пациенти с ОМЛ**

Имунологичен маркер	WT1(+) пациенти %	WT1(-) пациенти %	Статистическа значимост (p)
CD34 (n=73)	37,5	57,5	0,103
CD33 (n=74)	92,7	96,9	0,624
CD56 (n=65)	36,1	41,4	0,798
HLA-DR (n=70)	87,2	93,5	0,452
CD117 (n=72)	77,5	81,2	0,776
CD 14 (n=66)	13,5	34,4	0,074
CD 7 (n=66)	27	24,1	1,0

Беше проведено изследване на експресията на WT1 при пациенти с de novo ОМЛ и нормален фенотип и при болни с линейно-кръстосана или асинхронна антигенна експресия под 60-годишна възраст (табл. 10 и табл. 11).

**Табл. 10 WT1-експресия при пациенти с ОМЛ под 60-годишна възраст с нормален фенотип спрямо болни с линейно-кръстосана антигенна експресия**

	WT1(+) пациенти %	WT1(-) пациенти %	Статистическа значимост (p)
<b>Пациенти с линейно-кръстосана антигенна експресия vs пациенти с нормален фенотип</b>			
CD4+CD33+CD34± vs CD4-CD33+CD34+	76,9	23,1	0,027 <sup>#</sup>
CD7+ CD33+CD34± vs CD7- CD33+CD34+	45,4	54,6	ns*
CD56+CD13±CD14±CD15±CD33+ vs CD56-CD13±CD14±CD15±CD33+	55	45	ns*

<sup>#</sup> При пациенти с линейно-кръстосана експресия на CD4 се установява статистически достоверно по-често висока експресия на WT1, в сравнение с пациентите с нормален фенотип (p=0,027).

\* статистически незначима стойност

Анализът на данни показва, че при пациенти с линейно-кръстосана експресия на CD4 се установява статистически достоверно по-често висока експресия на WT1, в сравнение с пациентите с нормален фенотип ( $p=0,027$ ).

**Табл. 11 WT1-експресия при пациенти под 60-годишна възраст с нормален фенотип спрямо болни с асинхронна антигенна експресия**

	WT1(+) пациенти %	WT1(-) пациенти %	Статистическа значимост (p)
<b>Пациенти с асинхронна антигенна експресия vs пациенти с нормален фенотип</b>			
<b>CD34+CD33+CD14+</b>	0	100	
<b>vs</b>			
<b>CD34+CD33+CD14-</b>	41,2	58,8	ns*
<b>CD34+CD33+CD15+</b>	14,3	85,7	
<b>vs</b>			
<b>CD34+CD33+CD15-</b>	57,1	42,9	0,044 <sup>#</sup>
<b>CD34+CD56+</b>	50	50	
<b>vs</b>			
<b>CD34+CD33+CD13+CD14±CD15±</b>	75	25	ns*

<sup>#</sup> При Пациенти с асинхронна експресия на CD15 се установява статистически достоверно по-рядко експресия на WT1, в сравнение с пациентите с нормален фенотип ( $p=0,044$ ).

\* статистически незначима стойност

Беше установено, че бластите на пациенти с de novo ОМЛ и асинхронна експресия на CD15 експресират значително по-рядко WT1, в сравнение с бластите на пациенти с нормален фенотип (Fisher's exact test,  $p=0,044$ ). Пациенти с асинхронна експресия на CD15 по-често експресираща маркери с нисък цитогенетичен/молекулярен риск (Fisher's exact test,  $p=0,020$ ).

Беше проведено изследване на експресията на WT1 в зависимост от фенотипа на бластната популация (млад vs зрял фенотип) при пациенти с de novo ОМЛ. Беше установена статистически достоверна корелация между експресията на WT1 и по-младия левкемичен фенотип на бластните клетки [88,9% (8/9) vs 27,3% (3/11); Fisher's exact test,  $p=0,010$ ). Данните са представени в табл. 12.

**Табл. 12 WT1-експресия в зависимост от фенотипа на бластна популация при пациенти с de novo ОМЛ**

Левкемичен фенотип	WT1(+) пациенти %	WT1(-) пациенти %	Статистическа значимост (p)
Зрял фенотип [CD15(+); CD 14(±); CD 16(±)]	27,3	72,7	
Млад фенотип [CD15(-); CD14(-); CD16(-)]	88,9	11,1	0,010*

\* Левкемични бласти, притежаващи млад фенотип, експресират достоверно по-често WT1 в сравнение с клетките с по-зрял фенотип (Fisher's exact test, p=0,010).

### **Експресия на ключови молекулярни маркери при пациенти с ОМЛ**

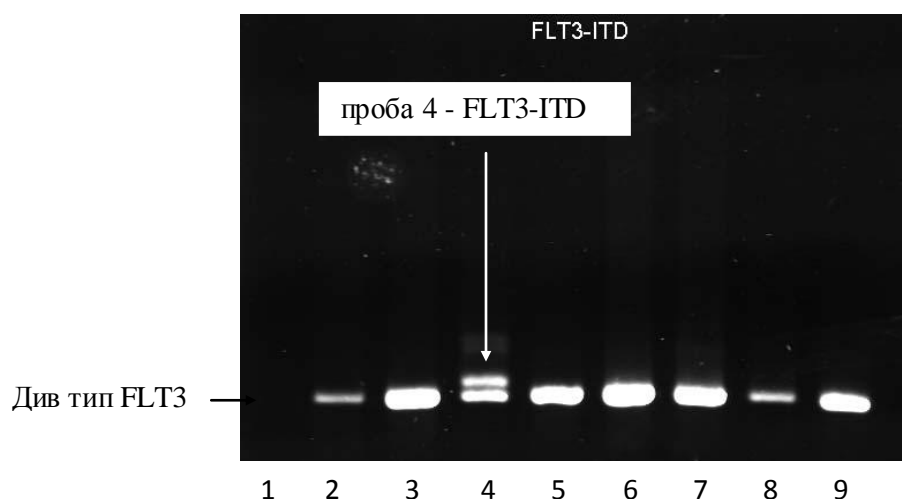
Този сравнителен анализ има за цел изясняване на някои възможни взаимодействия и зависимости между ключови гени, ангажирани в левкемогенезата и прогресията, които биха могли да обусловят определени особености в биологичното и клинично поведение на ОМЛ.

#### **1. Изследване на FLT3-ITD при пациенти с ОМЛ чрез RT-PCR**

Бяха изследвани пробите на 105 пациенти с de novo ОМЛ за наличието на FLT3-ITD. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 51 години (обхват 19-76 години), като 80,9% (85/105) от болните бяха под 60-годишна възраст.

Експресията на FLT3-ITD беше изследвана посредством RT-PCR (фиг. 9). Беше установено, че чувствителността на реакцията е  $10^{-2}$ . Наличието на този молекулярен маркер беше установено при 33,3% (35/105) от всички анализирани болни с de novo ОМЛ. Честотата на този маркер беше съответно 35,3% (30/85) и 25% (5/20) при пациенти под и над 60-годишна възраст.

Анализът показва, че наличието на FLT3-ITD се наблюдава статистически по-често при пациенти с нормален кариотип (50%; 24/47) в сравнение с останалите заболели (11,8%; 4/34) – Fisher's exact test, p=0,0003.



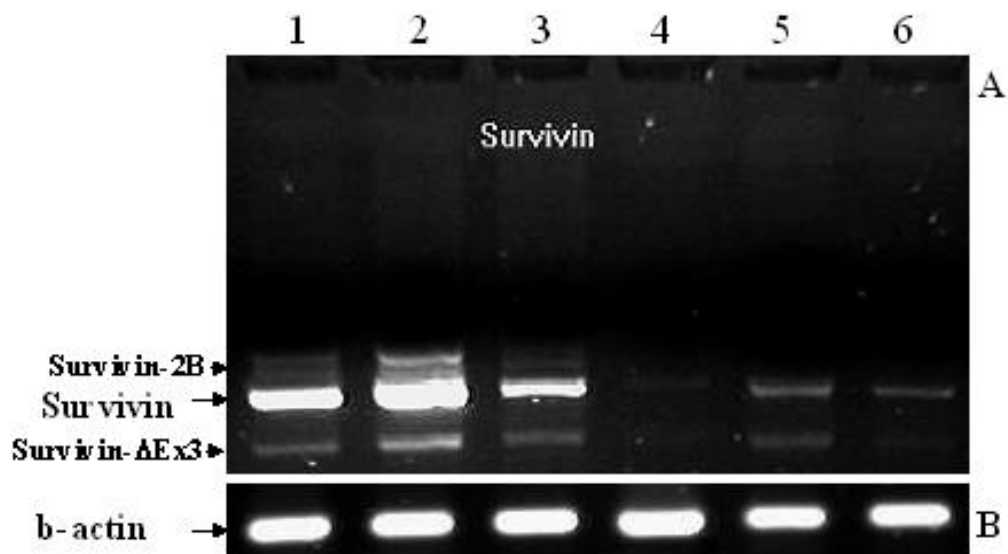
**Фиг. 9 RT-PCR амплификация на FLT3 и РНК при пациенти с ОМЛ.**

Получените фрагменти бяха анализирани чрез електрофореза в 2% агарозен гел, оцветен с етидиев бромид. Проба 1 представлява отрицателна контрола, докато проби 2-9 са получени от различни пациенти с ОМЛ. Високо-молекулярният банд в проба 4 представлява FLT3-ITD (мутирал ген FLT3). При същия болен беше установена и експресия на нормалния ген FLT3.

## **2. Изследване на експресията на сурвивин чрез RT-PCR при пациенти с ОМЛ**

Бяха изследвани пробите на 48 пациенти с de novo ОМЛ за експресия на сурвивин посредством RT-PCR. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 51 години (обхват 19-76 години), като 68,8% (33/48) от болните бяха под 60-годишна възраст.

Експресията на сурвивин и неговите сплайс варианти (2В и-ΔEx3) беше изследвана посредством RT-PCR (фиг. 10). Беше установено, че чувствителността на RT-PCR е  $10^{-3}$ . Като вътрешна контрола беше използвана амплификацията на β-актиновия ген.



**Фиг. 10 RT-PCR амплификация на сурвивин и неговите сплайс варианти (сурвивин-2В и сурвивин-ΔЕх3) при пациенти с ОМЛ.**

Получените фрагменти бяха анализирани чрез електрофореза в 2% агарозен гел, оцветен с етидиев бромид. Проби 1-3 представляват пациенти със свръхекспресия на гена, докато проби 5 и 6 представляват болни с нормална експресия на молекулярния маркер. Проба 4 е отрицателна.

RT-PCR позволи идентифициране на отчетлив сигнал от амплификацията на сурвивин и.РНК при общо 58,3% (28/48) от изследваните пациенти и липса на амплификация при съответно 41,7% (20/48). Резултатите от проведения молекулярен анализ демонстрираха хетерогенност на установения сигнал. Беше направена полуколичествена оценка на продукта при отделните болни, които в зависимост от въприетите критерии за оценка бяха разпределени в следните групи: болни с висока експресия 29,2% (14/48), болни с ниска експресия 29,2% (14/48) и болни с липсващ продукт на RT-PCR реакцията 41,7% (20/48). Като положителни бяха приети пробите на Пациентите, при които беше установена ниска или висока експресия на молекулярния маркер.

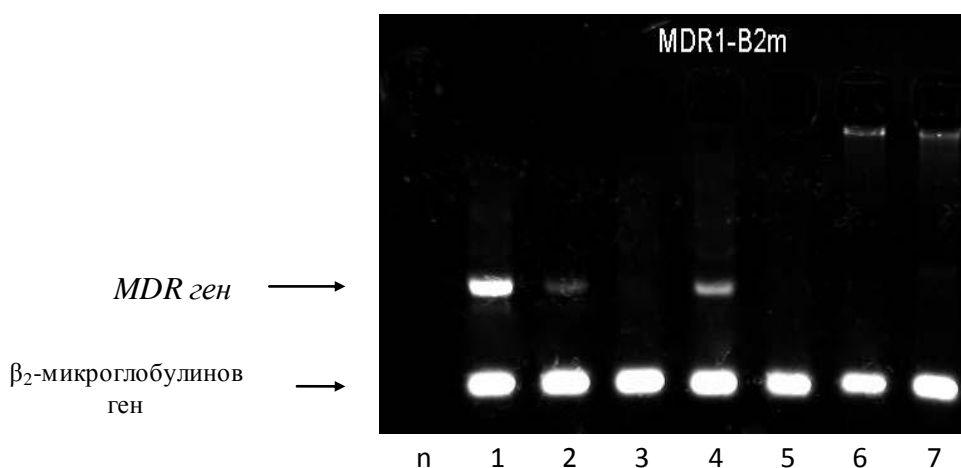
Честотата на установима експресия на сурвивин не показва значими различия в зависимост от възрастта, като свръхекспресията на гена беше установена при 57,6% (19/33) и 66% (9/15) при пациенти под- и над 60-годишна възраст.

### 3. Изследване на експресията на *MDR1* чрез *RT-PCR* при пациенти с *ОМЛ*

Изследвани бяха пробите на 39 пациенти с *de novo* ОМЛ за експресията на *MDR1*. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 52 години (обхват 27-72 години), като 76,9% (30/39) от болните бяха под 60-годишна възраст.

Експресията на *MDR1* беше изследвана посредством *RT-PCR* (фиг. 11). Като вътрешна контрола беше използвана амплификацията на  $\beta_2$ -микроглобулиновия ген.

В нашето проучване свръхекспресията на *MDR1* беше установена при 56,4% (22/39) от всички пациенти с *de novo* ОМЛ, без разлика във възрастта на изследваните пациенти - 56,7% (17/30) при пациенти под и 55,5% (5/9) при пациенти над 60-годишна възраст.



n-негативна контрола, проби 1, 2 и 4 – положителни, проби 3, 5, 6 и 7 – отрицателни

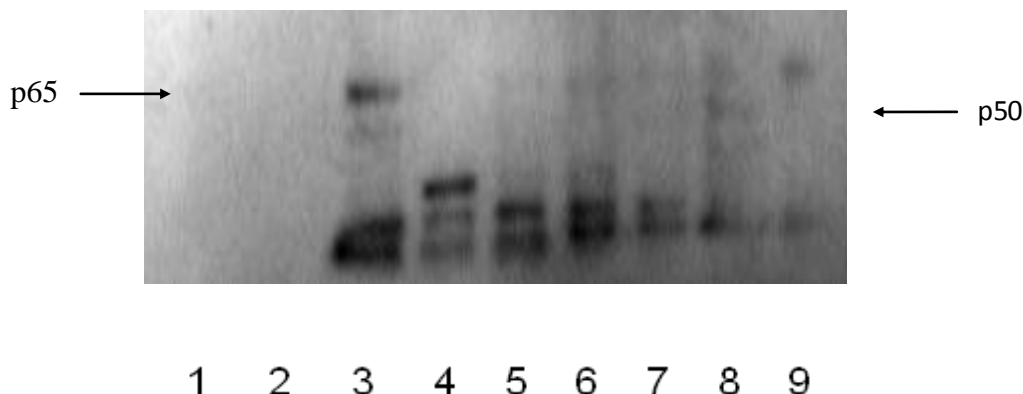
**Фиг. 11** Експресия на *MDR*-гена, установена посредством *RT-PCR*

### 4. Изследване на експресията на *NF-kB* протеин чрез *WB* при пациенти с *ОМЛ*

Изследвани бяха пробите на 25 пациенти с *de novo* ОМЛ за едновременната експресия на двата протеина. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 53 години (обхват 32-72 години), като 68% (17/25) от болните бяха под 60-годишна възраст.

Експресията на *NF-kB* беше изследвана посредством *WB* (фиг.12). Експресията на този маркер се установява при 52% (13/25) от всички пациенти. Честотата на

NF-kB беше съответно 52,9% (9/17) и 50% (4/8) при пациенти под и над 60-годишна възраст.



Проби 1 и 2 – отрицателни; 3, 4, 5 и 6 силно положителни (++/+++); 7, 8 и 9 слабо положителни (+).

**Фиг. 12 Установяване на експресията на NF-kB (p65 и p50) – субединици на NF-kB, посредством WB**

**Корелация на изследваните маркери с експресията на WT1 или wt1 при пациенти с ОМЛ към момента на поставяне на диагнозата**

На фиг. 13 са представени обобщени резултатите от изследванията за наличие на FLT3-ITD, определяне експресията на survivin и MDR1 посредством RT-PCR, представени в зависимост от експресията на WT1, оценена посредством RT-PCR.

На фиг. 14 е показана експресията на ключовия транскрипционен фактор NFkB, определена чрез WB, в зависимост от експресията на wt1.

**1. Корелация между наличието на FLT3-ITD и експресията на WT1**

Едновременната експресия на FLT3-ITD и WT1 беше изследвана при 80 пациенти с de novo ОМЛ. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 51,5 години (обхват 22-76 години), като 73,8% (59/80) от болните бяха под 60-годишна възраст.

Анализът на едновременната експресия на WT1 и FLT3-ITD при всички пациенти с de novo ОМЛ показва тенденция към корелация между експресията на FLT3-ITD и високата експресия на WT1 (Fisher's exact test, p=0,084). Беше

установено, че при пациенти с липсваща експресия на FLT3-ITD 57,9% (33/57) не експресират или слабо експресират WT1. При 65,2% (15/23) от FLT3-ITD положителните пациенти се установява висока експресия на WT1.

