

**Kvantitativní detekce exprese genu WT1: prognostický
význam a sledování reziduální nemoci u dětských
hematologických onemocnění**

Markéta Kalinová

Dizertační práce

**Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta
2007**

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli prof. MUDr. J. Trkovi, Ph.D. za uvedení do molekulární genetiky dětských leukémií, za odbornou a metodickou pomoc a za důsledné vedení v průběhu celého studia.

Prof. MUDr. J. Starému DrSc., Doc. MUDr. O. Hrušákovi Ph.D., MUDr. O. Krejčímu Ph.D., MUDr. J. Zunovi Ph.D., Mgr. J. Madžovi Ph.D., MUDr. L. Boublíkové a MUDr. E. Mejstříkové děkuji za spolupráci na společných projektech. Bc. K. Mužíkové děkuji za pomoc v praktických laboratorních otázkách. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem spolupracovníkům ze skupiny CLIP a všem svým novým spolupracovníkům z Laboratoře molekulární patologie Ústavu patologie molekulární medicíny UK 2.LF pod vedením prof. MUDr. R. Kodeta, CSc.

OBSAH

1	Úvod	4
1.1	Gen WT1	4
1.2	Hematologická onemocnění v dětském věku	8
1.2.1	Akutní lymfoblastická leukémie	8
1.2.2	Akutní myeloidní leukémie	11
1.2.3	Myelodysplastický syndrom	14
1.2.4	Aplastická anémie	16
1.2.5	Anaplastický velkobuněčný lymfom	17
1.3	Minimální reziduální nemoc	18
1.4	Transplantace hematopoetických kmenových buněk	20
2	Cíle práce	22
3	Metody	23
3.1	Materiál	23
3.2	Odběr a zpracování vzorků	23
3.3	Kvantitativní PCR	24
3.4	Analýza výsledků a statistické zpracování	25
4	Výsledky	26
4.1	Kontrolní vzorky	26
4.2	Pacienti s aplastickou anémií a myelodysplastickým syndromem	26
4.2.1	Sledování minimální reziduální nemoci u pacientů s MDS	27
4.3	Pacienti s akutní lymfoblastickou leukémií	28
4.3.1	Sledování minimální reziduální nemoci u pacientů s ALL	32
4.4	Pacienti s akutní myeloidní leukémií	33
4.4.1	Sledování minimální reziduální nemoci u pacientů s AML	34
4.5	Pacienti podstupující transplantaci hematopoetických kmenových buněk	36
4.6	Pacienti s anaplastickým velkobuněčným lymfomem	39
4.6.1	Sledování minimální reziduální nemoci u pacientů s ALCL	41
4.7	Mezinárodní studie	42
5	Diskuze	44
6	Závěr	49
7	Seznam použitých zkratk	50
8	Přílohy	52
8.1	Příložené publikace	52
8.2	Publikační a přednášková činnost	58
9	Použitá literatura	63

1 Úvod

1.1 Gen WT1

Gen WT1 (název odvozen od Wilmsova tumoru) byl poprvé izolován roku 1990, kdy byl lokalizován na krátké raménko chromozomu 11 do oblasti 11p13 a je jedním z genů odpovědných za vznik Wilmsova tumoru ledvin [1]. Gen WT1 je dlouhý 50kbp, skládá se z 10 exonů, kdy exony 7-10 kódují motiv transkripčního faktoru – motiv čtyř „zinkových prstů“. Několik alternativních začátků transkripce v oblastech s ostrůvky CpG, dva nezávislé alternativní sestřihy v kódující oblasti a dále řada posttranskripčních modifikací dávají genu WT1 možnost velkého počtu (nejméně 36) různých proteinových izoform, které jsou lokalizovány ve specifických buněčných kompartmentech v závislosti na jejich funkci, čase a typu buněk [2-7].

Mezi dva nezávislé alternativní sestřihy patří: první alternativní sestřih, který zahrnuje 51 nukleotidů exonu 5, který kóduje 17 aminokyselin; druhý alternativní sestřih používá dvě donorová sestřihová místa na 3' – konci exonu 9, jenž kóduje zinkový prst 3. Zde jsou vkládány nebo deletovány 3 aminokyseliny: lyzin – treonin – serin = sekvence KTS. Kombinacemi alternativních sestřihů vznikají 4 hlavní sestřihové formy genu WT1 (-/-,+/-,-/+ ,+/+), viz Obrázek č. 1. Nejčastější sestřihovou variantou je protein, který obsahuje oba sestřihové úseky, a nejméně častou variantou je protein, u něhož jsou oba úseky vystřiženy [8].

Protein WT1 má několik funkčních domén, jeho C konec obsahuje již zmíněné 4 domény zinkových prstů, které se váží na DNA sekvence a některé proteiny a obsahují jaderný lokalizační signál. Amino konec proteinu WT1 obsahuje doménu bohatou na aminokyseliny prolin a glutamin a domény, které se účastní jak represe, tak aktivace transkripce, viz Obrázek č.1.

Protein WT1 je transkripční faktor a reguluje expresi mnoha cílových genů (má jak represní, tak aktivační účinek) – bylo identifikováno více než 45 různých cílových genů (růstové faktory, receptory růstových faktorů např. CSF-1, TGFβ-1, RARα, c-myc, bcl-2, WT1, PDGF-A). Gen WT1 je také zahrnut v postranskripční úpravě RNA. Funkce genu WT1 je jak v kontrole proliferace, diferenciaci, buněčném cyklu, tak v apoptóze [4, 9-11]. Fyziologicky je gen WT1 exprimován prenatálně v mezoteliálních lištách abdominální dutiny, zahrnujících perikard, slezinu, speciální populaci míšních neuronů a sklerotik vyvíjejících se somitů. Postnatálně přetrvává exprese genu WT1 v podocytech ledvin,

v Sorteliho buňkách varlat a granulózniích buňkách dělohy a vaječníků a v hematopoetických prekurzorech [12-16].

Důležitá je funkce genu WT1 v kontrole proliferace a diferenciaci hematopoetických buněk, kdy hematopoetické prekurzory (CD34+/CD38-) procházejí bifázickým vývojem exprese genu WT1: gen WT1 je exprimován v nezralých progenitorech, ve kterých navozuje stav “quiescence”, čímž tyto buňky udržuje ve fenotypicky primitivním stavu (G0 fáze), poté dochází k rapidnímu snížení exprese genu WT1 a znovuobjevení až ve zralejších prekurzorech granulocytární/monocytární řady [15-17]. Dvoufázová exprese genu WT1 během hematopoeze je pozoruhodně podobná expresi ve vyvíjející se ledvině, kdy lze sledovat nízkou hladinu transkriptu v blastických buňkách a velmi vysoké hladiny se objevují v následujících stádiích diferenciaci [18]. Z toho plyne, že snížení exprese genu WT1 během procesu hematopoezy je významným požadavkem pro maturaci hematopoetických buněk a naopak vysoká hladina proteinu WT1 diferenciaci a tudíž maturaci brání.

Pokud však dojde zatím nedefinovaným způsobem k narušení tohoto fyziologického snížení exprese genu WT1 během hematopoezy, tak tato porucha může vést podle jedné z teorií k expanzi hematopoetických progenitorů, a tím je učiní citlivé k dalším genetickým změnám, které následně mohou vést ke vzniku leukémie. Někteří autoři předpokládají přímou účast aberantně exprimovaného proteinu na leukemogenezi, například v kooperaci s fúzním genem AML1/ETO, kdy Nishida et al. ve své práci ukazuje na myším modelu, že fúzní gen AML1/ETO (přítomný u subtypu akutní myeloidní leukémie M2 a výsledek t(8;21) – viz kapitola 1.2.2. Akutní myeloidní leukémie) samotný není schopný spustit leukémii, pouze způsobuje u transgenních myši abnormální myelopoezu podobnou myelodysplastickému syndromu, kdy se zvyšuje počet nezralých myeloidních prekurzorů v kostní dřeni, avšak u myši nedojde k rozvoji leukémie ani po dlouhé latenci. Na druhou stranu myši model s konstitutivně exprimovaným genem WT1 vykazoval zvýšení myelopoezy v kostní dřeni a granulocytózu v periferní krvi. Avšak všechny myši po transplantaci buněk kostní dřene transdukovaných fúzním genem AML1/ETO a získaných od transgenních myši s již konstitutivně exprimovaným genem WT1 vyvinuly akutní myeloidní leukémii [19].

Také však bylo popsáno, že v primárních hematopoetických prekurzorech a v leukemických buněčných liniích schopných diferenciaci je exprese genu WT1 spojena se zastavením buněčného cyklu a spontánní diferenciací [17]. Tyto výsledky argumentují proti onkogenní roli WT1 u leukémií. Narušená funkce tohoto genu tedy může přispět ke

vzniku určitých podtypů leukémií, ale většina případů zřejmě získává mutace, které je mohou učinit necitlivé k účinku „wild-type“ WT1 a vést tak ke zpětnovazebně udržované či dokonce zvyšované expresi WT1. S těmito výsledky se také shodují data publikovaná Ellisenem et al, která poukazují na neschopnost ektopické exprese genu WT1 indukovat diferenciaci v leukemických buňkách neschopných odpovědi na diferenciací agens.

U různých typů malignit a premaligních syndromů byly detekovány jak mutace v genu WT1, tak změny hladin exprese „wild type“ genu WT1. Typickým příkladem je úloha genu WT1 jako nádorového supresoru u WAGR syndromu (Wilmsův tumor, aniridie, urogenitální vady a mentální retardace), Denis-Drash syndromu a Frasierova syndromu, kde nacházíme heterozygotní mutace [20, 21]. První zmínky o tom, že gen WT1 může být účasten vývoje leukémií, byly popsány v roce 1990 Callem [1]. Mutace v genu WT1 typu bodových mutací, malých delecí nebo inzercí byly nalezeny u 10-20% pacientů s akutní leukémií, převážně u pacientů s bifenotypickou leukémií a akutní myeloidní leukémií (AML), vzácně u pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). U pacientů s AML jsou tyto mutace spojeny s horší prognózou [3, 22]. Nejčastějšími mutacemi jsou malé inserce v exonu 1 a 7, nonsense mutace v exonu 9 a jejich výsledkem je ve všech případech zkrácený protein, jenž vykazuje defekt v doméně „zinkových prstů“. Změny hladin exprese „wild type“ genu WT1 jsou nejčastěji typu nadměrné exprese (hyperexprese), kdy hyperexprese byla nalezena v 80-90% pacientů s AML, v 70-90% pacientů s ALL a u pacientů s myelodysplastickým syndromem [5, 22-29]. U chronické myeloidní leukémie je hladina exprese genu WT1 v chronické fázi nemoci obvykle nízká a zvyšuje se s progresí onemocnění, tzn. s přechodem do akcelerované fáze a blastické krize [5, 30].

Tamaki et al. [31] se ve své práci zabývá expresí genu WT1 u pacientů s MDS a ukazuje, že by hladina exprese genu WT1 mohla sloužit jako nádorový marker preleukemických nebo leukemických blastů MDS a že odráží progresi tohoto onemocnění. Pokud by exprese genu WT1 byla skutečně jednoznačným markerem maligního postižení, umožňovala by jeho kvantitativní detekce spolehlivé rozlišení refrakterní anémie (RA) od jiných forem anémie, zejména aplastické (SAA). Současně by umožňovala sledování progresu MDS.

Ztráta exprese genu WT1 u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií, leukémií z vlasatých buněk a „plasma cell leukemia“ naznačuje, že exprese genu WT1 je limitována pouze na nezralé leukémie [30].

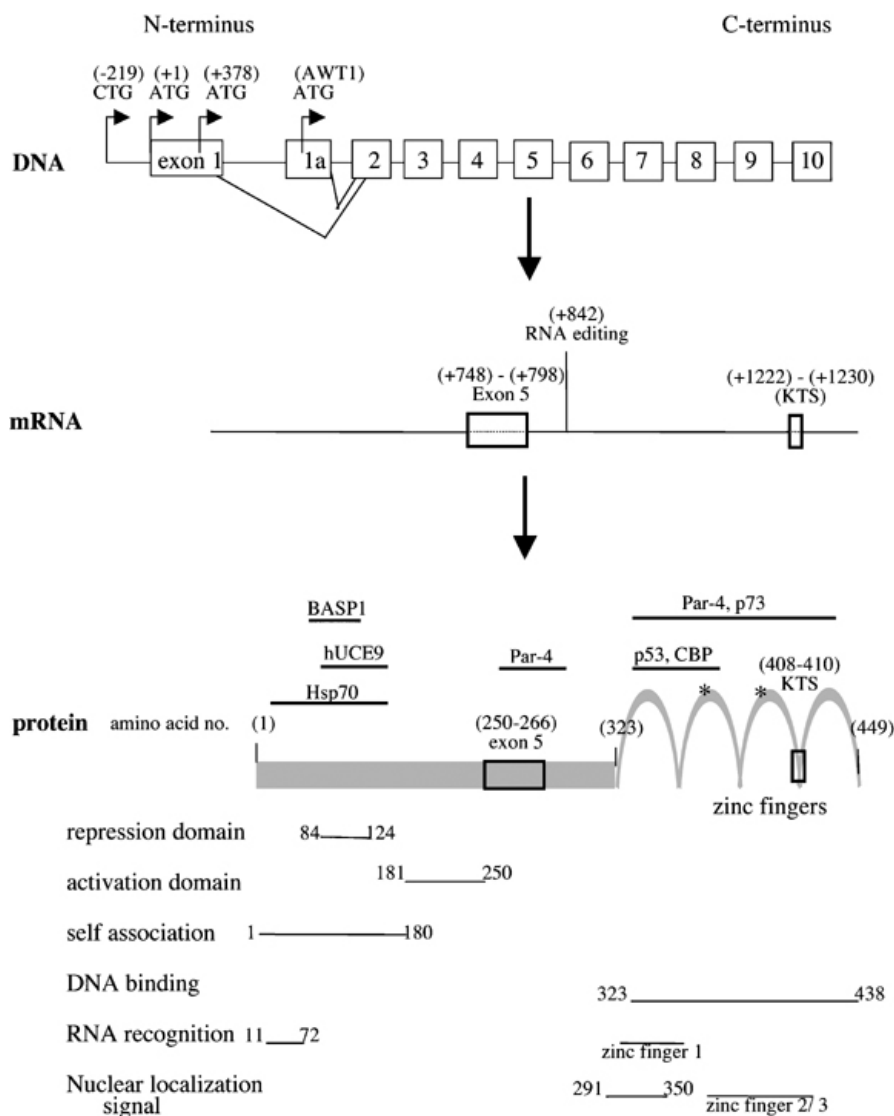
Někteří autoři [5, 32-36] našli nízkou hladinu exprese genu WT1 u relativně zralejších AML se subtypem M5 a M7.

V několika studiích [32, 35-39] byla vysoká exprese genu WT1 při diagnóze u pacientů s akutními leukémiemi určena jako nezávislý prognostický faktor spojený s horší prognózou, ale někteří autoři [33, 40, 41] toto tvrzení ve svých studiích neprokázali. Některé diskrepance mezi jednotlivými studiemi zabývajícími se hladinami exprese genu WT1 mohou být způsobeny rozdílným souborem pacientů s odlišným typem léčby, velikostí sledovaných souborů (často menší skupiny), ale také nestandardizovanými technikami a různými kvantifikačními přístupy (semikvantitativní PCR vs. real-time PCR, relativní vs. absolutní kvantifikace, různé kontrolní geny).

Zprávy o přítomnosti, resp. nepřítomnosti jednotlivých izoform proteinu WT1 v různých stádiích vývoje fyziologických hematopoetických prekurzorů a jejich nepoměr v buňkách akutních leukémií jsou zatím neuspořádané a vzájemně si protirečí [42-44]. Někteří autoři zjistili, že WT1 (+/+) blokuje G-CSF zprostředkovanou diferenciací [45], kdežto WT1(-/-) urychluje diferenciaci a inhibuje G1/S progresi supresí Cyklinu E a tedy, že WT1(-/-) a WT1(+/+) mají odlišnou funkci během hematopoetické diferenciace [46].

To, že je gen WT1 zahrnut v leukemogenezi tedy podporují tyto výsledky: 1. téměř všechny leukémie exprimují gen WT1 na vysokých hladinách [3, 26, 35], 2. růst leukemických buněk s vysokou expresí genu WT1 je potlačen použitím WT1 antisense oligonukleotidy [47] a siRNA proti WT1 [48] 3. zvýšená exprese genu WT1 v myších myeloidních progenitorech a hematopoetických progenitorech inhibuje diferenciaci a podporuje jejich proliferaci pomocí G-CSG [19, 45].

Nadměrná exprese „wild type“ genu WT1 tedy hraje významnou onkogenní roli nejen u AML, ale zřejmě i u řady jiných nádorových onemocnění (ovariální karcinomy, astrocytární nádory, plicní nádory atd.). Stále však není známo, zda nadměrná exprese genu WT1 je zahrnuta v iniciaci nebo progresi nádorového onemocnění.



Obrázek č. 1. Schéma struktury WT1 DNA (pouze exony), mRNA a proteinu [9].

1.2 Hematologická onemocnění v dětském věku

1.2.1 Akutní lymfoblastická leukémie

Akutní leukémie jsou nejčastějším nádorovým onemocněním dětského věku, přičemž asi 80% dětských leukémií tvoří akutní lymfoblastická leukémie (ALL). Ročně v České republice onemocní 65-70 dětí s typickou věkovou distribucí, kdy vrchol výskytu je zaznamenán ve věkové skupině předškolních dětí [49]. Ve skutečnosti není ALL jedno homogenní onemocnění, ale souhrn relativně přesně imunofenotypově a genotypově charakterizovaných podskupin. Tyto podskupiny se liší typickým věkem při nástupu nemoci, odpovědí na léčbu a prognózou [50]. Při podezření na akutní leukémii je nutné komplexní vyšetření kostní dřeně. ALL je definována nálezem $\geq 25\%$ lymfoblastů

v aspirátu kostní dřeně. Kromě morfologického a cytochemického vyšetření kostní dřeně se provádí vyšetření imunofenotypu a cytogenetické a molekulární vyšetření. Imunofenotyp zařadí ALL k řadě B nebo T-lymfocytární a určí stádium prekurzoru, ze kterého vznikl leukemický klon. U dětí se nejčastěji vyskytuje ALL z nezralých B-prekurzorů (80%), méně často z prekurzorů a zralých T-lymfocytů (15%) a výjimečně ze zralých B-lymfocytů (2%) nebo z velmi nezralých prekurzorů před vývojem lymfocytové řady (hybridní leukémie). Cytogenetické vyšetření určí karyotyp leukemického klonu a molekulární vyšetření zjišťuje nejčastější fúzní geny přítomné u ALL (Tabulka č 1). Fúzní geny vznikají při chromozomálních translokacích, kdy dochází k výměně genetického materiálu mezi partnerskými chromozomy. Fúzní geny mohou být translatovány do proteinů a zasahovat do buněčných pochodů [51]. Geny, které se účastní chromozomálních aberací u akutních leukémií, často hrají klíčovou roli při vývoji lymfoidních a myeloidních prekurzorů, většinou jde o transkripční faktory, regulátory buněčného cyklu, molekuly signálních kaskád, buněčné receptory nebo molekuly imunoglobulinů či T-buněčných receptorů [51, 52]. Přítomnost některých fúzních genů má prognostický význam a/nebo je asociována s citlivostí či rezistencí na určitá cytostatika [53-59].

ALL	Chromozomální aberace	Fúzní gen	Relativní frekvence
B-ALL			
	t(1;19)(q23;p13)	E2A/PBX1	5-8%
	t(4;11)(q21;q23)	MLL/AF4	3-5% (kojenecké ALL až 70%)
	t(9;22)(q34;q11)	BCR/ABL p190	3-5%
	t(9;22)(q34;q11)	BCR/ABL p210	1-2%
	t(12;21)(p13;q22)	TEL/AML1	25-30%
		<i>Celkem</i>	<i>40-45%</i>
T-ALL			
	del(1)(p32;p32)	SIL/TAL1	10-25%

Tabulka č. 1. Nejčastější chromozomální aberace u dětských ALL [52]

Fúzní geny

TEL/AML1

Nejčastější translokací u dětských ALL je t(12;21), kdy dochází k fúzi genu TEL na 12p2 (také nazývaný ETV6) s genem AML1 (synonymum CBFA2 nebo RUNX1). Fúzní gen je transkripční faktor, který má funkci jako represor genů ovlivňovaných samotným genem AML1 [60]. Starší studie s kratší dobou sledování ukazovaly, že TEL/AML1 pozitivní

leukémie mají menší procento relapsů [54, 61], studie skupiny BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) ale ukázala, že incidence této translokace ve skupině s relapsem je stejná jako při iniciální diagnóze. Relaps se většinou vyskytuje pozdě a jeho léčba má dobrou prognózu [62]. Oproti tomu studie z Dana Farber Cancer Institute prokázala pozitivitu TEL/AML1 pouze u 1 ze 32 vzorků z doby relapsu onemocnění [63]. Tyto rozdíly jsou zřejmě způsobeny odlišnými způsoby léčby. Studie in vitro ukázaly, že TEL/AML1 pozitivní blasty jsou zvýšeně citlivé k asparagináze, proto je jejich eliminace pravděpodobně účinnější na protokolech s vyššími dávkami asparaginázy [64].

