

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

**TELOMERÁZOVÁ AKTIVITA
A EXPRESE JEJÍCH REGULAČNÍCH GENŮ
U PACIENTŮ
S MYELODYSPLASTICKÝM SYNDROMEM
A AKUTNÍ LEUKÉMIÍ**

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Mgr. Hana Žižková
Ústav hematologie a krevní transfuze**

**Školitel: RNDr. Zuzana Sieglová, PhD.
Praha 2006**

Tato disertační práce byla vypracována na oddělení molekulární genetiky Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze za podpory grantů MZ0002373601 a IGA NC5903-3 a NC7606-3 Ministerstva zdravotnictví.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Zuzaně Sieglové, PhD. za poskytnutí zajímavého tématu pro disertační práci, za odborné vedení, cenné rady a konzultace při zpracování práce.

Ráda bych vyjádřila svou vděčnost i MUDr. Jaroslavu Čermákovi, CSc., a to nejen za poskytnuté vzorky pacientů, ale i za uvedení do problematiky myelodysplastického syndromu, celkový klinický pohled i připomínky při interpretaci výsledků. Dále děkuji Doc. MUDr. Radaně Neuwirtové, CSc. a MUDr. Jacqueline Maaloufové za poskytnutí klinických údajů analyzovaných vzorků a cenné připomínky při jejich zpracování.

Poděkování patří i všem spolupracovníkům z oddělení molekulární genetiky ÚHKT, kteří přispěli k této práci.

V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu a trpělivost.

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

V Praze dne 12.5.2006

Zuzana Čermáková

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. CÍLE PRÁCE.....	2
3. PROBLEMATIKA.....	3
3.1. TELOMÉRO-TELOMERÁZOVÝ KOMPLEX.....	3
3.1.1. Teloméry a telomeráza.....	3
3.1.1.1. Telomerázová aktivita v normálních hematopoetických buňkách.....	9
3.1.2. Geny účastnící se regulace teloméro-telomerázového komplexu.....	9
3.1.2.1. hTERT gen.....	9
3.1.2.2. c-Myc gen.....	10
3.1.2.3. POT1 gen	10
3.1.2.4. TEPlgen.....	10
3.1.2.5. TRF1 gen.....	11
3.1.2.6. TNKS gen.....	11
3.2. STUDOVANÁ HEMATOLOGICKÁ ONEMOCNĚNÍ.....	12
3.2.1. Myelodysplastický syndrom.....	12
3.2.1.1. Charakteristika onemocnění.....	12
3.2.1.2. Klasifikace MDS	13
3.2.1.3. Prognóza onemocnění.....	14
3.2.2. Akutní myeloidní leukémie.....	15
3.2.3. Akutní lymfoblastová leukémie.....	16
3.3. TELOMERÁZOVÁ AKTIVITA U HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT.....	17
3.4. DÉLKA TELOMÉR U HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT.....	18
3.5. EXPRESE STUDOVANÝCH GENŮ U HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT.....	18
3.6. ALTERNATIVNÍ PRODLUŽOVÁNÍ TELOMÉR.....	20
3.7. METYLACE PROMOTOROVÉ OBLASTI GENU hTERT.....	20
3.8. ANTI-TELOMERÁZOVÁ TERAPIE.....	21
4. BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	23
4.1. TELOMERÁZOVÁ AKTIVITA.....	23
4.1.1. Pacienti.....	23
4.1.2. Kontrolní vzorky.....	23
4.1.2.1. Negativní kontroly.....	23
4.1.2.2. Pozitivní kontroly.....	24
4.2. GENOVÁ EXPRESE.....	24
4.2.1. Pacienti.....	24
4.2.2. Kontrolní vzorky.....	24
4.2.2.1. Negativní kontroly.....	24
4.2.2.2. Pozitivní kontroly.....	25
5. METODY.....	26
5.1. IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK.....	26
5.2. STANOVENÍ TELOMERÁZOVÉ AKTIVITY.....	26
5.2.1. Příprava proteinových extraktů.....	26
5.2.2. Detekce telomerázové aktivity.....	26
5.3. STANOVENÍ EXPRESE GENŮ.....	28
5.3.1. Izolace RNA.....	28
5.3.2. Reverzní transkripce.....	29
5.3.3. Real-time kvantitativní PCR.....	29
5.4. STANOVENÍ DÉLKY TELOMÉR.....	31
5.5. STATISTICKÁ ANALÝZA.....	32
6. VÝSLEDKY.....	33
6.1. TELOMERÁZOVÁ AKTIVITA	33

6.1.1. Telomerázová aktivita u MDS.....	33
6.1.1.1. Dynamika telomerázové aktivity.....	33
6.1.1.2. Průběžné změny telomerázové aktivity.....	33
6.1.1.3. Vztah mezi telomerázovou aktivitou a délkom telomér.....	34
6.1.1.4. Prognostický význam.....	34
6.1.2. Telomerázová aktivita u sekundární AML z MDS.....	35
6.1.3. Telomerázová aktivita u AML.....	36
6.1.3.1. Dynamika telomerázové aktivity.....	36
6.1.3.2. Průběžné změny telomerázové aktivity.....	36
6.1.3.3. Vztah mezi telomerázovou aktivitou a délkom telomér.....	36
6.1.3.4. Prognostický význam.....	37
6.1.4. Telomerázová aktivita u ALL.....	37
6.2. EXPRESE STUDOVANÝCH GENŮ.....	39
6.2.1. Expresi genu <i>hTERT</i>.....	39
6.2.1.1. Expresi genu <i>hTERT</i> u pacientů s MDS.....	39
6.2.1.2. Expresi genu <i>hTERT</i> u pacientů se s MDS z AML.....	40
6.2.1.3. Expresi genu <i>hTERT</i> u pacientů s AML.....	40
6.2.2. Expresi genu <i>c-Myc</i>	42
6.2.2.1. Expresi genu <i>c-Myc</i> u pacientů s MDS	42
6.2.2.2. Expresi genu <i>c-Myc</i> u pacientů se s MDS z AML	42
6.2.2.3. Expresi genu <i>c-Myc</i> u pacientů s AML	42
6.2.3. Expresi genu <i>POT1</i>.....	44
6.2.3.1. Expresi genu <i>POT1</i> u pacientů s MDS	44
6.2.3.2. Expresi genu <i>POT1</i> u pacientů se s MDS z AML	44
6.2.3.3. Expresi genu <i>POT1</i> u pacientů s AML	45
6.2.4. Expresi genu <i>TEP1</i>.....	46
6.2.4.1. Expresi genu <i>TEP1</i> u pacientů s MDS	46
6.2.4.2. Expresi genu <i>TEP1</i> u pacientů se s MDS z AML	47
6.2.4.3. Expresi genu <i>TEP1</i> u pacientů s AML	47
6.2.5. Expresi genu <i>TRF1</i>.....	48
6.2.5.1. Expresi genu <i>TRF1</i> u pacientů s MDS	48
6.2.5.2. Expresi genu <i>TRF1</i> u pacientů se s MDS z AML	49
6.2.5.3. Expresi genu <i>TRF1</i> u pacientů s AML	49
6.2.6. Expresi genu <i>TNKS</i>.....	50
6.2.6.1. Expresi genu <i>TNKS</i> u pacientů s MDS	50
6.2.6.2. Expresi genu <i>TNKS</i> u pacientů se s MDS z AML	51
6.2.6.3. Expresi genu <i>TNKS</i> u pacientů s AML	51
7. DISKUSE.....	54
7.1. TELOMERÁZOVÁ AKTIVITA.....	54
7.1.1. Publikované výsledky a příčiny jejich nesouladu.....	54
7.1.2. Telomerázová aktivita u hematologických malignit.....	55
7.2. EXPRESE STUDOVANÝCH GENŮ.....	57
7.2.1. Expresi genů <i>hTERT</i> a <i>c-Myc</i>	57
7.2.2. Expresi genu <i>POT1</i>	58
7.2.3. Expresi genu <i>TEP1</i>	58
7.2.4. Expresi genu <i>TRF1</i>	59
7.2.5. Expresi genu <i>TNKS</i>	59
7.2.6. Expresi regulátorů telomerázové aktivity u hematologických malignit.....	60
8. ZÁVĚRY.....	61
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ODKAZŮ.....	64
10. PŘÍLOHA TABULEK.....	70
11. PREZENTACE A PUBLIKACE.....	83
12. PŘÍLOHA PUBLIKACÍ.....	88

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A ODBORNÝCH TERMÍNU

AL – akutní leukemie

ALL – akutní lymfoblastická leukemie

ALT – Alternative Lengthening of Telomeres

AML - akutní myeloidní leukémie

B2M – beta-2-mikroglobulin

cDNA – komplementární DNA

CMMoL - chronická myelomonocytární leukémie

DNA – deoxyribonukleová kyselina

Dg - diagnóza

dNTP - deoxynukleotidtrifosfáty

HSCT – Hematopoietic Stem Cell Transplantation

IPSS – International Prognostic Scoring System

MDS - myelodysplastický syndrom

M0- M7 - subtypy akutní myeloidní leukémie

KD – kostní dřeň

mRNA – mediátorová RNA

NC – negativní kontrola

PCR - polymerázová řetězová reakce

PK – periferní krev

RA - refrakterní anémie

RAEB - refrakterní anémie s excesem blastů

RAEB-t - refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci

RARS - refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty

RNA – ribonukleová kyselina

RT – reverzní transkripce

sAML – sekundární AML

TA – telomerázová aktivita

TRF – terminální repetiční fragment

anémie - snížení počtu erytrocytů a koncentrace hemoglobinu

(pan)cytopenie - snížení počtu krvinek ve všech buněčných řadách

hematopoéza - krvetvorba

leukopenie - snížení počtu leukocytů ($< 4 \times 10^9 / l$)

relaps - znovuvzplanutí nemoci

remise - klidové stadium nemoci

Poznámka:

Označení genů, na rozdíl od proteinů, které kódují, je zvýrazněno kurzívou.

1. ÚVOD

Myelodysplastický syndrom (MDS) představuje heterogenní skupinu onemocnění charakterizovanou neefektivní krvetvorbou. Vzhledem ke skutečnosti, že část pacientů s MDS přechází do akutní myelodní leukemie (AML), bývá též označován za preleukémii. V současné době představuje alogenní transplantace krvetvorných buněk pro pacienty s MDS jediný způsob vedoucí k vyléčení. Přesto je riziko transplantace poměrně vysoké a je třeba jednoznačně definovat pacienty, pro které představuje transplantace nižší riziko než samotný MDS. Individuální riziko pacientů, jejich přežití a pravděpodobnost transformace do AML, je stanovenou na základě počtu blastů v kostní dřeni, počtu cytopenií v periferní krvi a klonálních chromozomových abnormalit – tzv. IPSS skóre (International Prognostic Scoring System). Diagnostické a prognostické systémy se ale stále vyvíjejí, stejně jako se neustále zdokonalují technologie umožňující lepší detekci genetických a biologických abnormit vedoucích ke vzniku MDS. Objasnění a pochopení těchto patogenetických procesů může představovat nový, velmi důležitý prognostický přínos pro pacienty s MDS a může přispět ke vzniku nových úspěšných léčebných postupů.

Jedním z mechanismů přispívající k patogenezi onemocnění je i zvýšení aktivity ribonukleoproteinu telomerázy. Její změny v průběhu maligní transformace buněk se staly jedním z nejčastěji studovaných témat posledních let, díky zjištění že většina nádorových onemocnění, včetně hematologických malignit, vykazuje reaktivaci telomerázy nebo zvýšené hladiny její aktivity (Kim et al., 1994). Zvýšení aktivity telomerázy předchází postupné zkracování telomér až na kritickou délku, kdy už teloméry nejsou schopny plnit svoji biologickou funkci ochrany chromosomů. Za fyziologických podmínek vede tato eroze telomér k zániku buňky, ale obnovení funkce telomerázy umožní stabilizaci telomér, což může vést k expanzi patologického klonu s poškozením genomu.

Změněná dynamika telomerázové aktivity a vlastně celého teloméro-telomerázového komplexu, včetně exprese genů, které se podílejí na její regulaci, tak patří mezi významné mechanizmy procesu transformace buněk bez ohledu na typ malignity. Ačkoli se jednotlivé studie již zabývaly především expresí genů *hTERT* a *c-Myc*, u pacientů s MDS a AML nebyly dosud provedeny studie zabývající se komplexní charakteristikou teloméro-telomerázového komplexu, včetně expresních profilů genů *POT1*, *TEP1*, *TNKS* a *TRF1*, jejichž exprese nebyla u MDS zatím vůbec sledována.

Znalost variability délky telomér, telomerázové aktivity a expresních profilů genů, zapojených do souvisejících signalizačních drah, může kromě teoretického přínosu, určit nové prognostické faktory MDS a identifikovat pacienty v riziku. Stejně tak mohou být tyto faktory důležité pro prognózu primární akutní leukémie.

Na základě současných poznatků, kdy normální somatické buňky nevykazují telomerázovou aktivitu a vyjímkou jsou zárodečné buňky a buňky obnovujících se tkání (včetně krvetvorných, které exprimují nízké hladiny telomerázy), představuje telomeráza vhodný univerzální terapeutický cíl. Terapie zaměřená na snížení její aktivity by tak neměla příliš ovlivnit normální buňky, které se od nádorových liší nižší hladinou telomerázové aktivity, delšími telomérami a menší proliferační aktivitou.

Předkládaná disertační práce vznikla v rámci řešení grantových projektů IGA MZ ČR NC/5903-3 a NC/7606-3, které se zabývaly problematikou dynamiky komponent teloméro-telomerázového komplexu u MDS a akutní leukémie. Nedílnou součástí bylo studium délky telomér (TRF) v krvetvorných buňkách a míry jejich nadměrného zkracování jako iniciačního kroku narušení fyziologické rovnováhy jeho dalších komponent. I když vyšetření délky telomér nebylo přímo předmětem disertační práce, problematiku teloméro-telomerázového komplexu a jeho úlohu v leukemogeneze je nutné pojímat komplexně. Proto jsou, výsledky dosažené v rámci této studie jsou konfrontovány s výsledky TRF dosaženými v rámci uvedených grantových projektů, na jejichž řešení jsem se podílela.

2. CÍLE PRÁCE

- Stanovit aktivitu telomerázy u pacientů s myelodysplastickým syndromem a akutní leukémií při diagnóze a v průběhu onemocnění pomocí kvantitativní metody založené na schopnosti telomerázy syntetizovat *in vitro* telomérické repetice (TRAP - Telomeric Repetition Amplification Protocol)
- U pacientů zařazených do studie stanovit hladinu exprese genů, které se přímo či nepřímo podílejí na regulaci aktivity telomerázy, metodou reverzně transkriptázovou PCR v reálném čase. Kromě genů *hTERT* a *c-Myc* se jedná o první studii expresních profilů genů *POT1*, *TEP1*, *TNKS* a *TRF1* u MDS.
- Definovat vzájemné vztahy délky telomér, telomerázové aktivity a expresních profilů genů uvedených v bodě 2. u studovaných hematologických onemocnění, určit jejich význam z hlediska diagnózy, prognózy a léčby nemoci.

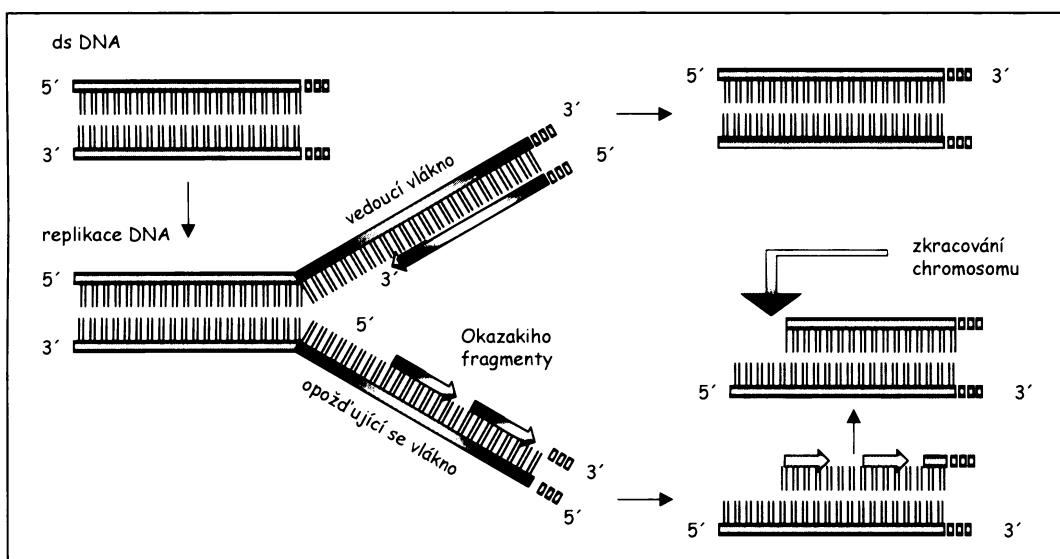
3. PROBLEMATIKA

3.1. TELOMÉRO-TELOMERÁZOVÝ KOMPLEX

3.1.1. Teloméry a telomeráza

Teloméry jsou specializované DNA-proteinové struktury, které představují konce lineárních chromosomů. U člověka jsou složené z krátkých tandemově uspořádaných repetitivních DNA sekvencí (TTAGGG)_n, které mohou tvořit 5-25 kbp.

Hlavní funkcí telomér je ochrana konců chromosomů před jejich vzájemnými fúzemi a formováním di- a multi centrických chromosomů. U těchto abnormálních chromosomů může během mitózy docházet ke zlomům, které poškodí genom a následně vedou k procesu senescence či iniciaci apoptózy. Vedle ochrany konců chromosomů působí teloméry proti ztrátě DNA sekvencí. Dělící se buňky ztrácí přibližně 25-200 bp během každého buněčného dělení, což je důsledkem neúplné replikace opožďujícího se vlákna během DNA syntézy – tzv. koncový replikační problém (Obr. 3.1.). Další možná ztráta se děje díky 5'-3' exonukleázové aktivitě polymerázy, která zkracuje telomerické CA bohaté vlákno.

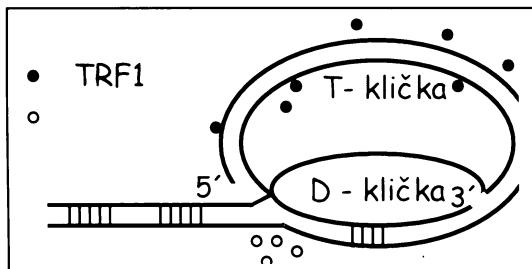


Obr. 3.1.: Neúplná replikace opožďujícího se vlákna

Za předpokladu, že buňka začíná dělení při délce telomér 5-10 kbp, čeká ji přibližně 50-200 dělení. Padesát buněčných dělení představuje potenciální výtěžek 10^{15} buněk, čili přibližně 1000 kg buněk. Aktuální proliferativní potenciál je ale zpravidla nižší v

závislosti na přesné délce telomérických repeticí potřebných pro správnou funkci telomér. Délka telomér se u jednotlivých chromosomů liší a proliferativní potenciál buňky je ovlivněn nejkratšími z nich. Replikativní kapacita somatických buněk tak představuje bariéru proti neomezené proliferaci, která je charakteristická pro nádorové buňky. Ty podobně jako zárodečné buňky exprimují telomerázu a jsou z tohoto pohledu nesmrtelné (Lansdorp et al., 1995). Signifikantně vyšším proliferativním potenciálem, oproti hematopoetickým buňkám dospělých, se díky delším telomérám vyznačují buňky pupečníkové krve, čímž se jeví jako vhodnější pro transplantační účely (Vaziri et al., 1994).

