

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Vaidas

DIRSĖ

Suaugusiųjų ūminės limfoleukemijos genominių veiksmų ir jų evoliucijos tyrimas

DAKTARO DISERTACIJA

Medicinos ir sveikatos mokslai

Medicina M 001

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2015–2019 metais Vilniaus universitete, Medicinos fakultete, Vidaus ligų, šeimos medicinos ir onkologijos klinikoje.

Mokslinis vadovas:

prof. dr. Laimonas Griškevičius (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Mokslinis konsultantas:

doc. dr. Kajsa Paulsson (Lund University)

TURINYS

ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1. Ūminės limfocitų leukemijos epidemiologija	10
1.2. Ūminės limfocitų leukemijos biologija	12
1.2.1. B ląstelių vystymasis	12
1.2.2. B ląstelių vystymosi transkripcinis reguliavimas	15
1.2.3. T ląstelių vystymasis	18
1.2.4. T ląstelių vystymosi transkripcinis reguliavimas	19
1.2.5. B ląstelių vystymosi sutrikimas: B ūminė limfocitų leukemija	21
1.2.6. B-ŪLL inicijuojantys chromosominiai pokyčiai	22
1.2.7. T ląstelių vystymosi sutrikimas: T ūminė limfocitų leukemija	27
1.2.8. T-ŪLL inicijuojantys chromosominiai pokyčiai	27
1.2.9. B ir T-ŪLL inicijuojančios submikroskopinės delecijos / duplikacijos	28
1.2.10. B ir T-ŪLL mutacijų spektras	30
1.3. Klinikinė diagnostika	31
1.4. Genetinė diagnostika	32
1.5. Molekulinis kariotipavimas ir jo taikymas	33
1.6. Prognostinė chromosominių aberacijų ir mutacijų reikšmė ŪLL	34
1.7. Kloninė chromosominių aberacijų ir mutacijų evoliucija esant ŪLL	38
2. TYRIMO METODIKA	40
2.1. Tiriamieji	40
2.2. Tyrimo sumanymas	41
2.3. Tyrimo eiga ir metodai	41
2.3.1. DNR išskyrimas ir DNR koncentracijos ir grynumo matavimas	41
2.3.2. MK metodas	42

2.3.3. <i>TP53</i> geno mutacijų tyrimas	45
2.3.4. ŪLL NKS mutacijų duomenų bazėje atranka, NKS metodikos principai.....	45
2.3.5. Statistinė analizė: koreliacija su klinikiniais duomenimis, IBLP ir BI tyrimų metodika.....	46
3. TYRIMO REZULTATAI	47
3.1. Tiriamųjų charakteristikos.....	47
3.2. MK tyrimu nustatytų genominių aberacijų spektras suaugusiųjų ŪLL	49
3.3. <i>TP53</i> geno mutacijos suaugusiųjų ŪLL grupėje	58
3.4. Statistinė analizė: koreliacija su klinikiniais duomenimis, IBLP ir BI tyrimų rezultatai	59
3.5. Genominės kloninės evoliucijos rezultatai.....	60
4. TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS.....	64
5. IŠVADOS	71
6. LITERATŪRA.....	72
7. PADĖKA.....	92
8. PRIEDAI	93
9. APIE AUTORIŲ	104

SANTRUMPOS

ALP – ankstyvasis limfocitų pirmtakas	NK – ląstelė „natūralioji žudikė“ (angl. <i>natural killer</i>)
APL – antigeną pateikiančios ląstelės	NKS – naujos kartos sekoskaita
BCR – B ląstelių receptorius (angl. <i>B-cell receptor</i>)	NOPHO – Skandinavų Europos vaikų onkologų ir hematologų asociacija (angl. <i>Nordic society of paediatric hematology and oncology</i>)
BI – bendras išgyvenamumas	PCR – polimerazės grandininė reakcija
BLP – bendrasis limfocitų pirmtakas	PDLP – pirminis daugiakryptis limfocitų pirmtakas
DH – didelė hiperdiploidija	SCF – kamieninių ląstelių veiksnys (angl. <i>stem cell factor, SCF</i>)
DN – dvigubai neigiamos	SLV-1 – chemokino stromos ląstelių veiksnys – 1
DT – dvigubai teigiamos	Tc – T citotoksinės ląstelės (angl. <i>T cytotoxic cells</i>)
FL – folikulinės zonos B ląstelės	TCR – T ląstelių receptorius (angl. <i>T-cell receptor, TCR</i>)
GC – germinalinis centras	TdT – deoksinukleotidiltransferazė
H – sunkioji grandinė (angl. <i>heavy chain</i>)	Th – T helperiai (angl. <i>T helpers</i>).
HKL – hematopoetinė kamieninė ląstelė	TKI – tirozino kinazės inhibitorius
HP – heterozigotiškumo praradimai	UH – „užsimaskavusi hipodiploidija“
IBLP – išgyvenamumas be ligos progresijos	ŪLL – ūminė limfoleukemija
Ig – imunoglobulinas	ŪML – ūminė mieloleukemija
ITAM – imunoreceptorių tirozino aktyvacijos motyvai	MPL – multipotentinė pirmtakė ląstelė
LGH – lyginamoji genomine hibridizacija	MZL – marginalinės zonos B-ląstelės
MK – molekulinis kariotipavimas	NK – ląstelė „natūralioji žudikė“ (angl. <i>natural killer</i>)
MPL – multipotentinė pirmtakė ląstelė	NK – ląstelė „natūralioji žudikė“ (angl. <i>natural killer</i>)
MZL – marginalinės zonos B-ląstelės	

ĮVADAS

Darbo tematika

Disertacija „Suaugusiųjų ūminės limfoleukemijos genominių veiksnių ir jų evoliucijos tyrimas“ yra sudaryta iš dviejų susijusių dalių, kurios yra aktualios šiuolaikinėje onkohematologijoje. Pirmoje dalyje, pasitelkus molekulinio kariotipavimo metodą (MK), ištirti 2007–2013 m. Lietuvoje diagnozuotų suaugusių pacientų ūminės limfoleukemijos (ŪLL) atvejai. Šioje dalyje MK, pasižyminčiu didele skiriamąja geba, nustatomas platus chromosominių aberacijų spektras, kuris apima tiek nedideles delecijas / duplikacijas, tiek stambius struktūrinius chromosominius pokyčius bei pavienių chromosomų monosomijas / trisomijas. Nustačius genominių aberacijų „žemėlapi“, buvo bandoma jį detalizuoti ir struktūrizuoti: įvertinti genominių aberacijų dažnį, jų pasiskirstymą pagal tipą, dydį, lokalizaciją kariotipe. Dėl santykinai didelio MK tikslumo yra identifikuojama, kokie genai patenka į nustatytų aberacijų ribas, bei įvertinamas genų potencialus leukemogeninis poveikis. Aberacijų analizės metu nustatyti nauji genai kandidatai, kurie gali turėti įtakos ŪLL ligai atsirasti suaugusių pacientų grupėje. Susisteminti genominių aberacijų rezultatai buvo susieti su suaugusių ŪLL pacientų klinikiniais duomenimis ir įvertinta asociacija tarp genominių pokyčių ir jų įtakos išgyvenamumui be ligos progresijos ir bendram išgyvenamumui.

Antroje tyrimo dalyje buvo bandoma nustatyti, kaip vyksta genominė kloninė evoliucija esant suaugusiųjų ŪLL. MK nustačius genomines aberacijas, diagnozės metu analogiškai galima patikrinti aberacijų spektro pokyčius ligos atkryčio metu. Taip pat buvo nagrinėtas ir mutacijų, nustatytų naujos kartos sekoskaitos (NKS) metodu, pasiskirstymas tarp šių dviejų kritinių ŪLL ligos etapų. Įvertinus šiuos duomenis buvo apibrėžtos kelios kloninės evoliucijos kryptys, jose dalyvaujantys su leukemija susiję genai ir galima šio genominio reiškinio klinikinė reikšmė ŪLL.

Darbo naujumas, aktualumas ir reikšmė

Tyrimas, kai yra analizuojami genominiai pokyčiai sergant onkohematologine liga, yra pirmas tokio pobūdžio Lietuvoje. Reikėtų pažymėti, kad šiuo metu pasaulyje yra atliktos tik penkios analogiškos studijos, kuriose tirtas aberacijų spektras ŪLL ligoje suaugusių pacientų grupėje, tačiau tik mūsų tyrime pabandyta pažiūrėti į galimą genominių aberacijų įtaką išgyvenamumui be ligos progresijos ir bendram išgyvenamumui. Iki šios dienos disertacijoje tiriama suaugusiųjų ŪLL kloninė evoliucija turi tik vieną lyginamąją analogišką studiją, atliktą Švedijos tyrėjų (Safavi et al., 2015).

Vaikų ŪLL genomika yra santykinai gerai ištirta ir suklasifikuota didelėse imtyse, o genominių aberacijų dažnis ir pasiskirstymas suaugusiųjų ŪLL grupėje taip išsamiai nėra analizuotas. Žinant, kad suaugusiųjų ŪLL atsakas į gydymą, išgyvenamumo be ligos progresijos ir bendro išgyvenamumo rodikliai yra kur kas prastesni nei vaikų, yra aktualu detaliau gilintis į šios ligos genominių aberacijų klinikinę ir biologinę reikšmę. Suaugusiems ŪLL pacientams taip pat būdingas dažnesnis ligos atkrytis, tad yra ypač svarbu išsiaiškinti kloninės evoliucijos biologinius mechanizmus, kryptis ir jų įtaką ligai progresuoti.

Tyrimo reikšmingumas ir naujumas atsiskleidžia tiriamojoje imtyje, nes dėl nedidelės šalies populiacijos ir bendros pacientų registravimo sistemos buvo galimybė surinkti ir ištirti visus 2007–2013 m. šalyje diagnozuotus suaugusiųjų ŪLL atvejus. Tokia populiacinė homogeniškos imties analizė gali tiksliau atskleisti šios agresyvios onkohematologinės ligos genomines aberacijas, jų tikslų pasiskirstymą ir dažnį bei įvertinti galimą klinikinę reikšmę.

Tyrimo tikslas – ištirti suaugusiųjų ūminės limfoleukemijos pacientų genominių aberacijų paplitimą, jų prognostinę reikšmę ir įvertinti kloninę ligos evoliuciją genomo lygmeniu.

Tyrimo tikslui įgyvendinti iškelti uždaviniai:

1. Atlikti suaugusiųjų ŪLL pacientų genominių aberacijų analizę – nustatyti aberacijų dažnį, tipą, dydį, pasiskirstymą kariotipe, lokalizaciją chromosomoje.
2. Nustatyti naujas, pasikartojančias genomines aberacijas pirminės diagnozės metu, galimai turinčias įtakos ŪLL patogenezei. Identifikuoti naujus genus kandidatus Lietuvos populiacijos suaugusiųjų ŪLL grupėje.
3. Įvertinti genominių aberacijų prognostinę reikšmę išgyvenamumui be ligos progresavimo ir bendrajam išgyvenamumui.
4. Nustatyti suaugusiųjų ŪLL kloninę chromosominių aberacijų ir mutacijų evoliuciją ligos atkryčio metu. Įvertinti šių genominių aberacijų įtaką biologiniams ŪLL mechanizms.

Ginamieji teiginiai:

1. Lietuvos suaugusiems ŪLL pacientams būdingas mažesnis genominių aberacijų atvejui dažnis negu kitoms suaugusiųjų ŪLL populiacijoms. Lyginant su kitomis suaugusiųjų ŪLL studijomis, nustatyti panašūs aberantiniai leukemogenezės genai (*CDKN2AB*, *PAX5*, *IKZF1*, *ETV6*, *EBF1*, *TP53*), tačiau jų dažnis yra mažesnis.

2. Suaugusiųjų ŪLL grupėje nustatyti galimai nauji genai kandidatai, kurie yra susiję su ŪLL leukemogeneze.
3. Nustatytos chromosominės sritys ir aberantiniai genai, kurie gali turėti įtakos suaugusiųjų ŪLL išgyvenamumui be ligos progresijos ir bendram išgyvenamumui.
4. Suaugusiųjų ŪLL grupėje chromosominių aberacijų ir mutacijų lygmeniu nustatytos trys kloninės evoliucijos kryptys: identiški genominių aberacijų klonai diagnozės ir ligos atkryčio metu, dinaminė kloninė evoliucija iš diagnostinio klonu ir evoliucija iš preleukeminio klonu. Dažniausi aberantiniai genai kloninės evoliucijos metu buvo *CDKN2AB*, *PAX5*, *IKZF1*, *ETV6*, *BTG1*, *NRAS*, *KRAS*. ŪLL kloninei evoliucijai gali turėti įtakos *NRAS/KRAS* genų mutacijų ir *CDKN2AB* geno delecijų biologinių mechanizmų asociacija.

Darbo aprobacija

Darbo rezultatai paskelbti keturiuose ISI sąrašo mokslo leidiniuose, pristatyti tarptautinėse konferencijose.

Publikacijos disertacijos tema (4):

Dirse V, Bertasiute A, Gineikiene E, Zvirblis T, Dambrauskiene R, Gerbutavicius R, Juozaityte E, Malciute L, Paulsson K, Griskevicius L. A population-based single nucleotide polymorphism array analysis of genomic aberrations in younger adult acute lymphoblastic leukemia patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015 May; 54(5): 326–333.

Dirse V, Gineikiene E, Zvirblis T, Bertasiute R, Paulsson K, Griskevicius L. Single nucleotide polymorphism array analysis of clonal evolution in younger adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2016 Nov; 57(11): 2716–2719.

Dirse V, Norvilas R, Gineikiene E, Matuzevičienė R, Griskevicius L, Preiksaitiene E. *ETV6* and *NOTCH1* germline variants in adult acute leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018 Apr; 59(4): 1022–1024.

Vaisvilas M, **Dirse V**, Aleksuniene B, Tamuliene I, Cimbaliene L, Utkus A, Rascon J. Acute Pre-B Lymphoblastic Leukemia and Congenital Anomalies in a Child with a de Novo 22q11.1q11.22 Duplication. *Balkan J Med Genet*. 2018 Oct 29; 21(1): 87–91.

Žodiniai pranešimai disertacijos tema (2):

V. Dirsė. SNP array analysis of adults ALL: a population-based study of Lithuanian patients in 2007–2013. Baltijos hematologijos konferencija, 2014, Vilnius, Lietuva.

V. Dirsė, E. Gineikienė, T. Žvirblis, R. Bertašiūtė, A. Bertašiūtė, J. Drachneris, U. Mickys, M. Stoškus, K. Paulsson, L. Griškevičius. Limfoproliferacinių ligų genominių veiksnių ir jų evoliucijos tyrimas. Jaunųjų mokslininkų konferencija „BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“, 2017. Vilnius, Lietuva.

V. Dirsė, E. Gineikienė, T. Žvirblis, R. Bertašiūtė, J. Drachneris, U. Mickys, M. Stoškus, K. Paulsson, L. Griškevičius. A population based single nucleotide polymorphism array analysis of genomic aberrations in lymphoproliferative diseases. 1-oji tarptautinė doktorantų konferencija „Science for Health 2018“, 2018 m. balandžio 13 d. Kaunas, Lietuva.

R. Norvilas, **V. Dirsė,** R. Semaškevičienė, O. Mickevičiūtė, G. Vaitkevičienė, J. Rascon, L. Griškevičius. Cytokine receptor and kinase signaling pathway activating alterations in pediatric and adult B-other ALL. Baltijos hematologijos konferencija. Talinas, Estija, 2018.

Stendiniai pranešimai ir tezės, pateiktos konferencijose (2):

V. Dirse, T. Zvirblis, L. Griskevicius, SNP array analysis of adult ALL: a population based study of lithuanian patients. Abstract book of 18th Congress of the European Hematology Association, Stockholm, June 13–16, p. 7 (2013).

Norvilas R., **Dirse V.,** Gineikiene E., Matuzevičienė R., Griskevicius L., Preiksaitiene. „ETV6 and NOTCH1 germline variants in adult acute lymphoblastic leukemia – a case report“. European Society of Human Genetics. Copenhagen, Denmark, 2017.

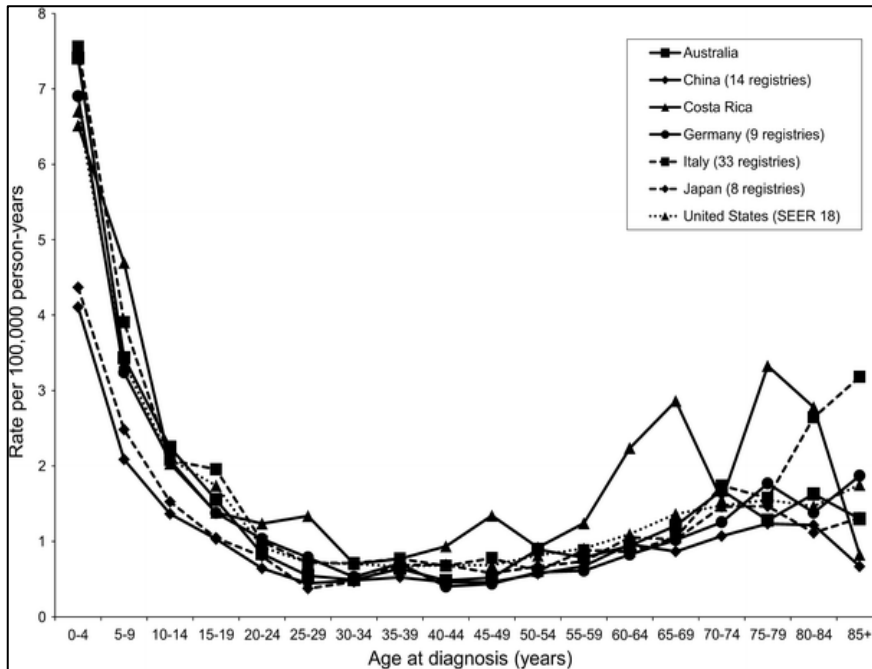
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Ūminės limfoleukemijos epidemiologija

ŪLL dažniausiai yra nustatoma 0–14 metų (3–4 atvejai iš 100 000), kiek rečiau 15 metų amžiaus ir vyresniems (~1 atvejis iš 100 000) vaikams. Vaikų ŪLL yra dažniausia leukemija (75 % visų ūminių leukemijų) ir sudaro apie trečdalį visų vaikų diagnozuojamų vėžinių susirgimų (Onciu et al., 2009). Buvo atlikta plataus spektro epidemiologinė studija, kuri apibendrino 184 šalių ŪLL dažnį. Studija rėmėsi 2003–2007 m. nacionaliniais vėžio registro duomenimis (68 šalys), papildomai buvo peržiūrėta 2012 m. IARC's GLOBOCAN duomenų bazė (184 šalys). Dažnis buvo skaičiuojamas 100 000 asmenų per metus, taip pat atsižvelgiama į amžiaus grupes, lytį. Studija parodė, kad ŪLL dažniausiai nustatoma Ekvadore (2,8 atvejo iš 100 000), Kosta Rikoje (2,4 atvejo iš 100 000) ir Kolumbijoje (2,3 atvejo iš 100 000). Rezultatai dar kartą patvirtino, kad ši liga dažniausiai nustatoma vaikams (didžiausiais pikas 0–4 metų amžiaus grupėje), vis dėlto buvo pastebėta tendencija, kad ŪLL dažnis vėl smarkiai padidėja 75 metų ir vyresniems asmenims (Miranda-Filho et al., 2018).

Remiantis kita panašaus pobūdžio studija (5 žemynai, 21 šalis) nustatyta, kad, 2003–2007 metų registro duomenimis, visose šalyse ŪLL siekė nuo 1,08 iki 2,12 atvejo 100 000 asmenų. Vėlgi pasitvirtino, kad didžiausias ligos paplitimas buvo Pietų Amerikoje (Kosta Rikoje ir Kolumbijoje), o mažiausias – Azijoje (Kinija, Pietų Korėja) ir Rytų Europoje (Lenkija, Čekija). Lyginant pagal amžiaus grupes, didžiausias ŪLL pikas yra pasiekiamas 0–4 metų amžiaus grupėje, mažiausiai ligos atvejų nustatoma 25–29 metų ir 45–49 metų amžiaus grupėse. Vėl ligos dažnis ima didėti pradedant nuo 50–54 metų amžiaus grupės (Katz et al., 2015) (1 pav.).

Šiaurės (Norvegija, Suomija, Danija, Švedija) ir Baltijos (Lietuva, Estija) šalys naudojo bendrą diagnostikos ir gydymo protokolą (NOPHO 2008), kuriuo 2008–2014 metais įvertino 1509 ŪLL pacientų (1–45 metų) rezultatus. Pagal amžiaus grupes ŪLL pasiskirstymas buvo toks: 1022 (67,7 %) atvejų 1–9 metų amžiaus grupėje, 266 (17,6 %) atvejų 10–17 metų amžiaus grupėje ir 221 (14,6 %) atvejų suaugusiųjų grupėje (18–45 metų amžiaus grupė) (Toft et al., 2018). Abi prieš tai aprašytos studijos patvirtina, kad dažniau liga pasitaiko vyrams negu moterims (atitinkamai 55 % ir 45 %). Epidemiologiniu požiūriu buvo atskirai pažvelgta į suaugusiųjų ŪLL grupę. Moorman su autoriais išanalizavo 349 ŪLL sergančių vyresnių nei 15 metų asmenų duomenis (1983–2001 m. Jungtinės Karalystės nacionalinės statistikos departamentas). Didžiausias ŪLL dažnis nustatytas 15–19 metų ir >70 metų amžiaus grupėse, mažiausiai liga serga 35–39 ir 55–59 metų



1 pav. ŪLL pasiskirstymas pagal amžių skirtingose šalyse 100 000 atvejų (Katz et al., 2015)

amžiaus grupės asmenys. Vėl patvirtinta teorija, kad ŪLL dažnesnė vyrams negu moterims (santykis 1,2 : 1), šis santykis dar padidėja jaunesniame amžiuje (1,8 : 1) (Moorman et al., 2010).

Buvo atlikta 11 Vokietijos registrų centrų (1175 ŪLL pacientai 15–69 m.) ir JAV epidemiologijos tarnybos (2314 ŪLL pacientų, 15–69 m.) duomenų bazių analizė. Pagal Vokietijos ir JAV duomenų bazines, suaugusiųjų ŪLL vidutinis sergamumo amžius yra 39 metai (Pulte et al., 2014). Analogiška vieno centro (Indija) 507 suaugusių ŪLL pacientų (15–67 m.) analizė nustatė 26 metų vidutinį amžių susergant šia liga (Jain et al., 2018). Lietuvoje ŪLL atvejai imti registruoti 1998 metais. Vaikų ŪLL atvejų 1998–2019 m. nustatyta 566, o suaugusiųjų – 154 atvejai (18–45 m. amžiaus 117, > 45 m. – 37) (vidutiniškai 1,21 atvejo 100 000 gyventojų) (neskelbti duomenys).

1.2. Ūminės limfoleukemijos biologija

1.2.1. B ląstelių vystymasis

Ūminė limfoblastinė leukemija – kraujodaros liga, atsirandanti sutrikus limfoidinių ląstelių pirmtakių vystymuisi. Priklausomai nuo sutrikusių ląstelių pirmtakių tipo ŪLL skirstoma į: B ląstelių ir T ląstelių ŪLL. Nors yra ne viena B ląstelių vystymosi schema, tačiau, manoma, kad B ląstelių vystymasis prasideda nuo hematopetinės kamieninės ląstelės (HKL). HKL toliau diferencijuojasi į ankstyvą pro-B ląstelę, vėlyvą pro-B ląstelę, didelę pre-B ląstelę, mažą pre-B ląstelę, nesubrendusią B ląstelę ir subrendusią B ląstelę. Pirmiausia HKL aptinkamos vaisiaus trynio maišelyje, tada jos migruoja į distalinę aortą (3–4 nėštumo savaitė), vėliau hematopoezė tęsiasi vaisiaus kepenyse (6 nėštumo savaitė) ir galiausiai viskas pereina į kaulų čiulpus (Bryder et al., 2006). HKL yra pluripotentinės, atsinaujinančios, gebančios diferencijuotis į bet kurią kraujodaros ląstelę (Ashley et al., 2017). Priklausomai nuo gaunamo ląstelinio stimulo ir veikiančių transkripcijos veiksnių HKL gali diferencijuoti įvairiais keliais. HKL produkuoja multipotentines pirmtakes ląsteles (MPL). HKL virtimui į MPL didelę reikšmę turi *c-kit* geno koduojamo receptoriaus sąveika su *SCF* geno (angl. *stem cell factor, SCF*), koduojamo kamieninių ląstelių veiksnio ligando. Po šios receptoriaus ir ligando sąveikos HKL praranda galimybę save atnaujinti, tačiau vis dar išlaiko savybę diferencijuoti į kitas kraujo ląstelių linijas (Zayas et al., 2008). Šiame procese MPL tolesnei migracijai reikšminga ir chemokino stromos ląstelių veiksnio – 1 (SLV-1) sąveika su chemokino receptoriumi CXCR-4. Atlikus geno *SLV-1* išveiklinimo eksperimentą pelėms, buvo nustatyta, kad pelių kaulų čiulpuose hematopoezė nebevyksta, tačiau vaisiaus kepenyse ji buvo nepaveikta. Skiriamasis HKL ir MPL stadijų veiksnys yra paviršinio ląstelinio žymens CD34 raiška (Möhle et al., 1998; Reid et al., 2018).

Pirminis daugiakryptis limfocitų pirmtakas (PDLP) yra kita B ląstelių vystymosi stadija po MPL, kur PDLP dar turi galimybę keisti kryptį į eritroidinių-mieloidinių ląstelių linijas, tačiau daugiausia išlaiko limfoidinių ir granulocitų / makrofagų ląstelių linijų vystymosi potencialą. Pelių modelyje kritiniai veiksniai MPL ir PDLP stadijose yra citokinai FLT3LG ir IL-7. Eksperimentiniu būdu pašalinus šių citokininų receptorių, B ląstelių limfopoezė būdavo blokuojama ir nebevykdavo (Ichii et al., 2014). *FLT3* ir *IL-7* genų funkcijos kelia diskusijų kalbant apie žmogaus B ląstelių vystymąsi. Manoma, kad čia yra būtinas *FLT3*, tačiau *IL-7* atlieka svarbias funkcijas tik tam tikrose stadijose. *FLT3* raiška parodo, kad galutinai pereita iš MPL į PDLP stadiją (Hystad et al., 2007; Nakamori et al., 2012).

Iš PDLP vėliau diferencijuojasi ankstyvieji limfoidiniai pirmtakai (ALP), kurių skiriamasis bruožas yra pirmą kartą atsiradusi RAG genų raiška. Dalis ALP migruoja į užkrūčio liauką, kur virsta T ląstelių pirmtakais, o dalis lieka kaulų čiulpuose ir toliau dalyvauja B ląstelių vystymosi procese (Zlotoff et al., 2011). Tolesniame etape ALP diferencijuojasi į bendruosius limfoidinius pirmtakus (BLP), kurie pagal ląstelės paviršiaus žymenį Ly6D skirstomi į: Ly6D- ir Ly6D+. BLP su Ly6D- yra būdinga proliferacija į B, T ląsteles, dendritines ir NK ląsteles, tačiau prarandamas potencialas virsti mieloidinės linijos ląstelėmis. BLP su Ly6D+ proliferuoja tik į B ląsteles. Diferenciacijos į T ląsteles nepavyko pakeisti net BLP Ly6D+ eksperimentiškai perkėlus į užkrūčio liaukos mikroaplinką (Zlotoff et al., 2011). BLP stadijoje daugiausia diskusijų kelia IL-7 ir IL-7R vaidmuo. Yra nemažai tyrimų, kur parodyta, kad pelėms IL-7 yra reikalingas BLP išgyvenamumui, plitimui ir diferenciacijai (Dias et al., 2005), tačiau nėra iki galo išaiškinta IL-7 reikšmė žmogaus BLP etape (Payne et al., 2011). Vis dėlto neabejojama IL-7 ir IL-7R reikšme tolesniuose B ląstelės vystymosi etapuose, pvz.: pro-B, pre-B ląstelėse (Sanchez et al., 2011).

Iš BLP vyksta tolesnis vystymasis į ankstyvasias pro-pre-B ląstelės stadijas, kuriose atsiranda specifiniai ląstelės paviršiaus žymenys: CD45R, II klasės MHC, CD19, CD40. Taip pat padidėja *EBF-1* geno, kurio produkuojamas baltymas kartu su *E2A* geno baltymu jungiasi prie Ig geno ir pirmą kartą indukuoja imunoglobulinų genų persitvarkymo pradžią, raiška (Lutz et al. 2011). Ig persitvarkymus, kurie paremti dvigrandžių trūkių inicijavimu tarp genų segmentų, atlieka šioje stadijoje aktyvavusių *RAG1* ir *RAG2* genų (angl. *recombination activating genes*) koduojamas baltymų kompleksas (rekombinazės), o nukleotidus atsitiktine tvarka V(D)J grandinių rekombinacijoje prijungia terminalinės deoksinukleotidiltransferazės (TdT) (Motera et al., 2010). Ankstyvame pro-B ląstelių etape atsitiktinai yra sujungiami sunkiosios grandinės (angl. *heavy chain, H*) variabilios srities D ir J segmentai. V segmento prijungimu prie jau susidariusio D-J komplekso prasideda vėlyvas pro-B-ląstelės etapas. Čia prasideda CD19 ląstelės paviršiaus žymens raiška, kuri vyksta kartu su ankstyvoje pro-B ląstelės stadijoje prasidėjusia CD45R raiška. Prieš tai aprašytiems veiksams vykti yra svarbūs kaulų čiulpų stromos ląstelių citokinai: IL-7, SCF ir į insuliną panašus augimo veiksnys-1 (angl. *insuline-like growth factor-1, IGF-1*). Manoma, kad IL-7 yra reikalingas stimulus pro-B ląstelių populiacijai didėti, o IGF-1 ir SCF – pro-B ląstelių proliferacijai (Gibson et al., 1993; Youssef et al., 2017).

Visiškai pasibaigus Ig sunkiosios grandinės VDJ rekombinacijai, prasideda pre-B-ląstelės stadija. Pre-B ląstelės savo membranoje turi susiformavusį pre-B-ląstelės receptorių (angl. *pre-B-cell receptor, pre-BCR*), kurį sudaro jau susiformavusi sunkioji H grandinė, dvi surogatinės lengvosios grandinės L (sudarytos iš VpreB ir

lamda 5 segmentų) bei dvi signalo perdavimo transmembraninės molekulės Igα (CD79a) ir Igβ (CD79b). Pre-BCR vyksta alelių ekskluzija ir sustabdomi sunkiosios grandinės persitvarkymai (Winkler et al., 2018). Citoplazminės Ig H grandinės „uodegėlės“ dar yra per trumpos, tad tolesnės signalo kaskadas vykdo Igα ir Igβ imunoreceptorių tirozino aktyvacijos motyvai (ITAM). Kol kas neaišku, koks ligandas sukelia iniciacinį ITAM fosforilinimą, tačiau tai sukuria citoplazminį signalinį kelią, dėl kurio ima proliferuoti pre-B ląstelės su identiška Ig H grandine. Kadangi šio proceso metu besidalijančios ląstelės yra didesnės negu nesidalijančios, ši stadija vadinama didelių pre-B ląstelių stadija.

Pasibaigus proliferacijai, dalis pre-B ląstelių netenka pre-BCR – tokios ląstelės pereina pirmąjį kontrolinį tašką ir apoptozės būdu yra pašalinamos. Pasibaigus proliferacijai, pereinama į mažų (nebesidalijančių) pre-B ląstelių etapą, kuriame jau yra visiškai suformuota citoplazminė-membraninė Ig sunkioji grandinė ir prasideda Ig lengvosios grandinės persitvarkymai (matoma rekombinazės genų *RAG1/2* padidėjusi raiška) (Clark et al., 2005). Ig lengvosios grandinės persitvarkymo metu vyksta geno segmentų V ir J susijungimas. Nepavykus šiam procesui ir nesusiformavus persitvarkiusiai lengvajai grandinei, ląstelė nepereina antrojo kontrolinio taško ir žūsta. Ląstelės, kurioms pavyksta suformuoti lengvąją grandinę, virsta nesubrendusiomis B ląstelėmis. Visi pirmiau aprašyti etapai (nuo KL iki nesubrendusios B ląstelės) yra vadinami nuo antigeno nepriklausančiais. Nesubrendusios B ląstelės savo paviršiuje turi IgM tipo BCR ir pasižymi dideliu specifiškumu antigenui. Ši savybė leidžia atrinkti nesubrendusias B ląsteles, kurių IgM-BCR reaguoja su savais antigenais (pvz.: subrendusiomis B ląstelėmis) (Maity et al., 2015; Winkler et al., 2018). Tokioms ląstelėms toliau galimos trys kryptys: vyksta jų apoptozė (kloninė delecija), iš naujo aktyvinamos rekombinazės *RAG1/2* ir pakartotinai pertvarkomos BCR grandinės arba dalis šių ląstelių tampa anerginėmis – palieka kaulų čiulpus, pasižymi IgD raiška, nedidele IgM raiška, tačiau nesugeba reaguoti į antigeną ir greitai žūsta. Visa ši vykdoma atranka yra vadinama neigiama B ląstelių selekcija. Po jos atrinktos ir su savais antigenais nereaguojančios nesubrendusios B ląstelės keliauja iš kaulų čiulpų į blužnį tolesniam toliau vystytis (Noviski et al., 2018). Patekusios į blužnį nesubrendusios B ląstelės yra vadinamos tranzitinėmis ir skirstomos į T1 ir T2 ląsteles. Blužnyje periarteriniame limfoidiniame apvalkale vykdoma T1 ląstelių neigiama selekcija ir apoptozės metu yra sunaikinamos ląstelės, kurių BCR reaguoja į savus antigenus. Tada T1 ląstelės patenka į pirminį blužnies folikulą ir yra vadinamos T2 ląstelėmis. Jos turi pereiti teigiamą selekciją, kai atrenkamos T2 ląstelės, galinčios prisijungti antigeną. Svarbus tranzitinių ląstelių brendimo veiksnys yra B ląsteles aktyvinantis veiksnys (angl. *B-cell activating factor*, *BAFF*) ir jo sąveika su BAFF receptoriais, esančiais nesubrendusių B ląstelių membranose. Ši aktyvacija toliau leidžia T2

ląstelėms virsti arba marginalinės zonos Bląstelėmis (MZL), arba folikulinėmis Bląstelėmis (FL) (Pieper et al., 2013). Esminis veiksnys, nuo kurio priklauso, išsivystys MZL ar FL, yra BCR signalo stiprumas. Esant stipriam BCR signalui kartu su kanoniniu branduolio veiksnio κB (angl. *nuclear factor κB* , *NF- κB*) signalu T2 ląstelės diferencijuojasi į FL pirmąjį tipą (FL-I). Manoma, kad FL-I virsta tos T2 ląstelės, kurios turi didelį afiniškumą savo antigenui. Jeigu BCR signalas yra silpnas, bet kartu „įsijungia“ ir NF- κB bei NOTCH2 signalinimo keliai, tada T2 ląstelės virsta MZL. Manoma, kad MZL labiau linkusios virsti T2 ląstelės, kurios turi mažesnę afiniškumą „svetimiems“ antigenams, bet didesnę reaktivumą „saviems“ antigenams. Yra iškelta hipotezė, kad marginalinei zonai visiškai užsipildžius MZL, T2 ląstelės gali virsti FL-II, kurios yra tarsi rezervinės ir esant poreikiui vėl gali diferencijuotis į MZL (Pillai et al., 2009). MZL būna lokalizuotos blužnies baltojoje pulpoje (išorinė blužnies limfoidinio audinio dalis), produkuoja IgM, bet mažiau IgD, yra ilgaamžės, tačiau po sąveikos su antigenu gali virsti trumpai gyvuojančiomis plazminėmis ląstelėmis (PL), kurios produkuoja didelį kiekį IgM (Cerutti et al., 2013). FL keliauja į limfmazgiuose esančius germinacinius centrus (GC) toliau vystytis. GC esančiose FL įvyksta hipermutacija – reiškinys, kai daugybę kartų mutuoja Ig variabilus regionas, taip padidinant afiniškumą antigenui. GC taip pat vyksta sąveika tarp FL ir nuo T ląstelių priklausomo antigeno, kurį produkuoja ir padeda prisijungti folikulinės dendritinės ląstelės ir folikuliniai T helperiai (angl. *follicular T-helper*). Dalis FL po šios aktyvacijos iškart virsta trumpaamžėmis plazminėmis ląstelėmis su mažo afiniškumo IgM – jos yra reikalingos greitam imuniniam atsakui esant infekcijoms (De Silva et al., 2015; Takemori et al., 2014).