Беше установена статистически достоверна корелация между наличието на FLT3-ITD и високата експресия на WT1 при пациенти с нормален кариотип (Fisher's exact test,  $p=0,022$ ). При пациенти с липса на FLT3-ITD 65% (13/20) не експресират или слабо експресират WT1. При 75% (12/16) от FLT3-ITD положителните пациенти се установява висока експресия на WT1.

## **2. Корелация между експресията на гените сурвивин и WT1**

Едновременната експресия на сурвивин и WT1 беше изследвана при 44 пациенти с de novo ОМЛ. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 52,5 години (обхват 25-76 години), като 65,9% (29/44) от болните бяха под 60-годишна възраст.

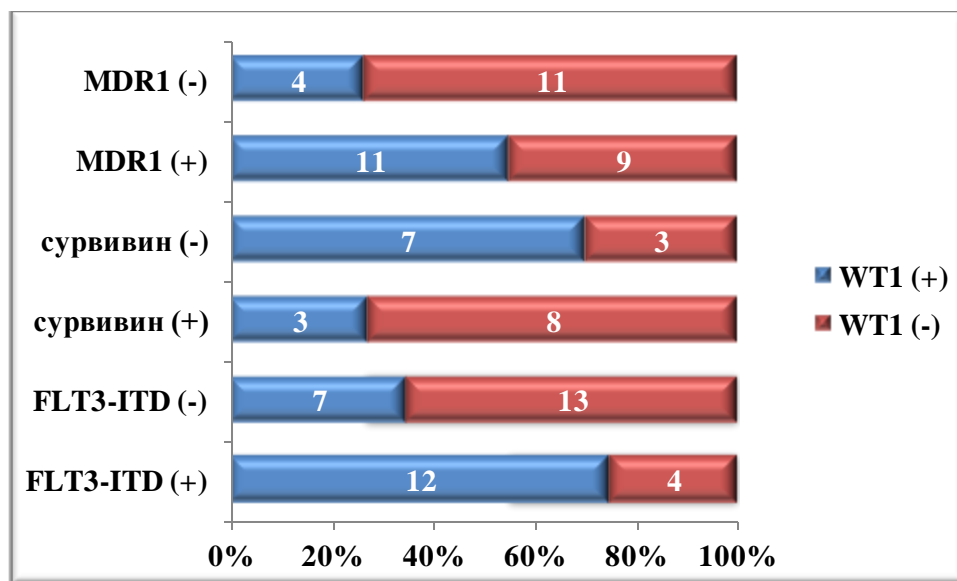
Анализът на данни показва, че липсва статистически значима връзка между експресията на сурвивин и високата експресия на WT1 към момента на поставяне на диагнозата (Fisher's exact test,  $p=0,541$ ).

Статистически достоверна връзка между експресията на сурвивин и степента на експресия на WT1 не беше установена и при пациенти с нормален кариотип (Fisher's exact test,  $p=0,178$ ).

## **3. Корелация между експресията на гените MDR1 и WT1**

Бяха изследвани пробите на 35 пациенти с de novo ОМЛ за едновременна експресия на MDR1 и WT1. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 54 години (обхват 27-72 години), като 74,3% (26/35) от болните бяха под 60-годишна възраст.

Анализът на данни показва, че липсва статистически значима корелация между степента на експресия на WT1- и експресията на MDR1 (Fisher's exact test,  $p=0,167$ ) – фиг. 13.



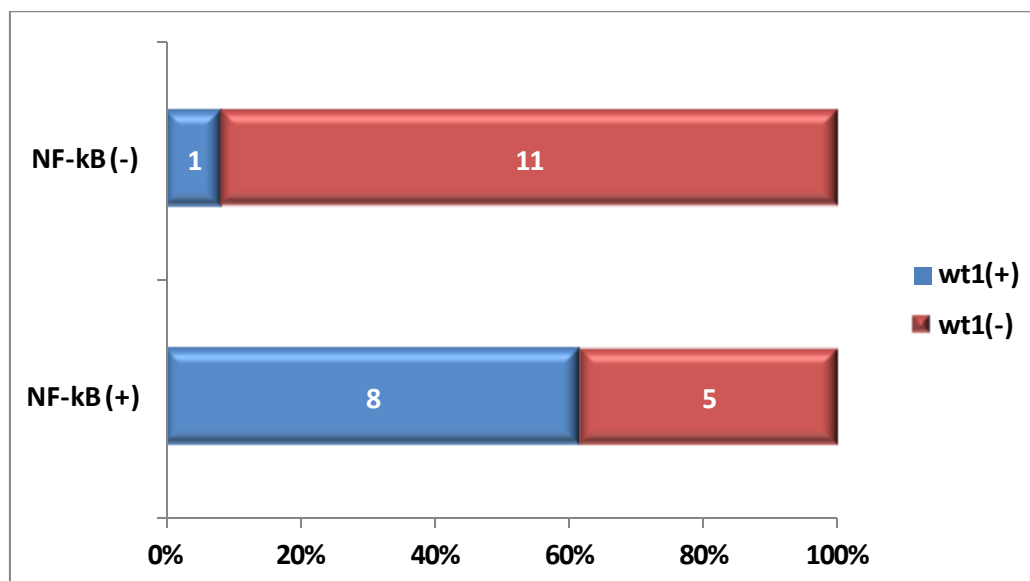
WT1(+) – ОМЛ пациенти с висока експресия на WT1

WT1(-) – ОМЛ пациенти със слаба или липсваща експресия на WT1

**Фиг. 13** Схематично представяне експресията на MDR1, сурвивин и FLT3-ITD в зависимост от експресията на WT1

#### 4. Корелация между експресията на NF-kB и wt1

Пробите на 25 пациенти с ОМЛ бяха изследвани за едновременната експресия на wt1 и NF-kB. Беше установено, че при болни с липсваща експресия на NF-kB 91,6% (11/12) от тях не експресират или слабо експресират wt1. Анализът на данни показва статистически достоверна корелация между експресията на NF-kB и високата експресия на wt1 (Fisher's exact test,  $p = 0,011$ ), като при 61,5% (8/13) от NF-kB (+) пациенти, беше установена висока експресия на wt1 (фиг. 14).



wt1(+) – ОМЛ пациенти с висока експресия на wt1

wt1(-) – ОМЛ пациенти със слаба или липсваща експресия на wt1

**Фиг. 14** Схематично представяне експресията на NF-kB протеина в зависимост от експресията на wt1

**Корелация между комбинираната експресия на WT1 или wt1 и изследваните ключови молекулярни маркери с клинично-лабораторни параметри при пациенти с ОМЛ към момента на поставяне на диагнозата**

**1. Корелация между експресията на WT1 и наличието на FLT3-ITD при пациенти с нормален кариотип и основни клинично-лабораторни параметри**

Тъй като наличието на FLT3-ITD се установява предимно при пациенти с de novo ОМЛ и нормален кариотип, в настоящия анализ бяха включени само такива болни. В зависимост от наличието или липсата на FLT3-ITD и степента на експресия на WT1, пациентите бяха разпределени в четири групи. В табл. 13 са представени стойностите на лабораторните показатели в зависимост от експресията на молекулярните маркери при четирите групи ОМЛ пациенти.

**Табл. 13 Стойности на лабораторните показатели в зависимост от експресията на FLT3-ITD и WT1 при пациенти с de novo ОМЛ и нормален кариотип**

	<i>FLT3-ITD(+)</i> <i>WT1(+)</i>	<i>FLT3-ITD(+)</i> <i>WT1(-)</i>	<i>FLT3-ITD(-)</i> <i>WT1(-)</i>	<i>FLT3-ITD(-)</i> <i>WT1(+)</i>	<i>p</i>
<b>Брой пациенти</b>	12	4	13	7	
<i>Брой левкоцити (10<sup>9</sup>/L)</i>					
Медиана	108,4	142,5	12,15	13,2	0,003 <sup>#</sup>
Обхват	6,2-298	37,9-211	0,95-66,1	2,1-98	
<i>Хемоглобин (g/L)</i>					
Медиана	92,5	102	94	77	0,411
Обхват	68-123	82-127	54-109	63-101	
<i>Брой тромбоцити (10<sup>9</sup>/L)</i>					
Медиана	86,8	89,4	90	39	0,181
Обхват	25-313	50-155	12-177	15,7-105	
<i>ЛДХ (Е/л)</i>					
Медиана	1238	1102,5	560	712	0,167
Обхват	518-4033	406-2931	350-1420	341-2723	
<i>% бласти в костен мозък</i>					
Медиана	90,5	93	83,5	82	0,202
Обхват	58-100	92-96	40-99	40,5-98	
<i>% бласти в периферна кръв</i>					
Медиана	87	82	60	47	0,060 <sup>^</sup>
Обхват	37-100	44-87	0-90	20-84	

WT1(+) – пациенти с висока експресия на туморния ген на Wilms

WT1(-) – пациенти със слаба или липсваща експресия на туморния ген на Wilms

<sup>#</sup> Пациентите с FLT3-ITD(-)/WT1(-) имат значително по-нисък левкоцитен брой в сравнение с останалите болни (p=0,003).

<sup>^</sup> Пациентите с FLT3-ITD(-)/WT1(-) имат тенденция към по-ниска бластна инфилтрация в периферната кръв в сравнение с останалите болни (p=0,060).

Анализът на данни показва, че независимо от WT1-статуса, левкоцитният брой и степента на бластна инфилтрация в периферната кръв на пациентите с de novo ОМЛ статистически значимо зависят от наличието на FLT3-ITD (Fisher's exact test, p=0,003).

## 2. Корелация между ко-експресията на WT1 и сурвивин при пациенти с *de novo* ОМЛ и основни клинично-лабораторни параметри

В зависимост от експресията на сурвивин и WT1, пациентите бяха разпределени в четири групи. На табл. 14 са представени стойностите на лабораторните показатели в зависимост от експресията на молекулярните маркери при четирите групи ОМЛ пациенти.

**Табл. 14 Стойности на лабораторните показатели в зависимост от експресията на сурвивин и WT1 при пациенти с ОМЛ**

	сурвивин(+) WT1(+)	сурвивин(+) WT1(-)	сурвивин(-) WT1(-)	сурвивин(-) WT1(+)	p
<b>Брой пациенти</b>	19	7	6	12	
<b>Брой левкоцити (<math>10^9/L</math>)</b>					
Медиана	14,1	31	83,1	29,75	
Обхват	1,7-137	5,3-83	9-206	2,1-298	0,123
<b>Хемоглобин (g/L)</b>					
Медиана	93	98	103	84	
Обхват	49-145	57-111	69-157	54-113	0,462
<b>Брой тромбоцити (<math>10^9/L</math>)</b>					
Медиана	55,5	34	39	29	
Обхват	19-223	7-177	17-90	9-264	0,063 <sup>^</sup>
<b>ЛДХ (Е/л)</b>					
Медиана	7781	825	1616	1079	
Обхват	166-3982	545-3193	406-3347	300-4033	0,445
<b>% бласти в костен мозък</b>					
Медиана	86	81	96	93	
Обхват	25,5-98	47-96	84-100	57-100	0,022 <sup>*</sup>
<b>% бласти в периферна кръв</b>					
Медиана	53	78	87	70	
Обхват	3-96	18-89	65-90	20-100	0,036 <sup>*</sup>

\* При пациенти с експресия на WT1 и сурвивин [WT1(+)/сурвивин(+)] се наблюдава статистически достоверно по-ниска бластна инфилтрация в костния мозък ( $p=0,022$ ) и периферната кръв ( $p=0,036$ ) към момента на поставяне на диагнозата в сравнение с останалите пациенти с ОМЛ.

<sup>^</sup> При пациенти с експресия на WT1 и сурвивин [WT1(+)/сурвивин(+)] се наблюдава тенденция към по-висок тромбоцитен брой към момента на поставяне на диагнозата в сравнение с останалите пациенти с ОМЛ ( $p=0,063$ ).

### 3. Корелация между ко-експресията на WT1- и MDR1 при пациенти с *de novo* ОМЛ и основни клинично-лабораторни параметри

В зависимост от наличието или липсата на WT1- и MDR1, пациентите с *de novo* ОМЛ бяха разпределени в четири групи. Статистическият анализ на данните не показва наличие на достоверна корелация между експресията на WT1 и MDR1 и броя на левкоцити и тромбоцити, ниво на хемоглобин и ЛДХ, както и бластната инфилтрация в костния мозък и периферната кръв – табл. 15.

**Табл. 15 Стойности на лабораторните показатели в зависимост от експресията на MDR1 и WT1-гените при пациенти с ОМЛ**

	MDR(+) WT1(+)	MDR(+) WT1(-)	MDR(-) WT1(-)	MDR(-) WT1(+)	<i>p</i>
<b>Брой пациенти</b>	18	2	5	10	
<b>Брой левкоцити (<math>10^9/L</math>)</b>					
Медиана	13,65	91,4	32	16,2	
Обхват	1,7-144	5,3-177,5	30,9-65	4,3-196,5	0,411
<b>Хемоглобин (g/L)</b>					
Медиана	96,5	108,5	60	88	
Обхват	54-140	106-111	50-98	64-132	0,053
<b>Брой тромбоцити (<math>10^9/L</math>)</b>					
Медиана	57	25,5	8	40	
Обхват	7-223	17-34	5-100	8-264	0,247
<b>ЛДХ (Е/л)</b>					
Медиана	781	1235,5	1044	1239	
Обхват	360-3982	551-1920	825-2931	300-2777	0,654
<b>% бласти в костен мозък</b>					
Медиана	88	71	52,5	78,5	
Обхват	25,5-98	58-84	47-58	27-100	0,335
<b>% бласти в периферна кръв</b>					
Медиана	66	76,5	73	44	
Обхват	3-100	63-90	58-82	10-90	0,210

**4. Корелация между комбинираната експресия на wt1- и NF-kB протеина и основни клинично-лабораторни параметри при пациенти с de novo ОМЛ**

В зависимост от наличието или липсата на wt1- и NF-kB протеините, пациентите с de novo ОМЛ бяха разпределени в четири групи – табл. 16.

**Табл. 16 Стойности на лабораторните показатели в зависимост от експресията на NF-kB и високата експресия на WT1 при пациенти с ОМЛ**

	NF-kB(+) WT1(+)	NF-kB(+) WT1(-)	NF-kB(-) WT1(-)	NF-kB(-) WT1(+)	p
<b>Брой пациенти</b>	8	5	7	5	
<b>Брой левкоцити (<math>10^9/L</math>)</b>					
Медиана	41,65	26,2	6,1	13,65	
Обхват	1,7-144	4,3-37,9	3,9-36,2	7,1-51,2	0,672
<b>Хемоглобин (g/L)</b>					
Медиана	101	95	89	92,5	
Обхват	63-132	91-111	54-126	81-140	0,713
<b>Брой тромбоцити (<math>10^9/L</math>)</b>					
Медиана	64,5	34	30	43,5	
Обхват	25-189	7-100	7-177	36-223	0,546
<b>ЛДХ (Е/л)</b>					
Медиана	781	874	710	2196	
Обхват	360-2073	300-2931	389-1298	597-3982	0,303
<b>% бласти в костен мозък</b>					
Медиана	89,5	86	57	93	
Обхват	42-100	58-92	25,5-96	49-96	0,086*
<b>% бласти в периферна кръв</b>					
Медиана	55	82	44	68	
Обхват	20-100	63-90	3-89	50-80	0,065*

\* При пациенти с липсваща или слаба експресия на WT1 и липсваща експресия на NF-kB [WT1(-)/NF-kB (-)] се наблюдава тенденция към по-ниска бластна инфилтрация в костния мозък ( $p=0,086$ ) и в периферната кръв ( $p=0,065$ ) в сравнение с останалите болни с ОМЛ.

