

W procesie różnicowania komórek dużą rolę odgrywają czynniki transkrypcyjne. Gen kodujący czynnik transkrypcyjny CEBPA (*CCAAT enhancer binding protein α*) jest jednym z kluczowych regulatorów granulopoezy. Postuluje się, że mutacje genu *CEBPA* mogą sprzyjać wystąpieniu objawów i być przyczyną progresji ostrej białaczki szpikowej (*acute myeloid leukemia* – AML). Ich obecność jest jednak powiązana z korzystnym rokowaniem u chorych na AML. W niniejszej pracy przedstawiono rolę *CEBPA* w regulacji procesu różnicowania granulocytów, typy mutacji genu *CEBPA* oraz rekomendowane sposoby ich wykrywania. Omówiono również wartość rokowniczą defektów molekularnych genu *CEBPA*, występujących zarówno w sposób izolowany, jak i w skojarzeniu z mutacjami dwóch innych genów: *NPM1* i *FLT3* u pacjentów z AML i normalnym kariotypem.

Słowa kluczowe: *CEBPA*, *CCAAT enhancer binding protein α*, granulopoeza, ostra białaczka szpikowa, rokowanie.

Prognostyczne znaczenie obecności mutacji genu *CEBPA* u chorych na ostrą białaczkę szpikową

Prognostic significance of CEBPA gene mutations in patients with acute myeloid leukemia

Marzena Pieronkiewicz, Krzysztof Lewandowski

Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp

U ok. 55% dorosłych chorych na ostrą białaczkę szpikową (*acute myeloid leukemia* – AML) stwierdza się obecność zaburzeń cytogenetycznych w chwili rozpoznania choroby. Najczęściej występującymi aberracjami są: t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21), t(9;11)(p22;q23) oraz inv(16)(p13;q22). U prawie połowy chorych na AML analiza cytogenetyczna, prowadzona z wykorzystaniem standardowych technik, nie wykazuje jednak obecności aberracji chromosomowych. Ten typ AML definiowany jest jako „AML z prawidłowym kariotypem” (*cytogenetically normal AML* – *CN-AML*).

Obecnie wiadomo, że występowanie określonych zaburzeń cytogenetycznych jest ściśle powiązane z rokowaniem w tej grupie pacjentów [1]. Istotne znaczenie mają także niewielkie defekty molekularne, obejmujące pojedyncze geny, w tym m.in. *NPM1*, *FLT3* oraz *CEBPA* [2].

Rola czynników transkrypcyjnych w procesie granulopoezy

W procesie różnicowania granulocytów uczestniczą dziesiątki genów. Misterna sieć zależności, które zachodzą między nimi, przekłada się na pełną synchronizację podziałów komórkowych, procesów różnicowania, dojrzewania i obumierania komórek. Dialog pomiędzy poszczególnymi elementami układu krwiotwórczego odbywa się za pośrednictwem cząsteczek białkowych, docierających do komórek hematopoetycznych poprzez odpowiednie receptory i kaskady sygnalizacyjne. Na poziomie międzykomórkowym mediatorami granulopoezy są cytokiny [wśród nich m.in. czynniki stymulujące formowanie kolonii (CSF) i interleukiny (IL)], które po związaniu z odpowiednimi receptorami na powierzchni komórek przekazują sygnał do ich wnętrza (zwykle w procesie fosforylacji lub defosforylacji kolejnego elementu szlaku transdukcji sygnału). Sygnał jest w cytoplazmie wielokrotnie wzmacniany poprzez aktywację kolejnych kinaz białkowych, by w końcu dotrzeć do ostatecznego, „decyzyjnego” poziomu przekazywania informacji, tj. do poziomu czynników transkrypcyjnych, bezpośrednio kontrolujących ekspresję genów.

Wśród czynników transkrypcyjnych uczestniczących w procesie granulopoezy główną rolę odgrywają rodziny genów: Ets (*E-twenty six*), CBF (*core binding factors*), RAR (*retinoic acid receptors*), CEBP (*CCAAT enhancer binding proteins*). Te oraz inne liczne czynniki transkrypcyjne tworzą pomiędzy sobą funkcjonalną sieć powiązań, podtrzymującą homeostazę ekspresji reszty genów i siebie nawzajem.

Geny z rodziny Ets, m.in. *PU.1*, *ERG*, *TEL1* i *TEL2*, przyłączają się do promotorów z motywem C/A GGA A/T. W granulopoezie centralną pozycję zajmuje czynnik PU.1, który wraz z CEBPA promuje ekspresję genów cytokin (CSF, IL), genów kodujących białka ziarnistości granulocytarnych, m.in. peroksydazy

Transcription factors play important role in the process of cells differentiation and intracellular signalling. The gene encoding CEBPA transcription factor is one of the master regulators of granulopoiesis. Mutations of CEBPA are presumed to be involved in emergence and progression of acute myeloid leukemia (AML) and are associated with good prognosis in AML patients. This article pinpoints the role of CEBPA in granulocyte differentiation regulation, types of CEBPA mutations and recommended methods of their identification. Independently, prognostic value of CEBPA mutations alone and with co-existing molecular defects of two other genes: *NPM1*, *FLT3* are discussed in cases of AML with normal karyotype.

Key words: CEBPA, CCAAT enhancer binding protein α , granulopoiesis, acute myeloid leukemia, prognosis.

(MPO), elastazy neutrofilowej (NE), lizozymu oraz genów receptorów powierzchniowych [3–5]. Rola produktu białkowego genu *ERG* nie jest do końca poznana. Wykazano jednak, że jego podwyższona ekspresja jest związana z niekorzystnym rokowaniem u chorych cierpiących na AML i ostrą białaczkę limfoblastyczną (*acute lymphoblastic leukemia* – ALL) [6]. Do białek działających antagonistycznie należą hamujący proliferację komórek TEL1 i nasilający ten proces TEL2. Ich funkcja wydaje się powiązana z regulacją działania protoonkogenu *c-Myc*. Udział genu *TEL1* w onkogenezie potwierdzają wyniki dotychczas przeprowadzonych badań u chorych na ostrą białaczkę. Obecność genu fuzyjnego *TEL1-CBFB* stwierdza się także u niektórych pacjentów z ALL [7, 8].