Lygiagrečiai besivystančiose FL, po sąveikos su folikuliniais T-helperiais, vyksta ir „imunoglobulinų klasių perjungimas“, kai rekombinacijos būdu bręstanti B ląstelė geba keisti imunoglobulinų klases iš vienos į kitą, taip užtikrindama didesnes galimybes prieš įvairius antigenus (Xu et al., 2012). Po „klasių perjungimo“ FL virsta atminties B ląstelėmis ir palieka GC. Atminties-B ląstelei būdingas ilgaamžiškumas, didelis antikūnų afiniškumas, IgG produkavimas, IgM/IgD raiškos praradimas. Susidariusiomis trumpalaikėmis (iš MZL), ilgalaikėmis (iš FL) plazminėmis bei atminties B-ląstelėmis (iš FL) baigiasi B ląstelės diferenciacijos ir vystymosi ciklas.

1.2.2. B ląstelių vystymosi transkripcinis reguliavimas

B ląstelių vystymuisi yra būtina įvairių transkripcijos ir signalo pernašos kelių aktyvacija. Branduolio lygmeniu šias pagrindines funkcijas atlieka transkripcijos veiksniai: PU.1, Ikaros, ID-1, E2A, EBF1 ir PAX5.

PU.1 priklauso ETS transkripcijos veiksnių šeimai (kilpa-spiralė-kilpa tipas) ir jungiasi prie purinų gausių DNR sekų (motyvų). PU.1 B ląstelėse reguliuoja kritiškai svarbius genus: *CD79a* (I α), J grandinę, μ grandinę, κ grandinę, λ grandinę, RAG1 rekombinazę, terminalinę deoksinukelotidil- transferazę (Somasundaram et al., 2015). ETS šeimos transkripcijos veiksniai pasižymi silpnu transkripciniu aktyvumu ir dažniausiai procese dalyvauja kartu su kitais pagalbinais transkripcijos veiksniais. Ne išimtis yra ir PU.1, kuris veikia kartu su PIP (LSIRF, IRF4), c-JUN ir c-FOS transkripcijos veiksniais. Eksperimentiškai pelėse išveiklinus *PU.1* geną, buvo produkuojami neveiksnūs, pakitę monocitai, granulocitai ir limfocitų pirmtakai, kas indikuoja šios transkripcijos veiksnio svarbą B ląstelės vystymuisi, o ypač MPL ir PDLP stadijose (Pang et al., 2018).

Ikaros priklauso „cinko pirštelių“ transkripcijos veiksnių šeimai, jo raiška matoma tiek KL, tie subrendusiuose limfocituose. Išskirtinis šio transkripcijos veiksnio bruožas yra tai, kad jo transkriptas yra potencialus taikinyas alternatyviajam splaisingui, todėl Ikaros yra būdingos skirtingos izoformos, kurios gali jungtis prie skirtingų DNR sekų. Šis transkripcijos veiksnys kontroliuoja B ląstelių limfopoezę ir funkcijas įvairiais lygmenimis. Pirmiausia, Ikaros aktyvina IL-7R ir Flt3 receptorių raišką BLP stadijoje ir EBF transkripcijos veiksnį pre-pro-B ląstelių stadijose (Sellars et al., 2011). Vėliau Ikaros kontroliuoja Ig H rekombinaciją aktyvindamas *RAG1/2* genų raišką, o po pre-BCR kontrolinio taško patikros sumažina pre-BCR komponento lambda 5 raišką. Vykstant lengvosios grandinės L persitvarkymams, manoma, kad būtent Ikaros yra atsakingas už alelių ekskluziją (Sellars et al., 2011; Schwickert et al., 2014). Ne viena studija įrodė, kad Ikaros^{-/-} pelėse stipriai sumažėja Flt3 ir IL-7R RNR raiška, pre-pro-B ląstelių skaičius ir galutinai blokuojams B ląstelių vystymasis (Yoshida et al., 2006; Sellars et al., 2011).

E2A geno lokusas koduoja du transkripcijos veiksnius (spiralė-kilpa-spiralė tipas: E12 ir E47). Pagrindiniai *E2A* taikiniai yra RAG1 (jungiasi E47), TDT (jungiasi E47), EBF1 (jungiasi E12) ir PAX5 (jungiasi E12). Manoma, kad, sutrikus *E2A* raiškai, BLP stadijoje ir pre-pro-B ląstelėse sutrinka RAG1 rekombinazės veikla ir nebevyksta Ig sunkiosios H grandinės D-J segmentų persitvarkymas (Kwon et al., 2008; Perez-Vera et al., 2011).

ID-1 transkripcijos veiksnys, kaip ir *E2A*, yra spiralė-kilpa-spiralė tipo, tačiau neturi DNR prisijungimo domeno, tad veikia kaip inhibuojantis veiksnys, o konkrečiai – inhibuojantis *E2A*. ID-1 raiška stebima tik pro-B ląstelėse. Pelių modelyje išveiklinus ID-1 geną, fenotipiškai pelės atrodė kaip ir su išveiklintu *E2A* genu – buvo sutrikusios ankstyvos B ląstelių vystymosi stadijos (Somasundaram et al., 2015; Roschger et al., 2017).

EBF1 transkripcijos veiksnio (angl. *early B-cell factor 1, EBF1*) (spiralė-kilpa-spiralė tipo) koduojamo geno raiška prasideda BLP stadijoje ir trunka visu B ląstelių vystymosi periodu, išskyrus brendimo pabaigoje visiškai diferencijuotose plazminėse ląstelėse. Pelių modelyje išjungus *EBF1* geną, B ląstelių vystymasis sustodavo ties pro-B ląstelių stadija. Taip pat pastebėta, kad B ląstelių brendimo sutrikdymas buvo labai panašaus pobūdžio kaip ir E2A mutantinių pelių, todėl iškelta hipotezė apie E2A ir EBF1 transkripcijos veiksnių bendrą veikimą (Ramirez-Komo et al., 2017). Manoma, kad EBF1 aktyvina SWI/SNF chromatino remodeliavimo kompleksą slopindamas B ląstelių specifinius genų stipriklus (angl. *enhancers*), tai skatina histonų modifikaciją, kuri reikalinga pereiti į kitus B ląstelių vystymosi etapus. Ši teorija parodo, kad EBF1 funkcija yra ne tik aktyvinti tiesiogiai PAX5, POU2AF1, FOXO1 genus, bet ir slopinti specifinių genų, kurie neleidžia toliau bręsti B ląstelėms, raišką. Taip pat nustatyta, kad patį *EBF1* geną pro-B ląstelių stadijoje aktyvina IL-7 signalinis kelias (Murre et al., 2018; Giampaolo et al., 2019).

PAX5 transkripcijos veiksnys („suporuotos dėžutės“ tipo) yra vienas iš svarbiausių ir plačiausiai veikiančių B ląstelei bręstant, o jo kritinė reikšmė pasireiškia pro-B ląstelės stadijoje. Manoma, kad PAX5 turi dvejopą, neigiamą ir teigiamą, reguliacinį mechanimą B ląstelių diferenciacijoje. Neigiamos reguliacijos metu šis transkripcijos veiksnys inhibuoja daugiau kaip 100 genų, susijusių su ląstelių adhezija, migracija, transkripcijos kontrole, receptorių signalinimu. Visi šie genai gali pakeisti B ląstelių vystymąsi, tad PAX5 inhibuodamas juos apsaugo ir išlaiko B ląstelių linijos kryptį (Delogu et al., 2006). Šioje reguliacijoje PAX5 laikinai inhibuoja *FLT3, CSF1R, CCL3, NOTCH1* genus, kas yra geras pavyzdys, kad sustabdomos galimybės B ląstelių linijai keisti kryptį. Mutantinių PAX5 modelyje *CSF1R* geno raiška paskatina greitą diferenciaciją į makrofagus, o B-ląstelių vystymosi linijoje procesas sustoja pro-B ląstelių stadijoje. Panaši sutrikusi diferenciacija išsivysto ir išveiklinus *PAX5* geną bei padidinus *CCL3* geno raišką – nebevyksta B ląstelių brendimas, tačiau padidėja osteoklastų formavimasis (Delogu et al., 2006). Galiausiai PAX5 inhibuoja Tląstelių pagrindinį transkripcijos veiksnį NOTCH1, tai išlaikydamas Bląstelių liniją (Shouabni et al., 2002). Teigiamoje reguliacijoje PAX5 aktyvina apie 170 genų, atsakingų už ląstelių migraciją, transkripcijos reguliaciją, B-ląstelių signalinimą, antigenų pristatymą bei B ląstelių brendimą. Iš šių genų B ląstelei bręstant yra svarbiausi šie: *EBF1, LEF1, TCF4, Aiolos, Id3, Bach2, IRF4* ir *IRF8*. PAX5 dalyvauja signalo pernašoje pre-BCR aktyvindamas genus, reikalingus signalo pernašos komponentui I α (Schebesta et al., 2007). Nors PAX5 reikšmingiausia funkcija pasireiškia pro-B ląstelių stadijoje, tačiau jis dalyvauja ir vėlesnėse B ląstelių brendimo stadijose. Nuo šio transkripcijos veiksnio priklauso marginalinės zonos, germinacinio centro ir

atminties B ląstelių generacija blužnyje, o folikulinės B ląstelės kuri laiką gali funkcionuoti be PAX5. Vėlgi, manoma, kad būtent PAX5 aktyvina genus ilgaamžėse plazminėse ląstelėse, kurie yra atsakingi už imunoglobulinų sekreciją ir pačių plazminių ląstelių išgyvenamumą (Rozanski et al., 2011).

1.2.3. T ląstelių vystymasis

T ląstelių pirmtakai formuojasi iš KL ir migruoja į užkrūčio liauką toliau vystytis. Kita teorija teigia, kad dalis ALP migruoja į užkrūčio liauką, kur virsta T ląstelių pirmtakais (Koch et al., 2011). T ląstelių pirmtakai, patekę į užkrūčio liauką, vadinami timocitais. Užkrūčio liaukoje ankstyvoje vystymosi stadijoje timocitai neturi paviršinių žymenų CD4 ir CD8 ir yra vadinami dvigubai neigiamais (DN) (CD4-CD8). Didžioji dalis DN ląstelių turi $\alpha\beta$ T-ląstelių receptorių (angl., *T-cell receptor, TCR*), o kita dalis – $\gamma\delta$ TCR. Kitame vystymosi etape DN ląstelių paviršiuje vyksta pakaitinė adhezijos molekulių CD44 ir interliaukino 2 receptoriaus α grandinės CD25 raiška (Koch et al., 2011; Kumar et al., 2018). Pagal CD44 ir CD25 raišką, susiformuoja keturios DN ląstelių subpopuliacijos: CD44+CD25- (DN1), CD44+CD25+ (DN2), CD44-CD25+ (DN3) ir DN4 (CD44-CD25-).

DN1 subpopuliacija linkusi duoti vystymosi pradžią makrofagams, NK ir dendritinėms ląstelėms. Šiuo atveju DN1 stadijoje yra pirmas kontrolės taškas, kur *NOTCH1* geno signaliniai keliai inhibuoja T ląstelių potencialą virsti kitų linijų ląstelėmis (Vargas et al., 2011). Vėliau einančios DN2 ir DN3 stadijos skiriasi paviršiniais žymenimis, atitinkamai CD117 ir CD27. DN3 (CD44-CD25+) ląstelės pereina kitą kritinį kontrolės tašką, kuris vadinasi beta selekcija. Šios selekcijos metu vyksta TCR β grandinės persitvarkymas, kuris prasideda D-J segmentų susijungimu ir po to V segmento prisijungimu prie DJ. Sėkmingai persitvarkiusi TCR β grandinė susijungia su surogatine pre-T α ir produkuoja pre-TCR, kuris būna komplekse su CD3. Tada per pre-TRC signalinius kelius inicijuojama β grandinės persitvarkymo pabaiga ir stebima CD4 ir CD8 žymenų raiška – tokios ląstelės vadinamos dvigubai teigiamomis (DT).

Ląstelės, neperėjusios beta selekcijos, yra pašalinamos apoptozės būdu (Montel-Hagen et al., 2018). DT ląstelėse vyksta RAG1/2 rekombinazių pakartotinė raiška ir pertvarkoma α grandinė. Ši α grandinės pertvarka vyksta abiejose chromosomose, todėl T ląstelėms nėra būdinga alelinė ekskliuzija. Po pertvarkos DT ląstelės produkuoja $\alpha\beta$ -TCR ir pereina į užkrūčio liaukos žievės-šerdis jungtį teigiamai selekcijai (Koch et al., 2011). Teigiamos selekcijos metu DT ląstelės su $\alpha\beta$ -TCR reaguoja su antigeno ir audinių suderinamumo kompleksu I ir II (angl. *major histocompatibility complex I/II, MHC I/II*), kuri pristato antigeną

pateikiančios ląstelės (APL). Tos DT ląstelės, kurios dideliu afiniškumu reaguoja su antigeno/MHC I/II kompleksu, pereina teigiamą selekciją, o tos, kurių afiniškumas yra silpnas – apoptozės būdu yra pašalinamos (pašalinamos ir tos DT ląstelės, kurios nesureaguoja su antigeno/MHC I/II kompleksu per 3–4 dienas) (Klein et al., 2014).

Teigiamos selekcijos metu taip pat diferencijuojama, ar ląstelė taps T CD4+ ar T CD8+. Jeigu DT ląstelė reaguoja su MHC II kompleksu, šis viduląstelinis būdu perduos signalą baltymui ThPOK ir padidins jo raišką, tada šis baltymas sumažins kito baltymo RUNX3 raišką. RUNX3 yra pagrindinis CD8+ padidėjusios raiškos reguliatorius, tad šiame signaliniame kelyje po DT sąveikos su MHC II susidarys CD4+ T ląstelės, o priešingo proceso metu, sąveikoje su MHC I susidarys CD8+ T ląstelės (Shah et al. 2014). Nors tiksliai nėra žinoma kaip, bet vėliau CD8+ T ląstelės vystosi į T citotoksines ląsteles (angl. *T cytotoxic cells, Tc*), o CD4+ T ląstelės vystosi į T helperius (angl. *T helper, Th*). Po teigiamos selekcijos yra vykdoma neigiama selekcija, kuri vyksta ląstelėms migruojant į užkrūčio liaukos šerdį. Neigiamos selekcijos metu APL pateikia timocitams savus antigenus. Jeigu timocitai labai stipriai reaguoja į savus antigenus, tada aktyvinami viduląsteliniai signalai ir tokie timocitai apoptozės būdu yra pašalinami. Ląstelės, sėkmingai perėjusios teigiamą ir neigiamą selekcijas, iš užkrūčio liaukos patenka į periferinę kraujotaką (Starr et al., 2003; Dzhagalov et al., 2013).

1.2.4. T ląstelių vystymosi transkripcinis reguliavimas

Vienas iš pirmųjų ir svarbiausių transkripcijos veiksnių T ląstelėms vystantis yra *NOTCH1* geno koduojamas baltymas, kurio raiška būna nuo PDLP stadijos kaulų čiulpuose iki DN3 ląstelių stadijos užkrūčio liaukoje. NOTCH1 signalinio kelio pagrindinis veiksnys yra Dll4 ligandas, kurį produkuoja užkrūčio liaukos epitelinės ląstelės (Yuan et al., 2010). NOTCH1-Dll4 signalinis kelias leidžia DN1 ląstelėms virsti DN2, o šioms vėliau į DN3. Ties DN3 stadija NOTCH1 raiška staigiai sumažėja, o tai rodo, kad NOTCH1 yra reikalingas transkripcijos veiksnys ankstyvose stadijose, bet ne vėlyvose (Wolfer et al., 2001). Yra nustatyti keli pagrindiniai ir tiesioginiai NOTCH1 taikiniai: TCF-1, IL2RA, HES1, pTα, tačiau aiškesnės informacijos apie NOTCH1 tiesioginę veiklą trūksta (Seo et al., 2016).

TCF-1 baltymas, koduojamas *TCF7* geno, manoma, yra svarbus veiksnys pereinant iš DN1 stadijos į DN2. Mutantinių pelių modelyje, kuriame nebuvo TCF-1 baltymo, buvo pastebėta gerokai padidėjusi DN1 stadijos ląstelių koncentracija, tai įrodo TCF-1 transkripcijos veiksnio reikšmę ankstyvose T ląstelės vystymosi stadijose (Weber et al., 2011). Manoma, kad NOTCH1 jungiasi prie *TCF7* geno stipriklio, kuris yra apie 32 kilobazių nuo transkripcijos vietos pradžios ir taip jį

aktyvina. Po TCF-1 aktyvinimo vyksta jo sąveika bei slopinimo / aktyvinimo veiksmai reakcijoje su *GATA3* ir *RUNX1* (DN stadijų reguliatoriais) (Willert et al., 2006; Johnson et al., 2018).

HES1 yra transkripcijos slopiklis, kurio raiška vyksta įvairiose ląstelėse, įskaitant dendritines, T ir B ląsteles. Manoma, kad HES1 yra tiesioginis NOTCH1 signalinio kelio taikynys ir, sutrikus HES1 raiškai, T ląstelių vystymasis sutrinka tiek ankstyvose, tiek DN stadijose (Seo et al., 2016).

Nors *RUNX1* raiška vyksta nuo kamieninių ląstelių iki subrendusių T ląstelių, tačiau išskiriama, jog šis transkripcijos veiksnys ypač svarbus DN3 stadijoje, CD4+ slopinant DN ląstelėse, teigiamoje selekcijoje ir CD8+ raiškai DT ląstelėse (Egawa et al., 2007). *RUNX1* kaip transkripcijos aktyvatorius pasitelkia papildomus aktyvatorius, pvz., p300/CBF, ar kitus prie DNR besijungiančius baltymus, pvz., ETS-1. Kaip transkripcijos slopiklis, *RUNX1* taip pat aktyvina kitus transkripcijos slopiklius – HDAC, mSin3a, TLE1/Groucho (Seo et al., 2012). Transkripciją valdant *RUNX1* kooperuojasi su *RUNX3*. Šiuo atveju *RUNX1* yra svarbesnis ankstyvose vystymosi stadijose, DN ir DT ląstelėse, o *RUNX3* svarbesnis – subrendusiose CD8+ ląstelėse (Taniuchi et al., 2011).

BCL11B transkripcijos veiksnys T ląstelių brandai yra svarbus DN2 stadijoje, kur reguliuoja pre-TCR komponentus, DN3 stadijoje, kai padeda rekombinacijai ir TCR-β raiškai, DT ląstelių išgyvenamumui bei teigiamoje timocitų selekcijoje. Nėra aiškus mechanizmas, kaip *BCL11B* reguliuoja transkripciją, tačiau galimai per sąveiką su NOTCH1, nes *BCL11B* geno promotoriuje aptikta NOTCH1 prisijungimo DNR sekų (Li et al., 2010; Li et al., 2013).

GATA3 transkripcijos veiksnio (cinko pirštelių tipo) raiška matoma skirtingose stadijose ir, manoma, atlieka įvairias funkcijas T-ląstelėms bręstant. Eksperimentiškai pelių modelyje pašalinus *GATA3* DN2 stadijoje, buvo nustatyta β-selekcija, taip pat buvo generuojamos nenormalios B ląstelės vietoj T ląstelių, tai rodo *GATA3* reikšmę parenkant B ar T liniją ALP ląstelėse (Garcia-Ojeda et al., 2013). Vis dėlto, padidinus *GATA3* raišką, net ir nedideliu lygiu, buvo slopinami genai, atsakingi už T ląstelių vystymąsi, taip įrodyta, kad *GATA3* raiška yra griežtai kontroliuojama ir turi svarbią transkripcijos valdymo reikšmę (Gimferrer et al., 2011).

E2A (E12 ir E47 izoformos) ir HEB transkripcijos veiksniai buvo intensyviai tirti B-ląstelėms vystantis, tačiau nustatyta, kad jie dalyvauja ir T ląstelių brandoje pereinant iš DN į DT stadijas (*in vitro* pašalinus vieną ar abu transkripcijos veiksnius, buvo blokuojama ne viena T ląstelėse vystymosi stadija) (Takeuchi et al., 2001). E2A ir HEB homodimerai arba E2A-HEB heterodimeras reguliuoja svarbius T ląstelėms genus, pvz., *pre-Ta*, *TCR-α*, *TCR-β* ir *CD4*. Taip pat nustatyta,

kad E2A-HEB slopina ir GATA3 raišką DN2 stadijoje ir galimai atlieka GATA2 neigiamą reguliaciją (Xu et al., 2013).

1.2.5. B ląstelių vystymosi sutrikimas: B ūminė limfoleukemija

B ląstelių ūminė limfoleukemija (B-ŪLL) – kloninė piktybinė liga, kuri pasireiškia normalios hematopoezės sutrikimu ir nesubrendusių B ląstelių pirmtakų kaupimusi kaulų čiulpuose, periferiniame kraujyje, o dažnai ir centrinėje nervų sistemoje. ŪLL yra viena iš keturių pagrindinių leukemijų, o B-ŪLL dažniausiai pasitaikanti forma (Pui et al., 2004; Steeghs et al., 2019). Dėl B ląstelių skirtingų vystymosi stadijų plastiškumo praktiškai neįmanoma identifikuoti ląstelės pirmtakės, kurioje įvyko pirminis genetinis pokytis, lėmęs B-ŪLL atsiradimą, sudėtinga stebėti ir ligos evoliucijos etapus, pradedant nuo KL. Onkogenetinis įvykis (pvz.: mutacija, translokacija) gali įvykti kiekvienoje B ląstelės vystymosi stadijoje, taip sutrikdyti ir užblokuoti tolesnę ląstelių brendimą. Vis dėlto yra nustatyta, kad kai kurios specifinės translokacijos, kurios nustatomos vaikų B-ŪLL, įvyksta dar vaisiaus hematopoezėje. Tipinė *MLL* sulieto geno translokacija yra dažniausia naujagimių B-ŪLL aberacija, o *ETV6-RUNX1* translokacija – vaikų dažniausias genetinis pokytis. Šie du pokyčiai, manoma, įvyksta dar KL ar ankstyvose B ląstelių vystymosi stadijose vaisiaus kepenyse arba kaulų čiulpuose. Tačiau šios išvados dar neleidžia atmesti fakto, jog genetiniai pokyčiai gali įvykti ir vėlesnėse B ląstelių vystymosi stadijose (Greaves et al., 2003; Malouf et al., 2018).

Daugiausia diskusijų būtent ir kelia klausimas, kas yra vadinamoji pradinė leukeminė ląstelė (PLL), kurioje įvyko pirmas genetinis pokytis, ir kas lėmė B-ŪLL atsiradimą. Nustatyti PLL kilmę yra sunku, nes KL nėra būdinga statiškumas ar homogeninė populiacija, o būdingiau didelė proliferacija, variabilumas, galimybė atsinaujinti. Ne vienoje studijoje, nagrinėjusioje B-ŪLL kloninę evoliuciją, lyginant ligos atkryčio ir diagnostinius mėginius, nustatyta, kad dalis klonų su tam tikrais genetiniais pokyčiais buvo nustatyti abiejuose mėginiuose, tačiau buvo matomi dalies klonų subpopuliacijų skirtumai. Šie rezultatai rodo, kad leukemogenezė vyksta šakojimosi principu su daugybės klonų evoliucija, o ne linijiniu principu (Anderson et al., 2011).

B-ŪLL diagnostika yra neatsiejama nuo specifškai šiai ligai nustatomų genetinių pokyčių, kurie, manoma, sutrikdo B ląstelių vystymąsi ir turi įtakos kloninei ligos eigai. Dažniausi genetiniai pokyčiai B-ŪLL yra sulieto geno tipo chromosominės translokacijos: *ETV6-RUNX1*, *E2A-PBX1*, *BCR-ABL1* ir *MLL* tipo. Šios su leukemija susijusios translokacijos skirtingu dažniu nustatomos tiek vaikų, tiek suaugusiųjų B-ŪLL, tad galima kelti hipotezę, jog kiekviena specifinė

translokacija gali sutrikdyti skirtingą B ląstelių vystymosi stadiją. Dviejų sulietų genų translokacija ETV6-RUNX1 dažniausiai nustatoma vaikų B-ŪLL (22 % vaikų ir 2 % suaugusiųjų leukemijose), kai BCR-ABL1 translokacija išskirtinai dažna suaugusiųjų šio tipo leukemijoje (atitinkamai 25 % prieš 3 %) (Campos-Sanchez et al., 2011). Pastarąjį dešimtmetį šios sulietų genų translokacijos buvo ypač gerai ištirtos molekulinio lygmeniu, tačiau tikslus biologinis mechanizmas, dėl kurio sutrinka B ląstelių vystymasis ir atsiranda B-ŪLL, nėra aiškus.

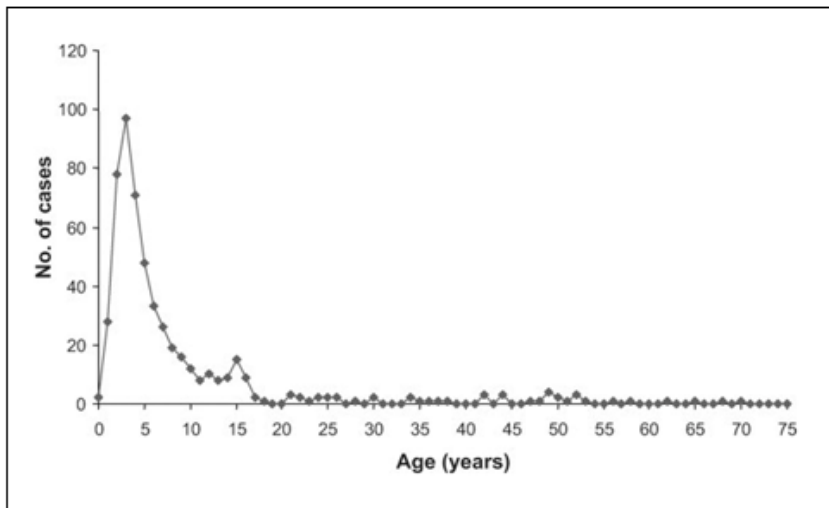
Šiuo metu yra kelios teorijos, kurios galėtų paaiškinti genetinių pokyčių įtaką B-ŪLL atsirasti: pirma teorija teigia, kad dėl translokacijų susidarę chimeriniai baltymai tiesiogiai veikia ir sutrikdo B ląstelių diferencijavimo signalinius kelius. Antra teorija, palaikydama pirmąją, iškelia hipotezę, jog chimeriniai baltymai „neleidžia“ besivystančiai B ląstelei priimti išorinius išorės signalus, kurie atlieka diferenciacijos ir vystymosi reguliatorių funkcijas. Galiausiai, manoma, kad B-ŪLL sukeltas genetiniai įvykiai perprogramuoja ląsteles, kad šios fenotipiškai „kopijuotų“ tik atskiras normalių B ląstelių vystymosi stadijas (Campos-Sanchez et al., 2011; Gole et al., 2015).

1.2.6. B-ŪLL inicijuojantys chromosominiai pokyčiai

B-ŪLL genetinės aberacijos skirstomos į mutacijas ir chromosominės aberacijas. Chromosominės aberacijos skirstomos į chromosomų skaičiaus ir struktūros pokyčius. Pagrindiniai B-ŪLL chromosomų skaičiaus pokyčių tipai yra hiperdiploidija ir hipodiploidija.

Hiperdiploidija – chromosomų skaičiaus pokytis, kai yra padidėjęs chromosomų skaičius kariotipe. Skiriamos šios hiperdiploidijos grupės: maža hiperdiploidija, kai nustatomas 47–50 chromosomų rinkinys kariotipe, didelė hiperdiploidija – 51–65 chromosomos kariotipe (Hakeem et al., 2014). Papildomai yra skiriamos dvi atskiros grupės, kai kariotipe nustatomos 68–80 chromosomos (beveik triploidija) ar >80 chromosomų (beveik tetraploidija) (Raimondi et al., 2006). Šiuo metu labiausiai yra ištirta didelė hiperdiploidija (DH), nors ilgą laiką vyko diskusija, norint nusibrėžti chromosomų skaičių, kuris tiksliai nusakytų DH ribas. Mažiausiai diskusijų kilo dėl „apatinio“ DH chromosomų skaičiaus, kuris daugelyje studijų buvo išlaikytas 50. Daugiau svarstymų buvo dėl „viršutinio“ DH chromosomų skaičiaus, buvo siūlomi 61, 65 ir 67 chromosomų rinkinių variantai. Vis dėlto šiomis dienomis remiamasi 51–67 chromosomų skaičiumi kaip DH ribomis (Heerema et al., 2007). DH yra dažniausia citogenetinė aberacija vaikų B-ŪLL (25–30 % atvejų), gerokai rečiau pasitaiko suaugusiųjų B-ŪLL ir beveik neaptinkama prie T-ŪLL. Vaikų B-ŪLL DH dažniausiai nustatoma 2–4 metų vaikams (mediana 3,6–3,9 metai), retai vyresniems nei 7 metų amžiaus ir labai

retai jaunesniems negu vienu metų amžiaus kūdikiams (Paulsson et al., 2009) (2 pav.). Nedideliu skirtumu, bet daugiau DH atvejų nustatoma berniukų negu mergaičių (santykis 1,3) (Paulsson et al., 2009). Suaugusiųjų B-ŪLL DH yra nustatoma apie 10 % pacientų (25–59 metų amžiaus (Moorman et al., 2012)). Viena studija ištyrė 1232 suaugusiųjų B-ŪLL (15–65 metų amžiaus) kariotipus ir nustatė DH 13 % pacientų (Chilton et al., 2014).



2 pav. DH pasiskirstymas pagal amžių (Paulsson et al., 2009)

Žiūrint iš citogenetinės pusės, daugiau nei pusei DH atvejų būna nustatomos papildomos 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 ir X chromosomų kopijos, 5 ir 8 chromosomų kopijos – 30–40 % atvejų, o likusių chromosomų kopijos – 10–20 % atvejų. Išskirtinai tik 21-os chromosomos papildomos kopijos yra 100 % DH atvejų (Paulsson et al., 2005). DH dažnai būdinga ne tik 21-os chromosomos trisomija, bet ir tetrasomija ar net pentasomija. Tetrasomijos DH taip pat yra būdingos X, 14 ir 18 chromosomoms (Paulsson et al., 2005; Mitelman et al., 2009). Kai yra DH, lygiagrečiai kariotipe nustatomos ir papildomos chromosominės aberacijos. Apie 5 % DH atvejų turi subalansuotus chromosominius pokyčius, dažniausiai translokacijas. Iš jų dažniausios yra t(1;19)(E2A/PBX1), t(9;22)(BCR/ABL1) ir t(12;21)(ETV6/RUNX1) translokacijos. Iš nesubalansuotų chromosominių pokyčių, kurie sudaro didžiąją dalį papildomų chromosominių aberacijų DH grupėje, dažniausi yra 1q chromosomos srities duplikacija (10–15 % DH atvejų), 6q srities delecija (5 % DH atvejų) bei 7q ir 17q sričių izochromosomos (atitinkamai 1–2 % ir 2–5 % DH atvejų) (Moorman et al., 2003; Paulsson et al., 2007; Paulsson et al., 2015).

Beveik triploidijos ir beveik tetraploidijos grupės yra nustatomos rečiau, ypač vaikams, sergantiems ŪLL. Atlikus studija su 620 vaikų, sergančių ŪLL, beveik triploidija nustatyta 4 (0,6 %) pacientams (chromosomų skaičius nuo 66 iki 80). Visi jie buvo B-ŪLL. Įdomus faktas, kad iš jų 3 pacientai papildomai turėjo ETV6-RUNX1 translokacijas. Beveik tetraploidija buvo nustatyta 14 (2,2 %) pacientų (chromosomų skaičius nuo 85 iki 94), iš kurių 11 buvo B-ŪLL, o 3 T-ŪLL. Iš 14 tetraploidijų 11 turėjo papildomas chromosomų skaičiaus ar struktūros aberacijas (Raimondi et al., 2006). Suaugusiųjų ŪLL grupėje beveik triploidija ir beveik tetraploidija yra mažai tirtos. Viena studija tyrė 1366 suaugusiųjų ŪLL kariotipus, iš kurių 19 (1,3 %) turėjo beveik triploidiją, o 17 (1,2 %) – beveik tetraploidiją (Moorman et al., 2007).

Hipodiploidija – chromosomų skaičiaus pokytis, kai yra sumažėjęs chromosomų skaičius kariotipe, jis nėra didesnis negu 44. Hipodiploidija skirstoma į grupes pagal chromosomų skaičių: beveik haploidija (25–29 chromosomos), maža hipodiploidija (33–39 chromosomos), didelė hipodiploidija (42–43 chromosomos, dažniausiai būna su kompleksiniu kariotipu), didelė hipodiploidija su 44 chromosomomis (Pui et al., 2019). Iš šių grupių didžiausią klinikinę reikšmę turi beveik haploidijos ir mažos hipodiploidijos grupės, o didelė hipodiploidija šiomis dienomis kelia vis daugiau diskusijų dėl klinikinės reikšmės ŪLL ir savo citogenetinio apibrėžtumo. Beveik haploidijoje chromosomų poras išlaiko 8, 10, 14, 18, 21, X/Y chromosomos, o likusios teturi po vieną chromosomą. Kai yra maža hipodiploidija, chromosomų poras išlaiko 1, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 18, 19, 21, 22 ir X/Y chromosomos. Šioms abiem grupėms nėra būdinga nustatyti papildomas chromosomines aberacijas, nors jų pasitaiko. Dažniau papildomos struktūrinės aberacijos būna mažos hipodiploidijos grupėje negu beveik haploidijos. Mažas papildomų aberacijų skaičius šiose grupėse aiškinamas tuo, kad ir taip yra prarasta daug genetinės medžiagos (Safavi et al., 2017). Abi grupės yra nustatomos apie 0,5 % vaikų ŪLL ir 3–4 % suaugusiųjų ŪLL. Beveik haploidijos amžiaus mediana vaikų ŪLL yra 5 metai, o mažos hipodiploidijos – 11,5. Suaugusiųjų ŪLL šių dviejų grupių dažnis didėja su amžiumi (Safavi et al., 2017). Atliktas mutacijų profilio tyrimas beveik haploidijos ir mažos hipodiploidijos grupėms atskleidė jų skirtumus. Beveik haploidijos ŪLL pacientams buvo būdingos RAS signalinimo kelio, *NF1*, *CREBBP*, *CDKN2A/B*, *IKZF3* ir *PAG1* genų mutacijos. Beveik visi mažos hipodiploidijos ŪLL pacientai (suaugusieji ir vaikai) (90 %) turėjo *TP53* geno mutacijas (Holmfeldt et al., 2014).

Kai yra beveik haploidija ir maža hipodiploidija, yra išskiriamas atskiras citogenetinis subtipas – „užsimaskavusi hipodiploidija“ (UH). UH esant beveik haploidijai sudaro 64 % atvejų, o mažai hipodiploidijai – 44 % (Mitelman et al., 2016). UH yra būdingas chromosomų klonų padvigubėjimas, kai hipodiploidijoje

poras išlaikiusios chromosomos padvigubėja ir tampa tetrasominėmis, o monosominės chromosomos padvigubėjusios tampa disominėmis (turinčiomis savo porą), bet praradusiomis savo heterozigotiškumo statusą. Manoma, kad esant UH chromosomų padvigubėjimas atsiranda dėl endoreduplikacijos (viso genomo replikacijos be vėliau vykstančios citokinezės) (Ma et al., 1998; Safavi et al., 2017).

ETV6-RUNX1(TEL-AML1) sulietas genas/t(12;21)(p13;q22) translokacija – yra dažniausia genetinė aberacija B-ŪLL. Ši translokacija susideda iš *ETV6* geno 5' galo 12-toje chromosomoje ir beveik visos koduojančios *RUNX1* geno srities 21-oje chromosomoje. *ETV6* geno koduojamas baltymas priklauso ETS transkripcijos veiksniams, kurie būna labai dažni chromosominių aberacijų ar mutacijų taikiniai esant leukemijai. *RUNX1* geno koduojamas baltymas taip pat yra transkripcijos veiksnių komplekso sudedamoji dalis ir dažnai būna mutuoatas tiek esant ūminėms mieloleukemijoms, tiek ir ŪLL (Mullighan et al., 2012). *ETV6* ir *RUNX1* yra būtini normaliai hematopoezei, o susidaręs *ETV6-RUNX1* sulietas genas veikia kaip *RUNX1* reguliuojamų genų slopiklis. Nustatyta, kad *ETV6-RUNX1* padidina eritropoetino receptoriaus (angl. *erythropoietin receptor*, *EPOR*) raišką ir aktyvina JAK-STAT signalinimo kelią, tačiau tiesiogiai leukemijos nesukelia (Morrow et al., 2004). Taip pat reikia pažymėti, kad *ETV6-RUNX1* nustatomas naujagimiams, apytiksliai vieneri metai iki diagnozuojant leukemiją, taip pasiūlant modelį, kad šis sulietas genas yra priešleukeminis genetinis įvykis. Tiriant pacientus, turinčius *ETV6-RUNX1* sulietą geną, buvo nustatyti papildomi pasikartojantys submikroskopiniai genominiai pokyčiai, dažniausiai delecijos, į kurias pateko B ląstelių transkripcijos veiksnių genai *PAX5*, *EBF1*, B ląstelių vystymosi signalinių molekulių genai *BTLA*, *TOX*, gliukokortikoidų receptoriaus genas *NR3C1*, transkripcijos koaktyvatoriaus genas *TBLIXR1*, apoptozės reguliavimo genas *BTG1* ir antra kopija *ETV6* geno (Mullighan et al., 2007; Mullighan et al., 2012; Bokemeyer et al., 2014). Šis sulietas genas yra nustatomas beveik 25 % vaikų B-ŪLL, dažniausiai 2–10 metų amžiaus (mediana 4 metai) (Sun et al., 2017), o suaugusiųjų B-ŪLL grupėje pasitaiko labai retai – 1–3 % dažniu (Burmeister et al., 2010).