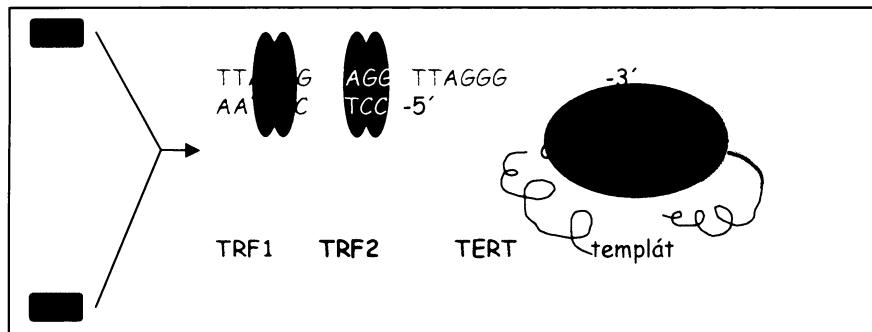
Konce chromozomů vytvářejí velké dvouvláknové smyčky - tzv. T-smyčky (T-loops) – lasovité struktury, které vzniknou zanořením přečnívajícího telomérového vlákna na 3' konci do dvouvláknové telomerické oblasti. Toto uspořádání zabezpečuje ochranu telomér před degradací a DNA opravnými systémy buňky (které by mohly strukturu rozpoznat jako dvouvláknový zlom) a zároveň může sloužit k alternativnímu způsobu jejich prodlužování (kapitola 3.6.). Struktura tvaru písmene D, která takto vznikne vytěsněním jednoho z vláken telomerické dsDNA, je označována jako D-smyčka (D-loop; Tomáška et Nosek 2001; Obr. 3.2.)



Obr. 3.2.: Struktura konců chromosomů (upraveno dle Tomáška et Nosek 2001)

U některých organismů jako např. kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* bylo prokázáno reversibilní umlčení exprese genů lokalizovaných v blízkosti telomér. Vliv telomér na expresi genů umístěných v oblasti telomérového chromatinu je označován jako telomérový poziční efekt (Telomere Position Effect, TPE). Extenzivní zkracování telomér může na druhé straně expresi aktivovat (Liu et al., 1999). Baur et al. (2001) popsal TPE i v lidských buňkách – ukázal, že reportérový gen lokalizovaný v blízkosti telomér byl exprimován přibližně 10x méně než kontrolní gen umístěný náhodně v genomu.

Telomeráza je velký ribonukleoproteinový enzym, který rozpoznává jednovláknové G-bohaté úseky jako primér a přidává telomérické repetice na jejich 3' konce používajíc vlastní RNA jako templát. Podílí se tak na udržování konců chromozomů *de novo* syntézou telomérických repetitive TTAGGG.

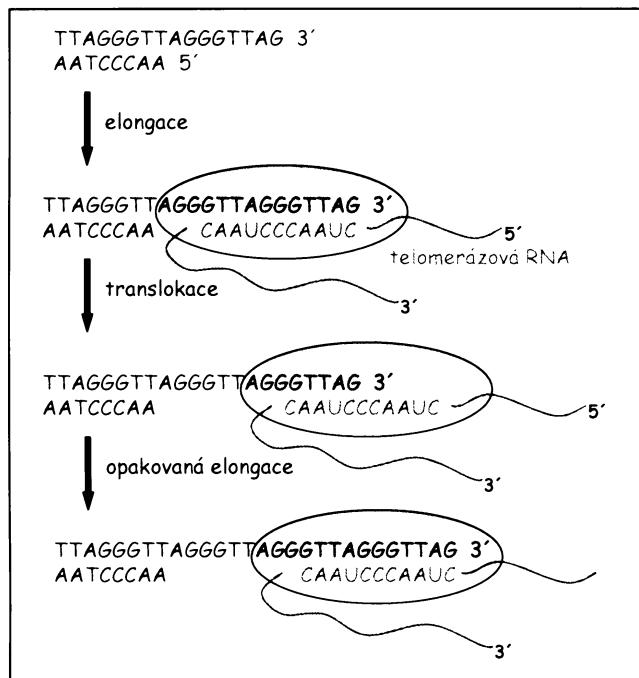


Obr. 3.3.: Konce chromosomů s telomerázou tvořenou RNA templátovou podjednotkou a proteiny TERT a TEP1 a telomérickými repetitive (TTAGGG)_n s navázanými proteiny TRF1 a TRF2 (Telomeric Repeat Fragment 1 a 2)

Jádro enzymu je tvořeno 445 nukleotidů dlouhou RNA podjednotku, kódovanou genem *hTR*, proteinovou podjednotkou s reverzně transkripční aktivitou kódovanou genem *hTERT* a proteinem TEP1 (Telomerase-associated Protein 1; Obr. 3.3.).

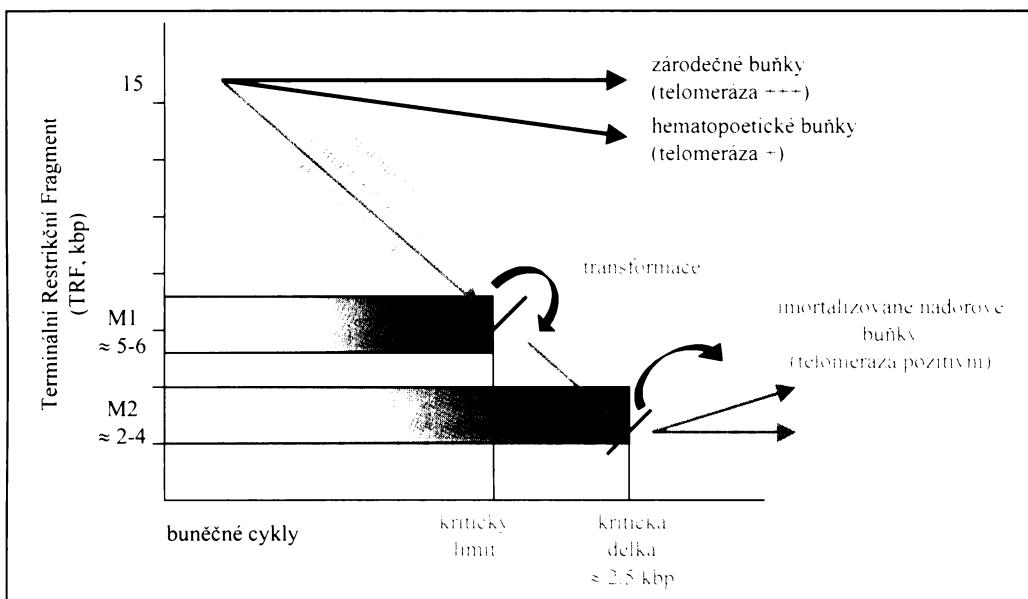
RNA komponenta, obsahující 11 nukleotidovou sekvenci komplementární k 1.5 telomérické repetitive (5'-CUAACCCUAAC-3'), slouží jako vnitřní templát pro syntézu telomérických repetitive. Buňky exprimující mutovanou telomerázovou RNA se vyznačují omezenou životaschopností, abnormálním buněčným cyklem a velkým počtem chromosomových fúzi. Exprese mutovaného templátu totiž mění vazebné místo pro teloméro-vazebné proteiny, které jsou důležité pro funkci telomér. Gen *hTR* je konstitutivně exprimován v lidských buňkách, zatímco exprese genu *hTERT* je charakteristická především pro kmenové a zárodečné buňky a je považována za hlavní limitující faktor určující aktivitu telomerázy (Mathieu et al., 2004). Protein telomerázové reverzní transkriptázy obsahuje 3 regiony: N-koncový region (N-terminus, amino terminus), centrální region a C-koncový region (C-terminus, carboxy terminus). N-konec proteinu je spíše bazický a obsahuje alespoň 4 domény, které jsou evolučně konzervované. Tato část je nezbytná pro aktivitu telomerázy díky vazbě RNA podjednotky. Centrální oblast proteinu obsahuje 7 evolučně konzervovaných motivů, které definují katalytickou část reverzní transkriptázy a jsou tak esenciální pro enzymatickou aktivitu telomerázy. C-koncová část je důležitá pro jaderný export

proteinu a pro uspořádání plně funkčního enzymu (Banik et al., 2002). Funkce enzymu je znázorněná na Obr. 3.4.



Obr. 3.4.: Funkce telomerázy: telomeráza přidává jednotlivé dNTP na 3'konec telomérického DNA vlákna podle vlastní RNA matrice; v dalším kroku dochází k translokaci telomerázy, čímž se posune o délku jedné telomérické repetitive a může dále prodlužovat DNA vlákno.

Exprese telomerázy hraje důležitou úlohu v buněčném stárnutí a normálně je potlačená v postnatálních somatických buňkách, čímž dochází k fyziologickému zkracování telomér (Obr. 3.5.). Její deregulace pak může být důležitým krokem v onkogenezi. Předpokládá se, že aktivace telomerázy je pozdní událostí v transformaci buněk, zatímco chromosomové změny jsou událostí časnou. Telomeráza je tak aktivovaná až po iniciaci genomové nestability a její funkce spočívá ve stabilizaci konců chromosomů (Obr. 3.6.). Telomerázový ribonukleoproteinový komplex je tedy exprimován v transformovaných buňkách a v buňkách obnovujících se tkání, kde působí ochranu konců chromosomů proti ztrátě genetického materiálu. Studie na myších modelech ale předpokládají, že se telomeráza účastní také opravy chromosomů, kdy se *de novo* syntéza telomérických repetic může objevit také v dvouvláknových zlomech (Goytisilo et al., 2002).



Obr. 3.5.: Teorie buněčného stárnutí a nesmrtelnosti

V normálních somatických buňkách je telomeráza neaktivní a tak dochází během buněčných dělení ke zkracování telomér. Hematopoetické buňky se vyznačují určitou aktivitou, ta ale není dostatečná k tomu, aby zcela zabránila zkracování telomér. Telomeráza je exprimovaná v zárodečných buňkách (kde je schopna udržet konstantní délku telomér) a v některých na proliferaci náročných typů, jako jsou např. aktivované lymfocyty.

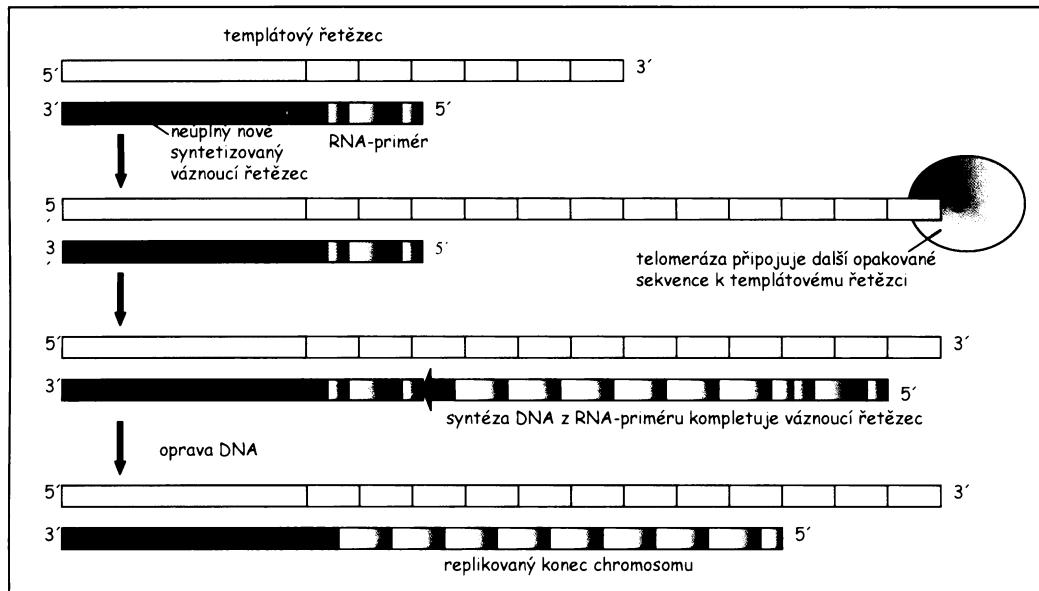
Podle teorie buněčného stárnutí a nesmrtelnosti existují dva mechanismy, které brání buňkám v neomezené proliferaci. První z nich, M1 mechanismus (Mortality Stage 1, Senescence), se aktivuje, když telomery dosáhnou určité délky – 5-6 kbp díky postupnému zkracování s každým buněčným dělením. M1 může být indukován i aktivací genů v subtelomerických oblastech nebo signálem poškození (zkrácení) DNA produkovaným jednou z 92 telomér. M1 působí spuštění procesu senescence buněk, přičemž se zastaví jejich další proliferace.

Senescenci lze ovšem obejít vyřazením jejich molekulárních mediátorů – tumor supresorových proteinů (např. pRB, p53). Pokud je jejich funkce zablokována, ať už mutací či vazbou virových onkoproteinů (jako např. AgT_{SV40}, E6/E7 proteiny papilomavirů), dochází k dalšímu buněčnému dělení a zkracování telomér až dosáhnou kritické délky (2-4 kbp), kdy už nejsou schopny plnit svoji biologickou funkci ochrany chromosomů. Dochází k indukci M2 (Mortality Stage 2, Crisis) mechanismu a zastavení buněčného dělení doprovázeného vlnou buněčné smrti. Nezbytnou podmínkou další proliferace a stabilizace telomér je nejčastěji reaktivace telomerázy, která může vést k imortalizaci a časově neomezené proliferaci.

Buňka ve stadiu senescence může v kultuře přetrávat i několik let – zůstává metabolicky aktivní, ale nemůže syntetizovat DNA

Ze schématu vyplývá, že nádory mají kratší telomery a rychlejší proliferaci a měly by tak být k inhibici citlivější než normální buňky, které jsou telomerázově negativní (viz také kap. 3.8.)

(upraveno dle: Hatina et Reischig, 2001; Shay et al., 1996; Bryan et al., 1999, Engelhardt et al., 1997)



Obr. 3.6.: Telomeráza kompenzuje ztrátu genetického materiálu v důsledku neúplné replikace opožďujícího se vlákna (dle Alberts et al. 2003)

Za jeden z mechanismů deregulace telomerázové aktivity je považována i existence alternativního sestřihu, kódující různé izoformy telomerázové reverzní transkriptázy, (Bechter et al., 1999; Liu et al., 1999). Funkce telomerázy může být také ovlivněna fosforylací telomerázových proteinových složek. Li et al. (1999) ve svých studiích ukazuje, že aktivace telomerázy vyžaduje fosforylace TERT a TEP1 proteinů, které se v buňkách nádorů prsu chovají jako fosfoproteiny. Telomeráza tak může existovat ve dvou konfiguracích s TERT a TEP1 fosforylovanými nebo defosforylovanými. Fosforylace je asociována s vyšší aktivitou telomerázy a podílí se na ní např. fosfatáza 2A a protein kináza Ca.

Podobně jako aktivace telomerázy je inaktivace proteinu p53 často asociována s lidskými nádory a je zapojená do imortalizace nádorových buněk. P53 může interagovat přímo s jádrem telomerázy a působit její inhibici, vedoucí k buněčné smrti (Liu et al. 1999). Na druhou stranu vede inaktivace p53 k up-regulaci telomerázové aktivity.

3.1.1.1. Telomerázová aktivita v normálních hematopoetických buňkách

Normální somatické buňky nevykazují telomerázovou aktivitu (TA), výjimku tvoří buňky obnovujících se tkání, včetně hematopoetických buněk, kde se setkáváme s nízkými hladinami exprese telomerázy. Iwama et al. (1998) zjišťoval aktivitu telomerázy a délku telomér mononukleárních buněk periferní krve skupiny zdravých jedinců. Společně s narůstajícím věkem jedince poukázal na pokles telomerázové aktivity a u zhruba 35% jedinců starších 40-ti let telomerázovou aktivitu nedetekoval vůbec. Celkově hladina telomerázové aktivity poklesla přibližně o dva řády během 90-ti let. Podobně, je stárnutí jedince doprovázeno i zkracováním telomér, v průměru detekoval ztrátu 84 bp za rok u věkové skupiny 4-39 let, zatímco u osob starších 40-ti let se jednalo o 41 bp ročně (TRF mladších 10-ti let = 13,2 kbp; TRF starších 80-ti let = 8,16 kbp).

Vzhledem k výše uvedeným rozdílnostem hladiny telomerázové aktivity u skupin různých věkových kategorií, je vhodné při jejím studiu porovnávat výsledky pacientů s věkově odpovídajícími zdravými jedinci.

3.1.2. Geny účastnící se regulace teloméro-telomerázového komplexu

3.1.2.1. *hTERT gen* (human Telomerase Reverse Transcriptase; gene ID 7015;

5p15.33)

Gen *hTERT* kóduje katalytickou subjednotku telomerázy (polypeptid skládající se z 1132 aminokyselinových zbytků, ~ p120), která spolu s RNA subjednotkou (kódovaná genem *hTR*) tvoří jádro telomerázy. Vyznačuje se reverzně-transkripční aktivitou a je považována za hlavní limitující regulační faktor telomerázové aktivity. (Cerni, 2000; NCBI). Na regulaci exprese *hTERT* se podílí celá řada proto-onkogenů a tumor supresorových genů, např. *Bcl-2*, *p21*, *p53*, *PKC*, *Akt/PKB* či proteinová fosfatáza 2A (Liu, 1999). Více v kap. 3.1.1.

3.1.2.2. *c-Myc gen* (gene ID 4609; 8q24.12-13)

Protoonkogen *c-Myc* kóduje transkripční faktor c-Myc zapojený do regulace buněčného cyklu, apoptózy a buněčné transformace. Mutace, deregulace exprese, přestavby a translokace tohoto genu jsou asociovány s různými maligními hematologickými onemocněními (Cerni, 2000; NCBI).

Objasnění funkce genu *c-Myc* v regulaci telomerázové aktivity přinesl Wu et al. (1999), který poukázal na existenci několika c-Myc vazebných míst v promotorové oblasti *hTERT* genu. C-Myc se tak přímo podílí na indukci aktivity telomerázy. Dokládá to i studie na leukemických buňkách publikovaná Liu et al. (1999), ve které antisence pentadekadeoxynukleotidy cílené proti *c-Myc* mRNA vedly k inhibici telomerázové aktivity.

3.1.2.3. POT1 gen (Protection Of Telomeres 1; gene ID 25913; 7q31.33)

Protein kódovaný *POT1* genem se váže ke G-bohatým ssDNA vláknům – k telomerickým repeticím, což souvisí s jeho přímou úlohou v ochraně konců chromosomů (NCBI, Baumann et al., 2001). Jeho role v regulaci teloméro-telomerázového komplexu není zcela prostudovaná, ale pravděpodobně se děje buď přímo vazbou k jednovláknovým molekulám DNA, nebo působí nepřímo vazbou na TRF1 protein (kap. 3.1.2.4.; Loayaza et al., 2003). Colgin et al. (2003) sice označil *POT1* za pozitivní regulátor délky telomér, jeho funkce však může záviset na umístění jeho vazby vzhledem k 3' konci DNA: může vytvářet substrát pro telomerázu nebo inhibovat její aktivitu, znemožněním vazby na teloméry (Lei et al., 2005). Zaug et al. (2005) popsal další možný způsob účasti *POT1* na regulaci délky telomér: rozrušením G-kvadruplexních struktur telomerické DNA (G-kvartety, čtyřretězcová DNA) umožní telomeráze přístup k telomerickým repeticím a jejich prodlužování.

Kromě vazby k TRF1 se *POT1* může přímo vázat také k tankyráze (kap. 3.1.2.6.; NCBI). Vazbou na DNA v D smyčce spolupracuje s TRF2 (Telomeric Repeat Binding Factor 2) na udržování T smyčky.

3.1.2.4. TEP1 gen (Telomerase-associated Protein 1; gene ID 7011; 14q11.2)

Funkce produktu tohoto genu v regulaci teloméro-telomerázového komplexu není zatím přesně definovaná. Protein *TEP1* je označován za součást ribonukleoproteinového komplexu zodpovědného za aktivitu telomerázy a váže se přímo k *hTERT* (NCBI). Předpokládá se však, že má ještě jinou buněčnou funkci, neboť se ukázalo, že je exprimován v různých tkáních včetně těch, které nevykazují telomerázovou aktivitu. *TEP1* je také např. součástí velkého cytoplazmatického ribonukleoproteinového (RNP) komplexu označovaného jako „Vault particle“ (Kickhoefer et al. 1999). Podobně i Liu et al. (2000), který ukázal na myších modelech, že *TEP1* není důležitý pro katalytickou

aktivitu telomerázového komplexu a není ani potřebný pro udržování délky telomér, předpokládá spíše obecnější úlohu TEP1 v uspořádání a funkci RNP komplexů.