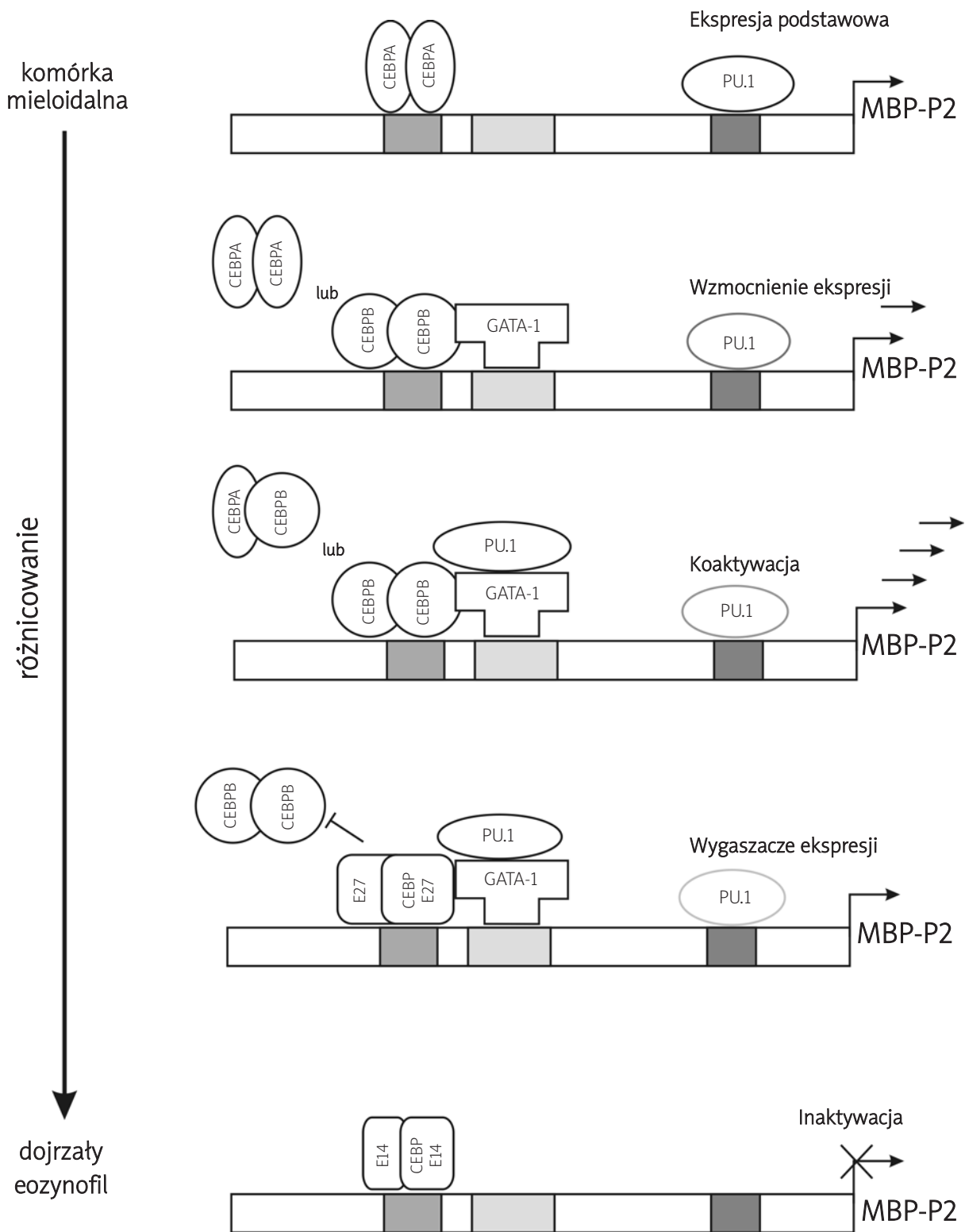
Czynnik CBF, heterodimeryczne białko złożone z podjednostek typu CBFA i CBFB, promuje m.in. ekspresję genu czynnika transkrypcyjnego PU.1 i pośrednio CEBPA, receptora dla makrofagowego czynnika wzrostu (M-CSFR), a także genów ważnych cytokin stymulujących różnicowanie i proliferację komórek linii granulocytarnej, w tym IL-3 i granulocytowo-makrofagowego czynnika wzrostu (GM-CSF). CBF wspólnie z czynnikiem *c-Myb* wzmacnia ekspresję genu mieloperoksydazy (MPO) i elastazy neutrofilowej (NE). Obecność aberracji chromosomowych z udziałem genów *CBF* (np. geny fuzyjne *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *RUNX1-MDS1-EVI1*) opisano u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym (MDS) i AML [4, 9–11].

Receptory kwasu retynowego (*retinoic acid receptors* – RAR), głównie receptor α (RARA), uczestniczą w aktywacji czynników transkrypcyjnych CEBPA, CEBPB i CEBPE. Upośledzenie procesu transkrypcji CEBP w wyniku mutacji lub rearanżacji genu *RARA* może prowadzić do zatrzymania granulopoezy na etapie promielocyty. Wykazano, że u chorych na ostrą białaczkę promielocytową (*acute promyelocytic leukemia* – APL) z obecnym genem fuzyjnym *PML-RARA* dochodzi do obniżenia ekspresji genu czynnika transkrypcyjnego PU.1, współdziałającego z CEBPA [3, 12, 13]. W procesie różnicowania granulocytów szczególną rolę odgrywają białka z rodziny CEBP. Razem z czynnikiem transkrypcyjnym PU.1 dimery CEBP wzmacniają ekspresję części spośród białek granulocytów, m.in. receptorów cytokin G-CSF, GM-CSF, M-CSF, peptydów zawartych w ziarnistościach neutrofilii (MPO, NE, lizozymu, MBN, LF, kolagenazy neutrofilowej). Jednocześnie CEBP są represorami ekspresji genów stymulujących erytropoezę, m.in. *GATA-1*, *EPOR*, *FOG1*, *KLF1* oraz *GFI1B*. Działają one także hamująco na ekspresję czynników proliferacyjnych, w tym E2F, CDK2, CDK4 [4, 14].

Wewnątrzkomórkowe stężenie poszczególnych CEBP zmienia się stopniowo podczas rozwoju komórek mieloidalnych. W mieloblastach dominuje CEBPA, którego ekspresja stopniowo maleje na korzyść CEBPB w dojrzewających granulocytach, by zostać następnie wygaszona w komórkach dojrziałych, w których z kolei wzrasta poziom CEBPE. Zmiana ta sama w sobie jest modulatorem ekspresji genów efektorowych (ryc. 1.) [15].