BCR/ABL

Fúzní gen vzniká translokací t(9;22), která je charakteristická a diagnostická pro chronickou myeloidní leukémii (CML). Fúzní protein má alterovanou tyrosinkinázovou aktivitu, která je zodpovědná za maligní transformaci. BCR/ABL pozitivní ALL patří k nejobtížněji léčitelným ze všech dětských ALL. Velkou nadějí přinesl objev specifického inhibitoru tyrosinkinázy BCR/ABL imatinib masylátu (STI 571, Gleevec, Glivec). Jeho nasazení přineslo přechodný efekt u pacientů s relapsem, u většiny případů však došlo k rekurenci choroby. V současné době se testuje nasazení imatinibu při iniciální léčbě spolu s chemoterapií.

E2A/PBX1

Tento fúzní gen je spojen s preB imunofenotypem. V protokolech využívajících klasickou antimetabolitovou léčbu byl znakem špatné prognózy, při použití současné intenzivní léčby se však stal nejpříznivějším genetickým subtypem dětských ALL s dlouhodobým přežitím přibližujícím se 90% [56].

MLL/AF4

Tento fúzní gen se vyskytuje až u 70% kojeneckých ALL a postihuje zejména děti do 6 měsíců věku. Gen MLL (mixed lineage leukemia) na chromozomu 11 má kromě genu AF4 ještě řadu dalších translokačních partnerů a jeho fúzní geny se nacházejí asi u 6% dětských ALL [52]. Fúzní gen MLL/AF4 se sdružuje s nezralým proB fenotypem a nepříznivou prognózou u dětí do 1 roku věku. Blasty s přestavbou MLL/AF4 nesou na svém povrchu často myeloidní znaky. Studie skupiny ze St Jude Children's Research Hospital v Memphisu ukázala, že se špatnou prognózou se pojí všechny translokace genu MLL [56].

Klinické prognostické faktory

Mezi nejdůležitější prognostické faktory patří věk a počet leukocytů při diagnóze. Za příznivý je pokládán věk 1-9 let a nízká iniciální leukocytóza (do $50 \times 10^9/l$). Děti do 1 roku mají prognózu trvale špatnou, za což z velké části odpovídá přestavba genu MLL. Přibližně 12-15% dětských ALL klasifikovaných jako z T buněk má horší prognózu než ALL z B prekurzorů.

Relaps ALL

Nejčastější příčinou neúspěchu léčby ALL je relaps onemocnění, který prodělává 20-25% dětí. Z hlediska další prognózy je velmi důležitá doba od diagnózy a místo, kde relaps vzniká. Nejhorší prognózu mají velmi časný relapsy v kostní dřeni, které vznikají do 18 měsíců od diagnózy. Relativně nejlepší prognózu mají pozdní relapsy mimodřeňové, které vznikají v centrálním nervovém systému nebo u chlapců v testes. Léčba relapsů je protokolární a je rozdělena do 3 rizikových skupin: skupina s nejnižším rizikem, skupina s intermediární prognózou a skupina s nejvyšším rizikem. Přes veškerou snahu jsou výsledky léčby relapsu významně horší než výsledky léčby primární ALL.

1.2.2 Akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukémie (AML) je u dětí relativně vzácným onemocněním, které tvoří asi 12% všech dětských leukémií a vyskytuje se s incidencí 0,8 nového případu/100000 dětí/rok [49]. AML vzniká z kmenové myeloidní buňky, která má značnou diferenciací šíři, a proto leukemickým procesem může být postižena granulocytární, monocytární, erytroidní i megakaryocytární řada. Z pohledu dnešních poznatků je možné vyčlenit řadu podskupin s různým klinickým i laboratorním nálezem, prognózou a odpovědí na terapii. V roce 1976 navrhla „French – American – British (FAB) Cooperative Group“ klasifikaci akutních leukémií na základě vyšetření nátěrů periferní krve a kostní dřene paletou cytochemických barvení. S rozvojem nových diagnostických metod pro bližší poznání akutních leukémií – imunofenotypizace, cytogenetiky a molekulární biologie – postupně vznikala návrh integrované klasifikace „Morphology, Immunology a Cytogenetic (MIC) Cooperative Group“.

Dle FAB klasifikace rozdělujeme AML na subtypy M0 až M7 [65]:

M0 – akutní leukémie s minimálními známkami myeloidní diferenciacie (tzv. časná myeloidní leukémie) – výskyt 6%

M1 – akutní myeloidní leukémie bez vyzrávání – výskyt 10%

M2 – akutní myeloidní leukémie s vyzráváním – výskyt 27%

M3 – akutní promyelocytární leukémie, M3v – variantní mikrogranulární leukémie M3 – výskyt M3 celkem 5%

M4 – akutní myelomonocytární leukémie, M4Eo – varianta s eozinofilií – výskyt M4 celkem 21%

M5 – akutní monocytární leukémie – výskyt 22%

M6 – erytroleukémie – výskyt 3%

M7 – akutní megakaryoblastická leukémie – výskyt 6%

Pro diagnózu je důležitý nález blastů v periferní krvi a kostní dřeni: v periferní krvi nacházíme často 20 – 90 % blastů, zatímco ve dřeni od několika procent do úplně infiltrované dřene.

Prvním a nejdůležitějším diagnostickým cílem je rozlišení mezi akutní myeloidní a akutní lymfoblastickou leukémií. Podmínkou správné diagnózy je morfologické, cytochemické, cytogenetické a imunologické vyšetření kostní dřene a periferní krve (viz Tabulka č. 2).

	ALL	AML
morfologie	žádná granula žádné Auerovy tyče	obvykle granula Auerovy tyče se mohou vyskytovat
MPO barvení	negativní	pozitivní
Imunofenotyp	B-řada: CD19+, CD10+ T-řada: cyCD3+, CD7+	panmyeloidní antigeny pozitivní (CD13, CD33, CD65)
Karyotyp	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) monosomie 7 trisomie 8 (nespecif.)

Tabulka č. 2. Rozdílné znaky AML a ALL [65]

Prognostické faktory

Vyšetření pacienta při diagnóze má stanovit individuální riziko selhání léčby, riziko časně smrti, relapsu nebo smrti v remisi. Nejdůležitějším prognostickým faktorem zůstává stejně jako u ALL správně indikovaná a provedená intenzivní chemoterapie.

Nález translokace t(8;21) se vznikem fúzního genu AML1/ETO, t(15;17) se vznikem fúzního genu PML/RAR α a inverze chromozomu 16 se vznikem fúzního genu CBF β /MYH11 je příznivým prognostickým znakem. Naopak nález monozomie chromozomu 7 je spojen s nepříznivou prognózou a vyskytuje se často u sekundárních AML nebo u AML, které se vyvinuly z myelodysplastického syndromu (MDS).

Počet leukocytů v periferní krvi nad 100 000/ μ l zvyšuje riziko časně smrti na krvácení a/nebo leukostázu, zejména u pacientů s monocytární leukémií. Význam počtu leukocytů pro vznik relapsu je již méně jasný.

Významným prognostickým faktorem je časná odpověď na léčbu. Časně vymizení blastů z kostní dřeně po prvním bloku chemoterapie (kostní dřeň den +15) zvyšuje šanci na dlouhodobé přežití. Pacienti s nedostatečnou nebo žádnou odpovědí na první blok chemoterapie jsou kandidáty časných relapsů.

Pacienti s M3 leukémií mají sice většinou nízký počet leukocytů při diagnóze, zato ale vysoké riziko život ohrožujícího krvácení při diseminované intravaskulární koagulaci. Rovněž děti s M7 leukémií mají vysoké riziko selhání léčby (pokud se nejedná o děti s Downovou nemocí). Německá pracovní skupina BFM, jejíž protokoly jsou používány v České republice, dělí dětské pacienty s AML do dvou rizikových skupin: standardního rizika a vysokého rizika. Do vysokého rizika jsou na základě tohoto doporučení řazeny 2/3 dětí s AML, do standardního rizika jedna třetina dětí.

Tato stratifikace léčby do rizikových skupin umožňuje využít u pacientů s vysokým rizikem intenzivnějších, ale rizikovějších terapeutických postupů (alogenní transplantace kostní dřeně) a u pacientů s nízkým rizikem se lze naopak pokusit léčbu redukovat.

Relaps AML

Příčiny vzniku relapsu nejsou objasněny, ale je známa řada mechanismů, které k jeho vzniku přispívají. Nejčastěji je uváděna existence mnohočetné lékové rezistence.

Nepříznivými rizikovými faktory pro úspěch léčby relapsu jsou délka první remise kratší než jeden rok a nález nepříznivých cytogenetických změn - zejména monozomie chromozomu 7 a komplexního karyotypu. Relaps AML se v 60 % případů manifestuje již v prvním roce od diagnózy. V této situaci je šance na dosažení druhé remise pouze 10 –

30 % a dlouhodobé přežití bez relapsu je 0 – 15 % (i po léčbě transplantací). Je-li první remise delší jednoho roku, je šance na dosažení druhé remise 40 – 70 % a pravděpodobnost dlouhodobého přežití je 30 % [65].

1.2.3 Myelodysplastický syndrom

Myelodysplastický syndrom (MDS) je u dětí vzácné onemocnění a tvoří méně než 10% maligních onemocnění krvetvorby. V České republice je ročně diagnostikováno 3-8 dětí a dospívajících. Často postihuje geneticky predisponované jedince. MDS je označení pro heterogenní skupinu nemocí s charakteristickou monoklonální hematopoezou s normo-, hypo- nebo hypercelulární kostní dřeni a současnou periferní cytopenií (inefektivní hematopoezou) postihující jednu či více vývojových linií.

Morfologické hodnocení kostní dřene a krevního obrazu je základem FAB klasifikace, která rozlišuje 5 podskupin MDS (viz dále). Frekvence FAB subtypů se u dětí liší od výskytu v dospělosti; agresivní typy RAEB a RAEBt tvoří více než 50% dětských MDS a naopak RAS se u dětí prakticky nevyskytuje (Tabulka č. 3).

Klasifikace MDS dle FAB:

Refrakterní anémie (RA)

Projevuje se jako mírná nebo středně těžká pancytopenie nebo cytopenie jedné řady. Zastoupení blastů v kostní dřeni je v mezích normy (< 5% blastů). Diagnóza je často obtížná v situaci chybění průkazu klonality. Zejména v kojeneckém věku mohou morfologický obraz RA imitovat některá infekční a metabolická onemocnění.

Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RAS)

U dětí je extrémně vzácná. Děti s morfologickým obrazem RAS mají většinou mitochondriální cytopatii – sideroplastickou anémií. Při diagnostice RAS jsou cytochemickým barvením železa detekovány v kostní dřeni prstenčité sideroblasty ($\geq 15\%$ všech jaderných buněk).

Refrakterní anémie s excesem blastů (RAEB)

Jde o hypercelulární kostní dřev s 5 – 20% blastů a nález v periferní krvi je < 5% blastů. U dětských pacientů existují diferencially diagnostické rozpaky v odlišení MDS a AML, kdy v případech nálezů charakteristických změn pro AML (fúzní geny AML1/ETO, PML/RAR α ,

MYH11/CBF β) a s detekcí méně než 30% blastů v kostní dřeni má být onemocnění diagnostikováno jako AML s nízkým počtem blastů.

Refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci (RAEBt)

Obraz je podobný jako v případě RAEB, jen podíl blastů v kostní dřeni je zvýšen na 21-30% anebo v periferní krvi na 5-20%. Diferenciálně diagnostické rozpaky MDS vs AML stejné jako v případě RAEB.

Chronická myelomonocytární leukémie (CMML)/ juvenilní myelomonocytární leukémie (JMML)

V případě CMML je charakteristická dysplazie všech buněčných linií v kostní dřeni a zmnožení monocytárních buněčných forem. Počet blastů v kostní dřeni je <20%. V periferní krvi je počet monocytárních buněčných forem $>1 \times 10^9/l$ a je akceptováno 5 a více procent blastů. U dětí je nejčastěji pro toto onemocnění, charakterizované diagnózou v raném dětství (medián věku při diagnóze 1,8 roku), výraznou hepatosplenomegálií, častým postižením kůže, leukocytózou, monocytózou a přítomností nezralých krevních prekurzorů v periferní krvi, používán název JMML. Chlapci jsou postiženi častěji s poměrem s děvčaty 2,1:1. Asi 65% dětí má normální karyotyp, 25% má monozomii chromozomu 7, 15% pacientů má klinický nález neurofibromatózy 1. typu a 7% má jiné anomálie (např. nemoci charakterizované instabilitou genomu jako je Fanconiho anémie, Bloomův syndrom atd., dále různé imunodeficience, vrozená agranulocytóza Kostmannova typu atd.). Některé herpetické viry (CMV, EBV, HHV-6) mohou u malých dětí imitovat morfologický i klinický obraz JMML. Účinnou léčbou je pouze alogenní transplantace kostní dřene.

Podtyp	incidence u dětí (%)
RA	23
RAS	0
RAEB	31
RAEBt	13
CMML/JMML	32

Tabulka č. 3. Výskyt jednotlivých subtypů u dětských MDS [66]

Cytogenetické nálezy u MDS

Chromozomální změny se popisují asi u poloviny dětských pacientů. Častěji jsou detekovány početní změny chromozomů. Nejčastější chromozomální změnou je kompletní nebo parciální ztráta chromozomu 7, kterou nacházíme až u 30% pacientů. Dále můžeme detekovat trizomii chromozomu 8 a 21, případně parciální delece dlouhých ramének chromozomů 5, 7, 11 a 20. Monozomie chromozomu 7 se může vyskytovat u všech subtypů MDS [67].

Sekundární MDS

U dětí léčených chemoterapií, radioterapií a transplantací kostní dřeně je pozorováno vyšší riziko vzniku MDS. S rozvojem sekundárního MDS a leukémie se spojují zejména dvě skupiny cytostatik: inhibitory topoizomerázy II a alkylační agens. Sekundární MDS je spojeno s velmi špatnou prognózou.

Molekulárně genetické vyšetření

V současné době jsou rozvíjeny metodiky sloužící k průkazu klonální povahy onemocnění. Většina metodik využívá analýzy X-chromozomu a průkaz klonálního či polyklonálního charakteru krvetvorby. Detekuje se přítomnost či chybění fyziologických rozdílů mezi otcovským a mateřským X chromozomem a jsou vybírány okrsky s přirozeně vysokou variabilitou jako je např. gen pro hypoxantinfosforibosyl transferázu (HPRT), fosfoglycerát kinázu (PGK) či lidský androgenní receptor (HUMARA). Jako další genetické změny můžeme detekovat mutace v genech RAS, p53, FLT3 a JAK2 a v pokročilejších stádiích MDS hypermetylaci genu kódující inhibitor cyklin dependentní kinázi p15INK4B [67-70].

1.2.4 Aplastická anémie

Aplastická anémie (SAA) je nemaligní typ onemocnění, charakterizovaný nedostatečnou tvorbou krevních buněk v kostní dřeni. Může postihovat jen některý typ krvinek nebo celou krvetvorbu. SAA se dělí na vrozenou a získanou, kdy mezi vrozené patří Fanconiho anémie, Blackfanova - Diamondova anémie, Shwachmanův - Diamondův syndrom. Získané SAA mohou znamenat přechodnou poruchu tvorby erytrocytů, která může být způsobena virovou infekcí (EBV), ale může dojít až k dřevému útlumu, kdy dochází k postižení kmenové buňky krvetvorby, projevující se poklesem všech krevních elementů. Příčinou mohou být některé léky, cytostatika, toxické látky, ionizující záření aj.

Diferenciální diagnostika SAA a některých typů MDS typu RA je stále komplikovaná a neexistuje jednoznačné kritérium, které by tato zásadně rozdílná onemocnění odlišilo.

1.2.5 Anaplastický velkobuněčný lymfom

Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) je morfologicky i imunologicky definovaná jednotka non-Hodgkinských lymfomů (NHL), která představuje 2-8% všech lymfomů [71]. Ve většině případů jde o lymfomy T řady se ztrátou povrchových receptorů, ale se zachováním produkce cytotoxických granúl (perforin, granzym B, TIA-1). Diagnostika se opírá o morfologická kritéria a o subklasifikaci ALCL na základní imunofenotypy podle exprese proteinu ALK (anaplastic lymphoma kinase): ALCL CD30+ALK+ a o ALCL CD30+ ALK-. Molekula CD30 (zvaná též Ki-1) je 120kDa transmembránový cytokinový receptor, který patří do rodiny TNFR (tumor necrosis factor receptor). Exprese molekuly CD30 byla popsána v Hodgkinových a Reed-Sternbergových buňkách, buňkách ALCL a v aktivovaných B a T lymfocytech [72]. Kromě hematologických onemocnění byla exprese molekuly CD30 také popsána v anaplastických karcinomech, embryonálním karcinomu, melanomu, seminomu atd. [73-75].

ALK protein pozitivní ALCL se vyskytují převážně ve věkových kategoriích do třetího decennia, ALK protein negativní ALCL postihují starší osoby s věkovým průměrem 60 let. Obě skupiny lymfomů mají agresivní průběh, avšak ALK+ ALCL reagují dobře na systémovou léčbu a mají příznivější prognózu. Přibližně u 70% ALK+ ALCL je exprese proteinu ALK výsledkem translokace t(2;5)(p23;q35), která vede ke vzniku fúzního genu NPM/ALK.

NPM/ALK

Fúzní gen NPM/ALK nacházíme asi u 75% dětských ALCL. Při translokaci t(2;5)(p23;q35) fúzuje část genu kódující N-terminální úsek nukleofosminu (NPM) s částí genu ALK, která kóduje cytoplazmatickou oblast ALK proteinu [76]. NPM je transportní fosfoprotein přenášející nově syntetizované ribonukleoproteiny z cytoplazmy do jádérka a je přítomen ve všech buňkách. ALK protein je transmembránový receptor s tyrozin kinázovou aktivitou a postnatálně je exprimován jen v některých buňkách glie, v endoteliích a pericytech cév v mozku a je nepřítomen v lymfoidních tkáních [77-79]. Fúzní protein NPM/ALK tvoří homodimery nebo heterodimery s proteinem NPM. V kaskádě aktivačních reakcí aktivuje fúzní protein NPM/ALK fosfolipázu C a indukuje

mitotickou aktivitu, ale také reaguje s dalšími kinázami, které působí v antiapoptickém cyklu. Transfekční experimenty ukázaly, že fúzní gen má transformační potenciál [80-82].

1.3 Minimální reziduální nemoc

U leukémií je minimální reziduální nemoc (MRN) definována jako stav, kdy běžnými cytologickými metodami detekujeme méně než 5% maligních buněk v kostní dřeni. V této situaci hovoříme o kompletní hematologické remisi, přestože může mít pacient v těle až 10^{10} maligních buněk [83]. Toto množství je nadále velmi vysoké a právě tyto přežívající nádorové buňky mohou později způsobit relaps onemocnění. Proto jsou od počátku 90. let ve větší míře rozvíjeny techniky, které detekují tuto submikroskopickou hladinu nádorových buněk. V posledních letech se pro rutinní sledování MRN používá pouze imunofenotypizace (vícebarevná průtoková cytometrie) a metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR), lépe na kvantitativní PCR, která umožňuje detekovat přesné množství nádorových buněk přítomných v kostní dřeni případně periferní krvi pacienta. Metoda průtokové cytometrie využívá nejčastěji tři nebo čtyřbarevnou kombinaci značení antigenů, kdy nádorové buňky jsou detekovány na základě přítomnosti aberantních antigenů, asynchronní exprese nebo atypického množství exprese antigenů či jiných kombinací [83-85]. Problémem detekce MRN však může být posun v imunofenotypu při relapsu onemocnění [86, 87]. Citlivost imunofenotypizace se pohybuje v řádu 10^{-3} - 10^{-5} .

Metody detekce MRN pomocí PCR jsou založeny na amplifikaci určitých úseků nukleových kyselin, které jsou specifické pro nádorové buňky. Citlivost těchto metod se pohybuje v řádu 10^{-5} - 10^{-6} .

MRN a ALL

V případě ALL jsou molekulárním cílem pro sledování MRN fúzní geny, produkty chromozomálních translokací, které je možné detekovat na úrovni mRNA nebo přímo DNA. Kvantifikace mRNA nemonitoruje přímo množství leukemických buněk, ale hladinu exprese genu. U dětských ALL z B řady je pro své časté zastoupení nejvhodnější fúzní gen TEL/AML1, dále pak BCR/ABL, MLL/AF4, E2A/PBX1 a translokace postihující „promiskuitní“ gen MLL (MLL/AF9, MLL/AF6, MLL/AF10, MLL/ENL, MLL/ELL a další) [52, 88]. U T-ALL je možno sledovat MRN např. pomocí translokace SIL/TAL1 na úrovni DNA [89]. Metoda v současnosti považovaná za nejspolehlivější používá ke sledování MRN u ALL kvantitativní detekci klonálně-specifických přestaveb genů pro

imunoglobulíny a T-buněčné receptory na úrovni DNA. Výhodou proti průtokové cytometrii je stabilita DNA přestaveb i v případě měnícího se fenotypu leukemické buňky v průběhu terapie a celkově vyšší senzitivita. Na rozdíl od kvantifikace fúzních genů je použitelná pro naprostou většinu pacientů, navíc není ovlivněna viabilitou analyzovaných buněk. Tato metoda se stává ve stále větší míře součástí léčebných protokolů, a to i přes svou značnou časovou, finanční i laboratorní náročnost.