3.1.2.5. TRF1 gen (Telomeric Repeat Binding Factor 1; gene ID 7013; 8q13)

Protein kódovaný tímto genem se váže k dvouvláknové telomérové DNA a je označován za negativní regulátor délky telomér. Overexprese *TRF1* genu v buněčných liniích exprimujících telomerázu vede k progresivnímu zkracování telomér, zatímco jeho inhibice působí prodlužování telomér. TRF1 nepůsobí přímo na expresi telomerázy, ale zdá se, že inhibuje telomerázu na chromosomových koncích díky zpětnovazebným interakcím (Smogorzewska et al. 2000).

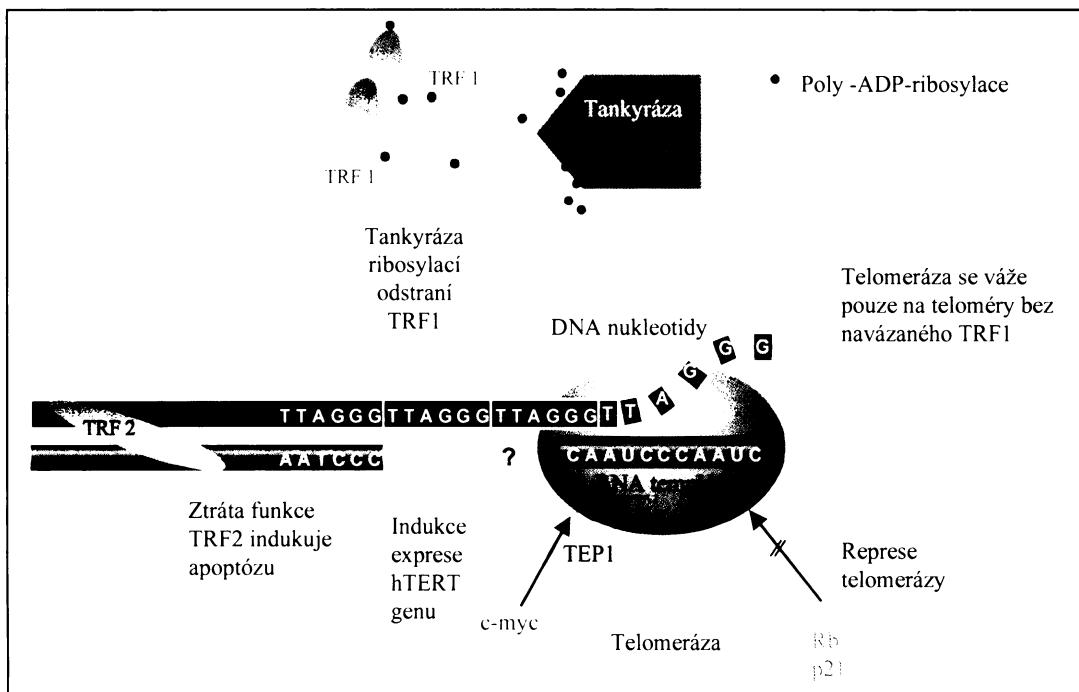
Podle tzv. „protein – counting“ modelu mohou teloméry existovat ve dvou stavech: „open“ stav, který umožní telomeráze přístup k telomérickým repeticím a jejich prodlužování; „close“ stav, kdy enzym nemá k telomérickým repeticím přístup. Dynamika mezi těmito stavami je regulována TRF1 a TRF2 proteiny, které tím negativně ovlivňují délku telomér. Předpokládá se, že množství TRF1 proteinu navázaného na telomérické repetice je úměrné délce telomér: dlouhé teloméry váží více telomerázového inhibitoru TRF1 než krátké a působí tak silnou negativní zpětnou vazbou na telomerázu (van Steensel a de Lange 1997).

Protein se přímo váže k tankyráze (kap. 3.1.2.6.) a protein-proteinovými interakcemi k POT1 a TRF2 (NCBI). Vazba s POT1 proteinem je pravděpodobně zprostředkovává komunikaci mezi jednovláknovým a dvouvláknovým úsekem telomér. Funkce TRF1 je kromě tankyrázy (TNKS) regulována i dalšími proteiny, např. TNKS2 a TIN2 proteiny (Blasco 2004).

3.1.2.6. TNKS gen (Tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase; gene ID 8658; 8p23.1)

Gen *TNKS* kóduje ribosyltransferázu, která ve své sekvenci obsahuje 10 ankyrinových repeticí – homologní sekvenci s ankyriny (rodina multifunkčních membránových proteinů; odtud odvozen název tankyráza). V regulaci teloméro-telomerázového komplexu působí ADP ribosylací TRF1 snížení jeho schopnosti vázat se na telomerickou DNA *in vitro* (Smith et al., 1998). Ribosylace vede k disociaci jak TRF1 tak tankyrázy z telomér (*in vivo*, Liu et al., 1999). Tankyráza je považována za pozitivní regulátor délky telomér *in vivo*, její overexprese vede k prodlužování telomér (Kaminker et al., 2001). Tím, že inhibuje funkci TRF1 proteinu otevře telomérový

komplex a umožní přístup telomerázy k telomérickým repetitivem, čímž může indukovat prodlužování telomér v lidských buňkách (Obr. 3.7.; Smith et al., 2000).



Obr. 3.7.: Regulace teloméro-telomerázového komplexu

Transkripční faktor c-Myc indukuje aktivitu telomerázy, která podle RNA matice přidává jednotlivé dNTP na konce telomérické DNA. Telomeráza se však váže pouze na teloméry bez navázaného TRF1 proteinu. Ten je z telomérické DNA odstraněn díky ribosylaci tankyrázou, která tak pozitivně reguluje telomerázovou aktivitu. TRF2 protein je považován za negativní regulátor a je důležitý pro tvorbu T smyčky (jeho ztráta či inhibice vede k fúzím chromosomů). Overexpress tumor supresorového proteinu pRB je asociována s inhibicí telomerázy a buněčným stárnutím a podobně i overexpress inhibitoru cyklin dependentních kináz p21 potlačuje aktivitu telomerázy. (upraveno dle Burger et al., 1999)

3.2. STUDOVANÁ HEMATOLOGICKÁ ONEMOCNĚNÍ

3.2.1. Myelodysplasticický syndrom

3.2.1.1. Charakteristika onemocnění

Myelodysplasticický syndrom (MDS) představuje heterogenní skupinu onemocnění charakterizovanou inefektivní hematopopézou, jejíž přičinou je porucha vyzrávání mladých prekurzorů buněk hematopoezy, zatímco jejich proliferační schopnost zůstává zachována. Tak vzniká dřeň, která je často hypercelulární, ale nevyzrávající. Nemocné s MDS tedy můžeme charakterizovat refrakterní cytopenii s poruchou buněčných funkcí a

chybným vyzráváním, které postihuje jednu, dvě, ale obvykle i všechny tři hematopoetické (erytropoetická, granulocytová, megakaryocytová) řady. V kostní dřeni nemocných s MDS, která je obvykle bohatá na buňky, ale i v periferní krvi, se nachází četné morfologické, cytogenetické a molekulárně genetické abnormality. Porucha kmenové buňky u myelodysplastického syndromu v sobě nese riziko přechodu v akutní leukémii (bud' postupným se zvyšováním podílu nezralých blastických buněk a snižováním počtu vyzrávajících buněk nebo náhlým vzestupem počtu blastů u dříve stabilizovaného MDS (Friedman, 2001; Adam et al., 2001; Hofmann et al., 2004; Delforge, 2003). Transformace v akutní leukémii proběhne zhruba u 35 % pacientů (Greenberg et al., 1997).

Onemocnění je vzácné u jedinců mladších 40 let, kde se můžeme spíše setkat s tzv. sekundárním MDS, který vzniká nejčastěji jako následek chemoterapie či radioterapie a vyznačuje se horší prognózou, častou leukemizací procesu a obecně horší odpověďí na léčbu.

Doba přežití pacientů se může pohybovat od několika týdnů třeba i do 10 let od doby stanovení diagnózy (Mufti, 2005). V současné době je jediným kurativním postupem při léčbě MDS alogenní transplantace krvetvorných buněk (Čermák, 2002).

Incidence MDS je 1-2/100 000 obyvatel, s věkem se výskyt zvyšuje, ve věku nad 70 let je incidence 20-40/100 000 obyvatel (Adam et al., 2001).

3.2.1.2. Klasifikace MDS

Myelodysplastický syndrom zahrnuje na základě kvantitativních (počet blastů v kostní dřeni a periferní krvi) a kvalitativních (morfologické odchyly krevních elementů) kritérií *Francouzsko - Americko - Britské klasifikace (FAB klasifikace)* vytvořená French-American-British Cooperative Group, Bennet et al. 1982) tyto klinické jednotky:

1. Refrakterní anémie s periferní pancytopenií - RA
2. Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (sideroblastickou anémii) - RARS
3. Refrakterní anémie s přebytkem (excesem) blastů - RAEB
4. Refrakterní anémie s přebytkem blastů v "transformaci" - RAEB-t
5. Chronická myelomonocytární leukémie - CMMoL

Stručná charakteristika jednotlivých FAB subtypů MDS je uvedena v tab. 3.1.

FAB subtyp	Počet blastů v kostní dřeni	Počet prstenčitých sideroblastů	Nález blastů v diferenciálním obraze periferní krve
RA	< 5 %	< 15 %	< 1 %
RARS	< 5 %	≥ 15 %	< 1 %
RAEB	5 – 20 %	různé	< 5 %
RAEB-t	21 – 30 %	různé	5 – 20 %
CMMoL	> 20 % a zvýšený počet monocytárních buněk	různé	Počet monocytárních buněčných forem v dif. > $1.10^9/l$

Tab. 3.1.: Charakteristika jednotlivých FAB subtypů MDS (dle Mayer et al., 2002)

V současnosti se kromě FAB klasifikace začíná používat i *klasifikace WHO (The World Health Classification, Harris et al., 1999)*. Na rozdíl od stále platné FAB klasifikace více podtrhuje význam ostatních diagnostických metod v průkazu maligních onemocnění a odráží zkušenosti klinických hematologů a onkologů vyčleněním jednotlivých nozologických jednotek již s konkrétním prognostickým dopadem. Ze subtypů RA/RARS se takto vyčleňují 5q- syndrom charakterizovaný delecí krátkého ramena chromosomu 5 a refrakterní cytopenie s dysplásií ve více řadách (RCMD), která se zdá být závažnějším stavem s horší prognózou než je RA. Dalším rozdílem mezi klasifikacemi je vynechání jednotky MDS RAEB-t, která podle WHO kritérií spadá již do diagnózy AML. CMML je podle charakteru onemocnění řazena k nově vytvořené podskupině myelodysplasticko-myeloproliferativní syndrom.

3.2.1.3. Prognóza onemocnění

Zejména v souvislosti s rizikem konverze MDS do akutní leukémie existuje snaha rozpoznat pacienty v riziku progrese onemocnění směrem k pokročilým formám a akutní myeloidní leukémii. Z prognostických systémů, které se stále vyvíjejí v závislosti na zkušenostech a nových technologiích, se v současné době nejvíce používá *Mezinárodní prognostický skórovací systém (International Prognostic Scoring System, IPSS)*, který kromě klinických údajů přihlíží i k cytogenetické charakteristice pacienta. IPSS tedy rozděluje pacienty s MDS do skupin na základě počtu blastů v kostní dřeni, počtu cytopenií v periferní krvi a klonálních chromosomových abnormalit. Rizikové faktory jsou odstupňované a výsledné skóre poukazuje na přežití pacientů a riziko transformace do AML (Tab. 3.2.; Greenberg et al., 1997).

Mezinárodní prognostický skórovací systém					
	Hodnota skóre				
Prognostický faktor	0	0.5	1	1.5	2
Počet blasty v KD (%)	< 5	5-10	-	11-20	21-30
Karyotyp	dobrý	interm.	špatný		
Počet linií s cytopenií	0/1	2/3			
Riziko		Karyotyp:			
nízké:	0	dobrý:	normální		
interm.-1:	0.5 - 1.0		-Y		
interm.-2:	1.5 - 2.0		del (5q)		
vysoké:	≥ 2.5		del (20q)		
		špatný:	komplexní karyotyp (≥ 3 abn)		
			abn. 7.chr.		
		interm.:	jiné změny		

Tab. 3.2.: Charakteristika Mezinárodního prognostického skórovacího systému pro nemocné s myelodysplastickým syndromem (interm., intermediální; abn., abnormalita; dle Greenberg et al., 1997)

3.2.2. Akutní myeloidní leukémie (AML)

Akutní myeloidní leukémie je onemocnění, které vzniká maligní transformací kmenové hematopoetické buňky. Ta se může diferencovat v myeloidní nebo myelomonocytární blasty, méně často blasty erytroidní či megakaryocytární, a proto nacházíme četné morfologické varianty, dle FAB klasifikace M1 - M7 (M0 - leukémie myeloblastická bez vyzrávání; M1 - leukémie myeloblastická s minimálním vyzráváním; M2 - leukémie myeloblastická s prokazatelným vyzráváním; M3 - akutní promyelocytová leukémie; M4 - akutní myelomonocytová leukémie; M5 - monocytová leukémie; M6 - erytroleukémie; M7 - megakaryoblastová leukémie).

Nejednou vzniká, jak již bylo uvedeno, na podkladě myelodysplastického syndromu (sekundární AML; sAML z MDS), ale i po útlumu kostní dřeně nebo po terapii zářením, eventuelně po chemoterapii.

Pro diagnózu je důležitý nález podílu blastů v periferní krvi a kostní dřeni: v periferní krvi nacházíme často 20 - 90% blastů, zatímco ve dřeni od několika procent do úplné infiltrace dřeně.

Akutní myeloidní leukémie (incidence 2-3/100 000) se sice může objevit i u novorozenců, ale maximum výskytu je v dospělosti - od středního věku až do vysokého

stáří, kde představuje asi 80% všech akutních leukémií (s incidencí 15-17/100000 obyvatel). Všechny dosavadní terapeutické metody pro AML se zakládají na vymýcení všech patologických buněk. Této koncepci nejlépe odpovídá alogenní transplantace krvetvorných buněk (HSCT), která představuje dosud nejúspěšnější způsob léčení akutních leukémií u pacientů mladších 40-ti let (Friedmann, 1994; Adam et al., 2001).

3.2.3. Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)

Akutní lymfoblastická leukémie je onemocnění, které vzniká maligní transformací kmenové hematopoetické buňky, která diferencuje v lymfoblasty, na jejichž úrovni je diferenciace zastavena. Více jak 25% buněk kostní dřeně představují blasty. Ačkoli se jedná o onemocnění kostní dřeně, dochází k infiltraci blastů i do dalších orgánů (např. do jater, sleziny, lymfatických uzlin). U pacientů se často vyskytuje cytogenetické aberace, některé z nich mají i prognostický význam (např. translokace t(9;22) a t(4;11)). Pro stanovení diagnózy a typu ALL je důležitá imunofenotypizace blastů, která na základě membránových a cytoplazmatických antigenů maligních buněk umožní rozlišení mezi T a B buněčnou linií a dále rozdělí leukemické blasty podle míry jejich vyzrávání (B-ALL: Pro B, common, Pre B, zralá; T-ALL: Pro T, Pre T, kortikální, zralá). FAB klasifikace rozlišuje tři podtypy ALL dle morfologie blastů (L1, L2 a L3). ALL představuje především onemocnění dětského věku – první kulminace výskytu je ve věku kolem 4 let (5,3/100000), poté přibývají případy nad 50 let věku a u osob starších 80-ti let je incidence 2,3/100000 obyvatel (Friedmann, 1994; Adam et al., 2001).

3.3. TELOMERÁZOVÁ AKTIVITA U HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT

Většina autorů používá k detekci telomerázové aktivity různé modifikace TRAP protokolu (Telomeric Repeat Amplification Protocol; Kim et al., 1997), který je považován za vysoce citlivou metodu umožující kvantitativní stanovení aktivity enzymu. Avšak s ohledem na používání ne zcela jednotné metodiky a nejednou i odlišného stanovení hranice označující telomerázovou pozitivitu či negativitu vzorku, může docházet k odlišnostem ve výsledcích, které nejsou zcela srovnatelné.

Výsledky výzkumu telomerázové aktivity (TA) a délky telomér u hematologických malignit shrnuje ve své práci Ohyashiki et al. (2002). Celkově konstatuje, že u MDS se setkáváme spíše s normálními či zvýšenými hladinami aktivity telomerázy v krvetvorných buňkách, zatímco u akutní leukémie má zhruba třetina pacientů zvýšené a polovina pacientů vysoké hladiny aktivity enzymu. Obecně lze shrnout, že mírně zvýšené hladiny telomerázové aktivity u MDS narůstají směrem k akutní leukémii, stejně tak jako roste podíl pacientů, u kterých je hladina aktivity telomerázy označena jako pozitivní. Aktivita enzymu telomerázy zjištěná u pacientů je většinou porovnávána s aktivitou zdravých jedinců.

Rozsáhlejší studii aktivity telomerázy u pacientů s MDS prezentoval Gurkan et al. (2005). Zvýšená hladina telomerázové aktivity detekovaná u pacientů nebyla sice signifikantně odlišná od aktivity zjištěné u zdravých kontrol, ale poukázal na to, že pacienti s negativními hladinami TA mají signifikantně delší přežití než ti s pozitivními hladinami aktivity telomerázy. Ani vyšší hladina TA zjištěná u pacientů s AML se výrazně nelišila od aktivity detekované u pacientů s MDS, přesto označil TA jako možný markér progrese onemocnění.

Více prací se zabývalo studiem aktivity telomerázy u AML. Counter et al. (1995) uvádí 86% pozitivních pacientů s TA v průměru 5x vyšší než v normální kostní dřeni. Xu et al. (1998) zjistil nárůst TA v porovnání se zdravými dospělými u 77% pacientů při diagnóze onemocnění a další signifikantní nárůst aktivity v progresi a relapsu onemocnění. Seol et al. (1998) publikoval studii 27 pacientů s AML, kteří byli všichni pozitivní na TA, nepředpokládal však, že kompletní remise bude častější u pacientů, kteří vykazovali vyšší hladiny TA při diagnóze. Zvýšenou aktivitu telomerázy detekovala i Engelhardt et al. (1998) u všech 15 dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií zahrnutých do studie. Zjištěná hladina TA při diagnóze onemocnění byla približně 10-20krát vyšší než u zdravých dárců a vykazovala pokles v

průběhu indukční terapie až ke hranici detekovatelnosti. Analýza telomerázové aktivity 78 pacientů s AML publikovaná Ohyashiki JH et al. (1997) prokázala zvýšenou hladinu TA u přibližně 80% pacientů s AML a 70% pacientů s ALL. Většina pacientů v kompletní remisi vykazovala normální TA, kromě dvou pacientů s mírně zvýšenou hladinou, u kterých došlo v krátké době k relapsu onemocnění. Na druhou stranu nebyla TA zjištěna u 9 pacientů s akutní leukémií uvedených Nilssonem et al. (1994), jehož metoda však nebyla založená na polymerázové řetězové reakci (PCR), která je součástí TRAP protokolu, což se zdá hrájet zásadní roli při detekci aktivity telomerázy.

