

# NEJČASTĚJŠÍ CHROMOZOMÁLNÍ PŘESTAVBY U DĚTÍ S AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ A MOŽNOSTI JEJICH SLEDOVÁNÍ NA MOLEKULÁRNÍ ÚROVNI

## THE MOST FREQUENT CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN CHILDREN WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA FOLLOW-UP AT THE MOLECULAR LEVEL

MICHÁLEK J.<sup>1</sup>, ŠMARD A J.<sup>2</sup>, ŠEVČÍKOVÁ S.<sup>2</sup>, HRSTKOVÁ H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 1. DĚTSKÁ INTERNÍ A ONKOLOGICKÁ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

<sup>2</sup> KATEDRA GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA, MASARYKOVA UNIVERZITA, BRNO

**Souhrn:** U osmdesáti procent dětí s akutní myeloidní leukémií (AML) lze cytogeneticky nalézt klonální chromozomální abe-race. Mezi nejčastější patří specifické přestavby, úzce spjaté s určitým podtypem AML: translokace t(8;21) u M2, transloka-ce t(15;17) u M3, inverze inv(16) u M4eo a translokace zahrnující oblast 11q23 u M4 a M5 podtypu AML dle FAB klasifika-ce. Tyto čtyři specifické přestavby, které se dohromady vyskytují u 40-45% dětí s AML, lze také detekovat na molekulární úrovni s vysokou citlivostí pohybující se na úrovni zachytu 1 leukemické buňky nesoucí specifickou přestavbu mezi 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> zdravými buňkami. S využitím molekulárně genetického vyšetření lze pacienty s AML nesoucí některou z přestaveb sledo-vat dlouhodobě s možností monitorování residuální nemoci při poklesu množství leukemických buněk pod hladinu deteko-vatelnosti klasickým morfologickým a cytogenetickým vyšetřením.

**Klíčová slova:** akutní myeloidní leukémie u dětí, chromozomální přestavba, PCR

**Summary:** Eighty percent of children with acute myeloid leukemia (AML) show clonal chromosomal aberrations on cyto-genetic examination. The most frequent aberrations recognized in AML are: t(8;21) in M2, t(15;17) in M3, inv(16) in M4eo and t 11q23 translocation in M4 or M5 subtypes of AML according to FAB classification. The above-mentioned aberrations comprise 40-45% of all AML cases in children. Recently, a molecular genetic examination of these specific genetic changes allowing detection of 1 leukemic cell per 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> normal cells has been worked out. Using this approach, long-term monitoring of residual disease has become possible, although the mass of leukemic cells has dropped far below the detection level of morphologic and cytogenetic examination.

**Key words:** acute myeloid leukemia in children, chromosomal aberration, PCR

**Seznam zkratk:** AML – akutní myeloidní leukemie, ALL – akutní lymfoblastická leukemie, CSF – kolonie stimulující fak-tor, FAB – francouzsko-americko-britská (klasifikace), MRN – minimální reziduální nemoc, PCR – polymerázová řetězová reakce

### Úvod

Vznik leukémie je provázen nenáhodnými genetickými změnami, které představují porušení normální struktury a funkce genů zodpovědných za udržení rovnováhy mezi proliferací a diferenciací hematopoetických buněk (1). Genetické přestavby jsou specifické pro jednotlivé typy leukémií a fenotyp nádorové buňky je jimi podmíněn. Z historického pohledu byla většina těchto přestaveb popsána a charakterizována na úrovni chromozomů při pečlivé cytogenetické analýze. V současné době lze tyto přestavby charakterizovat na molekulární úrovni a odhalit tak aktivaci onkogenů a inaktivaci tumor-supresorových genů zapojených do procesu leukemogeneze (1,2). Klonální chromozomální přestavby jsou nalézány téměř u 80% dětí i dospělých s akutní myeloidní leukémií (AML) diagnostikovanou *de novo* (2,3). Úspěšnost cytogenetického vyšetření se pohybuje kolem 85% (viz tab.1) a lze ji zvýšit využitím metody fluorescenční in situ hybridizace (2,9). Mezi nejčastější chromozomální přestavby patří translokace t(8;21), t(15;17), inverze inv(16) a translokace zahrnující oblast 11q23. Tyto přestavby jsou cytogeneticky nalézány u 40-45% dětských (3-5) a 30-35% dospělých (1,5) pacientů s AML a úzce korelují s určitou podskupinou AML podle FAB

(French-American-British) klasifikace (6). Podle velké studie cytogenetických nálezů u 2755 hodnotitelných pacientů s AML (5) se translokace t(15;17) vyskytuje pouze u podskupiny AML M3, translokace t(8;21) se z 91% vyskytuje u AML M2, inverze inv(16) se z 86% vyskytuje u AML M4eo a translokace zahrnující oblast 11q23 se z 83% vyskytuje u AML M4 nebo M5. Nejčastějším typem translokace zahrnující oblast 11q23 u AML je t(9;11), která se z 82% vyskytuje u podskupiny AML M5. Přehled nejčastějších specifických přestaveb u dětských i dospělých pacientů s AML uvádí tab.1.