MLL geno translokacija/t(v;11) – dažniausia naujagimių, sergančių leukemija, translokacija, kurią sudaro *MLL* (angl. *mixed lineage leukemia*) geno N-terminalinė sritis 11-toje chromosomoje ir kito partnerio geno C terminalinė sritis. *MLL* genas koduoja metiltransferazę, kurios pagrindinė funkcija yra metilinti H3K4 histoną ir reguliuoti *HOX* genų šeimos raišką (Campos-Sanchez et al., 2011). Iš viso yra nustatyta daugiau nei 40 skirtingų *MLL* geno translokacijos partnerių, tačiau dažniausi yra *AF4*, *AF9*, *ENL*, *AF6* ir *AF10* genai (Meyer et al., 2018). Dažniausia *MLL* translokacija yra t(4;11), kuri sudaryta iš *MLL* geno

11-toje chromosomoje ir *AF4* (angl. *ALL1 fused gene from chromosome 4*) geno 4-toje chromosomoje. MLL-*AF4* translokacija sudaro 50 % visų nustatomų MLL translokacijų kūdikių ŪLL grupėje bei 75 % suaugusiųjų ŪLL grupėje (Meyer et al., 2013). Kol kas nėra visiškai aiškus šios translokacijos biologinis kelias ir reikšmė ŪLL, tačiau, sutrikdžius *AF4* geno veiklą pelėse, jų labai sulėtėjo limfopoezė (B ir T ląstelių). *AF9* (angl. *ALL1 fused gene from chromosome 9*) ir *ELN* (angl. *eleven-nineteen leukemia*) yra antras ir trečias pagal dažnumą genai partneriai su MLL ŪLL ir sudaro t(9;11)(p22;q23) ir t(11;19)(q23;p13.3) translokacijas. *AF9* ir *ELN* genai turi labai panašias struktūras ir dalyvauja epigenetiniuose transkripcijos reguliavimo mechanizmuose. *AF9* atlieka svarbų ir specifinį reguliavimą megakariocitų / eritrocitų ląstelių linijose (Collins et al., 2002).

E2A-PBX1 sulietas genas/t(1;19)(q23;p13.3) translokacija yra nustatoma 5–6 % vaikų ir 3 % suaugusiųjų ŪLL. Labai retai (0,5–1 % vaikų ir suaugusiųjų ŪLL) nustatoma kito tipo E2A translokacija – E2A-HLF sulieto geno/t(17;19)(q22; p13.3) (Foa et al., 2003; Campos-Sabchez et al. 2011). *PBX1* geno koduojamas baltymas nėra specifinis tik limfoidinėms ląstelėms ir turi platesnes funkcijas. Tai įrodyta eksperimento metu, kai pelių embrionai be *PBX1* geno žūdavo 15–16 dieną, neišsivysčius daliai organų ir skeleto dalims (Campos-Sanchez et al., 2011). Chimerinis E2A-PBX1 transkriptas sudarytas iš N terminalinėje dalyje esančio transaktyvuojančio *E2A* geno dalies ir DNR prisijungimo domeną turinčio *PBX1* geno dalies. E2A-PBX1 turi dvejetainę leukemogeninį poveikį. Pirma, dėl chimerinio geno susidarymo sutrikdoma po vieną *E2A* ir *PBX1* alelį, kas automatiškai turi leukemogeninį poveikį, nes *E2A* yra svarbus B-ląstelių vystymuisi. Antra, susidaręs sulietas E2A-PBX1 genas neleidžia prisijungti svarbiems *PBX1* kontroliuojamiems genams, pvz., *HOX* (*PBX1* turi DNR prisijungimo domeną), taip pat lygiagrečiai slopina *E2A* „priklausančius“ genus taikinius ir nekontroliuoja ląstelės ciklo (Duque-Afonso et al., 2015).

BCR-ABL1 sulietas genas/t(9;22)(q43;q11) translokacija – kitaip vadinama Filadelfine chromosoma, ji retai nustatoma B-ŪLL vaikų grupėje (3–5 %), tačiau dažniau pasitaiko suaugusiųjų B-ŪLL grupėje (20–40 %) (Campos-Sanchez et al., 2011; Leoni et al., 2015). Priklausomai nuo to, kur yra įvykęs BCR geno trūkis, ši translokacija gali būti kelių tipų: p190, p210 ir p230. B-ŪLL tiek suaugusiųjų, tiek vaikų – dažniausiai pasitaiko p190 translokacijos tipas. *ABL1* genas koduoja tirozino kinazę, kuri yra atsakinga už įvairius signalo perdavimo kelius B ląstelių vystymosi, ląstelių dalijimosi, proliferacijos, adhezijos procesuose. Eksperimentiniuose pelių modeliuose, pašalinus *ABL1* geną, pelės mirdavo po 1–2 savaitių nuo gimimo be suformuotų B ir T ląstelių populiacijų. Susidaręs BCR-ABL1 sulietas genas veikia kaip sutrikusios funkcijos, aktyvi, nereceptorinė

tirozino kinazė, kuri tiesiogiai aktyvina signalo perdavimo kelius vykstant ląstelių proliferacijai, svarbi išgyvenamumui ir aktyvacijai (Bernt et al., 2014).

iAMP21 amplifikacija / intrachromosominė 21-os chromosomos amplifikacija yra nustatoma 1–2 % vaikų B-ŪLL (amžiaus mediana 9 metai). Buvo pastebėta, kad šios aberacijos dažnis didėjant amžiui nesiskiria, tad suaugusiųjų B-ŪLL grupėje jis yra apie 2 % (Harrison et al., 2014). iAMP21 yra apibūdinama kaip 5,1 Mb amplifikuotas regionas, einantis nuo 21-os chromosomos 32,8 Mb iki 37,9 Mb ir apimantis *RUNX1* geną. Pacientams su iAMP21 yra būdingas specifinis papildomų aberacijų spektras su X, 10-tos, 14-tos chromosomų trisomijomis, 7-tos chromosomos monosomija ir 7q, 11q regionų ir *RBI*, *ETV6* genų delecijomis (Schwab et al., 2013). Vis dar nėra iki galo aiškus iAMP21 susidarymo mechanizmas, bet manoma, kad ši specifinė amplifikacija susidaro po trūkio-susijungimo-tilto ciklo metu ir po to dėl chromotripsio. Šio ciklo metu įvyksta trūkis ties telomera, vėliau po replikacijos susiformavusios dvi chromatidės jau būna be telomerų. Chromatidžių galai be telomerų susijungia sudarydami tiltą. Anafazės metu chromatidėms judant į priešingus ląstelės galus, susijungęs tiltas trukdo joms atsiskirti ir įvyksta trūkis, tačiau jis nebūtinai būna per tilto susijungimo vietą. Vėliau ląstelių dalijimosi metu šis procesas kartojasi, taip suformuojama amplifikuota 21-os chromosomos sritis (Harrison et al., 2015).

1.2.7. T-ląstelių vystymosi sutrikimas:

T ūminė limfocitų leukemija

Manoma, kad kaip ir B-ŪLL atveju, T-ŪLL inicijuoja PLL. Tačiau kitaip nei ŪML atveju, kurios kilmė yra kaulų čiulpai, T-ŪLL prasideda užkrūčio liaukoje. Reikėtų pasakyti, kad užkrūčio liauka, kitaip nei kaulų čiulpai, nėra HKL produkujanti niša. Daugumoje T-ŪLL atvejų onkogeniniai keliai prasideda įvykus translokacijoms, kurių vienas iš chromosominių partnerių turi *TCR* geno lokusą, susijusį su somatine rekombinacija nesubrendusiuose timocituose. Tai paskatina manyti, kad T-ŪLL kilmės pradžia yra bendrieji T-ląstelių pirmtakai, o ne MPL (Tan et al., 2017).

1.2.8. T-ŪLL inicijuojantys chromosominiai pokyčiai

Chromosominės translokacijos nustatomos beveik 50 % visų T-ŪLL atvejų. Kaip minėta anksčiau, dažniausiai translokacijos apima *TCR* geno lokusą 14q11.2 (*TCR α*), 7q34 (*TCR β*), ir 7p14 (*TCR δ*) chromosomų regionuose. Translokacijų susidarymo metu *TCR* geno lokusai dažniausiai būna sulieti su kitose chromosomose esančiais onkogeniniais transkripcijos veiksniais, reikalingais normaliai hemopoezei ir limfocitų vystymuisi (Belver et al., 2016). Genai, kurie

koduoja šiuos onkogeninius transkripcijos veiksnius, yra: *TAL1*, *TAL2*, *LYL1*, *TLX1*, *TLX3*, *HOXA*, *NKX2-1*, *MYB*, *LMO*, *LMO1*, *LMO2*. Pagal šiuos translokacijų genus partnerius buvo išskirtos kelios T-ŪLL subgrupės: *TAL1/LMO1/2*, *TLX1/3*, *HOXA/MEISI*, *LMO2/LYL1* ir *NKX2-1* teigiami T-ŪLL atvejai. Nustatyta, kad šios genetinės subgrupės turi gana ryškių skirtumų, kurie matomi atskirose T ląstelių vystymosi stadijose. Pavyzdžiui, *LMO2/LYL1* translokacijos sutrikdo ankstyvą DN ląstelių stadiją bręstant timocitams, vėliau einančias T ląstelių vystymosi stadijas blokuoja *TLX1/3* ir *NKX2-1* translokacijos, o vėliausias stadijas – *TAL1* geno translokacijos. Kažkur apie 10–15 % T-ŪLL atvejų būna su *MLL* geno translokacijomis (Tan et al., 2017).

1.2.9. B ir T-ŪLL inicijuojančios submikroskopinės delecijos / duplikacijos

Molekulinėje medicinoje atsiradus lyginamosios genomines hibridizacijos (LGH) arba vieno nukleotido polimorfizmo lyginamosios hibridizacijos metodams (VNP-LGH), jie imti taikyti onkohematologijoje, siekiant nustatyti mažesnes negu 5 megabazių (Mb) delecijas, duplikacijas, amplifikacijas, nesubalansuotas translokacijas. Naudojant šiuos metodus yra analizuojamas visas tiriamojo kariotipas, tačiau molekulinis lygmeniu apibendrintai tai imta vadinti molekulinis kariotipavimu (MK).

Pirmą kartą MK buvo ištirti 242 vaikų ŪLL pacientai. Beveik 40 % pacientų turėjo chromosominių pokyčių (vidutiniškai 6,4 chromosominiai pokyčiai vienam pacientui), o dažniausiai – delecijas. Aberacijų dažnis beveik nesiskyrė tarp T-ŪLL ir B-ŪLL. Į delecijų regionus pateko genai, kurie, manoma, galėtų būti siejami su leukemija. Dažniausiai deletuoti buvo *PAX5*, *E2A*, *EBF1*, *LEF1*, *IKZF1* (*IKAROS*), *IKZF3* (*AIOLOS*) (Mullighan et al., 2007).

Analogiška studija MK kariotipavimu ištyrė 399 vaikų ŪLL pacientus ir identifikavo dažniausias delecijas 9p ir 12p chromosomų pečiuose. Šiuose regionuose dažniausiai buvo deletuoti *CDKN2AB* ir *ETV6* genai. Be šių dviejų genetinių pokyčių, MK taip pat nustatyta duplikacijų 1q (11 % atvejų) bei delecijų 6q (11,5 %) regionuose. Šiame tyrime naujai buvo pažvelgta į VNP-LGH galimybes nustatyti heterozigotiškumo praradimus (HP). Nors iki galo neiški HP reikšmė ŪLL, tačiau tyrimo metu pastebėtos tendencijos, jog heterozigotiškumo praradimai dažnesni 9-toje chromosomoje, o ypač trumpajame šios chromosomos petyje (Kawamata et al., 2008).

Kitose studijose naudojant MK metodą nustatyta ir patvirtinta, kad B-ŪLL dažniausiai delecijų yra paveikti šie genai: *CDKN2A/B*, *PAX5*, *RBI*, *EBF1*, *IKZF1*, *BTG1* (Kuiper et al., 2007; Bungaro et al., 2009).

MK buvo bandyta tirti atskirai T-ŪLL grupę. Atliktos dvi atskiros studijos, MK tiriant 50 ir 47 T-ŪLL pacientus, ir nustatyta, kad dažniausiai deletuoti buvo *TALI*, *PTEN*, *RBI*, *CDKN2A/B*, *TALI*, *LEF1*, *STIL* genai (Mullighan et al., 2008; Karrman et al., 2015). Naudojant MK metodą, buvo bandoma rasti vaikų ir suaugusiųjų ŪLL grupių chromosominių pokyčių skirtumų.

Studijoje, kurioje MK buvo tirti 75 suaugusieji ir 399 vaikai, nepastebėta aberacijų dažnio skirtumo tarp grupų, tačiau identifikuotos tos pačios pasikartojančios aberacijos 3p14.2 (*FHIT* genas), 5q33.3 (*EBF1*), 6q, 9p21.3 (*CDKN2A/B*), 9p13.2 (*PAX5*), 13q14.2 (*RBI*) ir 17q11.2 (*NFI*) srityse (Okamoto et al., 2010).

Iš viso, atlikus 142 vaikų ir 123 suaugusiųjų ŪLL pacientų MK analizę, nustatyta vidutiniškai 8 aberacijos kiekvienam atvejui, tačiau suaugusieji turėjo mažiau aberacijų, palyginti su vaikais (atitinkamai 87,8 % ir 95,1 %). Šioje studijoje dažniausios suaugusiųjų aberacijos buvo 9p srityje, tačiau, kitaip nei kitose suaugusiųjų ŪLL studijose, antros pagal dažnumą aberacijos nustatytos 7p srityje (Forero-Castro et al., 2016).

Atskirai tik suaugusiųjų ŪLL grupes MK tyrė keturios studijos. Pirmoje studijoje iš 45 suaugusiųjų ŪLL pacientų MK nustatytos aberacijos 96 % atvejų. Iš jų 70 % turėjo vieną arba kelias delecijas, kurios apėmė *CDKN2A/B*, *PAX5*, *IKAROS*, *ETV6*, *RBI* ir *EBF1* genus (Paulsson et al., 2008).

Antroje studijoje buvo tirti 66 suaugusieji ŪLL pacientai. Iš jų 82 % turėjo chromosominių pokyčių, nustatytų MK. Didžioji dalis aberacijų buvo hemizigotinės delecijos ir duplikacijos. Daugiausia aberacijų buvo nustatyta 9p (18 % atvejų), 6q (9 %), 13q (6 %) chromosomų srityse ir 17-toje (6 %) chromosomoje. Kaip ir prieš tai minėtose studijose, dažniausiai aberacijų buvo paveikti *CDKN2A/B*, *MLL*, *IKZF1*, *PAX5*, *RBI*, *TP53* ir *ETV6* genai (Dirse et al., 2015).

Kitų tyrėjų atlikta suaugusiųjų ŪLL 126 pacientų grupės analizė MK metodu identifikavo dažniausias aberacijas: 9p aberacijos (delecijos ir HP) (31 %), 1q duplikacija (6,3 % atvejų), 17q delecija (3,2 %), 6q delecija (1,6 %) ir 7q izochromosoma (1,6 %). Detalesnė MK analizė parodė, kad dažniausiai deletuoti genai šios suaugusiųjų ŪLL grupėje buvo *CDKN2A/B* (31 % atvejų), *IKZF1* (*IKAROS*) (25 %), *PAX5* (14 %), *ETV6* (10 %), *BTG1* (9 %), *RBI* (7 %), *EBF1* (6 %), *LEF1* (2 %), *NFI* (2 %) (Safavi et al., 2015).

Vokietijos tyrėjų atlikta analizė buvo didžiausia suaugusiųjų ŪLL grupėje. Iš 174 pacientų 80 % turėjo genomines aberacijas (vidurkis 5,8 aberacijų atvejui). Dažniausios aberantinės sritys buvo 9p ir 6q, o dažniausiai į aberacijas pateko *CDKN2A/B* genas (Mühlbacher et al, 2016).

1.2.10. B ir T-ŪLL mutacijų spektras

Apskritai, sergant ŪLL, dažniausiai mutuoti būna RAS biologinio kelio genai. Tą patvirtino studija, kurioje viso genomo NKS metodu buvo ištirta 240 vaikų, sirgusių ŪLL. Dažniausiai buvo mutuoti *KRAS* ir *NRAS* genai, o tarp jų pasikartoję gerai žinomos ir sergant kitomis onkologinėmis ligomis nustatomos G12, G13, Q61 mutacijos. Trečioje vietoje pagal dažnį buvo identifikuotos *PTPN11* geno mutacijos. Šio geno koduojama fosfatazė reguliuoja signalų perdavimą tarp tirozino kinazių ir RAS biologinio kelio genų. Rečiau, bet buvo nustatyta *FLT3*, *PDGFRA*, *KIT*, *ILR7*, *CSFR3*, *JAK1*, *JAK2*, *JAK3* genų pasikartojančių mutacijų (Ding et al., 2017).

Detaliau buvo nagrinėtos RAS biologinio kelio genų mutacijos studijoje, į kurią buvo įtrauktas 461 B-ŪLL pacientas vaikas. Taikininė NKS analizė 79 % atvejų nustatė pasikartojančias *KRAS* ir *NRAS* genų mutacijas. *FLT3* ir *PTPN11* genų mutacijos buvo nustatytos atitinkamai 10,1 % ir 9,3 % dažniu (Jerchel et al., 2018). Mutacijų spektras atskirai patikrintas suaugusiųjų ŪLL grupėje. Iš 121 ŪLL paciento 110 (90,9 %) pacientų turėjo bent vieną mutaciją. Dažniausios B-ŪLL buvo *FAT1*, *SF1*, *CRLF2*, *TET2*, *PTPN11* genų, o T-ŪLL – *NOTCH1*, *JAK3*, *FBXW7*, *NRAS* ir *FAT1* genų mutacijos (Feng et al., 2017).

Atskirai reikėtų išskirti *IKZF1* (*IKAROS*) geno mutacijas, kurių nustatoma 80 % ŪLL atvejų, kai turimas ir BCR-ABL1 sulietas genas. Didžioji dalis šių *IKZF1* geno delecijų yra intrageninės delecijos ir apima 3–6 geno egzonus N-terminalinio „cinko pirštelių“ prisijungimo domeną. Dėl šios mutacijos susidaro baltymo izoformų, kurios veikia dominantiniu neigiamu principu ir inhibuoja tiek laukinio tipo *IKZF1* formas, tiek kitus šio geno šeimos narius (Yokota et al., 2016).

NKS tyrimas iš 483 vaikų ŪLL pacientų 92 % nustatė bent po vieną mutaciją. Dažniausios iš jų buvo *CDKN2A* (24 % atvejų), *ETV6* (21 %), *NRAS* (18 %), *KRAS* (18 %), *PAX5* (15 %) genų mutacijos (Ueno et al., 2016). Tiriant atskirai *PAX5* geno mutacijas, nustatytas 32–34 % dažnis tiek vaikų, tiek suaugusiųjų ŪLL grupėse (Familiades et al., 2009; Nakitandwe et al., 2010). *ERG* geno intrageninė delecija nustatoma 3–7 % vaikų B-ŪLL.

Nors dar nėra pakankamai validuotų duomenų, tačiau ši *ERG* mutacija gali būti išskirta kaip naujas B-ŪLL subtipas. Detalesnė analizė parodė, kad pacientai, turintys šią mutaciją, neturi „klasikinių“ B-ŪLL būdingų translokacijų. Taip pat nustatyta asociacija tarp *ERG* geno mutacijos ir *IKZF1* geno delecijos bei *DUX4* geno translokacijų (Mullighan et al., 2012; Zaliova et al., 2019).

Atskirai buvo tirtas *TP53* geno mutacijų statusas sergant ŪLL. Vaikų ŪLL šio geno mutacijos dažnis buvo 2 %, o suaugusiųjų ŪLL grupėje viena studija nustatė 8,2 % mutacijos dažnį (Chiaretti et al., 2013). Vis dėlto kitoje studijoje, ištyrus

625 ŪLL pacientus (vaikus ir suaugusiuosius), nustatyta *TP53* geno mutacija 15,7 % atvejų. Tyrėjai taip pat pastebėjo mutacijos koreliaciją su žema hipodiploidija ir *MYC* geno translokacija (Stengel et al., 2014).

Nemažai buvo tirtas T-ŪLL mutacijų spektras, kur didžiausią dalį sudaro *NOTCH1* geno mutacijos (vaikų 50 %, suaugusiųjų 57 % dažnis), rečiau kitų genų mutacijos – *FBXW7* (po 14 %), *WT1* (19 % ir 11 %), *BCL11B* (10 % ir 9 %), *ETV6* (8 % ir 14 %), *DNM2* (po 13 %), *IL7R* (10 % ir 12 %), *PTEN* (19 % ir 11 %), *KRAS* (6 % ir 0 %), *NRAS* (14 % ir 9 %), *PH6F* (19 % ir 30 %), *EZH2* (po 12 %) (Girardi et al., 2017).

1.3. Klinikinė diagnostika

Įtariant pacientui ŪLL ligą pirminiai klinikiniai požymiai gali varijuoti ir yra gana nespecifiniai, tačiau dažniausiai būna: nuolatinis blyškumas, kraujosrūvos – dėl kraujodaros nepakankamumo, karščiavimas, naktinis prakaitavimas, nepaaiškinamas svorio kritimas, hepatosplenomegalija, kaulų / sąnarių skausmai, limfadenopatija, retai ir neurologiniai sutrikimai.

Liga ir jos simptomai gali pasireikšti lėtai per kelias savaites ar mėnesius, o kai kuriems pacientams liga pasireiškia ūmiai. Iš tiesų daliai pacientų liga nustatoma atsitiktinai, nesant klinikinių simptomų, tačiau pastebėjus neįprastai pakitusius bendro kraujo tyrimo rezultatus.

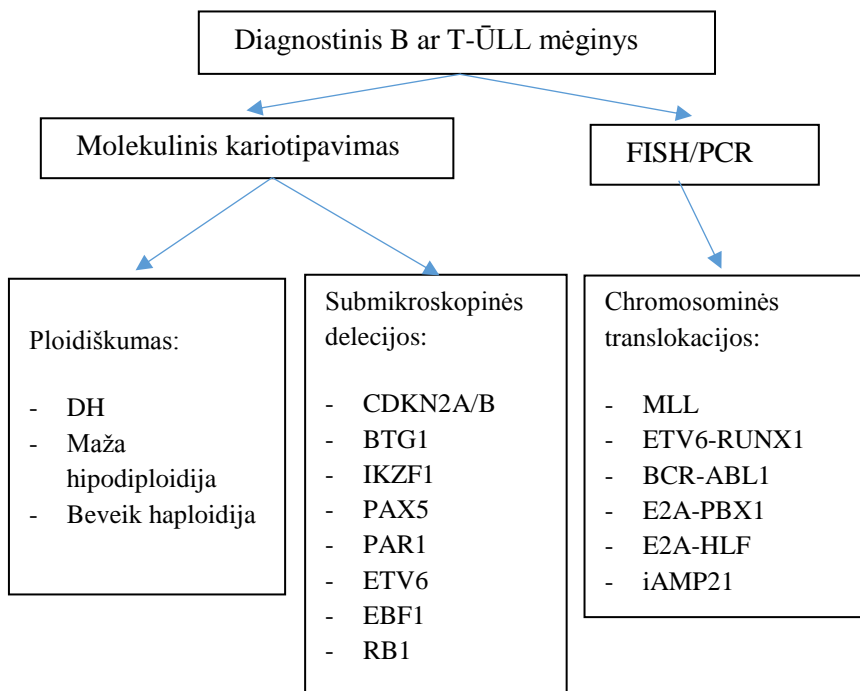
Ligos klinikinei diagnostikai yra atliekama kraujo bei kaulų čiulpų morfologinė ir imunofenotipavimo analizė. Morfologinės analizės metu yra nustatomas padidėjęs blastų skaičius, o tėkmės citometrijos (imunofenotipavimo) metu patvirtinama arba atmetama B arba T ląstelių limfoidinės linijos:

- B-ŪLL limfoblastams visada nustatomi B ląstelių linijos žymenys CD19, citoplazminiai CD79a ir CD22. Vien šie žymenys specifiskai nepatvirtina B-ŪLL diagnozės, būtina jų teigiama kombinacija su kitais žymenimis. Daugeliu atvejų B-ŪLL limfoblastai kartu ekspresuoja CD10, CD24, PAX5 ir TdT žymenis. Taip pat B limfoblastai turi būti neigiami CD3 (T ląstelių antigenas) ir mieloperoksidazei (MPO).
- T-ŪLL limfoblastams turi būti nustatomas CD7 žymuo bei paviršinis ar citoplazminis CD3 žymuo, neigiami B-ŪLL žymenys ir mieloperoksidazė.

Nors nėra būtina, tačiau papildomai gali būti atliekamas *IGH* ir *TCR* genų kloniškumo tyrimas. *IGH*, *IGK*, *IGL* genų kloniškumo tyrimu nustatomi kloniniai imunoglobulino sunkiosios grandinės persitvarkymai. B ir T limfocitų ontogenezės metu vyksta antigeno receptoriaus geno persitvarkymai. Dėl šių geno persitvarkymo kiekviename ląstelėje susidaro unikalūs ilgio ir sekos produktai. Vienos ląstelės kilmės (klono) limfocitų populiacijai identifikuoti naudojama polimerazės grandininė reakcija (PCR), kurioje nustatomi unikalūs antigeno receptoriaus lokuso V-J geno persitvarkymo variantai. Šis tyrimas naudojamas kloninių B ląstelių populiacijai nustatyti. Tyrimo metu nustatomos arba normalios (polikloninės) populiacijos, arba monokloninės, kurios indikuoja B-ŪLL diagnozę. Analogiškai yra su T-ŪLL, kai yra atliekamas *TCR* genų (*TCRB*, *TCRG*, *TCRD*) kloniškumo tyrimas.

1.4. Genetinė diagnostika

ŪLL genetinės diagnostikos algoritmai skiriasi tiek skirtingose šalyse, tiek ir skirtingose laboratorijose. Vilniaus universiteto Santaros klinikų Molekulinės medicinos skyriuje (VULSK MMS) taikomas genetinės diagnostikos algoritmas, kuris bendru sutarimu yra naudojamas Švedijoje, Danijoje, Suomijoje, Norvegijoje, Islandijoje, Didžiojoje Britanijoje, Prancūzijoje (šalys priklauso A2G ŪLL gydymo ir diagnostikos protokolui). Pagal šį algoritmą visų pirmą yra ištiriama didelė hiperdiploidija, maža hipodiploidija ir beveik haploidija. Visas šias genetines anomalijas galima nustatyti MK arba rutininio kariotipavimo metodais. VULSK MMS yra naudojamas MK metodas, norint ne tik identifikuoti minėtus ploidiško pokyčius, bet ir nustatyti „užsimaskavusią hipodiploidiją“, kurios dėl ribotų techninių galimybių negali aptikti rutininis kariotipavimas. Lygia greta yra atliekama fluorescencinės *in situ* hibridizacijos (FISH) diagnostika, norint nustatyti *MLL*, *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1*, *E2A-PBX1* ir *E2A-HLF* genų translokacijas. Protokolui yra svarbu nustatyti ir intrachromosominę 21-os chromosomos amplifikaciją, kurią galima detektuoti tiek MK, tiek FISH metodais. Inovacijų genetinėje ŪLL diagnostikoje įnešė MK nustatytos ir prognostinę reikšmę įgijančios *BTG1*, *CDKN2A/B*, *IKZF1*, *EBF1*, *ETV6*, *PARI*, *PAX5*, *RBI* genų submikroskopinės delecijos (1 schema).



1 schema. ŪLL diagnostikos algoritmas, naudojamas VULSK MMS

1.5. Molekulinis kariotipavimas ir jo taikymas

Nustatyti citogenetines aberacijas yra reikšminga ne tik diagnozuojant onkohematologinės ligos tipą, bet ir prognozuojant ligos eigą bei parenkant gydymą. ŪLL diagnostikoje dažniausiai naudojami rutininio kariotipavimo G dažymo ir FISH metodai. Rutininis kariotipavimas turi limituotą skiriamąją gebą, tai yra gali nustatyti chromosomines aberacijas, didesnes negu 5–10 Mb. FISH metodas yra gerokai tikslesnis ir jautresnis, iš specifinių žymenų gebantis nustatyti pokyčius iki kelių kilobazių (kb). FISH trūkumas ŪLL genetiųjų aberacijų paieškoje yra tai, kad šiuo metodu nustatomi tik taikininiai pokyčiai, bet negalima įvertinti kitų, dar nenustatytų naujų aberacijų.

Atsiradus MK metodams – LGH ir VNP-LGH – chromosominius pokyčius pavyksta nustatyti žemesne negu 100 kb skiriamąją geba. Šiuo atveju VNP-LGH metodo pranašumas, palyginti su LGH, yra tai, kad juo galima nustatyti ne tik genomo struktūrinius pokyčius, bet ir HP, kurie vis dažniau pastebimi ne tik leukemijų, bet ir kitų onkologinių ligų vystymesi (Song et al., 2015). Minėta, kad

MK metodu atskleista naujų, pasikartojančių aberacijų spektras esant ŪLL bei identifikuoti galimai su leukemogeneze susiję genai.

Kai yra sergama kitomis hematologinėmis ligomis, MK metodo taikymas turėjo tiek mokslinės, tiek klinikinės vertės. Sergančių ūmine mieloleukemija (ŪML) apie 40 % pacientų turi citogenetiškai normalius kariotipus, tačiau MK metodu iš 157 ŪML atvejų, kai pacientų kariotipas buvo citogenetiškai normalus, beveik 50 % atvejų nustatytos prieš tai neidentifikuotos chromosominės aberacijos, dalis jų buvo pasikartojančios ir apėmė su leukemija susijusius genus (Bullinger et al. 2010). Naudojant MK metodą mielodisplastiniu sindromu (MDS) sergantiems 72 pacientams, chromosominės aberacijos buvo nustatytos 82 % atvejų, iš šių pacientų 68 % prieš tai turėjo normalų kariotipą, nustatytą G dažymo metodu (Gondek et al., 2007). Kai yra tirozino kinazės inhibitoriams (TKI) atspari lėtinė mieloleukemija (LML), MK metodu identifikuoti tiek pasikartojantys HP įvairiose chromosomose, tiek pasikartojanti *IGCL1* geno delecija, kuri, kaip manoma, gali būti TKI atsparumą paaiškinantis biologinis veiksnys (Nowak et al., 2010). ŪML MK tyrimu nustatyta 17p regiono HP ir *TP53* geno mutacijos sąsąją. Šių genetinių įvykių kombinacija turėjo neigiamą prognozę ŪML grupėje (Parkin et al., 2010). Sergant ŪLL, MK yra svarbus nustatant „užsimaskavusią hipodiploidiją“. UH atveju pirminiai klonai (20–23 chromosomos) dėl endoreduplikacijos gali padvigubėti kelis kartus, taip imituojant hiperdiploidiją (50–61 chromosoma). Tokiu atveju naudojant tik rutininį kariotipavimą G dažymo metodu galima klaidinga genetinė diagnozė. Naudojant MK, UH yra nustatoma, kai yra dauginiai HP, apimantys visas endoreduplikacijos metu padvigubėjusias chromosomas (Safavi et al., 2017).

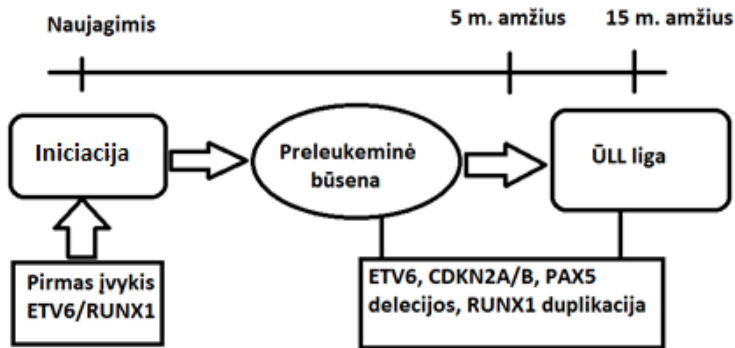
1.6. Prognostinė chromosominių aberacijų ir mutacijų reikšmė ŪLL

Hiperdiploidija standartiškai priskiriama geros prognozės aberacijų tipui. Pirmą kartą gera hiperdiploidijos prognostinė vertė buvo pastebėta ištyrus 502 vaikus, sergančius ŪLL (Chessels et al., 1997). Kitose studijose hiperdiploidijos gera prognostinė vertė buvo patvirtinta, tačiau išskirta, kad geresnis išgyvenamumas be ligos progreso (IBLP) ir bendras išgyvenamumas (BI) vis dėlto būdingesni ne visai hiperdiploidijai, o tik DH. Nors DH grupėje buvo ligos atkryčių, tačiau jie fiksuoti vėliau negu ne DH grupėje (Moorman et al., 2007). Šis citogenetinis pogrupis yra priskiriamas gerai prognozei, tačiau skirtingas pacientų amžius, leukocitų skaičius, ankstyvas gydymas gali modifikuoti prognozę. Tobulėjant tyrimo metodams, beveik triploidijos ir tetraploidijos bloga prognostinė vertė buvo paneigta (Hakeem et al., 2015).

Hipodiploidija, kitaip nei hiperdiploidija, dažniausiai siejama su bloga vaikų ir suaugusiųjų ŪLL prognoze (Safavi et al., 2017). Viena pirmųjų didžiausių studijų, kai tirti 226 vaikų / suaugusiųjų ŪLL pacientai, turintys hipodiploidinius kariotipus, nustatė, kad bloga prognozė buvo būdinga pacientams, kurių beveik haploidija ir maža hipodiploidija, tačiau ne didelė hipodiploidija. Vaikų ŪLL, kai yra beveik haploidija / maža hipodiploidija 3 metų IBPL buvo vos 29 %, kai didelė hipodiploidija – 66 %. Panaši situacija buvo ir suaugusiųjų ŪLL grupėje, kur 5 iš 7 suaugusiųjų ŪLL pacientų su beveik haploidija / maža hipodiploidija turėjo ligos atkrytį, tačiau su didele hipodiploidija – 45 % 5 metų IBPL (Harrison et al., 2004). Analogiška studija patvirtino, kad blogesnis IBPL ir BI buvo būdingas ŪLL pacientams, kurie turėjo mažiau negu 44 chromosomas, negu tų, kurie turėjo 44–46 chromosomas. Nustatytoje blogos prognozės grupėje nebuvo skirtumo tarp beveik haploidijos ir mažos hipodiploidijos (Nachman et al., 2007). Hipodiploidijos prognostinė reikšmė buvo tirta išskirtinai suaugusiųjų ŪLL grupėje. Hipodiploidijos prognostinė reikšmė buvo analizuota 91 suaugusiajam B-ŪLL pacientui. Remiantis studijos rezultatais pažymėtina, kad pacientų, jaunesnių nei 35 metų ir turinčių mažą hipodiploidiją, išgyvenamumo ir ligos atkryčio rodikliai buvo geresni negu pacientų, turinčių mažą hipodiploidiją ir vyresnių negu 35 metų (išgyvenamumas 71 % ir 21 %, ligos atkryčio tikimybė – 17 % ir 66 %) (Ribera et al., 2019).

Translokacija t(12;21)(p13;q22) yra dažniausia vaikų ŪLL aberacija ir priskiriama prie geros prognozės žymenų su 5 metų IBPL, siekiančių 80–97 % (Bhojwani et al., 2012; Lee et al., 2017). Vis dėlto buvo pastebėta, kad apie 20 % vaikų, sergančių ŪLL ir turinčių šią translokaciją, nustatomas vėlyvas ligos atkrytis. Detalesnė analizė parodė, kad šioje grupėje, be t(12;21)(p13;q22) translokacijos, ligos eigoje atsiranda papildomos genetinės aberacijos: *RUNX1* geno duplikacija, *CDKN2A/B*, *ETV6* ir *PAX5* genų delecijos. Ši „dvejų įvykių“ hipotezė leidžia teigti, kad gimimo metu atsiradusi translokacija t(12;21)(p13;q22) dar neinicijuoja ŪLL, tačiau yra reikalinga antrinė aberacija (3 pav.) (Sun et al., 2017).