Charakterystyka genu *CEBPA*

Gen *CEBPA* (CCAAT enhancer binding protein α) jest umiejscowiony na chromosomie 19 w rejonie q13.1. Nie ma intronów, a w obrębie pojedynczego egzonu wyróżniono 4 domeny funkcjonalne: dwie domeny transaktywacyjne (TAD1 i TAD2) odpowiedzialne za wzmacnianie transkrypcji, region podstawowy (*basic*) i zamek leucynowy (Zip), połączone w jedną domenę funkcjonalną bZip. Odpowiada ona za dimeryzację i wiązanie DNA. Produktami translacji genu *CEBPA* są dwa białka o masach 30 kDa i 42 kDa. Forma lżejsza, powstająca dzięki zapoczątkowaniu translacji dalej od 5'-końca mRNA, nie ma domeny TAD1 i nie aktywuje wydajnie transkrypcji. W komórkach o niezakłóconej hematopoezie proporcja obu izoform jest optymalna i zapewnia utrzymanie ekspresji genów efektorowych na poziomie odpowiednim dla danego etapu granulopoezy [16, 17]. Białko CEBPA wykazuje aktywność czynnika transkrypcyjnego jedynie w formie dimeru. Może to być homodimer izoformy 42 kDa lub heterodimer, w którego skład oprócz CEBPA 42 kDa wchodzi CEBPA 30 kDa lub inny członek rodziny białek CEBP. Poszczególne dimery formują się w komórkach na różnych etapach



Ryc. 1. Modulacja ekspresji genów na różnych etapach różnicowania komórki. W procesie tym istotną rolę odgrywa wymiana czynników transkrypcyjnych oddziałujących z promotorem. Na podstawie [15]

Fig. 1. Gene expression modulation during myeloid cell maturation. Interchange of transcription factors plays an important role in this process

różnicowania i mają inne powinowactwo do elementów promotorowych z motywem CCAAT [18, 19].

Białko CEBPA występuje w największym stężeniu w początkowych stadiach rozwojowych komórek mieloidalnych. Wspólnie z PU.1 wiąże się z motywami wzmacniającymi ekspresję w regionie promotorowym kilkadziesiąt do kilkuset nukleotydów przed miejscem inicjacji transkrypcji [20]. Wciąż mało wiadomo na temat całkowitej liczby genów, których ekspresję bezpośrednio reguluje CEBPA. Na podstawie analizy motywów promotorowych wykonanych przez Cold Spring Harbor Laboratory (baza danych TRED – informacje zgromadzone w tej bazie pochodzą z analiz promotorów *in silico* i ich weryfikacji na podstawie dostępnych danych literaturowych) wytypowano 220 genów kontrolujących różne procesy fizjologiczne, których promotory zawierają sekwencje rozpoznawane przez CEBPA. Wśród nich 74 geny (33%) są zaangażowane w proces hematopoezy. Spośród genów ulegających ekspresji w komórkach krwiotwórczych 38 zostało zidentyfikowanych laboratoryjnymi metodami analizy promotorów. Reszta została wytypowana dzięki eksperymentom mikromacierzowym. Poza genami kodującymi białka, CEBPA kontroluje także gen *miRNA-223*, uczestniczący w odpowiedzi molekularnej na kwas retynowy [21].

Jako ważny element systemu regulacji procesu różnicowania granulocytów CEBPA podlega ścisłej, wieloetapowej kontroli na wszystkich etapach ekspresji. Dotąd zidentyfikowano 7 różnych mechanizmów na poziomie genomu, transkryptu i białka, zapewniających synchronizację aktywności CEBPA podczas procesu różnicowania mieloblastów. Zestawienie wymienionych mechanizmów regulacji przedstawiono w tabeli 1.

Mutacje CEBPA

Zgodnie z tzw. teorią dwóch uderzeń jedną z przyczyn wystąpienia AML jest pojawienie się w komórkach macierzystych szpiku szeregu defektów molekularnych. Mutacje w obrębie genów kontrolujących proliferację i procesy apoptozy (defekty klasy I) oraz mutacje genów odpowiedzialnych za inicjację i przebieg procesów różnicowania komórkowego (defekty klasy II) są przyczyną niekontrolowanego namnażania i dysplazji komórek [14, 30].

Mutacje genu kodującego czynnik transkrypcyjny CEBPA są zaliczane do defektów klasy II. Ich obecność prowadzi przede wszystkim do zaburzeń procesów różnicowania komórek hematopoetycznych oraz do zakłócenia funkcji komórkowych szlaków przekazywania sygnału. Mutacje CEBPA powodują także zaburzenia w procesach apoptozy i proliferacji. Sądzi się, że jest to wynikiem zmian w ekspresji genów klasy I, wywołanych przez obecność mutacji CEBPA [16, 30].

Opisano cały szereg mutacji genu *CEBPA*, zarówno punktowych, jak i insercyjno-delecyjnych. Ze względu na ich wpływ na ekspresję i funkcje białka można je zakwalifikować do jednej z trzech kategorii. Do pierwszej należą mutacje *N*-terminalne, powodujące zmianę ramki odczytu i przedwczesne zakończenie procesu translacji, do drugiej – mutacje *C*-terminalne zachowujące ramkę odczytu, a do trzeciej – inne mutacje insercyjno-delecyjne i punktowe o dotychczas niescharakteryzowanym wpływie na funkcje CEBPA [16, 17].

Obecność mutacji *N*-terminalnych prowadzi do zaburzenia równowagi pomiędzy ilością izoformy 30 kDa i 42 kDa. Przedwczesna terminacja procesu translacji formy 42 kDa w jednej kopii genu przy niezakłóconej produkcji izoformy 30 kDa jest wynikiem zmiany ramki odczytu przed domeną

Tabela 1. Mechanizmy regulacji ekspresji oraz geny zaangażowane w modulację aktywności genu *CEBPA* w komórkach linii mieloidalnej
Table 1. Mechanisms of expression modulation and genes involved in regulation of *CEBPA* activity in myeloid cells

Mechanizm regulacji	Funkcja	Zaangażowane geny	Piśmiennictwo
regulacja promotora	hipermetylacja promotora	hamowanie transkrypcji genu CEBPA	TRIB2, NOTCH1 [16, 21]
	zmiany steryczne promotora	hamowanie transkrypcji genu CEBPA	LEF-1 [22]
	acetylacja histonów w promotorze	hamowanie transkrypcji genu CEBPA	RUNX1-RUNXIT1 [23]
	sprzężenie zwrotne ekspresji czynników transkrypcyjnych	hamowanie/wzmacnianie transkrypcji genu CEBPA	PU.1, GATA-1 [24]
mikro RNA	oddziaływanie z regionem 3' UTR mRNA	degradacja mRNA	miRNA-124a [25]
regulacja translacji	wiązanie mRNA przez kalretikulinę	hamowanie translacji CEBPA	CABP3, RUNX1-MDS1-EV1 [9]
fosforylacja	fosforylacja S-21	inaktywacja białka CEBPA	FLT3, ERK1/2 [26]
	fosforylacja S-248	zwiększenie aktywności białka CEBPA względem G-CSFR	Ras [27]
SUMOrylacja	SUMOrylacja TAD2	inaktywacja białkowej izoformy 42 kD	Ubc9, SUMO-1 [25, 27]
dimeryzacja	regulacja efektywności przyłączania CEBPA do różnych sekwencji promotorowych	modulacja transkrypcji genów efektorowych	rodzina białek CEBP [17]
interakcje białko-białko	wiązanie izoformy 42 kD przez TRIB2	inaktywacja i degradacja białka CEBPA	TRIB2 [28]
	oddziaływanie domeny bZip z c-JUN	inaktywacja białka CEBPA	c-JUN [29]