Rychlost, s jakou klesá hladina MRN po zahájení léčby, je důležitým znakem, který určuje průběh léčby a riziko vzniku relapsu onemocnění. Význam MRN u ALL pro určení prognózy onemocnění ukazují některé retrospektivní studie [90-96] a rozsáhlé prospektivní studie na velkých souborech pacientů vliv hladiny MRN na prognózu pacienta potvrdily [97-101]. Pacienti, kteří mají v kostní dřeni na konci indukční terapie nízkou hladinu MRN mají signifikantně lepší prognózu než pacienti s vysokými hladinami. Riziko relapsu je úměrné hladině MRN [91, 94, 95, 97, 98, 100]. Některé studie ukazují, že velký význam má sledování kinetiky MRN ve více časových bodech. Na základě kinetiky MRN v počáteční fázi léčby je možné pacienty rozdělit do rizikových skupin nezávisle na jiných prognostických znacích [97].

MRN a AML

Pro detekci MRN u AML neexistuje univerzální marker jako přestavby imunoglobulínů a T-buněčných receptorů u ALL. Možnosti imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie jsou zatím omezené, nenacházejí se kombinace znaků specifických pro leukemické buňky. Přesto bylo publikováno několik studií, které dokládají úspěšné monitorování MRN u pacientů s AML [102, 103]. Obdobně jako u ALL se i u AML vyskytují nenáhodné chromozomální aberace a z nich vycházející fúzní geny, které slouží k detekci MRN. U pacientů s akutní promyelocytární leukémií (subtyp M3) se vyskytují translokace t(15;17), t(11;17) a t(5;17) a z nich vycházející fúzní geny PML/RAR α respektive PLZF/RAR α respektive NPM/RAR α [104]. Fúzní gen PML/RAR α je možné použít k detekci MRN pomocí technik založených na PCR nebo FISH [105]. U pacientů se subtypem AML M2 a M4Eo se vyskytují translokace t(8;21) respektive inverze chromozomu 16 se vznikem fúzních genů AML1/ETO a CBF β /MYH11, které se dají využít jako cíle pro sledování MRN [106-109]. Fúzní geny mohou sloužit pro detekci MRN přibližně u 30% dětských pacientů s AML [52]. Hledání univerzálního markeru vhodného ke sledování MRN u dětí s AML vedlo k zájmu o další geny: FLT3, WT1 a PRAME. Interní tandemové duplikace genu FLT3 v leukemických buňkách je možné použít ke sledování a kvantifikaci MRN u

pacientů s AML [110, 111]. Informace o použití genu WT1 jako markeru pro detekci MRN jsou sporné. Některé studie nenalezly souvislost mezi dynamikou transkriptu WT1 a prognózou nemocného [33, 40, 112, 113], jiné studie, které využívají kvantitativních technik naznačují prognostický význam dynamiky WT1 u pacientů s AML [32, 35, 36, 39, 114-117]. Overexprese genu PRAME (preferentially expressed antigen in melanoma) byla nalezena přibližně u 40% dětských pacientů s AML, kdy pacienti s t(8;21) vykazují signifikantně vysokou expresi tohoto genu. Někteří autoři využili kvantitativní detekci exprese genu PRAME ke sledování MRN u AML, kdy našli souvislost mezi dynamikou exprese genu PRAME a průběhem onemocnění – snížení exprese v době remise onemocnění a zvýšení hladiny exprese při relapsu onemocnění [118-121].

Klinický význam MRN u AML není tak zřejmý jako u ALL. U pacientů s AML M3 predikuje nárůst hladin transkriptu PML/RAR α relaps onemocnění [122]. Naproti tomu na prognostický význam přítomnosti detekovaných hladin transkriptů AML1/ETO a CBF β /MYH11 u pacientů v remisi se názory jednotlivých autorů různí [123]. Zdá se, že je nutná rozsáhlejší studie s použitím znaků společných pro jednotlivé subtypy AML pro ověření významu MRN u pacientů s AML.

MRN a lymfomy

V případě lymfomů je detekce lymfomových buněk v KD označována jako minimální diseminovaná (případně reziduální) nemoc. Pro zjednodušení bude dále v textu uváděno minimální reziduální nemoc (MRN). Lymfomy jsou asi v 65% případů primárně uzlinová onemocnění s možným postižením KD a leukemizací. Studie věnující se hladinám MRN u lymfomů nejsou zatím stále k dispozici, avšak odběry KD a PK v průběhu terapie na stanovení hladin MRN jsou nyní součástí nejnovějších léčebných protokolů u pacientů s ALCL. Recentní studie sledují hladiny infiltrace KD v době záchytu primárního onemocnění v uzlině či jiném mimodřeňovém orgánu ve vztahu k predikci relapsu onemocnění. Některé práce prokázaly prognostický význam infiltrace KD v době diagnózy lymfomu (tzv. cirkulující lymfomové buňky v KD), kdy současné postižení KD je spojeno se zvýšeným rizikem relapsu onemocnění [124, 125].

1.4 Transplantace hematopoetických kmenových buněk

Transplantace hematopoetických kmenových buněk (TKD) je vzhledem ke své náročnosti a toxicitě vyhrazena pro poměrně úzkou skupinu pacientů s akutními leukémiemi, u

kterých selhává léčba vysokodávkovou chemoterapií. Jedná se především o pacienty s časným dřeňovým relapsem a vysoce rizikovou ALL při diagnóze [49]. V případě pacientů s SAA je TKD léčba první linie v případě dostupnosti identického sourozence. V případě nedostupnosti identického sourozence přistupují pacienti k nepříbuzenské TKD až po selhání imunosupresivní léčby. U pacientů s MDS je TKD jedinou kurativní metodou. Vzhledem k pokrokům ve zpracování štěpu, podpůrné léčbě a typizaci tkáňových antigenů, je TKD dostupná pro většinu dětí indikovaných k transplantaci [126]. Konečný výsledek transplantace ovlivňuje celá řada faktorů: dárce (příbuzný vs. nepříbuzný, HLA shoda vs. neshoda, věk, virologický status), použitý štěp (kostní dřeň vs. periferní kmenové buňky vs. pupečnicková krev), typ předtransplantační přípravy, typ prevence reakce štěpu proti hostiteli a stav pacienta před TKD [127-129]. Výsledek TKD u pacientů s akutní leukémií transplantovaných ve druhé remisi ovlivňuje též délka první remise [130, 131] a transplantace v období mimo kompletní remisi je velmi málo úspěšná. Některé publikace naznačují, že množství maligních buněk, se kterými je pacient transplantován, je rozhodujícím faktorem podílejícím se na úspěchu či neúspěchu TKD [132-137].

2 Cíle práce

Práce se zabývá diferenciálně diagnostickým a prognostickým významem exprese genu WT1 u dětských hematologických onemocnění.

1) Zavedení a standardizování metodiky (v rámci mezinárodní studie) s cílem sledovat expresi genu WT1 při diagnóze, případně v průběhu onemocnění u dětských pacientů s těmito hematologickými onemocněními:

- akutní myeloidní leukémie
- akutní lymfoblastická leukémie
- myelodysplastický syndrom
- aplastická anémie
- anaplastický velkobuněčný lymfom

2) Porovnání hladin exprese genu WT1 v průběhu terapie se sledováním reziduální nemoci pomocí průtokové cytometrie.

3) Sledování exprese genu WT1 a jeho význam v buňkách zdravých jedinců (kostní dřeň, periferní krve, pupečnicková krev) a v regenerující se kostní dřeni.

4) Koordinování jak vnitrostátní, tak mezinárodní kontroly kvality vyšetření hladin exprese genu WT1.

3 Metody

3.1 Materiál

Vzorky odebrané při diagnóze a během léčby dětským pacientům z center Pracovní skupiny pro dětskou hematologii v České republice (Praha, Plzeň, České Budějovice, Hradec Králové, Ústí nad Labem, Brno, Olomouc, Ostrava,) s hematologickým onemocnění byly shromažďovány v Laboratoři molekulární genetiky (Laboratorní centrum Kliniky dětské hematologie a onkologie UK 2.LF a Fakultní nemocnice Motol, Praha). Vzorky dospělých pacientů byly odebrány v Ústavu hematologie a krevní transfuze, Praha; na Hemato-onkologické klinice FN Olomouc a na Onkologickém oddělení nemocnice České Budějovice.

Všechny vzorky byly zpracovány v Laboratoři molekulární genetiky (Laboratorní centrum Kliniky dětské hematologie a onkologie UK 2.LF a Fakultní nemocnice Motol, Praha) a v Laboratoři molekulární patologie (Ústavu patologie a molekulární medicíny UK 2.LF Praha a FN Motol).

3.2 Odběr a zpracování vzorků

Vzorky aspirátů kostní dřeně (KD), periferní krve (PK) a pupečnickové krve byly odebrány do sterilních zkumavek s antikoagulantii (K_2 nebo K_3 EDTA) a ihned transportovány při pokojové teplotě do laboratoře, kde proběhla izolace mononukleárních buněk pomocí centrifugace v hustotním gradientu (Ficoll-Pague, hustota 1,077g/ml; Pharmacia, Uppsala, Švédsko) případně izolace pomocí osmotické lýzy erytrocytů. Izolované jaderné buňky byly uchovávány v alikvótech po 1×10^7 buněk (v případě dostatečného množství) a méně v -80°C . Celková RNA byla extrahována zavedenou technologií (modifikace „single-step“ metody) dle Chomczynského a Sacchi [138] a kontrola integrity a množství získané RNA byla provedena pomocí vizualizace na agarózovém gelu. Vzorky tkání primárních nádorů v případě pacientů s ALCL byly zpracovány pro histologické vyšetření buď jako zmražený materiál a/nebo fixované ve formolu a zalité do parafínu. Následná izolace RNA probíhala v případě kryostatových řezů pomocí Trizolu (Life Technologies) dle doporučení výrobce a z parafinových řezů dle komerčně dostupného kitu (Roche).

Přepis do cDNA probíhal pomocí MMLV reverzní transkriptázy a náhodných hexamerů v reakčních podmínkách: 1x RT pufr (50mM Tris-HCl, pH 8,3; 75mM KCl, 3mM MgCl₂);

0,01M dithiotreitol; 12,5 μ M hexamery; 0,5mM každého dNTP, 200U MMLV reverzní transkriptázy – poté 1hod/37°C.

Buněčné populace

Vybrané odběry pupečnickové krve (dle buněčnosti) byly po izolaci na hustotním gradientu následně separovány pomocí magnetických kuliček (CD34 a CD19 MACS-Magnetic Cell Sorting of Human Leukocytes, Miltenyi, Biotec, Germany) na buněčné subpopulace obohacené o danou frakci, ze kterých následně probíhala izolace RNA a reverzní transkripce (viz výše).

3.3 Kvantitativní PCR

Kvantitativní detekce exprese (reverzně transkriptázová PCR v reálném čase: RQ-RT-PCR) genu WT1, fúzního genu NPM/ALK, molekuly CD 30 a „housekeeping“ genu pro β 2-mikroglobulin probíhala na přístroji LightCycler™ (Roche) a/nebo IQcycler (Biorad) za použití hydrolyzační sondy (gen WT1, fúzní gen NPM/ALK), LNA sondy (molekuly CD30) a hybridizačních sond (gen pro β 2-mikroglobulin).

Provedli jsme amplifikaci genu WT1 od exonu 5 k exonu 10 s následným vložením do plazmidu a transformováním do buněk bakterie E. coli (TOPO T/A Cloning Kit – Invitrogen, Groningen). Po namnožení těchto transformovaných bakterií jsme izolovali plazmid Miniprep metodou s námi vloženým inzertem, poté jsme změřili koncentraci plazmidu pomocí spektrofotometru a vypočetli počet kopií genu WT1. Pro sestrojení standardní kalibrační křivky pro absolutní kvantifikaci jsme provedli logaritmické ředění plazmidu. Ředění probíhalo ze zásobního roztoku – (10^0) který odpovídal $2,5 \times 10^{10}$ počtu kopií genu WT1 v 1 μ l. Tento roztok byl logaritmicky ředěn do roztoku pufované vody TRIS-base pH 8,06 krok po kroku do ředění 10^{-3} . Toto ředění bylo poté logaritmicky ředěno do xeno-DNA (koncentrace 0.2 ug/ul, DNA z lososích spermii, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) krok po kroku do ředění 10^{-9} , které odpovídá $2,5 \times 10^1$ počtu kopií genu WT1. Standardní kalibrační křivka, která sloužila pro určení počtu kopií ve vyšetřovaném vzorku, byla sestrojena z $2,5 \times 10^6$ do $2,5 \times 10^1$ kopií genu WT1.

Podobným způsobem jsme postupovali i v případě tzv. „housekeeping genu“ – vybrali jsme si gen pro β -2 mikroglobulin. Tento gen splňuje všechny podmínky pro „housekeeping gen“, neboť lidský genom neobsahuje žádné jeho pseudogeny (na rozdíl od známých kontrolních genů, jako je např. gen pro β -actin a gen pro glyceraldehyd – fosfát dehydrogenázu, kde je známo n=8 respektive n=52 možných pseudogenů). Dále nemá

tento gen velmi vysokou expresí jako např. kontrolní gen pro 18S rRNA a nevyznačuje se ani velmi nízkou expresí a neobsahuje žádné alternativní začátky transkripce.

Pro sestrojení standardní kalibrační křivky jsme provedli ředění, které probíhalo ze zásobního roztoku 10^0 který odpovídal 1×10^{10} počtu kopií genu pro β -2 mikroglobulin v 1 μ l. Tento zásobní roztok byl ředěn do roztoku pufované vody TRIS-base pH 8.06

Standardní kalibrační křivka, která sloužila pro určení počtu kopií ve vyšetřovaném vzorku byla sestrojena z 1×10^7 kopií „housekeeping genu“ což odpovídalo expresi „housekeeping genu“ z množství izolovaného z 1×10^7 buněk zdravých dárců (odpovídá 100%) . Toto ředění bylo ředěno do pufované vody v ředění 30%, 10%, 3%, 1%, případně 0,1%; které odpovídá 1×10^4 počtu kopií „housekeeping genu“.

Účinnost obou systémů – jak detekce exprese genu WT1, tak detekce exprese „housekeeping genu“ se pohybovala ve stejných rozmezích (sklon křivky $-3,33 \pm 0,2$, korelační koeficient 1,00).

Normalizovaná hladina exprese genu WT1 byla poté určena jako poměr exprese genu WT1 k expresi „housekeeping genu“ - genu pro β -2 mikroglobulin.

Stejným způsobem jsme postupovali i v případě detekce fúzního genu NPM/ALK a molekuly CD30. Standardní kalibrační křivka pro detekci exprese fúzního genu NPM/ALK byla sestrojena z $4,4 \times 10^6$ do $4,4 \times 10^1$ kopií genu v 1 μ l, v případě detekce molekuly CD30 byla standardní kalibrační křivka sestrojena z $1,8 \times 10^6$ do $1,8 \times 10^1$ kopií genu v 1 μ l. Normalizovaná hladina exprese fúzního genu NPM/ALK a molekuly CD30 byla poté určena jako poměr exprese genu NPM/ALK resp. CD30 k expresi genu pro β -2 mikroglobulin.

Reakční podmínky kvantitativních PCR jsou uvedeny v příložených publikacích (viz str. 54 a str. 55).

3.4 Analýza výsledků a statistické zpracování

Všechny statistické analýzy zahrnující deskriptivní neparametrickou regresní analýzu byly zhotoveny za pomoci Instant a Stat-View softwaru (SAS Institute, Cary, NC, USA).

4 Výsledky

4.1 Kontrolní vzorky

Vyšetřili jsme celkem 35 kontrolních vzorků aspirátů kostní dřeně (KD) a pupečnickové krve (16x kostní dřeň od zdravých dárců, 19x pupečnicková krev – z toho 9x celá buněčná populace, 5x CD34+ populace a 5x CD19+, CD19-, CD34+, CD 34- populace), 44 vzorků periferní krve (PK) a 30 vzorků regenerující kostní dřeně (odběry od pacientů s TEL/AML1+ ALL odebrané v různých časových bodech léčby, kdy v těchto reziduálních vzorcích KD jsme nedetekovali MRN pomocí molekulární detekce fúzního genu TEL/AML1).

Kontrolní vzorky KD a pupečnickových krvinek exprimují gen WT1 na velice nízké nebo nedetekovatelné hladině (0-41,4; medián 0) – viz Obrázek č. 2. Při rozdělení na vzorky KD a pupečnickové krve: KD 0-41,4, medián 1 a ve vzorcích pupečnickové krve byly hladiny nedetekovatelné kromě 5 vzorků ve kterých byla detekovatelná hladina na velice nízké úrovni (0,1-4). Ve vzorcích PK jsme detekovali velice nízkou případně nulovou expresi genu WT1. Ve vzorcích regenerující se KD jsme našli stejné rozpětí hladin exprese genu WT1 jako ve vzorcích zdravých dárců KD.

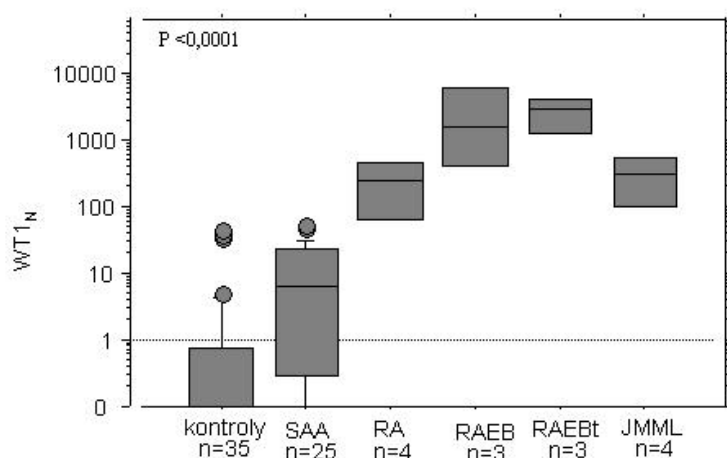
4.2 Pacienti s aplastickou anémií a myelodysplastickým syndromem

Shrnutí v článku: Je vysoká exprese genu WT1 znakem nádorových buněk?, Transfuze a hematologie dnes, str. 55.

Pacienti s aplastickou anémií (n=25) mají velice nízkou nebo nedetekovatelnou hladinu exprese genu WT1 (0-50,9 normalizovaných kopií genu WT1; medián 5,9). Pacienti s MDS (n=14) souhrnně exprimují gen WT1 na vyšší hladině než pacienti s aplastickou anémií (18,4 – 7261,9; medián 495,1). Při rozdělení pacientů s MDS na jednotlivé podskupiny byla distribuce expresních hladin následující: RA (18,4-551,4; medián 238,8), RAEB (34,2-7261,9; medián 1441,6), RAEBt (597,1-4251,2; medián 2864,6) a JMML (25,4-581,6; medián 307,7) – viz Obrázek č.2.

Po statistické analýze pomocí neparametrických testů Mann-Whitney (2 parametry) a Kruskal-Wallis (více než 2 parametry) jsme našli statistickou významnost při porovnání hladin exprese u pacientů s aplastickou anémií (SAA) a pacientů s MDS ($P < 0,001$), a stejně statisticky významné je i porovnání těchto skupin s kontrolními vzorky. V případě rozčlenění MDS na jednotlivé subtypy (RA, RAEB, RAEBt a JMML) dosahuje statistická

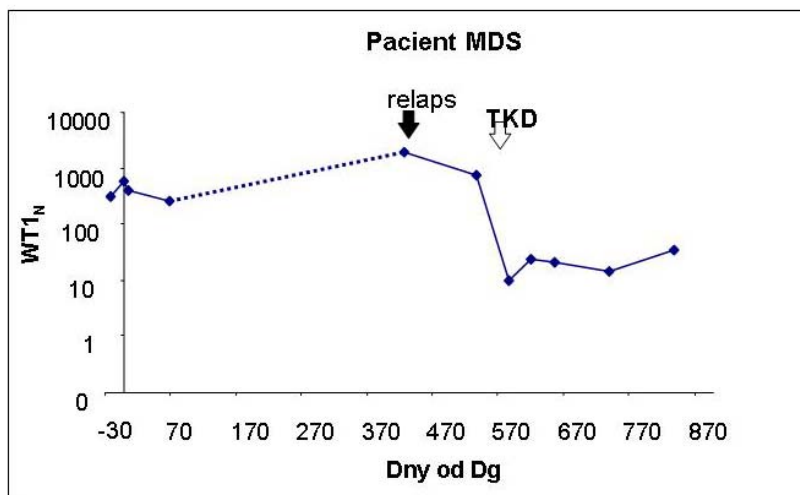
významnost hodnoty $P < 0,001$; při porovnání se skupinou pacientů s SAA a zdravými kontrolami. Při porovnání pacientů s SAA se skupinou pacientů s RA nacházíme rozdíl statisticky významný ($P = 0,0079$). Zdá se tedy, že lze na základě hladiny exprese genu WT1 rozlišit mezi maligním onemocněním typu RA a nemaligním onemocněním SAA.