3.4. DÉLKA TELOMÉR U HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT

Zkrácené teloméry stejně jako zvýšená telomerázová aktivita se objevují již u podílu pacientů s MDS a charakterizují většinu pacientů s AML. U pacientů s MDS jsou erodované teloméry asociované s vyšším výskytem chromosomových aberací včetně komplexních přestaveb karyotypu a horší prognózou. Stanovení délky telomér tak bývá považováno za lepší prognostický faktor než telomerázová aktivita (Ohyashiki et al., 2002). Podobně i naše výsledky dokládají zkrácené teloméry u více než poloviny pacientů s časnými formami MDS (RA, RARS), ve srovnání s délkou telomér (TRF) věkově odpovídajících dárců kostní dřeně. Proces eroze telomér představuje v patologii MDS důležitý krok vedoucí ke vzniku patologického klonu spojeného s nestabilitou genomu, horší prognózou nemoci s častějším přechodem do leukémie, prokázanou negativní korelací mezi TRF a IPSS skórem rizika. Pacienti s erodovanými telomérami mají navíc kratší medián přežití a odhad 3-letého přežití ve srovnání se skupinou pacientů s normální délkou telomér v kostní dřeni (Sieglová et al., 2004).

3.5. EXPRESE STUDOVANÝCH GENŮ U HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT

Exprese genů, kódujících regulátory telomerázy, již tak intenzivně jako telomerázová aktivita studovány nebyly. V dosud publikovaných pracech se zpravidla u hematologických malignit setkáváme se zvýšenou hladinou exprese genu *hTERT*. Bock et al. (2004) studoval expresi *hTERT* genu u pacientů s myelodysplastickým syndromem a myeloproliferativním onemocněním a signifikantně zvýšenou expresi zjistil u pacientů s refrakterní anémií (RA, MDS) a chronickou myeloidní leukémií, ve

srovnání s ostatními studovanými onemocněními. Nárůst exprese *hTERT* genu byl také detekován u pacientů s akutní leukémií, kde byla obdržena i její signifikantní pozitivní korelace s telomerázovou aktivitou Meng et al. (2003) a Cheng et al. (2003). Podobné výsledky získal i Xu et al. (1998), který navíc nepotvrdil vztah *hTERT* exprese s expresí genů *hTR* či *TEP1*.

Vzájemné vztahy *c-Myc* genu a dalších účastníků regulace teloméro-telomerázového komplexu u hematologických malignit nejsou zatím dostatečně definované. Cheng et al. (2003) nalezl korelací mezi telomerázovou aktivitou, expresí *hTERT* a *c-Myc* genů u akutní leukémie, čímž potvrzuje účast *c-Myc* na regulaci teloméro-telomerázového komplexu a v leukemogenezi. Podobně i u jiných nádorových onemocnění se setkáváme se zvýšenými hladinami exprese *c-Myc*, které odráží expresi *hTERT* genu a případně i telomerázovou aktivitu (Geng et al., 2003; Wisman et al., 2003).

V dosud publikovaných pracech, týkajících se exprese genu *POT1* u nádorových onemocnění, se *POT1* jeví spíše jako pozitivní regulátor telomerázové aktivity a délky telomér. Jeho zvýšená exprese byla detekována u nádorů žaludku, kde byla navíc její hladina asociována s progresí onemocnění (Kondo et al., 2004).

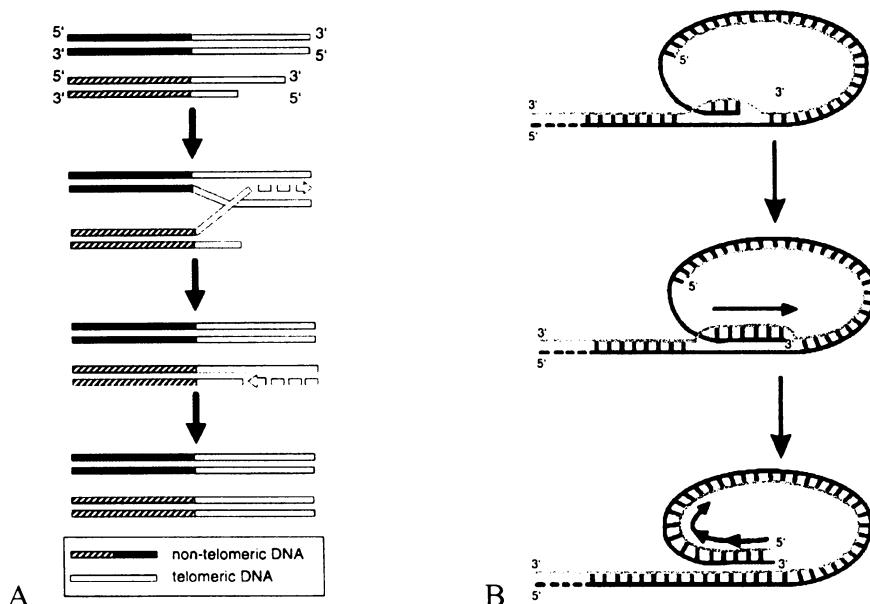
Podobně jako u exprese genu *POT1*, nebyly zatím publikované studie, které by se zabývaly expresí genu *TEP1* u MDS. Xu et al. (1998) nezaznamenal významnější rozdíly v *TEP1* exprese u pacientů s AML a normálních kontrol. A Li et al. (2004) detekoval pozitivní exprese *TEP1* u všech analyzovaných vzorků pacientů s AML. Podobně i u hematopoetických buněk byla detekována exprese genu *TEP1*, ale nelišila se, na rozdíl od *hTERT* exprese, mezi jednotlivými typy (monocyty, CD34+ buňky, polymorfonukleární buňky) a nezměnila se ani během myeloidní diferenciace (Uchida et al., 1999).

U MDS nebyla zatím exprese *TRF1* genu studována, u AML se setkáváme spíše se sníženými hladinami exprese genu *TRF1* ve srovnání se zdravými jedinci (Shi et al., 2006; Sun et al., 2004b).

Expresu genu *TNKS* u MDS a AML nebyla studována. Sun et al. (2004a) sledoval expresi *TNKS* v myeloidních leukemických liniích, a přičemž zjistil signifikantní zvýšení oproti exprese kostní dřeně zdravých jedinců a pozitivní korelací exprese *TNKS* a *hTERT* genu.

3.6. ALTERNATIVNÍ PRODLUŽOVÁNÍ TELOMÉR

Některé immortalizované buněčné linie a nádory jsou schopny si zajistit stávající délku telomér či jejich prodlužování mechanismem, který je nezávislý na aktivitě telomerázy. Podobně, pokud je známo, že většina lidských nádorů vykazuje pozitivní hladiny telomerázové aktivity, je pravděpodobné, že část z nich uplatňuje schopnost zajistit si prodlužování telomér bez působení telomerázy. Tyto mechanismy označované jako ALT (Alternative Lengthening of Telomeres), jsou založeny na výměně sekvencí DNA – rekombinaci (Obr. 3.8.; Henson et al., 2002; Scheel et al., 2000; Tomáška et Nosek, 2001)



Obr. 3.8.: Možné mechanismy alternativního prodlužování telomér. A – intertelomérická homologní rekombinace; B – intratelomérická rekombinace, kdy struktura T-smyčky poskytne templát pro 3' konec uvnitř D-smyčky (Scheel et al., 2002)

3.7. METYLACE PROMOTOROVÉ OBLASTI GENU *hTERT*

Pokud se zabýváme problémem regulace telomerázové aktivity je třeba zmínit také změny v hladině methylace CpG ostrovů promotorové oblasti genu *hTERT*. V souladu s teorií epigenetického utlumování transkripce genů souhrou methylace DNA a deacetylace histonů lze předpokládat, že hypermethylace promotoru *hTERT* genu bude utlumovat expresi a tedy negativně regulovat TA, ale zatím bylo publikováno jen málo

studii, které se tímto tématem u MDS a akutní leukémie zabývají. Guillert et al. (2002) překvapivě prokázal pozitivní korelaci mezi hypermetylací promotoru *hTERT* genu, jeho expresí a telomerázovou aktivitou u lidských nádorových buněčných linií a nádorů a normálních tkání různých organizmů a předpokládá tak možnost uplatnění změn hladiny metylace v regulaci exprese genu *hTERT*. Dessain et al. (2000) však žádný vztah mezi telomerázovou aktivitou a stupněm metylace při studiu kultivovaných neimortalizovaných buněk nenalezl. U chronické lymfatické leukemie z B buněk byla potvrzena nízká hladina metylace jako předpoklad pro vysokou TA a opačně (Bechter et al., 2000), což je v souladu s výše uvedenou teorií.

Dosavadní rozpory v jednotlivých závěrech mohou být dány jednak typem studované tkáně či buněk, použitou metodou i studovanou oblastí promotoru genu *hTERT*.

3.8. ANTI-TELOMERÁZOVÁ TERAPIE

Reaktivace či zvýšená aktivita telomerázy detekovaná u většiny nádorů staví tento enzym do role potencionálního cíle protinádorových terapeutik. Vzhledem k tomu, že normální somatické buňky nemají telomerázu aktivní nebo má pouze nízké hladiny aktivity, spočívala by výhoda anti-telomerázové terapie především v její nízké toxicitě a vedlejších účincích (Neidle et Parkinson, 2002). Anti-telomerázová terapie je založena na předpokladu, že inhibice telomerázy může omezit růst nádoru rychlým zkracováním telomér, vedoucím k buněčné smrti. Ani tato cesta se nezdá být zcela ideální a to jednak z důvodu existence ALT mechanismů i díky skutečnosti, že nádorová buňka se bude dělit dokud teloméry nedosáhnou kritické délky a efekt tak nebude okamžitý. Proto je důležité pohlížet na regulaci telomerázové aktivity jako na komplex událostí, k nimž je třeba přiřadit i ALT mechanismy (Blasco, 2001).

Samozřejmostí výběru daných inhibitorů, zacílených na telomerázu a její pozitivní regulátory, by pak měl být individualizovaný přístup k pacientovi – ne všichni vykazují stejné znaky deregulace telomero-telomerázového komplexu. Je tedy třeba vybírat mezi cílemi terapeutik: telomeráza (katalytická podjednotka) nebo regulační proteiny (mRNA) a je samozřejmě třeba přihlédnout i k ALT mechanismu.

Strategie antitelomerázové terapie zaměřená na kontrolu produkce a uspořádání složek důležitých pro telomerázovou aktivitu nejčastěji využívá antisence oligonukleotidy, ribozomy nebo malé molekuly inhibitorů. Cílem antisence oligonukleotidů jsou nejčastěji *hTERT* mRNA či RNA komponenta telomerázy. Ribozomy, malé katalytické

RNA molekuly vybavené antisence sekvencí a ribonukleázovou aktivitou, jsou většinou použity ke štěpení *hTERT* mRNA. Z nízkomolekulárních inhibitorů lze zmínit např. geldamycin, který blokuje funkci chaperonů, které se podílejí na kompletaci biologicky aktivního telomerázového komplexu (Rezler et al., 2002).

V odborné literatuře se setkáváme i s dalšími inhibitory telomerázové aktivity, jako např. PNA (Peptide Nucleic Acids), LNA (Locked Nucleic Acids), které díky chemické modifikaci bazí vykazují zvyšenou vazebnou afinitu k dané sekvenci (Corey et al., 2002; Herbert 1999), či molekulami, které stabilizují G-kvadruplexní strukturu a omezují tak možnost telomerázy prodlužovat substrát o telomerické repetice (Rezler et al., 2002).

4. BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Pro studium telomerázové aktivity a exprese studovaných genů byly s informovaným souhlasem použity převážně vzorky kostní dřeně pacientů s myelodysplastickým syndromem a dále vzorky kostní dřeně či periferní krve pacientů s akutní leukémií. Většina těchto vzorků byla odebrána v době stanovení diagnózy onemocnění nebo před zahájením léčby. U některých pacientů byly analyzovány i další vzorky odebrané v průběhu onemocnění.

Vzhledem k omezenému množství periferní krve či kostní dřeně pacientů a zdravých dárců, nebylo možné u všech vzorků provést stanovení telomerázové aktivity a expresních analýz všech studovaných genů.

4.1. TELOMERÁZOVÁ AKTIVITA

4.1.1. Pacienti

MDS: 91 vzorků 70 pacientů při diagnóze, před zahájením léčby a v průběhu onemocnění 38x RA, 5x RARS, 14x RAEB, 12x RAEB-t, 1x CMML, průměrný věk 55.5 let, Me = 58.5 let, rozpětí 2-81 let

sAML: 14 vzorků 13 pacientů při diagnóze, průměrný věk 57 let, Me = 57.5 let, rozpětí 37-69 let

AML: 59 vzorků 53 pacientů při diagnóze a v průběhu onemocnění (2x M0, 9x M1, 13x M2, 8x M3, 17x M4, 3x M5), průměrný věk 42.4 let, Me = 41 let, rozpětí 7-71 let

ALL: 10 vzorků 9 pacientů při diagnóze a v průběhu onemocnění (1x T-ALL, 8x B-ALL), průměrný věk 41.9 let, Me = 45.5 let, rozpětí 3-61 let

4.1.2. Kontrolní vzorky

4.1.2.1. Negativní kontroly

Jako negativní kontroly (NC) byly použity vzorky kostní dřeně a periferních kmenových buněk 41 zdravých dárců s průměrným věkem 35.5 let (rozpětí 3-60 let, Me = 36 let, 25 mužů a 16 žen). Průměrná hodnota telomerázové aktivity skupiny těchto vzorků byla stanovena: TA = 0.0162 ± 0.0193 .

4.1.2.2. Pozitivní kontroly

Pozitivní kontroly představovaly buněčné linie, odvozené od pacientů s hematologickými malignitami. Jejich charakteristika s výsledky telomerázové aktivity, získanými v rámci této studie je uvedena v tab. 4.1.

Linie	Charakteristika	TA
ML-1	AML (myeloidní)	18.444
HL-60	AML M3 (promyelocytární)	17.713
NB-4	AML M3 (promyelocytární)	16.142
K562	CML BP, Ph+	15.649
SD-1	ALL (lymfoblastická)	9.840
KCL-22	CML BP, Ph+	7.539
PS-1	T-ALL	2.940
HEL	AML M6 (erytroidní)	2.176
MOLM-7	CML BP, Ph+	2.160
KG1	AML M1	0.483

Tab. 4.1.: Charakteristika buněčných linií (AML, akutní myeloidní leukémie; BP, blastická faze; CML, chronická myeloidní leukémie; T-ALL, akutní lymfoblastická leukémie z T buněk; Ph, Philadelphia chromosom)

4.2. GENOVÁ EXPRESE

4.2.1. Pacienti

MDS: 36 vzorků 32 pacientů při diagnose, před zahájením léčby a v remisi: 21x RA, 3x RARS, 6x RAEB, 2x RAEB-t; průměrný věk 57.6 let, Me = 58 let, rozpětí 29-77 let

sAML: 7 vzorků 6 pacientů při diagnóze a relapsu onemocnění; průměrný věk 50.3 let, Me = 57 let, rozpětí 30-61 let

AML: 30 vzorků 27 pacientů při diagnóze a v průběhu onemocnění: 6x M1, 6x M2, 4x M3, 11x M4, průměrný věk 43.2 let, Me = 41.5 let, rozpětí 14-71 let

4.2.2. Kontrolní vzorky

4.2.2.1. Negativní kontroly

Jako negativní kontroly pro expresní profily studovaných genů byly použity vzorky kostní dřeně a periferních kmenových buněk 17 zdravých dárců s průměrným věkem 34.4 let (rozpětí 14-51 let, Me = 36 let, 9 mužů a 8 žen). Průměrné hodnoty exprese zdravých dárců navýšené o 2 S.D. byly považovány za 100%-ní hodnotu a exprese zjištěné u pacientů převyšující tuto hodnotu byly označeny za zvýšené, tj. pozitivní. Pro

lepší vzájemné porovnání expresních profilů byly exprese jednotlivých genů detekované u pacientů vyjádřeny jako relativní exprese, t.j. jako procento exprese detekované u zdravých dárců.

4.2.2.2. Pozitivní kontroly

Pozitivní kontroly představovaly leukemické buněčné linie K562 a MOLM7.



5. M E T O D Y

Pro všechny analýzy je izolace mononukleárních buněk z periferní krve či kostní dřeně prvním a společným krokem, další specifické metodiky mají své kapitoly.

5.1. IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK Z PERIFERNÍ KRVE A KOSTNÍ DŘENĚ

Mononukleární buňky byly získány centrifugací v hustotním gradientu Ficoll - Paque následujícím postupem:

- dřeň naředit 1 : 1 s PBS, periferní krev neředíme
- 3 ml Ficoll – paque opatrně převrstvit 4 ml periferní krve nebo naředěné dřeně
- centrifugovat 30 minut při 4°C, 360 g
- střední fázi obsahující mononukleární buňky přepipetovat do 50ml zkumavky Falcon
- doplnit do 45 ml lyzačním roztokem pro erytrocyty, vychlazeným na 4°C, lýzu nechat probíhat 30 minut při 4°C
- centrifugovat 10 minut při 4°C, 800 g
- odsát supernatant, na dně zkumavky zůstane peleta mononukleárních buněk

5.2. STANOVENÍ TELOMERÁZOVÉ AKTIVITY

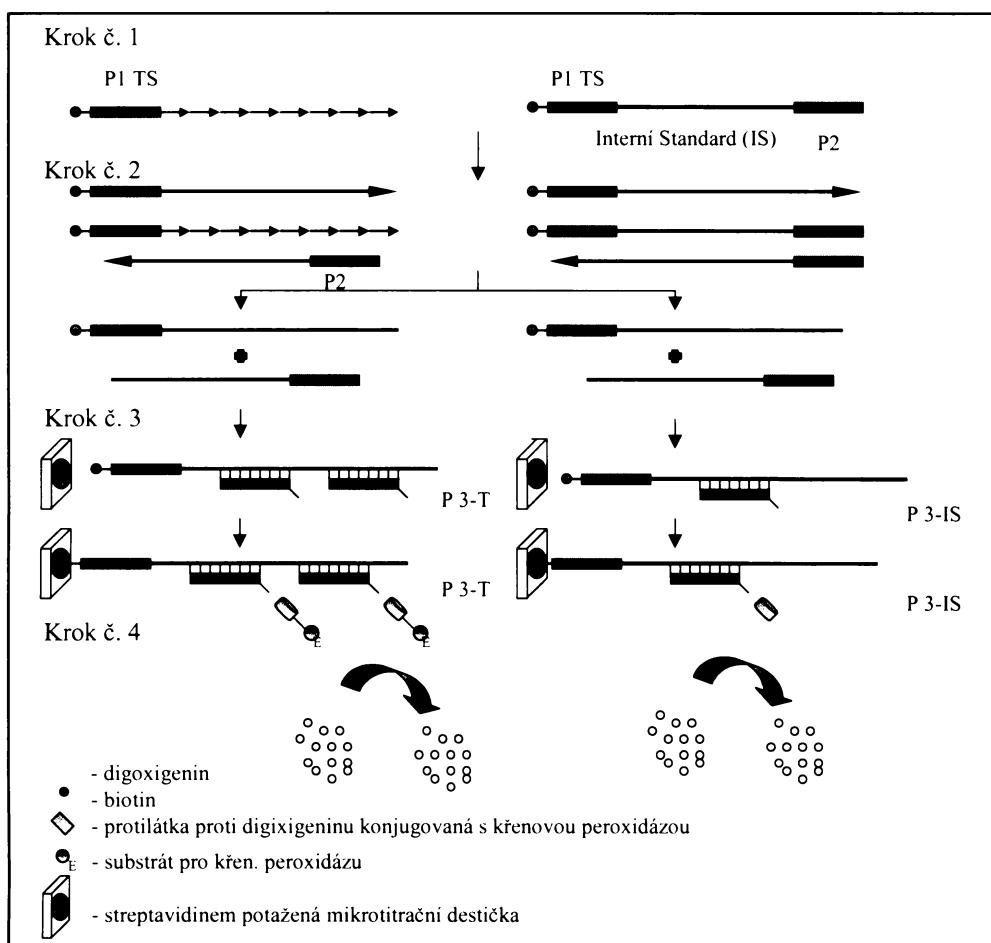
5.2.1. Příprava proteinových extraktů

- k 1 milionu mononukleárních buněk přidat 200µl CHAPS lysis bufferu (Scintila) a resuspendovat peletu
- inkubovat 30 minut při 4°C
- centrifugovat 25 minut při 4°C, 10000g
- odpipetovat 160 µl supernantu a 10x naředit (2µl ≈ 1000 buněk)

5.2.2. Detekce telomerázové aktivity

Pro kvantitativní stanovení telomerázové aktivity byl použit kit *TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS}* firmy Roche vycházející z protokolu TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol, Kim et al. 1997). Kvantitativní metoda TRAP je

založená na schopnosti telomerázy syntetizovat *in vitro* telomerické repetice na DNA substrát. Všechny modifikace TRAP analýzy mají společné první dva kroky – prodloužení oligonukleotidu TS (Telomerase Substrate) o telomerické repetice (TTAGGG)_n v rozsahu, jež závisí na aktivitě aliquotu proteinového extraktu dodaného do reakce a amplifikaci prodlouženého TS templátu pomocí PCR. Princip metody je znázorněn na obr. 4.1.