Kromě těchto přestaveb úzce souvisejících s určitou podskupinou AML dle FAB klasifikace se také často setkáváme se ztrátou části nebo celého chromozomu (-7, -7q, -5q, -Y) nebo naopak s trisomií některých chromozomů (+8, +21, +22). Tyto chromozomální aberace však nejsou specifické pro jednotlivé podskupiny AML (5,7) a nejsou v tomto přehledu dále diskutovány.

Rozvoj molekulární biologie umožnil klonování a sekvenování genů poškozených nebo změněných translokací a poskytl nové možnosti pro diagnostiku a sledování pacientů. Zejména rychlá, přesná a vysoce citlivá metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) našla značné uplatnění v hemato-onkolo-

Tab. 1: Výskyt specifických chromozomálních přestavb diagnostikovaných cytogeneticky u dětských a dospělých pacientů s AML.

Zdroj	Děti s AML					Dospělí s AML			
	Kalwinsky 1990	Creutzig 1995	Martinez-Climent 1995	Leblanc 1997	Rubnitz 1998	Mitelman 1992	Marosi 1992	Ferrant 1997	Grimwade 1998*
Číslo citace	3	21	4	51	43	5	57	56	20
Úspěšnost vyšetření <sup>###</sup> (%)	78	75	96	88	N	N	N	93	82
Počet pacientů*	121	147	115	220	N	2755	125	927	1612
Normální karyotyp (%)	20	20	15	28	21	N	28	N	42
t(8;21) (%)	12	17	8	16	12	13	6	10	8
t(15;17) (%)	7	3	10	4	7	12	10	9	12
inv(16) (%)	12	8	8	9	12	9	7	5	3
t(11q23)** (%)	13	17	18	17	N	8	6	4	4
t(9;11) (%)	7	12	9	7	7	2	N	N	N
jiné chromoz. přestavby (%)	36	35	41	26	41	N	41	N	31

N údaj neuveden

# soubor zahrnuje dospělé i děti s AML

### úspěšnost cytogenetického vyšetření v procentech

\* počet pacientů s cytogeneticky hodnotitelným nálezem

\*\* t(11q23) představuje všechny pacienty s nálezem této přestavby včetně pacientů s t(9;11)

gii (1). V současné době je tato metoda nedílnou součástí vyšetření dětských pacientů s AML vedle vyšetření morfologického, cytogenetického a imunofenotypizačního. Metoda PCR se používá k detekci specifických chromozomálních přestavb u AML (8). Rozšiřuje tak možnosti vyšetření specifických genových přestavb tam, kde chromozomální změny jsou tak nepatrné, že cytogenetickým vyšetřením jsou jen obtížné nebo zcela nerozpoznatelné.

Předpokládá se, že v době stanovení diagnózy AML je v organismu přítomno řádově  $10^{12}$  leukemických buněk (9). Klasickým morfologickým a cytogenetickým vyšetřením lze rozpoznat 1 leukemickou buňku mezi řádově  $10^2$  zdravými buňkami. Poklesne-li v průběhu léčby počet leukemických buněk pod tuto hranici, tedy řádově pod  $10^{10}$ , hovoříme na základě morfologického vyšetření o remisi a vývoj onemocnění nelze tímto způsobem dále sledovat. Na tomto místě se může velmi dobře uplatnit vyšetření metodou PCR, kdy lze teoreticky zachytit ve vyšetřovaném materiálu jedinou leukemickou buňku nesoucí specifickou přestavbu. Prakticky se citlivost metody PCR pohybuje v rozmezí zachytu 1 leukemické buňky mezi  $10^5$ - $10^6$  zdravými buňkami (8-10). Tato metoda přispívá nejen k upřesnění diagnózy, ale zejména ke sledování tzv. minimální residuální nemoci (MRN) u pacientů po dosažení klinické remise onemocnění v průběhu další léčby. Pojem MRN označuje zbytkovou populaci leukemických buněk, kterou nelze zachytit klasickými morfologickými metodami. Pokud dojde k relapsu onemocnění, lze jej detekovat na molekulární úrovni zpravidla o několik měsíců dříve, než dojde ke klinické manifestaci a lze jej diagnostikovat klasickým morfologickým vyšetřením kostní dřeně (1,8-10). V současné době nabývá také na významu sledování MRN metodou multiparametrické imunofenotypizace průtokovým cytometrem, kde citlivost detekce leukemických buněk, které však musí exprimovat specifickou kombinaci CD znaků, se pohybuje v rozmezí 1 leukemické buňky mezi  $10^4$ - $10^5$  zdravými buňkami. Bližší informace, které lze nalézt např. v citacích (9-12), však přesahují rozsah tohoto článku.