Obrázek č. 2. Hodnoty hladin exprese genu WT1 u zdravých kontrol a u pacientů s SAA a MDS rozdělené na jednotlivé subtypy. Hodnoty exprese genu WT1 jsou v logaritmickém měřítku.

4.2.1 Sledování minimální reziduální nemoci u pacientů s MDS

U pacientů s MDS, kteří exprimovali gen WT1 na vysoké hladině v době diagnózy a měli k dispozici více než jeden reziduální vzorek jsme sledovali hladiny MRN během léčby a výsledky jsme korelovali s klinickým průběhem onemocnění (celkem 4 pacienti). Jeden pacient prodělal relaps onemocnění, který byl provázen vysokou hladinou exprese genu WT1, avšak díky nedostupnosti reziduálních vzorků v dlouhé době před relapsem onemocnění (359 dní) není možné určit, zda by hladina exprese genu WT1 v době před relapsem tento relaps predikovala. Mimo to u tohoto pacienta byla detekovaná vysoká hladina exprese genu WT1 i v době primární léčby (den+8) (viz Obrázek č. 3). Ostatní sledovaní pacienti (3 pacienti) s MDS podstoupili TKD a jsou nadále sledováni, kdy ve všech reziduálních vzorcích po TKD jsou detekovány hladiny exprese genu WT1 v rozmezí hodnot detekovaných ve zdravých kontrolách KD a pacienti jsou v klinické remisi. Pro sledování predikce relapsu pomocí detekce exprese genu WT1 je třeba ještě další sledování a hlavně rozšíření souboru pacientů s MDS.



Obrázek č. 3. Příklad sledování MRN u pacienta s MDS (JMML). Hodnoty exprese genu WT1 jsou v logaritmickém měřítku.

4.3 Pacienti s akutní lymfoblastickou leukémií

Shrnuto v článku Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring, Leukemia, str. 56.

A v článku: Je vysoká exprese genu WT1 známkou nádorových buněk?, Transfúze a hematologie dnes, str. 55.

Ve spolupráci s kolegy z Irska (skupina Dr. M. Lawlera z Trinity College v Dublinu) jsme vyšetřili reprezentativní skupinu dětských pacientů s ALL diagnostikovaných a léčených v České republice a v Irsku. Výsledky jsme zpracovávali zavedenou metodikou kolegů z Irska, která je porovnatelná s naší kvantitativní metodikou detekce exprese genu WT1.

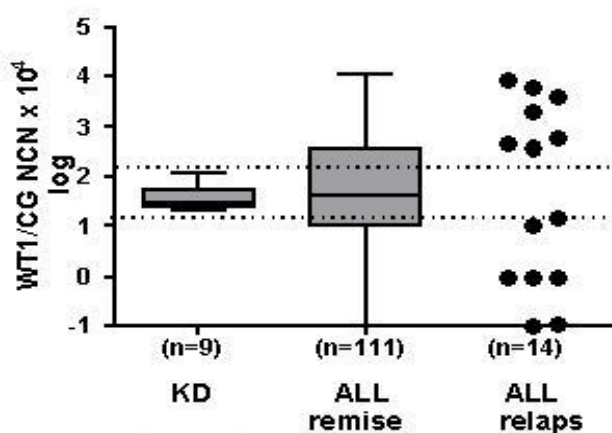
U dětských pacientů s ALL (n=125) jsme detekovali ve skupině B-ALL (n=106) v diagnostických vzorcích široké rozpětí (přes 5 řádů) hodnot exprese genu WT1, kdy většina pacientů exprimovala gen WT1 v rozmezí hodnot detekovaných ve zdravých kontrolách KD. Exprese genu WT1 ve zdravých kontrolách KD (n=9) byla detekována ve velmi nízkých hladinách, avšak v žádném z případů nebyla detekována nulová hodnota exprese genu WT1.

Exprese genu WT1 u T-ALL (n=19; medián 485) byla signifikantně vyšší než u B-ALL (medián 25) ($p < 0,001$). Při sledování hladin exprese genu WT1 v korelaci s chromozomálními abnormalitami jsme našli vysokou hladinu exprese genu WT1 u

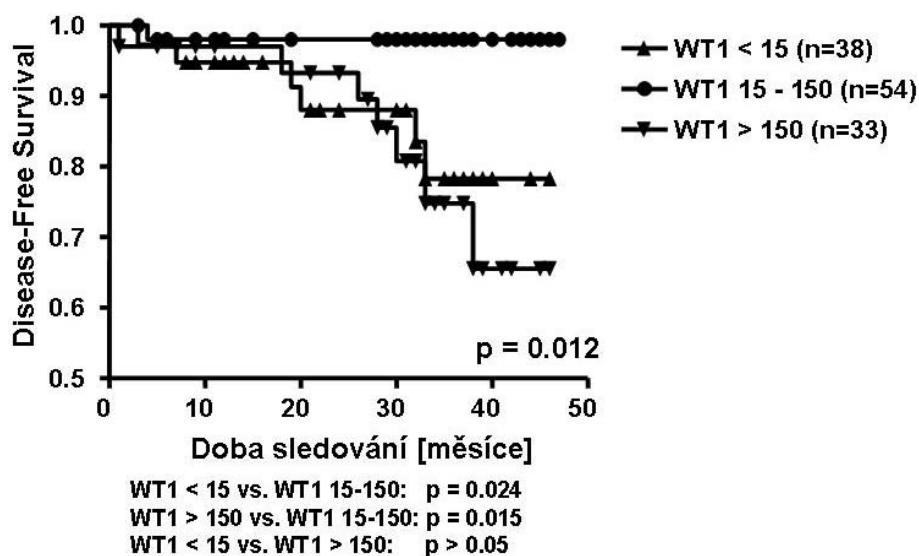
pacientů nesoucích fúzní gen MLL/AF4 a v porovnání s ostatními pacienty s ALL bez chromozomální aberace, případně s ostatními aberacemi jinými než MLL/AF4 jsme našli statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$).

Při sledování hladiny exprese genu WT1 v závislosti na věku a počtu leukocytů jsme našli vyšší hladiny exprese genu WT1 u dětí starších 10-ti let v porovnání s dětmi ve věku 1-10 let ($p < 0,001$). U dětí mladších 1 roku jsme našli vysoké hladiny exprese genu WT1, avšak do této skupiny jsou zahrnuti i pacienti nesoucí fúzní gen MLL/AF4, který je spojen s vysokou expresí genu WT1. Nenalezi jsme rozdíl mezi hladinami exprese genu WT1 a počtem leukocytů u dětských ALL.

Při studiu exprese genu WT1 jako prognostického faktoru jsme skupinu dětských pacientů s ALL rozdělili do 3 skupin: s abnormálně nízkou expresí genu WT1, s expresí v rozmezí hodnot ve zdravých KD a s abnormálně vysokou expresí. Ze 125 dětských pacientů 14 prodělalo relaps onemocnění. Při univariální analýze jsme našli signifikantně zvýšené riziko relapsu u pacientů s abnormálně nízkou a s abnormálně vysokou expresí genu WT1 ($p = 0,0006$) – Obrázek č. 4 a Obrázek č. 5.



Obrázek č. 4. Exprese genu WT1 u pacientů s relapsem v porovnání s pacienty bez relapsu a zdravými kontrolami.



Obrázek č. 5. „Disease Free Survival“ u pacientů s ALL rozdělených dle hladin exprese genu WT1 na tři skupiny: s abnormálně nízkou expresí genu WT1, s expresí v rozmezí hodnot ve zdravých KD a s abnormálně vysokou expresí.

Výsledky skupiny Boublikova et al jsou v korelaci s našimi výsledky popsány v časopise *Transfúze a hematologie dnes*:

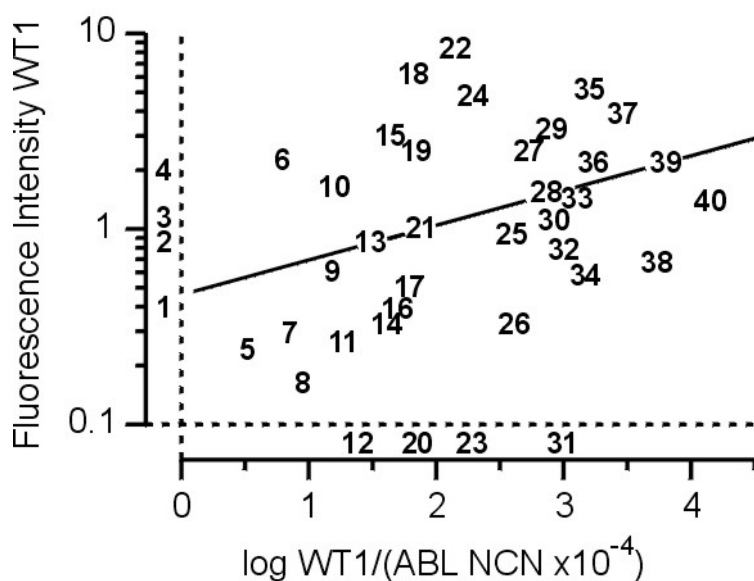
U pacientů s fúzním genem BCR/ABL (n=5) jsme detekovali nízkou hladinu exprese genu WT1 (1,31-182,4; medián 106), pacienti nesoucí fúzní gen TEL/AML1 (n=19) měli také nízkou hladinu exprese genu WT1 (0-459,5; medián 13,1). Naopak pacienti s fúzním genem MLL/AF4 (n=10) exprimují gen WT1 na vysoké úrovni (3449,5-16422; medián 8642). U pacientů s T typem ALL (n=10) jsme detekovali expresi genu WT1 v široké škále hladin, od 0,5 do 11532,5 s mediánem 287,7.

Při statistické analýze jsme našli signifikantně vysokou hladinu exprese genu WT1 u pacientů nesoucích fúzní gen MLL/AF4 ($P < 0,001$).

Dále korelace exprese genu WT1 s průtokovou cytometrií v článku, který je zaslán do časopisu British Journal of Haematology: WT1 protein expression in childhood acute leukemia, str. 53.

Ve spolupráci s kolegy z Německa (Dr. G. Kerst, Department of Pediatric Kardiology, University Children's Hospital Tuebingen) jsme vyšetřovali hladiny exprese genu WT1 na

souboru dětských pacientů s akutními leukémiemi diagnostikovanými a léčenými v Tuebingenu (n=15 B-ALL, n=10 T-ALL, n=15 AML-1xM0, 1xM1, 4x M2, 5x M5, 3x M6 a 1x hybridní leukémie řazená mezi AML) a souboru buněčných linií. Výsledky jsme korelovali s hladinami proteinu WT1 sledovanými průtokovou cytometrií. V případě buněčných linií (K562, HL-60, PLB-985, KG-1 CCRF-CEM) byla detekována vysoká exprese genu WT1 a vysoká hladina proteinu WT1. V primárních vzorcích akutních leukémií byla detekována nízká hladina proteinu WT1 pomocí průtokové cytometrie. Při statistickém hodnocení lineární korelace mezi hladinou proteinu WT1 sledovanou pomocí průtokové cytometrie a množstvím transkriptu WT1 určeným pomocí RQ-RT-PCR jsme našli hodnoty $r=0,382$, $p<0,03$ (Obrázek č. 6). Ve čtyřech případech akutních leukémií byl detekován protein WT1 a nebyl detekován transkript pomocí RQ-RT-PCR (ve dvou případech však byl detekován WT1 transkript jinou metodikou detekce exprese genu WT1 s využitím primerů v jiné části genu, což si můžeme vysvětlit přítomností mutace v genu WT1 v těchto případech) a v dalších čtyřech případech byl detekován transkript WT1 a nebyl detekován protein průtokovou cytometrií. Další biologické konsekvence těchto nálezů budeme dále studovat. Dle této studie tedy lze detekovat protein WT1 pomocí průtokové cytometrie, avšak ve velice nízkých hodnotách, a proto se detekce proteinu WT1 pomocí průtokové cytometrie jeví jako nevhodný marker pro sledování MRN u dětských akutních leukémií.

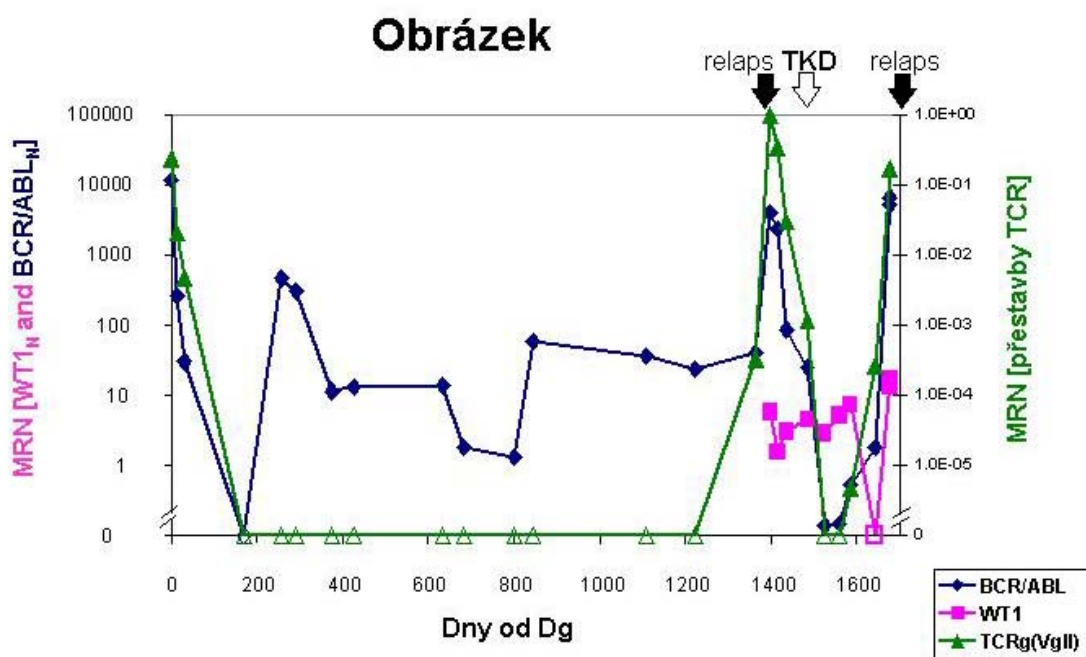


Obrázek č. 6. Korelace hodnot exprese genu WT1 - mRNA (RQ-RT-PCR) a hodnot proteinu WT1 (průtoková cytometrie)

4.3.1 Sledování minimální reziduální nemoci u pacientů s ALL

Pacienti s fúzním genem MLL/AF4 exprimují vysokou hladinu genu WT1. V případě sledování MRN u těchto pacientů korelovala hladina MRN detekovaná pomocí fúzního genu MLL/AF4 (kvalitativní hodnocení tzn. negativita, pozitivita 2. kolo PCR, případně pozitivita 1. kolo PCR) s hladinou MRN detekovanou pomocí kvantitativní detekce exprese genu WT1. Dnešní možnosti sledování MRN pomocí kvantifikace sekvence genomické oblasti fúze MLL/libovolný partnerský gen jsou však mnohem slibnější [139, 140].

Avšak u ostatních dětských pacientů s ALL se sledování MRN pomocí detekce exprese genu WT1 jeví jako nevhodná metoda na rozdíl od „zlatého standardu“ – kvantitativní detekce přestaveb imunoglobulinových řetězců, popřípadě fúzního genu. Detekční rozmezí je totiž vzhledem k nízké iniciální expresi genu WT1 příliš malé na to, aby poskytlo validní informaci o dynamice leukemického klonu. Příklad sledování MRN pomocí exprese genu WT1, fúzního genu a detekce klonálních přestaveb T buněčných receptorů je na Obrázku č. 7.



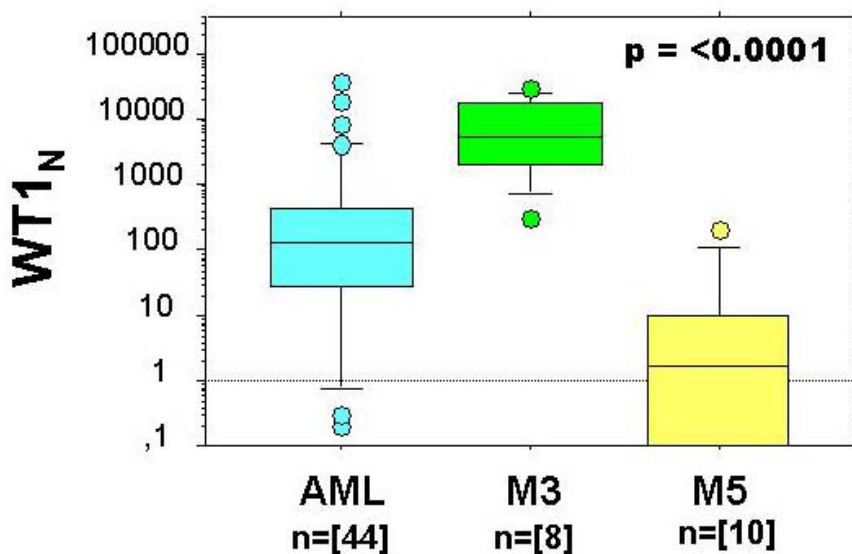
Obrázek č. 7. Sledování hladin MRN pomocí kvantitativní detekce exprese genu WT1 (růžová), kvantitativní detekce exprese fúzního genu BCR/ABL (modrá); oba hlavní osa y – logaritmické měřítko; a kvantitativní detekce přestaveb T buněčných receptorů (zelená) – vedlejší osa y – logaritmické měřítko; u dětského pacienta s mBCR/ABL+ ALL.

4.4 Pacienti s akutní myeloidní leukémií

První část studie shrnuta v článku Real-Time Quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry, Leukemia, str. 57.

U pacientů s AML (n=62) jsme našli významně vyšší hladinu exprese genu WT1 u subtypu AML M3 (n=8) (319-29213,9; medián 5212,1). U subtypu AML M5 (n=10) jsme shodně s literaturou našli nižší hladinu exprese a to v hodnotách od 0 do 209,2 s mediánem exprese 1,7. Při porovnání hladin exprese genu WT1 v celé skupině AML s kontrolními vzorky nacházíme statistickou významnost $P < 0,001$. Statisticky významná je i vysoká hladina exprese genu WT1 u subtypu AML M3 v porovnání s ostatními skupinami u pacientů s AML ($p = 0,0001$) a při porovnání hladin exprese se skupinou AML M5 nacházíme $p = 0,0005$.

Porovnání hladin exprese genu WT1 u pacientů s AML je na Obrázku č. 8.



Obrázek č. 8. Porovnání hladin exprese genu WT1 u AML. Hodnoty exprese genu WT1 jsou v logaritmickém měřítku.

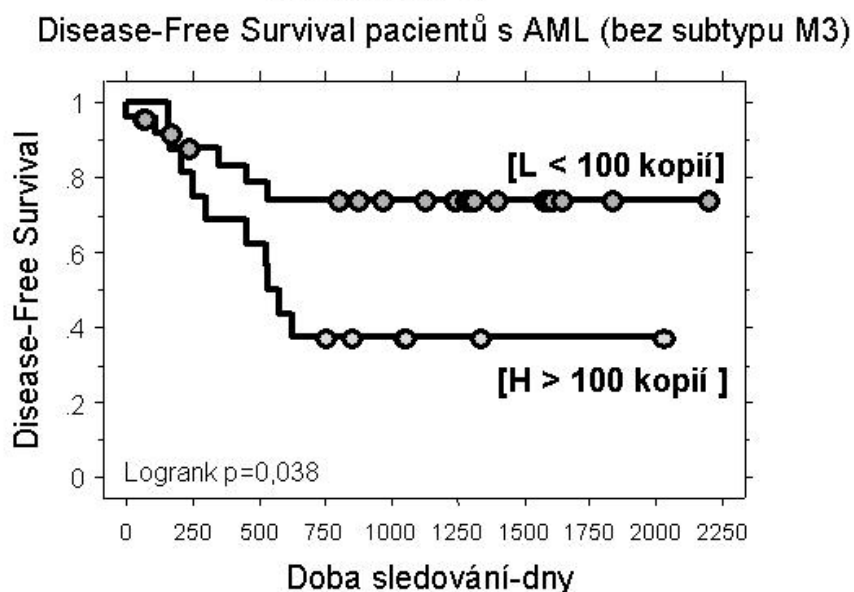
Dále korelace exprese genu WT1 s průtokovou cytometrií v článku, který je zaslán do časopisu *British Journal of Haematology: WT1 protein expression in childhood acute leukemia*, str. 53.

Viz kapitola 4.3 Pacienti s akutní lymfoblastickou leukémií

Prognostický význam exprese genu WT1 u pacientů s AML

Při rozdělení pacientů s AML dle jednotlivých hladin exprese genu WT1 při diagnóze a vyselektování subtypu AML M3 z důvodu jiného typu léčby - založené na all-trans retinové kyselině (ATRA), jsme našli signifikantně lepší „Disease-Free Survival“ (DFS) – přežití bez leukémie pro pacienty exprimující gen WT1 na hladině nižší než 100 normalizovaných kopií WT1 (logrank $p=0,038$) viz Obrázek č. 9.