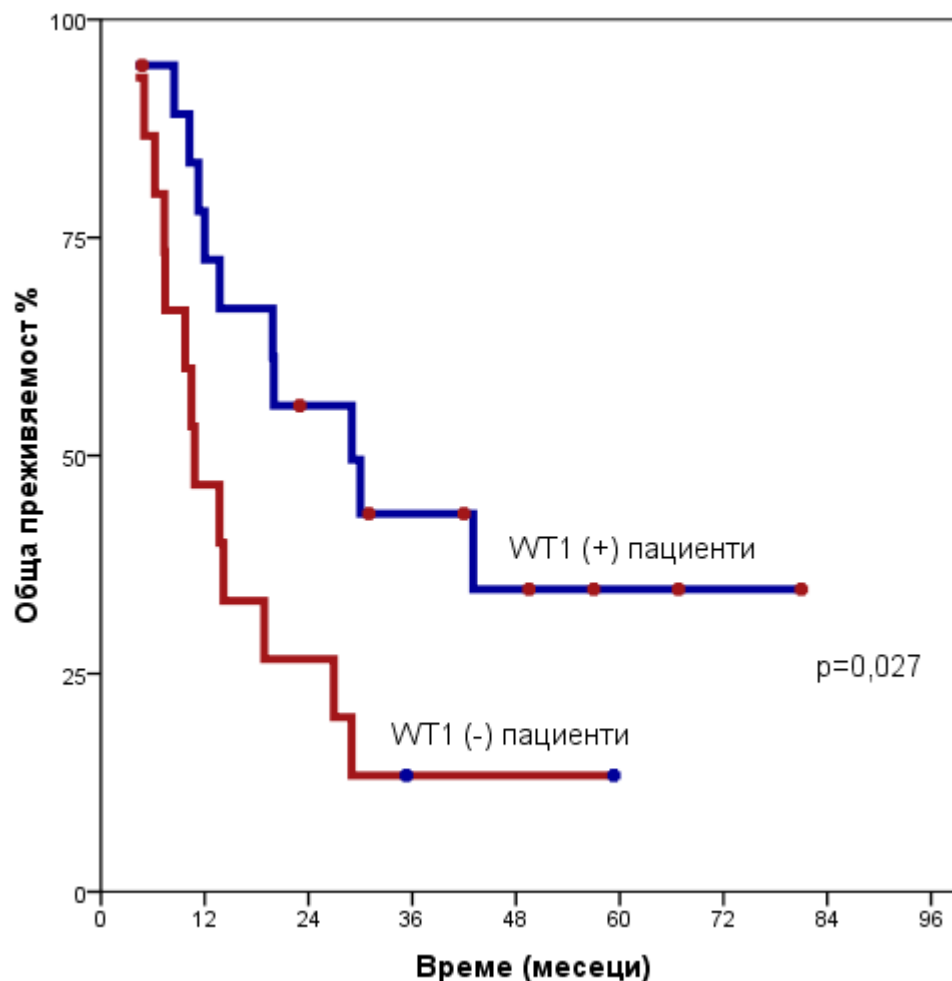
### **Прогностична стойност на експресията на WT1 mRNA при пациенти с ОМЛ**

Възможното прогностично значение на експресията на WT1 към момента на поставяне на диагнозата беше оценено при анализа на болните с de novo ОМЛ, подложени на интензивна (в т.ч. високо-дозова) индукционна ПХТ по отношение на постигането на CR, наличието на RD, продължителността на OS и DFS. Интензивна индукционна ПХТ беше проведена при 44 от пациентите под 60-годишна възраст, които бяха разделени в две групи: WT1 (+) пациенти, при които се установява висока експресия на WT1 и WT1 (-) болни, при които се установява ниска или липсваща експресия на молекулярния маркер. Индукционната смъртност на пациентите, лекувани с конвенционална и високо-дозова индукционна терапия в НСБАЛХЗ, беше 22,7% (10/44).

1. **Прогностична стойност на експресията на WT1 mRNA за постигане на CR** - CR беше постигната при 56,8% (25/44) от анализиранияте пациенти с de novo ОМЛ под 60-годишна възраст. При Пациенти с висока експресия на WT1 значително по-рядко беше постигната CR след прилагане на конвенционална ПХТ, в сравнение с останалите болни [4/19 (21,05%) vs 15/25 (60%)]; Fisher's exact test,  $p=0,014$ .

Не беше наблюдавана статистически достоверна разлика, обаче, при постигане на CR между WT1 (+) пол. и WT1 (-) отр. пациенти след прилагане на конвенционална и високо-дозова индукционна терапия (52,6% vs 60%; Fisher's exact test,  $p=0,421$ ).

2. **Прогностична стойност на експресията на WT1 mRNA за продължителността на OS** - След среден период на проследяване от 20 (5-64) месеца, при 70,6% (24/34) от изследваните пациенти с de novo ОМЛ под 60-годишна възраст, независимо от постигането на CR или наличие на резистентно заболяване, настъпи летален изход. Изчислената медиана на OS беше 18,9 месеца (95% CI; 11,82 – 25,97 месеца). Летален изход беше регистриран при 57,9% (11/19) от WT1(-) и при 86,7% (13/15) от WT1(+) болни (Fisher's exact test,  $p=0,128$ ). Статистическият анализ на данни показва, че изчислената медиана на OS при WT1(-) пациенти е 29 месеца (95% CI; 10,15 – 47,90 месеца), докато при WT1(+) пациенти – 10,83 месеца (95% CI; 5,81 – 15,84 месеца) – фиг. 15. На 48<sup>-мия</sup> месец беше отчетена значимо по-продължителна OS при 34,7% от WT1 (-) болни в сравнение с 13,3% от WT1(+) пациенти (log rank,  $p=0,027$ ).



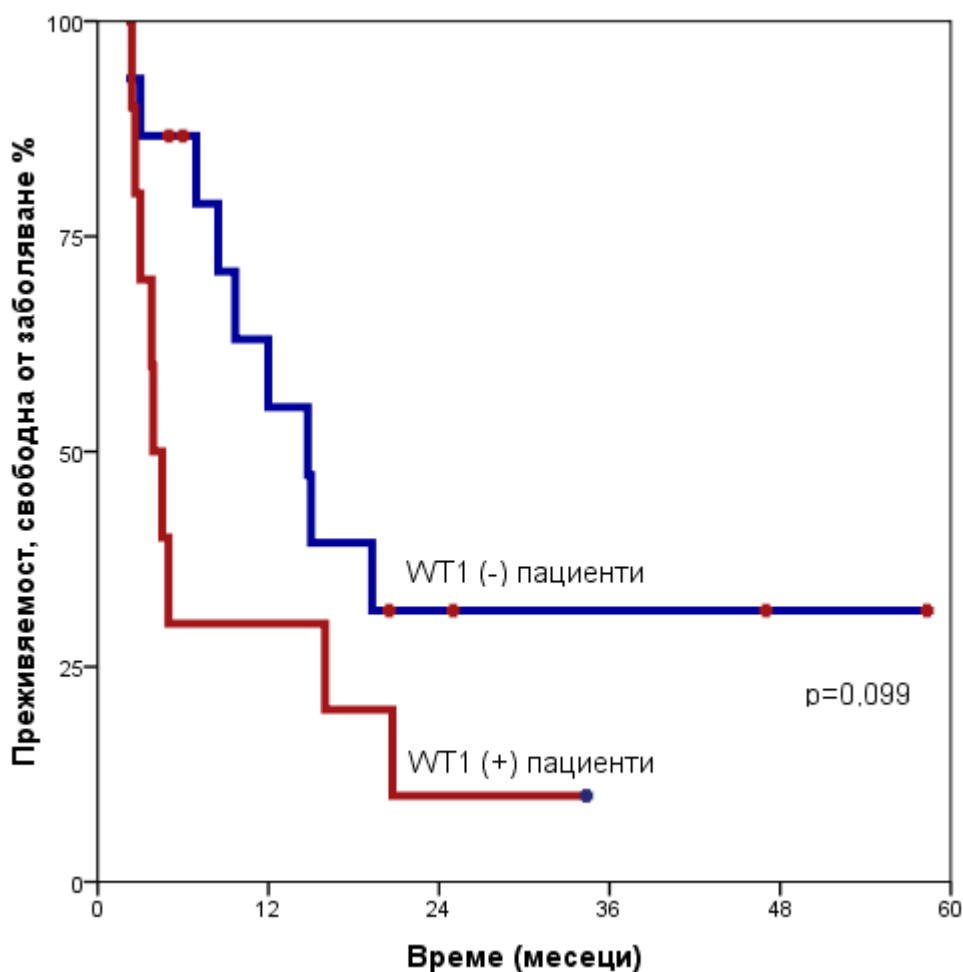
WT1 (-) пациенти – пациенти с ниска или липсваща експресия на WT1

WT1 (+) пациенти – пациенти с висока експресия на WT1

**Фиг. 15** Изчислена обща преживяемост на пациенти с *de novo* ОМЛ в зависимост от степента на експресия на WT1, лекувани в НСБАЛХЗ

3. **Прогностична стойност на експресията на WT1 mRNA за продължителността на DFS** - В хода на проследяването, беше регистриран рецидив при 72% (18/25) от пациентите с *de novo* ОМЛ, постигнали ремисия, като изчислената медиана на DFS беше 12 месеца (95% CI; 3,31–20,68 месеца). Рецидив беше установен при 60% (9/15) от WT1(-) и при 90% (9/10) от WT1(+) болни (Fisher's exact test,  $p=0,179$ ). Изчислената медиана на WT1(-) пациенти беше 14,7

месеца (95% CI; 9,5–19,9 месеца), докато при болните с висока експресия на маркера – 3,9 месеца (95% CI; 2,7-5,03 месеца). Анализът на данните показва наличие на тенденция към статистически достоверна разлика между двете групи заболели по отношение продължителността на DFS (log rank,  $p=0,099$ ) – фиг. 16. Общата DFS на 48<sup>-мия</sup> месец беше съответно 31,5 % и 10% при WT1(-) и WT1(+) болни.



WT1 (-) пациенти – пациенти с ниска или липсваща експресия на WT1

WT1 (+) пациенти – пациенти с висока експресия на WT1

**Фиг. 16** Изчислената преживяемост, свободна от заболяване на пациенти с *de novo* ОМЛ под 60-годишна възраст в зависимост от степента на експресия на WT1

**Прогностична стойност на експресията на останалите ключови молекулярни маркери при пациенти с ОМЛ**

Тъй като интензивната, както и високо-дозовата ПХТ можеше да бъде проведена единствено при пациентите под 60 годишна възраст, прогностичната стойност на ключовите молекулярни маркери беше изследвана само при тази пациентска кохорта.

1. **Прогностична стойност на експресията на останалите ключови молекулярни маркери за постигане на CR** – Унивариационният анализ показва, че постигането на CR при прилагане на конвенционална ПХТ зависи от ниската или липсващата експресия на WT1 (Fisher’s exact test,  $p=0,014$ ), липсата на FLT3-ITD (Fisher’s exact test,  $p=0,021$ ) и наличието на цитогенетични или молекулярни аномалии, свързани с нисък риск (Fisher’s exact test,  $p=0,005$ ) – табл. 17.

**Табл. 17 Статистическа значимост на различни молекулярно-цитогенетични маркери по отношение постигане на CR след прилагане на конвенционална ПХТ при пациенти с de novo ОМЛ**

<b>CR</b>						
<i>показател</i>	<i>пациенти</i>	<i>%</i>	<i>показател</i>	<i>пациенти</i>	<i>%</i>	<i>P</i>
WT1 (-)	15/25	60	WT1 (+)	4/19	21,05	<b>0,014</b>
FLT3-ITD (-)	17/31	54,8	FLT3-ITD (+)	2/13	15,4	<b>0,021</b>
сурвивин (-)	4/12	33,3	сурвивин (+)	6/15	40	ns
NF-kB (-)	4/6	66,7	NF-kB (+)	0/5	0	ns
нисък цитогенетичен риск	7/8	87,5	всички останали	20/59	33,9	<b>0,005</b>

2. **Прогностична стойност на експресията на останалите ключови молекулярни маркери за продължителността на OS** – Анализът на данни показва, че продължителността на OS зависи от липсващата или слаба експресия на WT1 (Fisher’s exact test,  $p=0,024$ ), липсата на FLT3-ITD (Fisher’s exact test,  $p=0,0001$ ) и наличието на цитогенетични или молекулярни аномалии, свързани с нисък риск (Fisher’s exact test,  $p=0,036$ ) – табл. 18.

**Табл.18 Статистическа значимост на различни молекулярно-цитогенетични маркери по отношение продължителност на OS при пациенти с de novo ОМЛ**

<b>OS</b>				
показател	месеци (медиана)	показател	месеци (медиана)	P
WT1 (-)	29	WT1 (+)	10,83	<b>0,024</b>
FLT3-ITD (-)	14,17	FLT3-ITD (+)	7,33	<b>0,0001</b>
сурвивин (-)	26,93	сурвивин (+)	13,7	ns
NF-kB (-)	12	NF-kB (+)	3	ns
нисък цитогенетичен риск	не е достигната	всички останали	10,83	<b>0,036</b>

3. **Прогностична стойност на експресията на останалите ключови молекулярни маркери за продължителността на DFS** - Беше установено, че продължителността на DFS статистически достоверно се определя от липсата на FLT3-ITD експресия (Fisher's exact test, p=0,002) – табл. 19.

**Табл.19 Статистическа значимост на различни молекулярно-цитогенетични маркери по отношение продължителност на DFS при пациенти с de novo ОМЛ**

<b>DFS</b>				
показател	месеци (медиана)	показател	месеци (медиана)	P
WT1 (-)	15,0	WT1 (+)	3,9	ns
FLT3-ITD (-)	15,0	FLT3-ITD (+)	4,4	<b>0,002</b>
сурвивин (-)	12,0	сурвивин (+)	16,0	ns
NF-kB (-)	-	NF-kB (+)	-	-
нисък цитогенетичен риск	16,0	всички останали	9,67	ns

***Прогностична стойност на едновременната експресия на WT1 и наличието на FLT3-ITD при пациенти с ОМЛ***

Предвид наличието на неблагоприятна прогноза при пациенти с експресия на WT1 или FLT3-ITD, беше предположено, че болни с наличие на FLT3-ITD и/или висока експресия на WT1 ще имат по-лоша прогноза в сравнение с другите пациенти, при които не се установява експресия и на двата молекулярни маркера.

Сравнени бяха две групи болни: в първата група бяха включени пациенти с липсваща експресия на FLT3-ITD и слаба или липсваща експресия на WT1 [WT1(-)/FLT3-ITD(-)], а в другата – всички заболели, при които беше установена експресия на поне един от двата молекулярни маркера [WT1(+)/FLT3-ITD(+)] - табл. 20.

**Табл. 20** *Терапевтичен отговор при пациенти с ОМЛ в зависимост от експресията на WT1 и FLT3-ITD под 60-годишна възраст*

Показател	Общо	WT1(-) FLT3-ITD(-)	WT1(+) FLT3-ITD(+)	Статистическа значимост (p)
Всички пациенти n (%)	44	21 (47,8)	23 (52,2)	
ID n (%)	10 (22,7)	3 (14,3)	7 (30,4)	ns
CR n (%)	25 (56,8)	14 (66,7)	11 (47,8)	ns <sup>#</sup>
RD n (%)	9 (20,5)	4 (19)	5 (21,7)	ns
Рецидив n (%)	18 (72)	8 (57,1)	10 (90,9)	ns
CCR* n (%)	7 (28)	6 (42,8)	1 (9,1)	ns
Летален изход* n (%)	24 (70,6)	10 (55,6)	14 (87,5)	0,063

ID – индукционна смъртност при пациенти, провели конвенционална и високо-дозова ПХТ  
WT1(-)/FLT3-ITD(-) – пациенти с липсваща или слаба експресия на WT1 и липсваща експресия на FLT3-ITD

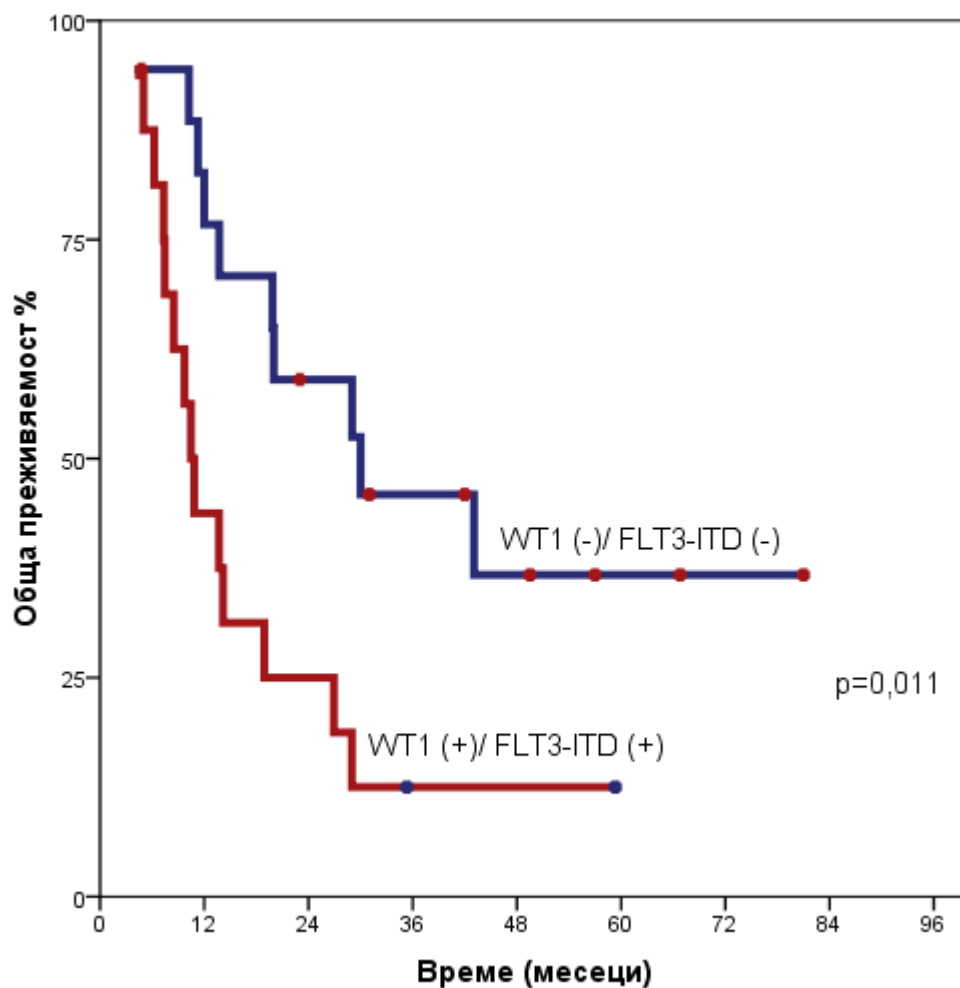
WT1(+)/FLT3-ITD(+) – пациенти с висока експресия на WT1 и/или експресия на FLT3-ITD

<sup>#</sup> При провеждане на конвенционална и високо-дозова индукционна терапия липсва значима разлика по отношение постигане на CR между двете пациентски кохорти. При провеждане само на конвенционална индукционна терапия CR се установява значително по-често при [WT1(-)/FLT3-ITD(-)] пациенти, в сравнение с останалите болни с ОМЛ [14/21 (66,7%) vs 5/23 (21,7%); Fisher's exact test, p=0,0055].