TAD2. Prowadzi to do przesunięcia równowagi stechiometrycznej w syntezie CEBPA na korzyść mniej aktywnej izoformy 30 kDa. Skutkiem tego jest formowanie się nieaktywnych dimerów białka i w konsekwencji osłabienie ekspresji genów efektorowych [16, 17].

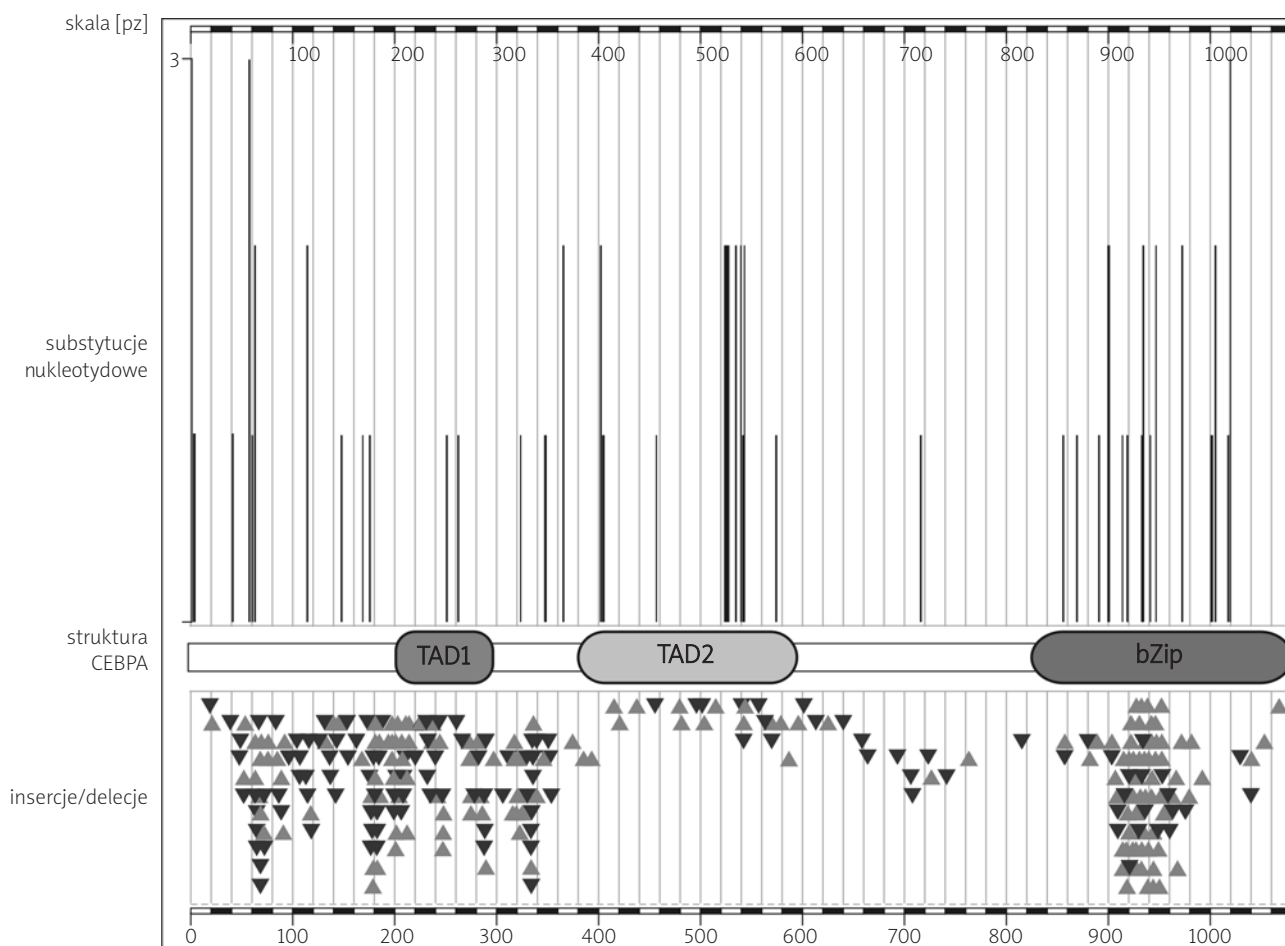
Mutacje C-końcowe to w większości przypadków duplikacje tandemowe lub insercje niezmiennające ramki odczytu. Stwierdzono także pojedyncze przypadki współwystępowania zmian delecyjnych i insercyjnych [31–33]. Mutacje te pojawiają się w obrębie domeny bZip, prowadząc do zakłócenia procesu wiązania DNA w obrębie zamka leucynowego lub do osłabienia dimeryzacji CEBPA. Zmniejszone powinowactwo CEBPA do DNA obniża efektywność promowania transkrypcji genów efektorowych, a tym samym ogranicza ich ekspresję [16]. W przypadku mutacji zarówno N-, jak i C-terminalnych zmiany sekwencji obejmują zwykle od kilku do kilkudziesięciu nukleotydów.

Mutacje CEBPA należące do trzeciej kategorii mogą wpływać w sposób pośredni na proces wzmacniania trans-

krypcji. Zakłócają one mechanizmy regulacji poziomu ekspresji i aktywność samego CEBPA.

Przystępując do analizy mutacji w obrębie genu *CEBPA*, należy pamiętać, że mutacje synonimiczne, znajdujące się poza miejscami wiązania miRNA, nie zaburzają funkcji białka i nie wywierają prawdopodobnie wpływu onkogenego. Zidentyfikowano również polimorfizmy (SNP oraz niewielkie duplikacje niezmiennające ramki odczytu), występujące w sposób naturalny w populacji ogólnej, które również nie mają wpływu na proces leukemogenezy [34, 35].