Obr. 4.1.: Princip *TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS}*: V kroku č. 1 přidává telomeráza telomerické repetice na 3'konec biotinem značeného P1-TS primeru; v kroku č. 2 je takto prodloužený primér společně s interním standardem (IS) v jedné PCR reakci naamplifikován s použitím primeru P1-TS a kotvíciho primeru P2; výsledkem jsou produkty lišící se o 6bp telomerickou repeticí a 216bp produkt z IS; v kroku č. 3 jsou PCR produkty, ukoťvené na mikrotitrační destičky díky afinitě biotinu a streptavidinu, hybridizovány s digoxigeninem značenou sondou; krok č. 4 představuje detekci amplikonů použitím protilátek proti digoxigeninu konjugovaným s křenovou peroxidázou a přidáním peroxidázového substrátu TMB

Telomerázová aktivita vyjádřená indexy TA byla stanovena podle protokolu dodaného výrobcem vzhledem k internímu standardu (216 bp). Jednalo se o poměr absorbance

($A_{450\text{nm}}/A_{690\text{nm}}$) PCR produktu vzorku k absorbanci interního standardu po odečtení pozadí, což byla absorbance lyzačního pufru CHAPS. Jako pozitivní byly označeny vzorky, jejichž TA byla větší než průměrná hodnota TA negativních kontrol navýšená o 2 S.D. (> 0.0548).

5.3. STANOVENÍ EXPRESE GENŮ

5.3.1. Izolace RNA

Totální RNA byla izolována z 10 nebo 5 milionů buněk metodou kyselého fenolu dle Chomczynského (1987). Kvalita a kvantita byla kontrolována agarózovou gelovou elektroforézou. Pracovní postup:

- lyzáty (5-10 mil bb. + 500 μl ITG) řádně zamíchat a zcentrifugovat
- 500 μl lyzátu přidat do zkumavky s 50 μl Na Acetátu (pH 4.0), řádně zamíchat a zcentrifugovat
- přidat 450 μl kyselého fenolu a 125 μl chloroformu (49:1, chloroform:izoamylalkohol)
- vše zvortexovat a protřepávat minimálně 30 sec; vzorek se musí mléčně zakalit
- vzorek inkubovat 10 min v ledové lázni
- centrifugovat 20 min při 4°C, 10 000g
- vrchní vodnou fázi odebírat 4x po 100 μl do nových zkumavek, pomalu a opatrně z hladiny (mezifáze obsahuje DNA, dolní fáze proteiny a lipidy)
- ke 400 μl odebraného vzorku přidat 400 μl ledového izopropanolu
- zkumavky opatrně promíchat (cca 20x otočit dnem vzhůru)
- inkubovat minimálně 40 min při – 20°C, během inkubace 1-2x promíchat jako v předchozím bodě
- centrifugovat 20 min při -2°C, 10 000g
- supernatant opatrně slít, k sedimentu přidat 500 μl 75% ledového ethanolu.
- zvortexovat
- centrifugovat 10 min při 10 000g
- supernatant opatrně slít, k sedimentu přidat 500 μl 75% ledového ethanolu.
- zvortexovat
- centrifugovat 10 min při 10 000g

- supernatant opatrně slít, hrdlo zkumavky otřít o sterilní filtrační papír
- vzorek zcentrifugovat na mikrocentrifuze
- k peletě RNA přidat 20 µl TK H₂O
- vzorek zcentrifugovat na mikrocentrifuze
- rozpustit RNA ve vodní lázni 55°C 10 min a 15 min při pokojové teplotě
- zchladit v ledové lázni a dále používat nebo zamrazit -20°C, pro delší skladování -70°C

5.3.2. Reverzní transkripce (RT)

Aliqout RNA z 2 x 10⁶ buněk byl odebrán pro syntézu cDNA pomocí náhodných hexamerů a SuperScript™ II Rnase H reverzní transkriptázy (100U/10ul reakce) s následujícím postupem:

- do 0,5 ml zkumavky pipetovat 2 µl 25pmol/ml hexamérů
- přidat 4 µl promíchané RNA, zcentrifugovat na mikrocentrifuze
- denaturovat - inkubovat 5 min při 70°C
- po inkubaci vzorky ihned přenést do ledové lázně

připravit mastermix, který pro 1 vzorek obsahuje: 2.0 µl 5x konc.pufr (Invitrogen),

1.0 µl DTT (100mM, Invitrogen), 0.5 µl dNTP (10 mM, Fermentas), 0.5 µl

SuperScript II (200U/ul, Invitrogen), 0.25 µl Rnasin (39 U/µl, Promega), TK H₂O

- mastermix promíchat, rozpipetovat po 5 µl do zkumavek s denaturovaným vzorkem
- zkumavky lehce promíchat, nevortexovat
- inkubovat 13 minut při 25°C, poté nastavit lázeň na 42°C
- inkubovat při 42°C 1,5 hodiny
- inkubovat 3 minuty (přesně) při 93°C
- ihned přenést do ledové lázně, případně vzorky zamrazit -20°C

5.3.3. RT-PCR v reálném čase (RQ PCR)

Reverzně transkriptázová PCR v reálném čase byla provedena v termocykleru RotorGene 3000A (Corbett Research, Austrálie) s použitím specifických TaqMan sond. Výsledky exprese sledovaných genů byly vztaženy k expresi stejného množství kontrolního genu (β -2-mikroglobulinu, gene ID567; 15q21-q22.2). Vzorky byly

amplifikovány v paralelách a pro výpočet byla použita průměrná hodnota. V každém experimentu byla vedle vzorků amplifikována rovněž řada závislých ředění vnitřního standardu, která byla při počítačové analýze použita pro tvorbu kalibrační křivky. Jako vnitřní standard byl použit amplifikovaný PCR produkt.

Detekce množství PCR produktu TaqMan sondou je metoda založená na hybridizaci genově specifické sondy s úsekem cDNA daného genu, který je ohraničen specifickými priméry. TaqMan sonda je značena na jednom konci (5') fluoroforem (Reporter) a na druhém konci (3') jeho zhášečem (Quencher). Při každém prodlužování primérů DNA polymerázou dochází díky její 5' nukleázové aktivitě k degradaci sondy, čímž se separuje reportérová barva od zhášeče a může tak emitovat svou charakteristickou fluorescenci, která je v průběhu každého PCR cyklu detekována.

Reakční cyklus se sestával z aktivace polymerázy, teploty denaturace a teploty pro hybridizaci sondy a extenze primérů. Sondy byly značené na 5' konci fluoroforem 6-FAM a na 3' konci zhášečem TAMRA.

Sekvence jednotlivých primerů a TaqMan sond a velikosti amplifikovaných fragmentů byly následující:

***hTERT* gen** (dle Yajima et al., 2000)

Velikost amplifikovaného produktu: 177 bp

Primér forward: 5' - ACG GCG ACA TGG AGA ACA A – 3'

Primér reverse: 5' - CAC TGT CTT CCG CAA GTT CAC – 3'

TaqMan sonda: 5' - CTC CTG CGT TTG GTG GAT GAT TTC TTG TTG – 3'

***TEP1* gen** (dle Yajima et al., 2000)

Velikost amplifikovaného produktu: 187 bp

Primér forward : 5' - CAC CTG CGA CGA TAT TTC T - 3'

Primér reverse : 5' - CGA GGG TTG TAC TTA GCC A - 3'

TaqMan sonda: 5' - CAA ATT TGC CCA GTT TGA CGA GTA CC - 3'

***POT1* gen** (navrhla firma Proligo)

Velikost amplifikovaného produktu: 170 bp

Primér forward: 5' - GAC GGA GCA TCA TTT CTT CTA AAG G - 3'

Primér reverse : 5' - CTT GCC ACA TGA ACA TGG TTA TCG - 3'

TaqMan sonda: 5' - TGG CAC CAG GAC ACC ATT TCC ATC TTG G – 3'

***TRF1* gen** (navrhla firma Proligo)

Velikost amplifikovaného produktu: 88 bp

Primér forward: 5' - TCT CTC TTT GCC GAG CTT TCC - 3'

Primér reverse: 5' - GAT AGT CCA TGA ATA ATA GCC TCT GC - 3'

TaqMan probe: 5' - CCG CTC CGA GGA CTT CCG CAG G – 3'

***c-Myc* gen** (dle Fang et al., 2004)

Velikost amplifikovaného produktu: 73 bp
Primér forward: 5' - ACA CCG CCC ACC ACC AG - 3'
Primér reverse: 5' - CCA CAG AAA CAA CAT CGA TTT CTT - 3'
TaqMan sonda: 5'- AGC GAC TCT GAG GAG G – 3'

TNKS gen (navrhla firma Prolico)
Velikost amplifikovaného produktu: 192 bp
Primér forward: 5' - GCG TGT CTG TTG TAG AGT ACC TG - 3'
Primér reverse: 5' - AGC TCA GCC ACC TCA TAG TGT C - 3'
TaqMan sonda: 5'- ACC ACG GTG CCG ATG TCC ATG CCA – 3'

Kontrolní gen β -2-mikroglobulin (*B2M*; dle Beillard et al., 2003)
Velikost amplifikovaného produktu: 109 bp
Primér forward: 5' - GAG TAT GCC TGC CGT GTG - 3'
Primér reverse: 5' - AAT CCA AAT GCG GCA TCT - 3'
TaqMan sonda: 5' - CCT CCA TGA TGC TGC TTA CAT GTC TC - 3'

20 μ l amplifikační směsi obsahovalo: 12.35 μ l TK H₂O, 2.00 μ l 10x konc. pufu (PE Biosystems), 3.75 μ l MgCl₂ (25mM, PE Biosystems), 0.80 μ l dNTP (10mM, Fermentas), 0.50 μ l primeru forward a reverse (20 μ M, Prolico), 0.20 μ l TaqMan sondy (20 μ M, Prolico), 0.25 μ l AmpliTaq Gold DNA polymerázy (5U/ μ l, PE Biosystems) a 1.00 μ l cDNA

Reakční podmínky pro amplifikaci *hTERT* genu: 95°C, 10' - (95°C, 15''- 60°C, 60'') 50x
Reakční podmínky pro amplifikaci *B2M*, *TEP1*, *POT1*, *TRF1*, *TNKS* a *c-Myc* genu:
95°C, 10' - (95°C, 15''- 60°C, 60'') 45x

5.4. STANOVENÍ DÉLKY TELOMÉR

Pro úplnost pohledu na metodologii studia teloméro-telomerázového komplexu je uvedena i metoda pro analýzu délky telomér, ačkoli její provedení nebylo součástí předkládané disertační práce. Délka telomér byla stanovena s použitím kitu *TeloTAGGG Telomere Length Assay* (Roche) podle instrukcí výrobce. Jednalo se o metodou terminálního repetičního fragmentu (TRF, Terminal Repeat Fragment), která je založená na neexistenci cílových palindromů restrikčních endonukleáz v telomerických sekvencích a subtelomerické DNA. Délka telomér byla detekována po Southernově hybridizaci vysokomolekulární DNA štěpené směsí restrikčních enzymů pro často se vyskytující cílové palindromy Hinf I a Rsa I s telomerickou sondou (TTAGGG)₇ značenou digoxigeninem s následnou chemiluminescenční detekcí. Délka

telomér - průměrná délka všech chromosomových konců ze všech buněk obsažených ve vzorku - byla vyjádřena indexy TRF v kbp. Jako zkrácené byly označeny hodnoty TRF < 7.5 kbp (Sieglová et al., 2004).

5.5. STATISTICKÁ ANALÝZA

Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu GraphPad InStat2 a GraphPad PRISM. Statistická významnost porovnání experimentálních výsledků skupin vzorků byla hodnocena neparametrickými testy (nepárový t test, analýza variance ANOVA). Pro stanovení korelací byly použity neparametrické statistiky, které nezávisí na předpokladu normální distribuce (stanovení Spearmanova korelačního koeficientu).

DFS analýzy - křivky přežití byly vypracovány Kaplan-Meierovou metodou pomocí programu GraphPad PRISM a pro jejich porovnání byl použit Log-rank test.

Za statisticky významné byly považovány hodnoty $P < 0.05$.

6. VÝSLEDKY

6.1. TELOMERÁZOVÁ AKTIVITA (TA)

6.1.1. Telomerázová aktivita u MDS

6.1.1.1. Dynamika telomerázové aktivity u FAB u subtypů MDS

Aktivita telomerázy byla stanovena u 93 vzorků 70 pacientů. Z celkového počtu 65 vzorků kostní dřeně při diagnóze a před zahájením léčby vykazovalo zvýšenou aktivitu 33 z nich (51%, tab. 10.1., graf 6.2.). Pozitivní aktivita byla detekována již u téměř poloviny 49% (21/43) vzorků pacientů s časnými formami MDS (RA a RARS, čísla pacientů 1-43) a 52% (11/21) vzorků pacientů s pokročilými formami MDS (RAEB a RAEB-t, čísla pacientů 44-69). K signifikantnímu nárůstu telomerázové aktivity oproti zdravým dárcům (0.0162 ± 0.0193) dochází již u RA a RARS ($P = 0.0006$; 0.0963 ± 0.1398) a dále narůstá, i když ne signifikantně ($P=0.5767$), společně s počtem blastů v kostní dřeni směrem k RAEB a REAB-t diagnózám (0.1204 ± 0.1689).

U některých pacientů byla TA stanovena jak v kostní dřeni (KD), tak v periferní krvi (PK). U pacientů č. 19, 68 a 70 byla aktivita v buňkách kostní dřeně vyšší, u pacientů č.11 a 66 byla aktivita nižší než v periferní krvi, a to i přes vyšší počet blastů v KD.

6.1.1.2. Průběžné změny telomerázové aktivity u pacientů s MDS

Alespoň dva vzorky stejné tkáně v průběhu onemocnění byly vyšetřeny u 9 pacientů. U těchto pacientů (č. 1, 29, 39, 53 a 54) se telomerázová aktivita zpravidla měnila v souladu s poklesem či nárůstem blastů v kostní dřeni. Podobně i u pacienta č. 17 byly analyzovány celkem 4 vzorky u nichž docházelo ke kolísání TA, která odražela množství blastů zjištěné v KD ($TA_1 = 0.3605$, 2.8% blastů; $TA_2 = 0.0114$, 0.8%; $TA_3 = 0.2367$, 3.2%; $TA_4 = 0.0034$, 1%). Pacient stále žije.

Dva kontrolní odběry pacienta č. 29 vykazují stoupající tendenci TA ($TA_1 = 0.1484$, $TA_2 = 0.3534$). Tento pacient za 2 měsíce od odběru druhého vzorku zemřel.

Pacient č. 45 s RAEB s narůstající TA vykazoval po odběru 3. vzorku známky progrese onemocnění. Dvacet měsíců po odběru 3. vzorku pacient stále žije.

U pacienta č. 57 byla při diagnóze zjištěna pozitivní hladina TA a zkrácené telomery ($TA_1 = 0.0741$, $TRF_1 = 5.6\text{ kbp}$). V průběhu léčby došlo k poklesu TA a negativní hodnoty byly detekovány i remisi onemocnění ($TA_2 = 0.0361$, $TA_3 = 0.0159$, $TA_4 = 0.0034$, $TRF_2 = 10.2\text{ kbp}$).

0.0014), poslední vzorek charakterizovala i normální délka telomér ($TA_5 = 0.0118$, $TRF_5 = 7.62\text{ kbp}$). Po 4 měsících od odběru posledního vzorku podstoupil pacient alogenní transplantaci krvetvorných buněk (HSCT).

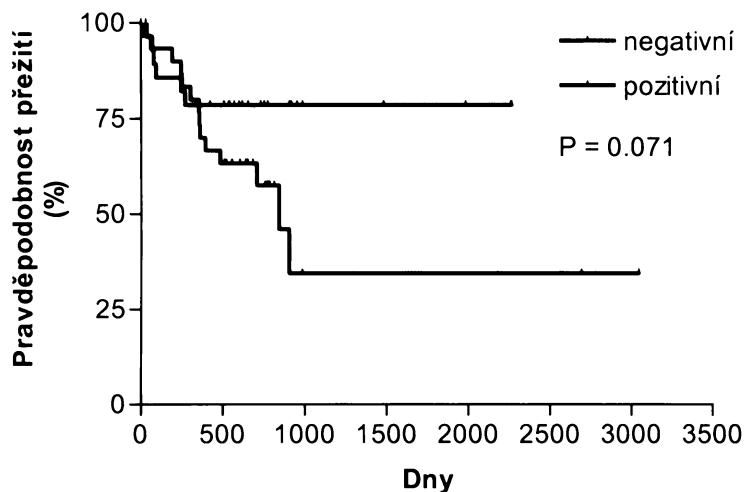
6.1.1.3. Vztah mezi telomerázovou aktivitou a délkou telomér

Zkrácené teloméry byly zpravidla spojeny se zvýšenou hladinou TA nebo jejich eroze zvýšení TA předcházela. U našeho souboru pacientů s MDS zvýšená telomerázová aktivita signifikantně souvisela se zkrácenými telomérami ($r = -0.2919$, $P = 0.0465$). Naopak, normální délka telomér a zvýšená aktivita byly detekovány u pacientů č. 12, 23 a 30. U pacienta č. 23 se obě hodnoty pohybovaly blízko hranice negativity a pozitivity a tudíž zcela nevylučují výše zmíněný trend. I přes normální délku telomér pacient č. 12 postupně progrevoval směrem k blastickým formám MDS. Pacient č. 30 podstoupil alogenní HSCT, takže ho bylo nutné s dalšího sledování vyloučit.

6.1.1.4. Prognostický význam telomerázové aktivity u MDS

Ke stanovení rizika progrese směrem k pokročilým formám a leukemické transformaci pacientů s MDS se v současné době používá zejména IPSS systém, založený na kombinaci tří faktorů, z nichž jeden představuje podíl blastických buněk v kostní dřeni. Stanovení vzájemného vztahu telomerázové aktivity se skórem rizika dle IPSS, tak může napovědět více o její prognostické významnosti. V našem souboru pacientů však nebyla korelace mezi TA a počtem blastů v analyzované tkáni potvrzena ($r = 0.0461$, $P = 0.6810$), stejně jako nebyl nalezen vztah mezi TA a IPSS skórem ($r = 0.1214$, $P = 0.2654$).

Graf 6.1. znázorňuje Kaplan-Meierovy křivky přežití pacientů s pozitivní a negativní hodnotou telomerázové aktivity. I když pacienti s pozitivní TA přežívají kratší dobu, rozdíl není statisticky významný. Přesto však prognostický význam telomerázové aktivity pro progresi MDS naznačuje odhad pravděpodobnosti pětiletého přežití: ve skupině pacientů s nízkou hladinou TA přežívají více než 5 let tři čtvrtiny (75%) pacientů, kdežto ve skupině s vysokou TA pouze přibližně jedna třetina (30%) z nich.



Graf č. 6.1.: Kaplan-Maierovy křivky přežití MDS pacientů s pozitivní a negativní TA.