#### Nejčastější specifické přestavby u AML v dětském věku Translokace t(8;21)

Při translokaci t(8;21)(q22;q22) dochází k fúzi genu ETO (MTG8) lokalizovaném na chromozomu 8 s genem AML1 na

chromozomu 21. Chimerický gen AML1/ETO dává vznik nové RNA, kterou lze detekovat metodou reverzně-transkripční (RT)-PCR (8).

Gen AML1 za fyziologických okolností reguluje expresi několika genů specifických pro jednotlivé linie hematopoetických prekurzorů: genu myeloperoxidázy, leukocytární elastázy, receptoru makrofágového kolonie-stimulujícího faktoru (M-CSF)(=colony-stimulating factor), granulocytárního-makrofágového CSF a genů T-lymfocytárních receptorů (13). Je rovněž nezbytný v procesu normální krvevorní v průběhu fetálního vývoje (14). Gen AML1 může fúzovat s dalšími geny, jako je tomu v případě poměrně vzácné translokace t(3;21)(q26;q22), která se vyskytuje u sekundární AML a myelodysplastického syndromu (MDS) po léčbě cytostatiky a u některých pacientů v blastickém zvratu chronické myeloidní leukemie, kdy vzniká fúzní gen AML1/Evi-1 (15). Dalším případem zapojení genu AML1 do leukemogeneze je translokace t(12;21), nalézáná u 25% dětí s B-prekurzorovou akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), kdy vzniká fúzní gen TEL/AML1 (16). AML1 tak představuje gen, který je vůbec nejčastěji zapojen do procesu leukemogeneze (13-18). Ukazuje se, že v případě t(8;21), je jeho fyziologická funkce, kterou sehrává v procesu diferenciaci myeloidních buněk, dominantně potlačena fúzním genem AML1/ETO (17). V kostní dřeni pacientů s AML M2 t(8;21) je nalézána významně vyšší hladina exprese receptoru pro M-CSF, stejně jako v případě buněčné linie Kasumi-1, vyznačující se rovněž touto translokací (18). Signál přenášený receptorem pro M-CSF způsobí zapojení cyklinů D a E, což vede k přechodu buněk do G1/S fáze a stimuluje tak buněčnou proliferaci. Stimulace exprese receptoru pro M-CSF prostřednictvím AML1/ETO tak může být jedním z faktorů podílejících se na leukemogenezi u pacientů s AML (19).

Translokace t(8;21)(q22;q22) je jednou z nejčastějších chromozomálních přestavb specifických pro AML. U dětí je spojována s dobrou prognózou s více než 80% dosažením remise a s 5-letým intervalem přežití bez známek nemoci nad 50% (20,21). Vyskytuje se u podtypu AML M2, charakteristickým rysem je přítomnost Auerových tyčí v myeloblastech, silná pozitivita myeloperoxidázy a častá pozitivita CD13, CD15, CD33, CD34, CD65, HLA-DR a negativita CD11b, CD14 (21,22). Blasty mohou rovněž aberantně exprimovat CD19,

což je fyziologický znak B-lymfocytů (22). Ojedinele byla t(8;21) nalezena u AML M1 a M4, byla popsána i u pacientů s myelodysplastickým syndromem a u dospělých pacientů v blastické fázi chronické myeloidní leukemie (5, 22). Podtyp AML M2 tvoří 15-25% všech pacientů s AML, přičemž 50-60% AML M2 je t(8;21) pozitivních.

Metoda dvoukolové RT-PCR umožňuje detekci fúzního genu AML1/ETO a dlouhodobé sledování MRN u pacientů s translokací t(8;21) na úrovni citlivosti 1 leukemické buňky mezi 10<sup>6</sup> zdravými buňkami. Zpravidla však nedochází k úplné eradikaci fúzního genu po chemoterapii, ani po autologní či alogenní trasplantaci kostní dřeně, přestože pacienti jsou dlouhodobě v remisi bez známek aktivity leukemie (23, 24). Při vyšetření fúzního genu AML1/ETO metodou kvantitativní RT-PCR je patrný pokles pozitivivity o 3-4 řády ve srovnání s vyšetřením při diagnóze. Gen AML1/ETO je však stále nalézán i po několika letech od zahájení léčby AML v granulocytární-makrofágové, erytroidní a megakaryocytární linii prekurzorových buněk, což ukazuje na přítomnost AML1/ETO genu v pluri-potentních progenitorových buňkách kostní dřeně se schopností diferenciací do všech tří buněčných linií (24). Tento fenomén přetrvávání malého množství fúzního leukemogenního genu ve všech třech buněčných liniích v kostní dřeni dlouhodobě po léčbě u pacientů v klinické kompletní remisi AML dosud nebyl uspokojivě vysvětlen (23-26). V případě relapsu AML však dochází ke zvyšování pozitivivity AML1/ETO mRNA, což lze dokumentovat na molekulární úrovni o několik měsíců dříve, než morfologicky a klinicky (25, 26).

