

**Univerzita Karlova v Praze**  
**2. lékařská fakulta**  
**Laboratoř molekulární genetiky**  
**Klinika dětské hematologie a onkologie**

**Přestavby MLL genu a jejich klinický význam**  
**u dětských pacientů s akutními leukémiemi**

**Školitel: Doc. MUDr. Jan Trka PhD.**

**Praha 2007**

**Leona Řezníčková**

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. MUDr. J. Trkovi, PhD., MUDr. J. Zunovi, PhD. a MUDr. E. Froňkové PhD. za odborné rady a čas, který mi věnovali.

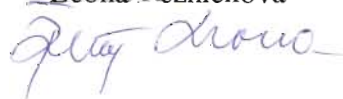
Bc. K. Mužikové děkuji za uvedení do metodických postupů. Poděkování patří také všem centrům PSDH ČR a jejich cytogenetickým laboratořím.

V neposlední řadě děkuji všem ostatním kolegům a přátelům z pracovní skupiny CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague).

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím zdrojů uvedených v Seznamu literatury.

V Praze 10.4.2007

Leona Řezníčková  


## Seznam zkratek

ABL	protoonkogen v oblasti 9q34
AHL	akutní hybridní leukémie
AF4	partner MLL genu, lokalizovaný v oblasti 4q21
AF6	partner MLL genu, lokalizovaný v oblasti 6q27
AF9	partner MLL genu, lokalizovaný v oblasti 9p22
AF10	partner MLL genu, lokalizovaný v oblasti 10p12
AL	akutní leukémie
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
AML1	“acute myeloid leukemia 1 gene”
BCR	zlomové místo genu (breakpoint cluster region)
APBB1IP	amyloid beta (A4) precursor protein-binding
bp	„base pair“
CD	cluster of differentiation
CBFbeta	“core binding factor beta gene”
cDNA	komplementární DNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELL	fúzní partner MLL genu lokalizovaný v oblasti 19p13.1
ENL	fúzní partner MLL genu lokalizovaný v oblasti 19p13.3
ETO	“eight twenty - one gene”
FAB	French–American-British kooperative group
FOXO3A	forkhead box O3A
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
HOX	homeobox gen
MAML2	mastermind-like 2
MLL	protoonkogen v oblasti 11q23 ( z angl.myeloid./lymfoid leukemia)
MDS	myelodysplastický syndrom
MRN	minimální reziduální nemoc

mRNA	mediátorová RNA
MYH11	„smooth muscle myosin heavy chain 11 gene“
NG2	chondroitin sulfate proteoglycan neuron-glia antigen 2
PCR	polymerázová řetězová reakce
PML	“promyelocytic leukemia gene”
RARalfa	alfa receptor kyseliny retinové
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální RNA
RT-PCR	reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce
SCT	stem cells transplantation
Taq	Thermus aquaticus
WT1	Wilms tumor homolog

# Obsah

Poděkování .....	2
Čestné prohlášení .....	3
Seznam zkratk .....	4
1. Úvod .....	7
1.1 Nádorová onemocnění v dětském věku .....	7
1.1.1 Rozdělení a celosvětová incidence .....	7
1.2 Charakteristika a molekulární podstata akutních leukémií .....	9
1.3 Akutní lymfoblastická leukémie v dětském věku .....	10
1.3.1 Diagnostika ALL .....	11
1.4 Akutní myeloidní leukémie v dětském věku (AML) .....	13
1.4.1 Diagnostika AML .....	14
1.5 Sekundární AML .....	16
1.6 Minimální reziduální nemoc (MRN) .....	17
1.6.1 Metody založené na RNA .....	17
1.6.2 Metody založené na DNA .....	18
1.7 MLL gen (myeloid/lymfoid or mixed lineage leukemia) .....	19
2. Cíl práce .....	23
3. Pacienti .....	24
4. Metodika .....	24
4.1 Izolace mononukleárních buněk pomocí hustotního gradientu .....	24
4.2 Izolace celkové RNA z mononukleárních leukocytů – modifikace metody dle Chomczynski a Sacchi (1987) – modifikace dle Trizolu .....	25
4.3 Ověření kvality RNA na přístroji Agilent .....	27
4.4 Reverzní transkripce .....	28
4.5 Vyšetření kontrolního genu ABL .....	29
4.6 Příprava 2% agarózového gelu .....	31
4.7 Stanovení přestaveb genu MLL metodou multiplex-reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (multiplex RT-PCR) .....	32
4.8 Izolace DNA pomocí přístroje BioRobot (QIAGEN) .....	35
4.9 Statistické zpracování .....	35
5. Výsledky .....	36
5.1 Výsledky fúzních genů .....	36
5.1.1 Výsledky fúzních genů u pacientů s kojeneckou ALL diagnostikovanou do 1 roků věku .....	36
5.1.2 Výsledky fúzních genů u pacientů s AML subtypů M4, M5 .....	38
5.1.3 Výsledky fúzních genů u pacientů se sekundární leukémií .....	40
5.1.4 Výsledky pacientů s B-prekurzovou leukémií .....	41
5.2 Sledování MRN u pacienta s prokázanou přestavbou genu MLL .....	42
6. Diskuze .....	44
7. Závěr .....	46
8. Abstrakt .....	47
9. Summary .....	48
Příloha .....	51

# 1. Úvod

V mnohastupňovém procesu vývoje hematopoetických buněk může docházet k celé řadě změn na DNA úrovni, vedoucích k poruchám normální proliferace a diferenciaci buněk různého stupně zralosti. Tyto změny pak mohou vést ke vzniku benigních i maligních onemocnění krvinek.

Akutní leukémie je nejčastějším maligním onemocněním dětského věku – v České republice je ročně diagnostikováno asi 90-100 nových leukémií u pacientů mladších 18 let. Za posledních 40-50 let se dětská akutní leukémie změnila z fatální nemoci na nemoc léčitelnou a ve většině případů vyléčitelnou. Pomocí moderních metod jako je chemoterapie, ozařování či transplantace kostní dřeně lze v dnešní době vyléčit až 80% dětí s nově diagnostikovanou akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) a asi 50% dětí s akutní myeloidní leukémií (AML). Stále však zůstává část dětí, pro něž je bohužel tato choroba nevyléčitelná. Relaps, čili znovuobjevení nemoci, je pro pacienta nepříznivá událost, významně snižující jeho další šance na přežití. Tím se leukémie mění v nemoc chronickou, která vyžaduje pokračující, několik let trvající náročnou léčbu. Ta je pro pacienta i jeho okolí velice náročná jak fyzicky tak i psychicky. Dokud budou k léčbě tohoto onemocnění používány chemoterapie a transplantace kostní dřeně, nepodaří se také zcela zabránit náhlým a neočekávaným úmrtím na komplikace této léčby [1].

## 1.1 Nádorová onemocnění v dětském věku

### 1.1.1 Rozdělení a celosvětová incidence

Nádorové bujení v dětském věku je velmi vzácné onemocnění s věkovou standardizovanou incidencí obvykle mezi 70-160 případy na 1 milion dětí ve věku 1-14 let. Oproti dospělým pacientům, u nichž patří k nejčastějším nádorům karcinomy, jsou dětské malignity z histologického hlediska velmi rozmanité. Podle „International classification of childhood cancer“ jsou tato onemocnění rozdělena do 12 hlavních skupin, mezi které patří leukémie, nádory mozku a míchy, lymfomy, nádory vycházející ze sympatiku, retinoblastomy, nádory ledvin, jater, nádory kostí, nádory měkkých tkání, nádory vycházející z gonadálních zárodečných buněk a další nespecifikované novotvary.

V převládající bělošské populaci Evropy, Ameriky a části východní Asie představuje leukémie asi 1/3 dětských nádorů, s incidencí 35-50 případů na milion dětí. V jižní Asii, na Středním východě a v černošské populaci USA a Afriky je toto číslo nižší, většinou méně než 30 případů na milion dětí [2].

Asi 80% dětských leukémií představují akutní lymfoblastické leukémie, jejichž vysoká incidence (40 případů/milion dětí) je zaznamenávána v bělošské populaci severní Ameriky, západní Evropy a Oceánie a také v Číně, HongKongu a Singapuru. Nižší incidence je ve východní Evropě, Japonsku, Latinské Americe a opět mezi černošskou populací. Leukémie z T řady mají přibližně stejnou incidenci na celém světě, takže rozdíly připadají zejména na ALL z B řady, neboť u rizikovějších etnických skupin je incidence tohoto typu leukémie vyšší. V některých oblastech může důsledkem vzácnějšího výskytu ALL z B řady dokonce převládat T-buněčná leukémie. Obecně lze říci, že incidence ALL koreluje s úrovní socioekonomického vývoje tak, že je vyšší v rozvinutějších oblastech, což naznačuje, že rizikové faktory spojené s životním prostředím jsou u těchto nádorových onemocnění velice důležité[2]. Tento jev je i příčinou zvýšení incidence ALL v České republice ve věkové skupině předškolních dětí během 90. let na hodnotu podobnou státům západní Evropy [3].

Akutní myeloidní leukémie, jejichž incidence je 4-10 případů na 1 milion dětí, opět vykazují velké variace v procentuálním zastoupení akutních leukémií (AL) mezi různými oblastmi po celém světě. Relativně vyšší výskyt AML je obvykle důsledkem nižší incidence ALL spíše než zvýšeným rizikem AML. Vysoký výskyt tohoto typu byl zaznamenán u Maorů na Novém Zélandu a u obyvatel Havaje. Příčina tohoto jevu zatím není známa, ale vzhledem k tomu, že se jedná vždy o etnickou skupinu, předpokládá se, že významným faktorem bude genetická predispozice [2].



## 1.2 Charakteristika a molekulární podstata akutních leukémií

Obecná charakteristika leukémií je popisuje jako onemocnění, která vznikají hromaděním mutací v genomu kmenových buněk nebo progenitorů jednotlivých řad hematopoézy. Změny v genomu mohou být jemné, jako jsou bodové mutace, při kterých dochází v DNA k záměně jedné báze za druhou, až po změny v počtu chromosomů. Změny v genomu vznikají u převážné většiny v somatických buňkách – buňkách hematopoézy - v průběhu života jedince a jen zcela výjimečně mají dědičný základ. Většinu genů odpovědných za vznik leukémií lze v zásadě rozdělit do dvou kategorií: onkogeny a antionkogeny, nazývané též nádorové supresory. Onkogeny jsou geny, které se účastní regulace proliferace buněk a jako nemutované protoonkogeny řídí procesy proliferace v normálních buňkách. Mutace onkogenů (respektive protoonkogenů) vedou obecně ke zvýšené a nekontrolovatelné proliferaci buněk. Antionkogeny naopak tlumí proliferaci a některé z nich stimulují diferenciaci a apoptózu buněk. Jejich vyřazení z funkce mutací tedy podporuje proliferaci buněk a inhibuje jejich diferenciaci a apoptózu [1].

Jak už bylo zmíněno, akutní leukémie se dělí na akutní lymfoblastické a akutní myeloidní leukémie. Slovo akutní naznačuje, že jde o onemocnění s prudkým nástupem, velmi často u osob bez jakékoliv známé hematologické anamnézy. První příznaky se objevují zpravidla jen několik dnů či týdnů před zjištěním definitivní diagnózy. Termín akutní rovněž odráží průběh nemoci, neboť neléčená či nedostatečně léčená choroba pacienta zahubí během několika týdnů. Dnešní léčba leukémií patří celkově mezi nejnáročnější onkologické postupy, ale právě díky moderním terapeutickým protokolům bylo možno výrazně zvýšit procento vyléčených pacientů [1]

Prvním a nejdůležitějším diagnostickým cílem je rozlišení mezi AML a ALL. Podmínkou správné diagnózy je morfologické, cytochemické, cytogenetické a imunologické vyšetření kostní dřeně a periferní krve. Hlavní kritéria pro ALL a AML, zahrnující morfologické charakteristiky, karyotypické charakteristiky a imunofenotyp, jsou shrnuta v Tabulce 1.

	ALL	AML
<b>morfologie</b>	žádná granula žádné Auerovy tyče	obvykle se mohou vyskytovat Auerovy tyče
<b>imunofenotyp</b>	B-řada: CD 19+, CD10+ T-řada: cyCD3+, CD7+	panmyeloidní antigeny CD13+, CD33+, CD65
<b>karyotyp</b>	t(8;14) (B-ALL) t(9;22) t(1;19) (pre- B-ALL) t(11;14) (T-ALL) t(4;11) (pro- B-ALL)	t(8;21) (FAB M2) t(15;17) (FAB M3) t(9;11) (FAB M5) inv(16) (FAB M4eo) monozomie 7 trizomie 8

Tabulka 1. Rozdílné znaky ALL a AML (Starý *et al.* 2002).