Ve skupině pacientů (bez subtypu M3) s expresí genu WT1 větší než 100 normalizovaných kopií došlo k 11 relapsům z 24 dětí oproti 5 relapsům ze 30 dětí s expresí nižší než 100 normalizovaných kopií.



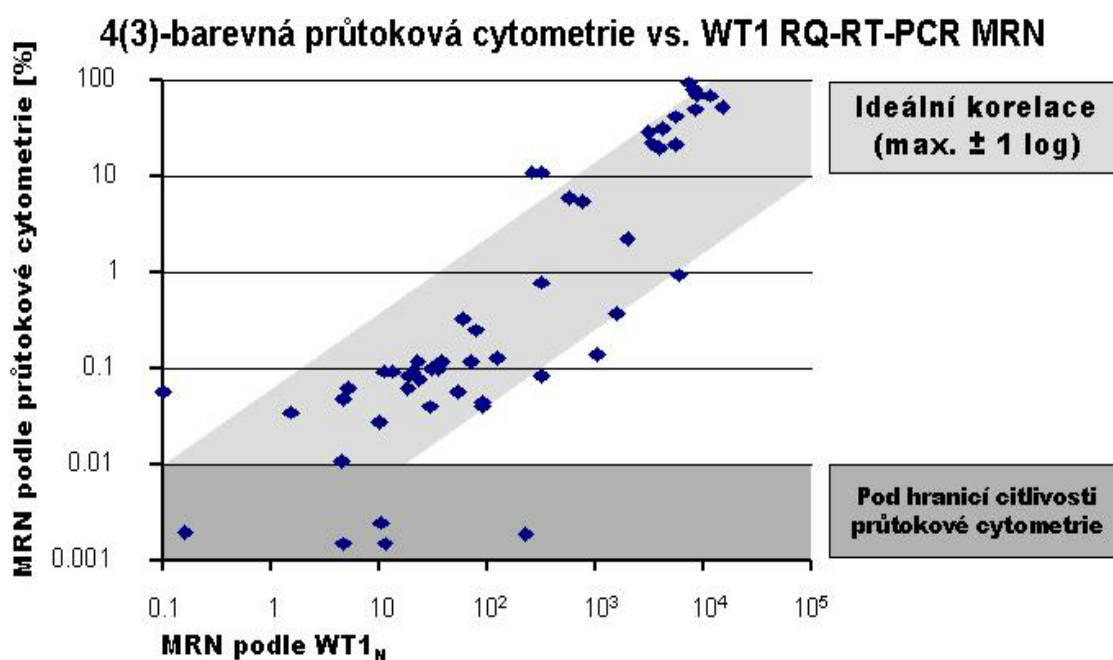
Obrázek č. 9. Sledování křivky přežití bez leukémie u pacientů s AML.

4.4.1 Sledování minimální reziduální nemoci u pacientů s AML

U pacientů s AML, kteří měli v době diagnózy vysokou hladinu exprese genu WT1 (32 pacientů) jsme sledovali hladiny MRN pomocí kvantitativní detekce exprese genu WT1 a výsledky jsme porovnávali se sledováním hladin MRN pomocí průtokové cytometrie. Nalezli jsme statisticky významnou korelaci mezi hodnotami sledování MRN pomocí

expresí genu WT1 a hodnotami počtů blastů detekovaných průtokovou cytometrií (Obrázek č.10).

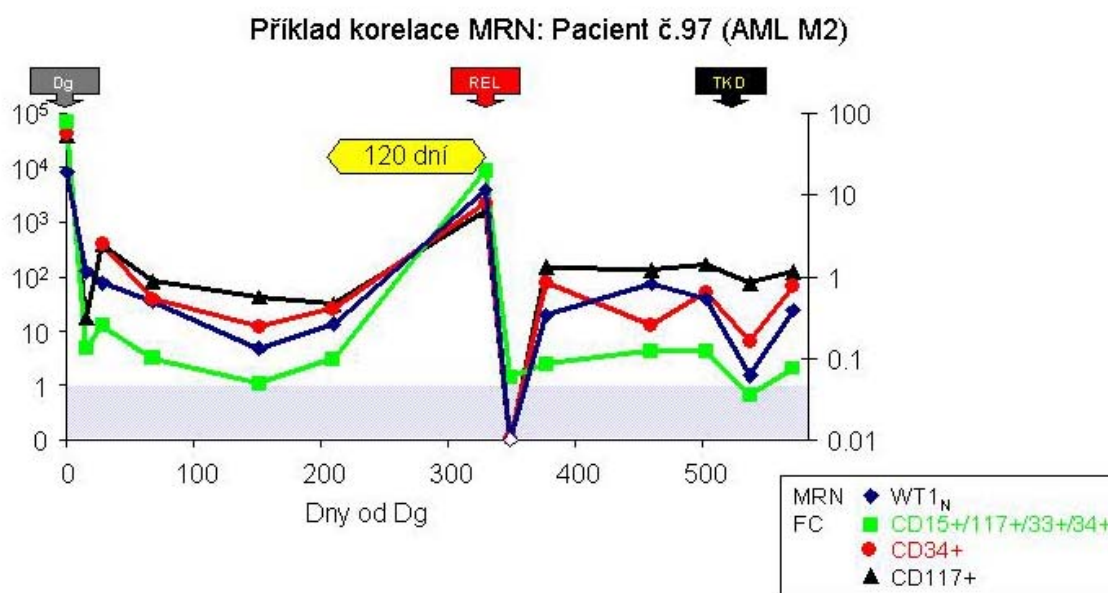
Příklad sledování MRN pomocí kvantitativní detekce exprese genu WT1 a pomocí detekce blastů průtokovou cytometrií v korelaci s průběhem onemocnění je na Obrázku č. 11.



Obrázek č. 10. Korelace výsledků sledování MRN pomocí kvantitativní detekce exprese genu WT1 (osa x) a průtokové cytometrie (procenta blastů, osa y).

Pro sledování predikce relapsu pomocí detekce exprese genu WT1 je třeba další sledování a rozšíření souboru pacientů, neboť z 32 vyšetřovaných pacientů s vysokou expresí genu WT1 při diagnóze prodělalo relaps onemocnění pouze 11 pacientů. Vzorky k analýze exprese genu WT1 v čase před relapsem byly odebrány v rozmezí 27 dní až 377 dní, z toho plyne, že některé důležité vzorky v době před relapsem nebyly k dispozici. Ve všech dostupných relapsových vzorcích jsme detekovali vysokou hladinu exprese genu WT1, kromě dvou relapsů: v jednom případě byl relaps diagnostikován v době, kdy průtoková cytometrie detekovala pouze 3% leukemických blastů na rozdíl od morfologické metody, která detekovala 31%, v případě exprese genu WT1 jsme detekovali 50x zvýšení hladiny exprese vůči vzorku odebraném 77 dní před relapsem, avšak hladina se stále pohybovala pod 100 kopiemi; ve druhém případě šlo o pacienta se subtypem AML M0, který měl

v době diagnózy vysokou hladinu exprese genu WT1, avšak v době relapsu onemocnění jsme detekovali nízkou hladinu exprese a dle morfologického hodnocení relapsového vzorku šlo o morfologický posun leukemických blastů.



Obrázek č. 11. Příklad sledování MRN u pacienta s AML pomocí hladin exprese genu WT1 (modrá, hlavní osa y – logaritmické měřítko) v porovnání s hodnotami MRN sledovanými pomocí průtokové cytometrie (kombinace 4 znaků zelená; jen CD34+ buňky červená a jen CD117+ buňky modrá; vedlejší osa y)

4.5 Pacienti podstupující transplantaci hematopoetických kmenových buněk

Výsledky prezentovány a shrnuty v abstraktu: Little evidence for the prognostic role of WT1 quantitative detection before HSCT in paediatric haematologic malignancies. 31st Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Prague, Czech Republic 2005. Bone Marrow Transplantation 2005, 35(2):S158.

U dětských pacientů (ALL - 11 pacientů, AML - 13 pacientů, MDS - 5 pacientů) podstupujících TKD jsme sledovali hladinu exprese genu WT1 v čase diagnózy, před a po TKD z důvodu sledování predikce post transplantačního relapsu. U pacientů s ALL bylo přítomno 5 post-TKD relapsů u 5-ti pacientů, kdy 3 pacienti měli vysokou hladinu exprese genu WT1 při diagnóze, avšak u všech těchto pacientů s post-TKD relapsem onemocnění nebyl dle hladiny exprese genu WT1 ve vzorcích před TKD predikován relaps na rozdíl od jiných použitých metod (detekce fúzního genu a přestaveb imunoreceptorových genů predikovala relaps – viz Tabulka č. 4). V případě AML byly detekovány 3 relapsy po TKD

u 2 pacientů (oba vysoká hladina exprese genu WT1 při diagnóze), avšak pouze u jednoho pacienta s dvěma post-TKD relapsy byla patrná predikce na základě vyšší exprese genu WT1 ve vzorcích před TKD. U pacientů s MDS byl pouze jeden post-TKD relaps, který však nebyl predikován vyšší hladinou exprese genu WT1 v předtransplantačním odběru.

Dg	hladina WT1 při Dg	hladina WT1 před SCT	hladina WT1 po SCT	dny od HSCT	relaps po SCT	událost (event)	příčina smrti	MRN fúzní geny před SCT	MRN fúzní geny po SCT	MRN Igh před SCT	MRN Igh po SCT
AML M0	1249,8	0,5	1,1	2467	NE	NE					
AML M2	0,0	ND	ND	2605	NE	NE					
AML M0	232,1	1,5	0,2	183	NE	ANO	M0F				
AML M2	31,0	8,9	34,6	2025	NE	NE					
AML M2	786,8	463,2	0,1	117	NE	ANO	EBV-LTP				
AML M2	390,6	9,1	1,4	212	ANO	ANO					
		423,1	0,1	92	ANO	ANO	relaps				
s-AML M4	43,6	0,1	0,3	105	NE	ANO	reflektce				
AML M4	109,7	2,4	17,6	1248	NE	NE					
AML M2	8650,8	322,9	10,5	1037	NE	NE					
AML M6	4251,2	5584,1	54,6	926	NE	NE					
AML M2	8196,2	71,6	38,6	450	NE	NE					
AML, MLL/AF6	7289,7	87,7	216,6	410	ANO	ANO	ND				
AML, MLL/AF10	207,7	6,9	6,2	198	NE	NE					
ALL, MLL/AF4	3449,5	0,0	0,3	1493	NE	NE					
ALL, TEL/AML1	0,4	0,0	1,7	480	ANO	ANO	GvHD, mycosis	poz 2. kolo	neg	1,47x10E-4	neg
ALL, TEL/AML1	ND	2,4	1,2	1353	NE	NE					
ALL, MLL/AF4	16422,1	6,6	20,6	1080	NE	NE					
ALL, mBCR/ABL	210,0	2,8	3,7	696	ANO	ANO	mycosis	poz	poz	1,19x10E-3	2,99x10E-4
ALL, mBCR/ABL	1,3	0,6	14,2	868	ANO	ANO	CNS relaps	poz 2. kolo	neg	1,84x10E-3	4,0x10E-4
ALL, mBCR/ABL	ND	3,1	2,6	1830	NE	NE					
ALL, mBCR/ABL	1280,0	5,5	1,6	140	ANO	ANO	IFI	poz	poz	2,34x10E-4	neg
ALL, mBCR/ABL	5,7	4,5	2,8	208	ANO	ANO	relaps	poz 1. kolo	poz 2. kolo	1,2x10E-3	neg
ALL, mBCR/ABL	182,4	0,6	4,7	632	NE	NE		neg	neg	neg	neg
ALL, TEL/AML1	ND	3,1	1,8	1038	NE	NE		poz 2. kolo	neg	neg	neg
MDS RAEB	34,2	75,1	15,4	288	NE	NE					
MDS RAEBt	551,4	2726,1	7,8	222	NE	NE					
MDS RAEBt (REL)	1632,2	1834,5	7,1	421	NE	NE					
MDS JM/MML	3,6	0,0	11,7	100	ANO	ANO					
MDS JM/MML	581,9	10,2	23,2	450	NE	NE					

Tabulka č. 4. Sledování hladin MRN různými metodami před a po TKD.

4.6 Pacienti s anaplastickým velkobuněčným lymfomem

U pacientů s ALCL jsme ve vzorcích primárních nádorů a/nebo vzorků z relapsu onemocnění (lymfatické uzliny, kůže, nuchální krajina, pleura) detekovali nízkou hladinu exprese genu WT1 (0-883 kopií, medián 5 kopií). Výsledky uvedeny v Tabulce č. 5. Proto jsme jako marker nádorových buněk pro sledování reziduální nemoci u pacientů s ALCL využili kvantitativní detekci exprese fúzního genu NPM/ALK a molekuly CD30, které byly vysoce exprimovány v primárních nádorech (11907 kopií resp. 61150 kopií).

*Výsledky shrnuty v článku [Quantitative PCR detection of NPM/ALK fusion gene and CD30 gene expression in patients with anaplastic large cell lymphoma – residual disease monitoring and a correlation with the disease status](#), *Leukemia Research*, str. 54.*

Pacient	pohlaví	věk (roky)	diagnóza	tkáň	NPM/ALK _N	CD30 _N	WT1 _N	follow-up dny
1	m	5	diagnóza	FF-PE	kopie 126016	kopie 234146	kopie 0	
			1.relaps	zmraž.	2251	7270	35	161
			2. relaps	zmraž.	4235	18938	3	374
				FF-PE	1145	1200	7	
			3.relaps	zmraž.	27104	48200	7	731
2	m	13	4.rrelaps	zmraž.				828
			diagnóza	zmraž.	133	2030	ND	
			1.relaps	zmraž.	35376	127956	37	417
3	m	4	diagnóza	zmraž.	82587	786114	99	
			1.relaps	0				155
			2.relaps	zmraž.	3967	17591	ND	305
4	ž	19	diagnóza	<i>bone marrow</i>	131	444	3	
			diagnóza	FF-PE	41170	158156	ND	
5	m	12	diagnóza	zmraž.	6477	10189	176	
			1.relaps	zmraž.	7538	4734	1	215
			diagnóza	zmraž.	103097	61150	5	
6	ž	17	diagnóza	FF-PE	216317	21911421	0	
			diagnóza	zmraž.	79226	88682	0	
7	m	23	diagnóza	FF-PE	6914062	753906	883	
			1.relaps	zmraž.	11907	178814		179
			diagnóza	zmraž.	6698	141853		
8	ž	34	diagnóza	zmraž.	4420	25499	1	
			diagnóza	zmraž.				
9	m	10	diagnóza	FF-PE	6914062	753906	883	
			1.relaps	zmraž.	11907	178814		179
10	m	12	diagnóza	zmraž.	6698	141853		
			diagnóza	zmraž.	4420	25499	1	
Medián (bez KD)					11907	61150	5	
FF-PE tkáň fixovaná ve formolu a zalitá do parafínu zmraž. zmražený materiál, ND neanalyzováno								

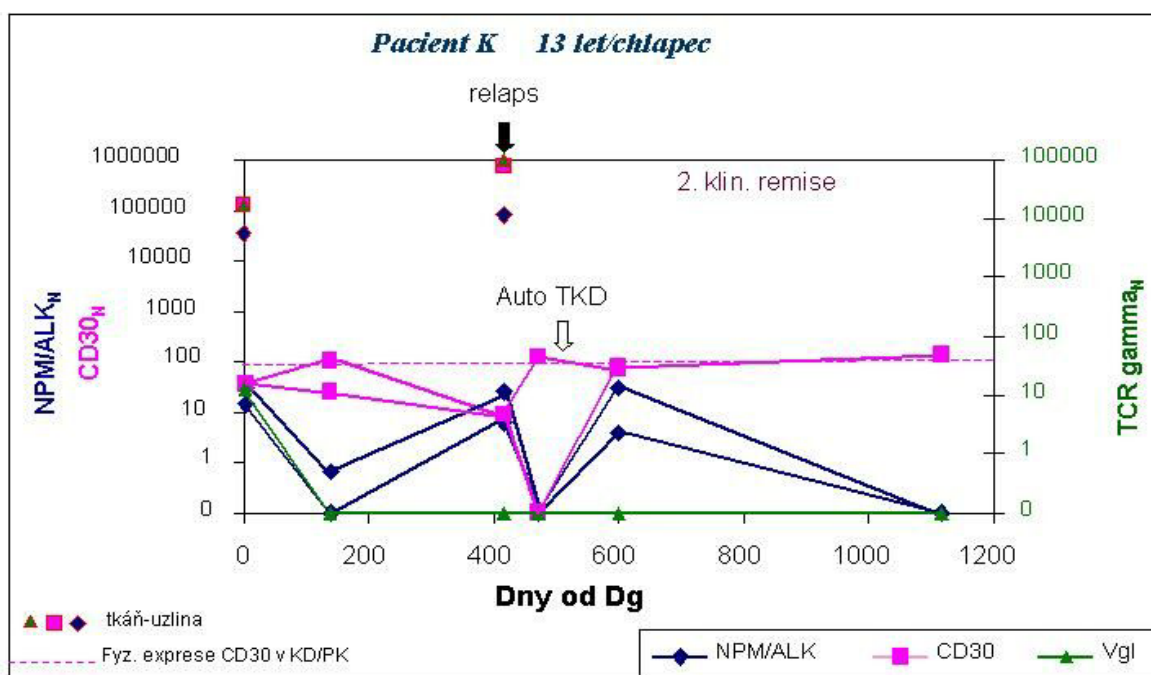
Tabulka č. 5. Pacienti s ALCL (diagnostické a relapsové vzorky tkání) zařazení do studie. Uvedeny jsou normalizované hladiny exprese genu NPM/ALK, CD30 a WT1.

4.6.1 Sledování minimální reziduální nemoci u pacientů s ALCL

*Výsledky shrnuty v článku *Quantitative PCR detection of NPM/ALK fusion gene and CD30 gene expression in patients with anaplastic large cell lymphoma – residual disease monitoring and a correlation with the disease status* v časopise *Leukemia Research*, str. 54.*

Vzhledem k nízké iniciální expresi genu WT1 v lymfomových buňkách v primárních nádorech nebylo možné využít expresi genu WT1 jako markeru nádorových buněk v reziduálních vzorcích KD a PK. Proto jsme sledovali hladiny reziduální nemoci v 79 vzorcích KD a/nebo PK v průběhu léčby u 10 pacientů s ALCL pomocí kvantitativní detekce exprese fúzního genu NPM/ALK a molekuly CD30. Ve všech vzorcích KD odebraných v čase relapsu a/nebo krátce před relapsem jsme detekovali expresi jak NPM/ALK, tak expresi CD30.

Pět z devíti relapsů bylo doprovázeno zvýšením hladiny exprese NPM/ALK v KD minimálně o půl řádu. Zjistili jsme, že exprese molekuly CD30 není vhodný marker pro sledování MRN, neboť pouze 2 relapsy byly spojeny se zvýšením exprese CD30 nad fyziologickou hladinu, kterou jsme detekovali ve vzorcích KD/PK i u zdravých dárců. Příklad sledování MRN u pacienta s ALCL je na Obrázku č. 12. Tato studie byla publikována v časopise *Leukemia Research*, kdy se jedná se o první významnou studii detekce MRN u pacientů s ALCL.



Obrázek č. 12. Sledování MRN u pacienta s ALCL pomocí kvantitativní detekce exprese fúzního genu NPM/ALK(modrá), molekuly CD30 (růžová) – oba hlavní osa y, logaritmické měřítko a kvantitativní detekce TCR přestavby VgI (zelená) – vedlejší osa y, logaritmické měřítko.

4.7 Mezinárodní studie

Iniciovali jsme založení mezinárodní pracovní skupiny, která by se zabývala:

- Standardizací metodiky RQ-RT-PCR pro detekci exprese genu WT1 a výběrem vhodného „housekeeping genu“
- Mezinárodní kontrolou kvality této metodiky a její propagací
- Vyšetřováním exprese genu WT1 u skupin onemocnění, kde by mohla přispět k hodnocení prognózy a sledování MRN

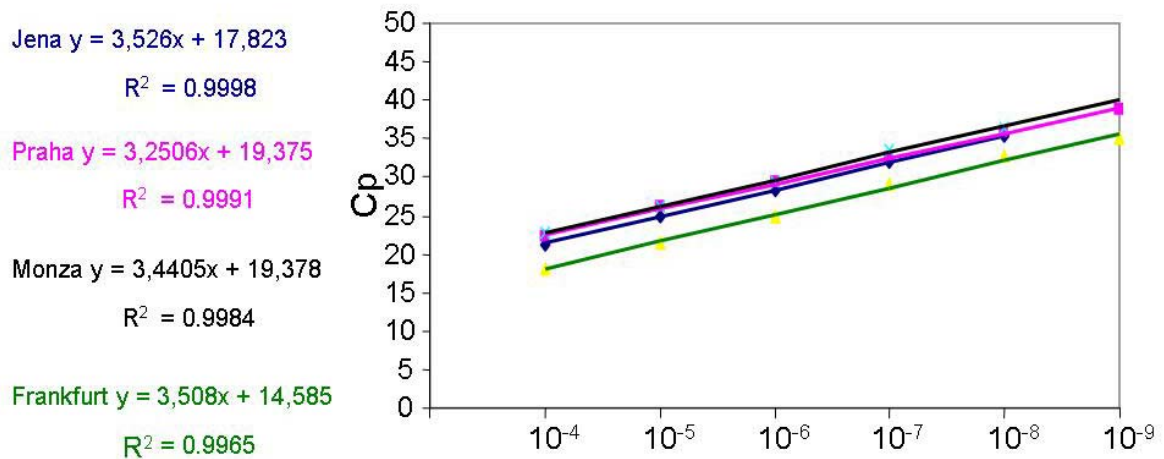
Spolu s kolegy z Frankfurtu, Jeny (Německo) a Monzy (Itálie) jsme v roce 2003 založili *International Cooperative Study Group on WT1 Expression in Childhood AML*, v rámci které standardizujeme metody pro kvantifikaci exprese genu WT1 a kontrolního genu s kontrolou kvality minimálně 2x ročně. V roce 2004 jsme pořádali první konferenci této skupiny v Praze. Od té doby se průběžně setkáváme v průběhu mezinárodních konferencí a pracovních schůzek.