#### Translokace t(15;17)

Translokace t(15;17)(q22;q21) se vyskytuje výhradně u podtypu AML M3, který je také nazýván akutní promyelocytární leukemií (APL). Jedná se o fúzi genu PML na chromosomu 15q22 s genem RAR $\alpha$  na chromosomu 17q21. Tuto specifickou přestavbu lze v 70% případů diagnostikovat cytogeneticky a prakticky u všech pacientů s APL metodou RT-PCR (27). APL tvoří 5-15% všech AML, jejím charakteristickým rysem je častá exprese CD13, CD33 a CD9, nízká exprese CD15, CD34, chybění HLA-DR a aberantní exprese CD2 (21,28).

V nedávné době bylo podáno několik důkazů o klíčové roli receptoru kyseliny retinové (RAR) při myeloidní diferenciaci (29,30). Existují tři geny kódující receptory kyseliny retinové: RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  a RAR $\gamma$ , přičemž především RAR $\alpha$  je exprimován v buňkách myeloidní řady. Produktem tohoto genu je jaderný protein RAR $\alpha$ , který vytváří heterodimer s retinoidovým receptorem X (RXR). Tento komplex je schopen po navázání all-trans retinové kyseliny (ATRA) stimulovat transkripci a vést k normální diferenciaci promyelocytů (31). V případě APL s translokací t(15;17), kdy je gen RAR $\alpha$  fúzován s genem PML pak vznikají aberantní proteiny PML-RAR $\alpha$  a RAR $\alpha$ -PML. Předpokládá se, že význam v leukemogenezi má chimerický protein PML-RAR $\alpha$ , který vytěšňuje RAR $\alpha$  protein z jeho fyziologické funkce a dominantně negativním účinkem blokuje diferenciaci promyelocytů (32). Podáním vysokých dávek ATRA lze tento patologický proces vedoucí k leukemické proliferaci promyelocytů zvrátit. ATRA stimuluje tvorbu fyziologického proteinu RAR $\alpha$ , který pak kompetitivně převáží nad aberantním proteinem PML-RAR $\alpha$  (33). Tímto způsobem lze dokonce navodit úplnou remisi APL, bohužel pouze dočasně. Pacienti s APL léčení pouze ATRA většinou do 1 roku relabují (34). V současné době má však použití ATRA své pevné místo v indukční léčbě APL v kombinaci s intenzivní cytostatickou léčbou. Charakteristickým rysem APL je časté a klinicky závažné krvácení, které je způsobeno uvolňováním aktivátorů plasminogenu z promyelocytů. Riziko život ohrožujícího krvácení s rozvojem syndromu diseminované intravaskulární koagulace prudce narůstá po zahájení indukční cytostatické léčby spojené s masivním rozpadem leukemických buněk. Pokud je však současně podávána ATRA, riziko krvácení se minimalizuje (35, 36).

Kombinovaná chemoterapie spojená s podáním retinové kyseliny v indukci vede k navození klinické remise u více než 90% pacientů s APL (35,37). Další vývoj nemoci pak již nelze sledovat klasickými morfologickými metodami, přitom asi 30% dětských pacientů s APL relabuje (21). Metoda kvantitativní dvoukolové RT-PCR prokázala schopnost sledovat MRN u pacientů s APL (1,8). Existují však odlišnosti při sledování MRN podle nastavení citlivosti detekce specifického fúzního transkriptu PML-RAR $\alpha$ . Většina autorů dosahovala citlivosti záchytu 1 leukemické buňky mezi 10<sup>4</sup> zdravými buňkami v kostní dřeni, s častějším nálezem vymizení leukemické populace v průběhu konsolidační léčby a v průběhu dlouhodobého sledování MRN. Pokud došlo k relapsu, bylo to často u pacientů MRN PML-RAR $\alpha$  negativních (1, 8, 37, 38). Naproti tomu studie, ve kterých se dařila detekce 1 leukemické buňky mezi 10<sup>6</sup> zdravými buňkami, ať už přímo (39) nebo po inkubaci s interferonem (40), zjistily častěji přetrvávání leukemického klonu nesoucího gen PML-RAR $\alpha$  při dlouhodobém sledování MRN a méně často docházelo k relapsu u MRN PML-RAR $\alpha$  negativních pacientů. U pacientů s MRN, kteří jsou pozitivní na PML-RAR $\alpha$ , znamenalo zvyšování stupně pozitivivity předzvěst relapsu, který se dostavil během několika měsíců. Pacienti s dlouhodobě nízkou pozitivitou PML-RAR $\alpha$  byli dlouhodobě v remisi (39, 40). Z uvedeného vyplývá, že důležitou roli při sledování MRN hraje kvantifikace použité PCR metody. V současné době se ukazuje, že určitá populace buněk nesoucích přestavbu PML-RAR $\alpha$  může dlouhodobě perzistovat u „vyléčeného“ pacienta s APL v remisi, bez jakýchkoliv známek aktivity choroby (39), podobně jako je tomu u pacientů s t(8;21) AML (23, 24).