### 1.3 Akutní lymfoblastická leukémie v dětském věku

Akutní lymfoblastická leukémie je nejčastějším nádorovým onemocněním u dětí, tvoří 80% leukémii dětského věku. Ročně v České republice onemocní 65-70 dětí. Jejich prognóza se v minulých desetiletích dramaticky zlepšila - procento trvale vyléčených dětí a adolescentů dosahuje 80% [4-7]. Stalo se tak především díky použití sjednocených léčebných protokolů, využívajících kombinace cytostatik vybrané v randomizovaných studiích. Důležitým faktorem je i kvalitní podpůrná péče, umožňující nasazení vysokodávkované chemoterapie. Přes tyto pokroky je zřejmě pro část pacientů intenzita léčby stále příliš vysoká, s rizikem pozdních následků včetně sekundárních malignit. Malou skupinu dětí s vysoce rizikovými leukémiemi nelze pomocí stávajících prostředků vyléčit vůbec.

ALL u dětí vzniká velmi pravděpodobně jako abnormální odpověď organismu na běžné virové infekce u predisponovaných jedinců. Vrchol výskytu dětské ALL je mezi dvěma až pěti lety života, což je období vývoje imunity proti nejčastějším virovým infekcím. Teorie dvou mutací genetického materiálu buňky – jedné prenatalní, vzniklé in-utero, a druhé postnatální, způsobené důsledkem virové infekce, je platná pravděpodobně pro předškolní nemocné. Dokladem pro prenatalní iniciaci leukémie jsou studie, které nacházejí identické klonální abnormality u monozygotních dvojčat s ALL a nález buněk s identickou klonální přestavbou při diagnóze leukémie a v kapkách

## **Genetické změny leukemických buněk**

Chromosomální klonální změny se nacházejí u 90% dětských ALL. V polovině případů jsou nacházeny translokace. Změny genotypu leukemické buňky mají zásadní význam pro prognózu.

### ***Změny v počtu chromosomů***

U blastů ALL pravidelně nacházíme získané genetické abnormality, které umožňují vysvětlit patogenezi a značně ovlivňují prognózu onemocnění. Přibližně čtvrtina případů vykazuje zvýšení počtu chromosomů v buňce – **hyperdiploidii** – definovanou jako >50 chromosomů v leukemické buňce. Hyperdiploidní ALL se obvykle pojí s imunofenotypem cALL a nízkou leukocytózou. Nevyskytuje se u kojeneckých leukémií a u T-ALL. Téměř tetraploidní případy (počet chromosomů 82-94) jsou vzácné a mají horší prognózu než ostatní typy hyperdiploidní ALL.

**Hypodiploidie** je u dětských ALL vzácná. Vyskytuje se pouze u 3-9% pacientů, z nichž 80% má počet chromosomů 45. Téměř haploidní počet chromosomů je vzácný a tyto děti mají extrémně špatnou prognózu [1].

### ***Chromosomální translokace***

Skoro třetina ALL vykazuje chromosomální translokace při absenci změn počtu chromosomů. Byly popsány čtyři nejčastější translokace, z nichž každá definuje unikátní podskupinu pacientů.

#### **TEL/AML1**

Nejčastější translokací s výskytem až u 25% dětských ALL je t(12;21)(p13;q22) a jejím důsledkem je vznik fúzního genu TEL/AML1. TEL/AML1 pozitivní leukémie vycházejí z prekurzorů B-lymfatické řady (cALL nebo preB ALL), mají vrchol mezi 2-5 lety života, blasty často nesou na svém povrchu myeloidní znaky. Jde o prognosticky velmi příznivou formu leukémie, šance na vyléčení jsou 80-90% [1].

## **BCR/ABL**

Fúzní transkript BCR/ABL je produktem translokace  $t(9;22)(q34;q11)$ , charakteristické pro chronickou myeloidní leukémií (CML). Protein jím kódovaný má alterovanou tyrosinkinázovou aktivitu, která je zodpovědná za maligní transformaci. Vyskytuje se u 3-5% dětských ALL a až u 20% ALL dospělého věku [8]. BCR/ABL pozitivní ALL patří k nejobtížněji léčitelným ze všech dětských ALL.

## **E2A/PBX1**

Translokace  $t(1;19)(q23;q13)$ , charakterizovaná fúzním genem E2A/PBX1 a preB imunofenotypem, se vyskytuje asi u 5-8% dětí [8]. Původně byla považována za prognosticky nepříznivou, ale na moderních terapeutických protokolech jsou výsledky léčby pacientů s touto translokací stejné jako výsledky dětí bez rizikových faktorů.

## **Přestavby dlouhého raménka chromosomu 11 (11q 23)**

Gen MLL (mixed lineage leukemia) na chromosomu 11 se účastní translokací s více než 80 partnerskými geny u asi 6% dětských ALL. Nejčastější translokací, postihující chromosom 11q23, je u dětské ALL  $t(4;11)(q21;q23)$ , jejímž produktem je fúzní gen MLL/AF4. Tato translokace se vyskytuje u 50% kojeneckých ALL a postihuje zejména děti do 6 měsíců.[8]. Sdružuje se s nezralým proB genotypem, expresí molekuly NG-2 (chondroitin sulfate proteoglycan neuron-gial antigen 2) a extrémně nepříznivou prognózou u dětí do 1 roku. Molekula NG-2 bývá nalezena na povrchu blastů u dětských AML a ALL. Byla zjištěna korelace exprese NG-2 molekuly s přestavbami genu MLL u těchto leukémií[9]. O fúzním genu MLL/AF4 i o dalších fúzních partnerech genu MLL je podrobněji pojednáno dále.

## **1.4 Akutní myeloidní leukémie v dětském věku (AML)**

Akutní myeloidní leukémie (AML) je heterogenní onemocnění vycházející z myeloidní kmenové buňky, která má značnou diferenciací šíři. Proto může být leukemickým procesem postižena granulocytární, monocytární, erytroidní i magakaryocytární řada. Na rozdíl od dospělých AML tvoří akutní myeloidní leukémie pouze 15% leukémií dětského věku. S malými výjimkami je biologie dětských

myeloidních leukémií stejná jako u dospělých. Výsledky léčby AML jsou jednoznačně horší než výsledky léčby dětské ALL. V posledních 15 letech ale došlo i u dětské AML k významnému zlepšení. Intenzivní indukční terapií a následnou konsolidací, intenzifikací a udržovací léčbou se daří dosáhnout dlouhodobého přežití bez známek nemoci u více než 50% pacientů [1].

#### **1.4.1 Diagnostika AML**

##### **Morfologie**

AML je morfologicky heterogenní nemoc. Světová zdravotnická organizace (WHO) navrhla v roce 2004 nové rozdělení podskupin AML na základě jak morfologických tak i cytogenetických charakteristik [10]. Přesto je však v praxi stále používané rozdělení z roku 1976, které navrhla „French-American-British (FAB) cooperative group“ vycházející také z morfologických a cytochemických znaků. Podle FAB klasifikace rozdělujeme AML na tyto subtypy:

- M0** – akutní leukémie s minimálními známkami myeloidní diferenciace (tzv. časná myeloidní leukémie)
- M1** – akutní myeloidní leukémie bez vyžívání
- M2** - akutní myeloidní leukémie s vyžíváním
- M3** – akutní promyelocytární leukémie, do této skupiny patří podskupina M3v – variantní mikrogranulární leukémie M3
- M4** - akutní myelomonocytární leukémie, do této skupiny patří také M4eo – varianta s eozinofilií
- M5** – akutní monocytární leukémie
- M6** – erytroleukémie
- M7** – akutní megakaryoblastická leukémie

Zastoupení jednotlivých subtypů je u dětí podobné jako u dospělých (Tabulka2), s výjimkou vyššího výskytu monocytární leukémie M5, která se typicky vyskytuje u dětí mladších 2 let [1].

Typ leukémie	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Přibližné zastoupení	3%	15-20%	25-30%	5-10%	25-30%	6%	3-5%	3%

Tabulka 2. Frekvence jednotlivých typů leukémií (Starý *et al.* 2002)

Zvýšené riziko AML mají děti s některými konstitučními onemocněními, např. Bloomův syndrom, ataxie – teleangiektázie, Schwachmanův – Diamondův syndrom, Downův syndrom, těžká vrozená granulomatóza a Fanconioho anémie. S výjimkou Downova syndromu se však jedná o velmi vzácná onemocnění. Děti s Downovým syndromem mají 20x vyšší riziko vzniku akutní leukémie než zdravé děti [1].

### Imunofenotypizace

Vyšetření panelem monoklonálních protilátek je nutné k diagnóze M0 a M7 a v situaci, kdy je obtížné odlišit ALL od AML (L2 versus M1). K diagnóze podtypu M0 je nutná pozitivita jednoho nebo více panmyeloidních antigenů CD13, CD33 a CD65. U podtypu M7 jsou panmyeloidní znaky často negativní, ale je nacházena pozitivita megakaryocytárních znaků CD41, CD42 a CD61. U dalších podtypů AML je prokazována pozitivita alespoň jednoho panmyeloidního markeru. [1]

### Genetické změny leukemických buněk

Více než 2/3 pacientů s AML mají abnormality karyotypu. Typická je pseudodiploidie nebo hypodiploidie. Specifické chromosomální aberace jsou úzce spjaty s jednotlivými FAB subtypy [1].

### AML1/ETO

Translokací t(8;21)(q22;q22) dochází ke vzniku fúzního genu AML1/ETO. U AML typu M2 nacházíme tuto translokaci až u 18% nemocných. Výskyt t(8;21) je spojen s příznivou prognózou [1].

### **PML/RARalfa**

Translokace t(15;17)(q22;q12-21), charakterizovaná fúzním genem PML/RARalfa, se vyskytuje nejčastěji u akutní promyelocytární leukémie (AML M3). Chromosomová změna t(15;17) je spojena s dobrou prognózou [1].

### **CBFbeta/MYH11**

Fúzní gen CBFbeta/MYH11 vzniká inverzí chromosomu 16 inv(16)(p13q22), v méně častých případech translokací t(16;16)(p13q22). Tyto leukémie jsou spojeny převážně se subtypem AML M4 Eo, charakterizovaným přítomností atypických eozinofilů a relativně dobrou prognózou [11].

### **Přestavby dlouhého raménka chromosomu 11 (11q23)**

Abnormality 11q23 se zlomem v genu MLL jsou charakterizovány velkým počtem partnerských chromosomů (více než 80 partnerských lokusů bylo popsáno cytogeneticky a z nich přes 50 již i charakterizováno na molekulární úrovni). AML s MLL přestavbou jsou častější u dětí (8-28%) než u dospělých (<5%) a spojují se typicky (ale ne výlučně) s M4 a M5 subtypem. Stejně jako u kojeneckých ALL i u AML diagnostikovaných do 1 roku života nacházíme často přestavbu chromosomu 11q23, u AML se v tomto věku obvykle spojuje s nálezem translokace t(9;11). Její prognostický význam se zdá být příznivější než u jiných častých translokací, postihujících úsek 11q23 (t(10;11), t(6;11), t(11;19)) [1].

## **1.5 Sekundární AML**

Velmi špatně léčitelné sekundární AML se u dětí vyskytují vzácně po předchozí chemoterapii, nejčastěji inhibitory topoizomerázy II (etoposid, teniposid), alkylačními agens a antracykliny, které přímo poškozují deoxyribonukleovou kyselinu. AML po předchozí léčbě inhibitory topoizomerázy II je nejčastěji myelomonocytární (M4) nebo monocytární (M5) a blasty nesou přestavbu chromosomu 11q23 [1]. Cytostatika způsobují zlomy genu MLL, což vede (v závislosti na použitém protokolu) ke vzniku sekundární AML až u 3,8% dětí [12-14].

## 1.6 Minimální reziduální nemoc (MRN)

Stále důležitější funkci v moderní léčbě akutních leukémií zastává detekce minimální reziduální nemoci (MRN). MRN je definována jako subklinická úroveň leukémie, kdy v průběhu terapie již maligní buňky nejsou detekovatelné běžnými cytologickými metodami a jejich zastoupení v kostní dřeni je nižší než 5%. V této situaci hovoříme o kompletní hematologické remisi, pacient však může i za tohoto stavu mít v těle až  $10^{10}$  maligních elementů [15].

Až u 95% případů ALL je možné stanovit MRN pomocí klonálně specifických přestaveb genů pro imunoglobuliny a T buněčné receptory (Ig/TCR). Lymfocyty tyto geny přestavují během svého vývoje, aby tak zajistily obrovskou variabilitu při styku s antigenem. Pokud buňka během svého vývoje prodělá maligní transformaci, nese celý z ní odvozený klon identické přestavby Ig/TCR. Dalším cílem pro monitorování MRN jsou fúzní geny, produkty chromosomálních translokací, které je možné detekovat na úrovni RNA transkriptu nebo přímo DNA.