\* при Пациенти, при които беше постигната пълна ремисия или беше регистрирано резистентно заболяване.

Анализът на данни показва, че при провеждане на конвенционална и високо-дозова индукционна терапия липсва значима разлика по отношение постигане на CR между двете пациентски кохорти. При провеждане само на конвенционална индукционна терапия CR се установява достоверно по-често при [WT1(-)/FLT3-ITD(-)] пациенти, в сравнение с останалите болни с ОМЛ (Fisher's exact test, p=0,0055).

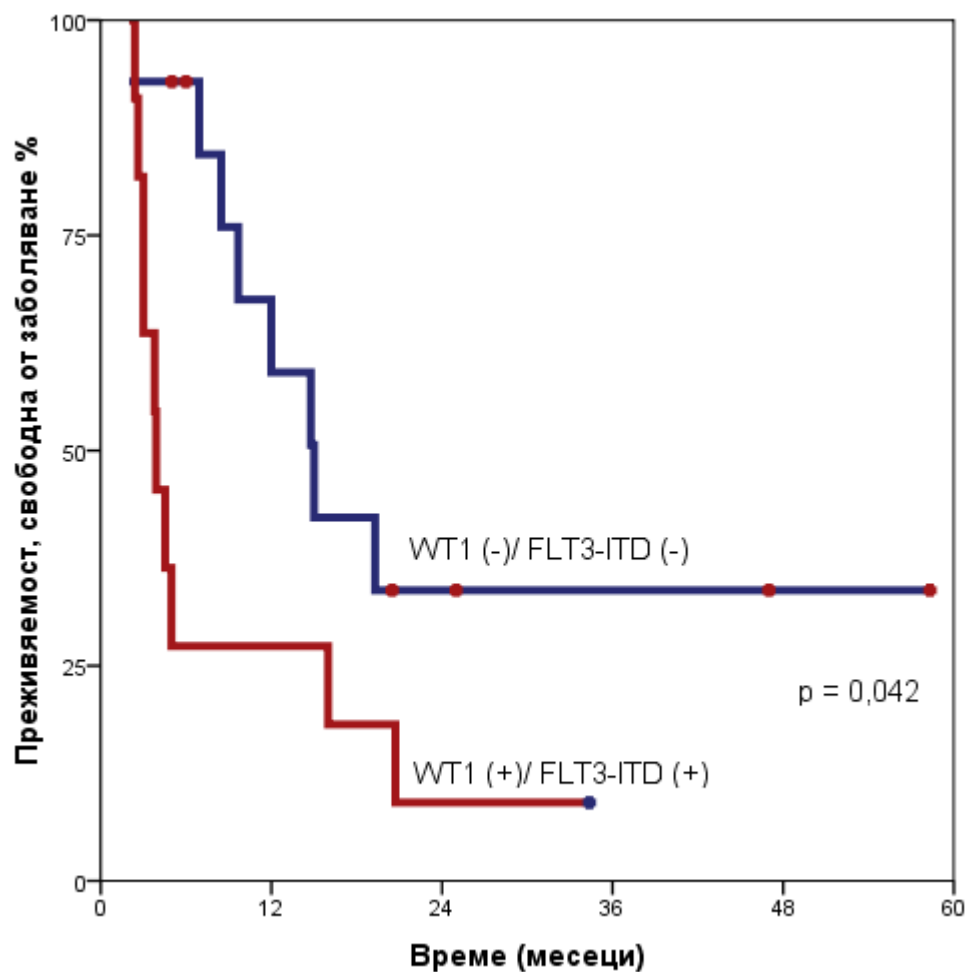
Летален изход беше регистриран при 55,6% (10/18) от WT1(-)/FLT3-ITD(-) и при 87,5% (14/16) от WT1(+)/FLT3-ITD(+) болни, при които беше постигната CR или беше установено резистентно заболяване (Fisher's exact test, p=0,063). Продължителността на OS на двете пациентски групи е представена на фиг. 17.



WT1(-)/FLT3-ITD(-) – пациенти с липсваща или слаба експресия на WT1 и липсваща експресия на FLT3-ITD  
WT1(+)/FLT3-ITD(+) – пациенти с висока експресия на WT1 и/или експресия на FLT3-ITD

**Фиг. 17** Изчислената обща преживяемост на пациенти с *de novo* ОМЛ под 60-годишна възраст в зависимост от експресията на WT1 и FLT3-ITD

Рецидив беше установен при 57,1% (8/14) от WT1(-)/FLT3-ITD(-) и при 90,9% (10/11) от WT1(+)/FLT3-ITD(+) болни. Продължителността на DFS при двете пациентски кохорти е представена на фиг. 18.



WT1(-)/FLT3-ITD(-) – пациенти с липсваща или слаба експресия на WT1 и липсваща експресия на FLT3-ITD

WT1(+)/FLT3-ITD(+) – пациенти с висока експресия на WT1 и/или експресия на FLT3-ITD

**Фиг. 18** Изчислената преживяемост, свободна от заболяване на пациенти с *de novo* ОМЛ под 60-годишна възраст в зависимост от експресията на WT1 и FLT3-ITD

Статистическите данни за продължителността OS и DFS при двете пациентски кохорти са представени в табл. 21.

**Табл. 21 Статистически данни за продължителността OS и DFS при WT1(+)/FLT3-ITD(+) и WT1(-)/FLT3-ITD(-) пациенти с ОМЛ, лекувани в НСБАЛХЗ – София**

Показател	WT1(-) FLT3-ITD(-)	WT1(+) FLT3-ITD(+)	Статистическа значимост (log rank; p)
OS (месеци; обхват)	30 (4,9–55)	10,47 (8,3-12,6)	0,011
DFS (месеци; обхват)	15 (10–19,9)	3,9 ( 2,2–5,5)	0,042

WT1(-)/FLT3-ITD(-) – пациенти с липсваща или слаба експресия на WT1 и липсваща експресия на FLT3-ITD

WT1(+)/FLT3-ITD(+) – пациенти с висока експресия на WT1 и/или експресия на FLT3-ITD

Не беше наблюдавана статистически достоверна разлика между пациентите, двойно положителни за експресията на двата молекулярни маркера, и тези, експресиращи един от двата гена.

Анализът на данни показва, че пациенти с поне една от двете молекулярни аномалии има значително по-неблагоприятен клиничен ход. При тези пациенти се наблюдава по-рядко постигане на CR след проведена конвенционална индукционна терапия, по-ниска продължителност на постигнатите ремисии и по-кратка OS.

#### **Регресионен анализ на Cox**

Беше проведен регресионен анализ на Cox, посредством който беше оценено прогностичното значение на високата експресия на WT1, експресията на FLT3-ITD и наличието на нисък цитогенетичен/молекулярен риск по отношение на продължителността на OS. В таблицата са отразени единствено параметрите, които имат статистически достоверно прогностично значение за продължителността на OS при анализиранияте пациенти. Данните са представени в табл. 22.

**Табл. 22 Прогностично значение на високата експресия на WT1 и експресията на FLT3-ITD по отношение продължителността на общата преживяемост при пациенти с новодиагностицирана ОМЛ, установено посредством регресионен анализ на Cox**

	Пациенти $\leq 60$ години	
	<i>p</i>	95% CI
WT1 (+) vs WT1 (-)	0,867	
Нисък цитогенетичен/молекулярен риск vs всички останали	0,06	4,04 (0,94 – 17,41)
FLT3-ITD (+) vs FLT3-ITD (-)	<b>0,001</b>	3,3 (1,59 – 6,8)

Данните от табл. 22 показват, че WT1 губи самостоятелното си значение по отношение на продължителността на OS в присъствието на FLT3-ITD. Това наблюдение предполага, че високата експресия на WT1 опосредства неблагоприятна прогностична роля на FLT3-ITD.

## V. ОБСЪЖДАНЕ

Индуцирането на апоптоза е главният механизъм, посредством който цитостатичните препарати, използвани при лечение на пациенти с ОМЛ, оказват своя цитотоксичен ефект (Gorczyca et al, 1993; Bhalla et al, 1993). Незначителният терапевтичен отговор спрямо индукционната терапия или персистирането на резидуална болест се причинява от резистентността на левкемичните бласти спрямо апоптогичните сигнали в организма. Следователно, регулацията на апоптогични и антиапоптогични сигнални пътища има голямо клинично значение по отношение на постигане на ремисия или преодоляване на лекарствената резистентност. Множество молекули контролират процесите на клетъчна апоптоза, като една от тях е WT.

В нашето проучване експресията на wt1 беше установена при 50% (21/42) от пациентите с ОМЛ. Силна експресия на белтъка беше регистрирана при общо 28,6% (12/42). Посредством използването на друг методологичен подход - имунофлуоресцентно оцветяване с моно- и поликлонални анти-wt1 антитела е установена експресия на wt1 в клетъчните ядра при 50-63% от пациентите с остри левкемии (Menssen et al, 1995; Menssen et al, 1997) без да се наблюдава доловима реакция в ядрата на нормалните CD34 (+) хематопоеични стволови клетки.

Други автори изследват експресията на wt1 посредством имунохистомични методи и установят наличието на белтъчния маркер при 40% от деца, страдащи от ОМЛ (Al-Adnani et al, 2007). Експресията на wt1 при деца, страдащи от остри левкемии, е много ниска (Kerst et al, 2008). Това вероятно може да бъде обяснено с по-ниската експресия на wt1 в детска възраст. От друга страна, транслирането на WT1 и.РНК в белтък вероятно се осъществява в значително по-ниска степен в сравнение с възрастните индивиди.

Въпреки че данните за експресията на wt1, получени чрез имунологични методи, са много оскъдни, по правило честотата на протеиновата експресия на този маркер при пациенти с ОМЛ е значително по-ниска в сравнение с честотата на генна експресия, изследвана посредством RT-PCR методи.

В настоящото проучване при 42 пациенти с ОМЛ бяха измерени успоредно експресиите на wt1 и WT1, като сравнителният анализ показва много добра корелация (Pearson chi-square,  $p < 0,001$ ) между резултатите на протеиново ниво и mRNA, получени съответно чрез WB и RT-PCR.

Според други автори, обаче, експресията на wt1 корелира слабо с броя на WT1-транскриптите, което показва значителна вариация в експресията на wt1 спрямо съответстващата експресия на WT1 иРНК (Kerst et al, 2008). Например експресията на wt1 е по-ниска при пациенти с висока експресия на WT1 иРНК, отколкото при пациенти със слаба експресия на WT1. Тези различия в данните от нашето проучване и тези на Kerst et al, 2008 биха могли да бъдат обяснени с ниския брой изследвани пациенти в детска възраст, голямата хетерогенност в детската пациентска група, включваща и болни с остра лимфобластна левкемия, както и наличието на значителна пост-транскрипционна регулация при деца, страдащи от левкемия.

Според нашите данни експресията на WT1 се установява при 72,8% от изследваните пациенти. Висока експресия на молекулярния маркер се установява при 45,7%, докато ниска експресия – при 27,2% от Пациентите. Подобни данни са наблюдавани и от други изследователски колективи, които установяват експресия на WT1 при 68,1%-74,6% от пациентите с новодиагностицирана ОМЛ (Bergmann et al, 1997; Karakas et al, 2002; Schmid et al, 1997; Miwa et al, 1992). Посредством по-чувствителни методи като q-RT-PCR, експресията на WT1 иРНК се установява при 89%-100% от възрастните пациенти с ОМЛ (Østergaard et al, 2004; Cilloni et al, 2002; Weisser et al, 2005) и при 77-78% от децата, страдащи от ОМЛ (Lapillonne et al, 2006; Shimada et al, 2012).

Различията, установени посредством имунологичните и молекулярни методи, могат да бъдат обяснени посредством различия в чувствителността на прилаганите методи и различия в използваните критерии за определяне на Wt1 протеин/ WT1 ген експресията, както и вероятно наличие на пост-транслационни модификации.

В зависимост от степента на експресия на WT1, острата миелоидна левкемия може да има различно биологично поведение. Затова ние съпоставихме експресията на WT1 с важни клинични и лабораторни характеристики на пациентите с ОМЛ. Подобно на други авторски колективи (Barragan et al, 2004; Karakas et al, 2002) ние не успяхме да установим значителни разлики между експресията на WT1 и основните клинико-лабораторни характеристики при пациентите с ОМЛ.

При пациентите с висока експресия на WT1, обаче, беше установена статистически достоверно по-висока бластна инфилтрация в периферната кръв към момента на поставяне на диагнозата, както и тенденция към по-висока бластна инфилтрация в костния мозък. Тези данни могат да бъдат обяснени посредством взаимодействието на WT1 и STAT3. Установено е, че WT1 увеличава транскрипционната активност на STAT3 (Rong et al, 2006), което води до повишаване експресията на cyclin D1 and Bcl-xL и повишена клетъчна пролиферация на левкемичните бласти.

Данните от настоящото проучване показват, че пациенти, чиито левкемични бласти са морфологично диференцирани (ОМЛ-M2 и ОМЛ-M5) експресират WT1 значително по-рядко в сравнение с останалите пациенти. Нашите данни корелират с тези, установени от други изследователски екипи (Karakas et al, 2002; Bergmann et al, 1997; Garg et al, 2003; Patmasiriwat et al, 1996; Inoue et al, 1994; Weiser et al, 2005). По-ниски нива на експресия на WT1 са установени и при деца, страдащи от ОМЛ-M5 (Im et al, 1999; Trka et al, 2001; Lapillonne et al, 2006). Тези данни потвърждават резултатите на Miwa et al, 1992, според които експресията на WT1 се установява предимно при морфологично незрели ОМЛ и експресията на този молекулярен маркер намалява в хода на диференциацията. Други изследователски екипи, обаче, не подкрепят наличието на такава корелация (Barragan et al, 2004; Østergaard et al, 2004).

Нашите данни показват, че при пациенти с цитогенетични или молекулярни аномалии, свързани с нисък риск, достоверно по-рядко се наблюдава висока експресия на WT1 в сравнение с тези, свързани с интермедиерен или висок риск. Тези резултати се потвърждават и от други

изследователски екипи (Garg et al, 2003). При пациентите с добър или интермедиерен цитогенетичен риск високата експресия на WT1 е свързана с неблагоприятна прогноза. По този начин посредством изследване експресията на молекулярния маркер, може да бъдат идентифицирани високо-рискови пациенти, които спадат към цитогенетичните групи с нисък и интермедиерен риск. Други изследователски екипи (Barragan et al, 2004; Bergmann et al, 1997; Karakas et al, 2002;) обаче не откриват подобна закономерност. При деца с ОМЛ и нисък цитогенетичен риск се установява значително по-често висока експресия на WT1 (Shimada et al, 2012; Lapillonne et al, 2006). Също така, експресията на WT1 при пациенти с t(8;21) и KIT мутации е значително по-ниска в сравнение с болните без KIT мутации. Причината за тези корелации все още не е напълно изяснена, като едно от възможните обяснения е наличието на различни изоформи на WT1 при пациентите с различен цитогенетичен риск. Установено е, че WT1 стабилизира митохондриалния мембранен потенциал и инхибира апоптозата при левкемичните бласти, като антиапоптотичната функция на гена се осъществява посредством неговите 17AA (+) изоформи [17AA(+)-KTS(+) и 17AA(+)-KTS(-)] – Ito et al, 2006. Същият изследователски колектив установява, че инхибирането на апоптозата от 17AA (+) изоформите се осъществява посредством потискане на експресията на проапоптотичния ген Bax, чрез който в митохондриите навлизат множество апоптотични сигнали.

Друго възможно обяснение е, че комбинираното действие на AML1-ETO и високата експресия на WT1 води до развитието на левкемия при мишки (Nishida et al, 2006). Развитието на левкемията е стъпаловиден процес, при който синергичните ефекти на няколко генетични аберации водят до левкемична трансформация (с белези на повишена клетъчна преживяемост и пролиферация, инхибиране на диференциацията и геномна нестабилност) и развитие на левкемия (Passegue et al, 2003). Според Nishida et al, първоначално експресията на AML1-ETO засяга миелоидните прогенитори и потиска тяхната диференциация в зрели миелоидни клетки. Впоследствие експресията на WT1 засяга по-незрели миелоидни прогенитори, потиска тяхната диференциация и по този начин улеснява развитието на левкемогенезата, причинена от AML1-

ЕТО. Накрая синергичните ефекти на двете молекулярни аберации водят до трансформация на миелоидните прогенитори в малигненни клетки.