Kromě přestavby PML-RAR $\alpha$  byly v současné době nalezeny další dvě přestavby u pacientů s APL: translokace t(11;17) s fúzí genu PLZF a RAR $\alpha$  (41) a translokace t(5;17) s fúzí genu nukleofosminu (NPM) a RAR $\alpha$  (42). Podání ATRA však na rozdíl od t(15;17) nevede u těchto pacientů k navození remise (19).

#### Inverze inv(16)

Inverze inv(16)(p13;q22) a příbuzná translokace t(16;16)(p13;q22) se vyskytuje u 12-15% dětí s AML (43,44). Ukazuje se, že cytogeneticky jsou tyto přestavby obtížně diagnostikovatelné a lze je zjistit pouze v polovině případů, nejčastěji u podtypu AML M4eo dle FAB klasifikace (definované jako alespoň 3% eosinofilů v kostní dřeni v době stanovení diagnózy). Všechny cytogeneticky pozitivní nálezy jsou prokazatelné na molekulární úrovni s použitím metody RT-PCR, kterou lze detekovat fúzní transkript CBF $\beta$ -MYH11 vznikající na základě fúze genu CBF $\beta$  na 16q22 s genem MYH11 na 16p13 (44-48). Navíc u zbyvajících poloviny cytogeneticky negativních případů lze metodou RT-PCR rovněž detekovat fúzní transkript CBF $\beta$ -MYH11, často u pacientů s jiným podtypem AML než M4eo (45-47). Fúzní protein CBF $\beta$ -MYH11 se váže na protein AML1 a vede k transformaci fibroblastů *in vitro* (43). Gen CBF $\beta$  je podobně jako gen AML1 nezbytný pro normální fetální krvetvorbu (14). Protein CBF $\beta$ -MYH11 zasahuje do funkce komplexu AML1-CBF $\beta$ , který za fyziologické situace funguje jako transkripční faktor potřebný pro normální myelopoézu. Tímto způsobem se CBF $\beta$ -MYH11 zřejmě uplatňuje v procesu leukemogeneze, podobně jako AML1-ETO.

Přestavba inv(16) nebo t(16;16) je u dětí i dospělých s AML spojena s dobrou prognózou. Po indukční cytostatické léčbě téměř všichni pacienti dosáhnou klinické remise, dlouhodobé přežití bez známek nemoci po cytostatické léčbě je zaznamenáno u více než 60% dětských pacientů. U 30% dochází k relapsu (20, 45). Pomocí dvoukolové RT-PCR lze detekovat 4 různé chimerické transkripty CBF $\beta$ -MYH11. Sledování MRN prokazovalo postupně se snižující PCR pozitivitu v průběhu léčby až na hranici detekovatelnosti touto metodou, tj. záchyt 1 leukemické buňky mezi 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> zdravými buňkami.

Při dlouhodobém sledování klesla hladina reziduálních leukemických buněk pod tuto hranici (1,46,49). Klinickému relapsu vždy předcházela nálezy zvyšující se PCR pozitivitu nebo u některých pacientů stále přetrvávaly hladiny leukemických buněk řádově  $1 : 10^2$ - $10^3$  (46-49).

### Translokace týkající se oblasti 11q23

Přestavby zahrnující oblast chromozómu 11q23 byly detekovány u různých typů hematologických malignit. Postihují 7-10% pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), kde se nejčastěji vyskytují translokace t(4;11) a t(11;19), 4-8% dospělých pacientů s AML *de novo* (1,5,20,50), 13-18% dětských pacientů s AML *de novo* (3,4,21,51) a často jsou nalézány u pacientů se sekundární AML po předchozí cytostatické léčbě inhibitory topoizomerázy II (43,58). U dětských i dospělých pacientů s t(11q23) AML se nejčastěji vyskytuje translokace t(9;11)(p22;q23), která představuje u dětí s AML přibližně polovinu všech translokací týkajících se oblasti 11q23 (3,4,51,52). V současné době je kromě t(9;11) známo více než 30 různých přestaveb, které zahrnují oblast chromozómu 11q23 (53). Místo zlomu na partnerském chromozómu se nejčastěji týká proužků 4q21, 6q27, 10q11, 19p13, Xq22 a vznikají tak translokace t(4;11), t(6;11), t(10;11), t(11;19) a t(11;X). Převážná většina těchto přestaveb je spojena s podtypem AML M5, s hyperleukocytózou v periferní krvi v době stanovení diagnózy, koagulačními poruchami, s častou expresí CD11b, CD15, CD33, CDw65, HLA-DR, CD4 (21,54) a obecně se špatnou prognózou. 70% AML i ALL diagnostikovaných u kojenců do 1 roku života nese přestavbu zahrnující oblast 11q23 (3,4,50).