V případě AML je situace složitější, neboť klonální přestavby Ig/TCR jsou v myeloidních blastech relativně vzácné. U případů s prokázaným fúzním genem lze použít ke sledování MRN tento gen, ve zbylých případech byl jako vhodný cíl navržen např. gen WT1, jehož zvýšená exprese byla prokázána v leukemických blastech některých subtypů AML [16].

### 1.6.1 Metody založené na RNA

Do této skupiny spadá zejména detekce transkriptů fúzních genů. K dosud nejpropracovanějším postupům patří detekce genu BCR/ABL u CML a ALL, AML1/ETO, CBF $\beta$ /MYH11 a PML/RAR $\alpha$  u AML a TEL/AML1 u dětských ALL. Zlomky v DNA jsou většinou lokalizovány v intronech. Přestože se v této oblasti jednotlivé sekvence liší na DNA úrovni, detekované fúzní transkripty nejsou pacient-specifické. Jednou zavedený systém reverzně-transkriptázové polymerázové řetězové reakce (RT-PCR, případně kvantitativní, qRT-PCR) je tedy použitelný pro většinu pacientů s danou aberací, což je největší výhodou této metody. Na druhé straně se tím ale podstatně zvyšuje riziko neodhalené vzájemné kontaminace vzorků. Další nevýhodou je



nutnost izolace RNA z patientského materiálu. Výsledky mohou být teoreticky více ovlivněny kvalitou vzorku, dobou mezi odebráním a zpracováním krve či kostní dřeně a také tím, jak je exprese mRNA ovlivněna podávanou protinádorovou terapií.

### 1.6.2 Metody založené na DNA

Práce na DNA úrovni má oproti sledování exprese výhodu ve větší stabilitě DNA a v přítomnosti konstantního množství kopií sledovaného markeru v buňce, bez ohledu na časový bod léčby a probíhající terapii. To je ale ve většině případů vyváženo mnohem větší pracností při zavádění systémů pro sledování MRN. V současnosti nejpropracovanější metodou založenou na DNA je kvantifikace klonálně-specifických přestaveb genů pro imunoglobuliny a T buněčné receptory. Tato metoda dnes slouží jako "zlatý standard" pro určování hladin MRN v průběhu terapie.

U chromosomálních aberací s fúzními geny představuje sekvence DNA zlomového místa (obvykle ležící v intronech) unikátní pacient-specifický cíl. Zlomová místa však jsou často rozmístěna v rozsáhlé oblasti (délka jednotlivých intronů přesahuje v některých případech i 100 kilobází), proto je třeba k jejich identifikaci často použít technik „long-distance PCR“ nebo inverzní PCR spolu se sekvenací získaných produktů. Tyto postupy se v současnosti používají např. u detekce TEL/AML1 nebo u přestaveb zahrnujících gen MLL.

Další používanou metodou ke sledování minimální reziduální nemoci je mnohobarevná (tří- až čtyřbarevná) průtoková cytometrie. Pomocí kombinací fluorescenčně značených protilátek proti povrchovým nebo cytoplazmatickým antigenům typickým pro leukemickou buňku umožňuje sledování MRN s citlivostí až 1 maligní buňky mezi  $10^4$  normálních buněk [17-19]

## 1.7 MLL gen (myeloid/lymfoid or mixed lineage leukemia)

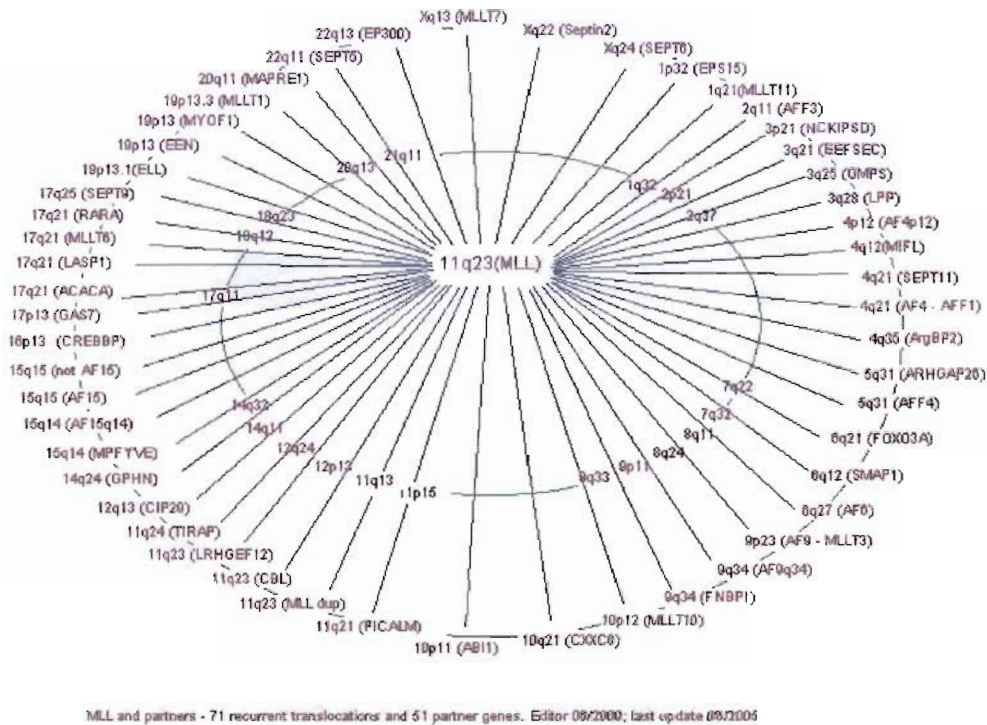
Gen MLL (ALL1, HRX, TRX1) je lokalizovaný na dlouhém raménku chromosomu 11 v oblasti 11q23. Obsahuje 37 exonů a velikostně přesahuje 100 kb. Kódující sekvence má velikost 11,9 kb.

MLL gen kóduje obrovský protein složený z 3969 aminokyselin o velikosti přibližně 430 kDa. MLL protein je proteolyticky štěpen Taspázou-I do N terminálního 320kDa velkého fragmentu (MLL<sup>N</sup>) a C-terminálního fragmentu o velikosti 180kDa (MLL<sup>C</sup>) [20]. Obě části zůstávají nadále nekovalentně vázány ve formě dimeru. Ten se nachází v jádře, kde působí jako regulační transkripční faktor. Pozitivně udržuje expresi homeotických (HOX) genů během vývoje [21], ovlivňuje buněčnou diferenciaci, apoptózu, proliferaci a regulaci buněčného cyklu.

Od N-konce se MLL gen skládá ze tří AT-vazebných motivů, transkripční represní domény, dvou motivů zinkových prstů a bromdomény, serin a treonin bohaté oblasti a SET domény. AT-vazebné motivy se váží v oblasti bohaté na adenin a thymin v malém žlábků DNA, čímž ji ohýbají, a umožňují tak interakci dalších proteinů. Transkripční represní doména zahrnuje cystein bohatý region homologní k savčí DNA-methyltransferáze. Motivy zinkových prstů a bromodoména hrají důležitou roli v protein-protein interakcích. SET doména má methyltransferázovou aktivitu, metyluje histon H3 v regionu HOX genů a tím se účastní remodelace chromatinu [22].

MLL gen je homologem transkripčního regulátoru trithorax u drozofily [23] a podobně jako u drozofily tak i u člověka je klíčovým regulátorem exprese HOX genů [24]. Jak se ukázalo, MLL gen reguluje expresi HOX genů přímou vazbou na jejich promotorové sekvence. A právě dysregulace specifických HOX genů je nejspíše hlavním mechanismem leukemické transformace iniciované MLL chimérickým onkogenem [21].

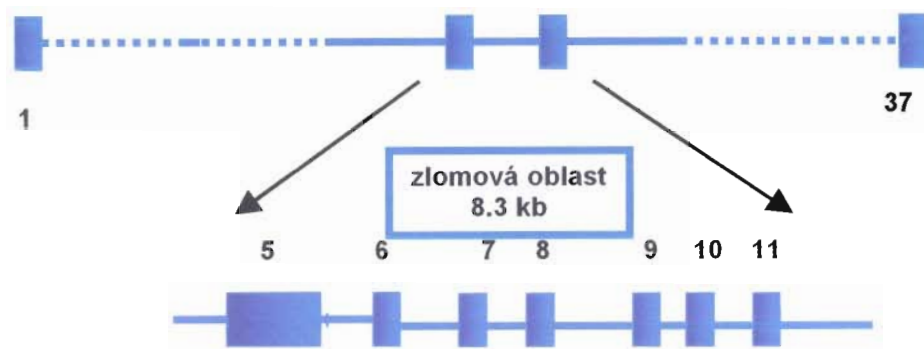
Nejběžnějšími změnami MLL genu jsou translokace, amplifikace a delece. Při translokaci dochází ke vzniku fúzního genu, tj. genu vzniklého splynutím dvou genů. V současnosti je popsáno více než 80 různých MLL přestaveb, ze kterých je více než 50 partnerských lokusů charakterizováno molekulárně [25].



Obrázek 1: MLL gen a jeho fúzní partneři  
 Převzato z <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/MLL.html>

Při studiu translokací genu MLL se zjistilo, že zlomové místo je lokalizováno uvnitř 8,5 kb regionu, označovaného bcr (breakpoint cluster region), mezi 5. a 11. exonem [26].

Výzkum MLL přestaveb ukázal, že přibližně polovina z nich souvisí s intronem 6, kde je nejvyšší incidence Alu repetitivních sekvencí (centromerická část bcr). Je tedy možné, že právě tyto regiony mohou mít vliv na určení místa zlomu u de-novo leukémií. Podobné repetitivní sekvence však v okolí zlomových míst partnerských chromosomů nalezeny nebyly [27]. U sekundární formy leukémie se zlom často nachází v telomerické části bcr, kde je lokalizováno vazebné místo pro topoizomerázu II. Vysvětlovalo by to vznik leukémií způsobených léčbou topoizomerázovými inhibitory. Ty inhibují ligázovou funkci enzymu, který tak zanechává volné konce DNA, což může vést k nehomologní rekombinaci mezi MLL genem a partnerským genem. Přesný mechanismus ale stále není zcela jasný [28].



Obrázek2: Bcr (breakpoint cluster region)

Mezi nejčastější partnery genu MLL patří AF4, AF9, ENL, ELL, AF10 a AF6.

### ***MLL/AF4 t(4;11)(q21;q23)***

Translokace  $t(4;11)$  je nejčastější translokací dětské ALL. Tato abnormita se vyskytuje u 50% kojeneckých ALL a ve vyšších věkových kategoriích je u dětí relativně vzácná a postihuje zejména pacienty do 6 let věku. Často ji nacházíme u sekundární leukémie a někdy u AML. Prognóza bývá špatná. (Starý leukémie 2002)

Fúzním partnerem MLL je zde gen AF4, lokalizovaný na 4q21. Tento gen produkuje protein o 1210 aminokyselinách a 140 kDa. Působí jako transkripční faktor v jádře. Výsledný fúzní gen je typu 5'MLL-3'AF4. Transkript má 12 kb a získaný protein se skládá ze 1400 aminokyselin N-konce MLL a 850 aminokyselin C-konce AF4. Odpovídá velikosti zhruba 240kDa.

### ***MLL/AF6 t(6;11)(q27;q23)***

Partnerským genem je u této translokace gen AF6, lokalizovaný v oblasti 6q27. Transkript má 8 kb mRNA a kóduje protein obsahující 1612 aminokyselin, který působí v cytoplazmě v transportní systému. Místo, kde dochází nejčastěji ke zlomu a fúzi s genem MLL bývá lokalizováno za 35 aminokyselinou proteinu AF6. Výsledný fúzní protein tvoří MLL od N-konce, AF6 od C-konce a je složen z 1400 aminokyselin.