Dosavadní výsledky práce této skupiny

- Vyvinuli jsme optimální metodiku kvantifikace transkriptu WT1 pomocí RQ-RT-PCR. V současné době po dohodě a řadě experimentů celá skupina využívá naší metodiku kvantitativní detekce exprese genu WT1 s námi zhotoveným a připraveným plazmidem.
- Jako „housekeeping“ gen byl vybrán gen pro ABL, kdy využíváme metodiku kolegů z Itálie (*Gianni Cazzaniga, Tiziana Coliva* – Ospedale San Gerardo, Monza, Itálie) i s jimi připraveným plazmidem.
- Kontrola kvality probíhá 2x ročně. Výsledky kontroly kvality viz Obrázek č. 13.

Příprava metodické publikace: V současné době probíhá statistická analýza výsledků a připravujeme rukopis práce pro časopis *Leukemia*.

Výsledky mezinárodní standardizace WT1 qRT-PCR: První kolo kontroly kvality



Obrázek č. 13. Výsledky kontroly kvality stanovení hladin exprese genu WT1. Amplifikována plazmidová ředící řada, hodnoty osy x: koncentrace plazmidu, osa y: „crossing point“

5 Diskuze

Aberantní exprese genu WT1 v leukemických blastech a v některých typech jak nádorových, tak nenádorových buněk byla a je opakovaně studována [44]. Hladina exprese genu WT1 je dobře prostudována u hematopoetických prekurzorů nesoucích molekulu CD34+, kde hladina transkriptu WT1 může u malé části z nich (cca 1%) dosáhnout podobných, hladin jaké jsou nalézány u leukemických buněk [17, 141]. V našem souboru zdravých KD, případně pupečnickových krví a jejich frakcí obohacených na CD34+ buňky, jsme našli nulové nebo velmi nízké hladiny exprese genu WT1. Ve studii dětských pacientů s ALL jsme s kolegy z Irsko jejich metodou vyšetřili 9 vzorků KD a 30 vzorků regenerujících se KD a ve všech případech jsme našli detekovatelnou hladinu exprese genu WT1, avšak opět pouze ve velmi nízkých hladinách, navíc jsme nenalezli rozdíl v expresi genu WT1 ve zdravých KD získaných od dárců a v regenerujících se KD, které byly odebrány v různých fázích léčby ALL (tyto vzorky KD byly prokazatelně MRN negativní podle alternativních metod).

Jak již bylo zmíněno, exprese genu WT1 v nemaligních krevních buňkách (s výjimkou malé frakce časných progenitorů CD34⁺/CD38⁻) by měla být na nízké nebo nedetekovatelné hladině, proto jsme se zaměřili na studium nemaligního typu onemocnění SAA. Diferenciální diagnostika SAA a některých typů myelodysplastického syndromu (MDS typu refrakterní anémie) je stále komplikovaná a neexistuje jednoznačné kritérium, které by tato zásadně rozdílná onemocnění odlišilo.

Dle výsledků v našem malém souboru (jen 4 RA) hladiny exprese genu WT1 rozlišují nemaligní typ anémie SAA a maligní typ anémie MDS – RA (P=0,0079). Velikost souboru v tomto případě není zásadním problémem: statistické signifikance bylo dosaženo, ale zásadní překážka využití v diferenciální diagnostice je zřejmá. Jak ukazuje Obrázek č. 2, naměřené hodnoty pro SAA a RA tvoří plynulou škálu. Je třeba přihlídnout i k tomu, že diagnostika probíhala na základě morfologického obrazu kostní dřeně a otázkou zůstává i morfologická hranice mezi SAA a RA a z toho odvozená diagnóza (a také RA s multilineární dysplázií vs RA). V případě dalších studií zabývajících se hladinami exprese genu WT1 u MDS našli autoři ve shodě s námi expresi u RA také na nízké nebo nedetekovatelné hladině [31, 142, 143].

Tamaki et al ve své studii demonstruje, že hladina exprese genu WT1 odráží stupeň progresu MDS do AML a že monitorování hladiny exprese genu WT1 může predikovat

transformaci MDS. Ve své studii ukazuje, že mezi hladinami exprese genu WT1 u pacientů s MDS typu RAEB a RAEBt není statisticky významný rozdíl, ale našel u nich přibližně o 2 řády vyšší hladinu exprese než u RA. Výsledky však neporovnávali s kontrolami ani s nemaligním onemocněním. Naše výsledky korelují s výsledky Tamakiho et al, kdy v naší skupině pacientů s MDS typu RA jsme našli o jeden řád nižší hladinu exprese než u pacientů s RAEB a RAEBt a pacienti s RAEB a RAEBt mají podobné hladiny (medián exprese 1441,6 vs 2864,6). V případě porovnávání pacientů s RA s ostatními pacienty s MDS (RAEB, RAEBt, JMML) – jsme našli statistickou významnost, kdy vyšší hladina exprese genu WT1 v zásadě koreluje s vyšším zastoupením blastů. Přesto i v případě RA a RAEB zůstává expresní hranice neostrá (Obrázek č.2).

U dětských pacientů s ALL jsme našli velice variabilní hladiny exprese genu WT1. U subtypu B-ALL většina pacientů exprimovala gen WT1 v rozmezí normální exprese genu WT1 detekované ve zdravých KD a při porovnání mediánu exprese genu WT1 u dětských B-ALL s expresí ve zdravých KD jsme nenalezli signifikantní rozdíl. Dětské pacienty s T-ALL exprimovali gen WT1 na signifikantně vyšších hladinách než B-ALL, navíc u žádného pacienta s T-ALL nebyla detekována hladina exprese genu WT1 pod hladinou fyziologické exprese genu WT1. Dále u pacientů s ALL nesoucích fúzní gen MLL/AF4 jsme shodně s literaturou našli signifikantně vysokou hladinu exprese genu WT1 [27].

V případě dětských pacientů s ALL patří mezi klinicky příznivé faktory věk v době diagnózy mezi 1-9 lety a nízká leukocytóza a naopak pacienti pod 1 rok věku v době diagnózy mají trvale nepříznivou prognózu. V našem souboru dětských pacientů s ALL jsme nenalezli korelaci mezi leukocytózou a hladinou exprese genu WT1 a skupina pacientů mezi 1-10 lety měla signifikantně nižší expresi než starší děti a dále pacienti s kojeneckou ALL exprimovali gen WT1 na vysokých hladinách, což je dáno zastoupením pacientů s MLL/AF4+ ALL.

V případě nízkých hladin exprese genu WT1 u pacientů s horší prognózou danou fúzním genem BCR/ABL a naopak u pacientů s fúzním genem TEL/AML1 spojeným s lepší prognózou se nám ukazuje, že dle hladin exprese genu WT1 nelze zařazovat pacienty s ALL do prognostických skupin a že vysoká i nízká exprese genu WT1 v případě pacientů s ALL má z hlediska diagnostiky nevalný význam.

Statisticky signifikantně horší prognóza u dětí s velmi vysokou a naopak velmi nízkou expresí zůstává zatím těžko objasnitelným fenoménem, kromě faktu, že do skupiny s velmi vysokou expresí spadají pacienti s fúzí MLL/AF4 a tedy extrémně špatnou prognózou.

Naopak žádný spojující faktor jsme nenalezli pro skupinu dětí s velmi nízkou expresí a špatnou prognózou (n=7) [144].

V naší předchozí studii [32] jsme našli signifikantně horší prognózu u dětských pacientů s AML, kteří exprimovali gen WT1 ve vysokých hladinách. Tento trend jsme našli i při rozšíření souboru pacientů a prodloužení doby sledování. Shodně s námi popisují vysokou hladinu exprese genu WT1 jako nezávislý prognostický faktor i jiní autoři [35-37, 114-117, 145], ale někteří toto tvrzení vyvracejí [33, 40, 41, 112, 113]. Jak jsme už naznačili, tyto rozdíly mohou být způsobeny technickým přístupem ke kvantifikaci exprese WT1, volbou a kvalitou použitých kontrol a také zaměřením na dětské, resp. dospělé pacienty, ale i statistickým zpracováním dat. Odpovědí na tyto diskrepance (alespoň z pohledu dětských AML) by měla být plánovaná prospektivní studie provedená na souboru českých, italských a německých pacientů léčených jednotně podle protokolu BFM naší kooperativní skupinou (viz výše).

Diskutabilní stále zůstává otázka využití exprese genu WT1 jako potenciálního markeru ke sledování MRN. Byla publikována rozporuplná data o expresi genu WT1 během hematologické remise. Autoři, kteří použili kvantitativní [114] nebo semi-quantitativní [36, 115] přístup zaznamenali korelaci mezi vzestupem hladin transkriptu WT1 a relapsem onemocnění, zatímco ostatní autoři korelaci nepotvrdili [112, 113]. Rovněž pokusy porovnat hladinu genu WT1 se známými markery specifickými pro leukemické buňky (fúzní geny jako výsledky nenáhodných translokací) přinesly rozporuplné výsledky. Tyto neshody jsou zřejmě dány nedostatkem korelace mezi klasickou „end-point“ PCR v porovnání s RQ-RT-PCR [41, 113, 114].

K porovnání výsledků sledování MRN jsme hledali metodu, která by pokrývala významnou většinu pacientů s AML a prokazatelně by korelovala s vlastním průběhem onemocnění. Zvolili jsme třibarevnou/čtyřbarevnou průtokovou cytometrii (3(4)-FC), která stanovuje přímo zastoupení leukemických blastů díky specifické kombinaci tří respektive čtyř antigenních molekul a vyšetřuje se u většiny pacientů s citlivostí $10^{-3} - 10^{-4}$ [102, 103].

Odečtení hladiny MRN pomocí 3(4)-FC je možné omezeně využít i pro různá terapeutická rozhodnutí. Nicméně je známo, že maturace leukemických buněk v případě AML je heterogenní a faktem je, že antigenní exprese povrchových molekul je také heterogenní.

U 30 z 62 pacientů vyšetřených oběma metodami hladina exprese genu WT1 při diagnóze neumožňovala další sledování dynamiky, neboť zjištěná normalizovaná hladina genu WT1 byla nízká. U druhé skupiny 32 pacientů s vysokou hladinou exprese genu WT1 při

diagnóze se projevuje signifikantní zvýšení hladiny předcházející, případně doprovázející relaps. Průkazu toho, zda zvýšení hladiny exprese genu WT1 skutečně předchází relaps onemocnění, brání skutečnost, že některé důležité vzorky nebyly dostupné v delším časovém intervalu před relapsem onemocnění.

Bylo by přehnané očekávat absolutní korelaci mezi počtem blastů detekovaných 3(4)-FC a hladinou exprese genu WT1. Obě tyto metody mohou odrážet skutečnou biologickou situaci. Rozdíl je v různém způsobu analýzy dat: porovnáváme procenta blastů exprimujících specifické antigenní kombinace proti hladině genové exprese, což znemožňuje přímou regresní analýzu. Avšak nápadná shoda jednotlivých křivek reprezentujících sledování dynamiky RQ-RT-PCR a 3(4) -FC dokládá potenciální možnost použití kvantitativní detekce exprese genu WT1 jako cíle pro monitorování MRN. Je možno konstatovat, že sledování dynamiky exprese genu WT1 pomocí RQ-RT-PCR představuje novou, relativně jednoduchou a rychlou metodu, která může sloužit jako možný další rizikový faktor u dětských pacientů s AML a ke sledování MRN. I otázku možného sledování MRN a prognostického významu hladin exprese WT1 v určitých časových bodech léčby dětských AML by měla zodpovědět výše zmíněná mezinárodní studie, na jejíž koordinaci se podílíme.

Zklamáním bylo využití detekce genu WT1 u transplantovaných pacientů. Zatímco v případě non-lymfoidních malignit zůstává kvůli nízkému počtu pacientů i potransplantačních událostí význam exprese WT1 spíše nejasný, v případě dětských ALL jednoznačně neprokazuje předtransplantační určení hladiny exprese WT1 prognostickou hodnotu. To vyniká zejména ve srovnání se sledováním MRN „klasickými“ cíly – tedy kvantifikací přestaveb imunoreceptorových genů resp. hladin transkriptů fúzních genů.

U pacientů s ALCL jsme ve vzorcích primárních nádorů a/nebo vzorků z relapsu onemocnění detekovali nízkou, případně nulovou hladinu exprese genu WT1 a proto jsme jako marker nádorových buněk pro sledování reziduální nemoci u pacientů s ALCL využili kvantitativní detekci exprese fúzního genu NPM/ALK a molekuly CD30, které byly vysoce exprimovány v primárních nádorech. Byla popsána detekce fúzního genu NPM/ALK v PK zdravých jedinců a v uzlinách bez infiltrace lymfomem [146, 147] a exprese molekuly CD30 v aktivovaných B a T lymfocytech [72]. Proto jsme vyšetřili KD a PK od zdravých dárců a reaktivní uzliny bez lymfomu na přítomnost fúzního genu NPM/ALK a molekuly CD30 a fúzní gen NPM/ALK jsme detekovali na velice nízké hladině pouze v jednom vzorku reaktivní uzliny (1/5), kdy nález je v korelaci s prací autorů Maes et al [147], kteří detekovali fúzní gen NPM/ALK ve 20 z 31 lymfoidních tkání ve

velice nízkých hodnotách. Molekulu CD30 jsme detekovali jak ve vzorcích KD, PK, tak ve vzorcích reaktivních uzlin. Pro detekci MRN jsme tedy určili fyziologickou expresi molekuly CD30 v rozmezí hodnot od 0 - 90 kopií.

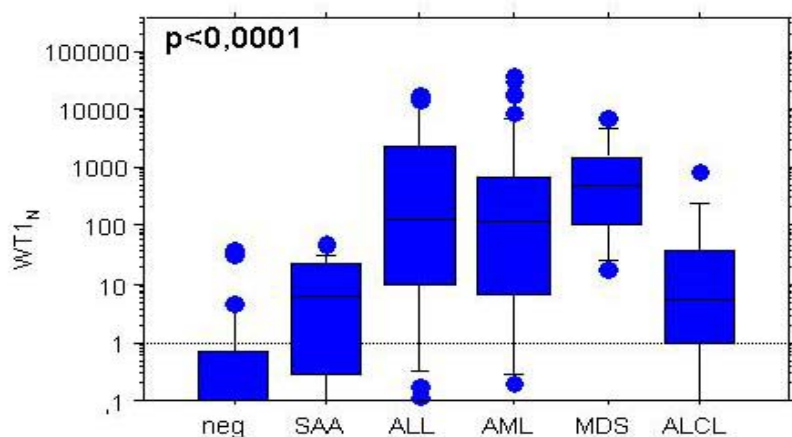
Otázka sledování infiltrace KD lymfomovými buňkami a kinetika jejich nárůstu případně úbytku během terapie, po léčbě a v době klinické remise onemocnění je diskutabilní z hlediska predikce relapsu onemocnění. V našem souboru pacientů jsme detekovali signifikantní zvýšení exprese fúzního genu NPM/ALK ve vzorcích KD předcházející a/nebo doprovázející relaps onemocnění u pěti z devíti uzlinových relapsů. U jednoho pacienta jsme měli k dispozici pouze vzorek KD z relapsu onemocnění, ve kterém jsme detekovali vysokou hladinu exprese fúzního genu NPM/ALK. Ve zbylých 3 případech relapsu onemocnění jsme detekovali snížení hladiny exprese fúzního genu v KD, avšak v jednom případě jsme neměli k dispozici vzorky v dlouhém období před relapsem onemocnění (154 dní) a měli jsme k dispozici pouze odběr KD v době diagnózy lymfomu, kde byla detekována vysoká hladina fúzního genu; ve druhém případě šlo o odběr KD u pacienta, který prodělal relaps onemocnění v kůži a ve třetím případě pacient prodělal relaps onemocnění +58 dní po TKD. Pro sledování predikce relapsu pomocí detekce exprese fúzního genu NPM/ALK v KD je třeba ještě další sledování a rozšíření souboru pacientů s ALCL. Využití kvantitativní detekce exprese molekuly CD30 ke sledování MRN u pacientů s ALCL se jeví jako nevhodné neboť pouze 2 relapsy byly doprovázeny zvýšením exprese molekuly CD30 nad fyziologickou hodnotu detekovanou ve zdravých KD a PK.

6 Závěr

Naše současná studie přispěla k vyjasnění některých kontroverzí ohledně diagnostického a prognostického významu exprese genu WT1. Ukazuje se, že v diagnostice dětských malignit má jen omezenou roli, s výjimkou AML. Úkolem prospektivní mezinárodní studie je nyní tuto roli u dětských AML ověřit.

V případě pacientů s ALCL šlo o první publikovanou studii detekce reziduální nemoci u pacientů s lymfomy.

Na Obrázku č. 14 je souhrnně uvedena hladina exprese genu WT1 u jednotlivých vyšetřovaných dětských pacientů s hematologickými onemocněními.



Obrázek č. 14. Hodnoty hladin exprese genu WT1 u jednotlivých typů hematologických onemocnění dětského věku.

7 Seznam použitých zkratek

3-FC	tříbarevná průtoková cytometrie
ABL	"Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1"
AF4	ALL-1 Fused Gene from Chromosome 4
ALCL	anaplastický velkobuněčný lymfom
ALK	anaplastic lymphoma kinase
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
AML1	"acute myeloid leukemia 1 gene"
AML1	gen "acute myeloid leukemia 1"
bcl 2	"B cell leukaemia 2 gene"
BCR	"breakpoint cluster region"
bp	páry bází
BSA	bovinní sérový albumin
CBF β	"core binding factor β gene"
CD	„cluster of differentiation“
cDNA	komplementární DNA
CLL	chronická lymfatická leukémie
CMML	chronická myelomonocytární leukémie
CMV	cytomegalovirus
c-myc	"cell - myelocytomatosis gene"
CSF1	"colony stimulation factor 1 gene"
Da	Dalton
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	prekurzory - deoxyribonukleotid trifosfáty
E2A	„Transcription Factor E2a Gene“
EBV	"Epstein-Barr virus"
ETO	"eight twenty - one gene"
FAB	French – American – British
HCL	leukémie z vlasatých buněk
HHV-6	"Human Herpes virus 6"
JMML	juvenilní myelomonocytární leukémie
KTS	sekvence tří aminokyselin lyzin-treonin-serin
MDS	myelodysplastický syndrom
MLL	mixed lineage leukemia
MMLV	"Moloney Murine Leukemia Virus"
MRN	minimální reziduální nemoc
mRNA	mediátorová RNA
MYH11	„smooth muscle myosin heavy chain 11 gene“
NHL	non-Hodgkinův lymfom
NPM	gen pro nukleofosmin
PBX1	„Pre-B-Cell Leukemia Transcription Factor 1 Gene“
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGF-A	"platelet-derived growth factor-A gene"
PML	"promyelocytic leukemia gene"

PRAME	preferentially expressed antigen of melanoma
RA	refrakterní anémie
RAEB	refrakterní anémie s excesem blastů
RAEBt	refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci
RAR α	alfa receptor kyseliny retinové
RAS	Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
RNA	ribonukleová kyselina
RQ-RT-PCR	reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce v reálném čase
rRNA	ribosomální RNA
SAA	aplastická anémie
SIL	„Stem Cell Leukemia Interrupting Locus Gene
TAL1	„T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia 1 gene“
TEL	„Translocation-ETS-Leukaemia“
TGFb-1	"transforming growth faktor beta - 1
TKD	transplanatce kostní dřeně
TNFR	tumor necrosis factor receptor
WT	Wilmsův tumor
WT1	„Wilms tumor 1 gene“
β -2 M	beta-2 mikroglobulinový gen

8 **Přílohy**

8.1 Přiložené publikace

Seznam přiložených publikací:

P1. Kerst G., Bergold N., Coustan-Smith E., Lang P., Kalinova M., Handgretinger R., Trka J., Müller I.

WT1 protein expression in childhood acute leukemia, *zasláno do časopisu British Journal of Hematology*

P2. Kalinova M., Krskova L., Brizova H., Kabickova E., Kepak T., Kodet R.