Molekulární studie prokázaly, že převážná většina recipročních translokací či insercí týkajících se oblasti 11q23 působí přestavbu genu MLL (syn. ALL1, HRX), který je v tomto místě lokalizován (1,59). Gen MLL hraje významnou roli v době fetálního růstu a fetální krvetvorby. Studie na myších ukázaly, že chybění genu MLL vede ke smrti *in utero*, heterozygoti v genu MLL vykazují retardaci růstu, anemii a trombocytopenii (43,55). Ačkoliv role fúzních partnerů genu MLL není dosud objasněna, patrně dochází při těchto přestavbách ke změně normální funkce genu MLL vedoucí k leukemogenezi. V poslední době se však ukazuje různé biologické chování jednotlivých přestaveb týkajících se oblasti 11q23. Nejčastější typ, translokace t(9;11), je spojována s lepší léčebnou odpovědí jak u dospělých, tak zejména u dětských pacientů s AML. Prognóza dětí s t(9;11) je významně lepší (5leté přežití nad 50%) (21,51) než u ostatních translokací týkajících se oblasti 11q23, kde i přes agresivní léčbu se začleněním alogenní transplantace kostní dřeně dlouhodobě přežívá méně než 20% pacientů (3,4,43).

Jednotlivé specifické přestavby týkající se genu MLL lze kro-

mě cytogenetického vyšetření sledovat na molekulární úrovni metodou RT-PCR. Studie zabývající se dlouhodobým sledováním MRN jsou však omezené vzhledem ke špatné prognóze těchto pacientů (60,61). Umožňují však detekci 1 leukemické buňky mezi  $10^5$ - $10^6$  zdravých buněk.

### Léčba dětí s AML v České republice

V České republice je ročně diagnostikováno 15-20 nových pacientů s akutní myeloidní leukémií ve věku 0-18 let (62). Tito pacienti jsou jednotně léčeni podle tzv. BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) protokolu. V současné době je používán protokol BFM 98, který rozděluje pacienty do standardního a vysokého rizika (63). Do protokolu se standardním rizikem, který nezařazuje transplantaci kostní dřeně v 1. remisi, jsou mimo jiné zahrnuti pacienti s nálezem přestavby t(8;21), t(15;17) a inv(16) s dobrou odpovědí na indukční léčbu. Do protokolu s vysokým rizikem, který začleňuje transplantaci kostní dřeně v 1. remisi, jsou mimo jiné začleněni pacienti s přestavbou zahrnující oblast 11q23.

### Závěr

Zavedení molekulárně genetických metod znamená převrat v pohledu na léčbu leukemie a posouvá náš pohled na toto zhubné onemocnění daleko za hranice klasického mikroskopického vyšetření kostní dřeně. Současně se však objevují nové otázky spjaté s dlouhodobým přetrváváním leukemického klonu v organismu bez známek jeho aktivity, dokonce s možností diferenciace do všech tří hematopoetických linií, jak je tomu v případě přestavby AML1/ETO (24). Názor o úplném vyléčení leukemie při poklesu leukemické populace pod hladinu detekovatelnosti na molekulární úrovni dnes neobstojí, zejména pokud se limit detekce pohybuje na úrovni 1 leukemické buňky mezi  $10^4$  zdravými buňkami. Riziko relapsu sice klesá se snižujícím se počtem leukemických buněk, avšak mnoho dalších faktorů, jako například vznik rezistence na cytostatika, může ovlivnit další vývoj nemoci. Největší přínos molekulárně genetického vyšetření tedy zřejmě spočívá v odhalení těch pacientů, kteří i přes intenzivní indukční léčbu jeví stále vysoký stupeň MRN, který je zpravidla předzvěstí klinického relapsu leukemie. Podobně je tomu v případě pacientů pohybujiících se na hranici detekovatelnosti nebo v molekulárně genetické remisi s nálezem se zvyšujícím stupněm MRN. Těmto pacientům bude třeba do budoucna věnovat zvláštní pozornost s cílem včasného a efektivního potlačení leukemické populace.

*Tato práce byla sponzorována grantem Interní grantové agentury MZ ČR číslo: NC/4547-3*