### ***MLL/AF9 t(9;11)(p22;q23)***

Partner genu MLL je zde gen AF9, lokalizovaný v oblasti 9p22. Kóduje 5kb velký transkript a protein o velikosti 568 aminokyselin. Zlomové místo se u AF9 nachází nejčastěji za 376. aminokyselinou. Výsledný fúzní protein obsahuje 1444 aminokyselin z proteinu MLL a 192 aminokyselin z proteinu AF9.[27]

### ***MLL/AF10 t(10;11)(p12;q23)***

Gen AF10 je lokalizován v 10p12 oblasti a kóduje 5,5 kb velký transkript za vzniku proteinu o velikosti 1027 aminokyselin. Translokace tohoto genu s genem MLL je charakteristická vysokou diverzitou zlomových míst na chromozomu 10. vzniklý fúzní protein má N-konec MLL a C-konec AF10.[27]

### ***MLL/ELL t(11;19)(q23;p13.1)***

Partnerský gen ELL je lokalizován v oblasti 19p13.1. Kóduje 1,9 kb velký transkript za vzniku 68 kDa jaderného proteinu o 621 aminokyselinách, který slouží jako elongační faktor pro RNA polymerázu II. Vzniklý fúzní gen má podobu 5' MLL - 3' ELL.[27]

### ***MLL/ENL t(11;19)(q23;p13.3)***

Gen ENL je lokalizován v oblasti 19p13.3. Jeho mRNA o velikosti 4,7 kb kóduje protein o 559 aminokyselinách, který působí jako jaderný transkripční faktor. Vzniklý fúzní gen je typu 5' MLL - 3' ENL. Zlomové místo je nejčastěji lokalizováno za 4. aminokyselinou proteinu ENL.[27]

## 2. Cíl práce

1. Zjistit zastoupení jednotlivých přestaveb MLL genu (zejména MLL/AF4, MLL/AF6, MLL/AF9, MLL/AF10, MLL/ENL, MLL/ELL) v těchto souborech pacientů:

A. Pacienti s kojeneckou leukémií (diagnostikovanou do 1 roku věku) léčení v České republice v období 1997-2006.

B. Pacienti s akutní myeloidní leukémií subtypů M4 a M5 léčení v České republice v období 1997-2007

C. Pacienti s diagnostikovanou sekundární leukémií

D. Pacienti s B-prekursorovou leukémií (BCP-ALL) splňující aspoň jedno z těchto kritérií:

a) proB imunofenotyp

b) cytogeneticky prokázaná přestavba genu MLL

c) exprese molekuly NG2 prokázaná pomocí průtokové cytometrie

2. U pacientů s prokázanou přestavbou genu MLL podstupujících transplantaci hematopoetických progenitorů (SCT) sledovat reziduální nemoc po jednotlivých blocích chemoterapie před transplantací a v pravidelných intervalech po transplantaci a umožnit tak indikaci léčby podle kinetiky reziduální leukémie.

### 3. Pacienti

Do této práce byly zahrnuty vzorky kostní dřeně a/nebo periferní krve dětských pacientů s akutní lymfatickou leukémií, akutní myeloidní leukémií a sekundární leukémií diagnostikovaných v České republice od 1997 do 2007. Všechny děti byly léčeny dle daného léčebného protokolu v jednotlivých léčebných centrech PSDH ČR a všechny vzorky byly transportovány a zpracovány nejpozději do 30 hodin po aspiraci.

### 4. Metodika

#### 4.1 Izolace mononukleárních buněk pomocí hustotního gradientu

##### Použité chemikálie

Ficoll-Paque Research Grade (PharmaTech)

PBS pufr: 137mM NaCl

2,7mM KCl

4,3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x12H<sub>2</sub>O

1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4

sterilizován autoklávováním

Trypanová modř 0,4% (Sigma Aldrich)

##### Pracovní postup

1. Vzorek kostní dřeně a/nebo periferní krve (odebrané do protisrážlivého roztoku) naředit v poměru 1:1 PBS pufrém.
2. Do 14 ml zkumavek napipetovat Ficoll Paque a opatrně převrstvit naředěným vzorkem (poměr Ficoll Paque a ředěného vzorku je 1:1).
3. Centrifugovat 35 minut při 2200 otáčkách a 4 °C.
4. Prsteneček mononukleárních buněk přenést do zkumavky, která obsahuje 5 ml pufru PBS.

5. Centrifugovat 10 minut při 2200 otáčkách a 4 °C, odsát supernatant a pelet rozpustit ve 2ml pufru PBS.
6. Odebrat 10 µl suspenze a smíchat se 190 µl trypanové modři, po 2 minutách stání počítat buňky v Bürkerově komůrce v alespoň 10 velkých čtvercích.

Výpočet počtu buněk v 1 ml suspenze:

$$\begin{aligned}
 & - \text{průměrný počet buněk v jednom čtverci} \\
 & \quad \times \\
 & - 25 \text{ (počet čtverců)} \\
 & \quad \times \\
 & - 20 \text{ (ředění buněk v trypanové modři)} \\
 & \quad \times \\
 & - 10 \text{ (výška Bürkerovy komůrky)} \\
 & \quad \times \\
 & - 1000 \\
 & \quad = \text{počet buněk v 1ml suspenze}
 \end{aligned}$$

7. Do zkumavek odpipetovat takové množství suspenze buněk, aby obsahovalo  $10^7$  buněk (pokud je k dispozici pouze menší množství buněk, pracovat obdobně), centrifugovat 10 minut / 2200 ot. / 4 °C, po centrifugaci odsát pipetou supernatant.
8. pelet buněk uchovávat v -80 °C.

## 4.2 Izolace celkové RNA z mononukleárních leukocytů – modifikace metody dle Chomczynski a Sacchi (1987) – modifikace dle Trizolu

### Použité chemikálie

Roztok ITG : 4M Guanidine thiocyanate (Serva)

25mM citrát sodný, pH7 (Serva)

0.5% N-Laurylsarcosine sodium salt (Serva)

2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)

75 % etanol (PENTA)

2-propanol (Merck)

Fenol, vysycený H<sub>2</sub>O (Sigma- Aldrich) s 0,1% 8-hydroxychinolinem (Merck)

Chloroform + izoamylalkohol 49:1 (Merck)

NaAcetát (Sigma-Aldrich)



1. Čerstvě izolované nebo hlubokozmražené buňky rychle lyzovat v roztoku ITG + Mercaptoetanol ( v poměru 1ml ITG + 7.2 ul Mercaptoetanolu) a pokud je k dispozici pouze  $< 10^6$  buněk přidat glykogen.

počet buněk	$10^7$ buněk	$5 \times 10^6$ buněk	$< 10^6$ buněk
ITG+Mercaptoetanol	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	100 $\mu$ l
glykogen			10 $\mu$ l

2. Se vzorky pracovat na ledové lázni.

3. Přidat acetát sodný.

počet buněk	$10^7$ buněk	$5 \times 10^6$ buněk	$< 10^6$ buněk
acetát sodný pH4	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	10 $\mu$ l

4. Přidat vodou vysycený fenol a chloroform/isoamylalkohol, důkladně vortexovat do mléčného zakalení.

počet buněk	$10^7$ buněk	$5 \times 10^6$ buněk	$< 10^6$ buněk
fenol	455 $\mu$ l	455 $\mu$ l	100 $\mu$ l
chlorof./izoamylalk.	130 $\mu$ l	130 $\mu$ l	20 $\mu$ l

5. Nechat stát 2-3 minuty na ledu.

6. Centrifugovat 15 minut při 12 741 otáčkách a 4 °C.

7. Odebrat vodnou fázi s RNA a přidat stejný díl vychlazeného (na -20°C) 2-propanolu, krátce promíchat a inkubovat 20 minut na ledu.

8. Centrifugovat 10 minut 12 741 otáčkách a 4 °C, odstranit supernatant.

9. Peletu promýt 75 % etanolem, centrifugovat 5 minut při 10 146 otáčkách.

10. Na závěr pelet rozpustit ve vodě pro injekce.

počet buněk	$10^7$ buněk	$5 \times 10^6$ buněk	$< 10^6$ buněk
aq. pro inj.	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l	11 $\mu$ l

11. RNA rozpouštět 10 minut / 55°C , ověřit kvalitu a uchovávat při -80°C.

### 4.3 Ověření kvality RNA na přístroji Agilent

#### Použité chemikálie

RNA nano chip kit (Agilent): 6000 Nano marker  
6000 Nano dye koncentrát  
RNA 6000 nano gel matrix

#### Pomůcky

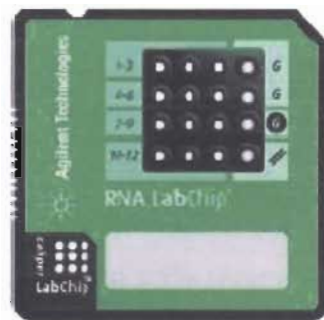
RNA LabChip (Agilent), priming station (HPST)



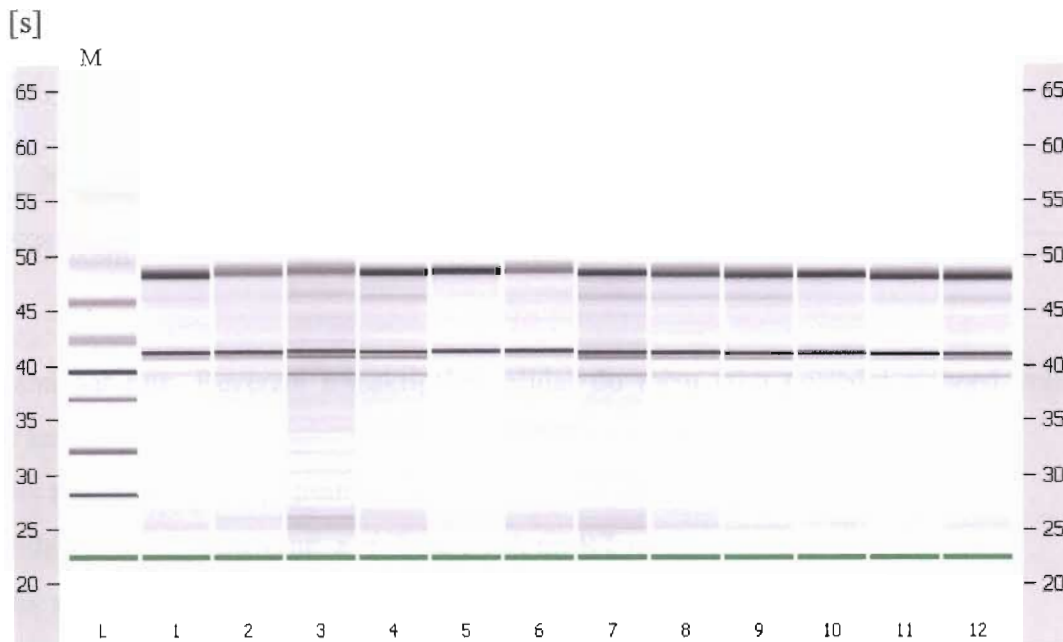
Obrázek 3: Přístroj Agilent

1. Vytemperovat všechny reagenty na pokojovou teplotu (30minut).
2. Připravit gel. 550 ul RNA 6000 nano gel matrix nepipetovat na kolonu a centrifugovat 10 minut 4000 rpm (minispin Eppendorf)
3. Připravit Gel-Dye mix. 1 ul RNA 6000 Nano dye koncentrátu zvortexovat a přidat do 65 ul připraveného gelu, centrifugovat 10 minut při 14 000 rpm (Minispin Eppendorf)
4. Napipetovat 9 ul Gel-Dye mixu do pozice G (v černém kroužku, viz. obr.4)
5. Pomocí priming station rozprostřít gel podtlakem do vnitřní struktury chipu.
6. Do dalších 2 G napipetovat 9 ul Gel-Dye mixu.
7. Do všech ostatních jamek napipetovat 5 ul 6000 Nano markeru.
8. Do všech jamek ( kromě G ) přidat 1 ul RNA, do pozice označené žebříkem (viz. obr.4) napipetovat velikostní marker.
9. Takto připravený chip vortexovat 1 minutu při 2400 rpm a vložit do přístroje Agilent.
10. Spustit příslušný program (RNA nano chip)

Pomocí kitu DNA 1000 kit a DNA LabChipu (Agilent) můžeme na tomto přístroji detekovat také amplifikované PCR produkty.



Obrázek 4: RNA LabChip



Obrázek 5: Elektroforetické dělení celkové RNA na přístroji Agilent pro kontrolu integrity RNA. Dva jasné „bandy“ představují 18S a 28S části ribozomální RNA, „smear“ představuje ostatní RNA, včetně mRNA. Na pozici „L“ je velikostní marker.

#### 4.4.Reverzní transkripce

##### Použité chemikálie

iScrip kit (BioRad): 5x iScript Reaction Mix

iScript Reverse Transcriptase

Nuclease-free water

1. RNA nechat rozmraznout na ledové lázni
2. Vodu a 5x iScript Reaction Mix nechat také rozmraznout na ledové lázni.
3. Podle počtu vzorků vypočítat množství jednotlivých reagentů v mixu s 5% rezerva.