Kadangi suaugusiųjų ŪLL ši translokacija yra reta, todėl nėra išsamių studijų apie jos įtaką IBPL ir BI šioje grupėje. Vokietijoje atlikta studija tyrė suaugusiųjų ŪLL pacientus su t(12;21)(p13;q22) translokacija ir nustatė, kad šiems pacientams yra būdinga gera prognozė, tačiau tik pirmus dvejus metus, o ilgalaikis BI buvo neigiamai paveiktas vėlyvųjų ligos atkryčių (Burmeister et al., 2010).



3 pav. „Dviejų įvykių“ hipotezė, esant ETV6-RUNX1 translokacijai.

ŪLL *MLL* geno translokacija/t(v;11) dažniausiai nustatoma naujagimiams, tačiau būna ir vyresniems vaikams. *MLL* geno translokacijos prognostinė reikšmė priklauso nuo amžiaus grupės. Blogiausią prognozę su šia geno translokacija turi naujagimiai, jų ilgalaikis IBLP siekė 10–30 %. Diferencijuojant prognostinę reikšmę naujagimių ŪLL grupėje blogesnę prognozę turėjo naujagimiai iki 6 mėnesių amžiaus. Nustatyta prognozės tendencija priklausomai nuo *MLL* geno partnerio translokacijos. Blogesnę prognozę turi t(4;11) ir t(9;11) negu translokacijos su kitu *MLL* geno partneriu (Vrooman et al., 2009; Tamai et al., 2011). Dėl reto *MLL* geno translokacijos dažnio suaugusiųjų ŪLL nėra atlikta pakankamai išsamių prognostinės vertės analizės tyrimų. Ispanų tyrėjų grupė analizavo 46 suaugusius ŪLL pacientus, kuriems buvo nustatyta *MLL* geno translokacija. Išgyvenamumo analizė nustatė, kad 5 metų BI buvo būdingas 20 % pacientų, kai vidutinis BI laikas buvo 12,1 mėnesio (Motlló et al., 2017). Retrospektyvinė 74 suaugusių ŪLL pacientų, turinčių *MLL* geno translokaciją, analizė leido nustatyti, kad vidutinis BI buvo 13,3 mėn. (t(4;11)) ir 24 mėn. (t(9;11)), o ŪLL pacientų be *MLL* geno translokacijos – 48,5 mėn. (Badar et al., 2014).

E2A-PBX1 translokaciją turintiems ŪLL pacientams yra būdinga agresyvesnė ligos eiga ir taikoma intensyvesnė chemoterapija, tačiau išgyvenamumo rodikliai yra santykinai geri. Vienoje studijoje buvo analizuota 20 vaikų, sergančių ŪLL, E2A-PBX1 translokacijos prognostinė reikšmė. Visa grupė pacientų turėjo gerą atsaką į gydymą, jų 5 metų IBLP siekė 95 %, vis dėlto BI translokacija įtakos neturėjo (Hu et al., 2016). Analogiška studija, kai buvo tirta E2A-PBX1 translokacijos prognostinė vertė 48 vaikų ŪLL grupėje. Buvo įvertinta ne tik pati translokacija, bet ir kaip skiriasi subalansuotų ir nesubalansuotų translokacijos variantų prognostinė vertė. ŪLL pacientų, turinčių E2A-PBX1 translokaciją, IBLP buvo 85 %, o subalansuoto ir nesubalansuoto translokacijų varianto IBLP beveik

nesiskyrė (88 % ir 78 %) (Felice et al., 2011). Daugiau kontroversijų yra analizuojant šios translokacijos prognostinę reikšmę esant suaugusiųjų ŪLL. Analizę apsunkina ir nedidelis translokacijos dažnis, nustatomas suaugusiųjų ŪLL grupėje. Vienos pirmųjų studijų identifikavo E2A-PBX1 translokacija kaip blogą prognostinį žymenį, kuris turėjo įtakos agresyvesnei ligos eigai, trumpesniai BI, prastesniai atsakai į gydymą (Foa et al., 2003; Piccaluga et al., 2006). Tačiau vėliau atlikta studija, kai buvo ištirta E2A-PBX1 translokacija 23 suaugusiems ŪLL pacientams, nenustatė statistiškai reikšmingo mažesnio BI negu pacientams be šios translokacijos (Burmeister et al., 2010). Kita E2A translokacija – E2A-HLF – pasižymi labai bloga prognoze vaikų ŪLL grupėje. Iš 21 aprašyto atvejo 20 pacientų mirė ligai progresavus. Iš jų dviem pacientams buvo atlikta alogeninė kaulų čiulpu transplantacija, tačiau net ir pasiekus visišką remisiją, jiems vis tiek buvo ligos atkrytis (Minson et al., 2013).

BCR-ABL1 translokacija arba kitaip vadinama Filadelinė chromosoma yra gerai žinomas suaugusiųjų ŪLL blogos prognozės žymuo, tačiau, atsiradus gydymo tirozino kinazės inhibitoriais (TKI) (imatinibu, nilotinibu, dasatinibu, ponatinibu) galimybei, įmanoma pasiekti ne tik visišką remisiją, bet ir BI, taip pat pailgėjo laikotarpis, kai yra išvengiama ligos atkryčio (Byun et al., 2017). Panaši situacija yra ir su vaikų ŪLL grupe, kurioje nustatoma ši translokacija. Iki TKI eros BCR-ABL1 translokacija buvo labai blogas prognostinis žymuo, tačiau, pradėjus TKI gydymą, vaikų, sergančių ŪLL, prognozė tapo gera (Bernt et al., 2014).

Intrachromosominė iAMP21 amplifikacija yra blogos prognozės žymuo vaikų ŪLL grupėje (Harrison et al., 2015). Viena iš pirmųjų studijų įvertino 28 vaikų, ŪLL pacientų, iAMP21 prognostinę reikšmę ir nustatė, kad jų IBLP ir 5 metų BI buvo statistiškai blogesnis negu pacientų be iAMP (IBLP – 29 % ir 78 %, BI – 71 % ir 87 %) (Moorman et al., 2007). Kadangi ši amplifikacija yra labai reta suaugusiųjų ŪLL, todėl jos prognostinė vertė šioje grupėje nėra žinoma.

IKZF1 (IKAROS) geno delecija pirmą kartą buvo aptikta naudojant MK vaikų ŪLL (Mullighan et al., 2007). Tų pačių autorių atlikta šio geno delecijos prognozės analizė parodė, kad *IKZF1* yra blogos prognozės žymuo, dėl kurio blogėja atsakas į gydymą ir padidėja ligos atkryčio tikimybė (Mullighan et al., 2009). *IKZF1* geno delecijos, kaip nepriklausomo blogos prognozės žymens vaikų ŪLL, hipotezę patvirtino keletas atliktų studijų (Kiuper et al., 2010; Dörge et al., 2013; Clappier et al., 2015).

CDKN2A/B geno delecijos prognostinė reikšmė pirmą kartą buvo tirta vaikų ŪLL grupėje. Nustatyta, kad *CDKN2AB* geno delecija buvo dažnesnė ligos atkryčio mėginuose, tačiau statistinio patikimumo neaptikta (Sulong et al., 2009). Ši delecija buvo atskirai nagrinėta suaugusiųjų ŪLL grupėje, kuri turi BCR-ABL1 translokaciją. Buvo nustatyta, kad *CDKN2AB* delecija prisideda prie ligos

progresijos ir blogo ilgalaikio šios BCR-ABL1 grupės išgyvenamumo (Iacobucci et al., 2011). Tolesnės atliktos studijos nustatė, kad *CDKN2AB* geno delecija yra prognostinis žymuo, bloginantis tiek BI, tiek IBLP vaikų ir suaugusiųjų grupėse (Zhang et al., 2019).

PAX5 geno delecijos prognostinė vertė nėra išsamiai tirta, tačiau vieni autoriai, ištyrę 87 suaugusius ŪLL pacientus, nustatė, kad *PAX5* geno delecija turi neigiamą įtaką dvejų metų BI ir padidina ligos atkryčio riziką (Fang et al., 2018). Vis dėlto tai validuojančių tyrimų nėra, o kai kurių tyrėjų manymu, ši delecija gali veikti kaip papildomas veiksnys, esant *CDKN2AB* ar *IKZF1* delecijoms (Dagdan et al., 2014).

RBI geno delecija buvo validuota kaip blogos prognozės žymuo didelėje studijoje, kai tirta 3239 B-ŪLL vaikų grupė (Hamadeh et al., 2019). Vis dėlto prognostinė vertė suaugusiųjų grupėje nėra gerai ištirta.

ETV6, *EBF1*, *BTG1* genų delecijų prognostinė reikšmė nėra nustatyta (Fang et al., 2018).

1.7. Kloninė chromosominių aberacijų ir mutacijų evoliucija esant ŪLL

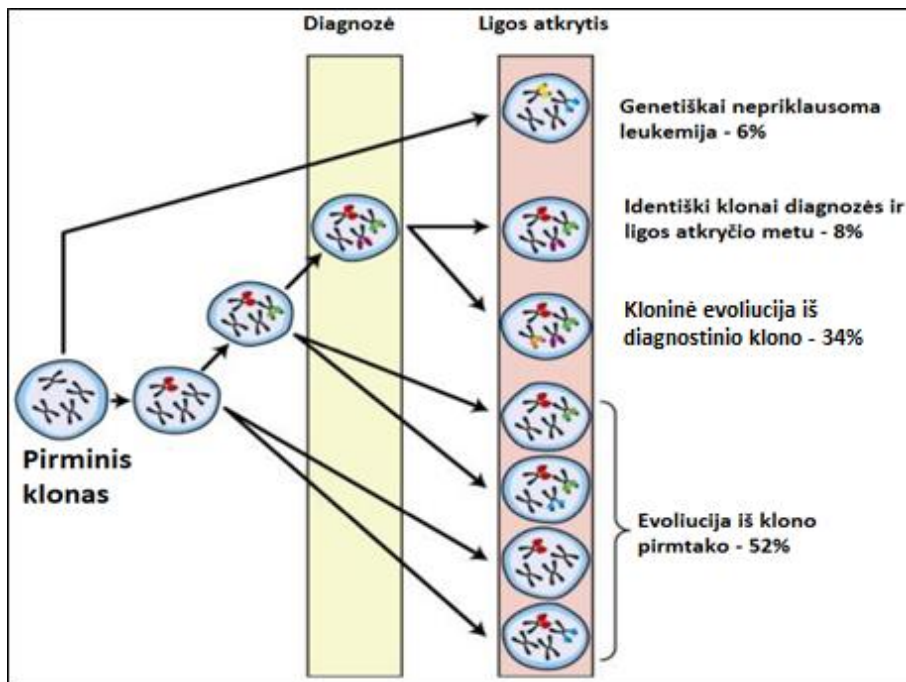
Nors vaikų, sergančių ŪLL, atsakas į gydymą ir išgyvenamumo analizė pastaraisiais metais rodo pasiekus gerų rezultatų, tačiau vis tiek neišvengiama ligos atkryčio atvejų. Kur kas blogesnė situacija yra suaugusiųjų ŪLL grupėje, kur ligos atkryčiai būna nereti. Norint išsiaiškinti ligos atkrytį lemiančius genetinius mechanizmus, reikia ligos diagnostinio ir ligos atkryčio mėginių lyginamosios analizės.

Pirmoje tokio pobūdžio studijoje buvo tiriami suporuoti vaikų ŪLL 61 diagnostinis ir ligos atkryčio mėginys, siekiant išsiaiškinti, kaip evoliuciškai kito chromosominių aberacijų spektras. Visų pirma reikia pasakyti, kad ligos atkryčio mėginiuose buvo nustatyta daugiau aberacijų negu diagnostiniuose (vidutiniškai 10,8 aberacijos diagnostiniam mėginiui ir 14 aberacijų ligos atkryčio mėginiui). Tiek diagnostiniuose, tiek ligos atkryčio mėginiuose dažniausiai chromosominių aberacijų buvo paveikti su ŪLL siejami genai: *CDKN2AB*, *ETV6*, *PAX5*, *IKZF1*, *EBF1*. Dauguma ligos atkryčio mėginių turėjo bent vieną aberaciją, ji taip pat buvo ir diagnostiniame mėginyje, tai rodo aberacijų bendrą kloninę kilmę.

Ištyrus aberacijas suporuotuose mėginiuose, nustatytos keturios aberacijų kloninės evoliucijos kryptys. Mažiausia atvejų (6 %), kai aberacijų buvo nustatyta tik ligos atkryčio mėginiuose, taigi galima hipotezė, jog tai yra antrinė leukemija arba „klaidingai“ identifiukuotas ligos atkrytis. Kitos evoliucijos krypties apie 8 % atvejų tiek diagnostiniame, tiek ligos atkryčio mėginyje buvo nustatyta identiškų aberacijų.

Trečdalyje mėginių buvo klasikinė kloninė evoliucija, kai atsirado papildomų aberacijų ligos atkryčio mėginyje, kurių nebuvo diagnostiniuose mėginiuose. Ir daugiau nei pusėje ŪLL mėginių dalies aberacijų, nustatytų diagnozės metu, nebebuvo aptikta ligos atkryčio mėginiuose, taigi galima manyti, jog ligos atkryčio klonas yra kilęs iš pirminio, priešdiagnozinio ląstelės pirmtakės klonas, o ne iš dabar dominuojančio diagnostinio klonas (Mullighan et al., 2008) (4 pav.).

Analogiška suporuotų mėginių studija buvo atlikta su suaugusiųjų ŪLL diagnostiniais ir ligos atkryčio mėginiais. MK buvo ištirti 18 suporuotų mėginių, iš jų 27 % turėjo identiškas chromosomines aberacijas abiejuose mėginiuose, 22 % turėjo papildomų naujų aberacijų ligos atkryčio mėginiuose, kurių nebuvo diagnozės metu, o 50 % atvejų diagnozės metu nustatytų aberacijų nebuvo nustatyta ligos atkryčio mėginiuose (Safavi et al., 2015). Lietuvių tyrėjai MK išanalizavo devynis suaugusiųjų ŪLL pacientų suporuotus mėginius ir patvirtino tris egzistuojančias kloninės evoliucijos kryptis: stabili kloninė kryptis, kai diagnostinių ir ligos atkryčių aberacijos nesiskiria (33 % atvejų), dinaminė kloninė evoliucija, kai ligos atkryčio mėginyje atsiranda naujų aberacijų (33 %), ir kloninė evoliucija iš pirminio prelaukeminio klonas (33 %) (Dirse et al., 2016).



4 pav. Kloninė evoliucija esant vaikų ŪLL

2. TYRIMO METODIKA

2.1. Tiriamieji

Pirmoje tyrimo dalyje 2007–2013 m. buvo atrinkti suaugusieji (18–64 m.) pacientai, kuriems diagnozuota ŪLL. 2007–2013 m. suaugusieji ŪLL pacientai iš visos Lietuvos buvo centralizuotai siunčiami diagnostikai ir gydyti į VULSK, lygiagrečiai pacientų klinikiniai duomenys buvo fiksuojami hematologijos stebėsenos sistemoje. Tokia bendra sistema šalies mastu leido tirti šią suaugusiųjų onkologinę ligą populiaciniu aspektu.

Antroje tyrimo dalyje atrinkti suaugusieji (18–64 m.) pacientai, kuriems buvo diagnozuotas ŪLL ligos atkrytis. Dalis pacientų, kuriems buvo ligos atkrytis, atrinkti iš pirmos tyrimo dalies (2007–2013 m., publikuoti duomenys). Norint kuo tinkamiau įvertinti ŪLL ligos atkrytį ir žinant, kad šių atvejų yra mažai, buvo papildomai įtraukti suaugusieji pacientai iš 2013–2018 m. laikotarpio (nepublikuoti duomenys). Šioje dalyje taip pat panaudoti NKS metodu nustatyti genominių mutacijų laboratoriniai duomenys iš VULSK MMS duomenų bazės (2007–2018 m.). Abiejose tyrimo dalyse buvo surinkti ir susisteminti hematologijos stebėsenos sistemos tiriamųjų ŪLL pacientų klinikiniai ir gydymo duomenys bei pasirinkti šie pacientų įtraukimo / neįtraukimo kriterijai:

Įtraukimo kriterijai:

1. 18–64 metų pacientai, kuriems nustatyta ūminė B/T ŪLL.
2. Paciento diagnostinis kaulų čiulpų aspiracijos mėginys yra tinkamas MK tyrimui (pirmoji tyrimo dalis).
3. Paciento kaulų čiulpų aspiracijos mėginys, paimtas diagnozuojant ligos recidyvą, yra tinkamas MK tyrimui (antroji tyrimo dalis).
4. Pasirašytas sutikimas dalyvauti biomediciniame tyrime.

Neįtraukimo kriterijai:

1. Jaunesni nei <18 m. ir vyresni nei 65 m. pacientai.
2. Bifenotipinė ar mišraus fenotipo ŪLL.
3. Subrendusių B-limfocitinių ląstelių kilmės ŪLL.
4. Nepakankamas diagnostinis ir / arba ligos atkryčio kaulų čiulpų mėginio kiekis MK tyrimui atlikti
5. Anksčiau persirgta onkologinė liga (jeigu ŪLL diagnozuojama kaip antrinis navikas).

Studijai atlikti buvo gautas Vilniaus regioninio biomedicinos tyrimų etikos komiteto leidimas (Nr. 158200-18/12-1087-581) (**III PRIEDAS**). Pacientų atranka, jų klinikinių duomenų analizę atliko gydytojos hematologės – Agnė Bertašiūtė ir Rūta Semaškevičienė.

2.2. Tyrimo sumanymas

Pirmoje tyrimo dalyje buvo numatyta MK ištirti suaugusiųjų ŪLL pacientų diagnostinius mėginius ir nustatyti genominių aberacijų spektrą Lietuvos populiacijoje. Atlikta analizė padėtų įvertinti chromosominių aberacijų pasiskirstymą, jų tipą, dydį sergant šia liga suaugusiems asmenims, identifikuotų galimai naujus genus kandidatus, kurie būtų susiję su leukemogeneze. Gautų genetinių duomenų ir klinikinių duomenų koreliacija leistų įvertinti specifinių aberacijų įtaką gydymui ir pacientų išgyvenamumui. Žinant geno *TP53* onkogenetinę vertę, papildomai buvo ištirtas šio geno mutacijų statusas diagnostiniuose mėginiuose.

Antroje tyrimo dalyje numatyta MK ištirti porinius suaugusiųjų ŪLL diagnostinius ir ligos atkryčio mėginius. Ši dviejų skirtingų ligos etapų mėginių analizė padėtų įvertinti, kaip kito chromosominių aberacijų spektras nuo diagnozės iki ligos atkryčio, tai leistų nustatyti kloninės evoliucijos kryptį. Pasinaudojus VULSK MMS duomenų bazės NKS nustatytų mutacijų rezultatais, buvo įvertinta, kaip evoliucionavo mutacijų fonas nuo diagnostinio iki ligos atkryčio ŪLL mėginio.

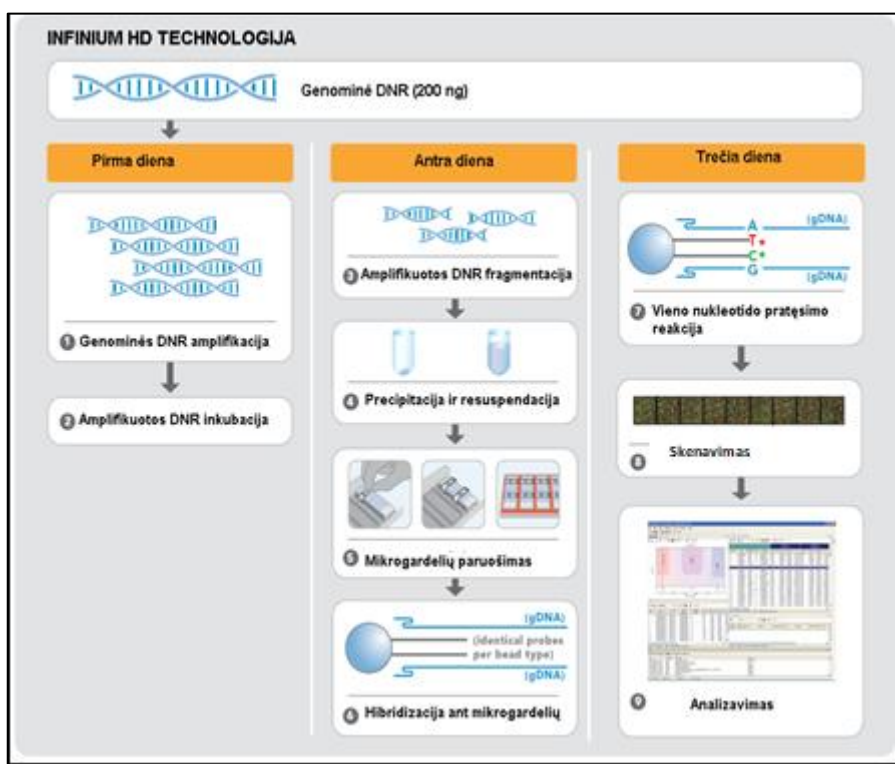
2.3. Tyrimo eiga ir metodai

2.3.1. DNR išskyrimas ir DNR koncentracijos ir grynumo matavimas

DNR iš kaulų čiulpų buvo išskirta automatizuota MAXWELL 16® INSTRUMENT (Promega) sistema. DNR koncentracija pamatuota NANODROP 2000 (Thermo Fisher Scientific, JAV), matuojant sugertį 280 nm ilgio bangoje. DNR grynumo tinkamumo ribos: A260/A280 ilgio bangose – 1,7–2,0. Detalus DNR išskyrimo, koncentracijos ir švarumo matavimo protokolas pateikiamas **I priede**.

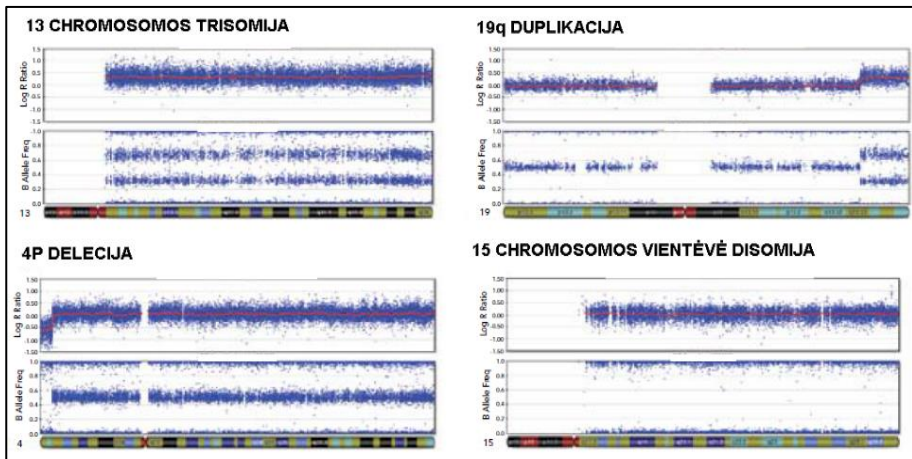
2.3.2. MK metodas

MK metodas yra paremtas vieno nukleotido polimorfizmo kaip žymenų, kurie yra pasirenkami remiantis tarptautinio HapMap projekto duomenimis, panaudojimu. Illumina® mikrolustai yra taikomi aberacijų paieškai, genotipavimui. Mikrolustai yra padengti šimtais tūkstančių mikroskopinių silikono rutuliukų, ant kurių yra pritvirtinti oligonukleotidiniai žymenys. Ant vieno silikoninio rutuliuko yra vieno tipo VNP žymenys. Nuskaitant lazeriu mikrolustus, yra koduojamas kiekvienas silikoninis rutuliukas, taip identifikuojant, koks žymuo yra ant jo pritvirtintas. Illumina® MK metodas remiasi Infinium HD™ technologija. Ši technologija susideda iš 4 etapų (5 pav.): (a) viso genomo amplifikacija (paremta atsitiktinių pradmenų išdėstymu po visą genomą ir bakteriofago *phi29* vykdoma amplifikacija), (b) fragmentacija, precipitacija ir resuspendacija, (c) tiriamos DNR hibridizacija su VNP žymenimis, (d) signalo amplifikacija (naudojama vieno nukleotido pratęsimo reakcija). Vieno nukleotido pratęsimo reakcijai yra naudojami dviem skirtingomis spalvomis pažymėti ddNTP



5 pav. Infinium HD technologijos algoritmas

(pvz.: ddCTP ir ddGTP žaliai, o ddATP ir ddTTP raudonai). Po šių etapų yra vykdomas mikrolusto nuskaitymas Illumina® iScan™ skeneriu bei analizė Illumina® GenomeStudio v3.1 programa. Aberacijų analizė MK metodu paremta dviem genotipavimo parametrais: aberacijų pasiskirstymo matavimas ir alelinės struktūros nustatymas. Nuskenavus mikrolustą gaunamas jo kompiuterinis vaizdas. Šis vaizdas Illumina® BeadScan™ programa yra lyginamas su kontroliniu pavyzdžiu. Kontrolinis pavyzdys – 120 bendros populiacijos individų (iš HapMap projekto) genomų, nuskenuotų tuo pačiu metodu, bendras vaizdas. Šis kontrolinis pavyzdys yra standartas, kurį Illumina® naudoja visose savo programose.



6 pav. MK nustatytų chromosominių aberacijų pavyzdžiai

Infinium HD™ technologija naudoja dviejų reikšmių sistemą (X,Y) kiekvienam VNP žymeniui. Po hibridizacijos ir vieno nukleotido pratęsimo reakcijos programa fiksuoja fluorescencijos signalą ir jo intensyvumą. Illumina® naudoja sutartinį žymėjimą: jei VNP vietoje žymenyje prie alelių prisijungia žaliai fluorescuojantis dideksinukleotidas – alelis žymimas kaip A (X reikšmė), o jei prisijungia raudonai fluorescuojantis dideksinukleotidas – alelis žymimas kaip B (Y reikšmė). Illumina® GenomeStudio v3.1 programa šiuos duomenis transformuoja į dvi dalis: Log R santykį (angl. *Log R ratio*) ir B alelio dažnumą (angl. *B allele frequency*). Log R santykį nusako lyginamų genominių vietų (paciento ir standarto) santykio \log_2 . Analizuojant Log R santykio vertes Illumina® GenomeStudio v3.1 programa, galima nustatyti hemizigotines delecijas (kai Log R santykis yra -0,5), homozigotines delecijas (kai Log R santykis yra 0) bei duplikacijas (kai Log R santykis yra 1,5). Log R santykis skaičiuojamas šiomis formulėmis – $R=X(\text{alelio A fluorescencijos intensyvumas})+Y(\text{alelio B fluorescencijos intensyvumas})$,

$R_{\text{tiriamoji}}/R_{\text{kontrolės}}$ ir $\log_2 R$. Kita dalis – B alelio dažnumas leidžia įvertinti genotipą, nurodydamas fluorescencijos intensyvumą tarp pačių alelių. B alelio dažnumas skaičiuojamas pagal šią formulę ($N_B/(N_A + N_B)$), čia N – visų kiekvieno tipo žymenų skaičius. B alelio dažnumą apibūdina gautos vertės – čia 0,5 vertė nurodo, kad genotipas yra heterozigotinis (AB), o 0 ir 1 reikšmės, kad genotipas homozigotinis (AA arba BB). Tai leidžia nustatyti heterozigotiškumo praradimą, vienatėvę disomiją, mozaicizmą (6 pav.). Detalus MK tyrimo protokolas pateiktas **II priede**.

llumina® HumanCytoSNP-12 mikrolustas

llumina® HumanCytoSNP-12 mikrolustu vienu metu galima išanalizuoti 12 pacientų DNR. Šiuo mikrolustu galima nustatyti duplikacijas, delecijas, heterozigotiškumo praradimus, mozaicizmą. llumina® HumanCytoSNP-12 mikrolusto pagrindą sudaro 300 000 VNP žymenų. Į šį mikrolustą taip pat įtraukta 250 „citogenetinių“ žymenų. llumina® HumanCytoSNP-12 mikrolusto vidutinė skiriamoji geba yra 10 Kb (vidutinis atstumas tarp žymenų).

llumina® GenomeStudio v3.1 analizavimo programa

llumina® GenomeStudio v3.1 programa analizuoja pirminius llumina® BeadScan™ skeneriu gautus rezultatus. Programa pateikia vizualiai visas nustatytas aberacijas ir parodo heterozigotiškumo praradimo vietas. Rezultatai lyginami su scheminiu chromosomų vaizdu (ideogramomis) – tai leidžia matyti, kuriame chromosomos regione yra įvykęs pakitimas. llumina® GenomeStudio v3.1 programa galima analizuoti kiekvieną chromosomą atskirai ir nustatyti tikslias aberacijos ribas ir įvertinti, kiek žymenų yra nustatytame pakitusiame regione. Programa yra tinkama pirminei analizei, peržvelgiant, ar nėra stambių chromosomų struktūros persitvarkymų.

QuantisNP© v1.0 analizavimo programa

Tai Oksfordo universitete sukurta programa, pritaikyta analizuoti rezultatus, gautus VNP-LGH metodu. QuantisNP© v1.0 programa galima gauti detalesnę informaciją apie nustatytas genomines aberacijas. Yra pateikiamos kiekvienos aberacijos pradžia ir pabaigą nurodančių žymenų koordinatės nukleotidais, žymenų pavadinimai, chromosoma, kurioje yra nustatyta aberacija, pakitusio regiono ilgis (bp), žymenų skaičius, įeinantis į aberaciją, pakitusių DNR fragmentų kopijų skaičius. QuantisNP© v1.0 nurodo genotipą ir jį apibūdinančius parametrus – Log R santykį (angl. *Log R ratio*) ir B alelio dažnumą (angl. *B allele frequency*).

illumina® iScan™ skeneris

illumina® iScan™ skenerio lazeris automatiškai vykdo mikrolustų nuskaitymą, tikslią kiekvieno mikrolusto padėtį skenavimo metu, nuskaityto vaizdo registravimą, kompiuterinio vaizdo transformavimą į skaitines reikšmes.

2.3.3. *TP53* geno mutacijų tyrimas

Naudojant didelės skiriamosios gebos lydymo (angl. *High Resolution Melting, HRM*) metodą yra atliekama *TP53* geno egzonų (2-11 egzonus) ir intronų-egzonų ribų patikra ir mutacijų nustatymas. Tyrimui naudojama genomine DNR išskirta iš pacientų, sergančių ŪLL, kaulų čiulpu. Naudojant trečios kartos interkaliacinius, visiškai DNR įsotinančius dažus, specialiais HRM funkciją palaikančiais aparatais / termocikleriais įmanoma nustatyti net 1 nukleotido skirtumą tiriamuosiuose amplikonuose. Stebimos genetinės sekos variacijos verifikuojamos atliekant DNR sekotyra. Tyrimą atliko dr. Eglė Gineikienė. Detali metodika aprašoma **III priede**.

2.3.4. ŪLL NKS mutacijų duomenų bazėje atranka, NKS metodikos principai

VULSK MMS rutininėje diagnostikoje yra naudojamas RNR NKS metodas, norint nustatyti kliniškai reikšmingas translokacijas ir mutacijas tiek diagnostiniame, tiek ligos atkryčio ŪLL mėginiuose. NKS tyrimui atlikti VULSK MMS naudoja illumina TruSight RNA Pan-Cancer (illumina, Inc.) panelį, kuris apima 1385, su įvairiomis onkologinėmis ligomis (iš jų ir leukemijomis) susijusius genus. Tyrimas atliekamas pagal gamintojo protokolus. Sekoskaitai yra naudojamas illumina MiSeq sekvenatorius. NKS sekoskaitą ŪLL ligai atlieka VULSK MMS darbuotojas Rimvydas Norvilas. Nustatytų genų variantų analizė yra atliekama illumina VariantStudio programa. Apie tai, kokie nustatyti kliniškai reikšmingi genų variantai / mutacijos, pranešama pacientą gydantiems gydytojams hematologams-onkologams ir įtraukiama į VULSK MMS duomenų bazę. Norint įvertinti mutacijų kloninę evoliuciją ŪLL ligoje, buvo atrinktos nustatytos mutacijos diagnostiniuose ir tų pačių pacientų ligos atkryčio mėginiuose. Buvo įvertinta, kaip kito mutacijų spektras ligos eigoje ir kokios galimos kloninės evoliucijos kryptys. Mutacijų kloninės evoliucijos pobūdis palygintas su MK metodu nustatytų chromosominių aberacijų kitimo pobūdžiu.

2.3.5. Statistinė analizė: koreliacija su klinikiniais duomenimis, IBLP ir BI tyrimų metodika

Pacientų charakteristikoms aprašyti naudota aprašomoji statistika. Išgyvenamumui be ligos progresijos įvertinti buvo fiksuojami įvykiai nuo ligos diagnozės – atsparumas gydymui, ligos atkrytis, antriniai vėžiai arba mirtis. Bendram išgyvenamumui įvertinti – mirties atvejais. Pacientai, nepatyrę įvykių ar likę gyvi, atitinkamai paskutinio vizito metu buvo cenzūruojami. Išgyvenamumo be ligos progresijos ir bendro išgyvenamumo rizikos veiksniams įvertinti buvo taikoma Cox regresijos analizė. Univariacinėje analizėje nustatyti reikšmingi veiksniai įtraukti į multivariacinį Cox modelį, naudojant atgalinį atrankos metodą. Statistiškai reikšminga dvipusė p reikšmė pasirinkta ties $< 0,05$. Statistinė analizė buvo atlikta naudojant SAS 9.2 (angl. *Statistical Analysis System package version 9.2*) programą. Statistinę analizę atliko Tadas Žvirblis.

3. TYRIMO REZULTATAI

3.1. Tiriamųjų charakteristikos

Lietuvoje nuo 2007 metų sausio iki 2013 metų gruodžio buvo diagnozuoti 96 suaugusiųjų (>18 m. amžiaus) ŪLL atvejai. Į tyrimą pateko visi gydyti 66 ŪLL pacientai 18–64 metų. Neįtraukti vyresnių nei 64 metų pacientų nutarta todėl, kad šiems pacientams dėl amžiaus atsiranda gretutinių ligų, nebėra taikomas intensyvus ŪLL gydymas. Šie išvardyti veiksniai neleistų objektyviai įvertinti genetinių pokyčių bei jų įtakos ligai ir jos progresijai. Visiems 66 pacientams diagnozės metu buvo išskirta DNR ir paruošta tolesniam MK ir *TP53* geno mutacijų tyrimui. Diagnozės metu tiriamųjų amžiaus intervalas buvo 18–64 m., o amžiaus mediana – 34 metai. Keturiasdešimt vienam pacientui (62 %) buvo diagnozuota B-ŪLL, o dvidešimt penkiems (38 %) – T-ŪLL. Visiems pacientams buvo atlikti rutininiai standartiniai tyrimai, kurių reikalaujama pagal gydymo protokolą (BCR-ABL1, ETV6-RUNX1, E2A-PBX1, MLL genų translokacijos ir iAMP21 amplifikacija) (1 lentelė). Visi ŪLL pacientai buvo gydomi pagal standartinį chemoterapijos protokolą, kur buvo naudojami multiagentiniai vaistai (BCR-ABL1 teigiamais atvejais buvo gydoma imatinibu). Alogeninė kaulų čiulpų transplantacija buvo atlikta 16 (24 %) pacientų.

Kloninės evoliucijos tyrimui 2007–2018 m. buvo atrinkti visi suaugusieji ŪLL pacientai, kuriems buvo konstatuotas ligos atkrytis. Ligos atkrytį turėjo 16 suaugusiųjų ŪLL pacientų. Jiems buvo atliktas MK tyrimas pagal tokias pačias sąlygas kaip ir pacientams diagnozės metu. Papildomai išanalizuota VULSK MMS NKS mutacijų duomenų bazė šių ŪLL diagnostinių ir ligos atkryčio mėginių.

1 lentelė. Pacientų, kuriems diagnozuota ŪLL Lietuvoje 2007–2013 metais, klinikinė charakteristika

Klinikinė charakteristika	Skaičius	%
Iš viso	66	100
Amžius, metai		
Mediana	34	
Dažnis	18–64	
Lytis		
Vyrai	34	52
Moterys	32	48
Fenotipas		
B-ŪLL	41	62
BCR-ABL1	11	27

TEL AML1	0	0
MLL AF4	6	15
E2A PBX1	2	5
AML1 amp	3	7
Kitos aberacijos	6	15
T-ŪLL	25	38
SIL TAL1	3	12
AML1 amp	2	8
Kitos aberacijos	2	8
Splenomegalija arba hepatomegalija		
Nustatyta	18	27
Nenustatyta	48	73
Neuroleukemija		
Nustatyta	10	18
Nenustatyta	46	82
Neaišku	10	-
WBC, $\times 10^9/l$		
Mediana	14.34	
Intervalo ribos	0.9-481.9	
NEU, $\times 10^9/l$		
Mediana	2.00	
Intervalo ribos	0.14-33.71	
Hgb, g/l		
Mediana	109.3	
Intervalo ribos	52.4-169	
Plt, $\times 10^9/l$		
Mediana	58	
Intervalo ribos	6.62-443	
Blastai, %		
Mediana	41.6	
Intervalo ribos	0-95	

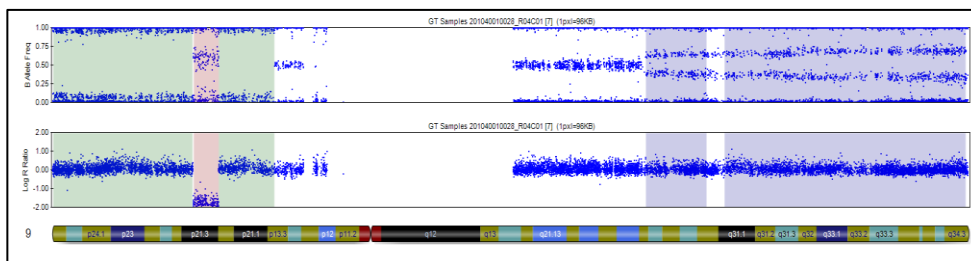
N=skaičius; WBC=baltieji kraujo kūneliai (angl. *white blood cells*, WBC);
 NEU=neutrofilai; Hgb=hemoglobinas; Plt=trombocitai.