6.1.2. Telomerázová aktivita u sAML z MDS

Analýza telomerázové aktivity byla provedena u 14 vzorků 13 pacientů se sekundární AML z MDS. Hodnoty TA se pohybovaly v rozmezí 0.0015 – 2.3580 s průměrnou hodnotou 0.3408 ± 0.5965 (výsledky v tab. 10.2. a grafu 6.4. – ten bude společný pro všechny). Zvýšená TA byla zjištěna u 77% (10/13) pacientů.

U pacienta č. 10 byly analyzovány vzorky periferní krve i kostní dřeně. Souhlasně s počtem blastů byla v periferní krvi detekována nižší TA (2% blastů, negativní TA = 0.0267) než v kostní dřeni (7.2 % blastů, pozitivní TA = 0.0685)

Nejčastěji byly erodované telomery spojeny se zvýšenou hladinou aktivity telomerázy a opačně, kromě pacienta č. 1, u kterého byla zjištěna normální délka telomér, ale zvýšená TA.

Telomerázová aktivita pacientů se sekundární AML z MDS nebyla signifikantně zvýšená vzhledem k aktivitě detekované u MDS ($P = 0.1808$).

Korelační vztah TA s počtem blastů a s délkou telomér nebyl signifikantní ($r = 0.4818$, $P = 0.0810$, resp. $r = -0.2143$, $P = 0.6191$).

Kaplan-Meierovy křivky přežití pacientů v závislosti na pozitivitě či nebyly sestaveny, protože téměř všichni pacienti vykazují pozitivní TA a kromě jednoho, který podstoupil alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk, všichni zemřeli v období do 2 let od odběru vyšetřovaného vzorku.

6.1.3. Telomerázová aktivita u AML

6.1.3.1. Dynamika telomerázové aktivity u AML

Aktivita telomerázy byla stanovena u 57 vzorků 52 pacientů. Celkem 80% (40/50) pacientů při diagnóze vykazovalo zvýšenou hladinu telomerázové aktivity. Hodnoty aktivity se pohybovaly v rozmezí 0.0016 – 26.1458, s průměrnou hodnotou TA = 2.2357 ± 5.6083 (Tab. 10.3., graf 6.4.), která je přibližně 100x vyšší než u zdravých dárců (TA = 0.0162 ± 0.0193). Nejvyšší hodnoty TA byly detekovány u FAB subtypů M4 a M5 (M1: 1.0847 ± 1.2143 ; M2: 0.3963 ± 0.5297 ; M3: 0.198 ± 0.1309 ; M4: 4.0484 ± 7.4929 ; M5: 9.4596 ± 9.5087 ; Graf 6.2.), přesto mezi jednotlivými subtypy AML nebyly zjištěny významnější rozdíly.

Dva pacienti byly analyzováni pouze v době relapsu onemocnění: pacient č. 1 (M0) měl negativní hladinu TA (0.0251), pacient č. 6 (M1) měl pozitivní TA (0.6671), ale nižší než byla průměrná hodnota TA u AML.

Telomerázová aktivita detekovaná u pacientů s AML je signifikantně zvýšená oproti aktivitě detekované u sAML ($P = 0.0215$).

6.1.3.2. Průběžné změny telomerázové aktivity u pacientů s AML

Pacienti sledovaní v průběhu onemocnění (č. 7 M1, č. 22 M1, č. 47 M4) dosáhli v kompletní/parciální remisi snížení hladiny TA až do negativity, pacient č. 19 byl negativní při diagnóze i v kompletní remisi. Společně se zvýšením počtu blastů v periferní krvi byla u pacienta č. 36 (M4) v relapsu onemocnění detekována vyšší hodnota TA než při diagnóze ($TA_R = 0.2431$, $TA_{Dg} = 0.2266$).

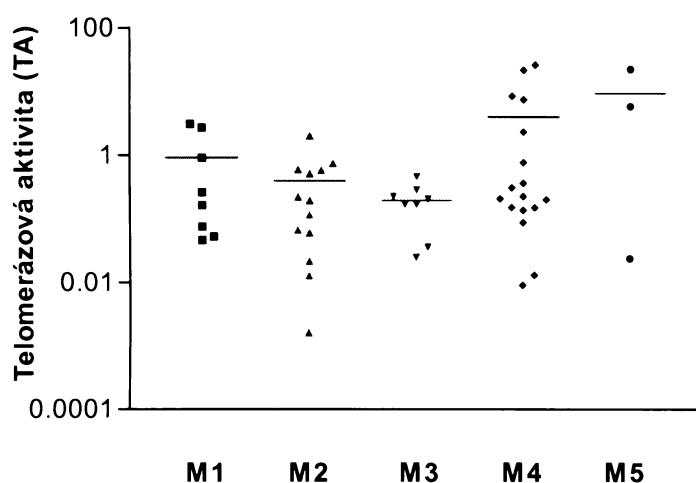
6.1.3.3. Vztah mezi telomerázovou aktivitou a délkou telomér

Kromě jednoho pacienta, souvisela zvýšená TA se zkrácenými telomérami. U 15-ti letého pacienta č. 37 (TA = 0.7716) byla detekována normální délka telomér (TRF = 8.69 kbp), ačkoli v porovnání s věkově odpovídající kontrolou by byla označena již za redukovanou (Iwama et al, 1998). U některých pacientů byly zjištěny zkrácené telomery ačkoli TA aktivita ještě nebyla zvýšená. Vztah mezi TA a délkou telomér tak nebyl signifikantní ($r = -0.1858$, $P = 0.2928$).

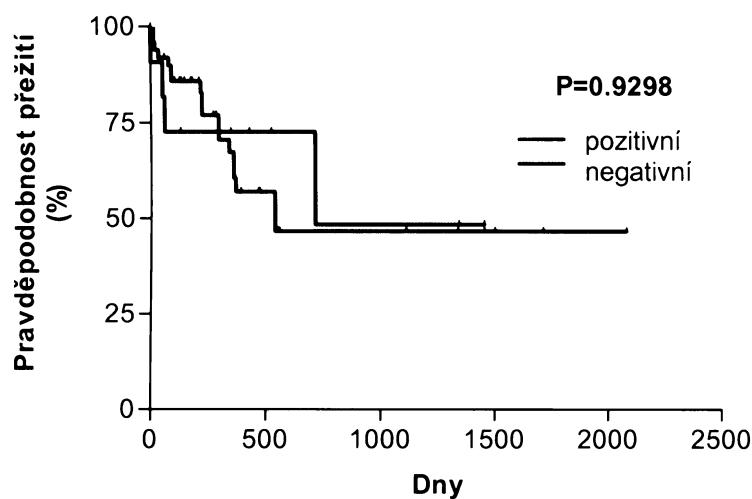
6.1.3.4. Prognostický význam telomerázové aktivity u AML

Klinický význam telomerázové aktivity u primární AML potvrdila signifikantní pozitivní korelace mezi TA a podílem blastů v analyzované tkáni ($r = 0.3689$, $P = 0.0040$).

Kaplan Meierovy křivky přežití mezi skupinami pacientů s AML s pozitivní a negativní hodnotou TA se však signifikantně nelišily ($P = 0.9298$, graf 6.3.). Průměrný počet dní přežití byl 472 dní u TA negativních a 440 u TA pozitivních pacientů.



Graf 6.2.: TA u pacientů s AML – rozděleno dle jednotlivých FAB subtypů; zvýrazněny jsou průměrné hodnoty TA.



Graf 6.3.: Kaplan-Maierovy křivky přežití AML pacientů s pozitivní a negativní TA.

6.1.4. Telomerázová aktivita u ALL

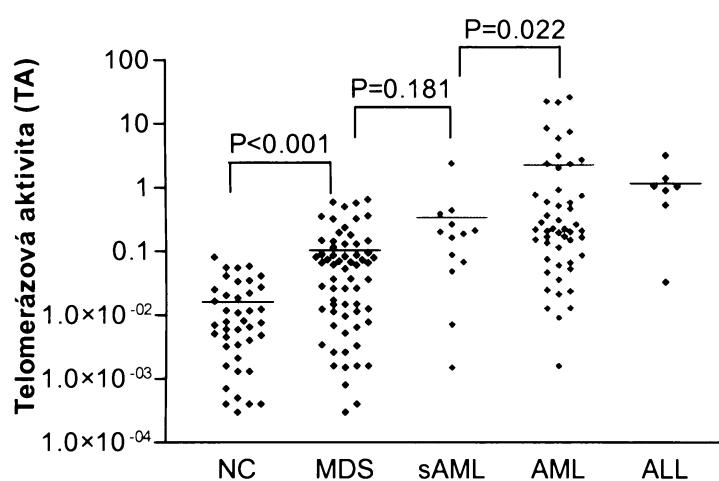
Analýzy TA byly provedeny u 10 vzorků 9 pacientů, z nichž 7 bylo odebráno v době stanovení diagnózy. Aktivita telomerázy se pohybovala v rozpětí 0.0330 – 3.1889 s

průměrnou hodnotou $TA = 1.1606 \pm 0.9206$. Zvýšená TA byla prokázána u 86% (6/7) pacientů s ALL. Výsledky společně se stručnou charakteristikou pacientů jsou shrnutы v tab. 10.4. a grafu 6.4.

Pacient č. 3 v kompletní remisi onemocnění vykazuje jen mírně zvýšenou TA a normální délku telomér. Vzhledem k tomu, že nebyla stanovena aktivita telomerázy před zahájením léčby, nelze posoudit její případnou změnu ve vztahu k onemocnění. Následně pacient podstoupil alogenní HSCT a žije. Pacient č. 8 byl analyzován 2x a vždy pouze v průběhu léčby, první vzorek se vyznačuje pozitivní $TA = 0.0705$ - jen mírně zvýšenou, druhý vzorek po zaléčení relapsu onemocnění je negativní ($TA = 0.0028$). Přibližně po 3 měsících od odběru druhého vzorku po opakovaných relapsech onemocnění pacient zemřel.

Vzájemné vztahy telomerázové aktivity s počtem blastů v analyzované tkáni či délkou telomér nebyly významné ($r = 0.2492$, $P = 0.4918$, resp. $r = -0.2571$, $P = 0.6583$).

Analýza přežití pacientů v závislosti na pozitivitě či negativitě výsledku nebyla vzhledem k malému počtu vzorků stanovena.



Graf 6.4.: TA u zdravých dárců a pacientů s MDS, se sAML, s AML a s ALL; zvýrazněny jsou průměrné hodnoty TA.

6.2. EXPRESE STUDOVANÝCH GENŮ

Stručné charakteristiky pacientů s uvedenými výsledky expresních analýz jsou uvedeny v tabulkách 10.5. (pacienti s MDS), 10.6. (pacienti se sAML z MDS) a 10.7. (pacienti s AML) v příloze. Z důvodu nízkého počtu testovaných vzorků nebyly u pacientů se sekundární AML z MDS sestaveny křivky přežití v závislosti na pozitivitě či negativitě výsledku a nebyly stanoveny vzájemné korelační vztahy s ostatními analýzami.

6.2.1. Exprese genu *hTERT*

6.2.1.1. Exprese genu *hTERT* u pacientů s MDS

Zvýšená exprese byla detekována u 41% (14/34) vzorků pacientů s MDS při stanovení diagnózy a před zahájením léčby. Hodnoty exprese byly vysoce variabilní, pohybovaly se v rozpětí 0 - 3071% exprese negativních kontrol (NC) s průměrnou hodnotou $300 \pm 600\%$ (Graf 6.5.). Zvýšená exprese *hTERT* byla charakteristická spíše pro buňky kostní dřeně pacientů s pokročilými formami MDS (RAEB a RAEB-t) – 50% (4/8) pozitivních vzorků, u pacientů s časnými formami MDS (RA, RARS) byla zvýšená exprese detekována přibližně u třetiny vzorků (38%, 10/26). Překvapivě byla exprese genu *hTERT* v průměru vyšší u pacientů s RA a RARS, ale s velkým rozptylem ($354 \pm 686\%$), než u pacientů s RAEB a RAEB-t ($146 \pm 102\%$), kde byly hodnoty vzhledem k průměru vyrovnanější.

Pouze u jednoho pacienta byl analyzován, kromě vzorku při diagnóze, ještě další vzorek ve stavu kompletní remise (CR). Diagnostický vzorek je charakterizován zvýšenou expresí genu *hTERT*, která je v CR přibližně dvojnásobná (117 a 228%), i přesto ale došlo k poklesu telomerázové aktivity. Délka telomér u tohoto pacienta vzrostla z erodovaných 5.6 kbp na normálních 7.62 kbp.

Vysoká exprese genu *hTERT* je většinou doprovázena vysokou hladinou TA a zkrácenými telomérami. Exprese genu *hTERT* pozitivně koreluje s expresí genů *c-Myc* a *TRF1*, dale je významněji asociována s expresí genů *POT1* a *TNKS* a počtem blastů v analyzované tkáni. Na druhé straně však nebyla prokázána korelace s aktivitou telomerázy, délkou telomér, expresí genu *TEPI* a IPSS skórem rizika (Tab. 10.8.).

Délka přežití pacientů s MDS nesouvisí s hladinou exprese genu *hTERT* (Graf 6.6.).

6.2.1.2. Exprese genu *hTERT* u pacientů se sekundární AML z MDS

Z celkového počtu 6 pacientů se sAML z MDS byla u většiny z nich (80%, 4/5) při diagnóze onemocnění exprese genu *hTERT* ($59 \pm 61\%$) v rozsahu referenčního intervalu zdravých kontrol. Stejně tak vykazoval normální hodnotu exprese i vzorek pacienta analyzovaného při relapsu onemocnění (67%). I přes negativní hodnoty exprese genu *hTERT* byla u tří z těchto pacientů zjištěna zvýšená telomerázová aktivity.

6.2.1.3. Exprese genu *hTERT* u pacientů s AML

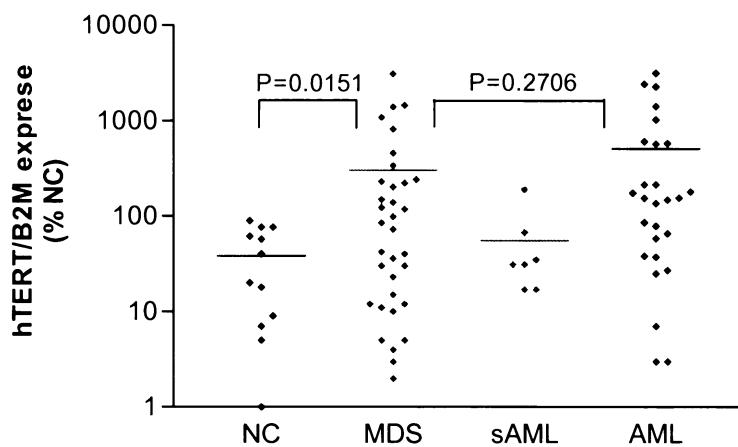
Exprese genu *hTERT* byla stanovena u 30 vzorků 27 pacientů s primární AML. Při diagnóze onemocnění byla zvýšená exprese nalezena u více než poloviny z nich (59%, 16/27). Podobně jako u MDS byla individuální exprese velmi variabilní – od 3 do 3126% exprese NC s průměrnou hodnotou $507 \pm 813\%$ (Graf 6.5.).

U pacienta č. 22 byla při diagnóze detekována vysoká exprese (1397%), která v průběhu léčby postupně klesala (110%) až na velmi nízkou negativní hodnotu v parciální remisi (8%).

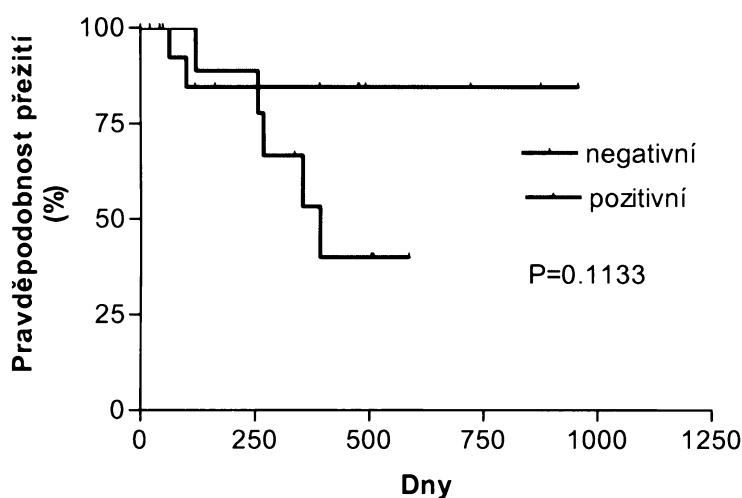
Kromě dvou pacientů (č. 8 a 9) mají ostatní zvýšenou expresi genu *hTERT* spojenou se zvýšenou aktivitou telomerázy. U pacienta č. 9 byla zjištěna i normální délka telomér, ačkoli vzhledem k jeho věku (14 let) by podle Iwama et al (1998) mohla být považována za zkrácenou.

Exprese genu *hTERT* pozitivně koreluje s expresemi genů *c-Myc*, *TEP1* a *TRF1*. Signifikantní korelace však nebyla prokázána s aktivitou telomerázy, délkou telomér, expresemi genů *POT1* a *TNKS* a počtem blastů v analyzované tkáni (Tab. 10.10.).

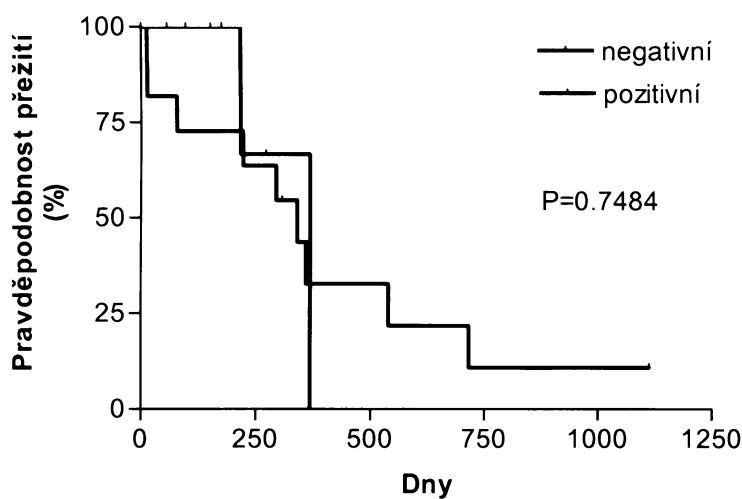
Rovněž přežití pacientů s AML není na hladině exprese genu *hTERT* závislé (Graf 6.7.).



Graf 6.5.: Porovnání exprese genu *hTERT* zdravých dárců, pacientů s MDS, sAML a AML se znázorněním významnosti nárůstu exprese pacientů s MDS vzhledem k NC a pacientů s AML vzhledem k pacientům s MDS.



Graf 6.6.: Přežití pacientů s MDS v závislosti na hladině exprese genu *hTERT*.



Graf 6.7.: Přežití pacientů s AML v závislosti na hladině exprese genu *hTERT*.

6.2.2. Exprese genu *c-Myc*

6.2.2.1. Exprese genu *c-Myc* u pacientů s MDS

Zvýšená exprese byla detekována u 7/26 (27%) vzorků pacientů s MDS při stanovení diagnózy nebo před zahájením léčby. Hodnoty exprese se pohybovaly v rozpětí 1 - 740% exprese NC s průměrnou hodnotou $110 \pm 173\%$ (Graf 6.8.). Hladina exprese genu *c-Myc* se zvyšovala v průběhu nemoci: u pacientů s časnými formami MDS byla nižší ($95 \pm 136\%$) než u pacientů s pokročilými formami ($150 \pm 243\%$). Podíl pacientů se zvýšenou expresí se ale s ohledem na klinický stav nelišil: RA a RARS 5/19 (26%), RAEB a RAEB-t 2/7 (28%).

U pacienta č. 25 sledovaného v průběhu onemocnění se exprese při diagnóze (RAEB) a v kompletní remisi zásadněji neměnila (49 a 60%).