5x iScript Reaction Mix .....	4ul
iScript Reverse Transcriptase.....	1 ul
Nuclease-free water .....	4 ul
RNA templát.....	11ul

---

Celkem	20 ul
--------	-------

4. Namíchat mix. Reverzní transkriptázu přidat do mixu jako poslední a ihned vrátit do mrazáku.
5. Mix rozpipetovat do popsaných šroubovacích zkumavek - 9 ul do každé.
6. Přidat 11 ul zvortexované a stočené RNA do RT mixu.
7. Mix s RNA inkubujeme: : 5 minut při 25°C (pokojová teplota)
  - 30 minut při 42°C
  - 5 minut při 85°C
  - ochládíme na 4°C (dáme na led)
8. cDNA skladovat při -20°C.

#### 4.5 Vyšetření kontrolního genu ABL

K ověření kvality cDNA jsme použili gen ABL. Nachází na 9. chromosomu v oblasti 9q34.13. Kóduje tyrozinovou kinázu. Normální forma tohoto proteinu se podílí na regulaci buněčného dělení, buněčné adheze a na stresové odpovědi buňky. Gen ABL je exprimován ve všech buňkách a jeho exprese je stabilní.

##### Použité chemikálie

10x PCR pufr s MgCl<sub>2</sub> (Eppendorf)

HotMaster Taq polymeráza (Eppendorf)

dNTP<sup>s</sup> (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) - 10 mM mix každého deoxyribonukleotidu (Promega)

Red cresol buffer (Sigma)

Primery A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>

Primer	sekvence 5' → 3'
A <sub>2</sub>	ttcagcggccagcagcatctgactt
A <sub>3</sub>	tgtgattatagcctaagaccggagcttt

Syntézu primerů objednáváme u firmy TIB MOLBIOL (Berlin, Germany) nebo KRĎ (Praha). Nasyntetizované primery jsou lyofilizované o koncentraci 100 μM, ředíme vodou (voda pro injekce) na koncentraci 50 μM.

Reakční mix	množství na 1 vzorek
10x PCR pufr s MgCl <sub>2</sub>	2,0 μl
dNTP 10 mM mix každého	0,5 μl
Red cresol buffer	4,75 μl
A <sub>2</sub> primer	0,25 μl
A <sub>3</sub> primer	0,25 μl
HotMaster Taq polymeráza	0,12 μl
sterilní H <sub>2</sub> O	15,13 μl
cDNA	2,0 μl

celkový objem 25 μl		
Teplotní režim PCR:	teplota	čas
Iniciální denaturace:	94 °C	2 min.
PCR cyklus	94 °C	30 sec.
	57 °C	30 sec.
	72 °C	30 sec.
počet cyklů	35x	
Finální extenze	72 °C	7 min.

Amplifikovaný PCR produkt genu ABL detekujeme na 2% agarozovém gelu (obrázek 6).

## 4.6 Příprava 2% agarózového gelu

### Použité chemikálie

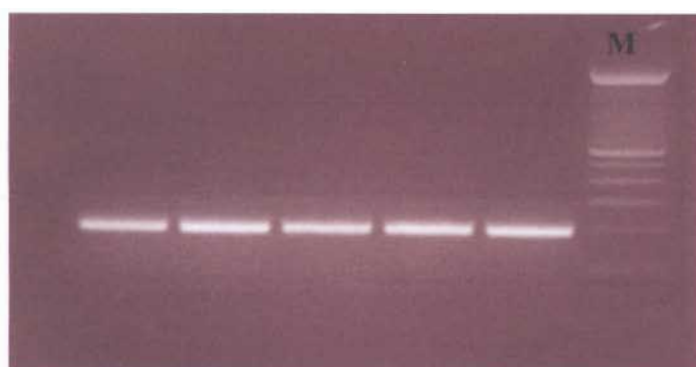
Agarosa NuSieve GTG (Cambrex)

agarose I (AMResco)

1xTAE pufr

Navážíme 1g agarózy (v poměru 1:1 - 0,5g Agarosa NuSieve GTG a 0,5g agarose I) a přidáme 50 ml 1xTAE pufru. Rozvaříme agarózu do úplného rozpuštění, ochladíme pod tekoucí vodou na cca 65 °C a za stálého míchání na magnetickém míchadle přidáme 5 µl ethidium bromidu. Ethidium bromid je fluorescenční barvivo, které se váže na nukleové kyseliny tak, že svou plochou molekulou interkaluje mezi ploché páry bází v molekule DNA, RNA (je to mutagen, proto musíme dodržovat bezpečnostní pravidla a používat ochranné pomůcky).

Nalijeme agarózu do misky, vložíme „zuby“ a necháme ztuhnout. Po ztuhnutí nanášíme PCR produkty.



Obrázek 6: Kontrolní gen ABL detekovaný na agarózovém gelu. Pomocí primerů A<sub>2</sub> a A<sub>3</sub> se amplifikuje PCR produkt o velikosti 198 bp.

## 4.7 Stanovení přestaveb genu MLL metodou multiplex-reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (multiplex RT-PCR)

Vyšetření genu MLL metodou multiplex-reverzně transkriptázová řetězová reakce (multiplex RT-PCR) umožňuje rychlou a přesnou detekci nejčastěji se vyskytujícími MLL fúzních genů u pacientů s akutní leukémií. Pomocí 2 sad primerů, které byly navrženy pro každý fúzní gen, probíhají souběžně 2 oddělené jednobáňové multiplex-PCR reakce. Použitím níže popsaného protokolu je možné úspěšně amplifikovat v jedné reakci 6 klinicky důležitých fúzních genů: MLL/AF4 t(4;11)(q21;q23), MLL/AF6 t(6;11)(q27;q23), MLL/AF9 t(9;11)(p21-22;q23), MLL/AF10 t(10;11)(p11-13;q23), MLL/ELL t(11;19)(q23;p13.1) a MLL/ENL t(11;19)(q23;p13.3) [29].

### Použité chemikálie

10x PCR pufr bez MgCl<sub>2</sub> (Introvigen)

MgCl<sub>2</sub> 50mM (Introvigen)

Platinum Taq DNA polymeráza (Introvigen)

dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) - 10 mM mix každého deoxyribonukleotidu

Red cresol buffer (Sigma)

2x sada primerů

### ➤ Out mix

Primer	gen	sekvence 5' → 3'
3759U	MLL	CCC AAA GAA AAG CAG TAG TGA
1607L	AF4	TTT GTA GGG AAA GGA AAC TTG
351L	AF6	GAT AAC CCC TTC TTT TTC CTG
1645L	AF9	AGC GAG CAA AGA TCA AAA TC
1049L	AF10 I.	CTG TTC TAT GCT GGC TGC TA
2366L	AF10 II.	CTG GTT GAT CAT AGC GAA TC
247L	ELL	GCT TCC TTG AAA TCG GAT AG
216L	ENL	CGT ACC CCG ACT CCT CTA CT
1399L	ENL	GCC TGA CAC CTT GCT GTT

➤ In mix

Primer	gen	sekvence 5' → 3'
3920U	MLL	CTC AGC CAC CTA CTA CAG GAC
2569L	AF4	TTT GGT TTT GGG TTA CAG AAC
439L	AF6	TTC CCG ATC ATC TTT GTT C
1825L	AF9	GAT TTG CTT TGC TTT ATT GG
1017L	AF10 I.	CCT GGA AAT TTG CAT TTG TAA
2316L	AF10 II.	TCT TCC AAG CGC TTC AAT
170L	ELL	CCG ATG TTG GAG AGG TAG AA
91L	ENL	GGA CAA ACA CCA TCC AGT C
1327L	ENL	GGC GCT GTT GTC ACT CTC

Syntézu primerů objednáváme u firmy TIB MOLBIOL (Berlin, Germany) nebo KRD (Praha). Nasyntetizované primery jsou lyofilizované o koncentraci 100μM, ředíme vodou (voda pro injekce) na koncentraci 50μM.

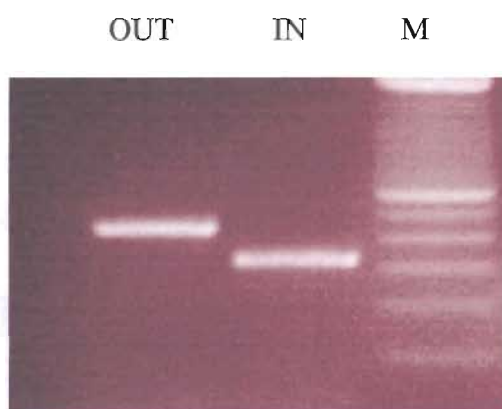
Reakční mix	množství na 1 vzorek
10x PCR pufr bez MgCl <sub>2</sub>	2,5 μl
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0,75 μl
dNTP 10 mM mix každého	0,5 μl
Red cresol buffer	4,75 μl
Out mix	0,25 μl každého primeru
In mix	0,25 μl každého primeru
Platinum Taq DNA polymeráza	0,2 μl
sterilní H <sub>2</sub> O	13,05μl
cDNA	1,0 μl

celkový objem 25 μl



Teplotní režim PCR:	teplota	čas
Iniciální denaturace:	95 °C	5 min.
PCR cyklus	95 °C	30 sec.
	60 °C	30 sec.
	72 °C	30 sec.
počet cyklů	34x	

PCR produkty nanášíme na 2% agarózu nebo detekujeme na Agilentu.



Obrázek 7. Pozitivní výsledek multiplex-RT PCR detekovaný na agarózovém gelu.

V případě pozitivního výsledku je nutné identifikovat nalezený fúzní gen sekvenací. PCR produkt přečistíme pomocí PCR Product Purification Spin Kit/250 a ve spolupráci s Ústavem lékařské biologie a genetiky ve Fakultní nemocnici v Motole sekvenujeme. Sekvence vyhodnocujeme pomocí databází volně přístupných na internetu ([www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast)). K popisu sekvencí a navržení specifických primerů používáme software VECTOR NTI 8 Suite (INFORMAX, Bethesda, MD, USA)

## 4.8 Izolace DNA pomocí přístroje BioRobot (QIAGEN)

### Použité chemikálie

EZ1 DNA Tissue Kit (48) – G2 pufr

Proteináza K

Reagent cartridge

AL pufr – lyzační pufr

1. Připravit lyzát z čerstvě izolovaných nebo zmražených mononukleárních buněk  
- k čerstvě izolovaným buňkám přidat 250  $\mu$ l G2 pufru a 10  $\mu$ l proteinázy K a důkladně vortexovat  
- mražené buňky rozmrazit při pokojové teplotě a přidat 250  $\mu$ l AL pufru, vortexovat
2. Lyzát přepipetovat do zkumavek a spolu s elučními zkumavkami a pipetovacími špičkami vložit do stojanu a pak do přístroje BioRobot.
3. Cartridge vložit do stojanu a také vložit do přístroje.
4. Do přístroje vložit kartu s programem a spustit.



Obrázek 8: Vložení zkumavek se vzorkem, elučních zkumavek, pipetovacích špiček a cartridge do stojanu přístroje a samotný přístroj BioRobot (QIAGEN).

## 4.9 Statistické zpracování

Použitá metodika nevyžadovala žádné zvláštní statistické zhodnocení.

## 5. Výsledky

### 5.1 Výsledky fúzních genů

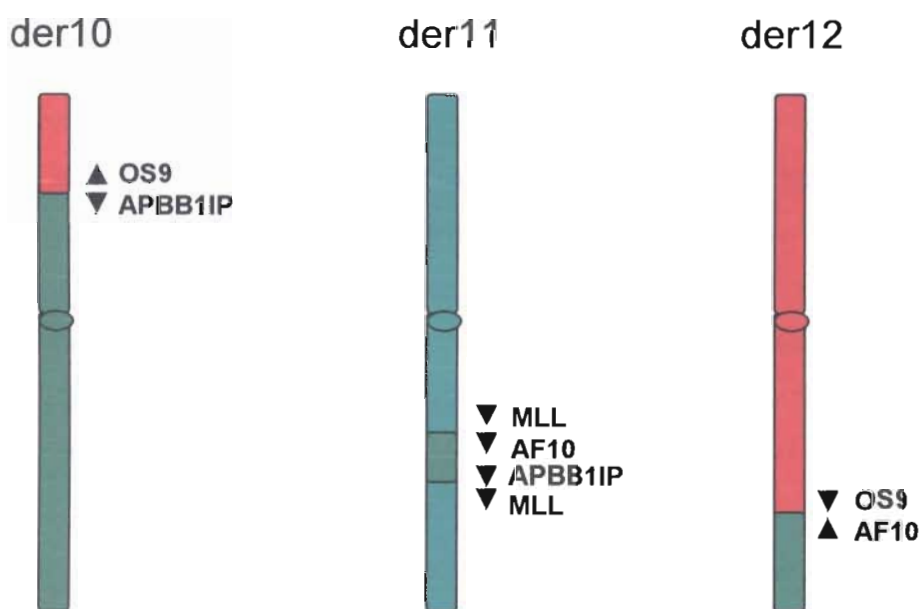
#### 5.1.1 Výsledky fúzních genů u pacientů s kojeneckou ALL diagnostikovanou do 1 roku věku

pac. číslo	diagnóza	věk(m)-dg	pohlaví	translokace
105	ALL koj.	2	ž	MLL/ENL
132	ALL koj.	8	m	MLL/AF4
175	ALL koj.	3	m	neg.
193	ALL koj.	6	m	MLL/AF4
252	ALL koj.	1	m	MLL/AF4
391	ALL koj.	0	ž	neg.
472	ALL koj.	5	m	neg.
481	ALL koj.	2	m	MLL/AF4
482	ALL koj.	4	m	MLL/AF9
520	ALL koj.	2	m	atypická MLL/AF4
571	ALL koj.	10	ž	MLL/AF4
587	ALL koj.	0	m	MLL/AF4
598	ALL koj.	10	m	MLL/AF9
670	ALL koj.	6	ž	neg.
873	ALL koj.	8	m	neg.
923	ALL koj.	1	ž	MLL/AF4
924	ALL koj.	10	ž	MLL/AF10 (+APBB1IP)
765	ALL koj.	0	ž	MLL/AF4
H92	ALL koj.	9	ž	MLL/AF4
R94	ALL koj.	3	ž	MLL/AF4
V94	ALL koj.	7	ž	MLL/AF4
1014	ALL koj.	8	m	neg.
1015	ALL koj.	5	ž	MLL/ENL
1018	ALL koj.	10	ž	MLL/AF10 (+FXD2)
1041	ALL koj.	5	m	neg.