3.2. MK tyrimu nustatytų genominių aberacijų spektras suaugusiųjų ŪLL

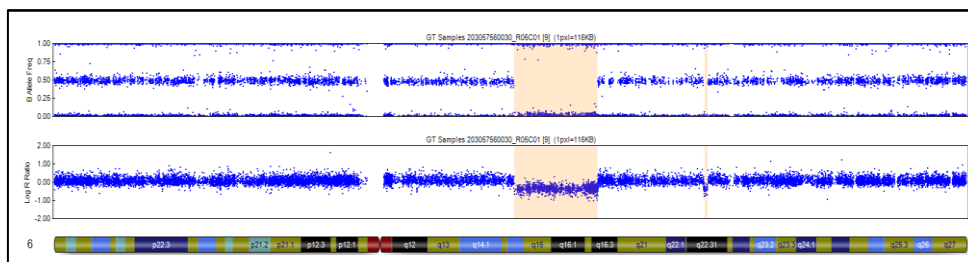
MK tyrimo metu 54 (82 %) suaugusiems ŪLL pacientams nustatytos 192 genominės aberacijos, kurios prieš tai nebuvo aprašytos kaip polimorfiniai geno variantai. Nustatytų aberacijų vidurkis, mediana ir moda buvo atitinkamai 3, 6,2 ir 1 aberacija pacientui. Nustatytų aberacijų dažnis buvo 1–12 aberacijų pacientui.

Genominių aberacijų pasiskirstymas pagal chromosomas

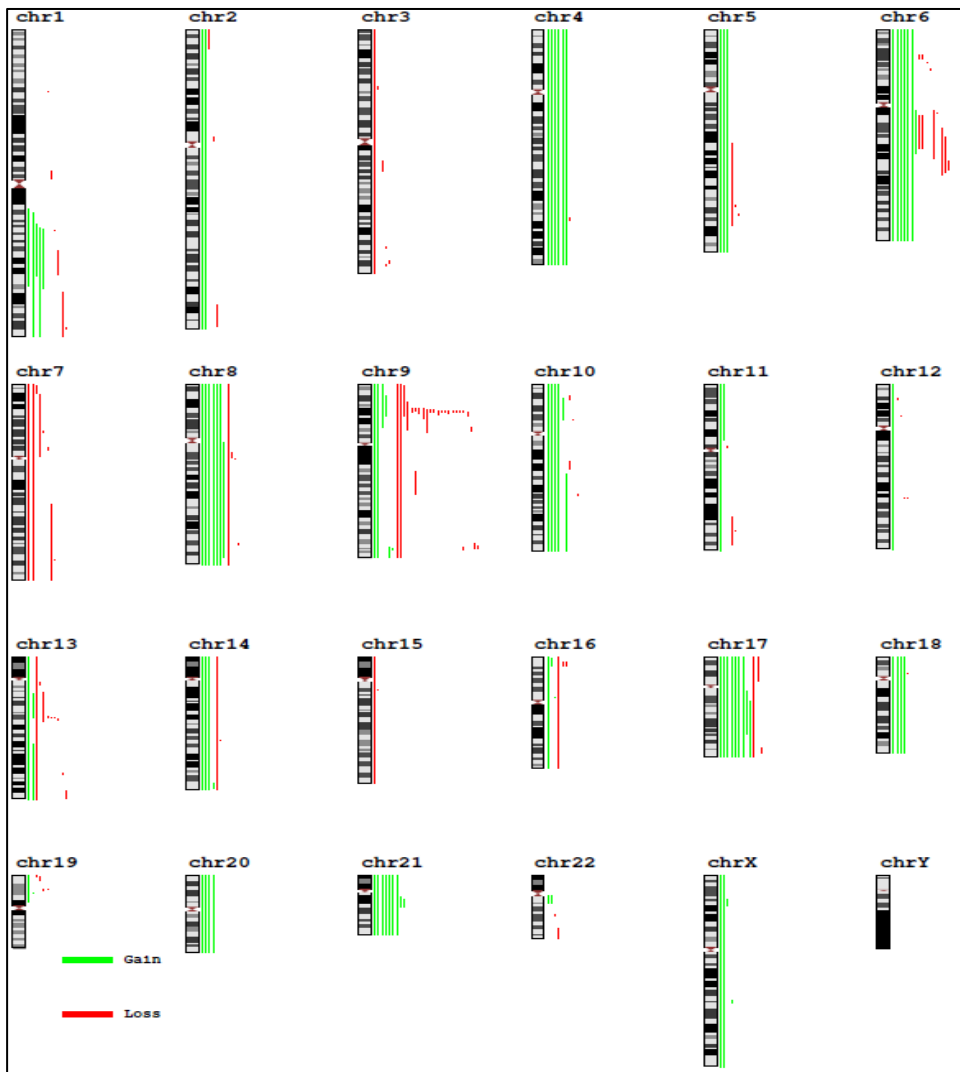
MK tyrimu daugiausiai chromosominių aberacijų buvo nustatyta 9-toje (34 aberacijos, daugiausia 9p srityje) (7 pav.) 6-toje (18, daugiausia 6q srityje) (8 pav.), 13-toje (12, daugiausia 13q srityje), 17-toje (12), 1-oje (11) ir 8-toje (11) chromosomose. Mažiausiai chromosominių aberacijų nustatyta 15-toje (2), 20-toje ir 22-oje chromosomoje (1 diagrama, 9 pav.)



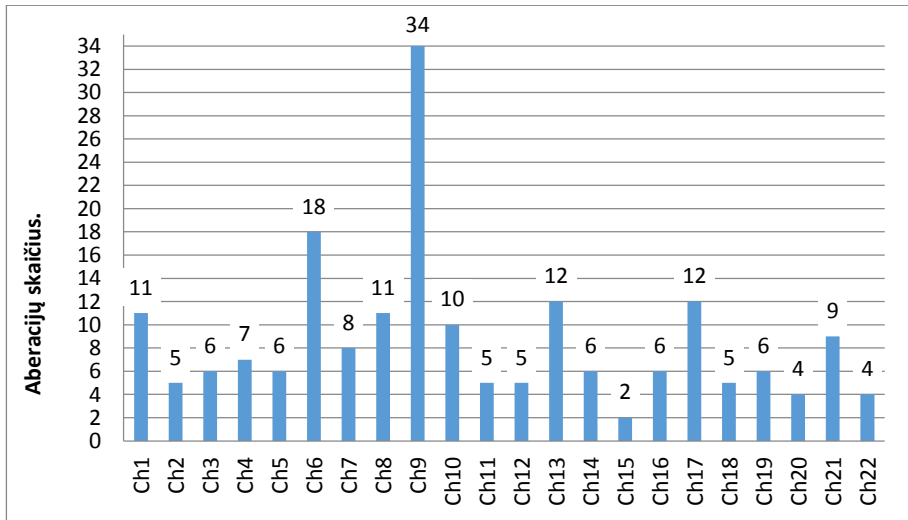
7 pav. HP 9p srityje (kairėje, žalia spalva) kartu su homozigotine delecija (raudona spalva).
Pirma pagal dažnumą ŪLL suaugusiųjų grupėje.



8 pav. Hemizigotinė 6q delecija. Antra pagal dažnumą suaugusiųjų ŪLL grupėje
(oranžinė spalva).



9 pav. Chromosominių aberacijų pasiskirstymas kariotipe

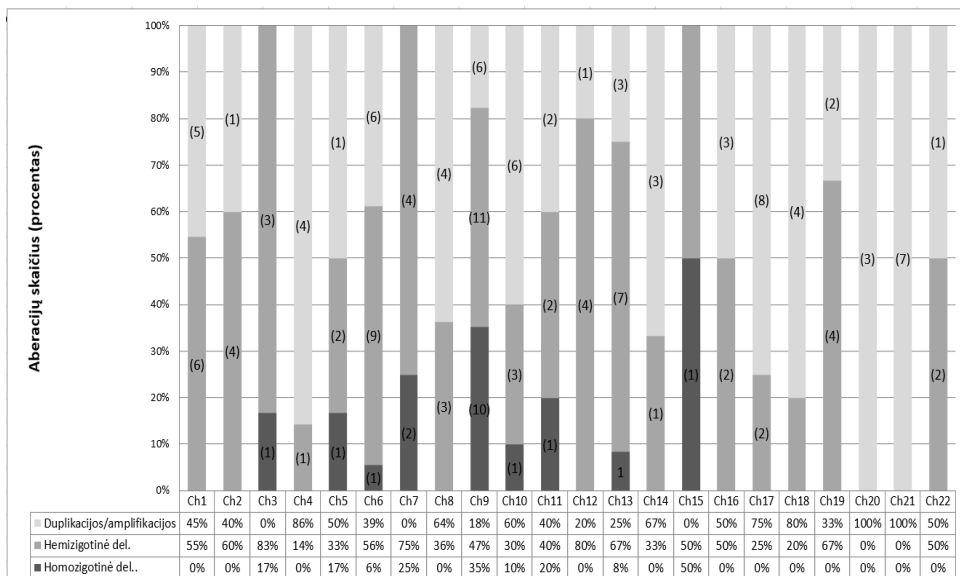


1 diagrama. Aberacijų pasiskirstymas pagal chromosomas

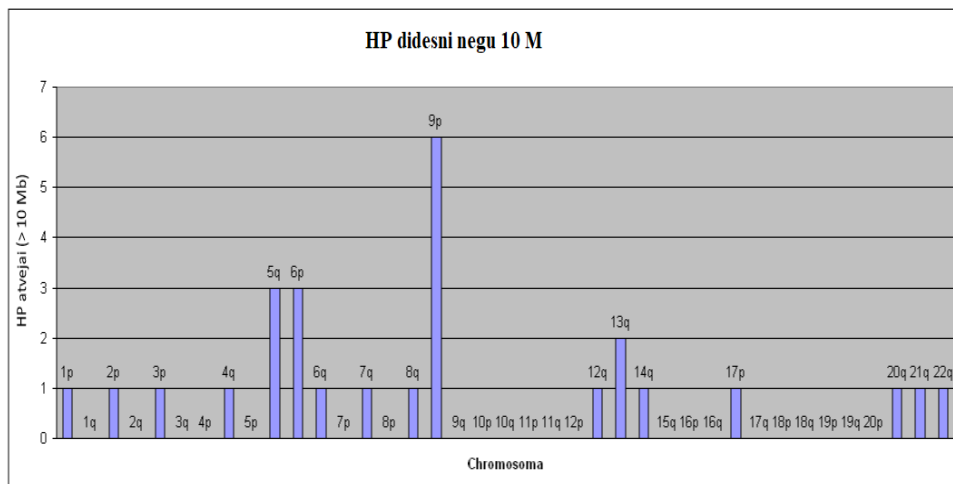
Genominių aberacijų pasiskirstymas pagal tipą

MK daugiausiai nustatyta hemizigotinių delecijų – 86 (45 % visų aberacijų), 85 duplikacijos / amplifikacijos (44 %) ir 21 homozigotinė delecija (11 %). Daugiausiai duplikacijų / amplifikacijų buvo nustatyta 17-toje ir 21-oje chromosomose (po 9 aberacijas kiekvienoje iš chromosomų). Hemizigotinių delecijų daugiausiai buvo nustatyta 9-toje chromosomoje (16 hemizigotinių delecijų), taip pat šioje chromosomoje buvo nustatyta ir daugiausiai homozigotinių delecijų (12 homozigotinių delecijų). Tik duplikacijos / amplifikacijos buvo nustatytos 20-toje ir 21-oje chromosomose, tačiau tik delecijos identifikuotos 3-ioje, 7-toje ir 15-toje chromosomose (hemizigotinės ir homozigotinės).

Įdomu pažymėti, kad X chromosomoje buvo nustatytos tik dvi trisomijos ir dvi duplikacijos, o Y chromosoma aberacijų neturėjo (2 diagrama). Papildomai buvo įvertintas heterozigotiškumo praradimų pasiskirstymas kariotipe, pasirinkus literatūroje rekomenduojamą 10 Mb ribą (Wang et al., 2016). Tokio dydžio ar didesnių HP iš viso buvo nustatyta 27, o daugiausiai – 6 HP – 9p srityje (3 diagrama) Visuose 9p HP regionuose buvo identifikuota homozigotinė delecija, kuri apėmė *CDKN2AB* geną.



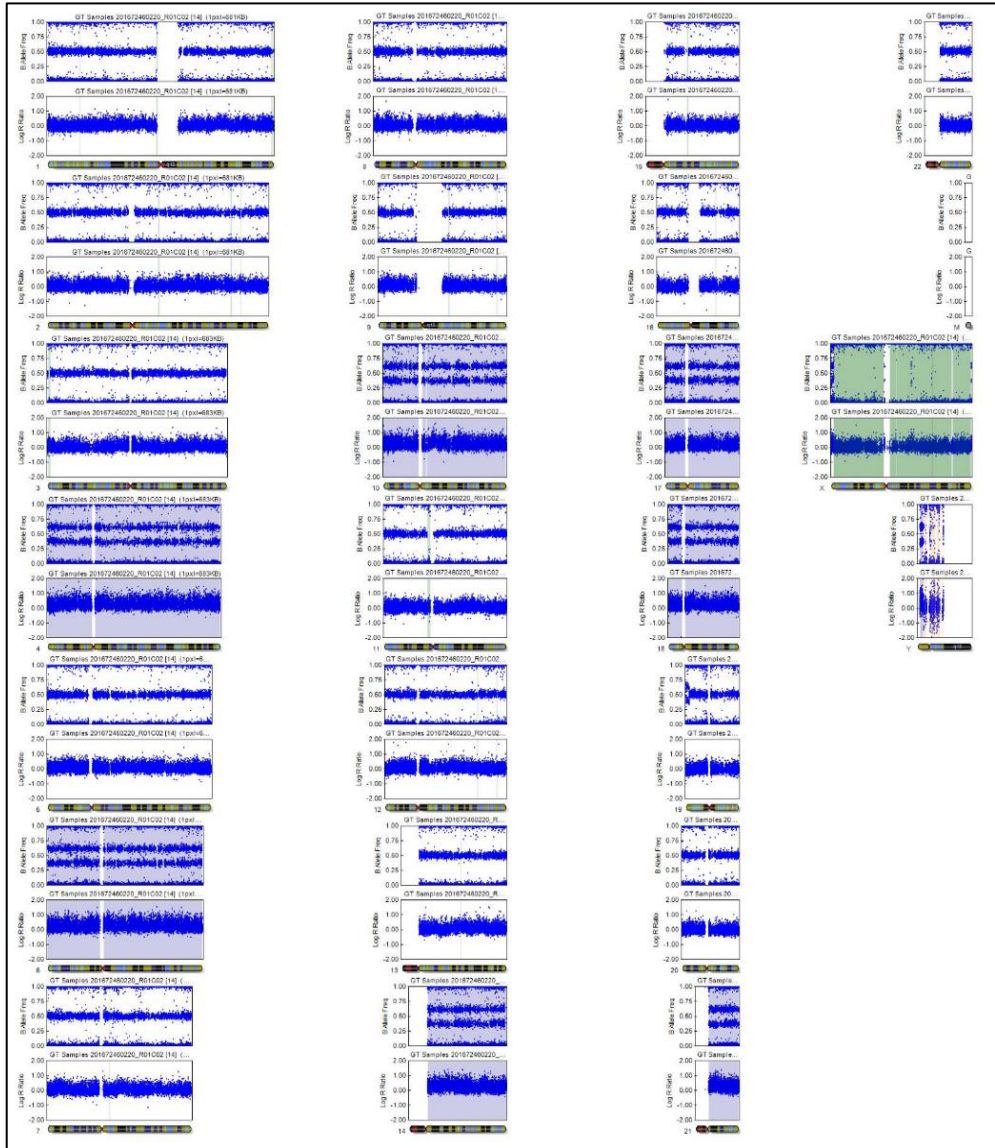
2 diagrama. Aberacijų pasiskirstymas chromosomose pagal tipą



3 diagrama. HP pasiskirstymas pagal chromosomas

Atlikus MK tyrimą iš viso nustatyta 14 hiperdiploidinių ir 2 hipodiploidiniai kariotipai. Hiperdiploidinių kariotipų grupėje 8 atvejais buvo maža hiperdiploidija (47–50 chromosomų) ir 6 atvejais didelė hiperdiploidija (51–60 chromosomų). Hiperdiploidiniuose daugiausiai trisomijų buvo su 4-ta (6 atvejai), 6-ta (6 atvejai), 10-ta (4 atvejai), 17-ta (5 atvejai), 18-ta (4 atvejai), 21-a (6 atvejai)

chromosomis. Iš nustatytų hipodiploidijų abu pacientai turėjo didelę hipodiploidiją (su 41 ir 45 chromosomis) (10 pav.)



10 pav. Hiperdiploidinis kariotipas, nustatytas MK

Genominių aberacijų pasiskirstymas pagal dydį

Norint įvertinti chromosominių aberacijų, nustatytų MK metodu, pasiskirstymą pagal dydį, buvo pasitelkti intervalai. Mažiausias intervalas pasirinktas 0–100 Kb atsižvelgiant į praktines MK skiriamosios gebos ribas. Iki 1 Mb buvo pasirinkti intervalai kas 500 Kb. Toliau intervalai buvo skirstomi taip: kas vieną Mb iki 5 Mb ribos, tada kas 5 Mb iki 50 Mb ribos. Į šį skirstymą nebuvo įtrauktos trisomijos ir monosomijos, norint tiksliau atspindėti atskirų aberacijų ilgio pasiskirstymą (2 lentelė).

2 lentelė. Aberacijų pasiskirstymas pagal dydį intervaluose

Aberacijos dydis, Mb	Aberacijų skaičius	Dažnis
≤0.1	7	4%
0.1-0.5	27	14%
0.5-1	9	5%
1-2	12	6%
2-3	11	6%
3-4	7	4%
4-5	2	1%
5-10	13	7%
10-15	1	1%
15-20	8	4%
20-25	5	3%
25-30	3	2%
30-35	3	2%
35-40	3	2%
40-45	3	2%

Mb=megabazės.

Iš pateiktų duomenų matome, kad aberacijų dydis yra santykinai įvairus, tačiau daugiausiai aberacijų, kurių dydis nuo 100 iki 500 Kb bei nuo 5 iki 10 Mb. Analizuojant dydžius pagal aberacijų tipus, nustatyta, kad hemizigotinių delecijų vidutinis dydis yra 2,7 Mb, duplikacijų 19,5 Mb, o homozigotinių delecijų 273 Kb. Detaliau pažvelgus į dydžių pasiskirstymą, matoma, jog daugiausiai duplikacijų nustatyta 5–10 Mb (22 %) (3 lentelė).

3 lentelė. Duplikacijų / amplifikacijų pasiskirstymas pagal dydį intervaluose

Aberacijų dydis, Mb	Aberacijų skaičius	Dažnis
≤0.1	0	0%
0.1-0.5	3	11%
0.5-1	1	4%
1-2	0	0%
2-3	0	0%
3-4	0	0%
4-5	1	4%
5-10	6	22%
10-15	0	0%
15-20	3	11%
20-25	1	4%
25-30	0	0%
30-35	3	11%
35-40	0	0%
40-45	3	11%
45-50	2	7%
50-55	0	0%

Mb=megabazės.

Hemizigotinių delecijų tarpe daugiausiai vyravo aberacijos 100–500 Kb (17 %) ir 1–2 Mb (13 %) intervaluose (4 lentelė). Tarp homozigotinių delecijų daugiausiai pasitaikė 100–500 Kb aberacijų (54 %) (5 lentelė). Homozigotinių delecijų nenustatyta aukščiau 3 Mb ribos.

4 lentelė. Hemizigotinių delecijų pasiskirstymas pagal dydį intervaluose

Aberacijų dydis, Mb	Aberacijų skaičius	Dažnis
≤0.1	4	5%
0.1-0.5	13	17%
0.5-1	7	9%
1-2	10	13%
2-3	8	11%
3-4	7	9%
4-5	1	1%

5-10	7	9%
10-15	1	1%
15-20	5	7%
20-25	3	4%
25-30	3	4%
30-35	0	0%
35-40	3	4%
40-45	0	0%
45-50	0	0%
50-55	1	1%

Mb=megabazės.

5 lentelė. Homozigotinių delecijų pasiskirstymas pagal dydį intervaluose

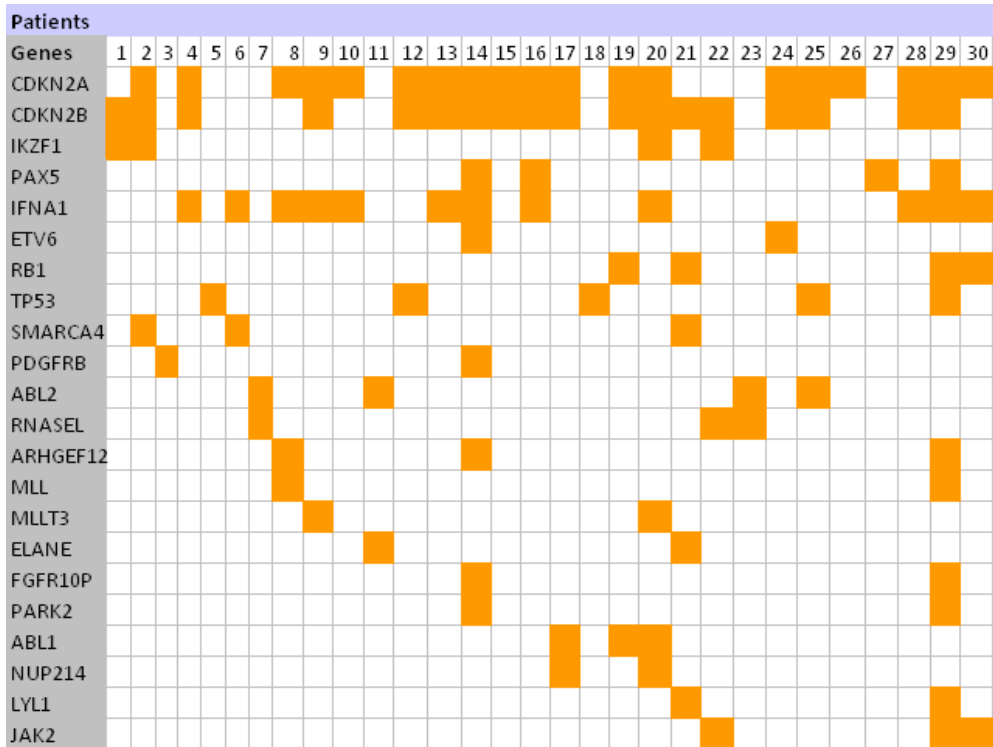
Aberacijų dydis, Mb	Aberacijų skaičius	Dažnis
≤0.1	3	14%
0.1-0.5	11	52%
0.5-1	1	5%
1-2	2	10%
2-3	3	14%
3-4	0	0%
4-5	0	0%
5-10	0	0%
10-15	0	0%
15-20	0	0%
20-25	1	5%
25-30	0	0%
30-35	0	0%
35-40	0	0%
40-45	0	0%
45-50	0	0%
50-55	0	0%

Mb=megabazės.

Pasikartojančios genominės aberacijos ir su leukemija susiję genai

MK analizė leido nustatyti 98 genomo regiono vietas, kuriose buvo rastos pasikartojančios aberacijos. Į šias pasikartojančias aberacijas pateko keletas su leukemija susijusių genų: *CDKN2A* (19 atvejų, 29 %), *CDKN2B* (18, 27 %), *MLL*

(2, 3 %), *IKZF1* (4, 6 %), *PAX5* (4, 6 %), *RB1* (4, 6 %), *TP53* (5, 7 %) ir *ETV6* (2, 3 %). Išdėsius pasikartojančias aberacijas pagal pacientus, nustatyta, kad dauguma aberacijų persidengia, tai leidžia kelti hipotezę apie genominių aberacijų ir jų onkogeninių bei biologinių kelių persidengimą ŪLL leukemogenezėje (11 pav.).



11 pav. Pasikartojančios aberacijos ir genai, lokalizuoti jose, suaugusiųjų ŪLL grupėje

MK analizė leido nustatyti keletą naujų pasikartojančių aberacijų, į kurias patenka galimai su ŪLL leukemogeneze susiję genai: *SMARCA4* 19p13.2 regione (450 Kb–12 Mb aberacijos) (3 atvejai, 4 %), *RNASEL* 1q25.3 regione (1,2–5 Mb) (3 atvejai, 4 %), *ARHGEF12* 11q23.3 regione (100 Kb–10 Mb) ir *LYL1* 19p13.2 regione (100 Kb–1 Mb (2 atvejai, 3 %). Buvo palygintas pasikartojančių aberacijų spektras B ir T-ŪLL grupėse (6 lentelė).

6 lentelė. Pasikartojančių aberacijų tipai B ir T-ŪLL

Aberacijos tipas	T-ŪLL atvejai, n (%)	B-ŪLL atvejai, n (%)
Hemizigotinės delecijos	15 (60)	24 (59)
Homozigotinės delecijos	5 (20)	10 (24)
Duplikacijos amplifikacijos	12 (48)	18 (44)
<i>Dažniausiai pasikartojančios aberacijos pagal chromosomos sritį</i>		
Chr 9p	7 (28)	15 (37)
Chr 6q	3 (12)	9 (22)
Chr 13q	1(4)	4(10)
Chr 17	3 (12)	9 (22)
<i>Pasikartojančios aberacijos/genai</i>		
<i>CDKN2A/B</i> delecija	7 (28)	12 (29)
<i>IKZF1</i> delecija	0 (0)	4 (10)
<i>PAX5</i> delecija	1 (4)	3 (7)
<i>TP53</i> delecija	1 (4)	4 (10)
<i>MLL</i> delecija	1 (4)	1 (2)
<i>RBI</i> delecija	1 (4)	3 (7)
<i>ETV6</i> delecija	0(0)	2(5)

Chr=chromosoma.

3.3. *TP53* geno mutacijos suaugusiųjų ŪLL grupėje

TP53 geno mutacija buvo nustatyta 3 iš 66 suaugusiųjų ŪLL pacientų (4,5 %). Iš šių trijų atvejų viena mutacija buvo taškinė (c.658 T>A; Tyr220Asn;), o kitos kompleksinės, viena taškinė mutacija su delecija (c.764T>C; p.Ile255Thr; c.764-766 TCAdel; Thr256del), kita – taškinė mutacija su duplikacija (c.376-457dup; p.Thr126_Pro152dup; Pro153Leu fs180X). Visos trys mutacijos buvo nustatytos 5, 6 ir 7 egzonuose. Iš šių atvejų su *TP53* mutacijomis vienam pacientui MK nustatytas kompleksinis kariotipas, kitam pacientui kompleksinis kariotipas su 17p srities hemizigotine delecija (apima *TP53* geną), o trečias pacientas turėjo hipodiploidinį kariotipą, kuriame buvo 17-tos chromosomos monosomija (7 lentelė).

7 lentelė. *TP53* geno mutacijų ir chromosominių aberacijų sąsaja suaugusiųjų ŪLL

Paciento nr.	<i>TP53</i> geno mutacijos	<i>TP53</i> geno lokuso chromosominiai pokyčiai
1	c.658 T>A; Tyr220Asn	Kompleksinis kariotipas
2	c.764T>C; p.Ile255Thr; c.764-766 TCA del; Thr256del	Kompleksinis kariotipas su 17p delecija (apima <i>TP53</i>)
3	c.376-457dup; p.Thr126_Pro152dup; Pro153Leu fs180X	Hipodiploidinis kariotipas su 17- tos chromosomos monosomija

3.4. Statistinė analizė: koreliacija su klinikiniais duomenimis, IBLP ir BI tyrimų rezultatai

Medianinis suaugusiųjų ŪLL pacientų stebėjimo laikas buvo 18 mėnesių (intervalo ribos 0–74 mėn.). Per šį laikotarpį buvo fiksuoti du atsparios ligos atvejai, 14 ligos atkryčių, 18 mirčių. Vidutinis IBLP ir BI buvo atitinkamai 21 (95 % PI: 5–37) ir 33 (95 % PI: 19–47) mėnesiai. Univariacinėje analizėje buvo nustatyta asociacija tarp trumpesnio IBLP ir didesnio pacientų amžiaus, aberacijų 13-toje chromosomoje ir *CDKN2AB* nedeletuoto geno. Aberacijos 13-toje chromosomoje ir nedeletuotas *CDKN2AB* genas buvo reikšmingi rizikos veiksniai IBLP multivariacinėje analizėje. Vienintelis predikcijos veiksnys trumpesniai BI buvo didesnis suaugusiųjų ŪLL pacientų amžius.

Buvo atlikta multivariacinė analizė atskirai B ir T-ŪLL grupėse. B-ŪLL trumpesniai IBLP reikšmingą įtaką turėjo didesnis pacientų amžius, aberacijos 13-toje ir 14-toje chromosomose. BI rizikos veiksniai buvo nustatyti šie: didesnis pacientų amžius, aberacijos 3- ioje ir 14-toje chromosomose bei *RBI* geno delecija. Nebuvo nustatyta nė vieno rizikos veiksnio IBLP ir BI T-ŪLL grupėje (8 lentelė).

8 lentelė. IBLP ir BI Cox regresijos analizė suaugusiųjų ŪLL grupėje

Faktorius	Univariacinė analizė			Multivariacinė analizė		
	Rizikos santykis		p reikšmė	Rizikos santykis		p reikšmė
	Įvertis	95% PI		Įvertis	95% PI	
Visi ŪLL pacientai						
Bendras išgyvenamumas						
Vyresnis amžius, metai	1.024	1.001-1.047	0.040	1.024	1.001-1.047	0.040
Aberacijos chr13	2.041	0.915-4.553	0.082	-		
Nedeletuotas <i>CDKN2AB</i>	2.434	0.997-5.944	0.051	-		

Išgyvenamumas be ligos progresijos						
Vyresnis amžius, metai	1.026	1.004-1.049	0.022	n.s.		
Aberacijos chr13	2.498	1.163-5.363	0.019	3.017	1.388-6.556	0.005
Nedeletuotas <i>CDKN2A</i> B genas	2.607	1.075-6.324	0.034	3.034	1.236-7.451	0.015
B-ŪLL pacientai						
Bendras išgyvenamumas						
Vyresnis amžius, metai	1.048	1.019-1.078	0.001	1.078	1.041-1.116	<.001
Aberacijos chr3	3.760	1.218-11.602	0.021	5.349	1.248-22.926	0.024
Aberacijos chr5	3.290	1.178-9.195	0.023	n.s.		
Aberacijos chr13	3.415	1.332-8.751	0.011	n.s.		
Aberacijos chr14	3.103	1.107-8.702	0.031	4.659	1.227-17.687	0.024
Deletuotas <i>RBI</i> genas	3.491	1.004-12.141	0.049	10.699	2.332-49.087	0.002
Išgyvenamumas be ligos progresijos						
Vyresnis amžius, metai	1.050	1.021-1.079	0.001	1.073	1.038-1.110	<.001
Aberacijos chr3	3.582	1.180-10.873	0.024	n.s.		
Aberacijos chr5	3.220	1.173-8.838	0.023	n.s.		
Aberacijos chr13	4.697	1.906-11.572	0.001	8.912	2.991-26.559	<.001
Aberacijos chr14	2.920	1.053-8.098	0.040	3.781	1.242-11.509	0.019
Deletuotas <i>RBI</i> genas	3.215	0.941-10.984	0.062	-		

3.5. Genominės kloninės evoliucijos rezultatai

Kaip paminėta metodikos skyriuje, kloninės genominės evoliucijos įvertinimas buvo iš dviejų dalių: pirmiausia įvertinta ŪLL diagnostinių ir ligos atkryčio mėginių chromosominių pokyčių kloninė evoliucija ir kloninė evoliucija analizuojant mutacijų spektrą, pasinaudojant VULSK MMS duomenų baze. Vėliau dviejų skirtingų tipų duomenys buvo palyginti (9 lentelė). MK ištyrus 16 pacientų, kuriems buvo ligos atkrytis, mėginių, dviem pacientams nebuvo nustatyta nė

vienos chromosominės aberacijos ar HP (pacientai Nr. 4, 8). Šiuose mėginiuose buvo per didelė normalių ląstelių koncentracija (blastų kiekis 0,5–1,5 %), todėl vertinti šių mėginių chromosominių aberacijų evoliuciją yra neinformatyvu. Vienam pacientui (Nr. 5) chromosominės aberacijos nebuvo vertinamos, nes ligos atkrytis buvo užfiksuotas limfmazgyje, o kaulų čiulpuose blastų kiekis buvo normalus.

9 lentelė. ŪLL pacientų kloninė evoliucija chromosominių aberacijų ir genominių mutacijų lygmeniu (pasikartojančios aberacijos / mutacijos – paryškintos).