Mapa rozmieszczenia dotychczas poznanych defektów genu *CEBPA* umożliwiła wskazanie tzw. gorących miejsc mutacji (*mutation hot spots*), w których anomalie występują statystycznie najczęściej. Są to rejony: 160-460nt mRNA/50-350nt CDS, w którym dochodzi do mutacji N-terminalnych, oraz 1010-1060nt mRNA/900-950nt CDS, gdzie zlokalizowana jest większość mutacji C-terminalnych (w pracy wykorzystywane są koordynaty sekwencji o numerze akcesyjnym NM_004364) (ryc. 2.).



Ryc. 2. Lokalizacja mutacji punktowych i insercyjno-delecyjnych w sekwencji kodującej genu *CEBPA* (wyłącznie rejon ulegający translacji – CDS) wg danych zgromadzonych w repozytorium COSMIC Trust Sanger Institute. Największe zagęszczenie mutacji występuje w rejonie 900-950nt (domena bZip). W obszarze tym dominują mutacje delecyjne. Drugim gorącym miejscem mutacji jest obszar 50-350nt, odpowiadający domenom TAD. Rozmieszczenie mutacji w tym rejonie jest bardziej równomierne. Mutacje inne niż N- i C-terminalne występują rzadko i pojawiają się wzdłuż całej długości sekwencji *CEBPA*

Fig. 2. Localization of in/del and point mutations in *CEBPA* gene (only coding sequence, CDS was included) according to COSMIC database of Sanger Trust Institute. The mutation hot spots are situated between 900-950bp in bZip domain (C-terminal mutations) and 50-350bp (N-terminal mutations)

Metody wykrywania mutacji *CEBPA*

Duża heterogenność mutacji genu *CEBPA*, zarówno co do ich umiejscowienia, jak i charakteru, wyklucza diagnostyczne zastosowanie większości podstawowych narzędzi molekularnych. Tradycyjny rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji *CEBPA* nie pozwala na wykrycie mutacji pojedynczych nukleotydów oraz niewielkich mutacji insercyjno-delecyjnych. Obecnie najpopularniejszą metodą poszukiwania mutacji genu *CEBPA* jest sekwencjonowanie poprzedzone amplifikacją sekwencji kodującej techniką reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR). Materiałem wyjściowym może być zarówno RNA, jak i DNA, ponieważ gen *CEBPA* jest jednoegzonowy. Najczęściej stosowaną techniką detekcji mutacji *CEBPA* jest metoda zaproponowana przez Pabsta i wsp., obejmująca reakcję PCR prowadzoną przy użyciu 4 par starterów. Uzyskane dzięki niej amplikony zawierają wszystkie domeny funkcjonalne, pozbawione są natomiast większości sekwencji 5'- i 3'-UTR. W metodzie tej w kolejnym etapie produkty PCR są oczyszczane i poddawane jedno- bądź obustronnemu sekwencjonowaniu [17].

Według doświadczeń autorów niniejszej pracy podczas wykonywania analizy wspomnianą metodą można napotkać na kilka problemów. Wysoka zawartość par GC utrudnia reakcję PCR, co zmusza do optymalizacji składu mieszaniny reakcyjnej poprzez użycie odczynników zwiększających topliwłość DNA, takich jak DMSO lub betaina [36]. Z kolei trakty CGG i CCG występujące w rejonie 500-700nt transkryptu mogą zmniejszać w znaczący sposób wydajność znakowania nukleotydów podczas sekwencjonowania. W rzadkich przypadkach miejsca delekcji w genie *CEBPA* mogą pokrywać się z miejscem przyłączania któregoś ze starterów, co prowadzi do braku jednego z produktów reakcji. W sytuacjach tych konieczne jest zastosowanie innej pary starterów PCR.

Wykrywanie mutacji *CEBPA* jest także możliwe za pomocą metod przesiewowych: wysoko sprawnej chroma-

tografii cieczowej w warunkach denaturujących (dHPLC) [37], analizy krzywych topnienia o wysokiej rozdzielczości (*high resolution melt* – HRM) [38] oraz elektroforezy kapilarnej znakowanych fluorescencyjnie produktów PCR [39]. Analiza krzywych topnienia o wysokiej rozdzielczości oraz dHPLC pozwalają na wykrycie każdego typu mutacji. Rozdział metodą elektroforezy kapilarnej prowadzony wg protokołów dostępnych w literaturze umożliwia jedynie wykazanie obecności mutacji insercyjno-delecyjnych. Jest to istotna wada wymienionej metody, uniemożliwia ona bowiem wykrycie ok. 9% przypadków mutacji pojedynczego nukleotydu (wg *COSMIC Trust Sanger Institute*, tab. 2.). Obecność mutacji zidentyfikowanych metodą przesiewową należy w każdym przypadku potwierdzić za pomocą sekwencjonowania wg protokołu Pabsta. Ten sposób postępowania zmniejsza koszt wykonywania oznaczeń, ograniczając ich przeprowadzanie jedynie do przypadków z wysokim prawdopodobieństwem występowania defektu.

Znaczenie rokownicze *CEBPA* w ostrej białaczce szpikowej

Klasyfikacja AML zmienia się ustawicznie w ostatnich latach. Jest to spowodowane coraz lepszą znajomością molekularnego podłoża tej bardzo heterogenicznej choroby. W 2008 r. WHO wyodrębniła przypadki AML z mutacjami genu *CEBPA* jako osobną podkategorię w kategorii „Ostra białaczka szpikowa ze zdefiniowanymi anomaliami genetycznymi”. Obecność mutacji *CEBPA* została uznana za korzystny czynnik rokowniczy.

Renneville i wsp., analizując przypadki 638 chorych z AML, wykazali, że odsetek przypadków z mutacjami *CEBPA* wynosi 8% [40]. Na podstawie oceny wyników innych badań okazało się także, że mutacje genu *CEBPA* występują najczęściej u chorych z typem M1 i M2 (wg FAB) i to zarówno u dzieci, jak i dorosłych [31, 32, 41]. Obecność pojedynczej mutacji lub dwóch różnych mutacji *CEBPA* występujących na różnych chromosomach potwierdzono także u ok. 10–20% chorych na AML z prawidłową cytogenetyką [40, 42]. U chorych na AML z delecją 9q22 i bez innych aberracji chromosomowych stwierdzono zwiększone prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji *CEBPA*. Częstość występowania defektów w *CEBPA* w tej grupie pacjentów określono na 22–48% [43].

Dowiedziano, że w przypadkach *CEBPA*– i *CEBPA*+ odsetek pacjentów uzyskujących remisję hematologiczną jest zbliżony (odpowiednio 82% i 80%). Okazało się jednak, że odsetek przeżyć 5-letnich pacjentów *CEBPA*+ w porównaniu z chorymi *CEBPA*– jest wyższy (odpowiednio 47% i 31%) [40]. U chorych *CEBPA*+ ze wznową choroby stwierdza się obecność tych samych defektów molekularnych, które wykazano przy pierwszej manifestacji choroby. Zmianie często podlega natomiast dystrybucja poszczególnych alleli. To ostatnie spostrzeżenie może świadczyć o ewolucji klonalnej choroby [41].