Tabulka 3: Výsledky pacientů s kojeneckou ALL.

Vyšetřili jsme 25 pacientů s kojeneckou akutní lymfoblastickou leukémií. U 12 pacientů (48%) jsme našli translokaci MLL/AF4, po dvou pacientech (8%) mělo přestavby MLL/AF9, MLL/AF10 a MLL/ENL a u 7 pacientů (28%) jsme nenalezli žádnou chromosomální přestavbu genu MLL. U pacienta číslo 520 se jednalo o atypickou fúzi genů MLL a AF4, která nemohla být detekována standardním PCR vyšetřením a na kterou upozornila až analýza metodami FISH a amplifikace intronové DNA.

Obě přestavby s fúzním genem MLL/AF10 se při důkladnějším vyšetření (provedeném ve spolupráci s laboratoří ve Frankfurtu nad Mohanem) ukázaly jako komplexnější translokace, kterých se kromě MLL a AF10 účastní více genů. Celý translokační postup se dá dobře demonstrovat u pacientky číslo 924, kde se podařilo popsat 4 zlomová místa a tak odhalit, že se v tomto případě jedná vlastně o translokaci t(10;12) a současnou inzerci části chromosomu 10 do genu MLL na 11q23. Schematické znázornění komplexní translokace je na Obrázku 9.



Obrázek 9: Schéma komplexní translokace u pacienta 924. Kromě translokace t(10;12) je patrná inserce části chromosomu 10 ležící mezi geny AF10 a APBB1IP do genu MLL na chromosomu 11.

### 5.1.2 Výsledky fúzních genů u pacientů s AML subtypů M4, M5

Ze souboru pacientů s AML léčených v České republice v období 1997-2007 jsme vybrali pacienty s akutní myelomonocytární leukémií (AML-M4) a akutní monocytární leukémií (AML-M5). Jak už bylo zmíněno, právě u těchto subtypů AML se nejčastěji vyskytují přestavby genu MLL.

Vyšetřili jsme 34 pacienty, výsledky jsou shrnuty v Tabulce 4. U 10 pacientů (29%) jsme našli fúzní gen MLL/AF9, dalšími nejčastějšími fúzními geny byly MLL/AF10 (7 pacientů, 21%), MLL/AF6 a MLL/ELL (po 2 pacientech, 6%) a u 12 pacientů (35%) jsme nenašli žádnou přestavbu genu MLL. Jednoho pacienta se nepodařilo z důvodu nedostatku diagnostického materiálu vyšetřit.

U pacienta číslo M160 jsme našli atypickou variantu fúze MLL/AF10, kde je mezi oba geny vložena část genu UGP-2, normálně lokalizovaného na chromosomu 2.

U pacienta číslo M77 jsme při diagnóze AML-M5 našli translokaci MLL/AF9, ovšem v období 1. a 2. relapsu onemocnění byl na přítomnost této translokace negativní (s citlivostí detekce 1 buňky s přestavbou mezi  $\geq 100\ 000$  buňkami bez přestavby). Tento výsledek naznačuje, že by se u tohoto pacienta mohlo jednat spíše o sekundární leukémii než o klasický relaps onemocnění. Mohou tomu nasvědčovat i data z cytometrické analýzy, kde mezi diagnózou a relapsem došlo k určitým změnám imunofenotypu leukemických buněk. Zatímco při diagnóze byly blasty charakterizovány jako M5, v relapsu se jejich charakteristika změnila na akutní hybridní leukémii (AHL).

pac. číslo	diagnóza	věk(r)- dg	pohlaví	translokace
M1	AML-M4	3	m	neg.
M22	AML-M4	2	m	MLL/AF9
M36	AML-M4	14	ž	neg.
M50	AML-M4	14	m	neg.
M51	AML-M4	16	ž	MLL/AF6
M60	AML-M4	17	m	neg.
M64	AML-M4	12	m	MLL/AF10
M104	AML-M4	15	m	MLL/AF9
M153	AML-M4	2	m	neg.
757	AML-M4	1	m	MLL/AF6
135	AML-M4	13	m	MLL/AF10
M212	AML-M4	15	ž	neg.
M245	AML-M4	14	ž	neg.
679	AML-M4	11	ž	MLL/ELL
M289	AML-M4	5	m	MLL/AF9
M134	AML-M4/M5	17	ž	neg.
999	AML-M4/M5	10	m	neg.
M266	AML-M4/M5	10	ž	neg.
M3	AML-M5	8	m	MLL/AF9
M10	AML-M5	0	ž	MLL/AF10
M35	AML-M5	12	m	MLL/AF9
M40	AML-M5	1	m	MLL/ELL
M41	AML-M5	0	ž	n.d.
M49	AML-M5	2	m	MLL/AF9
M77	AML-M5	4	m	MLL/AF9
	1.relaps	7	m	neg.
	2.relaps	10	m	neg.
M87	AML-M5	1	ž	neg.
M92	AML-M5	2	m	MLL/AF10
M99	AML-M5	5	m	MLL/AF10
M107	AML-M5	2	m	MLL/AF10
M160	AML-M5	10	m	MLL/UGP2-AF10
979	AML-M5	1	ž	MLL/AF9
M172	AML-M5	2	ž	MLL/AF9
M202	AML-M5	1	ž	MLL/AF9
557	AML-M5	3	ž	neg.

Tabulka 4: Výsledky pacientů s AML-M4 a AML-M5.



### 5.1.3 Výsledky fúzních genů u pacientů se sekundární leukémií

pac. číslo	primární diagnóza	sekundární diagnóza	věk(r)-při sekundární dg	pohlaví	translokace
323	ALL	sALL	5	ž	MLL/MAML2
919	AML-M3	sALL	18	ž	MLL/FOXO3A
M169	Ewingův sarkom	sAML-M2	14	ž	neg.
810	ALL	sAML-M5	5	ž	MLL/AF9
M63	Hodgkinův lymfom	sAML-M4	11	m	MLL/AF9
M134	Ewingův sarkom	sAML-M5	17	ž	neg.
M242	alveolární sarkom	sMDS	8	ž	t(1;11)
541	ALL	sAML-M5	1	m	neg
M287	medioblastom	sAML-M5	20	m	MLL/AF6

Tabulka 5. Výsledky pacientů se sALL, sAML, sMDS

Vyšetřili jsme 9 pacientů se sekundární leukémií. U 2 pacientů (22%) jsme našli translokaci MLL/AF9, po jednom pacientovi mělo přestavby MLL/FOXO3A, MLL/MAML2 a MLL/AF6 a u 2 pacientů nebyla nalezena žádná přestavba genu MLL. U pacienta číslo M242 byla při cytogenetickém vyšetření popsána translokace t(1;11), kterou není možné použitou metodikou multiplex-RT-PCR detekovat. Z důvodu nedostatku materiálu obsahujícího maligní buňky se nám nepodařilo potvrdit u této pacientky přestavbu genu MLL ani jinou molekulárně-genetickou metodou.

Fúzní gen MLL/MAML2 popsaný ve spolupráci s laboratoří ve Frankfurtu u pacientky číslo 323 nebyl dosud v literatuře popsán. Fúze vznikla v tomto případě inverzí dlouhého raménka chromozomu 11 oblasti q21;q23 (inv11(q21;q23)).

#### 5.1.4 Výsledky pacientů s B-prekurzovou leukémií

Do této skupiny jsme zařadili pacienty s B-prekurzovou leukémií (BCP-ALL), kteří splňovali alespoň jedno z kritérií - proB imunofenotyp, cytogeneticky prokázaná přestavba genu MLL nebo exprese molekuly NG-2 prokázaná pomocí průtokové cytometrie. Dále jsme sem zařadili pacienty s akutní hybridní leukémií, tedy případy, kdy kromě B-prekurzorových znaků jsou na leukemických blastech přítomny ve vyšší míře i znaky myeloidní řady, a pacienty, u kterých došlo v časných fázích léčby k imunologickému "shiftu", tedy změně povahy leukemických blastů z lymfoidní do myeloidní řady.

pac. číslo	diagnóza	věk(r)-dg	pohlaví	translokace	důvod vyšetření
41	ALL	2	ž	MLL/AF4	NG2
206	ALL	10	m	MLL/ENL	NG2
524	ALL	15	m	MLL/AF4	proB
655	ALL	8	ž	MLL/AF9	proB
896	ALL	2	m	MLL/ENL	proB+NG2
908	ALL	14	m	neg.	NG2
86D	AHL	10	ž	MLL/AF4	lineage switch
1057	ALL	16	m	neg.	lineage switch
844	AHL	2	m	neg.	lineage switch
914	AHL	14	m	neg.	proB
945	AHL	2	m	neg.	proB

Tabulka 6: Výsledky pacientů s B prekurzovou leukémií a AHL.

Vyšetřili jsme 11 pacientů. Přestavbu genu MLL jsme detekovali u 6 pacientů, a to ve formě fúzních genů MLL/AF4 (3 pacienti, 27%), MLL/ENL (2 pacienti, 18%) a MLL/AF9 (1 pacient, 9%).

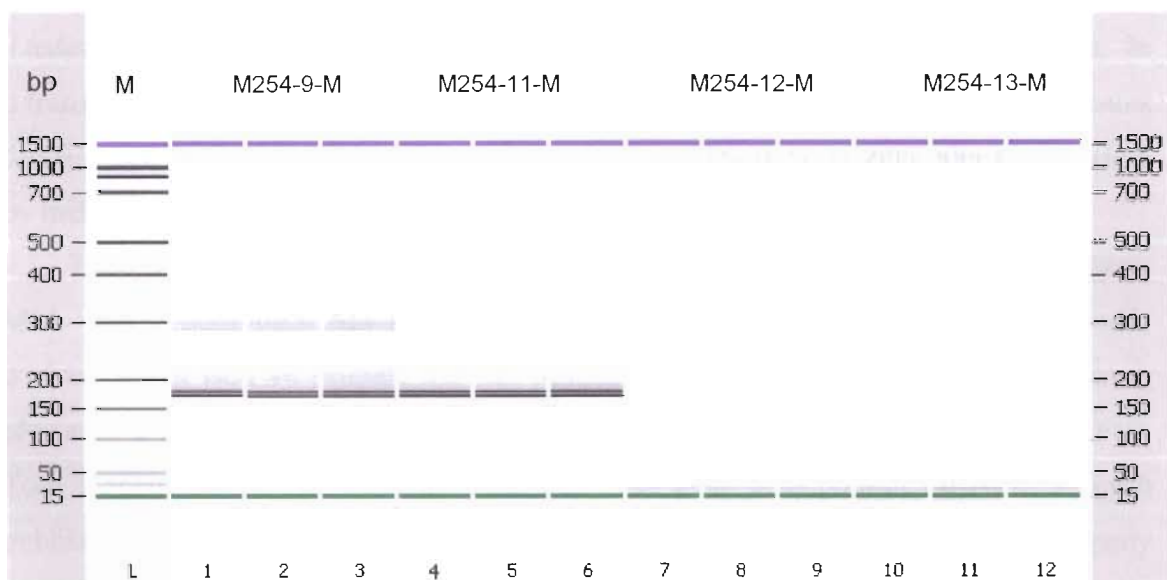
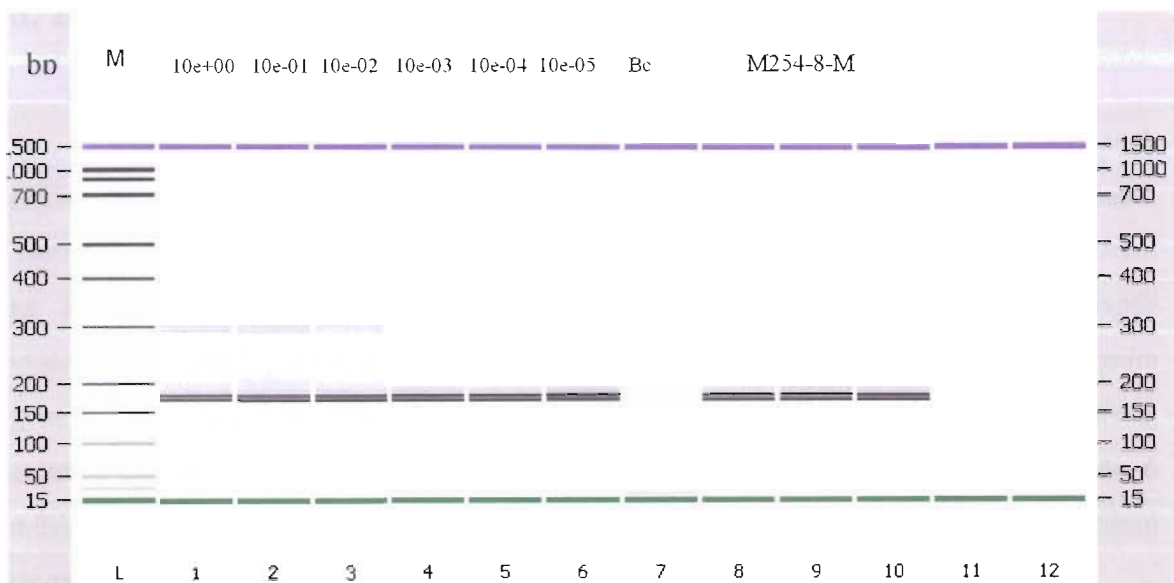