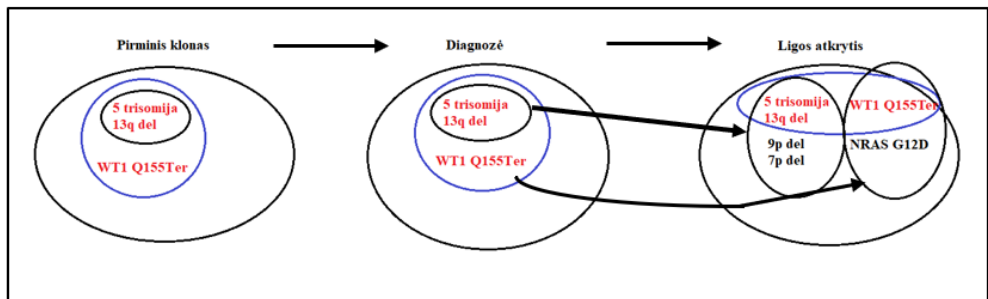
Paciento Nr.	Chromosominės aberacijos diagnozės metu	Chromosominės aberacijos ligos atkryčio metu	Chromosominių aberacijų evoliucijos statusas	Genų variantai diagnozės metu	Genų variantai ligos atkryčio metu	Genų variantų evoliucijos statusas
1	5 trisomija	5 trisomija 9p del (<i>CDKN2AB</i> , <i>PAX5</i>) 3q del 12p del 17p del (<i>TP53</i>)	Kloninė evoliucija	<i>NRAS</i> G12D <i>TALI</i> Y174H	nenustatyta	nevertinama
2	9p del (<i>CDKN2AB</i> , <i>PAX5</i>)	9p del (<i>CDKN2AB</i> , <i>PAX5</i>)	Identiški klonai	<i>PAX5</i> D193Ter <i>NRAS</i> G12D	nenustatyta	nevertinama
3	5 trisomija 13q del	5 trisomija 13q del 9p del (<i>CDKN2AB</i> , <i>PAX5</i>) 7p del (<i>IKZF1</i>)	Kloninė evoliucija	<i>WT1</i> Q155Ter	<i>WT1</i> Q155Ter <i>NRAS</i> G12D	Kloninė evoliucija
4	normalus kariotipas	normalus kariotipas	nevertinama	<i>KRAS</i> G12R <i>KMT2A</i> R420Q	nenustatyta	nevertinama
5	hiperdiploidija	neatlikta (ligos atkrytis limfmazgiuose)	nevertinama	<i>JAK2</i> R1063H <i>CBL</i> L272FX	<i>JAK2</i> R1063H <i>KRAS</i> L52P	Evoliucija iš klonų pirtako
6	1p del 8q del 2q del 12p del (<i>ETV6</i>)	1p del 8q del 9p HP (<i>CDKN2A</i> , <i>PAX5</i>) 8q dup	Evoliucija iš klonų pirtako	<i>NRAS</i> G12D <i>JAK2</i> R122H <i>FLT3</i> V94M	<i>NRAS</i> G12D <i>JAK2</i> R122H <i>FLT3</i> V94M <i>TP53</i> R282P	Kloninė evoliucija
7	7p del (<i>IKZF1</i>)	7p del (<i>IKZF1</i>) 9p del (<i>CDKN2AB</i> , <i>PAX5</i>) 8q del 16q del	Kloninė evoliucija	<i>SETD2</i> I1960M <i>NUP98</i> R1052L <i>ETV6</i> R291S	<i>SETD2</i> I1960Met <i>NUP98</i> R1052L <i>ZNF384</i> D220dup	Evoliucija iš klonų pirtako
8	normalus kariotipas	normalus kariotipas	nevertinama	<i>NRAS</i> G13R <i>FLT3</i> D835Y <i>IL7R</i> I258F	<i>NRAS</i> G13R <i>FLT3</i> D835Y <i>IL7R</i> I258F <i>WT1</i> H465N	Kloninė evoliucija
9	9p HP (<i>CDKN2AB</i> , <i>PAX5</i>) 8q del 12q del (<i>BTGI</i> , <i>PTPN11</i>)	9p HP (<i>CDKN2AB</i> , <i>PAX5</i>) 8q del 12q del (<i>BTGI</i> , <i>PTPN11</i>) +21, +X	Kloninė evoliucija	<i>KRAS</i> G12D <i>ABL1</i> G1079C <i>JAK2</i> R683G <i>PAX5</i> Q71Ter	<i>NRAS</i> Q61K <i>ABL1</i> G1079C <i>KRAS</i> G12V <i>KRAS</i> G12C <i>EBF1</i> S238Y	Evoliucija iš klonų pirtako
10	3q del 6q del 9p del homozigotinė	6q del 13q del 14q dup	Evoliucija iš klonų pirtako	neatlikta	neatlikta	nevertinama

	(<i>CDKN2AB</i>) 13q del 14q dup					
11	6q del 17p del +21 trisomija	7q dup +21 trisomija	Evoliucija iš klonų pirmtako	neatlikta NKS, <i>TP53 P152dup</i> <i>TP53 P153L</i> <i>fs180X</i>	neatlikta NKS, <i>TP53 P152dup</i> <i>TP53 P153L</i> <i>fs180X</i>	Identiški klonai
12	hiperdiploidija	hiperdiploidija	Identiški klonai	neatlikta	neatlikta	nevertinama
13	+10	+10	Identiški klonai	neatlikta	neatlikta	nevertinama
14	13q del	13q del	Identiški klonai	neatlikta	neatlikta	nevertinama
15	9p del (<i>CDKN2AB</i>)	3q dup 9p del (<i>CDKN2AB</i>)	Kloninė evoliucija	neatlikta	neatlikta	nevertinama
16	7p del	7p del 9p dup	Kloninė evoliucija	neatlikta	neatlikta	nevertinama

Iš analizei tinkamų 13 suaugusiųjų ŪLL pacientų keturiems (31 %) buvo nustatyti identiški chromosominių aberacijų klonai diagnostiniame ir ligos atkryčio mėginyje, šešiams (46 %) nustatyta kloninė evoliucija, o trims (23 %) – evoliucija iš klonų pirmtako. Diagnozės metu nustatytų chromosominių aberacijų vidurkis buvo 3,1 aberacijos / pacientui (intervalo ribos 1–8 aberacijos), o ligos atkryčio metu – 3,3 (intervalo ribos 1–8 aberacijos). Diagnozės metu 54 % pacientų turėjo delecijas/HP/duplikacijas, kurios apėmė su leukemija susijusius genus *CDKN2AB*, *PAX5*, *IKZF1*, *ETV6*, *BTG1*, *PTPN11*. Ligos atkryčio metu toks pat kiekis pacientų turėjo delecijas/HP/duplikacijas, kurios apėmė šiuos su leukemija susijusius genus: *TP53*, *CDKN2AB*, *PAX5*, *IKZF1*, *BTG1*, *PTPN11*. Ligos atkryčio metu labiausiai aberacijų paveikti buvo *CDKN2AB* ir *PAX5* genai.

Analizuojant NKS mutacijų duomenis genomines evoliucijos kryptių santykis skyrėsi lyginant su chromosominių aberacijų evoliucijos kryptimis. NKS duomenų bazėje mutacijų rezultatai buvo fiksuoti 10 suaugusiųjų ŪLL pacientų. Iš jų trims pacientams kloninės evoliucijos kryptis nevertinta, nes ligos atkryčio mėginyje nebuvo nustatyta nė vienos genomines mutacijos. Analizei tinkamų pacientų evoliucinės kryptys pasiskirstė taip: identiški mutacijų klonai diagnozės ir ligos atkryčio mėginiuose buvo nustatyti vienam pacientui (14 %), kloninė evoliucija – trims (43 %) (12 pav.), evoliucija iš klonų pirmtako – trims pacientams (43 %). Diagnozės metu 85 % pacientų buvo nustatytos mutacijos su leukemija susijusiuose genuose *TP53*, *KRAS*, *NRAS*, *ABL1*, *JAK2*, *FLT3*, *SETD2*, *NUP98*, *ETV6*, *IL7R*, *CBL*. Ligos atkryčio metu genomines mutacijos buvo nustatytos 100 % atvejų *WT1*, *EBF1*, *ZNF384*, *TP53*, *KRAS*, *NRAS*, *ABL1*, *JAK2*, *FLT3*, *SETD2*,

NUP98, *ETV6*, *IL7R*, *CBL* genuose. Ligos atkryčio metu mutacijos dažniausiai buvo nustatomos RAS biologinio kelio genuose – *NRAS* ir *KRAS*.



12 pav. Kloninės evoliucijos pavyzdys chromosominiu ir mutacijų lygmeniu (pacientas Nr. 3) (juodu ir mėlynu apskritimu pažymėti bendri klonai).

4. TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS

Atlikus suaugusiųjų ŪLL MK tyrimą chromosominių aberacijų nustatyta 82 % atvejų, vidutiniškai 3,56 aberacijos atvejui. Nustatytas aberacijų dažnis buvo kaip ir kitose studijose ir viršijo 80 % ribą. Vis dėlto nustatytų aberacijų vidurkis pacientui buvo mažiausias iš visų atliktų studijų, o nuo vienos studijos skyrėsi net 2,2 karto. Niekur dar nebuvo pabandyta pažiūrėti aberacijų pasiskirstymą pagal dydį. Lyginant visas aberacijas, daugiausiai buvo nustatyta 100–500 Kb (14 %) ir 5–10 Mb aberacijų. Iš duplikacijų / amplifikacijų daugiausia buvo 5–10 Mb (22 %), hemizigotinių delecijų – 100–500 Kb (17 %) ir 1–2 Mb (13 %), o homozigotinių – 100–500 Kb (52 %) dydžio aberacijų. Pagal nustatytų aberacijų tipą mūsų MK tyrimas nustatė beveik lygų skaičių hemizigotinių delecijų ir duplikacijų / amplifikacijų, o kitos penkios suaugusiųjų ŪLL studijos identifikavo kur kas daugiau hemizigotinių delecijų negu duplikacijų / amplifikacijų (Paulsson et al., 2008; Okamoto et al., 2010; Safavi et al., 2014; Mühlbacher et al., 2016; Forero-Castro et al., 2016). Tiesa, viena studija nediferencijavo atskirai delecijų į hemizigotines / homozigotines, tačiau delecijų aptikta vis tiek daugiau negu duplikacijų / amplifikacijų (Mühlbacher et al., 2016). Tiek mūsų atliktoje analizėje, tiek ir kitų penkių studijų dažniausiai nustatytos aberacijos buvo 9p chromosomos srityje, o antros pagal dažnumą aberacijos – 6q chromosomos srityje (Paulsson et al., 2008; Okamoto et al., 2010; Safavi et al., 2014; Mühlbacher et al., 2016; Forero-Castro et al., 2016). Vis dėlto vienoje studijoje daugiau buvo nustatyta aberacijų 7p srityje negu 6q (Castro et al., 2016) (10 lentelė).

10 lentelė. Visų suaugusiųjų ŪLL MK studijų palyginimas

	Paulsson et al. 2008	Okamoto et al. 2010	Safavi et al. 2015	Dirse et al. 2015	Forero-Castro et al., 2016	Mühlbacher et al., 2016
Pacientų skaičius	45	75	126	66	123	174
Aberacijų vidurkis atvejui	6	7,6	5,4	3,5	8	5,8
Nustatytų aberacijų dažnis	43/45 (95%)	69/75 (92%)	126/126 (100%)	54/66 (82%)	108/123 (87%)	140/174 (80%)

Hemizigotinės delecijos	211	349	381	86	-	346
Homozigotinės delecijos	48	19	73	21	-	
Duplikacijos/ amplifikacijos	93	169	238	85	-	170
Chromosomų sritys su daugiausiai aberacijų	9p ir 6q	9p ir 6q	9p	9p ir 6q	9p ir 7p	9p ir 6q
Dažniausi aberantiniai genai	<i>CDKN2AB</i>	<i>CDKN2AB</i>	<i>CDKN2AB</i>	<i>CDKN2AB</i>	<i>CDKN2AB</i>	<i>CDKN2AB</i>
Nauji genai kandidatai	<i>DLG2</i> <i>LDOC1</i> <i>CDH13</i>	<i>PTPRD</i> <i>PIK3AP1</i> <i>AKT1/2</i> <i>FOXO3</i> <i>BTG1</i>	<i>BCAT1SE</i> <i>RP2BTLA</i> <i>NR3C1</i> <i>PIK3AP1</i>	<i>SMARCA4</i> <i>ARHGEF12</i> <i>LYL1</i> <i>RNASEL</i>	<i>TBL1XR1</i>	<i>KCNJ15</i>

11 lentelė. Dažniausi aberantiniai genai visose suaugusiųjų ŪLL studijose

Dažniausi aberantiniai genai	Paulsson et al. 2008	Okamoto et al. 2010	Safavi et al. 2015	Dirse et al. 2015	Forero- Castro et al. 2016	Mühlbacher et al. 2016
<i>CDKN2AB</i>	21 (47%)	23 (31%)	39 (31%)	19 (19%)	58 (53%)	58 (41%)
<i>PAX5</i>	15 (33%)	15 (20%)	18 (14%)	4 (4%)	-	-
<i>RBI</i>	5 (11%)	7 (9%)	9(7%)	4 (4%)	-	20 (14%)
<i>IKZF1</i>	8 (18%)	9 (12%)	32(25%)	4 (4%)	58 (53%)	12 (9%)
<i>EBF1</i>	2 (4.4%)	5 (7%)	7 (6%)	0 (0%)	28 (26%)	7 (5%)
<i>ETV6</i>	7 (16%)	5 (7%)	12 (10%)	2 (2%)	9 (8%)	14 (10%)

Dažniausiai deletuotas / duplikuotas genas visose šešiose studijose buvo *CDKN2AB*, tačiau mūsų studijoje šio geno aberacijų dažnis buvo mažiausias iš visų. Mūsų atlikto MK tyrimo didžiausi skirtumai nuo kitų penkių studijų atsiskleidžia lyginant ir kitus dažniausius aberantinius genus. Vieno svarbiausių

ŪLL leukemogenezėje *PAX5* geno aberacijų dažnis mūsų studijoje buvo identifikuotas tik 4 % pacientų, o kitų studijų jis buvo nustatomas santykinai didesnis (14–33 %). Įdomus pastebėti, kad vaikų ŪLL grupėje šio geno aberacijos taip pat didelės (31,7 %) (Inaba et al., 2013). Mažesniu dažniu nustatytos ir kitos pasikartojančios aberacijos, kurios apima *IKZF1* (4 %), *ETV6* (2 %), *EBF1* (0 %). Palyginus matyti aiškus skirtumas, Forero-Castro su bendraautoriais nustatė beveik kelis kartus daugiau *IKZF1* ir *EBF1* genų aberacijų negu visos kitos suaugusiųjų ŪLL MK studijos (11 lentelė).

Prieš tai aprašytų aberacijų dažnių skirtumą būtų galima paaiškinti tuo, jog tirtos skirtingų populiacijų suaugusiųjų ŪLL grupės: Švedijos, Japonijos, Lietuvos, Ispanijos, Vokietijos. Iš analizės matoma, kad labiausiai savo aberacijų dažniu išsiskiria Lietuvos ir Ispanijos suaugusiųjų ŪLL populiacijos. Reikėtų pasakyti, kad mūsų tiriamųjų grupėje buvo atrinkti visi žinomi suaugusiųjų ŪLL pacientai, kurie registruoti Lietuvoje 2007–2013 m., todėl daroma prielaida, kad šis MK tyrimas geriausiai gali atspindėti populiacinį šalies ŪLL genominių aberacijų dažnį. Analizės metu buvo atsižvelgta ir į visų penkių studijų naudotą MK skiriamąją gebą. Skiriamoji MK metodo geba varijuoja priklausomai nuo mikrogardeles dengiančių žymenų, o jų skaičius tarp studijų varijuoja – mažiausiu žymenų skaičiumi pasižymėjo Forero-Castro ir bendraautorių grupė (135 tūkst. žymenų), paskui Mühlbacher (270 tūkst. žymenų), Paulsson ir Okamoto (po 510 tūkst. žymenų) bei Safavi (700 tūkst. – 1 mln. žymenų) tyrėjų grupės. Nors MK metodų skiriamoji geba ir skirtinga, tačiau nuo to priklausančių aberacijų dažnio dydžio tendencijų nepastebėta. Pavyzdžiui, nors Safavi su autoriais naudojo didžiausios skiriamosios gebos MK ir nustatė daugiausiai aberacijų iš visų grupių, tačiau, palyginę *IKZF1* ir *EBF1* genų delecijų dažnius, matome, kad Forero-Castro su bendraautoriais, turėdami mažiausios skiriamosios gebos MK, šių genų delecijas nustatė didesniu dažniu negu kitos grupės.

Palyginus aberacijų spektrą tarp B ir T-ŪLL, matoma, kad aberacijos pagal tipą tarp šių grupių pasiskirsto tolygiai, taip pat ir aberantinis *CDKN2A* genas, tačiau pasikartojančios aberacijos yra dažnesnės tarp B-ŪLL pacientų.

TP53 geno analizė mutacijas nustatė 4,5 % suaugusiųjų ŪLL pacientų. Analogiška studija suaugusiems ŪLL pacientams *TP53* geno mutacijas nustatė didesniu dažniu – 8 % (Chiaretti et al., 2013). Mūsų tirtoje grupėje pastebėtos tendencijos ir asociacijos tarp *TP53* geno mutacijų ir chromosominių aberacijų. Kaip minėta rezultatuose, vienas ŪLL pacientas turėjo abu genetinius pokyčius: *TP53* geno mutaciją ir 17p srities deleciją, kuri apima kitą *TP53* geno kopiją, taip netenkama abiejų geno kopijų. Kitas pacientas, be *TP53* mutacijos, turėjo didelę hipodiploidiją su 17-tos chromosomos monosomija, kas automatiškai sutrikdo abi *TP53* geno kopijas. Ištyrus 124 vaikų ŪLL hipodiploidinius atvejus, nustatyta, kad

net 91,2 % mažos hipodiploidijos atvejų turėjo *TP53* geno mutacijas (Holmfeldt et al., 2013). Analogiška studija suaugusiųjų ŪLL grupėje taip pat identifikavo, kad 90,9 % mažos hipodiploidijos atvejų turi *TP53* geno mutacijas. Mūsų atlikta *TP53* mutacijų ir MK analizė leidžia kelti hipotezę, kad *TP53* mutacijos gali būti svarbios ŪLL patogenezėje esant tiek mažai, tiek didelei hipodiploidijai.

MK tyrimas suaugusiųjų ŪLL grupėje nustatė pasikartojančias aberacijas, kurios apėmė naujus, galimai su ŪLL leukemogeneze susijusius genus, jie galėtų būti potencialūs nauji šio ligos patogenezės mechanizmo kandidatai. Trimis atvejais buvo pasikartojančios delecijos, kurios apėmė *SMARCA4* geną. Šio geno koduojamas baltymas yra nuo ATP priklausomo chromatino remodeliavimo SNF/SWI komplekso dalis. Šis kompleksas aktyvina transkripciją tų genų, kurie normalios būsenos yra slopinami chromatino. *SMARCA4* geno delecija gali sutrikdyti SNF/SWI komplekso funkciją ir turėti leukemogeninį poveikį. Taip pat šis kompleksas yra reikalingas gliukokortikoidų transkripcijai aktyvinti. Atsparumas gliukokortikoidams yra svarbus blogos prognozės žymuo naujai diagnozuotiems ŪLL pacientams, tad SNF/SWI komplekso funkcijų sutrikdymas gali būti kliniškai reikšmingas (Pottier et al., 2008). Eksperimentiniai pelių modeliai su mutuotu *SMARCA4* genu parodė, kad yra sutrikdomos eritroidinės ir limfoidinės kilmės ląstelių linijos, o mieloidinės kilmės šios linijos išliko nepakitusios (Shi et al., 2013). Taip pat pastebėta *SMARCA4* geno svarba T ląstelių diferenciacijai. Sutrikdžius šio geno veiklą yra išbalansuojama DN ląstelių stadija, kurioje vos pastebimai vyksta CD4+ raiška ir, nebeperėjus į DT stadiją, prarandamos Tląstelės (Chi et al., 2003).

Trims pacientams nutatytos pasikartojančios aberacijos, kurios apima *ARHGEF12* geną. Geno koduojamas baltymas formuoja kompleksą su G baltymais ir aktyvina nuo RhoA veiksnio priklausomus signalus. Šis baltymas taip pat buvo identifiкуotas kaip vienas iš translokacijos partnerių ŪML (Pottier et al., 2008). Genas *ARHGEF12* buvo nustatytas kaip translokacijos t(7;11) partneris vaikų ŪLL (Pope et al., 2005). Atlikus detalų *MLL* geno translokacijų tyrimą taip pat nustatyta, kad *ARHGEF12* genas kaip translokacijos partneris dalyvauja ūminėse leukemijose (Meyer et al., 2018).

Du pacientai turėjo deletuotą *LYLI* geną, kuris glaudžiai dalyvauja kraujagyslių formavime ir hematopoezėje (Pope et al., 2005). Nustatyta translokacija, kurioje buvo susilieję *LYLI* genas ir T ląstelių receptorių β lokusas. Buvo iškelta šio geno onkogeninio potencialo hipotezė T-ŪLL patogenezėje (Keersmaecker et al., 2005). Mūsų studijoje abu pacientai su *LYLI* geno delecija buvo T-ŪLL. Genų raiškos analizė patvirtino, kad ne tik *LYLI* geno translokacijos, bet ir kiti genominiai mechanizmai transkripcijos lygiu turi įtakos T-ŪLL. Iš 62 T-ŪLL atvejų, kurie neturėjo jokių translokacijų (tarp jų ir *LYLI* geno), 41 turėjo sutrikdytą *LYLI*,

TAL1/2, *LMO1/2*, *TLX1/ TLX3*, *HOXA*, *NKX2-1* genų raišką, manoma, dėl struktūrinių genominių pokyčių (Chen et al., 2018).

Trims ŪLL pacientams buvo nustatyta *RNASEL* geno delecija. Šis genas koduoja endoribonukleazę, kuri dalyvauja nuo interferono priklausančiuose priešuždegiminiuose ir priešvėžiniuose procesuose, ir pirmą kartą buvo identifikuotas kaip prostatos vėžio genas kandidatas (Dong et al., 2008). Eksperimentai su lėtinės mieloleukemijos (LML) ląstelių linijomis (K562) parodė, kad *RNASEL* ir jo sąveikai su miRNR būdinga leukeminių ląstelių proliferacija ir augimo inhibicija. Tai leidžia naujas prielaidas, kad šis genas gali atlikti svarbią funkciją LML ir potencialiai kitų hematologinių ligų patogenezėje (Lee et al., 2013).

Atlikus IBLP ir BI analizę nustatyta, kad labiausiai išsiskiriantys ir turintys įtakos veiksniai yra pacientų amžius, *CDKN2AB* geno statusas, aberacijos 3-ioje, 13-toje, 14-toje chromosomose, *RBI* geno delecija. Šiuo atveju galima manyti, kad *RBI* geno, kuris lokalizuotas 13-toje chromosomoje, delecija ir aberacijos šioje chromosomoje gali turėti biologiniais mechanizmais pagrįstą ryšį. Ši asociacija gerai atsiskleidė studijoje, kur buvo bandyta analizuoti lėtinės limfocitų leukemijos pacientus, kurių dalis turėjo aberacijas tik 13-toje chromosomoje, o kita dalis – be aberacijų 13-toje chromosomoje, papildomai turėjo ir *RBI* geno deleciją. Blogesnė prognozė ir prastesnis atsakas į gydymą buvo pacientų, kurie turėjo 13-tos chromosomos ir kartu *RBI* geno delecijas, grupėje (Dal Bo et al., 2011). Nors *RBI* geno aberacijos nustatomos ir B, ir T-ŪLL, tačiau, kai kurių autorių manymu, šio geno, kuris yra atsakingas už ląstelės G1/S ciklo fazes, delecija gali turėti įtakos tik B-ŪLL diferenciacijai, bet ne T-ŪLL (Studniak et al., 2013). *RBI* geno delecija buvo validuota kaip blogos prognozės žymuo didelėje studijoje, tyrusioje 3239 B-ŪLL vaikų grupėje (Hamadeh et al., 2019). Mūsų imtyje *RBI* geno delecija nustatyta tik keturiems suaugusiems ŪLL pacientams, tad detalesnei suaugusiųjų ŪLL grupės prognostinei analizei reikia didesnės pacientų imties.

Remiantis prognostine analize nustatyta, kad nedeletuotas *CDKN2AB* geno statusas turėjo įtakos IBLP suaugusiųjų ŪLL grupėje. Vienos iš pirmųjų studijų, tyrusių *CDKN2AB* geno prognostinę reikšmę, buvo atliktos atitinkamai 227 ir 109 vaikų B-ŪLL atvejais. Galutinė analizė nustatė, kad šio geno delecija neturi įtakos IBLP ir BI tirtose grupėse (van Zutven et al., 2005; Mirebeau et al., 2006). *CDKN2AB* geno delecijos įtaka nebuvo parodyta studijoje, kur buvo tirti 54 ŪLL pacientai 10–25 metų amžiaus. Vis dėlto statistinė analizė ($P = 0,06$) parodė, kad šio geno deleciją turintys pacientai labiau priklauso blogos prognozės grupei (Usvasalo et al., 2008). Kitoje studijoje analogiškai tirta 61 vaikas ir 30 suaugusiųjų ŪLL pacientų. Nustatyta, kad *CDKN2AB* geno delecija buvo dažnesnė suaugusiųjų tarpe ir turėjo įtakos BI suaugusiųjų B-ŪLL (Kim et al., 2009). Buvo

atliktos dvi didelės studijos (1551 ir 3239 pacientai), vertinta įvairių genetinių veiksnių, tarp jų geno *CDKN2AB*, įtaka ir pronostinė reikšmė ŪLL. Abi studijos patvirtino, kad deletuotas *CDKN2AB* genas yra priskiriamas blogai prognostinei grupei. Taip pat pastebėta tendencija, kad esant *CDKN2AB* geno delecijai kartu su *ETV6* geno delecija, prognostinė vertė pasikeičia į geros prognozės (Moorman et al., 2014; Hamadeh et al., 2019). Atlikta 13 studijų metaanalizė leido nustatyti *CDKN2AB* geno deleciją kaip galimą blogos prognozės žymenį vaikų ir suaugusiųjų ŪLL, tačiau ne visos studijos tai patvirtina iki galo, todėl šio geno prognostinė reikšmė kontroversinė (Zhang et al., 2019). Šie rezultatai rodo, kad suaugusiųjų ŪLL grupėje reikalinga išsamesnė šio geno analizė, žinant, kad *CDKN2AB* dalyvauja ląstelės ciklo G1/S patikros taške *RBI* ir *TP53* biologiniuose keliuose. Lygiai taip pat svarbu įvertinti ne tik pavienes *CDKN2AB* geno delecijas, bet ir jų galimą sąsają su kitais leukemogenezėje dalyvaujančiais genais bei jų aberacijomis. Pavyzdžiui, kai delecija yra didesnė negu kelios megabazės, ji apima ne tik *CDKN2AB*, bet ir šalia esantį *MTAP*, kuris koduoja metiltioadenozino fosforilazę. Ląstelių modelis parodė, kad esant inaktyvintam *MTAP*, padidėja ląstelių jautrumas ŪLL gydyti vartojamam metotreksatui. Taip pat reiktų pasakyti, kad prognostinė *CDKN2AB* geno delecijos reikšmė gali priklausyti nuo delecijos pobūdžio: vienose studijose prognostiškai vertintos tik homozigotinės delecijos, o kitose ir homozigotinės, ir hemizigotinės. Kai kurių autorių teigimu, svarbu įvertinti ir *CDKN2AB* geno promotoriaus metilinimo statusą, nes tai gali turėti įtakos prognostinei geno reikšmei (Carrasco Salas et al., 2016).

Pirmame lietuvių atliktame suaugusiųjų ŪLL kloninės evoliucijos tyrime (Dirse et al., 2016) stebėtų kloninės evoliucijos krypčių santykis buvo vienodas – po 33 % visų trijų krypčių, tačiau disertacijoje išplėtus tiriamųjų skaičių (2013–2018 m. duomenys) šis santykis tapo toks: identiški pokyčiai diagnozės ir ligos atkryčio metu nustatyti keturiems (31 %), kloninė evoliucija – šešiams (46 %), evoliucija iš klonų pirmtako – trims (23 %) pacientams. Palyginti su analogiška suaugusiųjų ŪLL studija, nutatėme panašų identiškų pokyčių diagnozuojant ligą ir ligos atkryčio metu dažnį (31 % ir 27 %), beveik dvigubai didesnę kloninės evoliucijos dažnį (46 % ir 22 %) ir mažesnę dažnį su klonine evoliucija iš preleukeminio klonų (23 % ir 50 %) (Safavi et al., 2015). Visų trijų kloninės evoliucijos šakų skirtingas dažnis skirtingose studijose gali būti paaiškinamas besiskiriančiais atrenkamos tiriamųjų imties kriterijais, tačiau neatmestinas ir skirtingų populiacijų veiksnys. Šios analizės metu patvirtinome, kad skirtingos kloninės evoliucijos kryptys egzistuoja ir suaugusiųjų, ne tik vaikų ŪLL.

Pastebėta tendencija, kad ligos atkryčio metu kitaip nei diagnozuojant nustatyta daugiau *CDKN2AB/PAX5* genų delecijų. Šis faktas kartojosi ir lyginamojoje kitoje suaugusiųjų ŪLL studijoje (Safavi et al., 2015). *PAX5* geno koduojamas

transkripcijos veiksnys turi kritinę reikšmę ankstyvoje pro-B ląstelės stadijoje bei neigiama / teigiama reguliacija inhibuoja / aktyvina daugiau kaip 100 genų, susijusių su ląstelių adhezija, migracija, transkripcijos kontrole, receptorių signalinimu (Delogu et al., 2006). Šiuo atveju galime manyti, kad didesnis šio svarbaus transkripcijos veiksnio delecijos dažnis ligos atkryčio metu gali turėti įtakos ligos progresijai. *PAX5* geno hipotetinė reikšmė ŪLL galimai buvo ir pacientams Nr. 2 ir Nr. 9, kur diagnostiniuose mėginiuose yra įvykusios hemizigotinės *PAX5* geno delecijos, o ligos atkrytyje, be minėtų *PAX5* delecijų, nustatytos ir *PAX5* geno mutacijos. Tokiu atveju dėl šių genetinių įvykių galimai yra sutrikdomas abiejų geno kopijų funkcionalumas.

Bandant nagrinėti bendrą chromosominių aberacijų / mutacijų kloninę evoliuciją, pastebėta *CDKN2AB* geno ir *RAS* biologinio kelio genų asociacija ir galima įtaka ligos atkryčiui. *CDKN2AB* geno ir *NRAS/KRAS* genų asociacija ir galima patogeninė įtaka buvo pacientams Nr. 2 ir Nr. 9. Šiuo atveju galime manyti, kad nors abu genetiniai pokyčiai atsirado diagnozės metu, vis dėlto *CDKN2AB* dalyvauja kaip kiek vėlesnis, antrinis genetinis įvykis. Tai galima įžvelgti pacientui Nr. 6, kur *NRAS* geno mutacija nustatyta diagnozės metu, o *CDKN2AB* geno delecija jau kaip antrinis įvykis – ligos atkryčio metu. Panaši ir paciento Nr. 1 situacija, diagnozės metu nustatyta *NRAS* geno mutacija, o ligos atkrytyje, kaip antrinis genetinis įvykis, atsiranda geno *CDKN2AB* delecija. Pacientams Nr. 4 ir Nr. 8 diagnozės metu (Nr. 8 ir esant ligos atkryčiui) nustatytos *NRAS/KRAS* genų mutacijos, tačiau neidentifikuota *CDKN2AB* geno delecija. Tai hipotetiškai leidžia manyti, kad, be *RAS* kelio mutacijų, tikėtina, gali įvykti ir antrinis genetinis įvykis – *CDKN2AB* geno delecija. Šią teoriją remia neseniai atlikta studija, kur buvo sukonstruotos modelinės pelių linijos su *KRAS* geno mutacija bei *CDKN2AB* geno delecija ankstyvose B ląstelių vystymosi stadijose. Analizė parodė, kad šis dviejų genetinių įvykių derinys indukavo visišką leukemijų / limfomų fenotipą. Maža to, pelių analizė parodė, kad joms išsivysčiusi leukemija yra labai panaši į žmonėms būdingą agresyvų, didelės rizikos, chemoterapijai atsparų B-ŪLL subtipą (Sewastianik et al., 2017).

5. IŠVADOS

1. Atlikus MK tyrimo analizę suaugusiųjų ŪLL grupėje chromosominės aberacijos nustatytos 82 % (3,6 aberacijos atvejui) pacientų. Daugiausiai genominių aberacijų nustatyta 9p, 6q, 13q chromosomų srityse. Pagal aberacijų tipą nustatytas beveik lygus hemizigotinių delecijų (45 %) ir duplikacijų / amplifikacijų (44 %) santykis. Į nustatytas aberacijas dažniausiai pateko su leukemija susiję genai: *CDKN2A* (29 %), *CDKN2B* (27 %), *MLL* (2,3 %), *IKZF1* (4,6 %), *PAX5* (4,6 %), *RBI* (4,6 %), *TP53* (5,7 %) ir *ETV6* (2,3 %). Suaugusiųjų ŪLL grupėje buvo nustatytas mažesnis aberacijų vienam atvejui bei mažesnis aberantinių *CDKN2AB*, *PAX5*, *ETV6*, *IKZF1*, *EBF1*, *TP53* genų dažnis, palyginti su analogiškais kitų šalių suaugusiųjų ŪLL studijomis.
2. Nustatyti galimai nauji genai kandidatai susiję su ŪLL leukemogeneze – *ARHGEF12*, *LYLI*, *RNASEL*, *SMARCA4*. Nors *ARHGEF* genas yra nustatomas kaip translokacijos partneris ūminėse leukemijose, šio geno delecijos gali turėti įtakos suaugusiųjų ŪLL. *SMARCA4* geno koduojamas baltymas priklauso chromatinio remodeliavimo SNF/SWI kompleksui. Šio geno aberacijos gali sutrikdyti SNF/SWI komplekso veiklą ir sukelti atsparumą gliukokortikoidams sergant ŪLL. *LYLI* geno, kaip svarbaus hematopoezėje dalyvaujančio veiksnio, sutrikdymas pasireiškia T-ŪLL patogenezeje. *RNASEL* geno koduojama endoribonukleazė dalyvauja nuo interferono priklausančiuose priešūždegiminiuose, priešvėžiniuose procesuose ir pasižymi leukeminių ląstelių proliferacijos ir augimo inhibicija.
3. Suaugusiųjų ŪLL grupėje išgyvenamumui be ligos progresijos turėjo įtakos aberacijos 13-toje chromosomoje ir *CDKN2AB* nedeletuoto geno statusas, o bendram išgyvenamumui genetiniai pokyčiai nebuvo statistiškai reikšmingi. Atskirai B-ŪLL grupėje išgyvenamumui be ligos progresijos turėjo įtakos aberacijos 13-toje ir 14-toje chromosomose. O bendro išgyvenamumo genetiniai rizikos veiksniai buvo aberacijos 3-ioje ir 14-toje chromosomose bei *RBI* geno delecija.
4. Patvirtintos trys genominės evoliucijos kryptys tarp ligos diagnozės ir ligos atkryčio etapų: identiški pokyčiai diagnozės, kloninė evoliucija ir evoliucija iš klonų pirmtako. Atlikta chromosominių aberacijų ir mutacijų kloninės evoliucijos analizė pasiūlė galimą ryšį tarp ląstelės ciklo inhibitoriaus *CDKN2AB* geno bei *NRAS/KRAS* genų. Šių genų aberacijų dinamikos stebėseną galėtų leisti prognozuoti ligos eigą ir galimą progresiją.

6. LITERATŪRA

1. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 2011; 469: 356–361.
2. Ashley PN, Warren SA. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discov.* 2017 Feb 6; 3:17002.
3. Badar T, Kantarjian HM, O'Brien S, Garcia-Manero G, Jabbour E, Garris R, Pemmaraju N, Daver N, Ravandi F, Cortes J, Thomas DA. Clinical Outcome of De Novo Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) with 11q23/Mixed Lineage Leukemia (MLL) Gene Rearrangements. *Blood* 2014; 124: 5342.
4. Belver L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2016; 16(8): 494–507.
5. Bernt KM, Hunger SP. Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol.* 2014 Mar 25; 4: 54.
6. Bhojwani D, Pei D, Sandlund JT, Jeha S, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Shurtleff S, Onciu M, Cheng C, Coustan-Smith E, Bowman WP, Howard SC, Metzger ML, Inaba H, Leung W, Evans WE, Campana D, Relling MV, Pui CH. ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia.* 2012 Feb; 26(2): 265–270.
7. Byun JM1, Koh Y, Shin DY, Kim I, Yoon SS, Lee JO, Bang SM, Kim KH, Jung SH, Lee WS, Park Y, Jang JH, Han JJ, Yhim HY, Kim DS, Lee YJ, Lee H, Choi YS, Lee S; Korean Adult ALL Working Party, Korean Society of Hematology. BCR-ABL translocation as a favorable prognostic factor in elderly patients with acute lymphoblastic leukemia in the era of potent tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica.* 2017 May; 102(5): e187–e190.
8. Bokemeyer A, Eckert C, Meyr F, Koerner G, von Stackelberg A, Ullmann R, Türkmen S, Henze G, Seeger K. Copy number genome alterations are associated with treatment response and outcome in relapsed childhood ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2014 Apr; 99(4): 706–714.
9. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Haematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol.* 2006 Aug; 169(2): 338–346.