Vysoké hodnoty exprese genu *c-Myc* byly průkazně asociovány se zvýšenou expresí genu *hTERT*. Exprese genu *c-Myc* byly dále v pozitivní korelací s expresemi genů *POT1*, *TRF1* a *TNKS*. Naopak nebyl prokázán žádný vztah s aktivitou telomerázy, délkou telomér, expresí genu *TEP1* a počtem blastů v analyzované tkáni (Tab. 10.9.).

Přežití pacientů s MDS nesouviselo s hladinou exprese genu *c-Myc* (Graf 6.9.).

6.2.2.2. Exprese genu *c-Myc* u pacientů se sekundární AML z MDS

Zvýšená exprese při stanovení diagnózy byla zjištěna u třetiny (33%, 1/3) pacientů se sekundární AML z MDS a dále u pacienta v relapsu onemocnění (104%). Zvýšená exprese *c-Myc* byla zpravidla následována i zvýšenou expresí genu *hTERT*, ikdyž měla její relativní exprese nižší hodnoty.

6.2.2.3. Exprese genu *c-Myc* u pacientů s AML

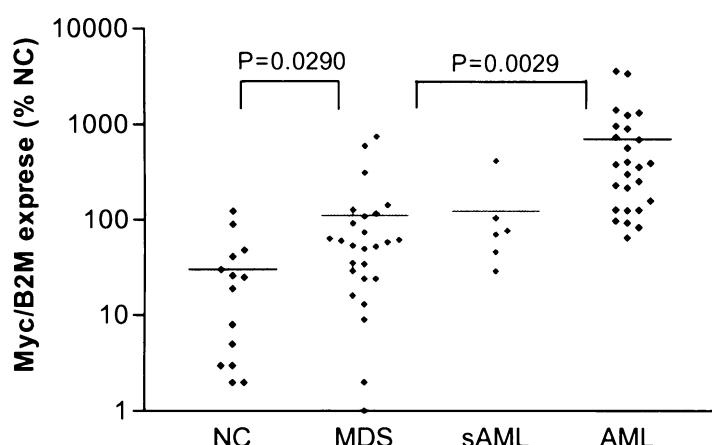
Exprese genu *c-Myc* byla stanovena u 28 vzorků 26 pacientů s primární AML. Při diagnóze onemocnění byla u většiny pacientů nalezena zvýšená exprese (81%, 22/27) ve srovnání s expresí zdravých kontrol. Hladina exprese se pohybovala v rozmezí 64 až 3579% exprese NC s průměrnou hodnotou $697 \pm 894\%$ (Graf 6.8.).

U pacienta č. 22 došlo v průběhu léčby k poklesu exprese ze 731 na 460%, u pacienta č. 1 poklesla exprese z původních 275% zjištěných při diagnóze, na negativní hodnotu v parciální remisi (47%).

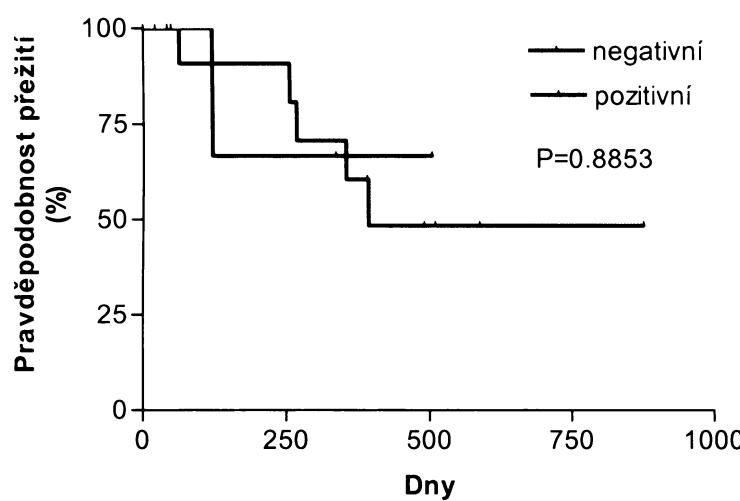
Pacienti se zvýšenou expresí *c-Myc* genu vykazovala většinou také zvýšenou expresi *hTERT* a nebo exprese *c-Myc* zvýšené expresi *hTERT* genu dokonce předcházela.

Exprese genu *c-Myc* byla tedy v přímé korelaci s expresí genu *hTERT*, dále pak s expresem genů *POT1*, *TEP1*, *TRF1* a *TNKS*. Významněji byla asociována s aktivitou telomerázy, ale nekoreluje s délkou telomér a počtem blastů v analyzované tkáni (Tab. 10.10.).

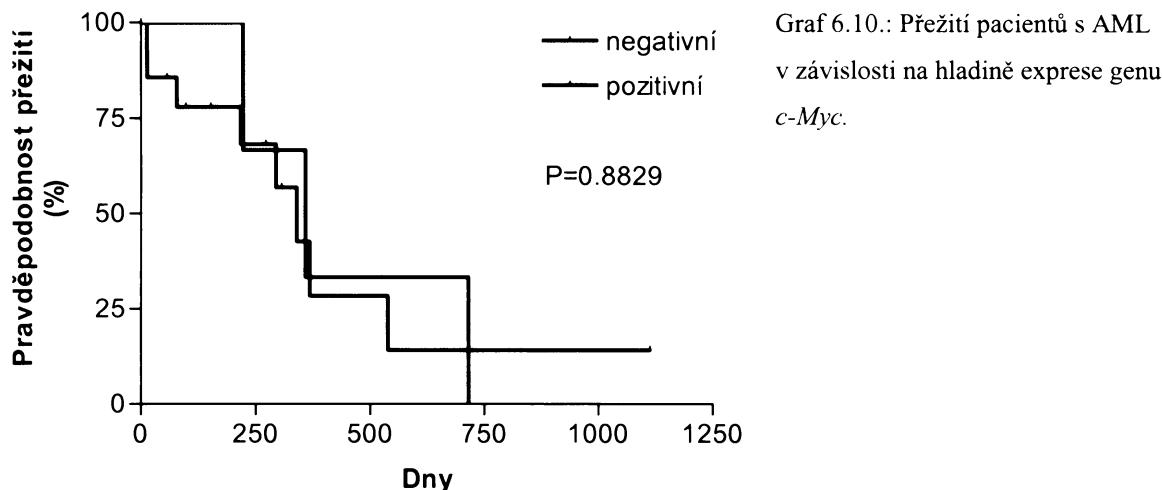
Přežití pacientů nebylo závislé na hladině exprese genu *c-Myc* (Graf 6.10.).



Graf 6.8.: Porovnání exprese genu *c-Myc* zdravých dárců, pacientů s MDS, sAML a AML se znázorněním významnosti nárůstu exprese pacientů s MDS vzhledem k NC a pacientů s AML vzhledem k pacientům s MDS.



Graf 6.9.: Přežití pacientů s MDS v závislosti na hladině exprese genu *c-Myc*.



6.2.3. Exprese genu *POT1*

6.2.3.1. Exprese genu *POT1* u pacientů s MDS

Zvýšená exprese byla detekována u poloviny vzorků pacientů s MDS (50%, 10/20) při stanovení diagnózy a před zahájením léčby. Hodnoty exprese se pohybovaly mezi 15 - 380% exprese negativních kontrol s průměrnou hodnotou $107 \pm 93\%$ (Graf 6.11.). I přesto, že pacienti s RAEB a RAEB-t vykazovali větší procento pozitivních výsledků (4/6, 67% pacientů) než u RA a RARS (6/16, 38% pacientů), exprese se výrazněji u pacientů s časnými a pokročilými formami MDS nelišila (100 ± 97 a 125 ± 179).

U pacienta č. 25 sledovaného v průběhu onemocnění exprese výrazně poklesla z 218% při stanovení diagnózy na 37% v kompletní remisi.

Zvýšená exprese genu *POT1* zpravidla souvisela zvýšenou aktivitou telomerázy ($P = 0.0492$). Signifikantní hodnota pozitivního korelačního koeficientu byla potvrzena i mezi expresí genu *POT1* a expresemi genů *c-Myc*, *TRF1* a *TNKS*. Byla významněji asociována s expesí genu *hTERT*, avšak nebyla v žádném vztahu s délkou telomér, expresí genu *TEPI*, skórem rizika podle IPSS a počtem blastů v analyzované tkáni (Tab. 10.9.).

Hladina exprese genu *POT1* neovlivňovala přežití pacientů s MDS (Graf 6.12.).

6.2.3.2. Exprese genu *POT1* u pacientů se sekundární AML z MDS

Exprese genu *POT1* byla studována pouze u 3 pacientů, z nichž pacienti při diagnóze vykazovali zvýšenou hladinu exprese (207 a 371%) a pacient při relapsu onemocnění

expresi odpovídající zdravým dárcům (44%). Podobně jako u MDS, vysoká exprese genu *POT1* zpravidla souvisela se zvýšenou aktivitou telomerázy.

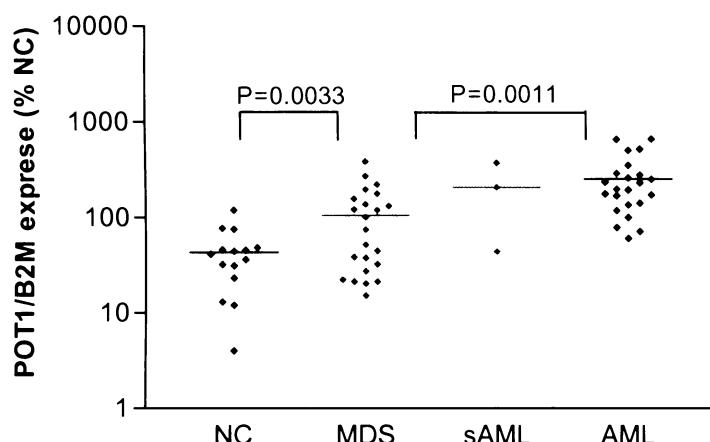
6.2.3.3. Expresi genu *POT1* u pacientů s AML

Expresi genu *POT1* byla stanovena u 25 vzorků 23 pacientů s primární AML. Při diagnóze onemocnění byla zvýšená exprese nalezena u 18/23 (78%) pacientů. Expresi se pohybovala v rozmezí 47 až 653% exprese NC s průměrnou hodnotou $252 \pm 169\%$ (Graf 6.11.).

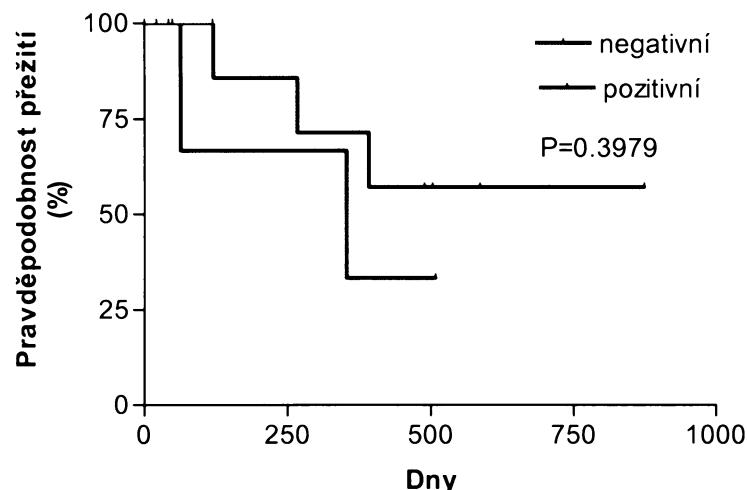
U pacienta č. 22 došlo v průběhu léčby k poklesu exprese genu *POT1* přibližně na polovinu (při diagnóze 498 % a v léčbě 269%), u pacienta č. 1 se s léčbou exprese snížila až na negativní hodnotu, která byla nalezena ve vzorku odebraném v parciální (při diagnóze 275 % a v parc. remisi 47%).

Expresi genu *POT1* byla v pozitivní korelaci s expresemi genů *c-Myc*, *TEP1*, *TRF1* a *TNKS* a nekorelovala s délkou telomér, aktivitou telomerázy, expresí genu *hTERT* a počtem blastů v analyzované tkáni (Tab. 10.10.).

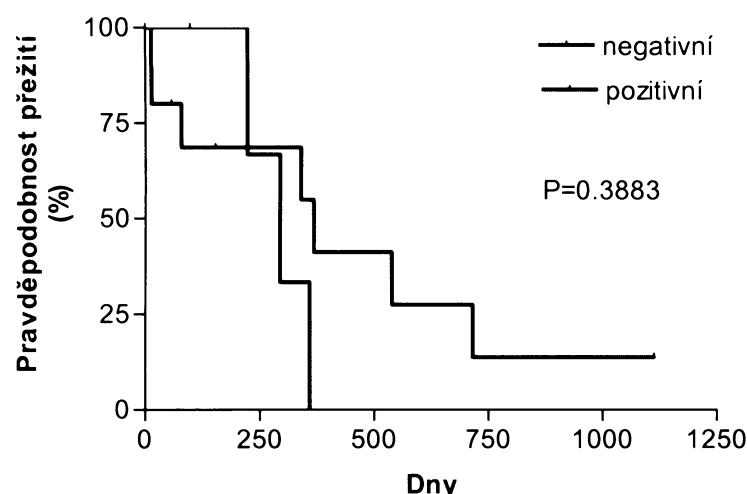
Přežití pacientů s AML nebylo na hladině exprese genu *POT1* závislé (Graf 6.13.).



Graf 6.11.: Porovnání expresi genu *POT1* zdravých dárců, pacientů s MDS, sAML a AML se znázorněním významnosti nárůstu exprese pacientů s MDS vzhledem k NC a pacientů s AML vzhledem k pacientům s MDS.



Graf 6.12.: Přežití pacientů s MDS v závislosti na hladině exprese genu *POTI*.



Graf 6.13.: Přežití pacientů s AML v závislosti na hladině exprese genu *POTI*.

6.2.4. Expresi genu *TEP1*

6.2.4.1. Expresi genu *TEP1* u pacientů s MDS

Zvýšená expresi genu *TEP1* byla detekována pouze u 22% (5/22) vzorků pacientů s MDS při stanovení diagnózy a před zahájením léčby. Hodnoty exprese se pohybovaly v rozpětí 15 - 166% exprese negativních kontrol s průměrnou hodnotou $67 \pm 45\%$ (Graf 6.14.). Mezi skupinami pacientů s časnými a pokročilými formami MDS se hladina exprese výrazněji nelišila (61 ± 45 a 81 ± 41), ačkoli zvýšená exprese se častěji objevovala u pacientů s RAEB a RAEB-t (2/6, 33%) než u pacientů s RA a RARS (3/16, 19%).

U pacienta č. 25 sledovaného v průběhu onemocnění se exprese výrazněji neměnila (73 a 46%).

Exprese genu *TEP1* pozitivně korelovala s aktivitou telomerázy a expresí genu *TNKS*, byla významněji asociována s počtem blastů v analyzované tkáni, ale nekorelovala s expresemi genů *hTERT*, *c-Myc*, *POT1* a *TRF1* a s délkou telomér (Tab. 10.9.).
Přežití pacientů s MDS nezáviselo na hladině exprese genu *TEP1* (Graf 6.15.).

6.2.4.2. Exprese genu *TEP1* u pacientů se sekundární AML z MDS

Zvýšená exprese genu *TEP1* byla detekována u všech tří studovaných pacientů – 2 pacienti při diagnóze (186 a 126%) a 1 pacient v relapsu onemocnění (103%).

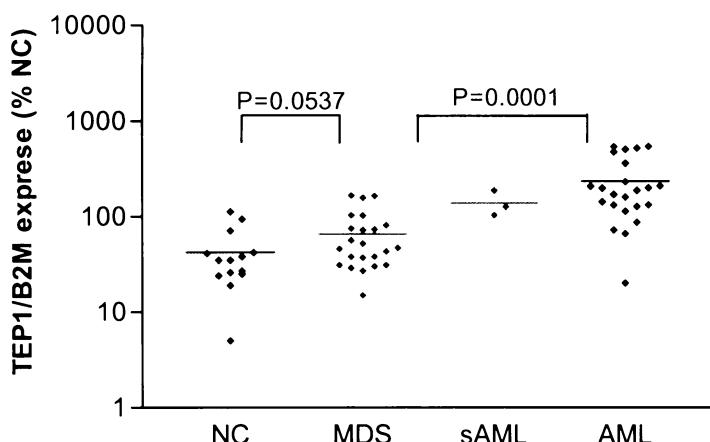
6.2.4.3. Exprese genu *TEP1* u pacientů s AML

Exprese genu *TEP1* byla stanovena u 25 vzorků 23 pacientů s primární AML. Při diagnóze onemocnění byla zvýšená exprese nalezena u většiny pacientů (83%, 19/23) pacientů. Expresce se pohybovala ve velkém rozmezí 20 až 534% exprese NC s průměrnou hodnotou $233 \pm 161\%$ (Graf 6.14.).

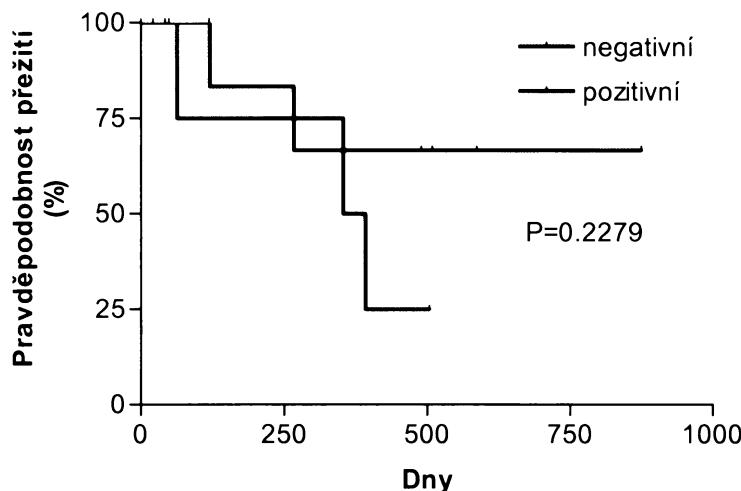
U pacienta č. 1 došlo během léčby při dosažení parciální remise k poklesu exprese přibližně o polovinu původní hodnoty (při diagnóze 208 % a v parc. remisi 114%), u pacienta č. 22 se exprese při diagnóze a v průběhu léčby výrazněji neměnila (537 a 573%).

Exprese genu *TEP1* pozitivně korelovala s expresemi genů *hTERT*, *c-Myc*, *POT1*, *TRF1* a *TNKS*, ale neměla žádný vztah s délkou telomér, telomerázovou aktivitou a počtem blastů v analyzované tkáni (Tab. 10.10.).

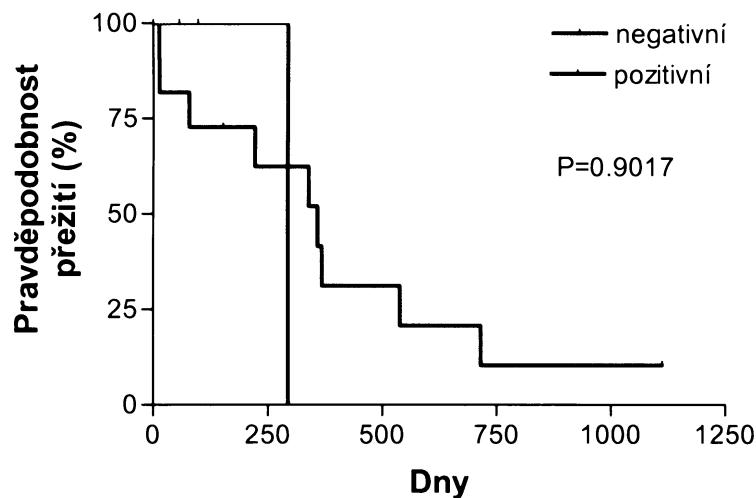
Přežití pacientů s AML nebylo závislé na hladině exprese genu *TEP1* (Graf 6.16.).



Graf 6.14.: Porovnání exprese genu *TEP1* zdravých dárců, pacientů s MDS, sAML a AML se znázorněním významnosti nárůstu exprese pacientů s MDS vzhledem k NC a pacientů s AML vzhledem k pacientům s MDS.