По отношение на имунофенотипните характеристики на бластната популация, при пациенти с новодиагностицирана ОМЛ не беше установена корелация между експресията на WT1 и изследваните маркери. Статистически достоверна корелация беше установена между експресията на WT1 и по-младия левкемичен фенотип на бластните клетки, което предполага, че левкемичните бласти, експресиращи молекулярния маркер, са спрели своето развитие на един много ранен етап. Нашите данни показаха, че бластите на Пациенти с линейно-кръстосана експресия на CD4 експресират значително по-често WT1, в сравнение с бластите на пациенти с нормален фенотип. Тези данни са в съответствие с резултатите на други изследователски колективи (Louache et al, 1994; Larson et al, 1995). Според данните на тези изследователи ко-експресията на тези маркери се установява при 20-50% от пациентите с ОМЛ, като експресията на тези молекули върху неопластичните клетки повтаря експресията им върху нормалните клетки. Според резултатите от нашето проучване експресията на CD4 се установява върху левкемичните бласти с моноцитен произход, което потвърждава данните на японски изследователски колектив (Miwa et al, 1998). Други автори като Louache et al, установяват наличието на тази молекула върху миеломоноцитни прекурсори. Освен това, подобно на Miwa et al, 1998, данните от нашето изследване показват, че пациентите с ОМЛ, при които се установява CD4, имат значително по-краткотрайна обща преживяемост в сравнение с останалите болни. Тези данни се потвърждават и при деца с ОМЛ (Smith et al, 1992).

Беше установено, че пациенти с асинхронна експресия на CD15 експресират по-рядко WT1, в сравнение с бластите на пациенти с нормален фенотип. Това се дължи на факта, че при пациенти с асинхронна експресия на CD15 значително по-често се установява експресия на маркери, които са характерни за ниския цитогенетичен/молекулярен риск.

Резултатите от настоящото проучване показват липса на статистически значима разлика в постигането на CR при WT1-положителни и WT1-отрицателни пациенти с ОМЛ. Нашите резултати се потвърждават и от данните на други изследователски екипи (Schmid et al, 1997; Brieger et al, 1994). Според

други изследователски колективи, обаче, CR се постига значително по-рядко при Пациенти с висока експресия на WT1 (Bergmann et al, 1997; Garg et al, 2003; Inoue et al, 1994; Karakas et al, 2002). Тези различия биха могли да се дължат на различния начин на приложение на Цитозар (двукратно приложение vs продължителна инфузия), както и на прилагането на различни антрациклинови антибиотици в хода на индукционната терапия (Farmorubicin vs Daunorubicin) в НСБАЛХЗ и други лечебни заведения в Западна Европа. Степента на експресия на WT1 няма прогностична стойност за постигане на CR и при деца, страдащи от ОМЛ (Lapillonne et al, 2006; Shimada et al, 2012).

Нашите данни показват, че високата експресия на WT1 има статистически значима роля върху продължителността на OS. Пациенти с липсваща или ниска експресия на WT1 имат значително по-продължителна OS в сравнение с WT1 положителните пациенти с ОМЛ. Тази корелация се установява единствено при групата от пациенти под 60-годишна възраст. Нашите данни се потвърждават от резултатите на други изследователски екипи (Bergmann et al, 1997; Inoue et al, 1994; Garg et al, 2003; Karakas et al, 2002). Подобни резултати се установяват и при деца, страдащи от ОМЛ (Trka et al, 2001). Според други автори, обаче, липсва статистически значима връзка между експресията на WT1 и OS (Schmid et al, 1997). При последното проучване не са взети под внимание различията в степента на експресия на WT1, което е и най-вероятната причина за получаването на такива резултати. Някои автори съобщават, че високата експресия на WT1 към момента на поставяне на диагнозата води до по-продължителна OS (Miglino M et al, 2011). Авторите обясняват тези парадоксални резултати с тумор-супресорната роля на WT1, както и със стимулиращия ефект на молекулярния маркер върху левкемичния клетъчен цикъл, което вероятно е довело до повишена химиочувствителност на заболяването към прилаганата ПХТ.

Данните за влиянието на експресията на WT1 върху продължителността на OS при деца с ОМЛ са противоречиви. Според някои автори високата експресия на маркера към момента на поставяне на диагнозата води до по-краткотрайна преживяемост (Trka et al, 2002; Spanaki et al, 2007). Други

изследователски колективи, обаче, не установяват статистически значима разлика в продължителността на OS и DFS в зависимост от степента на експресия на WT1 (Noronha et al, 2009). Различията в тези данни може да се дължат на различия в прилаганите терапевтични протоколи, както и на различия в броя на изследваните пациенти.

По отношение на DFS, нашите данни не показват наличие на статистически значима корелация между високата експресията на WT1 и продължителността на DFS. Нашите резултати контрастират на данните, получени от други изследователски екипи (Inoue et al, 1994; Barragan et al, 2004; Garg et al, 2003; Trka et al, 2002). Анализирайки, обаче, групата на пациентите под 60-годишна възраст, беше наблюдавана тенденция към по-продължителна DFS при пациенти с ниска или липсваща експресия на молекулярния маркер. Едно от възможните обяснения за различните резултати между нас и другите изследователски екипи е прилагането на различни консолидиращи курсове, както и различната кумулативна доза на Цитозар (10 гр vs 18-54 гр), прилагана в НСБАЛХЗ и другите европейски лечебни заведения.

Множество изследователски групи считат, че експресията на WT1 след проведената индукционна терапия има по-голямо прогностично значение, отколкото експресията на молекулярния маркер към момента на поставяне на диагноза при деца и възрастни пациенти с ОМЛ. Наличието на свръхекспресия на WT1 след проведена индукционна терапия води до повишен риск от рецидив и смъртен изход. Общата преживяемост е значително по-продължителна при пациенти с липсваща експресия на молекулярния маркер след проведената индукционна терапия в сравнение с останалите пациенти (Lapillonne et al, 2006; Shimada et al, 2012). Тези данни се потвърждават и от резултатите, получени при възрастни пациенти с ОМЛ (Inoue et al, 1996; Garg et al, 2003).

Данните, представени до този момент, подсказват неблагоприятното прогностично значение на високата експресия на WT1 при пациенти с ОМЛ. Едно от обясненията за неблагоприятния прогностичен ефект на WT1 са данните на Yamagami et al, 1996, според които растежът на левкемичните области може да бъде подтиснат *in vitro* посредством намаляване количеството

на wt1 чрез прилагане на antisense олигодеоксинуклеотиди. В повечето случаи намалената експресия на WT1 води до намалена пролиферация на левкемичните бласти и бързо настъпване на апоптоза. По този начин експресията на WT1 поддържа пролиферацията на левкемичните бласти. От друга страна експресия на WT1 в клетъчната линия K562 защитава клетките от апоптоза, причинена от прилагането на цитостатици, като доксорубин и етопозид.

Друго възможно обяснение за неблагоприятната прогностична роля на експресията на WT1 е нейното модулиране от множество фактори, като FLT3 мутациите, сурвивин, NFκB, bcl2 и други.

FLT3 представлява рецептор на тирозин киназа клас III, който участва в сигнални пътища, регулиращи процесите на пролиферация на клетките и инхибиране на апоптозата. FLT3-ITD са най-честите единични мутации, които се установяват при пациенти с ОМЛ, като тяхната честота варира между 13% и 32% (Nakao et al, 1996; Kiyoi et al, 1999; Abu-Duhier et al, 2000; Kottaridis et al, 2001; Stirewalt et al, 2001; Thiede et al, 2002; Frohling et al, 2002; Schnittger et al, 2002; Steudel et al, 2003). Според нашите данни наличието на FLT3-ITD може да бъде установено при 32.7% от пациентите с ОМЛ. Беше установено, че левкоцитният брой и степента на бластна инфилтрация в периферната кръв статистически значимо зависят от наличието на FLT3-ITD. Тези данни могат да бъдат обяснени с активиране на JAK-STAT сигналната каскада от FLT3-ITD. Въпреки че не беше установена статистически значима връзка между експресията на FLT3-ITD и честотата на постигане на CR, липсата на този молекулярен маркер води до по-продължителна преживяемост на пациентите с ОМЛ. Тези наши данни потвърждават резултатите на други авторски колективи (Frohling et al, 2002; Kottaridis et al, 2001; Whitman et al, 2001).

Беше наблюдавана значителна корелация между FLT3-ITD и висока експресия на WT1 при пациенти с нормален кариотип. Тези данни потвърждават резултатите на други авторски колективи (Barragan et al, 2004; Gaiger et al, 1998; Whitman et al, 2010; Shimada et al, 2012). Тъй като FLT3-ITD и WT1 са антиапоптотични молекулярни маркери, може да се предположи, че тяхната едновременна експресия може да доведе до поява на пролифериращи

левкемични бласти с нарушена диференциация и потисната програмирана клетъчна смърт. С това може да бъде обяснено значително по-честото постигане на CR и по-дълготрайните OS и DFS при Пациенти, при които не са експресирани и двата молекулярни маркера, в сравнение с тези Пациенти, при които е налице тяхната експресия.

При осем случая (34,8%) не беше установена експресия на WT1, въпреки наличието на FLT3-ITD. При тези пациенти също беше наблюдаван незначителен терапевтичен отговор. Липсата на WT1 експресия при наличие на FLT3-ITD може да бъде частично обяснена посредством наличие на мутации в WT1. Честотата на мутациите в WT1 при пациенти с ОМЛ варират около 10% (Summers et al, 2007; King-Underwood et al, 1996; Virappane et al, 2008; Paschka et al, 2008; Gaidzik et al, 2009; Renneville et al 2009; Thiede et al, 2008; Spinelli et al, 2008; Hollink et al, 2009; Abbas et al, 2008). Мутациите засягат предимно екзон 7 и 9 на WT1 и много рядко се наблюдават в комбинация с благоприятни хромозомни аномалии, като  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $inv(16)(p13q22)$  или  $t(16;16)(p13;q22)$ . Тези мутации могат да се установят в комбинация с хромозомни отклонения, свързани с неблагоприятен цитогенетичен риск, като  $t(7;11)(p15;p15)$  – Chou et al, 2009.

Според повечето изследователски колективи наличието на мутации в WT1 представлява неблагоприятен прогностичен фактор при пациенти с ОМЛ. Наличието на тези аномалии води до по-рядко постигане на CR и по-висока честота на химиорезистентно заболяване (Virappane et al, 2008). Пациентите с мутации в WT1 имат по-висок риск от настъпване на рецидив, което води до по-краткотрайна DFS и OS. При провеждане на мултивариационен анализ, наличието на мутации в WT1 запазва своето независимо неблагоприятно прогностично значение. Според Paschka et al, въпреки че честотата на постигане на CR не се определя от наличието на молекулярните аномалии, пациентите с мутации в WT1 имат трикратно по-висок риск от настъпване на рецидив и летален изход отколкото останалите болни. При около 90% от пациентите с молекулярните аберации се наблюдава рецидив в рамките на 9 месеца след постигане на CR. При нито един от пациентите с WT1-мутации, при които е

регистрирано резистентно заболяване или е установен рецидив, не е постигнат клиничен успех с прилагане на високо-дозови спасителни терапевтични режими. Според други автори, обаче, при пациентите с мутации в WT1 и нормален кариотип не се установява по-висок риск от настъпване на рецидив, но при болни с наличие на мутации в WT1 и присъствие на FLT3-ITD се наблюдават по-краткотрайни DFS и OS (Gaidzik et al, 2009). Според някои автори е налице значителна корелация между наличието на FLT3-ITD и присъствието на мутации в WT1 при пациенти с ОМЛ (Gaidzik et al, 2009; Renneville et al, 2009). Тези данни, обаче, не се подкрепят от други изследователски колективи, които не установяват корелация между молекулярните аберации (Virappane et al, 2008; Paschka et al, 2008).

Наблюдаваните различия между изследователските групи могат да бъдат обяснени с различните терапевтични протоколи, които се прилагат в различните хематологични центрове по света. Сравнявайки различните терапевтични протоколи, налице е съществена разлика по отношение на дозата на Цитозар, приложен в хода на консолидиращата терапия. При английските терапевтични протоколи кумулативната доза на Цитарабин е относително ниска (1-8 гр/м<sup>2</sup>) - Virappane et al, 2008. В американските хематологични центрове кумулативната доза на Ага-С е също относително ниска 13-25 гр/м<sup>2</sup> (Paschka et al, 2008). В германските хематологични болници прилаганата кумулативна доза на Цитозар е висока 18-54 гр/м<sup>2</sup>, като повечето пациенти получават цитостатика в дози, надхвърлящи 36 гр/м<sup>2</sup>. Тези данни подсказват, че негативното прогностично значение на мутациите в WT1 може да бъде преодоляно чрез прилагане на консолидираща терапия, включваща приложение на високи дози Цитозар, особено в групата пациенти с ОМЛ, при които не се установява FLT3-ITD.

Честотата и прогностичното значение на мутациите в WT1 са изследвани и при деца с ОМЛ (Hollink et al, 2009; Miyagawa et al, 1999; Willasch et al, 2009). Общата честота на мутациите при децата с ОМЛ е била 12%, което е сходно с възрастните пациенти. Честотата на мутациите, обаче, при деца с ОМЛ и нормален кариотип е 22%, което е по-високо в сравнение с възрастните индивиди. Наличието на WT1-мутации при деца с ОМЛ води до по-висока

експресия на WT1 (Staffas A et al, 2011), както и до по-висок риск от рецидив и по-краткотрайни DFS и OS. Тези данни, обаче, не се потвърждават от други изследователски колективи (Pollard et al, 2008; Ho et al, 2010; Staffas A et al, 2011). Наблюдавана е и значителна корелация между присъствието на FLT3-ITD и наличието на молекулярни аберации в структурата на WT1, като наличието на двете молекулярни аномалии е довело до изключително неблагоприятен ход на заболяването (Hollink et al, 2009). Според някои автори мутациите в WT1 губят своята неблагоприятна прогностична стойност в присъствието на FLT3-ITD (Pollard et al, 2008; Ho et al, 2010; Staffas A et al, 2011). Децата с ОМЛ, при които се установяват мутации в WT1, но липсва FLT3-ITD, имат сходна продължителност на DFS и OS в сравнение с пациентите, при които не се установяват и двете молекулярни аберации.

Наличието на FLT3-ITD и/или висока експресия на WT1 към момента на поставяне на диагнозата е неблагоприятен прогностичен белег. Установяването на двата молекулярни маркера (WT1 и/или FLT3-ITD) може да се окаже важно за установяване на ОМЛ пациенти с висок риск, при които е необходимо да бъдат приложени по-интензивни терапевтични стратегии.

В нашето проучване експресията на MDR1-гена беше установена при 56,4% от всички пациенти с de novo ОМЛ. Резултатите от това проучване подкрепят данните на други изследователи (Balacenko et al, 2002; Генова, М., Балаценко, Г., 2003). Нашите данни не показаха статистически достоверна корелация в експресията на WT1- и MDR-гените. Според други авторски колективи, обаче, съществува значителна корелация в експресията на WT1- и MDR1-гените (Galimberti et al, 2004; Xu et al, 2008). Вероятното обяснение за тези наблюдавани различия е в прилагането на различни техники за изследване на молекулярните маркери (RT-PCR vs q-RT-PCR).

Нашите данни показват статистически достоверна корелация между експресията на NFκB и силната експресия на Wt1. NF-κB представлява транскрипционен фактор, който най-често се разполага в клетъчната цитоплазма под формата на неактивен хетеротример, състоящ се от три субединици: 50, 65 и IκBa. Експресията на NF-κB води до клетъчна

резистентност спрямо действието на различни цитотоксични вещества. Експресията на NF- $\kappa$ B беше регистрирана при 52% от пациентите с ОМЛ, като експресията на NF- $\kappa$ B и високата експресия на Wt1 беше наблюдавана при 32% (8/15) от Пациентите. Липсата на експресия на Wt1 при наличие на NF- $\kappa$ B се установява при 38,4% (5/13) от NF- $\kappa$ B положителните пациенти, което може да бъде частично обяснено с наличие на мутации в WT1. Въпреки ниския брой на изследваните пациенти, едновременната експресия на Wt1 и NF- $\kappa$ B представлява неблагоприятен прогностичен белег, водещ до постигането на CR при едва 12,5% (1/8) от пациентите с ОМЛ. Доколкото е известно, това е първото проучване, макар и проведено върху ограничен брой пациенти с ОМЛ, при което се установява връзка между експресиите на тези протеинни маркери. Едновременната експресия на NF- $\kappa$ B и високата експресия на Wt1 може да се обясни с наличието на свързващи места за p50 и p65 субединиците на NF- $\kappa$ B в областта на промотора на WT1 (Dehbi et al, 1998). Регулацията на експресията на промотора на WT1 е комплексна. Установено е, че експресията на промотора на WT1 може да бъде регулирана от синергичното действие на NF- $\kappa$ B и други транскрипционни фактори, като Sp1, GATA-1, Pax-2 и Pax-8 (Wu et al., 1995; Dehbi et al., 1996; Cohen et al., 1997).