10. Bullinger L., Kronke J., Schon C., Radtke I., Urbauer K., Botzenhardt U., Gaidzik V., Cario A., Senger C., Schlenk R. F., et al. Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis. *Leukemia*. 2009; 24: 438–449.
11. Bungaro S, Dell’Orto MC, Zangrando A, Basso D, Gorletta T, Lo Nigro L et al. Integration of genomic and gene expression data of childhood ALL without known aberrations identifies subgroups with specific genetic hallmarks. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48: 22–38.
12. Burmeister T, Gökbuget N, Schwartz S, Fischer L, Hubert D, Sindram A, Hoelzer D, Thiel E. Clinical features and prognostic implications of TCF3-PBX1 and ETV6-RUNX1 in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2010 Feb; 95(2): 241–246.
13. .tas pats šaltinis keisis numeracija
14. Carrasco Salas P, Fernández L, Vela M, Bueno D, González B, Valentín J, Lapunzina P, Pérez-Martínez A. The role of CDKN2A/B deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2016 Oct – Nov; 33(7–8): 415–422.
15. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2013 Feb; 13(2): 118–132.
16. Chen B, Jiang L, Zhong ML, Li JF, Li BS, Peng LJ, Dai YT, Cui BW, Yan TQ, Zhang WN, Weng XQ, Xie YY, Lu J, Ren RB, Chen SN, Hu JD, Wu DP, Chen Z, Tang JY, Huang JY, Mi JQ, Chen SJ. Identification of fusion genes and characterization of transcriptome features in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jan 9; 115(2): 373–378.
17. Chessels JM, Swansbury GJ, Reeves B, Bailey CC, Richards SM. Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukaemia: results of MRC UKALL X. Medical Research Council Working Party in Childhood Leukaemia. *Br J Haematol*. 1997 Oct; 99(1): 93–100.
18. Chi TH, Wan M, Lee PP, Akashi K, Metzger D, Chambon P, Wilson CB, Crabtree GR. Sequential roles of Brg, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in thymocyte development. *Immunity*. 2003 Aug; 19(2): 169–182.
19. Chiaretti S, Brugnoletti F, Tavoraro S, Bonina S, Paoloni F, Marinelli M, Patten N, Bonifacio M, Kropp MG, Sica S, Guarini A, Foà R. TP53 mutations are frequent in adult acute lymphoblastic leukemia cases

- negative for recurrent fusion genes and correlate with poor response to induction therapy. *Haematologica*. 2013 May; 98(5): e59-61.
20. Chilton L, Buck G, Harrison CJ, Ketterling RP, Rowe JM, Tallman MS, Goldstone AH, Fielding AK, Moorman AV. High hyperdiploidy among adolescents and adults with acute lymphoblastic leukaemia (ALL): cytogenetic features, clinical characteristics and outcome. *Leukemia*. 2014 Jul; 28(7): 1511–1518.
 21. Clappier E, Grardel N, Bakkus M, Rapon J, De Moerloose B, Kastner P, Caye A, Vivent J, Costa V, Ferster A, Lutz P, Mazingue F, Millot F, Plantaz D, Plat G, Plouvier E, Poirée M, Sirvent N, Uyttebroeck A, Yakouben K, Girard S, Dastugue N, Suciu S, Benoit Y, Bertrand Y, Cavé H; European Organisation for Research and Treatment of Cancer, Children's Leukemia Group (EORTC-CLG). IKZF1 deletion is an independent prognostic marker in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, and distinguishes patients benefiting from pulses during maintenance therapy: results of the EORTC Children's Leukemia Group study 58951. *Leukemia*. 2015 Nov; 29(11): 2154–2161.
 22. Clark MR, Cooper AB, Wang LD, Aifantis I. The pre-B cell receptor in B cell development: recent advances, persistent questions and conserved mechanisms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 290: 87–103.
 23. Collins EC, Appert A, Ariza-McNaughton L, Pannell R, Yamada Y, Rabbitts TH. Mouse Af9 is a controller of embryo patterning, like Mll, whose human homologue fuses with Af9 after chromosomal translocation in leukemia. *Mol Cell Biol*. 2002 Oct; 22(20): 7313–7324.
 24. Dagdan E, Zaliova M, Dörge P, et al. The Strong Prognostic Effect of Concurrent Deletions of IKZF1 and PAX5, CDKN2A, CDKN2B or PAR1 in the Absence of ERG Deletions (IKZF1plus) in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Strongly Depends on Minimal Residual Disease Burden after Induction Treatment *Blood*. 2014; 124(21): 131.
 25. Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, Deambrogi C, Bertoni F, Del Giudice I, Palumbo G, Nanni M, Rinaldi A, Kwee I, Tissino E, Corradini G, Gozzetti A, Cencini E, Ladetto M, Coletta AM, Luciano F, Bulian P, Pozzato G, Laurenti L, Forconi F, Di Raimondo F, Marasca R, Del Poeta G, Gaidano G, Foà R, Guarini A, Gattei V. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Aug; 50(8): 633–643.
 26. De Keersmaecker K, Marynen P, Cools J. Genetic insights in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2005 Aug; 90(8): 1116–1127.

27. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol*. 2015 Mar; 15(3): 137–148.
28. Delogu, A., Schebesta, A., Sun, Q., Aschenbrenner, K., Perlot, T., and Busslinger, M. (2006). Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* 24: 269–281.
29. Dias S, Silva, JH, Cumano A, Vieira P. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J Exp Med*. 2005 Mar 21; 201(6): 971–979.
30. Ding LW, Sun QY, Tan KT, Chien W, Mayakonda A, Yeoh AEJ, Kawamata N, Nagata Y, Xiao JF, Loh XY, Lin DC, Garg M, Jiang YY, Xu L, Lim SL, Liu LZ, Madan V, Sanada M, Fernández LT, Hema Preethi SS, Lill M, Kantarjian HM, Kornblau SM, Miyano S, Liang DC, Ogawa S, Shih LY, Yang H, Koeffler HP. Mutational Landscape of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res*. 2017 Jan 15; 77(2): 390–400.
31. Dirse V, Bertasiute A, Gineikiene E, Zvirblis T, Dambrauskiene R, Gerbutavicius R, Juozaityte E, Malciute L, Paulsson K, Griskevicius L. A population-based single nucleotide polymorphism array analysis of genomic aberrations in younger adult acute lymphoblastic leukemia patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015 May; 54(5): 326–333.
32. Dirse V, Gineikiene E, Zvirblis T, Bertasiute R, Paulsson K, Griskevicius L. Single nucleotide polymorphism array analysis of clonal evolution in younger adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2016 Nov; 57(11): 2716–9.
33. Dong LM, Potter JD, White E, Ulrich CM, Cardon LR, Peters U. Genetic Susceptibility to Cancer: the Role of Polymorphisms in Candidate Genes. *JAMA*. 2008 May 28; 299(20): 2423–2436.
34. Dörge P, Meissner B, Zimmermann M, Möricke A, Schrauder A, Bouquin JP, Schewe D, Harbott J, Teigler-Schlegel A, Ratei R, Ludwig WD, Koehler R, Bartram CR, Schrappe M, Stanulla M, Cario G. IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Haematologica*. 2013 Mar; 98(3): 428–432.
35. Duque-Afonso J, Feng J, Scherer F, Lin CH, Wong SH, Wang Z, Iwasaki M, Cleary ML. Comparative genomics reveals multistep pathogenesis of E2A-PBX1 acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2015 Sep; 125(9): 3667–3680.

36. Dzhagalov IL, Chen KG, Herzmark P, Robey EA. Elimination of self-reactive T cells in the thymus: a timeline for negative selection. *PLoS Biol.* 2013; 11(5):e1001566.
37. Egawa, T., Tillman, R. E., Naoe, Y., Taniuchi, I. and Littman, D. R., The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *J. Exp. Med.* 2007. 204: 1945–1957.
38. Familiades JI, Bousquet M, Lafage-Pochitaloff M, Béné MC, Beldjord K, De Vos J, Dastugue N, Coyaud E, Struski S, Quelen C, Prade-Houdellier N, Dobbelstein S, Cayuela JM, Soulier J, Gardel N, Preudhomme C, Cavé H, Blanchet O, Lhéritier V, Delannoy A, Chalandon Y, Ifrah N, Pigneux A, Brousset P, Macintyre EA, Huguet F, Dombret H, Broccardo C, Delabesse E. PAX5 mutations occur frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and PAX5 haploinsufficiency is associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 fusion genes: a GRAALL study. *Leukemia.* 2009 Nov; 23(11): 1989–1998.
39. Fang Q, Yuan T, Li Y, Feng J, Gong X, Li Q, Zhao X, Liu K, Tang K, Tian Z, Zhang Q, Wang Y, Liu B, Wang M, Ru K, Wang J, Mi Y. Prognostic significance of copy number alterations detected by multi-link probe amplification of multiple genes in adult acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett.* 2018 Apr; 15(4): 5359–5367.
40. Felice MS, Gallego MS, Alonso CN, Alfaro EM, Gutter MR, Bernasconi AR, Rubio PL, Zubizarreta PA, Rossi JG. Prognostic impact of t(1;19)/TCF3-PBX1 in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of Berlin-Frankfurt-Münster-based protocols. *Leuk Lymphoma.* 2011 Jul; 52(7): 1215–21.
41. Feng J, Li Y, Jia Y, Fang Q, Gong X, Dong X, Ru K, Li Q, Zhao X, Liu K, Wang M, Tian Z, Jia Y, Wang Y, Lin D, Wei H, Tang K, Mi Y, Wang J. Spectrum of somatic mutations detected by targeted next-generation sequencing and their prognostic significance in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol.* 2017 Feb 28; 10(1): 61.
42. Foa R, Vitale A, Mancini M, Cuneo A, Mecucci C, Elia L, Lombardo R, Saglio G, Torelli G, Annino L, Specchia G, Damasio E, Recchia A, Di Raimondo F, Morra E, Volpe E, Tafuri A, Fazi P, Hunger SP, Mandelli F. E2A-PBX1 fusion in adult acute lymphoblastic leukaemia: biological and clinical features. *Br J Haematol.* 2003 Feb; 120(3): 484–487.
43. Forero-Castro M, Robledo C, Benito R, Abáigar M, África Martín A, Arefi M, Fuster JL, de Las Heras N, Rodríguez JN, Quintero J, Riesco S, Hermosín L, de la Fuente I, Recio I, Ribera J, Labrador J, Alonso JM, Olivier C, Sierra M, Megido M, Corchete-Sánchez LA, Ciudad Pizarro J,

- García JL, Ribera JM, Hernández-Rivas JM. Genome-Wide DNA Copy Number Analysis of Acute Lymphoblastic Leukemia Identifies New Genetic Markers Associated with Clinical Outcome. *PLoS One*. 2016 Feb 12;11(2): e0148972.
44. Garcia-Ojeda, M. E., Klein Wolterink, R. G., Lemaitre, F., Richard-Le Goff, O., Hasan, M., Hendriks, R. W., Cumano, A. et al., GATA-3 promotes T-cell specification by repressing B-cell potential in pro-T cells in mice. *Blood* 2013.121: 1749–1759.
 45. Giampaolo S1, Wójcik G2, Klein-Hessling S1,3, Serfling E1,3, Patra AK. B cell development is critically dependent on NFATc1 activity. *Cell Mol Immunol*. 2019 May; 16(5): 508–520.
 46. Gibson LF, Piktel D, Landreth KS. Insulin-like growth factor-1 potentiates expansion of interleukin-7-dependent pro-B cells. *Blood*. 1993 Nov 15; 82(10): 3005–3011.
 47. Gimferrer I, Hu T., Simmons A., Wang C., Souabni A., Busslinger M., Bender T. P. et al., Regulation of GATA-3 expression during CD4 lineage differentiation. *J. Immunol*. 2011.186: 3892–3898.
 48. Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood*. 2017 Mar 2;129(9):1113–1123.
 49. Gole B, Wiesmüller L. Leukemogenic rearrangements at the mixed lineage leukemia gene (MLL)-multiple rather than a single mechanism. *Front Cell Dev Biol*. 2015 Jun 25; 3: 41.
 50. Gondek L. P., Tiu R., Haddad A. S., O’Keefe C. L., Sekeres M. A., Theil K. S., Maciejewski J. P. Single nucleotide polymorphism arrays complement metaphase cytogenetics in detection of new chromosomal lesions in mds. *Leukemia*. 2007; 21:2058–2061.
 51. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*????
 52. Hakeem A, Shiekh AA, Bhat GM, Lone AR. Prognostification of ALL by Cytogenetics. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2015 Sep; 31(3): 322–331.
 53. Hamadeh L, Enshaei A, Schwab C, Alonso CN, Attarbaschi A, Barbany G, den Boer ML, Boer JM5, Braun M, Dalla Pozza L, Elitzur S, Emerenciano M, Fechina L, Felice MS, Fronkova E, Haltrich I, Heyman MM, Horibe K, Imamura T, Jeison M, Kovács G, Kuiper RP, Mlynarski W, Nebral K, Ivanov Öfverholm I, Pastorczak A, Pieters R, Piko H, Pombo-de-Oliveira MS, Rubio P, Strehl S, Stary J, Sutton R, Trka J, Tsaur G, Venn N, Vora A, Yano M, Harrison CJ, Moorman AV; International BFM Study Group. Validation of the United Kingdom copy-number alteration classifier

- in 3239 children with B-cell precursor ALL. *Blood Adv.* 2019 Jan 22; 3(2): 148–157.
54. Harrison CJ, Moorman AV, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Reza Jalali G, Robinson HM, Barber KE, Richards SM, Mitchell CD, Eden TO, Hann IM, Hill FG, Kinsey SE, Gibson BE, Lilleyman J, Vora A, Goldstone AH, Franklin IM, Durrant J, Martineau M; Childhood and Adult Leukaemia Working Parties. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2004 Jun; 125(5): 552–559.
55. Harrison CJ, Moorman AV, Schwab C, Carroll AJ, Raetz EA, Devidas M, Strehl S, Nebral K, Harbott J, Teigler-Schlegel A6, Zimmerman M7, Dastuge N, Baruchel A, Soulier J, Auclerc MF, Attarbaschi A, Mann G, Stark B, Cazzaniga G, Chilton L, Vandenberghe P, Forestier E, Haltrich I, Raimondi SC, Parihar M, Bourquin JP, Tchinda J, Haferlach C, Vora A, Hunger SP, Heerema NA, Haas OA; Ponte di Legno International Workshop in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia* 2014; 28(5): 1015–1021.
56. Harrison CJ. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. *Blood.* 2015 Feb 26; 125(9):1383–1386.
57. Heerema, NA, Raimondi, SC, Anderson, JR, Biegel, J, Camitta, BM, Cooley, LD, Gaynon, PS, Hirsch, B, Magenis, RE, McGavran, L, Patil, S, Pettenati, MJ, Pullen, J, Rao, K, Roulston, D, Schneider, NR, Shuster, JJ, Sanger, W, Sutcliffe, MJ, van Tuinen, P, Watson, MS, Carroll, AJ. 2007. Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*; 46: 684–693.
58. Hystad ME, Myklebust JH, Bø TH, Sivertsen EA, Rian E, Forfang L, Munthe E, Rosenwald A, Chiorazzi M, Jonassen I, et al. Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. *J Immunol.* 2007; 179: 3662–3671.
59. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013; 45(3): 242–252.
60. Hu Y, He H, Lu J, Wang Y, Xiao P, Li J, Li J, Sun Y, Lv H, Fan J, Yao Y, Chai Y, Hu S. E2A-PBX1 exhibited a promising prognosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated with the CCLG-ALL2008 protocol. *Onco Targets Ther.* 2016 Nov 22; 9:7219–7225.

61. Iacobucci I, Ferrari A, Lonetti A, Papayannidis C, Paoloni F, Trino S, Storlazzi CT, Ottaviani E, Cattina F, Impera L, Abbenante MC, Vignetti M, Vitale A, Potenza L, Paolini S, Soverini S, Pane F, Luppi M, Foà R, Baccarani M, Martinelli G. CDKN2A/B alterations impair prognosis in adult BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Cancer Res.* 2011 Dec 1; 17(23): 7413–7423.
62. Yao QM, Liu KY, Gale RP, Jiang B, Liu YR, Jiang Q, Jiang H, Zhang XH, Zhang MJ, Chen SS, Huang XJ, Xu LP, Ruan GR. Prognostic impact of IKZF1 deletion in adults with common B-cell acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer.* 2016 Apr 11; 16:269.
63. Ichii M, Oritani K, Kanakura Y. Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse. *World J Stem Cells.* 2014 Sep 26; 6(4): 421–431.
64. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2013 Jun 1; 381(9881): 1943–1955.
65. Yokota T, Kanakura Y. Genetic abnormalities associated with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci.* 2016 Jun; 107(6): 721–725.
66. Youssef A, Aboalola D, Han VK. The Roles of Insulin-Like Growth Factors in Mesenchymal Stem Cell Niche. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: 9453108.
67. Yuan JS, Kousis PC, Suliman S, Visan I, Guidos CJ. Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annu Rev Immunol.* 2010; 28: 343–365.
68. Jain P, Korula A, Deshpande P, Pn N, Abu Alex A, Abraham A, Srivastava A, Janet NB, Lakshmi KM, Balasubramanian P, George B, Mathews V. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: Limitations of Intensification of Therapy in a Developing Country. *J Glob Oncol.* 2018 Sep; 4:1–12.
69. Jerchel IS, Hoogkamer AQ, Ariës IM, Steeghs EMP, Boer JM, Besselink NJM, Boeree A, van de Ven C, de Groot-Kruseman HA, de Haas V, Horstmann MA, Escherich G, Zwaan CM, Cuppen E, Koudijs MJ, Pieters R, den Boer ML. RAS pathway mutations as a predictive biomarker for treatment adaptation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2018 Apr; 32(4): 931–940.
70. Johnson JL, Georgakilas G, Petrovic J, Kurachi M, Cai S, Harly C, Pear WS, Bhandoola A, Wherry EJ, Vahedi G. Lineage-Determining Transcription Factor TCF-1 Initiates the Epigenetic Identity of T Cells. *Immunity.* 2018 Feb 20; 48(2): 243–257.e10.
71. Karrman K., Castor A., Behrendtz M., Forestier E., Olsson L., Ehinger M., Biloglav A., Fioretos T., Paulsson K., Johansson B. Deep sequencing and

- SNP array analyses of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia reveal NOTCH1 mutations in minor subclones and a high incidence of uniparental isodisomies affecting CDKN2A. *J. Hematol. Oncol.* 2015; 8.
72. Katz AJ, Chia VM, Schoonen WM, Kelsh MA. Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden. *Cancer Causes Control.* 2015 Nov; 26(11): 1627–1642.
73. Kawamata N, Ogawa S, Seeger K, Kirschner-Schwabe R, Huynh T, Chen J, Megrabian N, Harbott J, Zimmermann M, Henze G, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol.* 2009 Jun; 34(6): 1603–1612.
74. Kim M, Yim SH, Cho NS, Kang SH, Ko DH, Oh B, Kim TY, Min HJ, She CJ, Kang HJ, Shin HY, Ahn HS, Yoon SS, Kim BK, Shin HR, Han KS, Cho HI, Lee DS. Homozygous deletion of CDKN2A (p16, p14) and CDKN2B (p15) genes is a poor prognostic factor in adult but not in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a comparative deletion and hypermethylation study. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009 Nov; 195(1): 59–65.
75. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol.* 2014 Jun; 14(6): 377–391.
76. Koch U, Radtke F. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011; 27: 539–562.
77. Kuiper RP, Schoenmakers EF, van Reijmersdal SV, Hehir-Kwa JY, van Kessel AG, van Leeuwen FN, Hoogerbrugge PM. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia.* 2007 Jun; 21(6): 1258–1266.
78. Kuiper RP, Waanders E, van der Velden VH, van Reijmersdal SV, Venkatachalam R, Scheijen B, Sonneveld E, van Dongen JJ, Veerman AJ, van Leeuwen FN, van Kessel AG, Hoogerbrugge PM. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B- ALL. *Leukemia.* 2010 Jul; 24(7): 1258–1264.
79. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity.* 2018 Feb 20; 48(2): 202–213.
80. Kwon K, Hutter C, Sun Q, Bilic I, Cobaleda C, Malin S, Busslinger M. Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis

- and germinal center B cell development. *Immunity*. 2008 Jun; 28(6): 751–762.
81. Lee JW, Kim SK, Jang PS, Chung NG, Jeong DC, Kim M, Cho B, Kim HK. Outcome and Prognostic Factors for ETV6/RUNX1 Positive Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Treated at a Single Institution in Korea. *Cancer Res Treat*. 2017 Apr; 49(2): 446–453.
 82. Lee TY, Ezelle HJ, Venkataraman T, Lapidus RG, Scheibner KA, Hassel BA. Regulation of human RNase-L by the miR-29 family reveals a novel oncogenic role in chronic myelogenous leukemia. *J Interferon Cytokine Res*. 2013 Jan; 33(1): 34–42.
 83. Leoni V, Biondi A. Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015 Mar; 100(3): 295–299.
 84. Li, L., Zhang, J. A., Dose, M., Kueh, H. Y., Mosadeghi, R., Gounari, F. and Rothenberg, E. V., A far downstream enhancer for murine Bcl11b controls T-cell specific expression. *Blood* 2013; 122: 902–911.
 85. Li, P., Burke, S., Wang, J., Chen, X., Ortiz, M., Lee, S. C., Lu, D. et al., Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science* 2010; 329: 85–89.
 86. Lutz J, Heideman MR, Roth E, van den Berk P, Müller W, Raman C, Wabl M, Jacobs H, Jäck HM. Pro-B cells sense productive immunoglobulin heavy chain rearrangement irrespective of polypeptide production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 28; 108(26): 106449.
 87. Ma SK, Chan GC, Wan TS, Lam CK, Ha SY, Lau YL, Chan LC. Near-haploid common acute lymphoblastic leukaemia of childhood with a second hyperdiploid line: a DNA ploidy and fluorescence in-situ hybridization study. *Br J Haematol*. 1998 Dec; 103(3): 750–755.
 88. Malouf C, Ottersbach K. The fetal liver lymphoid-primed multipotent progenitor provides the prerequisites for the initiation of t(4;11) MLL-AF4 infant leukemia. *Haematologica*. 2018 Dec; 103(12): e571–e574.
 89. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaur G et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. 2018 Feb; 32(2): 273–284.
 90. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaur G, Fechina L, Renneville A, Sutton R, Venn NC, Emerenciano M, Pombo-de-Oliveira MS, Barbieri Blunck C, Almeida Lopes B, Zuna J, Trka J, Ballerini P, Lapillonne H, De Braekeleer M, Cazzaniga G, Corral Abascal L, van der Velden VHJ, Delabesse E, Park TS, Oh SH, Silva MLM, Lund-Aho T, Juvonen V, Moore AS, Heidenreich O, Vormoor J, Zerkalenkova E, Olshanskaya Y, Bueno C, Menendez P, Teigler-Schlegel A, Zur Stadt U, Lentjes J, Göhring G, Kustanovich A, Aleinikova O, Schäfer BW, Kubetzko S, Madsen HO,

- Gruhn B, Duarte X, Gameiro P, Lippert E, Bidet A, Cayuela JM, Clappier E, Alonso CN, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Archer P, Hancock J, Möricke A, Alten J, Schrappe M, Stanulla M, Strehl S, Attarbaschi A, Dworzak M, Haas OA, Panzer-Grümayer R, Sedék L, Szczepański T, Caye A, Suarez L, Cavé H, Marschalek R. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. 2018 Feb; 32(2): 273–284.
91. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Groger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*. 2013; 27:2165–76.10.1038/leu.2013.135.
92. Minson KA, Prasad P, Vear S, Borinstein S, Ho R, Domm J, Frangoul H.t(17;19) in Children with Acute Lymphocytic Leukemia: A Report of 3 Cases and a Review of the Literature. *Case Rep Hematol*. 2013; 2013: 563291.
93. Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol*. 2018 Jan; 5(1): e14-e24.
94. Mirebeau D, Acquaviva C, Suciú S, Bertin R, Dastugue N, Robert A, Boutard P, Méchinaud F, Plouvier E, Otten J, Vilmer E, Cavé H; EORTC-CLG. The prognostic significance of CDKN2A, CDKN2B and MTAP inactivation in B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. Results of the EORTC studies 58881 and 58951. *Haematologica*. 2006 Jul; 91(7): 881–885.
95. Möhle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 1998 Jun 15; 91(12): 4523–30.
96. Montel-Hagen A, Crooks GM. From pluripotent stem cells to T cells. *Exp Hematol*. 2019 Mar; 71: 24–31.
97. Moorman AV, Chilton L, Wilkinson J, Ensor HM, Bown N, Proctor SJ. A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010 Jan 14; 115(2): 206–214.
98. Moorman AV, Enshaei A, Schwab C, Wade R, Chilton L, Elliott A, Richardson S, Hancock J, Kinsey SE, Mitchell CD, Goulden N, Vora A, Harrison CJ. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014 Aug 28; 124(9): 1434–1444.

99. Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, Vance GH, Cherry AM, Higgins RR, Fielding AK, Foroni L, Paietta E, Tallman MS, Litzow MR, Wiernik PH, Rowe JM, Goldstone AH, Dewald GW; Adult Leukaemia Working Party, Medical Research Council/National Cancer Research Institute. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8): 3189–97.
100. Moorman AV, Richards SM, Martineau M, Cheung KL, Robinson HM, Jalali GR, Broadfield ZJ, Harris RL, Taylor KE, Gibson BES, Hann IM, Hill FGH, Kinsey SE, Eden TOB, Mitchell CD, Harrison CJ. 2003. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 102: 2756–2762.
101. Moorman AV, Richards SM, Robinson HM, Strefford JC, Gibson BE, Kinsey SE, Eden TO, Vora AJ, Mitchell CD, Harrison CJ; UK Medical Research Council (MRC)/National Cancer Research Institute (NCRI) Childhood Leukaemia Working Party (CLWP). Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). *Blood*. 2007 Mar 15; 109(6): 2327-30.
102. Moorman AV. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev* 2012; 26: 123–135.
103. Morrow M, Horton S, Kioussis D, Brady HJ, Williams O. TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. *Blood*. 2004;103(10): 3890–3896.
104. Motea EA, Berdis AJ. Terminal deoxynucleotidyl transferase: the story of a misguided DNA polymerase. *Biochim Biophys Acta*. 2010 May; 1804(5): 1151–1166.
105. Motlló C, Ribera JM, Morgades M, Granada I, Montesinos P, Brunet S, Bergua J, Tormo M, García-Boyeró R, Sarrà J, Del Potro E, Grande C, Barba P, Bernal T, Amigo ML, Grau J, Cervera J, Feliu E; PETHEMA Group, Spanish Society of Hematology. Frequency and prognostic significance of t(v;11q23)/KMT2A rearrangements in adult patients with acute lymphoblastic leukemia treated with risk-adapted protocols. *Leuk Lymphoma*. 2017 Jan; 58(1): 145–152.
106. Mühlbacher V, Haferlach T, Kern W, Zenger M, Schnittger S, Haferlach C. Array-based comparative genomic hybridization detects copy number variations with prognostic relevance in 80% of ALL with normal

- karyotype or failed chromosome analysis. *Leukemia*. 2016 Feb; 30(2): 318–324. doi: 10.1038/leu.2015.276.
107. Mullighan C. G., Williams R. T., Downing J. R., Sherr C. J. Failure of CDKN2A/b (INK4A/b-ARF)-mediated tumor suppression and resistance to targeted therapy in acute lymphoblastic leukemia induced by BCR-ABL. *Genes Dev*. 2008; 22: 1411–1415.
 108. Mullighan CG, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007; 446(7137): 758–764.
 109. Mullighan CG, Miller CB, Su X, Radtke I, Dalton J, Song G, Zhou X, Pui CH, Shurtleff SA, Downing JR. ERG Deletions Define a Novel Subtype of B-Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 2007; 110:691.
 110. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, Downing JR. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2008 Nov 28; 322(5906):1377–80.
 111. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LAA, Miller CB, Ma J, Liu W, Cheng C, Schulman BA, Harvey RC, Chen IM, Clifford RJ, Carroll WL, Reaman G, Bowman WP, Devidas M, Gerhard DS, Yang W, Relling, Shurtleff SA, Campana D, Borowitz MJ, Pui CH, Smith M, Hunger SP, Willman, CL, Downing JR and the Children's Oncology Group. Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2009 Jan 29; 360(5): 470–480.
 112. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2012 Oct;122(10): 3407–3415.
 113. Murre C. 'Big bang' of B-cell development revealed. *Genes Dev*. 2018 Jan 15; 32(2): 93–95.
 114. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, Dastugue N, Schrappe M, Pui CH, Basso G, Silverman LB, Janka-Schaub GE. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007 Aug 15; 110(4): 1112–1115.
 115. Nakamori Y, Liu B, Ohishi K, Suzuki K, Ino K, Matsumoto T, Masuya M, Nishikawa H, Shiku H, Hamada H, Katayama N. Human bone marrow stromal cells simultaneously support B and T/NK lineage development from human haematopoietic progenitors: a principal role for flt3 ligand in lymphopoiesis. *Br J Haematol*. 2012 Jun;157(6): 674–686.
 116. Nakitandwe J, Chen S, Lenny NT, Miller CB, Su X, Mullighan CG, Downing JR. Acute Lymphoblastic Leukemia-Associated PAX5 Mutations Induce Aberrant B Cell Development. *Blood* 2010; 116:10.

117. Noviski M, Mueller JL, Satterthwaite A, Garrett-Sinha LA, Brombacher F, Zikherman J. IgM and IgD B cell receptors differentially respond to endogenous antigens and control B cell fate. *Elife*. 2018 Mar 9;7. pii: e35074.
118. Nowak D., Ogawa S., Muschen M., Kato M., Kawamata N., Meixel A., Nowak V., Kim H.S., Kang S., Paquette R., et al. SNP array analysis of tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemia identifies heterogeneous secondary genomic alterations. *Blood*. 2010; 115:1049–1053.
119. Okamoto R, Ogawa S, Nowak D, Kawamata N, Akagi T, Kato M, Sanada M, Weiss T, Haferlach C, Dugas M, Ruckert C, Haferlach T, Koefler HP. Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2010 Sep; 95(9): 1481–1488.
120. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Aug; 23(4): 655–674.
121. Payne K, Baez I, Milford T, Weldon A, Francis O, Sinisa D, Su R. IL-7 receptor expression defines a human common lymphoid progenitor in cord blood lymphopoiesis. *J Immunol* April 1, 2011, 186 (1 Supplement) 153.4
122. Pang SHM, de Graaf CA, Hilton DJ, Huntington ND, Carotta S, Wu L, Nutt SL. PU.1 Is Required for the Developmental Progression of Multipotent Progenitors to Common Lymphoid Progenitors. *Front Immunol*. 2018 Jun; 11;9:1264.
123. Parkin B., Erba H., Ouillette P., Roulston D., Purkayastha A., Karp J., Talpaz M., Kujawski L., Shakhan S., Li C., et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2010; 116: 4958–4967.
124. Paulsson K, Cazier JB, Macdougall F, Stevens J, Stasevich I, Vrcelj N, Chaplin T, Lillington DM, Lister TA, Young BD. Microdeletions are a general feature of adult and adolescent acute lymphoblastic leukemia: Unexpected similarities with pediatric disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 6;105(18): 6708–6713.
125. Paulsson K. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia: Chromosomal gains as the main driver event. *Mol Cell Oncol*. 2015 Jul 6; 3(1):e1064555.

126. Pérez-Vera P1, Reyes-León A, Fuentes-Pananá EM. Signaling proteins and transcription factors in normal and malignant early B cell development. *Bone Marrow Res.* 2011; 2011:502751.
127. Piccaluga PP, Malagola M, Rondoni M, Ottaviani E, Testoni N, Laterza C, Visani G, Pileri SA, Martinelli G, Baccarani M. Poor outcome of adult acute lymphoblastic leukemia patients carrying the (1;19)(q23;p13) translocation. *Leuk Lymphoma.* 2006 Mar; 47(3): 469–472.
128. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Apr; 131(4): 959–971.
129. Pillai S1, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol.* 2009 Nov; 9(11): 767–777.
130. PMID:15071128.
131. Poppe B, Cauwelier B, Van Limbergen H, Yigit N, Philippé J, Verhasselt B, De Paepe A, Benoit Y, Speleman F. Novel cryptic chromosomal rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by multiple color fluorescent in situ hybridization. *Haematologica.* 2005 Sep; 90(9): 1179–1185.
132. Pottier N, Yang W, Assem M, Panetta JC, Pei D, Paugh SW, Cheng C, Den Boer ML, Relling MV, Pieters R, Evans WE, Cheok MH. The SWI/SNF chromatin-remodeling complex and glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Dec 17; 100(24): 1792–1803.
133. Pui CH, Rebora P, Schrappe M, Attarbaschi A, Baruchel A, Basso G, Cavé H, Elitzur S, Koh K, Liu HC, Paulsson K, Pieters R, Silverman LB, Sary J, Vora A, Yeoh A, Harrison CJ, Valsecchi MG; Ponte di Legno Childhood ALL Working Group. Outcome of Children With Hypodiploid Acute Lymphoblastic Leukemia: A Retrospective Multinational Study. *J Clin Oncol.* 2019 Apr 1; 37(10): 770–779.
134. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1535–1548.
135. Pulte D, Jansen L, Gondos A, Katalinic A, Barnes B, Rensing M, Holleczeck B, Eberle A, Brenner H; GEKID Cancer Survival Working Group. Survival of adults with acute lymphoblastic leukemia in Germany and the United States. *PLoS One.* 2014 Jan 27; 9(1):e85554.
136. Raimondi SC, Zhou Y, Shurtleff SA, Rubnitz JE, Pui CH, Behm FG. Near-triploidy and near-tetraploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia: association with B-lineage blast cells carrying the ETV6-RUNX1 fusion, T-lineage immunophenotype, and favorable outcome. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006 Aug; 169(1): 50–57.

137. Ramírez-Komo JA, Straign MAD, Lukin K, Tsang M, Iritani BM, Hagman J. Spontaneous loss of B lineage transcription factors leads to pre-B leukemia in Ebf1+/-Bcl-xLTg mice. *Oncogenesis*. 2017 Jul; 6(7): e355.
138. Reid JC, Tanasijevic B, Golubeva D, Boyd AL, Porras DP, Collins TJ, Bhatia M. CXCL12/CXCR4 Signaling Enhances Human PSC-Derived Hematopoietic Progenitor Function and Overcomes Early In Vivo Transplantation Failure. *Stem Cell Reports*. 2018 May 8; 10(5): 1625–1641.
139. Ribera J, Granada I, Morgades M1, Vives S, Genescà E, González C, Nomdedeu J, Escoda L, Montesinos P, Mercadal S, Coll R, González-Campos J, Abella E, Barba P, Bermúdez A, Gil C, Tormo M, Pedreño M, Martínez-Carballeira D, Hernández-Rivas JM, Orfao A, Martínez-López J, Esteve J, Bravo P, Garcia-Guiñon A, Debén G, Moraleda JM, Queizán JA, Ortín X, Moreno MJ, Feliu E, Solé F1, Ribera JM; PETHEMA Group, Spanish Society of Haematology. The poor prognosis of low hypodiploidy in adults with B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia is restricted to older adults and elderly patients. *Br J Haematol*. 2019 Jul; 186(2): 263–268.
140. Roschger C, Cabrele C. The Id-protein family in developmental and cancer-associated pathways. *Cell Commun Signal*. 2017 Jan 25; 15(1):7.
141. Rozanski, C. H., Arens, R., Carlson, L. M., Nair, J., Boise, L. H., Chanan-Khan, A. A., Schoenberger, S. P., and Lee, K. P. (2011). Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. *J. Exp. Med*. 208: 1435–1446.
142. Safavi S, Hansson M, Karlsson K, Biloglav A, Johansson B, Paulsson K. Novel gene targets detected by genomic profiling in a consecutive series of 126 adults with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015 Jan; 100(1): 55–61.
143. Safavi S, Paulsson K. Near-haploid and low-hypodiploid acute lymphoblastic leukemia: two distinct subtypes with consistently poor prognosis. *Blood*. 2017 Jan 26; 129(4): 420–423.
144. Safavi S, Paulsson K. Near-haploid and low-hypodiploid acute lymphoblastic leukemia: two distinct subtypes with consistently poor prognosis. *Blood*. 2017 Jan 26; 129(4): 420–423.
145. Sanchez ET, Navasa AT, Camarero IR, Diego MB, Sanchez-Garcia I, Cobaleda I. Acute lymphoblastic leukemia and developmental biology. A crucial interrelationship. *Cell Cycle*. 2011 Oct 15; 10(20): 3473–3486.

146. Schebesta, M., Pfeffer, P. L., and Busslinger, M. (2002). Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene. *Immunity* 17: 473–485.
147. Schwab CJ, Chilton L, Morrison H, Jones L, Al-Shehhi H, Erhorn A, Russell LJ, Moorman AV, Harrison CJ. Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features. *Haematologica*. 2013 Jul; 98(7): 1081–1088.
148. Schwickert TA1, Tagoh H1, Gültekin S, Dakic A, Axelsson E, Minnich M, Ebert A, Werner B, Roth M, Cimmino L, Dickins RA, Zuber J, Jaritz M, Busslinger M. Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros. *Nat Immunol*. 2014 Mar; 15(3): 283–293.
149. Sellars M1, Kastner P, Chan S. Ikaros in B cell development and function. *World J Biol Chem*. 2011 Jun 26; 2(6): 132–139.
150. Seo W, Taniuchi I. Transcriptional regulation of early T-cell development in the thymus. *Eur J Immunol*. 2016 Mar; 46(3): 531–538.
151. Seo, W., Tanaka, H., Miyamoto, C., Levanon, D., Groner, Y. and Taniuchi, I., Roles of VWRPY motif-mediated gene repression by Runx proteins during T-cell development. *Immunol. Cell. Biol*. 2012; 90: 827–830. doi:10.1038/2007.204: 1945–1957.
152. Sewastianik T, Jiang M, Sukhdeo K, Patel SS, Roberts K, Kang Y, Alduaij A, Dennis PS, Lawney B, Liu R, Song Z, Xiong J, Zhang Y, Lemieux ME, Pinkus GS, Rich JN, Weinstock DM, Mullighan CG, Sharpless NE, Carrasco RD. Constitutive Ras signaling and Ink4a/Arf inactivation cooperate during the development of B-ALL in mice. *Blood Adv*. 2017 Nov 21; 1(25): 2361–2374.
153. Shah DK, Zúñiga-Pflücker JC. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol*. 2014 May 1; 192(9): 4017–4023.
154. Shi J, Whyte WA, Zepeda-Mendoza CJ, Milazzo JP, Shen C, Roe JS, Minder JL, Mercan F, Wang E, Eckersley-Maslin MA, Campbell AE, Kawaoka S, Shareef S, Zhu Z, Kendall J, Muhar M, Haslinger C, Yu M, Roeder RG, Wigler MH, Blobel GA, Zuber J, Spector DL, Young RA, Vakoc CR. Role of SWI/SNF in acute leukemia maintenance and enhancer-mediated Myc regulation. *Genes Dev*. 2013 Dec 15; 27(24): 2648–2662.
155. Somasundaram R, Prasad MA, Ungerback J, et al. Transcription factor networks in B-cell differentiation link development to acute lymphoid leukemia. *Blood* 2015; 126(2): 144–152.