### Literatura

1. Drexler H. G., Borkhardt A., Janssen J. W. G.: Detection of chromosomal translocations in leukemia-lymphoma cells by polymerase chain reaction. *Leuk. Lymph.* 1995, 19: 359-80;
2. Rubin C. M., Rowley J. D.: Chromosomal abnormalities in childhood malignant diseases. In: Nathan D. G., Oski F. A., eds. *Hematology of infancy and childhood*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993: 1288-1318;
3. Kalwinsky D. K., Raimondi S. C. et al.: Prognostic importance of cytogenetic subgroups in de novo pediatric acute nonlymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 1990, 8: 75-83;
4. Martínez-Climent J. A., Lane N. J. et al.: Clinical and prognostic significance of chromosomal abnormalities in childhood acute myeloid leukemia de novo. *Leukemia* 1995, 9: 95-101;
5. Mitelman F., Heim S.: Quantitative acute leukemia cytogenetics. *Genes Chrom. Cancer* 1992, 5: 57-66;
6. Bennet J. M., Catovsky D., Daniel M. T. et al.: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann. Int. Medicine* 1985, 103: 620-5;
7. Stasi R., Poeta G. et al.: Incidence of chromosome abnormalities and clinical significance of karyotype in de novo acute myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1993, 67: 28-34;
8. Baer M. R.: Assessment of minimal residual disease in patients with acute leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* 1998, 10: 17-22;
9. Campana D., Pui C. H.: Detection of minimal residual disease in acute leukemia: Methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995, 85: 1416-34;
10. Wormann B.: Implications of detection of minimal residual disease. *Curr. Opin. Oncol.* 1993, 5: 3;
11. San Miguel J. F., Martínez A. et al.: Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997, 90: 2465-70;
12. Sievers E. L., Lange B. J. et al.: Prediction of relapse of pediatric acute myeloid leukemia by use of multidimensional flow cytometry. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996, 88: 1483;
13. Tanaka K., Tanaka T. et al.: The AML1/ETO(MTG8) and AML1/Evi-1 leukemia-associated chimeric oncoproteins accumulate PEBP2((CBF)) in the nucleus more efficiently than wild-type AML1. *Blood* 1998, 91: 1688-99;