Бортезомибът (PS-341, Velcade®) представлява протеозомен инхибитор, който оказва антипролиферативен и проапоптоичен ефект, блокира клетъчното делене във фаза G2 и инхибира експресията на WT1 в някои клетъчни линии (Galimberti et al, 2008). Първоначалните проучвания показаха, че чувствителни на действието на Бортезомиб са левкемичните бласти, които имат миеломоноцитна диференциация (Riccioni et al, 2007). Впоследствие се установило, че Бортезомиб инхибира Sp1/NF- $\kappa$ B сигнална верига, което води до намаляване активността на ДНК-метилтрансферазата (Liu et al, 2008). Прилагането на Бортезомиб води до инактивиране на експресията на NF- $\kappa$ B и WT1 *in vitro* в клетките на клетъчна линия P39 с произход хронична миеломоноцитна левкемия (Galimberti et al, 2008). Комбинацията между Бортезомиб и вориностат води до синергично инхибиране експресията на WT1 в клетъчни линии P39 и MO7-e с произход мегакариобластна левкемия.

Комбинацията между Бортезомиб и ITF2357 (също инхибитор на хистон деацетилазата) не потиска експресията на NF- $\kappa$ B, но води до намалена експресия на WT1 в клетките на клетъчна линия P39 (Savli et al, 2008). Прилагането на Бортезомиб в комбинация с панобиностат (инхибитор на хистон деацетилазата) *in vitro* има синергичен ефект и води до потискане на bcl-2, вероятно чрез инхибиране NF- $\kappa$ B сигналната верига при адриамицин резистентна HL60 клетъчна линия и проби от пациенти с рефрактерна ОМЛ (Jiang XJ, et al, 2012). Подобни резултати са наблюдавани и при прилагането на Бортезомиб и белиностат, който също е инхибитор на хистон деацетилазата (Day et al, 2011). Авторските колективи, оглавявани от Jiang XJ и Day, не са проучили експресията на WT1 при комбинираното приложение на Бортезомиб и панобиностат/белонистат, но би могло да се предположи, че синергичното действие на тези препарати ще доведе до понижаване експресията на WT1.

При потвърждаване на тези резултати *in vivo* би могло да се предположи, че прилагането на Бортезомиб в комбинация с инхибитори на хистон деацетилазата и стандартна полихимиотерапия, включваща цитозар и антрациклини, би могло да бъде нова терапевтична стратегия при лечението на пациенти с ОМЛ и висока експресия на WT1 към момента на поставяне на диагнозата.

Понастоящем в клиничните центрове по целия свят се провеждат множество проучвания върху пациенти с ОМЛ, като част от лечението на тези пациенти включва прилагането на Бортезомиб.

Беше проведен унивариационен анализ върху множество параметри, като цитогенетични отклонения, експресия на FLT3-ITD, WT1, сурвивин, MDR1 и NF- $\kappa$ B, които имат статистически значима роля за продължителността на OS и DFS. Според нашите данни липсващата или слаба експресия на WT1, както и липсата на FLT3-ITD, имат статистически значима роля за продължителността на OS при пациенти под 60-годишна възраст. Също така беше наблюдавана и тенденция за по-продължителна DFS при пациенти с ниска или липсваща експресия на WT1 под 60 годишна възраст. Вероятно, поради малкия брой на

изследваните пациенти и недостатъчно интензивна консолидираща терапия, не беше достигната статистическа значимост.

Накрая на дисертационния труд, беше проведен Cox регресионен анализ, посредством който беше оценено прогностичното значение на високата експресия на WT1 и експресията на FLT3-ITD за продължителността на OS. В комбинация с FLT3-ITD, високата експресия на WT1 губи своето независимо неблагоприятно прогностично значение. Вероятно, неблагоприятното прогностично значение на FLT3-ITD до голяма степен се опосредства чрез високата експресия на WT1 при Пациентите под 60-годишна възраст. От друга страна, експресията на WT1 би могла да бъде използвана като маркер на МРБ, при пациенти с наличие на FLT3-ITD.

## **VI. ОБОБЩАВАЩИ ИЗВОДИ**

1. Експресията на WT1 следва да се приеме за биомаркер, който отграничава левкемичните от нормални хемопоетични клетки, тъй като се установява при над 70% от пациентите с ОМЛ към момента на поставяне на диагнозата, при липсваща експресия в периферната кръв и костния мозък на здрави индивиди.
2. Тъй като е налице много добра корелация между експресията на WT1 и wt1, в клиничната практика за оценка на биомаркера могат да се използват както имунологични, така и молекулярни методи с еквивалентна информативност.
3. Високата експресията на WT1 корелира с незрял и аберантен фенотип на левкемичните бласти и висока степен на ангажиране на костния мозък и периферната кръв
4. Установената корелация между Експресията на WT1 и тази на NF-κB, както и наличие на FLT3-ITD, предполага директно или индиректно взаимодействие на биомаркерите помежду им или участието им в общи пътища на сигнална трансдукция. Липсата на корелация с други молекулярни аномалии с доказана неблагоприятна прогностична значимост (сурвивин и MDR1) предполага особености в биологията на заболяването и вариации в механизмите на левкемогенезата.
5. Експресията на WT1 може да бъде използвана като метод за риск-стратифициране на пациентите с ОМЛ с цел индивидуализиране на терапевтичния подход. Пациентите с ниска или липсваща експресия на молекулярния маркер имат по-благоприятен клиничен ход на заболяването, свързан с по-висока честота на постигане на CR след приложение на конвенционална химиотерапия, по-продължителни OS и DFS. Високата експресия на WT1 към момента на поставяне на диагнозата налага по-често използване на интензивни индукционни терапевтични режими.
6. WT1 няма независима неблагоприятна прогностична роля при пациентите с ОМЛ. Този маркер опосредства прогностичното значение на други гени или протеини, които участват в процесите на малигнена трансформация.

## VII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Abbas S, Erpelinck-Verschueren CA, Goudswaard CS, Lowenberg B, Valk PJ. Mutant Wilms' tumor 1 (WT1) mRNA with premature termination codons in acute myeloid leukemia (AML) is sensitive to nonsense-mediated RNA decay (NMD). *Leukemia*. 2010;24:660-663.
2. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 2000 Oct;111:190–5.
3. Al-Adnani M, Williams S, Anderson J, Ashworth M, Malone M, Sebire NJ. Immunohistochemical nuclear positivity for wt1 in childhood acute myeloid leukemia. *Fetal Pediatr Pathol* 2007;26:193–7.
4. Alberta JA, Springett GM, Rayburn H, Natoli TA, Loring J, Kreidberg JA et al. Role of the WT1 tumor suppressor in murine hematopoiesis. *Blood* 2003; 101: 2570–2574.
5. Algar EM, Khromykh T, Smith SI, Blackburn DM, Bryson GJ, Smith PJ. A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene*. 1996;12:1005-1014.
6. Alimena G, Breccia M, Musto P, Cilloni D, D'Auria F, Latagliata R, Sanpaolo G, Gottardi E, Saglio G, Mandelli F. Erythroid response and decrease of WT1 expression after proteasome inhibition by bortezomib in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2011 Apr;35(4):504-7.
7. Archimbaud E, Leblond V, Fenaux P, Dombret H, Cordonnier C, Dreyfus F, Cony-Makhoul P, Tilly H, Troussard X, Auzanneau G, Thomas X, Ffrench M, Marie JP. Timed sequential chemotherapy for advanced acute myeloid leukemia.
8. Baird, P. N. et P. J. Simmons. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp Hematol*, 25, 1997, №4, 312-320.
9. Balatzenko G, Stoimenov A, Guenova M, Galabova I, Ganeva P, Hodjadjik D, Toshkov S. Application of reverse transcription polymerase chain reaction for analysis of multidrug resistance in patients with acute myeloblastic leukemia. *J BUON*. 2002 Oct-Dec;7(4):355-9.
10. Barragan E, Cervera J, Bolufer P, Ballester S, Marti'n G, Ferná'ndez P, et al. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004;89:926–33.
11. Bellon M, Nicot C. Central role of PI3K in transcriptional activation of hTERT in HTLV-I-infected cells. *Blood*. 2008;112:2946-2955.
12. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M-T., Flandrin G., Galton D.A.G. & Sultan C. (1985a) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukaemia. *Annals of Internal Medicine*, 103, 626-629.

13. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M-T., Flandrin G., Galton D.A.G. & Sultan C. (1985b) Criteria for the diagnosis of acute leukaemia of megakaryocytic lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine*, 103, 460-462.
14. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M-T., Flandrin G., Galton D.A.G. & Sultan C. (1991) Proposals for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). *British Journal of Haematology*, 78, 325-329.
15. 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 Aug;33(4):451-8.
16. Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E, Hoelzer D. High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood*. 1997 Aug 1;90(3):1217-25.
17. Berman E, Heller G, Santorsa J, McKenzie S, Gee T, Kempin S, Gulati S, Andreeff M, Kolitz J, Gabrilove J, et al. Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood*. 1991 Apr 15;77(8):1666-74.
18. Bhalla K, Ibrado AM, Tourkina E, Tang C, Grant S, Bullock G, et al. High-dose mitoxantrone induces programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Blood* 1993; 82:3133-40.
19. Bishop JF, Matthews JP, Young GA, Szer J, Gillett A, Joshua D, Bradstock K, Enno A, Wolf MM, Fox R, et al. A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1996 Mar 1;87(5):1710-7.
20. Bor YC, Swartz J, Morrison A, Rekosh D, Lodomery M, Hammarskjold ML. The Wilms' tumor 1 (WT1) gene (+KTS isoform) functions with a CTE to enhance translation from an unspliced RNA with a retained intron. *Genes Dev*. 2006;20:1597-1608.
21. Bøyum, A Isolation of leucocytes from human blood - further observations. (Paper II). *Scand J Clin Lab Invest* 21, 1968, Suppl, 97, 31-50.
22. Bøyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. (Paper IV). *Scand J Clin Lab Invest* 21, 1968, Suppl, 97, 77-89.
23. Brieger J, Weidmann E, Fenchel K, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L. The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells. *Leukemia* 1994; 8: 2138-2143.
24. Call, K. M., et al. Isolation and characterization of a „zinc finger” polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, 60, 1990, №3, 509-520.

25. Campbell CE, Huang A, Gurney AL, Kessler PM, Hewitt JA, Williams BR. Antisense transcripts and protein binding motifs within the Wilms tumour (WT1) locus. *Oncogene*. 1994;9:583-595.
26. Cao XM, Koski RA, Gashler A, et al. Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol Cell Biol*. 1990;10:1931-1939.
27. Carapeti, M., J. M. Goldman et N. C. Cross. Dominant-negative mutations of the Wilms' tumour predisposing gene (WT1) are infrequent in CML blast crisis and de novo acute leukaemia. *Eur J Haematol*, 58, 1997, №5, 346-349.
28. Caricasole A, Duarte A, Larsson SH, et al. RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:7562-7566.
29. Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, Schiffer CA, Bennett JM, Bloomfield CD et al. Report of the National Cancer Institutesponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 1990; 8: 813–819.
30. Chiusa L, Francia di Celle P, Campisi P, Ceretto C, Marmont F, Pich A. Prognostic value of quantitative analysis of WT1 gene transcripts in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2006; 91: 270–271.
31. Chou WC, Chen CY, Hou HA, et al. Acute myeloid leukemia bearing t(7;11)(p15;p15) is a distinct cytogenetic entity with poor outcome and a distinct mutation profile: comparative analysis of 493 adult patients. *Leukemia* 2009; 23: 1303–1310.
32. Cilloni D, Gottardi E, de Micheli D, Serra A, Volpe G, Messa F, et al. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* 2002;16:2115–21.
33. Cohen HT, Bossone SA, Zhu G, McDonald GA, Sukhatme VP. Sp1 is a critical regulator of the Wilms' tumor-1 gene. *J Biol Chem*. 1997;272:2901-2913.
34. Cook DM, Hinkes MT, Bernfield M, Rauscher III FJ. Transcriptional activation of the syndecan-1 promoter by the Wilms' tumor protein WT1. *Oncogene* 1996; 13: 1789–1799.
35. Dai Y, Chen S, Wang L, Pei XY, Kramer LB, Dent P, Grant S. Bortezomib interacts synergistically with belinostat in human acute myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia cells in association with perturbations in NF- $\kappa$ B and Bim. *Br J Haematol*. 2011 Apr;153(2):222-35.
36. Dame C, Kirschner KM, Bartz KV, Wallach T, Hussels CS, Scholz H. Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. *Blood* 2006; 107: 4282–4290.

37. Dehbi M, Ghahremani M, Lechner M, Dressler G, Pelletier J. The paired-box transcription factor, PAX2, positively modulates expression of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Oncogene*. 1996;13:447-453.
38. Dehbi M, Hiscott J, Pelletier J. Activation of the wt1 Wilms' tumor suppressor gene by NF-kappaB. *Oncogene*. 1998 Apr 23;16(16):2033-9.
39. Dehbi M, Pelletier J. PAX8-mediated activation of the wt1 tumor suppressor gene. *Embo J*. 1996;15:4297-4306.
40. Dejong V, Degeorges A, Filleur S, Ait-Si-Ali S, Mettouchi A, Bornstein P et al. The Wilms' tumor gene product represses the transcription of thrombospondin 1 in response to overexpression of c-Jun. *Oncogene* 1999; 18: 3143–3151.
41. Dennis SL, Manji SS, Carrington DP, Scarcella DL, Ashley DM, Smith PJ et al. Expression and mutation analysis of the Wilms' tumor 1 gene in human neural tumors. *Int J Cancer* 2002; 97: 713–715.
42. Deuel TF, Guan LS, Wang ZY. Wilms' tumor gene product WT1 arrests macrophage differentiation of HL-60 cells through its zinc-finger domain. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 192–196.
43. Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI, Sukhatme VP, Rauscher III FJ. Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science* 1992; 257: 674–678.
44. Dutton JR, Lahiri D, Ward A. Different isoforms of the Wilms' tumour protein WT1 have distinct patterns of distribution and trafficking within the nucleus. *Cell Prolif*. 2006;39:519-535.
45. Eccles MR, Grubb G, Ogawa O, Szeto J, Reeve AE. Cloning of novel Wilms tumor gene (WT1) cDNAs; evidence for antisense transcription of WT1. *Oncogene*. 1994;9:2059-2063.
46. Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, Scadden DT, Haber DA. The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO J* 2001; 20: 1897–1909.
47. Englert C, Hou X, Maheswaran S, Bennett P, Ngwu C, Re GG et al. WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J* 1995; 14: 4662–4675
48. Fallat ME, Donahoe PK. Intersex genetic anomalies with malignant potential. *Curr Opin Pediatr*. 2006;18:305-311.
49. Foon KA, Gale RP: Therapy of acute myelogenous leukaemia. *Blood Rev* 6:15, 1992
50. Fraizer G, Leahy R, Priyadarshini S, Graham K, Delacerda J, Diaz M. Suppression of prostate tumor cell growth in vivo by WT1, the Wilms' tumor suppressor gene. *Int J Oncol* 2004; 24: 461–471.

51. Fraizer GC, Wu YJ, Hewitt SM, et al. Transcriptional regulation of the human Wilms' tumor gene (WT1). Cell type-specific enhancer and promiscuous promoter. *J Biol Chem.* 1994;269:8892-8900.
52. Frohling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16–60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002;100:4372–80.
53. Furuhata A, Murakami M, Ito H, et al. GATA-1 and GATA-2 binding to 3' enhancer of WT1 gene is essential for its transcription in acute leukemia and solid tumor cell lines. *Leukemia.* 2009;23:1270-1277.
54. Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, et al. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood.* 2009;113:4505-4511.
55. Galimberti S, Canestraro M, Pacini S, Fazzi R, Orciuolo E, Trombi L, Mattii L, Battolla B, Capodanno A, Collecchi P, Veroni F, Simi P, Piaggi S, Casini A, Petrini M. PS-341 (Bortezomib) inhibits proliferation and induces apoptosis of megakaryoblastic MO7-e cells. *Leuk Res.* 2008 Jan;32(1):103-12. Epub 2007 Jul 16.
56. Galimberti S, Canestraro M, Savli H, Palumbo GA, Nagy B, Di Raimondo F, Petrini M. BORTEZOMIB IS ABLE TO INACTIVATE NF-KB AND DOWN-REGULATE WT1 GENE IN P39 CELL LINE: A POSSIBLE USE IN HIGH-RISK MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES. *Haematologica* 2008; 93(s1):280 Abs.0697
57. Galimberti S, et al. Significant co-expression of WT1 and MDR1 genes in acute myeloid leukemia patients at diagnosis. *Eur J Haematol.*, 72, 2004, №1, 45-51.
58. Gashler AL, Bonthron DT, Madden SL, Rauscher III FJ, Collins T, Sukhatme VP. Human platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms tumor suppressor WT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10984–10988.
59. Gessler M, Bruns GA. Sequence of the WT1 upstream region including the Wit-1 gene. *Genomics.* 1993;17:499-501.
60. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature.* 1990;343:774-778.
61. Goodyer P, Dehbi M, Torban E, Bruening W, Pelletier J. Repression of the retinoic acid receptor-alpha gene by the Wilms' tumor suppressor gene product, wt1. *Oncogene* 1995; 10: 1125–1129.