Quantitative PCR detection of NPM/ALK fusion gene and CD30 gene expression in patients with anaplastic large cell lymphoma – residual disease monitoring and a correlation with the disease status. *Leukemia Research* Přijato k tisku

P3. Kalinová M., Mužiková K., Šrámková L., Starý J., Horák J., Trka J.

Je vysoká exprese genu WT1 znakem nádorových buněk? *Transfuze a hematologie* dnes 2006, Červen; 2(12): 76-82

P4. Boublikova L., Kalinova M., Ryan J., Rooney S., Hrusak O., O'Marcaigh A., Smith O., Stary J., McCann SR., Trka J., Lawler M.

Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2006, Feb; 20(2): 254-63

P5. Trka J., Kalinová M., Hrušák O., Zuna J., Krejčí O., Madžo J., Sedláček P., Vávra V., Michalová K., Jarošová M., Starý J. for Czech Paediatric Haematology Working Group
Real-Time Quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry – *Leukemia* 2002, Jul;16(7): 1381-1389 (IF 4,693)

P1. Kerst G., Bergold N., Coustan-Smith E., Lang P., Kalinova M., Handgretinger R., Trka J., Müller I.
WT1 protein expression in childhood acute leukemia, *zasláno do časopisu British Journal of Hematology*

P2. Kalinova M., Krskova L., Brizova H., Kabickova E., Kepak T., Kodet R.
Quantitative PCR detection of NPM/ALK fusion gene and CD30 gene expression in patients with anaplastic large cell lymphoma – residual disease monitoring and a correlation with the disease status. *Leukemia Research* Přijato k tisku

P3. Kalinová M., Mužíková K., Šrámková L., Starý J., Horák J., Trka J.
Je vysoká exprese genu WT1 znakem nádorových buněk? Transfuze a hematologie dnes
2006, Červen; 2(12): 76-82

P4. Boublikova L., Kalinova M., Ryan J., Rooney S., Hrusak O., O'Marcaigh A., Smith O., Sary J., McCann SR., Trka J., Lawler M.
Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2006, Feb; 20(2): 254-63

P5. Trka J., Kalinová M., Hrušák O., Zuna J., Krejčí O., Madžo J., Sedláček P., Vávra V., Michalová K., Jarošová M., Starý J. for Czech Paediatric Haematology Working Group
Real-Time Quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry – *Leukemia* 2002, Jul;16(7): 1381-1389 (IF 4,693)

8.2 Publikační a přednášková činnost

Publikace

Kerst G., Bergold N., Coustan-Smith E., Lang P., Kalinova M., Handgretinger R., Trka J., Müller I.

WT1 protein expression in childhood acute leukemia, zasláno do časopisu *British Journal of Haematology*

Kalinova M., Krskova L., Brizova H., Kabickova E., Kepak T., Kodet R.

Quantitative PCR detection of NPM/ALK fusion gene and CD30 gene expression in patients with anaplastic large cell lymphoma – residual disease monitoring and a correlation with the disease status. *Leukemia Research* Přijato k tisku

Brizova H., Kalinova M., Krskova L., Mrhalova M., Kodet R.

Quantitative Measurement of Cyclin D1 mRNA, a Potent Diagnostic Tool to Separate Mantle Cell Lymphoma From Other B-cell Lymphoproliferative Disorders. *Diagnostic Molecular Patology*. Přijato k tisku

Capkova L., Kalinova M., Krskova L., Kodetova D., Petrik F., Trefny M., Musil J., Kodet R.

Loss of heterozygosity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in bronchial mucosa of heavy smokers. *Cancer*. Přijato k tisku

Krsková L., Kalinová M., Břízová H., Mrhalová M., Sumerauer D., Kodet R.

Molecular and immunohistochemical analysis of ERBB2 expression in correlation with proliferation rate in synovial sarcoma. *Diagnostic Molecular Patology*. Přijato k tisku

Kalinová M., Mužíková K., Šrámková L., Starý J., Horák J., Trka J.

Je vysoká exprese genu WT1 znakem nádorových buněk? Transfúze a hematologie dnes 2006, Červen; 2(12): 76-82

Boublikova L., Kalinova M., Ryan J., Rooney S., Hrusak O., O'Marcaigh A., Smith O., Sary J., McCann SR., Trka J., Lawler M.

Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2006, Feb; 20(2): 254-63 (IF 5,810)

Krejci O., Starkova J., Otova B., Madzo J., Kalinova M., Hrusak O., Trka J.

Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells. *Leukemia* 2004, Mar; 18(3): 434-41 (IF 4,7)

Bruchova H., Kalinova M., Brdicka R.

Array-based analysis of gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia – *Leukemia Research* 2004, Jan; 28(1): 1-7 (IF 2,333)

Kodet R., Mrhalová M., Krsková L., Mandřáková P., Kalinová M.: Život patologa mezi molekulami-výstroj a výzbroj pro přežití, *Klinická onkologie* 2004, 17 (1): 3-8

Mrhalová M., Kodet R., Kalinová M., Hilská I.
Relative quantification of ERBB2 mRNA in invasive duct carcinoma of the breast: correlation with the ERBB-2 protein expression and the ERBB2 gene copy number. *Pathology - Research and Practice* 2003, 199(7), 453-61 (IF 0,681)

Mrhalová M., Krsková L., Kalinová M., Soukup J., Kodet R.
Folikulární lymfomy: molekulární diagnostika t(14;18)(q32;q21) – fluorescenční in situ hybridizace, kvalitativní a kvantitativní PCR – *Česko-slovenská patologie a soudní lékařství* 2003, 39 (3), 130-137

Madžo J., Zuna, J, Mužíková K., Kalinová M., Krejčí O., Hrušák O., Otová B., Starý J., Trka J. for Czech Paediatric Haematology Working Group
Slower molecular response to treatment predicts poor outcome in TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukaemia: prospective Real-Time Quantitative RT-PCR study – *Cancer* 2003 Jan 1, 97 (1):105-113 (IF 4,017)

Trka J., Kalinová M., Hrušák O., Zuna J., Krejčí O., Madžo J., Sedláček P., Vávra V., Michalová K., Jarošová M., Starý J. for Czech Paediatric Haematology Working Group
Real-Time Quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry – *Leukemia* 2002, Jul;16(7): 1381-1389 (IF 4,693)

Zuna J., Hrušák O., Kalinová M., Mužíková K., Zörnerová T., Starý J., Trka J. pro pracovní skupinu dětské hematologie v ČR
Sledování minimální reziduální nemoci u dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií – *Vnitřní lékařství* 2000, 46(8), 465-9

Zuna J., Hrušák O., Kalinová M., Mužíková K., Starý J., and Trka J. for Czech Paediatric Haematology Working Group
TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? - *Leukemia* 1999 Jan;13(1):22-24

Trka J., Zuna J., Hrušák O., Michalová K., Mužíková K., Kalinová M., Horák J. & Starý J. for Czech Paediatric Haematology Working Group
No evidence for MLL/AF4 expression in normal cord blood samples - *Blood* 1999 Feb 1;93(3):1106-1107

Zuna J., Hrušák O., Kalinová M., Mužíková K., Starý J., and Trka J. for Czech Paediatric Haematology Working Group
Significantly lower relapse rate for TEL/AML1-positive ALL – *Leukemia* 1999 Oct: 13(10),1633

Kalinová M., Zuna J., Soukup J., Mužíková K., Sedláková K., Bohmerová I., Kodet R., Starý J., Trka J.
Sledování minimální reziduální nemoci u dětí s lymfoidními malignitami metodami molekulární genetiky - *Scripta Medica* 1998, 71, Suppl. 5, 47-50

Abstrakta v časopisech s IF:

Kalinová M., Mužíková K., Krsková L., Hilská I., Augustiňáková A., Kabíčková E., Kepák T., Kodet R.: Real-time quantitative PCR detection of fusion gene NPM/ALK, cytokine receptor CD30 and T-cell receptor rearrangement in patients with ALCL: monitoring residual disease and correlation with disease status; XXVI Congress of the IAP, 16.9.-21.9.2006, *Modern Pathology* 19 (3) 2006, p.116

Čapková L., Kalinová M., Krsková L., Kodetová D., Petřík F., Trefný M., Musil J.: Detection of molecular changes in bronchial mucosa of heavy smokers in correlation with findings of autofluorescence bronchoscopy; XXVI Congress of the IAP, 16.9.-21.9.2006, *Modern Pathology* 19 (3) 2006, p.164

Krsková L., Hilská I., Augustiňáková A., Kalinová M., Mrhalová M., Neradová M., Kodet R.: Expression of ERBB2 and BCL-2 in synovial darcoma; XXVI Congress of the IAP, 16.9.-21.9.2006, *Modern Pathology* 19 (3) 2006, p.181

Kalinova M., Krskova L., Hilska I., Kopecka P., Kodet R.
Real-time quantitative PCR detection of fusion gene ALK/NPM in patients with ALCL: residual disease monitoring and a correlation with the disease status - 20 th European Congress of Pathology, 3.-8..9.2005, *Virchows Archiv* 447 (2) 2005, p.264

Krsková L., Kalinová M., Kopecká P., Hilská I., Kodet R.: Evidence of genetic alterations in chromosomes 11, 9 and 2 in embryonal and alveolar rhabdomyosarcomas; 20 th European Congress of Pathology, 3.-8..9.2005, *Virchows Archiv* 447 (2) 2005, p.496

Kalinova M., Sedlacek P., Formankova R., Muzikova K., Fronkova E., Reznickova L., Stry J., Trka J.
Little evidence for the prognostic role of WT1 quantitative detection before HSCT in paediatric haematologic malignancies. 31st Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Prague, Czech Republic 2005. *Bone Marrow Transplantation* 2005, 35(2):S158

Mrhalová M., Kalinová M., Krsková L., Soukup J., Kodet R.
Monitoring of patients with follicular lamphoma carrying t(14;18)(q32;q21) by real time quantitative PCR – 19th European Congress of Pathology, 2003, Ljubljana, Slovenia, *Virchows Archiv* 2003, 3, 443

Mrhalová M., Kodet R., Kalinová M.
Quantitative RT-PCR as a tool solving discrepant results between ERBB2 gene copy numbers and expression of the ERBB-2 protein: an improvement of herceptin therapy indication in breast carcinomas – XXIV th International Congress of the International Academy of Pathology, Amsterdam, Holandsko, 2002, Suppl 1;S15

Trka J., Kalinová M., Hrušák O., et al.
RQ-PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: excellent correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry – 2nd International Symposium on MRD, 2001, Marseilles.

Trka J., Kalinová M., Hrušák O., et al.

RQ-PCR detection of WT1 gene expression in transplanted and non-transplanted children with AML: correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry – 27th Meeting European Group for Blood and Marrow Transplantation, 2001, Maastricht. *Bone Marrow Transpl* 2001, 27, Suppl. 1: S223

Trka J., Zuna J., Hrusak O., Zavacka A., Holzelova E., Kalinova M., Muzikova K., Zornerova T., Brabencova A., Stary J.: for Czech Paediatric Haematology Working Group Rapid clearance of bone marrow in children with TEL/AML1-positive ALL. 5th Meeting of European Hematology Association, 2000, Birmingham. *Hematol J* 2000, 1, Suppl. 1: 152

Trka J., Zuna J., Zavacká-Poloučková A., Madzo J., Holzelová E., Brabencová A., Kalinová M., et al.

Evidence for presence of t(12;21) in cord blood samples of healthy newborns - 42th Meeting of American Society of Hematology, 2000, San Francisco. *Blood* 2000, 96(11): 2991

Trka J., Zuna J., Hrušák O., Zavacká A., Kalinová M., et al.

Low expression of WT1 gene is related to specific subtypes of acute leukaemias - 28th World Congress of International Society of Hematology, 2000, Toronto. *Int J Hematol* 2000, 72, Suppl. 1: 24

Přednášky:

Kalinová M., Krsková L., Hilská I., Augustiňáková A., Mužíková K., Kabíčková E., Kepák T., Trka J., Kodet R.: Detekce exprese fúzního genu NPM/ALK, molekuly CD30 a klonálních přestaveb T buněčných receptorů u pacientů s anaplastickým velkobuněčným lymfomem; Vědecká konference 2007, 25.-26.4.2007, Praha 2.LF UK Praha, str.42

Kalinová M., Krsková L., Hilská I., Augustiňáková A., Kabíčková E., Kepák T., Kodet R.: Kvantitativní detekce fúzního genu NPM/ALK a exprese molekuly CD30 u pacientů s anaplastickým velkobuněčným lymfomem (ALCL) a korelace s minimální diseminovanou chorobou; XX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 31.5.-3.6.2006, Olomouc, str.63

Kalinová M., Krsková L., Hilská I., Augustiňáková A., Kabíčková E., Kepák T., Kodet R.: Kvantitativní detekce exprese fúzního genu NPM/ALK a exprese molekuly CD30 u pacientů s anaplastickým velkobuněčným lymfomem (ALCL); XXX. Brněnské onkologické dny 11.5.-13.5.2006, Brno, str. 282

Kalinová M., Kopecká P., Hilská I., Kepák T., Kodet R.

Kvantitativní detekce exprese fúzního genu ALK/NPM u pacientů s ALCL – roční zkušenosti

13. Sjezd českých a slovenských patologů s mezinárodní účastí, Rožnov pod Radhoštěm, 2005, str. 57

Kalinová M., Mužíková K., Šrámková L., Starý J., Trka J.
Kvantitativní detekce exprese genu WT1 u dětských hematologických onemocnění – je gen WT1 markerem maligních buněk? – Studentská vědecká konference 2005, str. 12

Kalinová M., Krsková L., Hilská I., Kopecká P., Kodet R.
Kvantitativní detekce exprese fúzního genu ALK/NPM u pacientů s ALCL: sledování infiltrace kostní dřeně - XXXI.Sjezd společnosti patologů ČLS J.E. Purkyně, Praha – Motol, 2004, str. 40

Kalinova M., Mejstrikova E., Sedlacek P., Sramkova L., Hrusak O., Stary J., Trka J. for *Czech Paediatric Haematology*
Quantitative detection of WT1 gene expression in children with AML undergoing stem cell transplantation: comparison with residual disease by flow cytometry and CD34+ and CD117+ status – The first International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Berlin 2004

Kalinová M., Mejstříková E., Starý J., Trka J.
Expres Genu WT1 koreluje s přítomností fúzních genů u akutních lymfoblastických leukémií (ALL) – XVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí 2003, str. 56

Kalinova M., Sramkova L., Starý J., Trka J. for *Czech Paediatric Haematology (CPH)*
Potential of quantitative detection of WT1 gene expression in differentiation between aplastic anaemia and refractory cytopaenia – III. International Symposium on MDS in Childhood, Stresa, Itálie 2003, str.38

Kalinová M., Šrámková L., Starý J. a Trka J.: Kvantitativní detekce exprese genu WT1 u dětských akutních myeloidních leukémií: prognostický význam a sledování reziduální nemoci - Studentská vědecká konference 2003

Trka J., Kalinová M., Hrušák O., Zuna J., Poloučková A., Sedláček P., Šrámková L., Vávra V., Michalová K., Jarošová M., Starý J.
Kvantitativní detekce (RQ-PCR) exprese genu WT1 u dětí s akutní myeloidní leukémií: prognostický význam a přesná korelace s klinickým průběhem nemoci a sledováním reziduální nemoci pomocí průtokové cytometrie – MEFA 2002

9 **Použitá literatura**

1. Call KM, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA et al.: Isolation and characterization of zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990;60:509-520.
2. Wagner KD, Wagner N, Schedl A: The complex life of WT1. *J Cell Sci* 2003;116:1653-1658.
3. Sugiyama H: Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol* 2001;73:177-187.
4. Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG: WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* 2001;273:141-161.
5. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, Reinhardt R, Thiel E: Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 1995;9:1060-1067.
6. Loeb DM, Sukumar S: The role of WT1 in oncogenesis: tumor suppressor or oncogene? *Int J Hematol* 2002;76:117-126.
7. Hohenstein P, Hastie ND: The many facets of the Wilms tumour gene, WT1. *Human Molecular Genetics* 2006;15:R196-R201.
8. Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE: Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9618-9622.
9. Yang L, Han Y, Saurez Saiz F, Minden MD: A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* 2007;21:868-876.
10. Roberts SG: Transcriptional regulation by WT1 in development. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:542-547.
11. Algar E: A review of the Wilms' tumor 1 gene (WT1) and its role in hematopoiesis and leukemia. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:589-599.
12. Pritchard-Jones K: The Wilms tumor gene, WT1, in normal and abnormal nephrogenesis. *Pediatr Nephrol* 1999;620-625.
13. Papežová M, MJ, Goetz P.: Molekulární genetika Wilmsova tumoru *Časopis lékařů českých* 2001;11:323-327.
14. Maurer U, Weidmann E, Karakas T, Hoelzer D, Bergmann L: Wilms tumor gene (wt1) mRNA is equally expressed in blast cells from acute myeloid leukemia and normal CD34+ progenitors. *Blood* 1997;90:4230-4232.
15. Maurer U, Brieger J, Weidmann E, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L: The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of CD34+ progenitors and downregulated early in the course of differentiation in vitro. *Exp Hematol* 1997;25:945-950.
16. Baird PN, Simmons PJ: Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp Hematol* 1997;25:312-320.
17. Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, Scadden DT, Haber DA: The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *Embo J* 2001;20:1897-1909.
18. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R: WT1 is required for early kidney development. *Cell* 1993:679-691.
19. Nishida S, Hosen N, Shirakata T, Kanato K, Yanagihara M, Nakatsuka S, Hoshida Y, Nakazawa T, Harada Y, Tatsumi N, Tsuboi A, Kawakami M, Oka Y, Oji Y, Aozasa K, Kawase I, Sugiyama H: AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic

- leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood* 2006;107:3303-3312.
20. Hirose M: The role of Wilms' tumor genes. *J Med Invest* 1999;46:130-140.
 21. Little M, Wells C: A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat* 1997;9:209-225.
 22. Menssen HD, Siehl JM, Thiel E: Wilms tumor gene (WT1) expression as a panleukemic marker. *Int J Hematol* 2002;76:103-109.
 23. Sugiyama H: Wilms tumor gene (WT1) as a new marker for the detection of minimal residual disease in leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998;30:55-61.
 24. Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H, Kjeldsen E, Hokland P: WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *Br J Haematol* 2004;125:590-600.
 25. Niegemann E, Wehner S, Kornhuber B, Schwabe D, Ebener U: wt1 gene expression in childhood leukemias. *Acta Haematol* 1999;102:72-76.
 26. Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, Oka Y, Miyake S, Tamaki H, Oji Y, Yamagami T, Tatekawa T, Soma T, Kishimoto T, Sugiyama H: Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 1997;89:1405-1412.
 27. Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D, Serra A, Volpe G, Messa F, Rege-Cambrin G, Guerrasio A, Divona M, Lo Coco F, Saglio G: Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* 2002;16:2115-2121.
 28. Chen Z: The possible role and application of WT1 in human leukemia. *Int J Hematol* 2001;73:39-46.
 29. Bergmann L, Maurer U, Weidmann E: Wilms tumor gene expression in acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma* 1997;25:435-443.
 30. Miwa H, Beran M, Saunders GF: Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia* 1992;6:405-409.
 31. Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Inoue K, Soma T, Oka Y, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim EH, Kawakami M, Fuchigami K, Tomonaga M, Toyama K, Aozasa K, Kishimoto T, Sugiyama H: The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1999;13:393-399.
 32. Trka J, Kalinova M, Hrusak O, Zuna J, Krejci O, Madzo J, Sedlacek P, Vavra V, Michalova K, Jarosova M, Stary J: Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia* 2002;16:1381-1389.
 33. Schmid D, Heinze G, Linnerth B, Tisljar K, Kusec R, Geissler K, Sillaber C, Laczika K, Mitterbauer M, Zochbauer S, Mannhalter C, Haas OA, Lechner K, Jager U, Gaiger A: Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11:639-643.
 34. Patmasiriwat P, Fraizer GC, Claxton D, Kantarjian H, Saunders GF: Expression pattern of WT1 and GATA-1 in AML with chromosome 16q22 abnormalities. *Leukemia* 1996;10:1127-1133.
 35. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, Kita K, Hiraoka A, Masaoka T, Nasu K, et al.: WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994;84:3071-3079.

36. Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E, Hoelzer D: High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* 1997;90:1217-1225.
37. Barragan E, Cervera J, Bolufer P, Ballester S, Martin G, Fernandez P, Collado R, Sayas MJ, Sanz MA: Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004;89:926-933.
38. Chiusa L, Francia di Celle P, Campisi P, Ceretto C, Marmont F, Pich A: Prognostic value of quantitative analysis of WT1 gene transcripts in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2006;91:270-271.
39. Spanaki A, Linardakis E, Perdikogianni C, Stiakaki E, Morotti A, Cilloni D, Kalmanti M: Quantitative assessment of WT1 expression in diagnosis of childhood acute leukemia. *Leuk Res* 2007;31:570-572.
40. Gaiger A, Linnerth B, Mann G, Schmid D, Heinze G, Tisljar K, Haas OA, Gadner H, Lion T: Wilms' tumour gene (wt1) expression at diagnosis has no prognostic relevance in childhood acute lymphoblastic leukaemia treated by an intensive chemotherapy protocol. *Eur J Haematol* 1999;63:86-93.
41. Rodrigues PC, Oliveira SN, Viana MB, Matsuda EI, Nowill AE, Brandalise SR, Yunes JA: Prognostic significance of WT1 gene expression in pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2006;49:133-138.
42. Siehl JM, Reinwald M, Heufelder K, Menssen HD, Keilholz U, Thiel E: Expression of Wilms' tumor gene 1 at different stages of acute myeloid leukemia and analysis of its major splice variants. *Ann Hematol* 2004;83:745-750.
43. Renshaw J, King-Underwood L, Pritchard-Jones K: Differential splicing of exon 5 of the Wilms tumour (WT1) gene. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;19:256-266.
44. Keilholz U, Menssen HD, Gaiger A, Menke A, Oji Y, Oka Y, Scheibenbogen C, Stauss H, Thiel E, Sugiyama H: Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia. *Leukemia* 2005;19:1318-1323.
45. Inoue K, Tamaki H, Ogawa H, Oka Y, Soma T, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim EH, Kawakami M, Akiyama T, Kishimoto T, Sugiyama H: Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1998;91:2969-2976.
46. Loeb DM, Summers JL, Burwell EA, Korz D, Friedman AD, Sukumar S: An isoform of the Wilms' tumor suppressor gene potentiates granulocytic differentiation. *Leukemia* 2003;17:965-971.
47. Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M, Kudoh T, Akiyama T, Murakami A, Maekawa T: Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood* 1996;87:2878-2884.
48. Elmaagacli AH, Koldehoff M, Peceny R, Klein-Hitpass L, Ottinger H, Beelen DW, Opalka B: WT1 and BCR-ABL specific small interfering RNA have additive effects in the induction of apoptosis in leukemic cells. *Haematologica* 2005;90:326-334.
49. Starý J: Dětská leukémie na prahu 3.tisíciletí. *Doktorská disertační práce: Univerzita Karlova, Praha, 2. lékařská fakulta, 2001.*
50. Pui CH: Acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr Opin Oncol* 2000;12:3-12.
51. Look AT: Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997;278:1059-1064.
52. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Diaz MG, Malec M,

- Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A: Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:1901-1928.
53. Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Stary J, Trka J: Significantly lower relapse rate for TEL/AML1-positive ALL. *Leukemia* 1999;13:1633.
 54. Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Stary J, Trka J: TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group. *Leukemia* 1999;13:22-24.
 55. Rubnitz JE, Behm FG, Pui CH, Evans WE, Relling MV, Raimondi SC, Harrison PL, Sandlund JT, Ribeiro RC, Grosveld G, Downing JR: Genetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia with emphasis on p16, MLL, and ETV6 gene abnormalities: results of St Jude Total Therapy Study XII. *Leukemia* 1997;11:1201-1206.
 56. Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, Chessells JM, Baruchel A, Kamps W, Silverman LB, Biondi A, Harms DO, Vilmer E, Schrappe M, Camitta B: Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002;359:1909-1915.
 57. McLean TW, Ringold S, Neuberg D, Stegmaier K, Tantravahi R, Ritz J, Koeffler HP, Takeuchi S, Janssen JW, Seriu T, Bartram CR, Sallan SE, Gilliland DG, Golub TR: TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996;88:4252-4258.
 58. Martinez-Climent JA: Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. *Leukemia* 1997;11:1999-2021.
 59. Crist WM, Carroll AJ, Shuster JJ, Behm FG, Whitehead M, Vietti TJ, Look AT, Mahoney D, Ragab A, Pullen DJ, et al.: Poor prognosis of children with pre-B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23;p13): a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1990;76:117-122.
 60. Guidez F, Petrie K, Ford AM, Lu H, Bennett CA, MacGregor A, Hannemann J, Ito Y, Ghysdael J, Greaves M, Wiedemann LM, Zelent A: Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood* 2000;96:2557-2561.
 61. Seeger K, Adams HP, Buchwald D, Beyermann B, Kremens B, Niemeyer C, Ritter J, Schwabe D, Harms D, Schrappe M, Henze G: TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *Blood* 1998;91:1716-1722.
 62. Seeger K, Buchwald D, Peter A, Taube T, von Stackelberg A, Schmitt G, Henze G: TEL-AML1 fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999;94:374-376.
 63. Loh ML, Silverman LB, Young ML, Neuberg D, Golub TR, Sallan SE, Gilliland DG: Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998;92:4792-4797.
 64. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, Hubeek I, van Drunen E, Beverloo HB, Slater RM, Harbott J, Seyfarth J, van Wering ER, Hahlen K, Schmiegelow K, Janka-Schaub GE, Veerman AJ: TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96:1094-1099.
 65. Mayer J, Starý, J. a kol.: Leukémie. Praha, GRADA Publishing 2002.

66. Hasle H: Myelodysplastic syndromes in childhood--classification, epidemiology, and treatment. *Leuk Lymphoma* 1994;13:11-26.
67. Fenaux P: Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 2001;73:429-437.
68. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, Gilliland DG, Tefferi A: The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005;106:1207-1209.
69. Quesnel B, Guillermin G, Vereecque R, Wattel E, Preudhomme C, Bauters F, Vanrumbeke M, Fenaux P: Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* 1998;91:2985-2990.
70. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC: Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005;106:2162-2168.
71. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, et al.: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
72. de Bruin PC, Gruss HJ, van der Valk P, Willemze R, Meijer CJ: CD30 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue: biological aspects and clinical implications. *Leukemia* 1995;9:1620-1627.
73. Falini B, Pileri S, Pizzolo G, Durkop H, Flenghi L, Stirpe F, Martelli MF, Stein H: CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood* 1995;85:1-14.
74. Durkop H, Foss HD, Eitelbach F, Anagnostopoulos I, Latza U, Pileri S, Stein H: Expression of the CD30 antigen in non-lymphoid tissues and cells. *J Pathol* 2000;190:613-618.
75. Agnarsson BA, Kadin ME: Ki-1 positive large cell lymphoma. A morphologic and immunologic study of 19 cases. *Am J Surg Pathol* 1988;12:264-274.
76. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT: Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994;263:1281-1284.
77. Pulford K, Lamant L, Morris SW, Butler LH, Wood KM, Stroud D, Delsol G, Mason DY: Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood* 1997;89:1394-1404.
78. Morris SW, Naeve C, Mathew P, James PL, Kirstein MN, Cui X, Witte DP: ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* 1997;14:2175-2188.
79. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, Mori S, Ratzkin B, Yamamoto T: Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 1997;14:439-449.
80. Kuefer MU, Look AT, Pulford K, Behm FG, Pattengale PK, Mason DY, Morris SW: Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice. *Blood* 1997;90:2901-2910.

81. Fujimoto J, Shiota M, Iwahara T, Seki N, Satoh H, Mori S, Yamamoto T: Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4181-4186.
82. Bai RY, Ouyang T, Miething C, Morris SW, Peschel C, Duyster J: Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood* 2000;96:4319-4327.
83. Campana D, Pui CH: Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995;85:1416-1434.
84. Lucio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Gaipa G, Biondi A, Orfao A, Janossy G, van Dongen JJ, San Miguel JF: Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999;13:419-427.
85. Hrusak O, Porwit-MacDonald A: Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002;16:1233-1258.
86. van Wering ER, Beishuizen A, Roeffen ET, van der Linden-Schrever BE, Verhoeven MA, Hahlen K, Hooijkaas H, van Dongen JJ: Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1995;9:1523-1533.
87. Campana D, Coustan-Smith E: Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999;38:139-152.
88. Pallisgaard N, Clausen N, Schroder H, Hokland P: Rapid and sensitive minimal residual disease detection in acute leukemia by quantitative real-time RT-PCR exemplified by t(12;21) TEL-AML1 fusion transcript. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;26:355-365.
89. Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJ: Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:110-118.
90. Yokota S, Hansen-Hagge TE, Ludwig WD, Reiter A, Raghavachar A, Kleihauer E, Bartram CR: Use of polymerase chain reactions to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients. *Blood* 1991;77:331-339.
91. Wasserman R, Galili N, Ito Y, Silber JH, Reichard BA, Shane S, Womer RB, Lange B, Rovera G: Residual disease at the end of induction therapy as a predictor of relapse during therapy in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1992;10:1879-1888.
92. Nizet Y, Van Daele S, Lewalle P, Vaerman JL, Philippe M, Vermylen C, Cornu G, Ferrant A, Michaux JL, Martiat P: Long-term follow-up of residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients in complete remission using clonogenic IgH probes and the polymerase chain reaction. *Blood* 1993;82:1618-1625.
93. Neale GA, Menarguez J, Kitchingman GR, Fitzgerald TJ, Koehler M, Mirro J, Jr., Goorha RM: Detection of minimal residual disease in T-cell acute lymphoblastic leukemia using polymerase chain reaction predicts impending relapse. *Blood* 1991;78:739-747.

94. Goulden NJ, Knechtli CJ, Garland RJ, Langlands K, Hancock JP, Potter MN, Steward CG, Oakhill A: Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1998;100:235-244.
95. Brisco MJ, Condon J, Hughes E, Neoh SH, Sykes PJ, Seshadri R, Toogood I, Waters K, Tauro G, Ekert H, et al.: Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet* 1994;343:196-200.
96. Biondi A, Yokota S, Hansen-Hagge TE, Rossi V, Giudici G, Maglia O, Basso G, Tell C, Masera G, Bartram CR: Minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: analysis of patients in continuous complete remission or with consecutive relapse. *Leukemia* 1992;6:282-288.
97. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR: Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998;352:1731-1738.
98. Jacquy C, Delepaut B, Van Daele S, Vaerman JL, Zenebergh A, Brichard B, Vermylen C, Cornu G, Martiat P: A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. *Br J Haematol* 1997;98:140-146.
99. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, Rubnitz JE, Rivera GK, Sandlund JT, Pui CH, Campana D: Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998;351:550-554.
100. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med* 1998;339:591-598.
101. Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, D'Aniello E, Willemse MJ, Fasching K, Pannunzio A, Gadner H, Schrappe M, Kamps WA, Bartram CR, van Dongen JJ, Panzer-Grumayer ER: Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia* 2000;14:1939-1943.
102. San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Diaz-Mediavilla J, Gutierrez N, Canizo C, Ramos F, Calmuntia MJ, Perez JJ, Gonzalez M, Orfao A: Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001;98:1746-1751.
103. San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Gonzalez M, Caballero D, Garcia-Marcos MA, Ramos F, Fernandez-Calvo J, Calmuntia MJ, Diaz-Mediavilla J, Orfao A: Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997;90:2465-2470.
104. Sainty D, Liso V, Cantu-Rajnoldi A, Head D, Mozziconacci MJ, Arnoulet C, Benattar L, Fenu S, Mancini M, Duchayne E, Mahon FX, Gutierrez N, Birg F, Biondi A, Grimwade D, Lafage-Pochitaloff M, Hagemeyer A, Flandrin G: A new

- morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. Group Francais de Cytogenetique Hematologique, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies. *Blood* 2000;96:1287-1296.
105. Tanaka K, Arif M, Eguchi M, Kumaravel TS, Ueda R, Ohno R, Iwato K, Kyo T, Dohy H, Kamada N: Application of fluorescence in situ hybridization to detect residual leukemic cells with 9;22 and 15;17 translocations. *Leukemia* 1997;11:436-440.
 106. Wattjes MP, Krauter J, Nagel S, Heidenreich O, Ganser A, Heil G: Comparison of nested competitive RT-PCR and real-time RT-PCR for the detection and quantification of AML1/MTG8 fusion transcripts in t(8;21) positive acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2000;14:329-335.
 107. Krauter J, Wattjes MP, Nagel S, Heidenreich O, Krug U, Kafert S, Bunjes D, Bergmann L, Ganser A, Heil G: Real-time RT-PCR for the detection and quantification of AML1/MTG8 fusion transcripts in t(8;21)-positive AML patients. *Br J Haematol* 1999;107:80-85.
 108. Krauter J, Hoellge W, Wattjes MP, Nagel S, Heidenreich O, Bunjes D, Ganser A, Heil G: Detection and quantification of CBFβ/MYH11 fusion transcripts in patients with inv(16)-positive acute myeloblastic leukemia by real-time RT-PCR. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:342-348.
 109. Elmaagacli AH, Beelen DW, Kroll M, Trzensky S, Stein C, Schaefer UW: Detection of CBFβ/MYH11 fusion transcripts in patients with inv(16) acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow or peripheral blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998;21:159-166.
 110. Stirewalt DL, Willman CL, Radich JP: Quantitative, real-time polymerase chain reactions for FLT3 internal tandem duplications are highly sensitive and specific. *Leuk Res* 2001;25:1085-1088.
 111. Nakao M, Janssen JW, Erz D, Seriu T, Bartram CR: Tandem duplication of the FLT3 gene in acute lymphoblastic leukemia: a marker for the monitoring of minimal residual disease. *Leukemia* 2000;14:522-524.
 112. Gaiger A, Schmid D, Heinze G, Linnerth B, Greinix H, Kalhs P, Tislar K, Priglinger S, Laczika K, Mitterbauer M, Novak M, Mitterbauer G, Mannhalter C, Haas OA, Lechner K, Jager U: Detection of the WT1 transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1998;12:1886-1894.
 113. Elmaagacli AH, Beelen DW, Trenchel R, Schaefer UW: The detection of wt-1 transcripts is not associated with an increased leukemic relapse rate in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:91-96.
 114. Kreuzer KA, Saborowski A, Lupberger J, Appelt C, Na IK, le Coutre P, Schmidt CA: Fluorescent 5'-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumor gene (WT1) mRNA: implications for monitoring human leukaemias. *Br J Haematol* 2001;114:313-318.
 115. Inoue K, Ogawa H, Yamagami T, Soma T, Tani Y, Tatekawa T, Oji Y, Tamaki H, Kyo T, Dohy H, Hiraoka A, Masaoka T, Kishimoto T, Sugiyama H: Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood* 1996;88:2267-2278.
 116. Brieger J, Weidmann E, Maurer U, Hoelzer D, Mitrou PS, Bergmann L: The Wilms' tumor gene is frequently expressed in acute myeloblastic leukemias and

- may provide a marker for residual blast cells detectable by PCR. *Ann Oncol* 1995;6:811-816.
117. Brieger J, Weidmann E, Fenchel K, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L: The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells. *Leukemia* 1994;8:2138-2143.
 118. Tajeddine N, Millard I, Gailly P, Gala JL: Real-time RT-PCR quantification of PRAME gene expression for monitoring minimal residual disease in acute myeloblastic leukaemia. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:548-555.
 119. Steinbach D, Schramm A, Eggert A, Onda M, Dawczynski K, Rump A, Pastan I, Wittig S, Pfaffendorf N, Voigt A, Zintl F, Gruhn B: Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2006;12:2434-2441.
 120. Steinbach D, Hermann J, Viehmann S, Zintl F, Gruhn B: Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;133:118-123.
 121. Matsushita M, Ikeda H, Kizaki M, Okamoto S, Ogasawara M, Ikeda Y, Kawakami Y: Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia. *Br J Haematol* 2001;112:916-926.
 122. Diverio D, Rossi V, Avvisati G, De Santis S, Pistilli A, Pane F, Saglio G, Martinelli G, Petti MC, Santoro A, Pelicci PG, Mandelli F, Biondi A, Lo Coco F: Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RARalpha fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter "AIDA" trial. *GIMEMA-AIEOP Multicenter "AIDA" Trial. Blood* 1998;92:784-789.
 123. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VH, San Miguel JF, van Dongen JJ: Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol* 2001;2:409-417.
 124. Mussolin L, Pillon M, d'Amore ES, Santoro N, Lombardi A, Fagioli F, Zanesco L, Rosolen A: Prevalence and clinical implications of bone marrow involvement in pediatric anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 2005;19:1643-1647.
 125. Damm-Welk C, Busch K, Burkhardt B, Schieferstein J, Viehmann S, Oschlies I, Klapper W, Zimmermann M, Harbott J, Reiter A, Woessmann W: Prognostic significance of circulating tumor cells in bone marrow or peripheral blood as detected by qualitative and quantitative PCR in pediatric NPM-ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 2007;110:670-677.
 126. Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, Schumm M, Neu S, Geiselhart A, Bader P, Schlegel PG, Greil J, Stachel D, Herzog RJ, Niethammer D: Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:777-783.
 127. Green A, Clarke E, Hunt L, Canterbury A, Lankester A, Hale G, Waldmann H, Goodman S, Cornish JM, Marks DI, Steward CG, Oakhill A, Pamphilon DH: Children with acute lymphoblastic leukemia who receive T-cell-depleted HLA mismatched marrow allografts from unrelated donors have an increased incidence of primary graft failure but a similar overall transplant outcome. *Blood* 1999;94:2236-2246.
 128. Davies SM, Wagner JE, Shu XO, Blazar BR, Katsanis E, Orchard PJ, Kersey JH, Dusenbery KE, Weisdorf DJ, McGlave PB, Ramsay NK: Unrelated donor bone marrow transplantation for children with acute leukemia. *J Clin Oncol* 1997;15:557-565.

129. Davies SM, Ramsay NK, Klein JP, Weisdorf DJ, Bolwell B, Cahn JY, Camitta BM, Gale RP, Giralt S, Heilmann C, Henslee-Downey PJ, Herzig RH, Hutchinson R, Keating A, Lazarus HM, Milone GA, Neudorf S, Perez WS, Powles RL, Prentice HG, Schiller G, Socie G, Vowels M, Wiley J, Yeager A, Horowitz MM: Comparison of preparative regimens in transplants for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2000;18:340-347.
130. Barrett J: The molecular basis of graft-versus-leukemia in CML. *Bone Marrow Transplant* 1994;14 Suppl 3:S68-73.
131. Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, Niethammer D, Beck JF: Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. *Leukemia* 1999;13:2079-2086.
132. van der Velden VH, Joosten SA, Willemsse MJ, van Wering ER, Lankester AW, van Dongen JJ, Hoogerbrugge PM: Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001;15:1485-1487.
133. Uzunel M, Mattsson J, Jaksch M, Remberger M, Ringden O: The significance of graft-versus-host disease and pretransplantation minimal residual disease status to outcome after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001;98:1982-1984.
134. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, Grandage VL, Harris EL, Garland RJ, Jones CG, Rowbottom AW, Hunt LP, Green AF, Clarke E, Lankester AW, Cornish JM, Pamphilon DH, Steward CG, Oakhill A: Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998;92:4072-4079.
135. Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A, Steward CG, Handgretinger R, Beck JF, Klingebiel T: Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia* 2002;16:1668-1672.
136. Sramkova L, Muzikova K, Fronkova E, Krejci O, Sedlacek P, Formankova R, Mejstrikova E, Stary J, Trka J: Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:93-100.
137. Krejci O, van der Velden VH, Bader P, Kreyenberg H, Goulden N, Hancock J, Schilham MW, Lankester A, Revesz T, Klingebiel T, van Dongen JJ: Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplant* 2003;32:849-851.
138. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
139. Meyer C, Kowarz E, Schneider B, Oehm C, Klingebiel T, Dingermann T, Marschalek R: Genomic DNA of leukemic patients: target for clinical diagnosis of MLL rearrangements. *Biotechnol J* 2006;1:656-663.
140. Burmeister T, Marschalek R, Schneider B, Meyer C, Gokbuget N, Schwartz S, Hoelzer D, Thiel E: Monitoring minimal residual disease by quantification of

- genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia* 2006;20:451-457.
141. Hosen N, Sonoda Y, Oji Y, Kimura T, Minamiguchi H, Tamaki H, Kawakami M, Asada M, Kanato K, Motomura M, Murakami M, Fujioka T, Masuda T, Kim EH, Tsuboi A, Oka Y, Soma T, Ogawa H, Sugiyama H: Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br J Haematol* 2002;116:409-420.
 142. Cilloni D, Gottardi E, Messa F, Fava M, Scaravaglio P, Bertini M, Girotto M, Marinone C, Ferrero D, Gallamini A, Levis A, Saglio G: Significant correlation between the degree of WT1 expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2003;21:1988-1995.
 143. Bader P, Niemeyer C, Weber G, Coliva T, Rossi V, Kreyenberg H, Gerecke A, Biondi A: WT1 gene expression: useful marker for minimal residual disease in childhood myelodysplastic syndromes and juvenile myelo-monocytic leukemia? *Eur J Haematol* 2004;73:25-28.
 144. Boublikova L, Kalinova M, Ryan J, Quinn F, O'Marcaigh A, Smith O, Browne P, Stary J, McCann SR, Trka J, Lawler M: Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2005.
 145. Garg M, Moore H, Tobal K, Liu Yin JA: Prognostic significance of quantitative analysis of WT1 gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukaemia. *Br J Haematol* 2003;123:49-59.
 146. Trumper L, Pfreundschuh M, Bonin FV, Daus H: Detection of the t(2;5)-associated NPM/ALK fusion cDNA in peripheral blood cells of healthy individuals. *Br J Haematol* 1998;103:1138-1144.
 147. Maes B, Vanhentenrijk V, Wlodarska I, Cools J, Peeters B, Marynen P, de Wolf-Peeters C: The NPM-ALK and the ATIC-ALK fusion genes can be detected in non-neoplastic cells. *Am J Pathol* 2001;158:2185-2193.