Coraz większa liczba danych dotyczących występowania mutacji w *CEBPA* dowodzi, że wpływ na rokowanie ma nie tylko sam fakt wystąpienia mutacji, ale także ich liczba. Zaobserwowano, że w ponad połowie przypadków AML *CEBPA*+ obecne są dwie różne mutacje, zlokalizowane na dwóch chromosomach (mutacje bialleliczne), z których naj-

Tabela 2. Udział procentowy poszczególnych typów mutacji *CEBPA* u chorych na AML. Analiza na podstawie oceny 616 próbek zdeponowanych w bazie COSMIC (zmodyfikowano na podstawie danych Trust Sanger Institute)

Table 2. Incidence of different *CEBPA* mutation types according to COSMIC database analysis of 616 *CEBPA*-positive AML samples

Typ mutacji	Liczba próbek	Odsetek wszystkich mutacji <i>CEBPA</i>
delekcje zmieniające ramkę odczytu	157	25,5
delekcje niezmieniające ramki odczytu	37	6
insercje zmieniające ramkę odczytu	138	22,4
insercje niezmieniające ramki odczytu	168	27,3
substytucje nonsensowe	17	2,8
substytucje zmiany sensu	27	4,4
substytucje synonimiczne	11	1,8
defekty złożone	52	8,4
inne aberracje	9	1,5

częściej jedna jest mutacją *N*-terminalną, a druga *C*-terminalną. Komórki blastyczne, w których doszło do pojawienia się dwóch mutacji, cechuje charakterystyczny immunofenotyp: CD15+, CD7+, CD34+ i HLA-DR+ [31]. Zgodnie z opinią niektórych autorów wystąpienie pojedynczej mutacji CEBPA nie wpływa korzystnie na czas trwania pierwszej remisji i średni czas przeżycia chorych. Obserwację tę poczyniono na podstawie wyników trzech niezależnych analiz [37, 42, 44]. Wykazano w nich, że jedynie obecność mutacji biallelicznych CEBPA rokuje korzystnie.

Należy także wspomnieć, że obecność mutacji genu CEBPA nie jest charakterystyczna jedynie dla pacjentów z AML. Ich występowanie stwierdzono u chorych z zespołem mielodysplastycznym, szpiczakiem mnogim, chłoniakami niezmiernymi, a także u osób z niektórymi nowotworami litymi [34, 56]. Również u chorych na ALL odnotowano przypadki występowania translokacji chromosomowych z udziałem CEBPA i czterech innych genów z rodziny CEBP [45].

Wystąpienie mutacji w CEBPA jest przypuszczalnie zdarzeniem pierwotnym w procesie transformacji nowotworowej. Świadczą o tym opisane przypadki dziedzicznych defektów *N*-terminalnych CEBPA, prowadzących bezpośrednio do wystąpienia objawów AML. Potwierdzeniem tej hipotezy jest spostrzeżenie, że w większości przypadków z dziedzicznym defektem CEBPA w momencie wystąpienia pierwszych objawów choroby pojawia się niezależnie inna mutacja tego genu zlokalizowana na drugim chromosomie. Sugeruje to, że pierwsza mutacja jest czynnikiem zwiększającym ryzyko pojawienia się kolejnej, przyspieszającej transformację nowotworową [46, 47].

Mutacje CEBPA a defekty innych genów zaangażowanych w hematopoezę

Obecnie wiadomo, że oprócz CEBPA obecność mutacji dwóch innych genów ma wartość rokowniczą u chorych na AML. Wykrycie wewnętrznych tandemowych duplikacji genu *FLT3* (*FLT3-ITD*) wiąże się z niekorzystnym, a mutacji *NPM1*, podobnie jak CEBPA, z korzystnym rokowaniem [24]. Dotyczy to szczególnie przypadków AML z prawidłową cytogenetyką (*cytogenetically normal AML* – CN-AML), w których nie stwierdzono aberracji chromosomowych ani obecności genów fuzyjnych.

Fms-podobna kinaza tyrozynowa 3 (*FLT3*) jest transbłonowym receptorem, uruchamiającym kaskadę sygnalizacyjną JAK/STAT, zaangażowaną w kontrolę proliferacji i apoptozy. Do mutacji genu *FLT3* dochodzi w obrębie domeny kinazowej (TKD) oraz domeny przybłonowej (ITD). Pierwsze mają charakter punktowy i prowadzą do zwiększenia aktywności kinazowej, drugie sprzyjają dimeryzacji niezależnej od związania ligandu. W efekcie obu typów mutacji *FLT3* jest stale aktywna, chociaż względem różnych grup genów efektorowych. Obecność *FLT3-ITD* potwierdzono u ok. 15–35%, a *FLT3-TKD* u ok. 6–8% pacjentów z AML [48]. Wyniki analiz klinicznych wykazały bezpośrednią zależność pomiędzy mutacjami *FLT3-ITD* a ryzykiem wznowy choroby u pacjentów z pośrednim ryzykiem niekorzystnego przebiegu choroby (w tym CN-AML). W przeciwieństwie do mutacji dome-

ny przybłonowej, substytucje nukleotydowe w domenie kinazowej nie prowadzą do zmniejszenia czasu przeżycia i czasu wolnego od wznowy [48–51].