62. Gorczyca W, Bigman K, Mittelman A, Ahmed T, Gong J, Melamed MR, et al. Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. *Leukemia* 1993;7:659–70.
63. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities amongst 5,876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116(3):354–65.
64. Gu W, Chen Z, Hu S, Shen H, Qiu G, Cao X. Changes in expression of WT1 isoforms during induced differentiation of the NB4 cell line. *Haematologica* 2005; 90: 403–405.
65. H. Savli, S. Galimberti, M. Canestraro, B. Nagy, G. A. Palumbo, M. Petrini. Bortezomib combined with histone deacetylase inhibitor ITF2357 or arsenic trioxide exerts synergistic anti-proliferative and pro-apoptotic effect on P39 cells. *J Clin Oncol* 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 18022).
66. Haber DA, Buckler AJ, Glaser T, et al. An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell*. 1990;61:1257-1269.
67. Haber DA, Park S, Maheswaran S, Englert C, Re GG, Hazen-Martin DJ et al. WT1-mediated growth suppression of Wilms tumor cells expressing a WT1 splicing variant. *Science* 1993; 262: 2057–2059.
68. Haber, D. A. et al. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88, 1991, №21, 9618-9622.
69. Haber, D. A. et al. An internal deletion within an 11p13 „zinc finger” gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell*, 61, 1990, №7, 1257-1269.
70. Han Y, San-Marina S, Liu J, Minden MD. Transcriptional activation of c-myc proto-oncogene by WT1 protein. *Oncogene* 2004; 23: 6933–6941.
71. Hänel M, Friedrichsen K, Hänel A, Herbst R, Morgner A, Nesper S, Nicklisch M, Teich M, Ehninger G, Fiedler F. Mito-flag as salvage therapy for relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Onkologie*. 2001 Aug;24(4):356-60.
72. Harrington MA, Konicek B, Song A, Xia XL, Fredericks WJ, Rauscher III FJ. Inhibition of colony-stimulating factor-1 promoter activity by the product of the Wilms' tumor locus. *J Biol Chem* 1993; 268: 21271–21275.
73. Harris, N. L. et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.*, 17, 1999, №12, 3835-3849.
74. Hartkamp J, Carpenter B, Roberts SG. The Wilms' tumor suppressor protein WT1 is processed by the serine protease HtrA2/Omi. *Mol Cell*. 2010;37:159-171.

75. Heckman C, Mochon E, Arcinas M, Boxer LM. The WT1 protein is a negative regulator of the normal bcl-2 allele in t(14;18) lymphomas. *J Biol Chem* 1997; 272: 19609–19614.
76. Heil G, Krauter J, Raghavachar A, Bergmann L, Hoelzer D, Fiedler W, Lübbert M, Noens L, Schlimok G, Arnold R, Kirchner H, Ganser A. Risk-adapted induction and consolidation therapy in adults with de novo AML aged  $\leq 60$  years: results of a prospective multicenter trial. *Ann Hematol.* 2004 Jun;83(6):336-44. Epub 2004 Mar 18.
77. Herzer U, Crocoll A, Barton D, Howells N, Englert C. The Wilms tumor suppressor gene wt1 is required for development of the spleen. *Curr Biol.*1999;9:837-840.
78. Hewitt SM, Fraizer GC, Saunders GF. Transcriptional silencer of the Wilms' tumor gene WT1 contains an Alu repeat. *J Biol Chem.* 1995;270:17908-17912.
79. Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher III FJ, Saunders GF. Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and cmyc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res* 1995; 55: 5386–5389.
80. Hiddemann W, Kreutzmann H, Straif K, Ludwig WD, Mertelsmann R, Donhuijsen-Ant R, Lengfelder E, Arlin Z, Büchner T. High-dose cytosine arabinoside and mitoxantrone: a highly effective regimen in refractory acute myeloid leukemia. *Blood.* 1987 Mar;69(3):744-9.
81. Ho PA, Zeng R, Alonzo TA, Gerbing RB, Miller KL, Pollard JA, Stirewalt DL, Heerema NA, Raimondi SC, Hirsch B, Franklin JL, Lange B, Meshinchi S. Prevalence and prognostic implications of WT1 mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group. *Blood.* 2010 Aug 5;116(5):702-10.
82. Hofmann W, Royer HD, Drechsler M, Schneider S, Royer-Pokora B. Characterization of the transcriptional regulatory region of the human WT1 gene. *Oncogene.* 1993;8:3123-3132.
83. Hollink IH, van den Heuvel-Eibrink MM, Zimmermann M, et al. Clinical relevance of Wilms tumor 1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood.* 2009;113:5951-5960.
84. Hosen, N. et al. Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br J Haematol*, 116, 2002, №2, 409-20.
85. Hosono S, Gross I, English MA, Hajra KM, Fearon ER, Licht JD. E-cadherin is a WT1 target gene. *J Biol Chem* 2000; 275: 10943–10953.
86. Hossain A, Nixon M, Kuo MT, Saunders GF. N-terminally truncated WT1 protein with oncogenic properties overexpressed in leukemia. *J Biol Chem.*2006;281:28122-28130.

87. Im HJ, Kong G, Lee H. Expression of Wilms tumor gene (WT1) in children with acute leukemia. *Pediatr Hematol Oncol.* 1999 Mar-Apr;16(2):109-18.
88. Inoue, K. et al. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood.* 89, 1997, №4, 1405-1412.
89. Inoue, K. et al. Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood,* 88, 1996, №6, 2267-2278.
90. Ito K, Oji Y, Tatsumi N, Shimizu S, Kanai Y, Nakazawa T et al. Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene* 2006; 25:4217–4229.
91. Jaffe E.S., N.L. Harris, H. Stein, J.W. Vardiman. 2001. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press. Lyon
92. Jiang XJ, Huang KK, Yang M, Qiao L, Wang Q, Ye JY, Zhou HS, Yi ZS, Wu FQ, Wang ZX, Zhao QX, Meng FY. Synergistic effect of panobinostat and bortezomib on chemoresistant acute myelogenous leukemia cells via AKT and NF- $\kappa$ B pathways. *Cancer Lett.* 2012 Dec 30;326(2):135-42.
93. Johnstone RW, See RH, Sells SF, Wang J, Muthukkumar S, Englert C et al. A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 6945–6956.
94. Karakas T, Miething CC, Maurer U, Weidmann E, Ackermann H, Hoelzer D, Bergmann L. The coexpression of the apoptosis-related genes bcl-2 and wt1 in predicting survival in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2002 May;16(5):846-54.
95. Kent J, Coriat AM, Sharpe PT, Hastie ND, van Heyningen V. The evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates. *Oncogene.* 1995;11:1781-1792.
96. Kerst G, Bergold N, Gieseke F, Coustan-Smith E, Lang P, Kalinova M, Handgretinger R, Trka J, Müller I. WT1 protein expression in childhood acute leukemia. *Am J Hematol.* 2008 May;83(5):382-6.
97. King-Underwood L, Little S, Baker M, Clutterbuck R, Delassus S, Enver T et al. Wt1 is not essential for hematopoiesis in the mouse. *Leuk Res* 2005; 29: 803–812.
98. King-Underwood L, Pritchard-Jones K. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood* 1998;91:2961–8.
99. King-Underwood L, Renshaw J, Pritchard-Jones K. Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. *Blood* 1996; 87: 2171–2179.

100. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999 May 1;93:3074–80.
101. Klamt B, Koziell A, Poulat F, et al. Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Hum Mol Genet.* 1998;7:709-714.
102. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001;98:1752–9.
103. Kreuzer, K. A. et al. Fluorescent 5'-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumour gene (WT1) mRNA: implications for monitoring human leukaemias. *Br J Haematol.*, 114, 2001, №2, 313-318.
104. Kudoh T, Ishidate T, Moriyama M, Toyoshima K, Akiyama T. G1 phase arrest induced by Wilms tumor protein WT1 is abrogated by cyclin/CDK complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:4517-4521.
105. Laity JH, Chung J, Dyson HJ, Wright PE. Alternative splicing of Wilms' tumor suppressor protein modulates DNA binding activity through isoform-specific DNA-induced conformational changes. *Biochemistry* 2000; 39: 5341–5348.
106. Lapillonne H, Renneville A, Auvrignon A, Flamant C, Blaise A, Perot C, Lai JL, Ballerini P, Mazingue F, Fasola S, Dehée A, Bellman F, Adam M, Labopin M, Douay L, Leverger G, Preudhomme C, Landman-Parker J. High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2006 Apr 1;24(10):1507-15.
107. Larson RS, McCurley TL 3rd. CD4 predicts nonlymphocytic lineage in acute leukemia. Insights from analysis of 125 cases using two-color flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* 1995 Aug;104(2):204-11.
108. Larsson, S. H. et al. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell*, 81, 1995, №3, 391-401.
109. Lee SB, Haber DA. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res.* 2001;264:74-99.
110. Lee SB, Huang K, Palmer R, Truong VB, Herzlinger D, Kolquist KA et al. The Wilms tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell* 1999; 98: 663–673.
111. Li RS, Law GL, Seifert RA, Romaniuk PJ, Morris DR. Ornithine decarboxylase is a transcriptional target of tumor suppressor WT1. *Exp Cell Res* 1999; 247: 257–266.

112. Little M, Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat* 1997; 9: 209–225.
113. Liu S, Liu Z, Xie Z, Pang J, Yu J, Lehmann E, Huynh L, Vukosavljevic T, Takeki M, Klisovic RB, Baiocchi RA, Blum W, Porcu P, Garzon R, Byrd JC, Perrotti D, Caligiuri MA, Chan KK, Wu LC, Marcucci G. Bortezomib induces DNA hypomethylation and silenced gene transcription by interfering with Sp1/NF-kappaB-dependent DNA methyltransferase activity in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):2364-73.
114. Liu XW, Gong LJ, Guo LY, et al. The Wilms' tumor gene product WT1 mediates the down-regulation of the rat epidermal growth factor receptor by nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem*. 2001;276:5068-5073.
115. Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjana B, Buluwela L et al. Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res* 2001; 61: 921–925.
116. Loeb DM, Korz D, Katsnelson M, Burwell EA, Friedman AD, Sukumar S. Cyclin E is a target of WT1 transcriptional repression. *J Biol Chem* 2002; 277: 19627–19632.
117. Louache F, Debili N, Marandin A, Coulombel L, Vainchenker W: Expression of CD4 by human hematopoietic progenitors. *Blood* 84:3344, 1994
118. Luo XN, Reddy JC, Yeyati PL, Idris AH, Hosono S, Haber DA et al. The tumor suppressor gene WT1 inhibits ras-mediated transformation. *Oncogene* 1995; 11: 743–750.
119. Maheswaran S, Englert C, Bennett P, Heinrich G, Haber DA. The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev* 1995; 9: 2143–2156.
120. Maheswaran S, Park S, Bernard A, et al. Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:5100-5104.
121. Makrigiannakis A, Coukos G, Mantani A, et al. Expression of Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in human endometrium: regulation through decidual differentiation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:5964-5972.
122. Malik KT, Wallace JI, Ivins SM, Brown KW. Identification of an antisense WT1 promoter in intron 1: implications for WT1 gene regulation. *Oncogene*. 1995;11:1589-1595.
123. Marie J-P, ZiHoun R: Chemotherapy of acute myelogenous leukaemia. *Clin Haematol* 4:97, 1991
124. Matsuzawa-Watanabe Y, Inoue J, Semba K. Transcriptional activity of testis-determining factor SRY is modulated by the Wilms' tumor 1 gene product, WT1. *Oncogene*. 2003;22:7900-7904.

125. Maurer, U. et al. The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of CD34+ progenitors and downregulated early in the course of differentiation in vitro. *Exp Hematol.*, 25, 1997, №9, 945-950.
126. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, et al. Intensive post-remission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1994;331(14): 896-903.
127. Mayo MW, Wang CY, Drouin SS, Madrid LV, Marshall AF, Reed JC et al. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J* 1999; 18: 3990–4003.
128. McCann S, Sullivan J, Guerra J, Arcinas M, Boxer LM. Repression of the c-myc gene by WT1 protein in T and B cell lines. *J Biol Chem* 1995; 270: 23785–23789.
129. McConnell MJ, Cunliffe HE, Chua LJ, Ward TA, Eccles MR. Differential regulation of the human Wilms tumour suppressor gene (WT1) promoter by two isoforms of PAX2. *Oncogene.* 1997;14:2689-2700.
130. McMaster ML, Gessler M, Stanbridge EJ, Weissman BE. WT1 expression alters tumorigenicity of the G401 kidney-derived cell line. *Cell Growth Differ* 1995; 6: 1609–1617.
131. Menke AL, Shvarts A, Riteco N, van Ham RC, van der Eb AJ, Jochemsen AG. Wilms' tumor 1-KTS isoforms induce p53-independent apoptosis that can be partially rescued by expression of the epidermal growth factor receptor or the insulin receptor. *Cancer Res* 1997; 57: 1353–1363.
132. Menke AL, van der Eb AJ, Jochemsen AG. The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *Int Rev Cytol* 1998; 181: 151–212.
133. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Kari C, Schwartz S, Thiel E. Detection by monoclonal antibodies of the Wilms' tumor (WT1) nuclear protein in patients with acute leukemia. *Int J Cancer* 1997;70:518–23.
134. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, et al. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 1995;9:1060–7.
135. Menssen, H. D. et al. Wilms' tumor gene expression in human CD34+ hematopoietic progenitors during fetal development and early clonogenic growth. *Blood*, 89, 1997, №9, 3486-3487.
136. Miglino M, Colombo N, Pica G, Grasso R, Clavio M, Bergamaschi M, Ballerini F, Ghiso A, Ghiggi C, Mitscheunig L, Beltrami G, Cagnetta A, Vignolo L, Lucchetti MV, Aquino S, Pierri I, Sessarego M, Carella AM, Gobbi M. WT1 overexpression at diagnosis may predict favorable outcome in patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2011 Oct;52(10):1961-9.

137. Miles C, Elgar G, Coles E, Kleinjan DJ, van Heyningen V, Hastie N. Complete sequencing of the Fugu WAGR region from WT1 to PAX6: dramatic compaction and conservation of synteny with human chromosome 11p13. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:13068-13072.
138. Mitelman F, editor. *ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995*. Basel, Switzerland: S. Karger. 1995
139. Miwa H, Beran M, Saunders GF. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia*. 1992 May;6(5):405-9.
140. Miwa H, Mizutani M, Mahmud N, Yamaguchi M, Takahashi T, Shikami M, Shiku H, Tanaka I, Nakase K, Nasu K, Dohy H, Ueda T, Kamada N, Kita K. Biphasic expression of CD4 in acute myelocytic leukemia (AML) cells: AML of monocyte origin and hematopoietic precursor cell origin. *Leukemia*. 1998 Jan;12(1):44-51.
141. Miyagawa K, Hayashi Y, Fukuda T, Mitani K, Hirai H, Kamiya. Mutations of the WT1 gene in childhood nonlymphoid hematological malignancies. *Gene Chromosome Canc* 1999; 25: 176–183.
142. Miyagi, T. et al. Expression of the candidate Wilm's tumor gene, WT1, in human leukemia cells. *Leukemia*, 7, 1993, №7, 970-977.
143. Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development*. 1999;126:1845-1857.
144. Morrison DJ, English MA, Licht JD. WT1 induces apoptosis through transcriptional regulation of the proapoptotic Bcl-2 family member Bak. *Cancer Res* 2005; 65: 8174–8182.
145. Moshier JA, Skunca M, Wu W, Boppana SM, Rauscher III FJ, Dosescu J. Regulation of ornithine decarboxylase gene expression by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1149–1157.
146. Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell*. 1998;93:445-454.
147. Nakagama H, Heinrich G, Pelletier J, Housman DE. Sequence and structural requirements for high-affinity DNA binding by the WT1 gene product. *Mol Cell Biol*. 1995;15:1489-1498.
148. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996 Dec;10(12):1911-8.
149. Nakatsuka S, Oji Y, Horiuchi T, Kanda T, Kitagawa M, Takeuchi T et al. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Mod Pathol* 2006; 19: 804–814.