## 5.2. Sledování MRN u pacienta s prokázanou přestavbou genu MLL

MRN jsme dosud sledovali u 10 pacientů, z toho 7 pacientů podstoupilo transplantaci hematopoetických progenitorů (SCT). Pro ilustraci přikládáme výsledky jednoho z nich. V Tabulce 7 a na Obrázku 10 je zachyceno sledování MRN u pacientky číslo 810 s diagnostikovanou sekundární leukémií AML-M5 (primární diagnóza ALL), u které jsme našli translokaci MLL/AF9. Použili jsme PCR systémy monitorující leukemickou populaci jak na úrovni exprese RNA (cDNA) fúzního genu MLL/AF9 tak na DNA úrovni s pacient specifickými primery v intronové oblasti zlomu (dosáhli jsme citlivosti  $\geq 10^{-5}$ , tedy schopnost detekce 1 leukemické buňky ve  $\geq 100\,000$  jiných buněk).

označení	dny od dg	MRN na RNA (cDNA)	MRN na DNA
M254-8-M	D+15	pozitivní	pozitivní
M254-9-M	D+28	pozitivní	pozitivní
M254-11-M	D+99 (před SCT)	slabě pozitivní	pozitivní
M254-12-M	D+139 (D+28 po SCT)	negativní	negativní
M254-13-M	D+173 (D+60 po SCT)	negativní	negativní

Tabulka 7: Výsledky sledování MRN u pacientky se sekundární AML, MLL/AF9 pozitivní.



Obrázek 10. Na obrázku je výsledek dvoukolové PCR na DNA úrovni u pacientky s fúzním genem MLL/AF9 detekovaný na Agilentu, kde pomocí pacient-specifických primerů jsme amplifikovali úsek dlouhý 175 bp. V horní části obrázku je na pozici „L“ velikostní marker. Na pozici 1-6 je ředící řada od 10e+00 do 10e-05 připravená z DNA diagnostického vzorku ředěná do DNA izolované z buffy-coatu (Bc) periferní krve dárců. Tuto DNA (Bc) používáme též jako negativní kontrolu (pozice 7). Na pozicích 8-10 je pozitivní výsledek vzorku M254-8-M vyšetřený v triplicátu. V dolní části obrázku je na pozici 1-3 vzorek M254-9-M (pozitivní), 4-6 M254-11-M (pozitivní), 7-9 M254-12-M (negativní) a 10-12 M254-13-M (negativní).

## 6. Diskuze

V našem souboru kojeneckých ALL jsme potvrdili vysokou četnost MLL přestaveb (72%). Mezi pozitivními pacienty dominuje přestavba MLL/AF4, která tvoří 2/3 případů. Tato data jsou v souladu s nedávno publikovanou podrobnou analýzou kojeneckých ALL na mezinárodním léčebném protokolu INTERFANT, do které jsme i my přispěli výsledky od našich pacientů [30]. V této studii je rovněž MLL/AF4 nejčastějším fúzním genem, následován MLL/ENL a MLL/AF9. Věkové rozložení případů je trochu odlišné, zatímco Jansen et al. popisují přítomnost MLL/AF4 hlavně u mladších kojenců do 6 měsíců věku, v našem souboru není tato tendence tolik patrná a pacienti jsou rozloženi rovnoměrněji.

Zvláštní komentář si zaslouží pacienti s přestavbou MLL/AF10. Tři z devíti dětí v našem souboru měly v translokaci zavzat ještě alespoň jeden jiný gen. Zdá se, že u translokací, jejichž produktem je fúzní gen MLL/AF10, je takováto komplexnost častější, než se dlouho myslelo. V současné době se účastníme mezinárodní studie, která by měla tuto teorii dále podrobně studovat.

Naše výsledky vyšetření pacientů s AML ukazují, že případy s přestavbou genu MLL jsou v podtypech M4 a M5 skutečně časté - dohromady tvoří asi 2/3 případů, o něco častější jsou ve skupině M5 než M4. Z našich dat je dobře patrné, že spektrum přestaveb u AML a ALL je jiné a u AML převažují fúzní geny MLL/AF9 a MLL/AF10. Toto rozdělení však není výlučné - oba tyto fúzní geny jsme popsali i u ALL, z jiných publikovaných dat je na druhou stranu známo, že i u AML jsou popisovány případy s fúzí MLL/AF4. Z toho můžeme usuzovat na to, že k přestavbám genu AML dochází ve velmi nezralých hematopoetických progenitorech a i když tyto buňky mají zřejmě větší tendenci diferencovat do lymfoblastů v případě MLL/AF4 a do myeloidní linie v případě MLL/AF9 a MLL/AF10, není vyloučena u žádného typu ani opačná diferenciací.

V naší práci jsme měli možnost vyšetřit i 9 pacientů se sekundární leukémií. Naše výsledky ukazují, že nejčastějším typem sekundární leukémie je AML a že sekundární malignita je ve většině případů způsobena přestavbou genu MLL. Bylo prokázáno, že zlomy tohoto genu způsobují specificky některá cytostatika, zejména inhibitory topoizomerázy jako je například etoposid [30]. U dvou z našich pacientů (323, 919) jsme popsali vzácné typy translokací a výsledných fúzních genů. Zatímco fúzní gen MLL/FOXO3A již byl popsán u dvou případů sekundární AML po léčbě Hodgkinova

lymfomu [30], gen MLL/MAML2 je zcela novou, dosud nepopsanou aberací. Vzhledem k tomu, že jsou obvykle pro vyšetření k dispozici i vzorky předcházející vlastní diagnóze sekundární malignity (neboť jsou uchovávány po odběrech při monitorování primární diagnózy), můžeme jejich zpětným vyšetřením zjistit, kdy se MLL přestavba v buňkách poprvé objevila a zjistit tak zajímavé informace o biologické podstatě tohoto typu leukémií. V našem souboru se takto podařilo zpětně vysledovat přibližnou dobu vzniku přestavby u dvou zmíněných pacientek s geny MLL/MAML2 a MLL/FOXO3A. Podle výsledků předchází vznik fúzního genu diagnózu leukémie až o řadu měsíců (12 respektive 20) a zřejmě tedy u těchto typů fúzních genů sám o sobě nestačí k vyvolání sekundární leukémie a potřebuje ještě nějaký další genetický "zásah". Studie detailně se zabývající oběma těmito případy nejsou v současné době ještě kompletně dokončeny.

Minimální reziduální nemoc se v posledních letech stává jedním ze základních ukazatelů prognózy onemocnění a její vyšetření má klíčový význam v moderních léčebných protokolech jak u nově diagnostikovaných případů (pro správné zařazení do léčebné skupiny podle rizika) tak u pacientů po relapsu a zejména po transplantaci kmenových buněk krvetvorby. U AML často nemáme jiný cíl pro sledování léčebné odpovědi pacientů. I když standardem pro monitorování MRN je u ALL vyšetření přestaveb genů pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TCR), metody založené na MLL přestavbách jako cíli nám mohou přinést řadu nových informací. Jednak vyšetření genomického zlomu může nahradit případně chybějící Ig/TCR cíle a jednak srovnání DNA přístupu a vyšetření exprese fúzních genů na mRNA (cDNA) úrovni může ukázat nové biologické informace o tom, zda exprese mRNA v maligních buňkách přežívajících cytostatickou léčbu zůstává stejná či zda se mění. Naše dosavadní předběžné výsledky hovoří spíše pro první variantu, pro přesnou analýzu ovšem bude muset získat ještě další data.

## 7. Závěr

Vyšetřili jsme soubor téměř 80 pacientů s různými typy dětských leukémií, které jsou nejčastěji způsobeny přestavbou genu MLL. Naše výsledky ukazují, že námi použitý algoritmus vyšetření (PCR screening šesti nejčastějších fúzních genů, FISH s použitím MLL split sondy a případně vyšetření místa zlomu na intronové úrovni) je schopen určit přítomnost a typ MLL přestavby u všech pacientů s diagnózou kojenecké ALL, AML-M4 a/ M5 či se sekundární leukémií. Samotné vyšetření nejčastějších fúzních genů v našem souboru odhalilo 47/51 (92%) přestaveb.

Vyšetření přestaveb genu MLL u dětských hematologických malignit slouží v klinické praxi jednak jako prognostický ukazatel (pacienti jsou podle výsledků vyšetření zařazováni do různých rizikových skupin léčebných protokolů) a jednak jako výhodný cíl pro sledování minimální reziduální nemoci. S použitím MLL přestaveb jako cíle můžeme monitorovat MRN jak na RNA tak na DNA úrovni. U AML se často jedná o jediný cíl, který můžeme s dostatečnou citlivostí u pacientů sledovat. Standardním cílem k vyšetřování MRN u pacientů s ALL jsou přestavby imunoglobulinů a T-buněčných receptorů, u pacientů s nezralými formami leukémie (což bývají často právě děti s přestavbou genu MLL) však bývá obtížné tyto imunoreceptorové přestavby detekovat. Pak se možnost sledovat alternativní cíl (MLL přestavbu) může v některých případech stát velmi důležitou pro správnou indikaci protinádorové terapie - zejména u pacientů po transplantaci kmenových buněk krvetvorby.

## 8. Abstrakt

Přítomnost přestavby genu MLL (11q23) je významným prognostickým faktorem a dobrým cílem pro sledování minimální reziduální nemoci (MRN) u některých subtypů dětských akutních leukémií (AL). V současné době je známo více než 80 různých translokací genu MLL, z nichž je molekulárně charakterizováno více než 50 partnerských lokusů. Pomocí metody multiplex-reverzně transkriptázové polymerázové řetězové reakce (multiplex-RT PCR), kombinované v některých případech s analýzou DNA přechodové oblasti, jsme vyšetřovali skupinu kojenců (<1 rok věku) s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), děti s akutní myeloidní leukémií (AML) subtypu M4 a M5 a pacienty se sekundární leukémií. Navíc jsme vyšetřili děti s B-prekurzorovou leukémií, kteří splňovali alespoň jedno z těchto kritérií: proB imunofenotyp, cytogeneticky prokázaná přestavba genu MLL a/nebo exprese molekuly NG2 prokázaná pomocí průtokové cytometrie. Metoda multiplex-RT PCR umožňuje rychlou detekci nejčastěji vyskytujících se fúzních partnerů MLL genu (AF4, AF6, AF9, AF10, ENL a ELL). Vyšetřili jsme soubor téměř 80 pacientů léčených v České republice v období 1997-2007, fúzní gen s účastí MLL jsme našli celkem u 51 z nich. Naprostou většinu přestaveb (92%) se podařilo detekovat námi použitou metodou, zbytek DNA analýzou přechodové oblasti, která umožňuje odhalit jakýkoliv, tedy i dosud nepopsaný partnerský lokus genu MLL. Vyšetření přestaveb genu MLL u dětských hematologických malignit slouží v klinické praxi jednak jako prognostický ukazatel při stratifikaci pacientů do léčebných protokolů a jednak jako výhodný, často jediný možný cíl pro sledování minimální reziduální nemoci.