14. Okuda T., van Deursen J. et al.: AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996, 84: 321;
15. Nucifora G., Begy C. R. et al.: Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML1 at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3;21)(q26;q22) translocations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91: 4004-8;
16. Romana S. P., Mauchauffe M. et al.: The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a TEL/AML1 gene fusion. *Blood* 1995, 85: 3662;
17. Tanaka T., Kurokawa M. et al.: The cellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its activation ability. *Mol. Cell. Biol.* 1996, 16: 3967;
18. Rhoades K. L., Hetherington C. J., Rowley J. D. et al.: Synergistic up-regulation of the myeloid-specific promoter for the macrophage colony-stimulating factor receptor by AML1 and the t(8;21) fusion protein may contribute to leukemogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93: 11895;
19. Tenen D. G., Hromas R., Licht J. D., Zhang D. E.: Transcription Factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 1997, 90: 489-519;
20. Grimwade D., Walker H. et al.: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998, 92: 2322-33;
21. Creutzig U., Harbott J. et al.: Clinical significance of surface antigen expression in children with acute myeloid leukemia: results of study AML-BFM-87. *Blood* 1995, 86: 3097-3108;
22. Miyamoto T., Nagafuji K. et al.: Quantitative analysis of AML1/ETO transcripts in peripheral blood stem cells harvests from patients with t(8;21) acute myeloid leukemia. *Br. J. Haematol.*, 1995, 91: 132-8;
23. Jurlander J., Caliguri M. A. et al.: Persistence of the AML1/ETO fusion transcript in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia. *Blood* 1996, 88: 2183-91;
24. Miyamoto T., Nagafuji K. et al.: Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood* 1996, 87: 4789-96;
25. Marcucci G., Livak K. J. et al.: Detection of minimal residual disease in patients with AML1/ETO-associated acute myeloid leukemia using a novel quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Leukemia* 1998, 12: 1482-9;
26. Muto A., Mori S. et al.: Serial quantification of minimal residual disease of t(8;21) acute myelogenous leukemia with RT-competitive PCR assay. *Br. J. Haematol.* 1996, 95: 85-94;
27. Warrel R.P. Jr., de The H., et al.: Acute promyelocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1993, 329: 177;
28. Guglielmi C., Martelli M.P., et al.: Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. A comparative Italian study of 196 cases. *Br. J. Haematol.* 1998, 102: 1035-41;
29. Gratas C., Menot M.L., et al.: Retinoic acid supports granulocytic but not erythroid differentiation of myeloid progenitors in normal bone marrow cells. *Leukemia* 1993, 7: 1156;
30. Douer D., Koeffler H.P.: Retinoic acid enhances colony-stimulating factor-induced clonal growth of normal human myeloid progenitor cells in vitro. *Exp. Cell Res.* 1982, 138: 193;
31. Largman C., Detmer K., et al.: Expression of retinoic acid receptor alpha mRNA in human leukemia cells. *Blood* 1989, 74: 99;
32. de The H., Lavau C., et al.: The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 1991, 66: 675;
33. Tallman M.S., Andersen J.W., et al.: All-*trans*-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1997, 337: 1021-8;
34. Chen Z.X., Xue Y-Q., et al.: A clinical and experimental study on all-*trans* retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 1991, 78: 1413;
35. Avvisati G., Lo Coco F., et al.: AIDA (All-*trans* retinoic acid + Idarubicin) in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: A Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) pilot study. *Blood* 1996, 88: 1390-8;
36. Dombret H., Sutton L., et al.: Combined therapy with All-*trans*-retinoic acid and high-dose chemotherapy in patients with hyperleukocytic acute promyelocytic leukemia and severe visceral hemorrhage. *Leukemia* 1992, 6: 1237-42;
37. Mandelli F., Diverio D., et al.: Molecular remission in PML-RAR $\alpha$ -positive acute promyelocytic leukemia by combined all-*trans* retinoic acid and idarubicin therapy. *Blood* 1997, 90: 1014-1021;
38. Diverio D., Rossi V., et al.: 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. *Blood* 1998, 92: 784-9;
39. Tobal K., Liu Jin J.A.: RT-PCR method with increased sensitivity shows persistence of PML-RARA fusion transcripts in patients in long-term remission of APL. *Leukemia* 1998, 12: 1349-54;
40. Seale J.R., Varma S., et al.: Quantification of PML-RARalpha transcripts in acute promyelocytic leukaemia: explanation for the lack of sensitivity of RT-PCR for the detection of minimal residual disease and induction of the leukaemia-specific mRNA by alpha interferon. *Br. J. Haematol.* 1996, 95: 876-7;
41. Chen S.J., Zelent A., et al.: Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* 1993, 91: 2260;
42. Redner R.L., Rush E.A., et al.: The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood* 1996, 87: 882;
43. Rubnitz J.E., Look A.T.: Molecular genetics of childhood leukemias. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 1998, 20: 1-11;
44. Liu P., Tarle S.A., et al.: Fusion between transcription factor CBF $\beta$ -PEBP2b and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 1993, 261: 1041-4;
45. Costello R., Sainy D., et al.: Detection of CBFbeta-MYH11 fusion transcripts in acute myeloid leukemia: heterogeneity of cytological and molecular characteristics. *Leukemia* 1997, 11: 644-50;
46. Laczika K., Novak M., et al.: Competitive CBF $\beta$ -MYH11 reverse-transcriptase polymerase chain reaction for Quantitative assessment of minimal residual disease during postremission therapy in acute myeloid leukemia with inversion(16): A pilot study. *J. Clin. Oncol.* 1998, 16: 1519-25;
47. Langabeer S.E., Walker H., et al.: Frequency of CBFbeta-MYH11 fusion transcripts in patients entered into the U. K. MRC AML trials. *Br. J. Haematol.* 1997, 96: 736-9;
48. Claxton D.F., Liu P., et al.: Detection of fusion transcripts generated by the inversion 16 chromosome in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1994, 83: 1750-6;
49. Evans P.A., Short M.A., et al.: Detection and quantitation of the CBFbeta-MYH11 transcripts associated with the inv(16) in presentation and follow-up samples from patients with AML. *Leukemia* 1997, 11: 364-9;
50. Thirman M.J., Gill H.J., et al.: Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N. Engl. J. Med.* 1993, 329: 909-14;
51. Leblanc T., Auvrignon A., et al.: Prognosis value of cytogenetics in 250 children with acute myeloblastic leukemia treated in the LAME 89/91 protocol. *Blood Suppl.* 1997, 634a;
52. Swansbury G.J., Slater R., et al.: Hematological malignancies with t(9;11)(p21-22;q23) - a laboratory and clinical study of 125 cases. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* 1998, 12: 792-800;
53. Cimino G., Rapanotti M.C., et al.: ALL1 gene alterations in acute leukemia: biological and clinical aspects. *Haematologica* 1998, 83: 350-7;
54. Baer M. R., Stewart C. C. et al.: Acute myeloid leukemia with 11q23 translocations: myelomonocytic immunophenotype by multiparameter flow cytometry. *Leukemia* 1998, 12: 317-25;
55. Yu B. D., Hess J. L. et al.: Altered Hox expression and segmental identity in MLL-mutant mice. *Nature* 1995, 378: 505-8;
56. Ferrant A., Labopin M. et al.: Karyotype in acute myeloblastic leukemia: prognostic significance for bone marrow transplantation in first remission: a European Group for Blood and Marrow Transplantation study. *Blood* 1997, 90: 2931-8;
57. Marosi C., Koller U., et al.: Prognostic impact of karyotype and immunologic phenotype in 125 adult patients with de novo AML. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1992, 61: 14-25;
58. Felix C.A., Hosler M.R., et al.: ALL-1 gene rearrangements in DNA topoisomerase II inhibitor-related leukemia in children. *Blood* 1995, 85: 3250-6;
59. Cimino G., Lo Coco F., et al.: ALL-1 gene at chromosome 11q23 is consistently altered in acute leukemia of early infancy. *Blood* 1993, 82: 544-6;
60. Yamamoto K., Seto M., et al.: A reverse transcriptase-polymerase chain reaction detects heterogeneous chimeric mRNAs in leukemias with 11q23 abnormalities. *Blood* 1994, 83: 2912-21;
61. Repp R., Borkhardt A., et al.: Detection of four different 11q23 chromosomal abnormalities by multiplex-PCR and fluorescence-based automatic DNA-fragment analysis. *Leukemia* 1995, 1: 210-5;
62. Národní onkologický registr České republiky, Brno, 1998;
63. Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hamatologie: Therapiestudie AML-BFM 98, 1998.