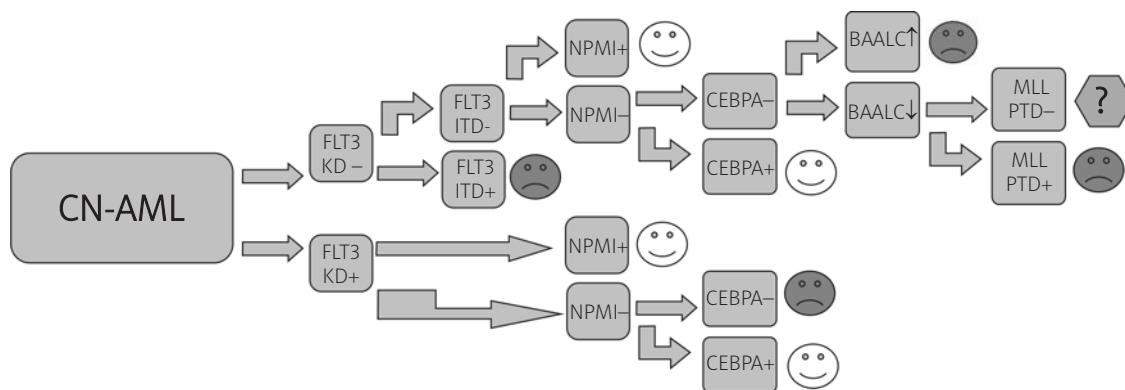
Innym genem, którego mutacje istotnie wpływają na przebieg AML, jest gen nukleofozminy. Nukleofozmina (*NPM1*) należy do tzw. białek opiekuńczych, zaangażowanych m.in. w kształtowanie się rybosomów i podział centromerów. Mutacje tego genu to insercje lub delecje prowadzące do zaniku dwóch reszt tryptofanu i wprowadzenia *C*-końcowej sekwencji VSLRK. Nieprawidłowe białko zmienia lokalizację z jądrowej na cytoplazmatyczną, powodując m.in. zaburzenia w proliferacji. Mutacje *NPM1* są stosunkowo często obecne u chorych na AML. Ich występowanie udokumentowano u ok. 15–35% chorych dorosłych oraz w ok. 2–8% przypadków AML u dzieci. Obecność mutacji w *NPM1* rokuje korzystnie i jest powiązana z wyższym odsetkiem uzyskiwanych remisji całkowitych (86,4% w porównaniu z 64,3%) [51]. Ponadto u pacjentów z CN-AML i mutacją *NPM1* przeżycie wolne od wznowy jest dłuższe w porównaniu z obserwowanym u chorych bez mutacji *NPM1* [2].

Obecność mutacji jednego z genów: *CEBPA*, *NPM1* i *FLT3*, jest uznawana za niezależny czynnik rokowniczy u osób z AML. Okazuje się jednak, że u części chorych dochodzi do współwystępowania różnych defektów molekularnych. Współwystępowanie mutacji *NPM1* i *FLT3-ITD* jest zjawiskiem stosunkowo częstym, stwierdzanym u ok. 18% chorych na CN-AML [24]. Co ciekawe, obecność mutacji *NPM1* nie znosi negatywnego wpływu mutacji *FLT3* na rokowanie u pacjentów z AML. Nie zaobserwowano istotnych różnic w przeżyciu całkowitym oraz odsetku uzyskiwanych remisji całkowitych pomiędzy pacjentami *FLT3-ITD+/NPM1–* i *FLT3-ITD+/NPM1+*. Podobne obserwacje poczyniono odnośnie do genotypu *FLT3-ITD+/CEBPA+*. Także korzystny wpływ mutacji biallelicznych CEBPA jest znoszony przez wystąpienie *FLT3-ITD* [40, 44]. Przeciwnie, u chorych na AML CEBPA+ ze współwystępującą mutacją genu *NPM1* rokowanie jest podobne jak u mających tylko jedną z nich [42].

Obecność mutacji domeny kinazowej *FLT3* (*FLT3-TKD+*), w przeciwieństwie do mutacji domeny przybłonowej, jest skorelowana z wydłużonym czasem przeżycia i lepszym rokowaniem zarówno u chorych z mutacjami CEBPA (dane przedstawione jedynie dla 4 pacjentów), jak i z mutacjami *NPM1* [52].

Na rycinie 3. przedstawiono dotychczas poznane defekty molekularne o uznanej wartości prognostycznej u chorych na AML z prawidłową cytogenetyką.

Oprócz mutacji w *NPM1*, *FLT3* i CEBPA wśród czynników wpływających na rokowanie u chorych z AML wymienia się defekty w TP53, c-KIT, NRAS, nadekspresję ERG, WT1 i BAALC oraz częściowe duplikacje genu *MLL* [24, 53]. Ich wpływ na rokowanie u chorych na AML jest trudny do oszacowania ze względu na małą częstość występowania wymienionych defektów wśród pacjentów z AML. Być może wraz z wprowadzeniem nowych technik jednoczesnego monitorowania wielu defektów molekularnych ocena ich wpływu na rokowanie będzie możliwa. Największe nadzieje w tym zakresie budzą wyniki prac nad diagnostycznym wykorzystaniem profilowania ekspresji genów (w tym *WT1*, *BAALC*, *ERG*, *miRNA-223* i innych) [54, 55].



Ryc. 3. Rokowanie u chorych na ostrą białaczkę szpikową z prawidłowym kariotypem (CN-AML) w zależności od obecności poszczególnych defektów molekularnych i zmian w poziomie ekspresji genów. Symbolem ☺ oznaczono genotypy z rokowaniem korzystnym i pośrednim. Genotypy rokujące niekorzystnie oznaczono symbolem ☹. Na podstawie [30, 37, 48, 52, 55]. Przez znak (+) i (-) rozumie się odpowiednio obecność lub brak mutacji danego genu. Strzałkami ↑ oraz ↓ oznaczono wysoki lub niski poziom ekspresji genu

Fig. 3. Prognostic value of gene mutations and gene expression changes in AML with normal karyotype (CN-AML). Mood symbols indicate “good to intermediate” and “worse” prognosis. Up/down arrows: high/low gene expression, (+)/(-): presence/absence of gene mutation