150. Natoli TA, McDonald A, Alberta JA, Taglienti ME, Housman DE, Kreidberg JA. A mammal-specific exon of WT1 is not required for development or fertility. *Mol Cell Biol.* 2002;22:4433-4438.
151. Nichols KE, Re GG, Yan YX, Garvin AJ, Haber DA. WT1 induces expression of insulin-like growth factor 2 in Wilms' tumor cells. *Cancer Res* 1995; 55: 4540–4543.
152. Nishida S, Hosen N, Shirakata T, Kanato K, Yanagihara M, Nakatsuka S et al. AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood* 2006; 107: 3303–3312.
153. Noronha SA, Farrar JE, Alonzo TA, Gerbing RB, Lacayo NJ, Dahl GV, Ravindranath Y, Arceci RJ, Loeb DM. WT1 expression at diagnosis does not predict survival in pediatric AML: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;53:1136–9.
154. Nurmemmedov E, Thunnissen M. Expression, purification, and characterization of the 4 zinc finger region of human tumor suppressor WT1. *Protein Expr Purif.* 2006;46:379-389.
155. Oji Y, Miyoshi S, Maeda H, Hayashi S, Tamaki H, Nakatsuka S et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer* 2002; 100: 297–303.
156. Oji Y, Miyoshi Y, Koga S, Nakano Y, Ando A, Nakatsuka S et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary thyroid cancer. *Cancer Sci* 2003; 94: 606–611.
157. Oji Y, Suzuki T, Nakano Y, Maruno M, Nakatsuka S, Jomgeow T et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary astrocytic tumors. *Cancer Sci* 2004; 95: 822–827.
158. Oji Y, Yamamoto H, Nomura M, Nakano Y, Ikeba A, Nakatsuka S et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 712–717.
159. Ostergaard, M. et al. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *Br J Haematol.* 125, 2004, №5, 590-600.
160. Owen C, Fitzgibbon J, Paschka P. The clinical relevance of Wilms Tumour 1 (WT1) gene mutations in acute leukaemia. *Hematol Oncol.* 2010;28:13-19.
161. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman, et al. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4595–4602.

162. Passegue E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:11842-11849.
163. Pastan, I. et M. Gottesman. Multiple-drug resistance in human cancer. N Engl J Med., 316, 1987, №22, 1388-1393.
164. Patmasiriwat P, Fraizer GC, Claxton D, Kantarjian H, Saunders GF. Expression pattern of WT1 and GATA-1 in AML with chromosome 16q22 abnormalities. Leukemia. 1996 Jul;10(7):1127-33.
165. Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. Science. 1991;252:809-817.
166. Phelan SA, Lindberg C, Call KM. Wilms' tumor gene, WT1, mRNA is down-regulated during induction of erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. Cell Growth Differ 1994; 5: 677-686.
167. Phillips GL, Reece DE, Shepherd JD, Barnett MJ, Brown RA, Frei-Lahr DA, Klingemann HG, Bolwell BJ, Spinelli JJ, Herzig RH, et al. High-dose cytarabine and daunorubicin induction and postremission chemotherapy for the treatment of acute myelogenous leukemia in adults. Blood. 1991 Apr 1;77(7):1429-35.
168. Pollard J, Zeng R, Ho P, et al. Prevalence and prognostic implications of WT1 mutations in pediatric AML: a report from the children's Oncology Group. Blood 2008; 112: 143 [abstract].
169. Poulat F, Morin D, Konig A, et al. Distinct molecular origins for Denys-Drash and Frasier syndromes. Hum Genet. 1993;91:285-286.
170. Rao MK, Pham J, Imam JS, et al. Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. Genes Dev. 2006;20:147-152.
171. Reddy JC, Hosono S, Licht JD. The transcriptional effect of WT1 is modulated by choice of expression vector. J Biol Chem 1995; 270: 29976-29982.
172. Renneville A, Boissel N, Zurawski V, et al. Wilms tumor 1 gene mutations are associated with a higher risk of recurrence in young adults with acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association. Cancer 2009; 115: 3719-3727.
173. Riccioni R, Senese M, Diverio D, Riti V, Buffolino S, Mariani G, Boe A, Cedrone M, Lo-Coco F, Foà R, Peschle C, Testa U. M4 and M5 acute myeloid leukaemias display a high sensitivity to Bortezomib-mediated apoptosis. Br J Haematol. 2007 Oct;139(2):194-205.
174. Richard DJ, Schumacher V, Royer-Pokora B, Roberts SG. Par4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1. Genes Dev. 2001;15:328-339.

175. Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 699–712.
176. Roberts CT, Jr. Control of insulin-like growth factor (IGF) action by regulation of IGF-I receptor expression. *Endocr J.* 1996;43 Suppl:S49-55.
177. Rong Y, Cheng L, Ning H, et al. Wilms' tumor 1 and signal transducers and activators of transcription 3 synergistically promote cell proliferation: a possible mechanism in sporadic Wilms' tumor. *Cancer Res.* 2006;66:8049-8057.
178. Ryan B, O'Donovan N, Browne B et al. Expression of survivin and its splice variants survivin-2B and survivin-DEx3 in breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 92: 120–124.
179. Sakamoto Y, Yoshida M, Semba K, Hunter T. Inhibition of the DNAbinding and transcriptional repression activity of the Wilms' tumor gene product, WT1, by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of Ser-365 and Ser-393 in the zinc finger domain. *Oncogene.* 1997;15:2001-2012.
180. Sanz MA, Montesinos P, Vellenga E, Rayón C, de la Serna J, Parody R, Bergua JM, León A, Negri S, González M, Rivas C, Esteve J, Milone G, González JD, Amutio E, Brunet S, García-Laraña J, Colomer D, Calasanz MJ, Chillón C, Barragán E, Bolufer P, Lowenberg B. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: long-term outcome of the LPA 99 multicenter study by the PETHEMA Group. *Blood.* 2008 Oct 15;112(8):3130-4. Epub 2008 Jul 29.
181. Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene.* 2001;273:141-161.
182. Schlenk R.F., A. Benner, F. Hartmann, F. del Valle, C. Weber, H. Pralle, J.T. Fischer, U. Gunzer, A. Pezzutto, W. Weber, W. Grimminger, J. Preiss, M. Hensel, S. Frohling, K. Dohner, R. Haas, H. Dohner; AML Study Group Ulm (AMLSG ULM). 2003. Risk-adapted postremission therapy in acute myeloid leukemia: results of the German multicenter AML HD93 treatment trial. *Leukemia.* 17: 1521-1528.
183. Schmid D, Heinze G, Linnerth B, Tisljar K, Kusec R, Geissler K, Sillaber C, Laczika K, Mitterbauer M, Zöchbauer S, Mannhalter C, Haas OA, Lechner K, Jäger U, Gaiger A. Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1997 May;11(5):639-43.
184. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood.* 2002;100:59-66.

185. Semba K, Saito-Ueno R, Takayama G, Kondo M. cDNA cloning and its pronephros-specific expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, from *Xenopus laevis*. *Gene*. 1996;175:167-172.
186. Shao Y, Lu J, Zhang G, Liu C, Huang B. Histone acetyltransferase p300 promotes the activation of human WT1 promoter and intronic enhancer. *Arch Biochem Biophys*. 2005;436:62-68.
187. Sharma PM, Bowman M, Madden SL, Rauscher FJ, 3rd, Sukumar S. RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev*. 1994;8:720-731.
188. Shimada A, Taki T, Koga D, Tabuchi K, Tawa A, Hanada R, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Adachi S, Kojima S, Hayashi Y. High WT1 mRNA expression after induction chemotherapy and FLT3-ITD have prognostic impact in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol*. 2012 Oct;96(4):469-76.
189. Siehl JM, Thiel E, Heufelder K, et al. Possible regulation of Wilms' tumour gene 1 (WT1) expression by the paired box genes PAX2 and PAX8 and by the haematopoietic transcription factor GATA-1 in human acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol*. 2003;123:235-242.
190. Sim EU, Smith A, Szilagi E, Rae F, Ioannou P, Lindsay MH et al. Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene* 2002; 21: 2948–2960.
191. Smith FO, Lampkin BC, Versteeg C, Flowers DA, Dinndorf PA, Buckley JD, Woods WG, Hammond GD, Bernstein ID. Expression of lymphoid-associated cell surface antigens by childhood acute myeloid leukemia cells lacks prognostic significance. *Blood*. 1992 May 1;79(9):2415-22.
192. Smith SI, Down M, Boyd AW, Li CL. Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, reduces the tumorigenicity of the leukemic cell line M1 in C.B-17 scid/scid mice. *Cancer Res* 2000; 60: 808–814.
193. Spanaki A, Linardakis E, Perdikogianni C, et al. Quantitative assessment of WT1 expression in diagnosis of childhood acute leukemia. *Leuk Res*. 2007; 31(4):570–572.
194. Spinelli O, Tosi M, Guerini V, et al. Prognostic significance of molecular markers in normal karyotype-AML: a single centre experience. *Haematologica* 2008; 91: 206 [abstract].
195. Srichai MB, Konieczkowski M, Padiyar A, et al. A WT1 co-regulator controls podocyte phenotype by shuttling between adhesion structures and nucleus. *J Biol Chem*. 2004;279:14398-14408.
196. Staffas A, Kanduri M, Hovland R, Rosenquist R, Ommen HB, Abrahamsson J, Forestier E, Jahnukainen K, Jónsson ÓG, Zeller B, Palle J, Lönnerholm G, Hasle H, Palmqvist L, Ehrencrona H; Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO). Presence of FLT3-ITD and high BAALC expression are

- independent prognostic markers in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011 Nov 24;118(22):5905-13.
197. Steinmetz HT, Schulz A, Staib P, Scheid C, Glasmacher A, Neufang A, Franklin J, Tesch H, Diehl V, Dias Wickramanayake P. Phase-II trial of idarubicin, fludarabine, cytosine arabinoside, and filgrastim (Ida-FLAG) for treatment of refractory, relapsed, and secondary AML. *Ann Hematol*. 1999 Sep;78(9):418-25.
  198. Sternberg DW, Aird W, Neuberg D, Thompson L, MacNeill K, Amrein P, Shulman LN. Treatment of patients with recurrent and primary refractory acute myelogenous leukemia using mitoxantrone and intermediate-dose cytarabine: a pharmacologically based regimen. *Cancer*. 2000 May 1;88(9):2037-41.
  199. Steudel C, Wermke M, Schaich M, et al. Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003 Jul;37:237– 51.
  200. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001 Jun 1;97:3589–95.
  201. Summers K, Stevens J, Kakkas I, et al. Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. *Leukemia*. 2007;21:550-551; author reply 552.
  202. Summers K, Stevens J, Kakkas I, et al. Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. *Leukemia* 2007; 21: 550–551 author reply 552.
  203. Svedberg H, Chylicki K, Baldetorp B, Rauscher III FJ, Gullberg U. Constitutive expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in the leukemic cell line U937 blocks parts of the differentiation program. *Oncogene* 1998; 16: 925–932.
  204. Svedberg H, Chylicki K, Gullberg U. Downregulation of Wilms' tumor gene (WT1) is not a prerequisite for erythroid or megakaryocytic differentiation of the leukemic cell line K562. *Exp Hematol* 1999; 27: 1057–1062.
  205. Svedberg H, Richter J, Gullberg U. Forced expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene inhibits proliferation of human hematopoietic CD34(+) progenitor cells. *Leukemia* 2001; 15: 1914–1922.
  206. Svensson E, Eriksson H, Gekas C, Olofsson T, Richter J, Gullberg U. DNA-binding dependent and independent functions of WT1 protein during human hematopoiesis. *Exp Cell Res* 2005; 308: 211–221
  207. Svensson E, Vidovic K, Lassen C, et al. Deregulation of the Wilms' tumour gene 1 protein (WT1) by BCR/ABL1 mediates resistance to imatinib in human leukaemia cells. *Leukemia*. 2007;21:2485-2494.

208. Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Inoue K et al. The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1999; 13: 393–399.
209. Thiede C, Illmer T, Soucek S, Schaich M, Ehninger G. Mutations in the WT1 transcription factor are associated with inferior overall survival - an analysis in 368 AML patients with normal karyotype under 60 years treated in the AML96 protocol of the DSIL. *Haematologica* 2008; 93: 62 [abstract].
210. Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99:4326-4335.
211. Thottassery, J. V. et al. p53-dependent regulation of MDR1 gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1997, 20, 11037-11042.
212. Trka J, Kalinova M, Hrusak O, et al. Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia*. 2002; 16(7):1381–1389.
213. Tsuruo, T. Mechanisms of multidrug resistance and implications for therapy. *Jpn J Cancer Res.*, 79, 1988, №3, 285-296.
214. Tuna M, Chavez-Reyes A, Tari AM. HER2/neu increases the expression of Wilms' Tumor 1 (WT1) protein to stimulate S-phase proliferation and inhibit apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*. 2005;24:1648-1652.
215. Udtha M, Lee SJ, Alam R, Coombes K, Huff V. Upregulation of c-MYC in WT1-mutant tumors: assessment of WT1 putative transcriptional targets using cDNA microarray expression profiling of genetically defined Wilms' tumors. *Oncogene* 2003; 22: 3821–3826.
216. Ueda T, Oji Y, Naka N, Nakano Y, Takahashi E, Koga S et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Sci* 2003; 94: 271–276.
217. Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2004; 350: 1617–1628.
218. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901–1928.
219. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2292-302.

220. Veelken H, Licht T, Lais A et al. Drug resistance of secondary acute myeloid leukemia with megakaryoblastic features and p190 BCR-ABL rearrangement. *Leuk Res* 1998; 22: 1021–1027.
221. Virappane P, Gale R, Hills R, et al. Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol*. 2008;26:5429-5435.
222. Visani G, Tosi P, Zinzani PL, Manfroi S, Ottaviani E, Testoni N, Clavio M, Cenacchi A, Gamberi B, Carrara P, et al. FLAG (fludarabine + high-dose cytarabine + G-CSF): an effective and tolerable protocol for the treatment of 'poor risk' acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 1994 Nov;8(11):1842-6.
223. Wagner N, Wagner KD, Hammes A, et al. A splice variant of the Wilms' tumour suppressor Wt1 is required for normal development of the olfactory system. *Development*. 2005;132:1327-1336.
224. Wagner N, Wagner KD, Schley G, Coupland SE, Heimann H, Grantyn R, Scholz H. The Wilms' tumor suppressor Wt1 is associated with the differentiation of retinoblastoma cells. *Cell Growth Differ*. 2002 Jul;13(7):297-305.
225. Waldstrom M, Grove A. Immunohistochemical expression of wilms tumor gene protein in different histologic subtypes of ovarian carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 85–88.
226. Wang ZY, Madden SL, Deuel TF, Rauscher III FJ. The Wilms' tumor gene product, WT1, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene. *J Biol Chem* 1992; 267: 21999–22002.
227. Wang ZY, Qiu QQ, Deuel TF. The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *J Biol Chem* 1993; 268: 9172–9175.
228. Wang ZY, Qiu QQ, Huang J, Gurrieri M, Deuel TF. Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene, wt1, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways. *Oncogene* 1995; 10: 415–422.
229. Wang ZY, Qiu QQ, Seufert W, et al. Molecular cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human ubiquitin-conjugating enzyme 9. *J Biol Chem*. 1996;271:24811-24816.
230. Ward A, Pooler JA, Miyagawa K, Duarte A, Hastie ND, Caricasole A. Repression of promoters for the mouse insulin-like growth factor II-encoding gene (Igf-2) by products of the Wilms' tumour suppressor gene wt1. *Gene* 1995; 167: 239–243.

231. Webster NJ, Kong Y, Sharma P, Haas M, Sukumar S, Seely BL. Differential effects of Wilms tumor WT1 splice variants on the insulin receptor promoter. *Biochem Mol Med* 1997; 62: 139–150.
232. Weisser M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005 Aug;19(8):1416-23.
233. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Research* 2001;61:7233–9.
234. Wiernik PH, Banks PL, Case DC Jr, Arlin ZA, Periman PO, Todd MB, Ritch PS, Enck RE, Weitberg AB. Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 1992 Jan 15;79(2):313-9.
235. Wilkinson KA, Henley JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J*. 2010;428:133-145.
236. Willasch AM, Gruhn B, Coliva T, et al. Standardization of WT1 mRNA quantitation for minimal residual disease monitoring in childhood AML and implications of WT1 gene mutations: a European multicenter study. *Leukemia* 2009; 23: 1472–1479.
237. Wu Y, Fraizer GC, Saunders GF. GATA-1 transactivates the WT1 hematopoietic specific enhancer. *J Biol Chem*. 1995;270:5944-5949.
238. Xu B, Song XY, Li L, Xu WJ, Tang JH. The significance of quantification of MDR1 and WT1 gene expression in acute myeloid leukemia. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2008 Mar;47(3):221-4.
239. Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M, Kudoh T, Akiyama T, Murakami A, Maekawa T. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood*. 1996 Apr 1;87(7):2878-84.
240. Ye Y, Raychaudhuri B, Gurney A, Campbell CE, Williams BR. Regulation of WT1 by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation. *EMBO J*. 1996;15:5606-5615.
241. Zaia A, Fraizer GC, Piantanelli L, Saunders GF. Transcriptional regulation of the androgen signaling pathway by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Anticancer Res* 2001; 21: 1–10.

242. Zhang X, Xing G, Fraizer GC, Saunders GF. Transactivation of an intronic hematopoietic-specific enhancer of the human Wilms' tumor 1 gene by GATA-1 and c-Myb. J Biol Chem. 1997;272:29272-29280.
243. Генова, М., Балаценко, Г. Молекулярно-генетични, имунологични и функционални аспекти на свързаната с MDR1, множествена лекарствена резистентност при болни с левкемии. Клин. и Трансф. Хематология, 39(1): 10-22, 2003.
244. Гигов, И., Митев, Л., Балаценко, Г., Кънчева, Т., Дамянов, И., Радинов, А. Случаи с остра миелоидна левкемия – клинични и морфологични особености, цитогенетични промени и лечебни резултати. Клин. и Трансф. Хематология, 36(3-4): 45-50, 2000.