156. Song J, Shao H. SNP Array in Hematopoietic Neoplasms: A Review. *Microarrays* (Basel). 2015 Dec 22;5(1). pii: E1.
157. Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M., and Busslinger, M. (2002). Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* 17, 781–793.
158. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:139–176.
159. Steeghs EMP, Boer JM1, Hoogkamer AQ, Boeree A, de Haas V, de Groot-Kruseman HA, Horstmann MA, Escherich G, Pieters R, den Boer ML. Copy number alterations in B-cell development genes, drug resistance, and clinical outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep.* 2019 Mar 15; 9(1): 4634.
160. Stengel A, Schnittger S, Weissmann S, Kuznia S, Kern W, Kohlmann A, Haferlach T, Haferlach C. TP53 mutations occur in 15.7 % of ALL and are associated with MYC-rearrangement, low hypodiploidy, and a poor prognosis. *Blood.* 2014 Jul 10; 124(2): 251–258.
161. Studniak E, Maloney E, Ociepa T, Urański T, Skonieczka K, Haus O, Poluha A, Kowalczyk J, Zajaczek S. Allelic loss of selected tumor suppressor genes in acute lymphoblastic leukemia in children. *Pol J Pathol.* 2013 Jun; 64(2): 121–128.
162. Sulong S, Moorman AV, Irving JA, Strefford JC, Konn ZJ, Case MC, Minto L, Barber KE, Parker H, Wright SL, Stewart AR, Bailey S, Bown NP, Hall AG, Harrison CJ. A comprehensive analysis of the CDKN2A gene in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals genomic deletion, copy number neutral loss of heterozygosity, and association with specific cytogenetic subgroups. *Blood.* 2009 Jan 1; 113(1): 100–107.
163. Sun C, Chang L, Zhu X. Pathogenesis of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia and mechanisms underlying its relapse. *Oncotarget.* 2017 May 23; 8(21): 35445–35459.
164. Takemori T, Kaji T, Takahashi Y, Shimoda M, Rajewsky K. Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *Eur J Immunol.* 2014 May; 44(5): 1258–1264.
165. Takeuchi, A., Yamasaki, S., Takase, K., Nakatsu, F., Arase, H., Onodera, M. and Saito, T. E2A and HEB activate the pre-TCR alpha promoter during immature T cell development. *J. Immunol.* 2001.167: 2157–2163.
166. Tamai H, Miyake K, Takatori M, Miyake N, Yamaguchi H, Dan K, et al. Activated K-Ras protein accelerates human MLL/AF4-induced leukemolymphomagenicity in a transgenic mouse model. *Leukemia.* 2011; 25: 888–891.

167. Tan SH, Bertulfo FC, Sanda T. Leukemia-Initiating Cells in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Oncol.* 2017 Sep 25; 7: 218.
168. Taniuchi, I. and Ellmeier, W., Transcriptional and epigenetic regulation of CD4/CD8 lineage choice. *Adv. Immunol.* 2011, 110: 71–110.
169. Toft N, Birgens H, Abrahamsson J, Griškevičius L, Hallböök H, Heyman M, Klausen TW, Jónsson ÓG, Palk K, Pruunsild K, Quist-Paulsen P, Vaitkeviciene G, Vettenranta K, Åsberg A, Frandsen TL, Marquart HV, Madsen HO, Norén-Nyström U, Schmiegelow K. Results of NOPHO ALL2008 treatment for patients aged 1-45 years with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2018 Mar; 32(3): 606–615.
170. Ueno H, Yoshida K, Yamashita Y, Shiozawa Y, Ishida T, Tsukamoto H, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Deguchi T, Sato A, Hashii Y, Tokimasa S, Hara J, Kosaka Y, Kato K, Imamura T, Miyano S, Ogawa S, Horibe K, Sanada M. Landscape of Driver Mutations and Their Clinical Impacts in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 2016; 128: 912.
171. Usvasalo A, Savola S, Rätty R, Vettenranta K, Harila-Saari A, Koistinen P, Savolainen ER, Elonen E, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S. CDKN2A deletions in acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults: an array CGH study. *Leuk Res.* 2008 Aug; 32(8): 1228–1235.
172. van der Veer A, Zaliova M, Mottadelli F, De Lorenzo P, Te Kronnie G, Harrison CJ, Cavé H, Trka J, Saha V, Schrappe M, Pieters R, Biondi A, Valsecchi MG, Stanulla M, den Boer ML, Cazzaniga G. IKZF1 status as a prognostic feature in BCR-ABL1-positive childhood ALL. *Blood.* 2014 Mar 13; 123(11): 1691–1698.
173. van Zutven LJ, van Drunen E, de Bont JM, Wattel MM, Den Boer ML, Pieters R, Hagemeyer A, Slater RM, Beverloo HB. CDKN2 deletions have no prognostic value in childhood precursor-B acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia.* 2005 Jul; 19(7): 1281–1284.
174. Vargas CL, Poursine-Laurent J, Yang L, Yokoyama WM. Vargas CL1, Poursine-Laurent J, Yang L, Yokoyama WM. *Blood.* 2011 Sep 29; 118(13): 3570–3578.
175. Vrooman LM, Silverman LB. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Curr Opin Pediatr.* 2009 Feb; 21(1): 1–8.
176. Wang Y, Miller S, Roulston D, Bixby D, Shao L. Genome-Wide Single-Nucleotide Polymorphism Array Analysis Improves Prognostication of Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *J Mol Diagn.* 2016 Jul; 18(4): 595–603.

177. Weber BN, Chi AW, Chavez A, Yashiro-Ohtani Y, Yang Q, Shestova O, Bhandoola A. A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature*. 2011 Aug 3; 476(7358): 63–8.
178. Willert K, Jones KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev*. 2006 Jun 1; 20(11): 1394–1404.
179. Winkler TH, Mårtensson IL. The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance. *Front Immunol*. 2018 Nov 15; 9: 2423.
180. Wolfer A. Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development., Bakker T, Wilson A, Nicolas M, Ioannidis V, Littman DR, Lee PP, Wilson CB, Held W, MacDonald HR, Radtke F. *Nat Immunol*. 2001 Mar; 2(3): 235–241.
181. Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jun 25; 12(7): 517–531.
182. Xu, W., Carr, T., Ramirez, K., McGregor, S., Sigvardsson, M. and Kee, B. L., E2A transcription factors limit expression of Gata3 to facilitate T lymphocyte lineage commitment. *Blood* 2013.121: 1534–1542.
183. Zayas J, Spassov DS, Nachtman RG, Jurecic R. Murine hematopoietic stem cells and multipotent progenitors express truncated intracellular form of c-kit receptor. *Stem Cells Dev*. 2008 Apr; 17(2): 343–353.
184. Zaliova M, Potuckova E, Hovorkova L, Musilova A, Winkowska L, Fiser K, Stuchly J, Mejstrikova E, Starkova J, Zuna J, Stary J, Trka J. ERG deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia with DUX4 rearrangements are mostly polyclonal, prognostically relevant and their detection rate strongly depends on screening method sensitivity. *Haematologica*. 2019 Jul; 104(7): 1407–1416.
185. Zhang W, Kuang P, Liu T. Prognostic significance of CDKN2A/B deletions in acute lymphoblastic leukaemia: a meta-analysis. *Ann Med*. 2019 Feb; 51(1): 28–40.
186. Zlotoff DA, Bhandoola A. Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Jan; 1217: 122–138.

7. PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju VULSK Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centro direktoriui bei mano darbo vadovui prof. dr. Laimonui Griškevičiui už suteiktą galimybę atlikti šį disertacinį darbą ir nuolatinį skatinimą judėti mokslo keliu. Noriu padėkoti darbą vertinusiems recenzentams – dr. Mindaugui Stoškui, dr. Valdui Pečeliūnui ir dr. Sonatai Šaulytei-Trakymienei. Nuoširdžią padėką skiriu visam Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centro kolektyvui už palaikymą bei pagalbą kiekviename žingsnyje.

Už išskirtinę kantrybę ir supratimą doktorantūros studijų metu noriu padėkoti savo žmonai Neringai ir sūnui Rokui.

8. PRIEDAI

I PRIEDAS. DNR išskyrimo, koncentracijos ir švarumo matavimo protokolas

1) DNR išskyrimas

Įranga ir darbo priemonės:

- antgaliai automatinėms mikropipetėms,
- automatinių mikropipetėčių rinkinys (Rainin),
- centrifugavimo mėgintuvėliai, 15–50 ml tūrio,
- MAXWELL 16® INSTRUMENT (Promega),
- ledo vonelė,
- mėgintuvėliai (1,5–2,0 ml tūrio),
- spektrofotometras NANODROP 2000 (Thermo Scientific),
- centrifuga (Hettich),
- šaldiklis (-20 °C),
- termopurtyklė THERMOMIXER® COMFORT (Eppendorf),
- vienkartinės apsauginės pirštinės.

Reagentai:

- DNR išskyrimo rinkinys *Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit* (Promega).

Darbo eiga:

Kaulų čiulpų mėginio paruošimas

- Įpilama kaulų čiulpų mėginio į 1,5 ml tūrio mėgintuvėlius ir jie nucentrifuguojami,
- į mėgintuvėlius įpilama po 30 µl *Proteinase K* tirpalo,
- įpilama po 300 µl *Lysis Buffer* tirpalo,
- mėgintuvėliai supurtomi vibruojančioje kratyklėje 10 s,
- mėgintuvėliai inkubuojami termokratyklėje 56 °C 20 min.

Maxwell® kasetės paruošimas:

- paruošiamos rinkinio kasetės,
- kasetės įstatomos į kasečių stovelių, fiksuojamos, pašalinamos kasečių sandarinimo plėvelės,
- į kasečių šulinėlius įstatomi LEV stūmoklių antgaliai,
- surinkimo mėgintuvėliai įstatomi į savo pozicijas kasečių stovelyje ir įpilama po 100 µl *Elution Buffer* tirpalo.

DNR gryninimas:

- lizuotas ląstelių mėginys perkeliamas iš mėgintuvėlio į kasetės šulinėlį,
- įjungiamas MAXWELL 16® INSTRUMENT,
- patikrinama, ar prietaiso nustatymai atitinka „LEV“ konfigūraciją ir „Rsch“ veiklos pobūdį,
- ekrane pasirenkama „Run“ ir paspaudžiamas RUN/STOP mygtukas,
- ekrane pasirenkama „DNA“, paskui – „OK“,
- ekrane pasirenkama „Blood“, paskui – „OK“,
- ekrane pasirodžius nurodymui, atidaromos prietaiso durelės ir paspaudžiamas RUN/STOP mygtukas,
- ant išvažiuosios platformos perkeliamas stovėlis su paruoštomis kasetėmis,
- paspaudžiamas RUN/STOP mygtukas ir, sureagavus platformai, prietaiso durelės uždaromos,
- MAXWELL 16® INSTRUMENT pradeda darbą, ekrane rodomas darbo etapas ir laikas iki darbo pabaigos,
- automatiniam gryninimo procesui pasibaigus, ekrane pasirodo atitinkamas pranešimas,
- paspaudžiamas RUN/STOP mygtukas ir, išvažiavus platformai, nuimamas kasečių stovėlis ir išimami išskirti DNR mėginiai.

2) DNR koncentracijos nustatymas

Reikalinga įranga ir reagentai:

- Spektrofotometras (NANODROP 2000) (Thermo Fisher Scientific, JAV),
- *Vortex* kratytuvas,
- 1,5 ml ependorfiniai mėgintuvėliai,
- Mikropipetės pipetės 0,5–10 µl tūrio,
- Antgaliai mikropipetėms 0,5–10 µl.

Darbo eiga:

- Įjungiama NANODROP kompiuterinė programa.
- Naudojant 0,5–10 µl tūrio mikropipetę ant specialaus detektoriaus užlašinamas distiliuoto vandens lašas.
- Spaudžiamas mygtukas *BLANK*.
- Vandens lašas nuvalomas. Su 0,5–10 µl tūrio mikropipete užlašinamas tiriamo mėginio lašas.
- Spaudžiamas mygtukas *MEASURE*.

II PRIEDAS. MK metodo protokolas

Įranga ir darbo priemonės:

- 96 šulinėlių plokštelė (LC480, Illumina®)
- 96 šulinėlių plokštelės dangtelis (LC480, Illumina®)
- Foliya plokštei uždengti
- Hibridizacijos kamera (Illumina®)
- Purtyklė plokštelėms (Illumina®)
- Centrifuga plokštelėms (Mini Plate Spinner™ Centrifuge)
- Automatiniai mikrodozatoriai (Eppendorf)
- Hibridizacijos dėžutės (Illumina®)
- Hibridizacijos dėžutės tarpikliai (Illumina®)
- HumanCytoSNP-12 mikrolustas (Illumina®)
- Vonelė su lentynomis (Illumina®)
- Plovimo vonelė (Illumina®)
- Vakuuminė džiovinimo kamera (Illumina®)
- iScan™ mikrolustų skeneris (Illumina®)
- Kompiuterinės programos: Illumina® BeadScan™, Illumina® GenomeStudio v3.1, QuantiSNP© v1.0 (sukurta Christopher Yau, Oksfordo universitetas).
- Duomenų bazės naudojamos analizuojant rezultatus, gautus MK metodu: DGV (angl. *Database of Genomic Variants*).

Reagentai:

- MA1 buferis (Illumina® patentas)
- MA2 buferis (Illumina® patentas)
- MSM reagentas (Illumina® patentas)
- 0,1 N NaOH
- FMS reagentas (Illumina® patentas)
- PM1 reagentas (Illumina® patentas)
- 100 % 2-propanolis
- RA1 reagentas (Illumina® patentas)
- PB2 reagentas (Illumina® patentas)
- PB1 reagentas (Illumina® patentas)
- RA1 reagentas (Illumina® patentas)
- XC1 reagentas (Illumina® patentas)
- XC2 reagentas (Illumina® patentas)
- XC3 reagentas (Illumina® patentas)
- TEM reagentas (Illumina® patentas)

- STM reagentas (Illumina® patentas)
- ATM reagentas (Illumina® patentas)
- XC4 reagentas (Illumina® patentas)
- 95 % formamido/1mM EDTA

MK metodo darbo eiga:

Viso genomo amplifikacija

Eiga:

1. Paruošiama 50 ng/μL genomines DNR koncentracija.
2. Į 96 šulinėlių plokštelę įpilama po 20 μL MA1 buferio – į kiekvieną šulinėlį atskirai priklausomai nuo to, kiek yra DNR mėginių.
3. Į šulinėlius įpilama po 4 μL kiekvieno paciento DNR bei po 4 μL NaOH. Plokštelė supurtoma, centrifuguojama ir dedama inkubuotis 10 min. kambario temperatūroje.
4. Po inkubacijos į šulinėlius įpilama po 34 μL MA2 reagento bei po 38 μL MSM reagento. Plokštelė supurtoma 1 min., centrifuguojama 280 g 1 min. ir dedama į hibridizacijos kamerą 20–24 valandoms.

Viso genomo fragmentacija

Eiga:

1. Praėjus inkubacijai, plokštelė centrifuguojama 50 g 1 min.
2. Į kiekvieną šulinėlį su amplifikuota DNR įdedama po 25 μl FMS reagento.
3. Plokštelė supurtoma 1 min. bei centrifuguojama 50 g 1 min. 22 °C temperatūroje.
4. Plokštelė dedama į 37 °C termostatą 1 val.

DNR mišinių precipitacija

Eiga:

1. Į plokštelę įdedama po 50 μL PM1 reagento į kiekvieną šulinėlį.
2. Plokštelė supurtoma 1 min., dedama į 37 °C termostatą 5 min.
3. Plokštelė centrifuguojama 50 g 22 °C temperatūroje 1 min. Į šulinėlius įdedama po 155 μL 100 % 2propanolio.
4. Plokštelė uždengiama dangteliu, lengvai supurtoma ir dedama į šaldytuvą 4 °C 30 min.
5. Praėjus laikui, plokštelė centrifuguojama 3000 g 20 min. 4 °C temperatūroje. Iš kiekvieno šulinėlio nusiurbiamas viršnuosėdinis sluoksnis. Plokštelę džiovinama 1 val. kambario temperatūroje.

DNR mišinių resuspendacija

Eiga:

1. Į kiekvieną šulinėlį įdedama po 23 μL RA1 reagento.
2. Plokštelė uždengiama folija ir dedama į 48 °C Illumina® hibridizacijos kamerą 1 val.
3. Plokštelė supurtoma purtykle 1 min., centrifuguojama 280 g 1 min.

DNR mišinių hibridizacija naudojant Illumina® mikrolustus

Eiga:

1. Plokštelė dedama į 95 °C termostatą. Denatūruojama 20 min.
2. Plokštelė centrifuguojama 280 g 1 min.
3. Ant mikrolustų užlašinama po 15 μL DNR. Kiekvieną DNR mėginį reikia užlašinama ant tam tikro mikrolusto plotelio, kuris yra sunumeruotas ir įvestas į kompiuterį.
4. Mikrolustai sudedami į Illumina® hibridizacijos dėžutes.
5. Illumina® hibridizacijos dėžutes įdedamos į termostatą 48 °C 16–24 val.

Illumina® mikrolustų paruošimas dažyti

Eiga:

1. Paruošiamos dvi vonelės su 200 ml PB1 ir su 150 ml PB1 reagentais.
2. Kiekvienoje vonelėje mikrolustai palaikomi po 1 min.
3. Mikrolustai užtvirtinami dviem metalinėmis juostelėmis ir dedami į Illumina® dėžutes.

Illumina® mikrolustų dažymas

Eiga:

1. Illumina® dėžutės su mikrolustais dedamos į Illumina® vonelę su lentynomis. Vonelėje nustatoma 44 °C temperatūra.
2. Į Illumina® mikrolustų dėžutes įdedama po 150 μL RA1 reagento, inkubuojama 30 s. Ši procedūrą pakartojama penkis kartus.
3. Į Illumina® mikrolustų dėžutes įdedama po 450 μL XC1 reagento, inkubuojama 10 min.
4. Į Illumina® mikrolustų dėžutes įdedama po 450 μL XC2 reagento, inkubuojama 10 min.
5. Į Illumina® mikrolustų dėžutes įdedama po 450 μL TEM reagento, inkubuojama 15 min.
6. Į Illumina® mikrolustų dėžutes įdedama po 450 μL 95% formamido/1mM EDTA, inkubuojama 1 min.

7. Į Illumina® mikrolustų dėžutes įdedama po 450 µL XC3 reagento, inkubuojama 37 °C 20 min.
8. Į Illumina® mikrolustų dėžutes įdedama po 250 µL STM reagento, inkubuojama 37 °C 10 min. Įdedama 450 µL XC3 reagento, inkubuojama 37 °C 1 min. Tada vėl įdedama 450 µL XC3 ir inkubuojama 37 °C 5 min.
9. Į Illumina® mikrolustų dėžutes įdedama po 250 µL ATM reagento, inkubuojama 37 °C 10 min. Įdedama 450 µL XC3 reagento, inkubuojama 37 °C 1 min. Tada vėl įdedama 450 µL XC3 ir inkubuojama 37 °C 5 min.
10. Į Illumina® mikrolustų dėžutes įdedama po 250 µL STM reagento, inkubuojama 37 °C 10 min. Įdedama 450 µL XC3 reagento, inkubuojama 37 °C 1 min. Tada vėl įdedama XC3 ir inkubuojama 37 °C 5 min.
11. Į Illumina® mikrolustų dėžutes įdedama po 250 µL ATM reagento, inkubuojama 37 °C 10 min. Įdedama 450 µL XC3 reagento, inkubuojama 37 °C 1 min. Tada vėl įdedama XC3 ir inkubuojama 37 °C 5 min.
12. Į Illumina® mikrolustų dėžutes įdedama po 250 µL STM reagento, inkubuojama 37 °C 10 min. Įdedama 450 µL XC3 reagento, inkubuojama 37 °C 1 min. Tada vėl įdedama XC3 ir inkubuojama 37 °C 5 min.
13. Illumina® mikrolustai nuplaunami 310 ml PB1 reagento 5 min.
14. Illumina® mikrolustai nuplaunami XC4 reagento 5 min.
15. Illumina® mikrolustai džiovinami 50–55 min. kambario temperatūroje. Išdžiovinus nuvaloma mikrolustų apatinė dalis etanolio tirpalu.

Analizavimas

Eiga:

1. Pirminiai rezultatai analizuojami pasitelkiant Illumina® GenomeStudio v3.1 programą. Ši programa padeda iškart vizualiai nustatyti stambiausius chromosomų struktūros persitvarkymus (>1–2 Mb). Illumina® GenomeStudio v3.1 pateikia nuskenuotą visą paciento kariotipą. Galima analizuoti kiekvieną chromosomą atskirai ir įvertinti Log R santykį bei B alelio dažnumą.
2. Rezultatai apdorojami QuantiSNP© v1.0 programa. Šia programa yra nustatomos tikslios delecijas / duplikacijas ribojančių žymenų pradžios ir pabaigos nukleotidų padėtys, žymenų pavadinimai ir pakitusios srities dydis.
3. Visos genominės aberacijos yra patikrinamos DGV (angl. *Database of Genomic Variants*) duomenų bazėje. Bendroje populiacijoje pasitaikantys variantai yra atmetami kaip nepatogeniniai.

4. Pasinaudojant *Ensembl* ir OMIM duomenų bazėmis yra analizuojami genomo regionai, kuriuose yra nustatyta aberacijų, taip ieškoma genų, kurie būtų susiję su leukemogeneze ŪLL.

III PRIEDAS. HRM tyrimo metodas

1) *TP53* geno mutacijų nustatymas HRM metodu

Įranga ir darbo priemonės:

- Realaus laiko termocikleris, turintis HRM funkciją (Biorad CFX 96),
- *Vortex* tipo kratytuvas (BIOSAN),
- Centrifuga 96 šulinėlių plokštelei,
- 0,5 ar 1,5 ml mėgintuvėliai,
- 96 šulinėlių plokštelė, skirta realaus laiko termocikleriui,
- Skaidri plokštelė, skirta realaus laiko termocikleriui,
- Mikropipetės 1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l tūrio,
- Mikropipečių antgaliai 1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l tūrio.

Reagentai:

Tyrimui naudojami *TP53* genui (Bastien R et al., 2008), apimantys 2–11 egzonus.

TP53 geno mutacijų nustatymo HRM metodu darbo eiga:

Procedūros metu vienam tiriamosios DNR amplikonui reikia turėti dviejų referentinių DNR amplikonų, vienas iš jų gali būti žinomas teigiamas kontrolinis mėginys (su nustatyta *TP53* geno mutacija).

Reagentų mišinys ruošiamas pagal VULSK MMS laboratorijoje esamą schemą (2 schema). Pradmenų mišiniai ruošiami atskirai poromis, sumaišant pirminės ir atvirkštinės krypties oligonukleotidus.

Ruošiant reakcijas, kai į bendrą mėgintuvėlį yra įlašinama genomine DNR, pradmenys įdedami atskirai pagal tiriamo amplikono eiliškumą.

Reakcijų paruošimo metu yra sukuriama lentelė, sunumeruojami mėgintuvėliai / šulinėliai:

2 schema. Realaus laiko PGR mišinys

RQ-PGR reagentų mišinys	1x reakcija
dH2O	7,4 µl
2x Master Mix (Thermo Fisher)	10 µl
DNR	1 µl
Bendras tūris	20 µl
Pradmenys (pirminės, atvirkštinės krypties)	1,6 µl

Į atitinkamas plokštelės pozicijas išpilstoma po 17,4 µl paruošto mišinio, į kiekvieną šulinėlį kruopščiai įpilama po 1,6 µl reikiamų pradmenų mišinio ir 1 µl DNR. Užklijuojama speciali sandarinimo plokštelė, nubraukiant su specialia rankenėle. Plokštelė centrifuguojama 3–5 min. 4000 RPM greičiu. Plokštelė dedama į realaus laiko termociklerį. Pagal termociklerio gamintojo instrukcijas sudaroma temperatūrinių ciklų programa *TP53* geno fragmentų amplifikacija ir HRM (3 schema).

3 schema. Termociklerio temperatūrinių ciklų programa HRM reakcijai

Temperatūra	Trukmė	Ciklai
94 °C	5 min.	1x
94 °C	2 sek.	45x
57 °C	6 sek.	
72 °C	6 sek.	
HRM		
94 °C	1 min.	
40 °C	1 min.	
55 °C→95 °C	1.7 °C/sek., 25 rinkimai/°C	

Rezultatų analizavimas:

Rezultatai analizuojami *BioRad* programa *Precision Melt Analysis*. Vertinamas ampliconų lydymosi grafikų profilis, referentiniu ampliconu pasirenkant ampliconą be mutacijos. Programa automatiškai nustato profilių skirtumus ir priskiria skirtingas spalvas besiskiriančioms kreivėms. Analizei naudojamas 0,3–0,5 jautrumo koeficientas. Nustačius lydymosi kreivių profilių skirtumus, mutacijas reikia patvirtinti kitu metodu (pvz., Sanger sekoskaita).

2) *TP53* geno mutacijų patvirtinimas Sanger sekoskaitos metodu

Įranga ir darbo priemonės:

- Termocikleris (Biometra TProfessional Standard 96).
- ABI genetinis analizatorius 3500 (Applied Biosystems).
- *Vortex* tipo kratytuvas (Biosan).
- Laminaras reakcijos mėginiams ruošti (Holten).
- Centrifuga 96 šulinėlių plokštelėms (Eppendorf 5430, rotorius A-2-MTP).
- PGR mėgintuvėliai (0,5 ml; 0,2 ml).
- 96 šulinėlių plokštelės (0,2 ml).
- Mikropipetės 1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl tūrio.
- Reguliuojamo tūrio 8 kanalų automatinės pipetės 0,5–10 µl; 5 – 50 µl tūrio.
- Antgaliai automatinėms pipetėms 1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl tūrio.

Reagentai:

- ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 sekoskaitos rinkinys (Applied Biosystems).
- Atitinkamų sekoskaitos pradmenų mišiniai (3,2 nmol/µl koncentracijos).
- 3 M Na-acetatas pH 5,2.
- 125 mM EDTA pH 8,0.
- 80 % etanolis.
- 96 % etanolis.
- Hi-Di formamidas (ThermoFisher).

TP53 geno mutacijų patvirtinimo sekoskaita darbo eiga:

Naudojamas ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 sekoskaitos rinkinys. 96 šulinėlių plokštelėje vienam mėginiui sumaišoma 2 µl BigDye Terminator v1.1 tirpalo, 2 µl atitinkamo sekoskaitos pradmens tirpalo, pridedama atitinkamas kiekis matricos ir H₂O iki 10 µl (4 schema).

4 schema. Sekoskaitos reagentų mišinys

Matrica	Kiekis
PGR produktai:	
100–200 bp	1–3 ng
200–500 bp	3–10 ng
500–1000 bp	5–20 ng
1000–2000 bp	10–40 ng
>2000 bp	20–50 ng
Viengrandė DNR	25–50 ng

- **Pastaba:** BigDye Terminator v1.1 tirpalas gali būti maišomas su 5× sekoskaitos buferiniu tirpalu santykiu 1:2. Reakcijai imama 2 µl gauto tirpalo.

Paruošti reakcijų mišiniai dedami į termociklerį. Vykdoma amplifikavimo programa:

<i>Žingsnis</i>	<i>Temperatūra</i>	<i>Laikas</i>	<i>Ciklai</i>
Pradinė denatūracija	96 °C	1 min.	
Denatūracija	96 °C	10 s	25
Hibridizacija	50 °C	5 s	
Sintezė	60 °C	4 min.	
Šaldymas	4 °C	∞	

Pastaba: temperatūros kitimo greitis 1 °C/s.

Reakcijos produktų gryninimas ir paruošimas sekoskaitai:

- Paruošiamas EDTA/Na-ace tirpalas: 125 mM EDTA pH 7,0 sumaišoma su 3 M Na-acetatu pH 5,2 santykiu 1:1.
- Naudojant 8 kanalų automatinį dozatorių, 10 µl 1 PGR reakcijos mišinio sumaišoma su 2 µl EDTA/NaOAc tirpalo ir 30 µl 96 % etanolio.
- 1 min mišinys purtomas purtyklėje.
- Centrifuguojama 30 min. 2000 g greičiu.
- Nucentrifugavus plokštelė apverčiama ant sugeriamojo popieriaus (netrankyti, nekratyti ir pan.).
- Centrifuguojama plokštelė apverstoje padėtyje ant sugeriamojo popieriaus 30 s 185 g greičiu.
- Įpilama 50 µl 80 % etanolio (nepipetuoti).
- Centrifuguojama 5 min. 2000 g greičiu.
- Nucentrifugavus plokštelė apverčiama ant sugeriamojo popieriaus.
- Centrifuguojama plokštelė apverstoje padėtyje ant sugeriamojo popieriaus 30 s 185 g greičiu.
- Plokštelė galutinai išdžiovinama 15 min. kambario temperatūroje, tamsoje.
- Įpilama 10–15 µl Hi-Di formamido, plokštelė nusukama 30 s 185 g greičiu.
- Plokštelė denatūruojama 95 °C, 2 minutes.
- Atšalus iki 4 °C, mėginiai perkeltami į sekoskaitos plokštelę ir analizuojami ABI genetiniu analizatoriumi 3500. Paruošti mėginiai frakcionuojami. Gautos DNR sekos analizuojamos Vector NTI 9 kompiuterine programa, norint patvirtinti HRM nustatytas *TP53* geno mutacijas.

III PRIEDAS. Bioetikos leidimas



VILNIAUS UNIVERSITETAS
VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2018-12-04 Nr.158200-18/12-1087-581

Tyrimo pavadinimas:

Ūminių leukemijų genominių aberacijų tyrimai

Protokolo Nr.: ALL-2018
Versija: 2.0
Data: 2018 11 30

Informuoto asmens sutikimo forma: 2
2018 11 30

Pagrindinis tyrėjas: **Vaidas Dirsė**

[staigos pavadinimas: VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos
Adresas: Santariškių g. 2, Vilnius

Leidimas galioja iki: **2023 01**

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2018/12), vykusio 2018 m. gruodžio 4 d. sprendimu.

Pirmininkas



prof. dr. (HP) Saulius Vosylius

Viešoji įstaiga
Universiteto g. 3
01513 Vilnius

Duomenys kaupiami ir saugomi
Juridinių asmenų registre
Kodas 211950810

Komiteto duomenys:
M. K. Čiurlionio g. 21, LT-03101 Vilnius
Tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@m.f.vu.lt
www.mf.vu.lt/lt/content/vrbtek/taisyjeos

9. APIE AUTORIŲ

Asmeniniai duomenys: Vaidas Diršė, 1985-05-10.

Kontaktinė informacija: Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Klinikinės medicinos instituto Vidaus ligų, šeimos medicinos ir onkologijos klinika, Santariškių g. 2, LT-08661 Vilnius.

El. pašto adresas: vaidas.dirse@santa.lt

Išsilavinimas:

2004–2008 m. Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, molekulinės biologijos studijų programa, biologijos bakalauro kvalifikacinis laipsnis (BA Nr.0714663)

2008–2010 m. Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, genetikos studijų programa, biologijos magistro kvalifikacinis laipsnis (MA Nr. 1040056)

2015–2019 m. Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, Klinikinės medicinos institutas, Vidaus ligų, šeimos medicinos ir onkologijos klinika, doktorantas

Darbinė patirtis:

2008–2011 m. VU MF Žmogaus ir medicininės genetikos katedra, pareigos – jaunesnysis mokslo darbuotojas;

2010–2011 m. VULSK Medicininės genetikos centras, Citogenetikos laboratorija, pareigos – medicinos genetikas;

Nuo 2011 m. VULSK Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centras, Molekulinės medicinos skyrius, Molekulinės medicinos laboratorija, pareigos – medicinos biologas.

Narystės profesinėse organizacijose:

Lietuvos hematologų draugijos narys

Santaros klinikų medicinos darbuotojų profesinė sąjunga, pirmininkas

Skandinavų Europos vaikų onkologų ir hematologų asociacija (NOPHO), citogenetikos komiteto narys

Stażuotės:

Tartu universitetas, Molekulinės ir ląstelės biologijos institutas.

Tarptautinė mokykla „1st International workshop on Cancer Genetic & Cytogenetic Diagnostics“, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegenas, Olandija, 2013.

Tarptautinė mokykla „4th International workshop on Cancer Genetic & Cytogenetic Diagnostics“, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegenas, Olandija, 2016.

Tarptautinė mokykla „Cytogenetics and Genetics Applied for the study of Hematological Neoplasms“, Institut de Recerca Contra la Leucemia Josep Carreras, Barselona, Ispanija, 2017.

Parengti vieši tobulinimosi seminarai VUL Santaros klinikose:

2011-12-28, V. Dirsė, Klinikinė citogenetika onkohematologijoje: chromosomų vizualizacijos, nomenklatūros ir interpretacijos principai bei prognostinių grupių sudarymas.

2012-03-14, V. Dirsė, Citogenetinių prognostinių grupių reikšmė: ŪML ir MDS.

2012-05-02, V. Dirsė, SNP molekulinio kariotipavimo metodo principai ir pritaikymas onkohematologijoje.

2012-06-27, V. Dirsė, SNP molekulinio kariotipavimo rezultatai – ŪLL. Genetinių tyrimų algoritmas HOTC.

2012-09-26, V. Dirsė, SNP-A tyrimai LLL, citogenetikos ypatybės.

2012-11-15, V. Dirsė, Ph-like citogenetika. IKAROS, PAX5 aberacijų biologiniai mechanizmai ir klinikinė reikšmė ALL. Suaugusiųjų ALL SNPa rezultatai.

2015-01-21, V. Dirsė, E. Gineikienė, A. Bertašiūtė, Sisteminė mastocitozė bei su ja siejamos cKIT bei kitų genų mutacijos.

2015-08-12, V. Dirsė, Somatinės mutacijos ir klininė hemopoezė aplastinės anemijos metu.

2015-11-11, V. Dirsė, Genų mutacijų spektras, sergant MDS bei AA, bei jų klinikinė reikšmė.

2015-12-10, V. Dirsė, E. Vitkevičiūtė, Nauji glioblastomų molekuliniai žymenys.

2015-12-28, V. Dirsė, BCR-ABL1 like ALL: molekuliniai mechanizmai ir klinikinė reikšmė. IKAROS delecija: molekulinė biologija, prognostinė reikšmė.

2016-11-03, V. Dirsė, R. Norvilas, CDK4/6 kelio aktyvacija onkologijoje, molekulinų biomarkerių detekcija ir jų inhibicijos biologija.

2017-01-11, V. Dirsė, Ibrutinibas DLBLL gydyti, molekuliniai mechanizmai.

2017-05-18, V. Dirsė, Preleukeminė kloninė hematopoezė ŪML. Praktiniai pavyzdžiai HOTC. Preleukeminė hematopoezė donoruose esant aKLLT.

2017-07-19, V. Dirsė, Telomerų ilgis mielomoje: kritinis veiksnys išgyvenamumo analizėje.

2018-02-01, V. Dirsė, E. Preikšaitienė, Su MDS/AML susiję paveldimi sindromai bei genetinio ištyrimo / konsultacijų taktika HOTC.

2018-10-24, V. Dirsė, A. Dapkevičiūtė, Telomerų ilgių, telomerazių ir jų genų mutacijų reikšmė onkohematologijoje. HOTC klinikinių atvejų analizė.

Konferencijos:

Konferencija „Baltic Hematology Conference“, 2014, Vilnius, Lietuva.

Konferencija „Baltic Hematology Conference“, 2016, Ryga, Latvija.

Konferencija „Vaikų ūmi mieloblastinė leukemija: gydymo ir diagnostikos pasiekimai Lietuvoje, ateities gairės“, Vilnius, Lietuva.

Konferencija „European Society of Human Genetics“, Milanai, Italija, 2018.

Konferencija „European human genetics conference“, Giottenburgas, Švedija, 2010.

Konferencija „European human genetics conference 2011“, Amsterdamas, Olandija, 2011.

Konferencija „18th Congress of the European Hematology Association“, Stokholmas, Švedija, 2013.

Konferencija „European Society of Human Genetics conference“, Barselona, Ispanija, 2016.

Konferencija „European Hematology Association conference“, Madridas, Ispanija, 2017.

Laimėtos premijos:

Vilniaus universiteto vienkartinė tikslinė stipendija už gerus mokslinės veiklos rezultatus 2016-04-18

Vilniaus universiteto vienkartinė tikslinė stipendija už gerus mokslinės veiklos rezultatus 2016-11-17

Vilniaus universiteto vienkartinė tikslinė stipendija už gerus mokslinės veiklos rezultatus 2017-04-18

Vilniaus universiteto vienkartinė tikslinė stipendija už gerus mokslinės veiklos rezultatus 2017-12-11

Vilniaus universiteto vienkartinė tikslinė stipendija už gerus mokslinės veiklos rezultatus 2018-05-17

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius
info@leidykla.vu.lt
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 15 egz.