Piśmiennictwo

- Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2010; 115: 453-74.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1909-18.
- Yoshida H, Ichikawa H, Tagata Y, et al. PML-retinoic acid receptor alpha inhibits PML IV enhancement of PU.1-induced C/EBPepsilon expression in myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 5819-34.
- Britos-Bray M, Friedman AD. Core binding factor cannot synergistically activate the myeloperoxidase proximal enhancer in immature myeloid cells without c-Myb. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5127-35.
- Rupa J, Lewandowski K. Granulopoeza: od roli zaangażowanych genów do czynników transkrypcyjnych i cytokin. *Acta Haematologica Polonica* 2006; 485-504.
- Stankiewicz MJ, Crispino JD. ETS2 and ERG promote megakaryopoiesis and synergize with alterations in GATA-1 to immortalize hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2009; 113: 3337-47.
- Carella C, Potter M, Bonten J, Rehg JE, Neale G, Grosveld GC. The ETS factor TEL2 is a hematopoietic oncoprotein. *Blood* 2006; 107: 1124-32.
- Zelent A, Greaves M, Enver T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene* 2004; 23: 4275-83.
- Helbling D, Mueller BU, Timchenko NA, et al. The leukemic fusion gene AML1-MDS1-EVI1 suppresses CEBPA in acute myeloid leukemia by activation of Calreticulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 13312-7.
- Friedman AD. Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 2002; 21: 3377-90.
- Link KA, Chou FS, Mulloy JC. Core binding factor at the crossroads: determining the fate of the HSC. *J Cell Physiol* 2010; 222: 50-6.
- Duprez E, Wagner K, Koch H, Tenen DG. C/EBPbeta: a major PML-RARA-responsive gene in retinoic acid-induced differentiation of APL cells. *EMBO J* 2003; 22: 5806-16.
- Mueller BU, Pabst T, Fos J, Petkovic V, Fey MF, Asou N, Buergi U, Tenen DG. ATRA resolves the differentiation block in t(15;17) acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression. *Blood* 2006; 107: 3330-8.
- Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3: 179-98.
- Du J, Stankiewicz MJ, Liu Y, Xi Q, Schmitz JE, Lekstrom-Himes JA, Ackerman SJ. Novel combinatorial interactions of GATA-1, PU.1, and C/EBPepsilon isoforms regulate transcription of the gene encoding eosinophil granule major basic protein. *J Biol Chem* 2002; 277: 43481-94.
- Pabst T, Mueller BU. Complexity of CEBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5303-7.
- Pabst T, Mueller BU, Zhang P, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2001; 27: 263-70.
- Parkin SE, Baer M, Copeland TD, Schwartz RC, Johnson PF. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) activator proteins by heterodimerization with C/EBPgamma (lg/EBP). *J Biol Chem* 2002; 277: 23563-72.
- Ranjan R, Thompson EA, Yoon K, Smart RC. C/EBPalpha expression is partially regulated by C/EBPbeta in response to DNA damage and C/EBPalpha-deficient fibroblasts display an impaired G1 checkpoint. *Oncogene* 2009; 28: 3235-45.
- Kovács KA, Steinmann M, Magistretti PJ, Halfon O, Cardinaux JR. CCAAT/enhancer-binding protein family members recruit the coactivator CREB-binding protein and trigger its phosphorylation. *J Biol Chem* 2003; 278: 36959-65.
- Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, Bozzoni I. A microRNA circuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005; 123: 819-31.
- Skokowa J, Cario G, Uenal M, et al. LEF-1 is crucial for neutrophil granulopoiesis and its expression is severely reduced in congenital neutropenia. *Nat Med* 2006; 12: 1191-7.
- Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, et al. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med* 2001; 7: 444-51.
- Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 2007; 109: 431-48.
- Geletu M, Balkhi MY, Peer Zada AA, Christopeit M, Pulikkan JA, Trivedi AK, Tenen DG, Behre G. Target proteins of C/EBPalpha30 in AML: C/EBPalpha30 enhances sumoylation of C/EBPalpha42 via up-regulation of Ubc9. *Blood* 2007; 110: 3301-9.
- Ross SE, Radomska HS, Wu B, et al. Phosphorylation of C/EBPalpha inhibits granulopoiesis. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 675-86.
- Khanna-Gupta A. Sumoylation and the function of CCAAT enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha). *Blood Cells Mol Dis* 2008; 41: 77-81.

28. Keeshan K, He Y, Wouters BJ, et al. Tribbles homolog 2 inactivates C/EBPalpha and causes acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell* 2006; 10: 401-11.
29. Rangatia J, Vangala RK, Singh SM, et al. Elevated c-Jun expression in acute myeloid leukemias inhibits C/EBPalpha DNA binding via leucine zipper domain interaction. *Oncogene* 2003; 22: 4760-4.
30. Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, Tomonaga M, Naoe T. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2009; 83: 90-8.
31. Lin LI, Chen CY, Lin DT, et al. Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1372-9.
32. Liang DC, Shih LY, Huang CF, et al. CEBPalpha mutations in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 410-4.
33. Fuchs O, Kostecka A, Provaznikova D, et al. Nature of frequent deletions in CEBPA. *Blood Cells Mol Dis* 2009; 43: 260-3.
34. Fuchs O, Provaznikova D, Kocova M, et al. CEBPA polymorphisms and mutations in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 40: 401-5.
35. Leecharendkeat A, Tocharoentanaphol C, Auewarakul CU. CCAAT/enhancer binding protein-alpha polymorphisms occur more frequently than mutations in acute myeloid leukemia and exist across all cytogenetic risk groups and leukemia subtypes. *Int J Cancer* 2008; 123: 2321-6.
36. Ralsler M, Querfurth R, Warnatz HJ, Lehrach H, Yaspo ML, Krobitch S. An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347: 747-51.
37. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelink-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009; 113: 3088-91.
38. Rázga F, Dvoráková D, Jurcek T, Jezízková I, Kristková Z, Mayer J. CEBPA gene mutational status: a complete screening using high-resolution melt curve analysis. *Mol Diagn Ther* 2009; 13: 195-200.
39. Ahn JY, Seo K, Weinberg O, Boyd SD, Arber DA. A comparison of two methods for screening CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn* 2009; 11: 319-23.
40. Renneville A, Boissel N, Gachard N, et al. The favorable impact of CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia is only observed in the absence of associated cytogenetic abnormalities and FLT3 internal duplication. *Blood* 2009; 113: 5090-3.
41. Shih LY, Liang DC, Huang CF, et al. AML patients with CEBPalpha mutations mostly retain identical mutant patterns but frequently change in allelic distribution at relapse: a comparative analysis on paired diagnosis and relapse samples. *Leukemia* 2006; 20: 604-9.
42. Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol* 2010; 28: 570-7.
43. Fröhling S, Schlenk RF, Krauter J, et al. Acute myeloid leukemia with deletion 9q within a noncomplex karyotype is associated with CEBPA loss-of-function mutations. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 42: 427-32.
44. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2739-47.
45. Akasaka T, Balasas T, Russell LJ, et al. Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). *Blood* 2007; 109: 3451-61.
46. Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia – a review. *Br J Haematol* 2008; 140: 123-32.
47. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 2008; 22: 915-31.
48. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4263-9.
49. Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, et al. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood* 2006; 108: 3654-61.
50. Moreno I, Martin G, Bolufer P, et al. Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2003; 88: 19-24.
51. Rau R, Brown P. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity. *Hematol Oncol* 2009; 27: 171-81.
52. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters – an analysis of 3082 patients. *Blood* 2008; 111: 2527-37.
53. Metzeler KH, Dufour A, Benthaus T, et al. ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5031-8.
54. Metzeler KH, Hummel M, Bloomfield CD, et al. An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 112: 4193-201.
55. Gulley ML, Shea TC, Fedoriv Y. Genetic tests to evaluate prognosis and predict therapeutic response in acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn* 2010; 12: 3-16.
56. Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen DG. Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 619-28.

Adres do korespondencji

Marzena Pieronkiewicz

Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych
Układu Krwiotwórczego
Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej
ul. Szamarzewskiego 82
60-569 Poznań
e-mail: marzena.pieronkiewicz@gmail.com