## 9. Summary

Presence of the MLL gene rearrangement at 11q23 is an important prognostic feature. Moreover, the rearrangements represent a suitable target for the minimal residual disease (MRD) monitoring in some subtypes of childhood acute leukaemias (AL). Currently more than 80 different translocations involving the MLL gene and more than 50 of those are characterised at the molecular level. Using multiplex-reverse transcriptase polymerase chain reaction (multiplex RT-PCR) and - in some cases - its combination with DNA analysis of the translocation breakpoint we examined a group of infants (<1 year of age) diagnosed with acute lymphoblastic leukaemia (ALL), children with M4 and M5 subtypes of acute myeloid leukaemia (AML) and patients with secondary leukaemias. Moreover, we examined children with B-cell precursor fulfilling at least one of the following criteria: proB immunophenotype, cytogenetically confirmed MLL rearrangement and/or expression of NG2 molecule shown by flow cytometry. Multiplex-RT PCR technique enables fast detection of the most frequent fusion partners of the MLL gene (AF4, AF6, AF9, AF10, ENL a ELL). We screened almost 80 patients diagnosed and treated in the Czech Republic between 1997 and 2007 and we found an MLL-fusion gene in 51 of them. Vast majority of rearrangements (92%) was detected by the multiplex-RT PCR, the rest of the cases by DNA analysis of the breakpoint region. Analysis of the MLL rearrangements in childhood haematological malignancies is crucial as a prognostic marker used in current treatment stratifications and, moreover, as a suitable (and sometimes the only) target for the MRD monitoring.

## 9. Použitá literatura

1. Starý, J., Mayer J. a kolektiv.. *Leukemie*. Grada Publishing, 2002
2. Stiller, C.A., *Epidemiology and genetics of childhood cancer*. *Oncogene*, 2004. 23(38): p. 6429-44.
3. Hrusak, O., et al., *Acute lymphoblastic leukemia incidence during socioeconomic transition: selective increase in children from 1 to 4 years*. *Leukemia*, 2002. 16(4): p. 720-5.
4. Silverman, L.B., et al., *Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01*. *Blood*, 2001. 97(5): p. 1211-8.
5. Pui, C.H., et al., *Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital*. *Blood*, 2004. 104(9): p. 2690-6.
6. Gaynon, P.S., et al., *Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995*. *Leukemia*, 2000. 14(12): p. 2223-33.
7. Schrappe, M., et al., *Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group*. *Blood*, 2000. 95(11): p. 3310-22.
8. van Dongen, J.J., et al., *Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia*. *Leukemia*, 1999. 13(12): p. 1901-28.
9. Hilden, J.M., et al., *MLL gene rearrangement, cytogenetic 11q23 abnormalities, and expression of the NG2 molecule in infant acute myeloid leukemia*. *Blood*, 1997. 89(10): p. 3801-5.
10. Ross, M.E., et al., *Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia*. *Blood*, 2004. 104(12): p. 3679-87.
11. Rubnitz, J.E. and A.T. Look, *Molecular basis of leukemogenesis*. *Curr Opin Hematol*, 1998. 5(4): p. 264-70.
12. Libura, J., et al., *Therapy-related acute myeloid leukemia-like MLL rearrangements are induced by etoposide in primary human CD34+ cells and remain stable after clonal expansion*. *Blood*, 2005. 105(5): p. 2124-31.
13. Ng, A., et al., *Effects of topoisomerase 2 inhibitors on the MLL gene in children receiving chemotherapy: a prospective study*. *Leukemia*, 2005. 19(2): p. 253-9.
14. Pui, C.H., et al., *Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia*. *N Engl J Med*, 1991. 325(24): p. 1682-7.
15. Campana, D. and C.H. Pui, *Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance*. *Blood*, 1995. 85(6): p. 1416-34.
16. Trka, J., et al., *Real-time quantitative PCR detection of WTI gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry*. *Leukemia*, 2002. 16(7): p. 1381-9.
17. Campana, D. and F.G. Behm, *Immunophenotyping of leukemia*. *J Immunol Methods*, 2000. 243(1-2): p. 59-75.



18. Campana, D. and E. Coustan-Smith, *Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow*. Cytometry, 1999. 38(4): p. 139-52.
19. Hrusak, O. and A. Porwit-MacDonald, *Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. Review*. Leukemia, 2002. 16(7): p. 1233-1258.
20. Hsieh, J.J., et al., *Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization*. Mol Cell Biol, 2003. 23(1): p. 186-94.
21. Slany, R.K., *When epigenetics kills: MLL fusion proteins in leukemia*. Hematol Oncol, 2005. 23(1): p. 1-9.
22. Ayton, P.M. and M.L. Cleary, *Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins*. Oncogene, 2001. 20(40): p. 5695-707.
23. Gu, Y., et al., *The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to Drosophila trithorax, to the AF-4 gene*. Cell, 1992. 71(4): p. 701-8.
24. Yu, B.D., et al., *Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice*. Nature, 1995. 378(6556): p. 505-8.
25. Meyer, C., et al., *The MLL recombinome of acute leukemias*. Leukemia, 2006. 20(5): p. 777-84.
26. Gu, Y., et al., *Sequence analysis of the breakpoint cluster region in the ALL-1 gene involved in acute leukemia*. Cancer Res, 1994. 54(9): p. 2326-30.
27. Bernard, O.A. and R. Berger, *Molecular basis of 11q23 rearrangements in hematopoietic malignant proliferations*. Genes Chromosomes Cancer, 1995. 13(2): p. 75-85.
28. De Braekeleer, M., et al., *The MLL gene and translocations involving chromosomal band 11q23 in acute leukemia*. Anticancer Res, 2005. 25(3B): p. 1931-44.
29. Andersson, A., et al., *Paired multiplex reverse-transcriptase polymerase chain reaction (PMRT-PCR) analysis as a rapid and accurate diagnostic tool for the detection of MLL fusion genes in hematologic malignancies*. Leukemia, 2001. 15(8): p. 1293-300.
30. Jansen, M.W., et al., *Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement*. Leukemia, 2007. 21(4): p. 633-41.

# Příloha

## Publikace

Fronkova E., Madzo J., Zuna J., Reznickova L., Muzikova K., Hrusak O., Sary J., Trka J. (2005): TEL/AML1 real-time quantitative reverse transcriptase PCR can complement minimal residual disease assessment in childhood ALL. *Leukemia* 2005; 19: 1296-1297

## Abstrakta v časopisech s IF

# přednáška, ostatní poster

Muzikova, K., Fronkova, E., Reznickova, L., Sramkova, L., Formankova R., Sedlacek, P., Sary, J., Trka J (2005): Minimal residual disease before haematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukaemia. Poster.

47th ASH Annual Meeting, Atlanta, Georgia, 2005. *Blood* 2005, 106(11):2037

Fronkova, E., Reznickova, L., Muzikova, K., Mejstrikova, E., Hrusak, O., Schrappe, M., Sary, J., Trka, J (2004): Minimal Residual Disease Detection Identifies Differences Between the Risk Groups Defined by the ALL IC-BFM 2002 and the ALL-BFM 2000 Protocols. Poster.

46th ASH Annual Meeting, San Diego, California, 2004. *Blood* 2004, 104(11):1085

#Muzikova, K., Fronkova, E., Reznickova, L., Sramkova, L., Sedlacek, P., Sary, J., Trka, J.: Minimal residual disease level prior HSCT is the best predictor of outcome in transplanted children with ALL. Přednáška

31st Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Prague, Czech Republic 2005. *Bone Marrow Transplantation* 2005, 35(2):S22

Kalinova, M., Sedlacek, P., Formankova, R., Muzikova, K., Fronkova, E., Reznickova, L., Sary, J., Trka, J.: Little evidence for the prognostic role of WT1 quantitative detection before HSCT in paediatric haematologic malignancies. Poster.

31st Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Prague, Czech Republic 2005. *Bone Marrow Transplantation* 2005, 35(2):S158

Fronkova E., Avigad S., Chik K.W., Castillo L., Manor S., Reznickova L., Zdrahalova K., Skocovska T., Schrappe M., Conter V., Izraeli S., Li C.K., Stark B., Hrusak O., Mejstrikova E., Sary J., Trka J.: Minimal Residual Disease (MRD) Analysis in Non-MRD Based ALL IC-BFM 2002 Protocol for Childhood ALL: Is It Possible To Omit Minimal Residual Disease in Risk Stratification?

48th ASH Annual Meeting, Orlando, Florida, 2006. *Blood* 2006, 108(11):2271

Krejčíková K., Muzikova K., Fronkova E., Kalinova M., Reznickova L., Zuna J., Sary J., Trka J.: Limited Reliability of Ig/TCR Based MRD Monitoring in BCR/ABL-Positive Childhood ALL: Comparison to Quantitative Fusion Transcript Detection

48th ASH Annual Meeting, Orlando, Florida, 2006. *Blood* 2006, 108(11):2340

Fronkova E., Avigad S., Chik K.W., Castillo, L., Manor S., Reznickova L., Mejstrikova E., Schrappe, M., Conter V., Izraeli, S., Stark B., Stary J., Trka J.: Minimal residual disease analysis in non-MRD based treatment protocol for childhood ALL: Low risk features together with fast morphological response fail to identify slow-responders within the ALL IC-BFM 2002 standard risk group

11th Congress of EHA, Amsterdam 2006, *Haematologica-The Hematology Journal* 2006, .91(1):651 (IF=4.6)

## Přednášky

Řezníčková L., Zemanová Z., Jarošová M., Marschalek R., Burjanivová T., Mužíková K., Zuna J., Starý J., Trka J.(2006): Vyšetřování přestaveb genu MLL u dětských pacientů s akutními leukemiemi.

XX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc

Starý J., Vrzalová A., Zemanová Z., Holzerová M., Linková V., Zuna J., Řezníčková L., Vávra V., Štěrba J., Blatný J., Mihál V., Pospíšilová D., Toušovská K., Ovčáčíková L., Blažek B., Ptoszková H., Černá D., Jabali Y., Procházková D., Hak J., Sedláček P., Mejstříková E., Zámková A., Housková J., Jarošová M., Michalová K. 2006: 11q23+ akutní myeloidní leukémie u dětí v České republice.XVI. konference dětských hematologů a onkologů ČR a SR, Podbanské, SR

Fronková E., Avigad S., Chik K.W., Castillo, L., Manor S., Řezníčková L., Zdráhalová K., Houdková A., Blažek B., Černá Z., Hak J., Jabali Y., Mihál V., Procházková D., Štěrba J., Skočovská T., Schrappe M., Conter V., Izraeli S., Hrušák O., Mejstříková E., Starý J., Trka J. (2006): Analýza minimální reziduální nemoci (MRN) na protokolu ALL IC-BFM 2002: Je možné stratifikovat pacienty bez MRN? XVI. konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, Podbanské, SR

Fronková E., Řezníčková L., Mužíková K., Mejstříková E., Hrušák O., Blažek B., Černá Z., Hak J., Jabali Y., Mihál V., Procházková D., Starý J., Štěrba J., Schrappe M., Trka J. (2005): Dynamika minimální reziduální nemoci u dětí s ALL identifikuje potenciálně rizikové pacienty ve skupině nízkého rizika s rychlou morfologickou odpovědí XV. konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, České Budějovice

Fronková E., Řezníčková L., Mužíková K., Mejstříková E., Hrušák O., Schrappe M., Starý J., Trka J. (2005): Znaky nízkého rizika a rychlá morfologická odpověď na iniciační fázi léčby nekoreluje s dynamikou minimální reziduální nemoci u dětí s ALL. Interim analysis pro PSDH ČR XIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc

Froňková E., Řezníčková L., Mužiková K., Mejstříková E., Hrušák O., Schrappe M., Starý J., Trka J. (2004): Minimální residuální nemoc odhaluje rozdíl mezi rizikovou stratifikací v protokolech ALL IC-BFM 2002 a ALL-BFM 2000

XIV. konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky,  
Průhonice

Froňková E., Mužiková K., Řezníčková L., Šrámková L., Mejstříková E., Hrušák O., Štěrba J., Procházková D., Blažek B., Starý J., Trka J. (2004): Detekovatelná minimální residuální nemoc v okamžiku izolovaného extramedulárního relapsu předpovídá dřeňový relaps dětské ALL

XIV. konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky,  
Průhonice