Graf 6.15.: Přežití pacientů s MDS v závislosti na hladině exprese genu *TEPI*.



Graf 6.16.: Přežití pacientů s AML v závislosti na hladině exprese genu *TEPI*.

6.2.5. Expresce genu *TRF1*

6.2.5.1. Expresce genu *TRF1* u pacientů s MDS

Zvýšená expresce genu *TRF1* byla detekována přibližně u třetiny vzorků (36%, 8/22) pacientů s MDS při stanovení diagnózy a před zahájením léčby. Hodnoty expresie se pohybovaly v rozpětí 5 - 226% exprese NC s průměrnou hodnotou $89 \pm 61\%$ (Graf 6.17.). Expresce i podíl pacientů s pozitivními hodnotami *TRF1* expresie se mezi skupinami pacientů s časnými a pokročilými formami MDS výrazněji nelišily (94 ± 66 a 76 ± 42 , resp. 38%, 6/16 a 33%, 2/6).

U pacienta č. 25 sledovaného v průběhu onemocnění vykazovala expresce negativní hodnoty již před zahájením léčby a po dosažení remise ještě poklesla z původních 87 na 38%.

Exprese genu *TRF1* pozitivně korelovala s expresemi genů *hTERT*, *c-Myc*, *POT1* a *TNKS*. Na druhé straně nebyla prokázána signifikantní korelace s délkou telomér, telomerázovou aktivitou, expresí genu *TEP*, skórem rizika podle IPSS a počtem blastů v analyzované tkáni (Tab. 10.9.).

Hladina exprese genu *TRF1* neovlivňovala přežití pacientů s MDS (Graf 6.18.).

6.2.5.2. Exprese genu *TRF1* u pacientů se sekundární AML z MDS

Exprese genu *TRF1* byla studována pouze u 3 pacientů, z nichž pacienti při diagnóze vykazovali zvýšenou hladinu exprese (122 a 142%) a pacient při relapsu onemocnění expresi odpovídající zdravým dárcům (29%).

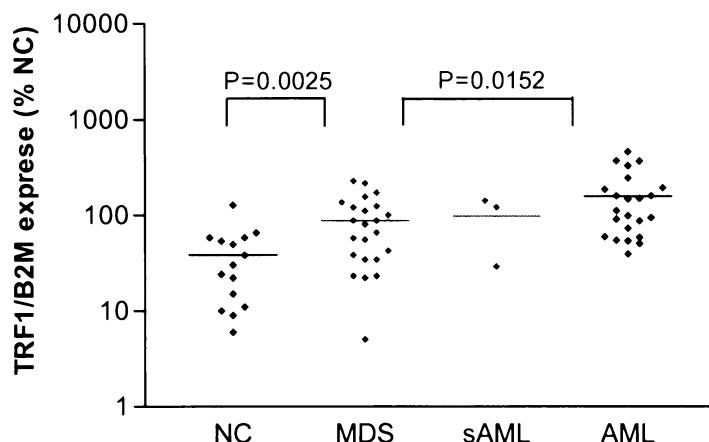
6.2.5.3. Exprese genu *TRF1* u pacientů s AML

Exprese genu *TRF1* byla stanovena u 25 vzorků 23 pacientů s primární AML. Při diagnóze onemocnění byla exprese zvýšená oproti zdravým kontrolám nalezena u asi poloviny pacientů (52%, 12/23) pacientů s průměrnou hodnotou 157% exprese NC (157 ± 116). Exprese měla velký rozsah - pohybovala se v rozmezí 39 až 459% (Graf 6.17.).

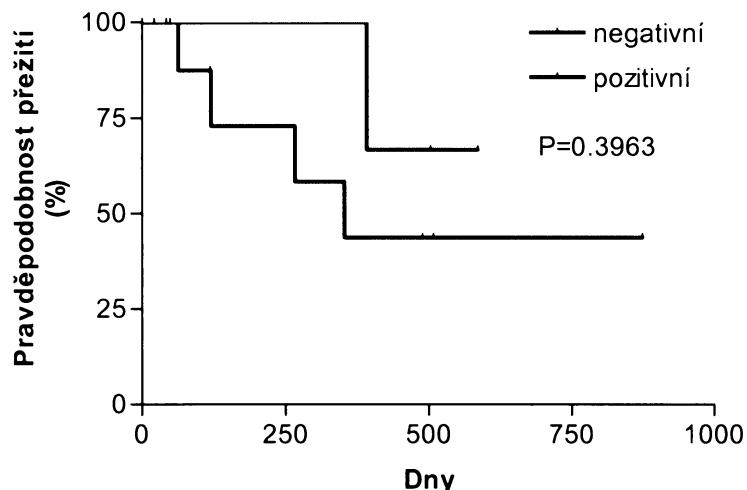
U pacienta č. 22 došlo v průběhu léčby k poklesu exprese ze 364% detekovaných při diagnóze na 244% v průběhu léčby, vzorek pacienta č. 1 vykazoval v parciální remisi dokonce negativní hodnotu (při diagnóze 159 % a v parc. remisi 54%).

Exprese genu *TRF1* byla v pozitivní korelací s expresemi genů *hTERT*, *c-Myc*, *POT1*, *TEP1* a *TNKS*. Signifikantní negativní korelace byla prokázána mezi expresí *TRF1* a délkou telomér. S telomerázovou aktivitou ani s počtem blastů v analyzované tkáni žádný vztah nalezen nebyl (Tab. 10.10.).

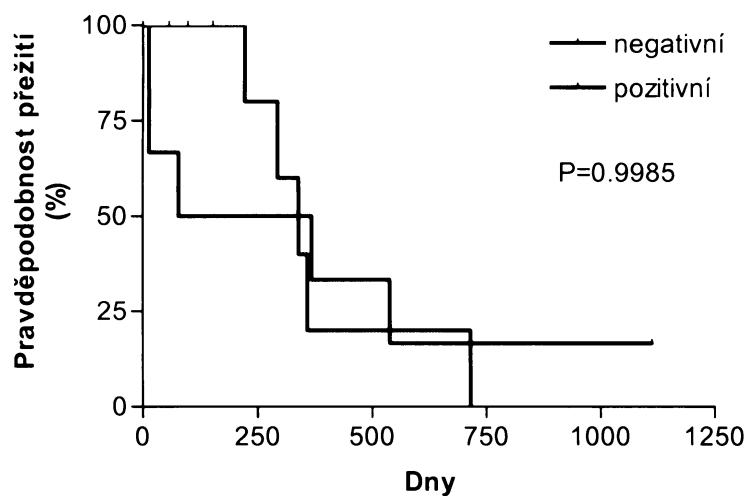
Přežití pacientů s AML nebylo závislé na hladině exprese genu *TRF1* (Graf 6.19.).



Graf 6.17.: Porovnání exprese genu *TRF1* zdravých dárců, pacientů s MDS, sAML a AML se znázorněním významnosti nárůstu exprese pacientů s MDS vzhledem k NC a pacientů s AML vzhledem k pacientům s MDS.



Graf 6.18.: Přežití pacientů s MDS v závislosti na hladině exprese genu *TRF1*.



Graf 6.19.: Přežití pacientů s AML v závislosti na hladině exprese genu *TRF1*.

6.2.6. Expresce genu *TNKS*

6.2.6.1. Expresce genu *TNKS* u pacientů s MDS

Zvýšená expresce genu *TNKS* byla detekována přibližně u třetiny vzorků (35%, 9/26) pacientů s MDS při stanovení diagnózy a před zahájením léčby. Hodnoty expresie se pohybovaly v rozpětí 7 - 355% exprese NC s průměrnou hodnotou $106 \pm 84\%$ (Graf 6.20.). Průměrná expresce pacientů s časnými formami MDS měla hodnotu nepřekračující referenční interval zdravých kontrol ($92 \pm 71\%$), přičemž zvýšenou expresi vykazovala pouze čtvrtina z nich (26%, 5/19). Expresce genu *TNKS* se zvyšovala v průběhu progrese onemocnění: u pacientů s pokročilými formami MDS



byla častěji na pozitivní úrovni (57%, 4/7 pacientů) a průměrná exprese této skupiny tak vzrostla až na $149 \pm 104\%$.

U pacienta č. 25 sledovaného v průběhu onemocnění vykazovala exprese pokles ze 186% detekovaných při diagnóze až na negativní hodnotu 44% v kompletní remisi.

Expresu genu *TNKS* vykazovala pozitivní korelace s expresemi genů *c-Myc*, *POT1*, *TEP1* a *TRF1*. Dále byla významněji asociována s aktivitou telomerázy a expresí genu *hTERT*, ale nekorelovala s délkou telomér, se skórem rizika podle IPSS a počtem blastů v analyzované tkáni (Tab. 10.9.).

Přežití pacientů s MDS nesouviselo s hladinou exprese genu *TNKS* (Graf 6.21.).

6.2.6.2. Expresu genu *TNKS* u pacientů se sekundární AML z MDS

Expresu genu *TNKS* byla studována u 5 pacientů, z nichž 75% (3/4) vykazovalo při diagnóze a před zahájením léčby zvýšenou hladinu exprese, zatímco pacient při relapsu onemocnění měl překvapivě hladinu exprese odpovídající zdravým dárcům (78%).

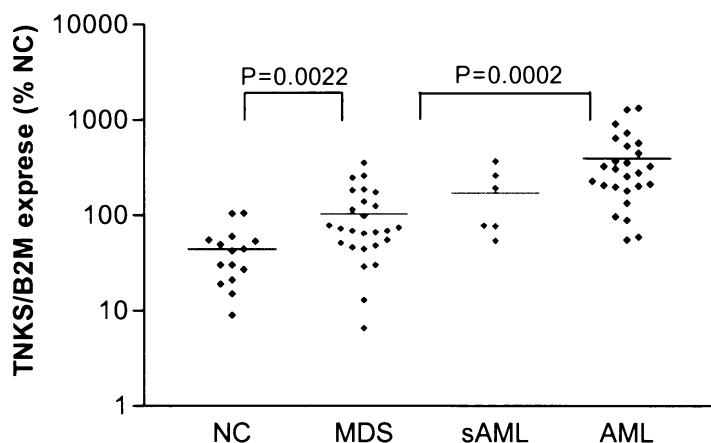
6.2.6.3. Expresu genu *TNKS* u pacientů s AML

Expresu genu *TNKS* byla stanovena u 28 vzorků 26 pacientů s primární AML. Při diagnóze onemocnění byla u většiny z nich (85%, 22/26) nalezena zvýšená exprese v porovnání s referenčními hodnotami zdravých kontrol. Pohybovala se ve značném rozmezí 55 až 1326% exprese NC s průměrnou hodnotou $395 \pm 332\%$ (Graf 6.20.).

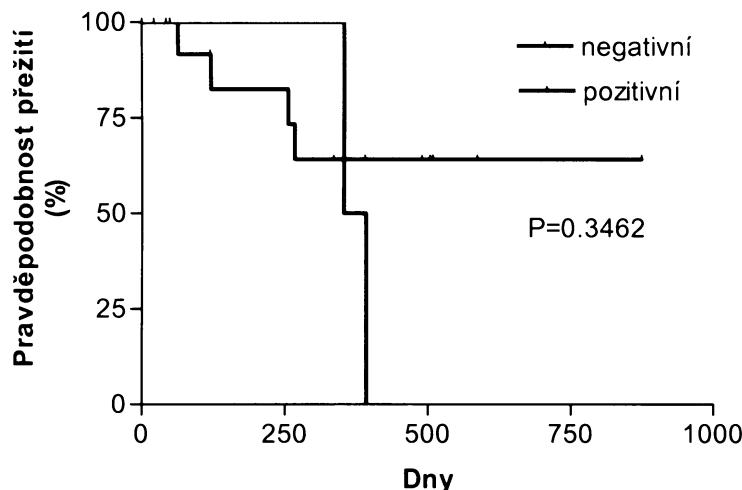
Pacient č. 1 vykazoval významný pokles exprese při porovnání vzorků při diagnóze (530%) a v parciální remisi (80%), kdy exprese odpovídala hodnotám zdravých kontrol. Podobně došlo k poklesu exprese u pacienta č. 22 z 569% detekovaných při diagnóze na 396% zjištěných v průběhu léčby.

Expresu genu *TNKS* pozitivně korelovala s expresemi genů *c-Myc*, *POT1*, *TEP1* a *TRF1*, byla významněji asociována s počtem blastů v analyzované tkáni, ale nebyla ve vztahu s aktivitou telomerázy, s délkou telomér a expresí genu *hTERT* (Tab. 10.10.).

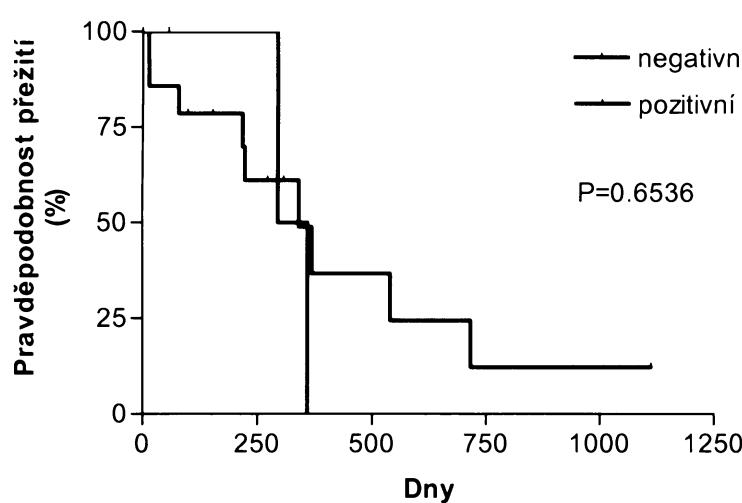
Přežití pacientů s AML nezáviselo na hladině exprese genu *TNKS* (Graf 6.21.).



Graf 6.20.: Porovnání exprese genu *TNKS* zdravých dárců, pacientů s MDS, sAML a AML se znázorněním významnosti nárůstu exprese pacientů s MDS vzhledem k NC a pacientů s AML vzhledem k pacientům s MDS.

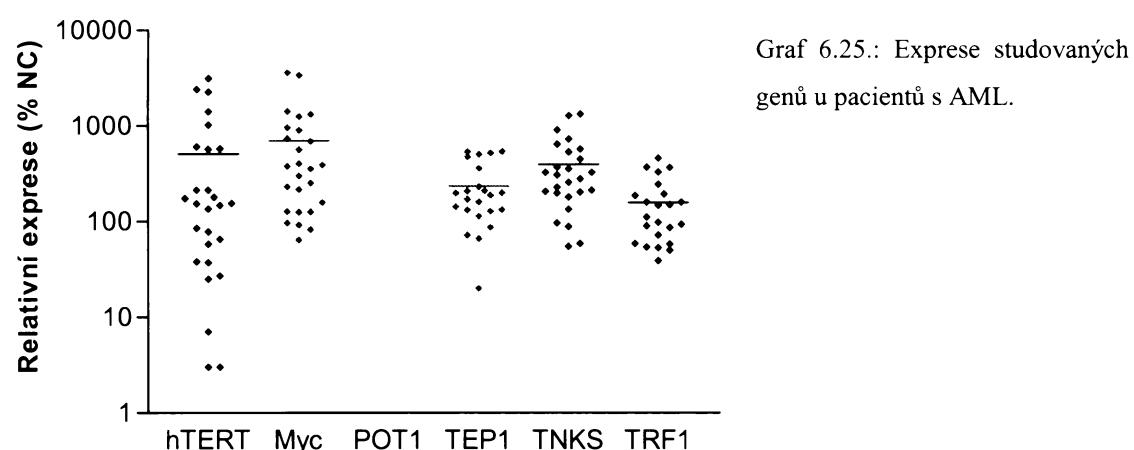
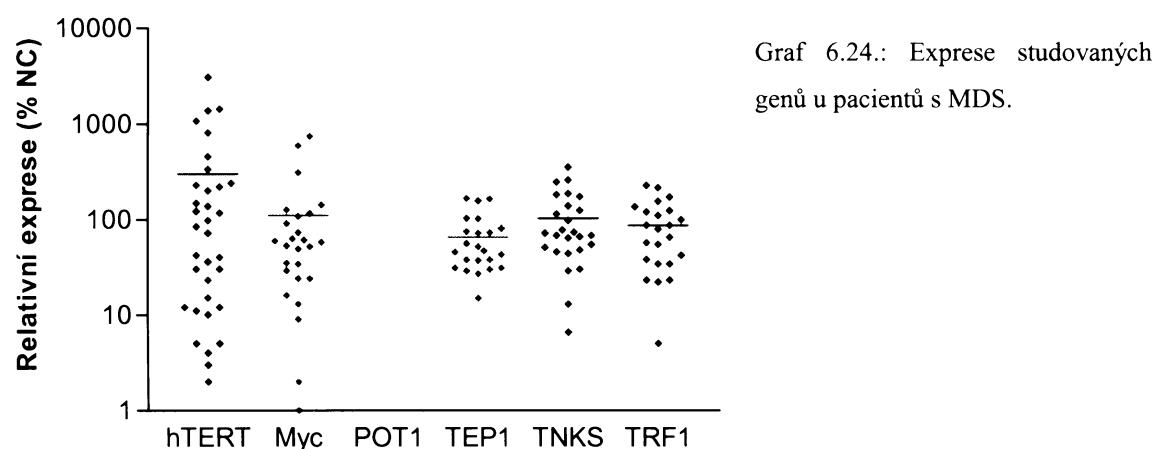
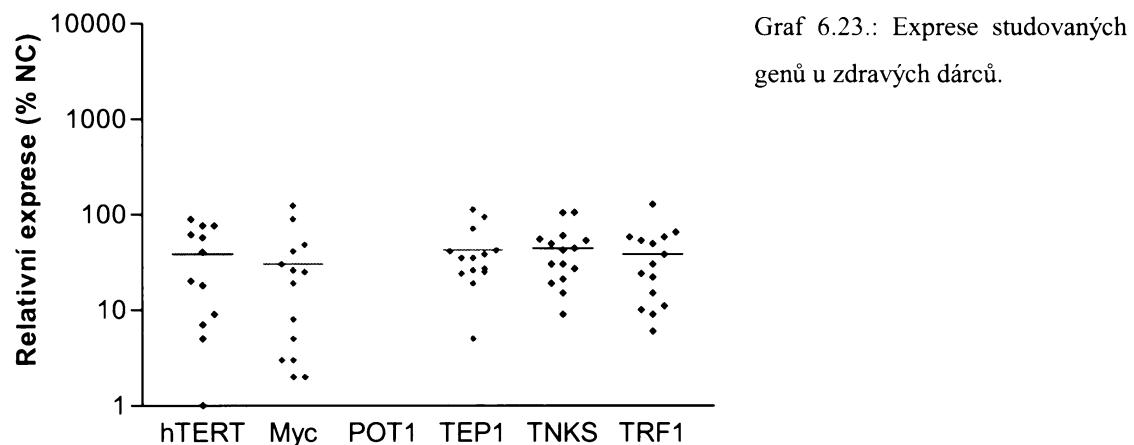


Graf 6.21.: Přežití pacientů s MDS v závislosti na hladině exprese genu *TNKS*.



Graf 6.22.: Přežití pacientů s AML v závislosti na hladině exprese genu *TNKS*.

Níže uvedené grafy znázorňují vzájemné porovnání expresních profilů všech studovaných genů: u zdravých dárců (Graf 6.23.), u pacientů s MDS (Graf 6.24.) a u pacientů s AML (Graf 6.25.).



7. DISKUSE

7.1. TELOMERÁZOVÁ AKTIVITA

7.1.1. Publikované výsledky a příčiny jejich nesouladu

Vzhledem ke skutečnosti, že normální krvetvorné buňky exprimují určitou hladinu telomerázy, je důležité analyzované vzorky pacientů porovnat s referenčními hodnotami zdravých jedinců. V této práci jsme považovali výsledek kvantifikace telomerázové aktivity za pozitivní teprve tehdy, když zjištěné hodnoty přesahovaly průměrnou hodnotu TA zdravých kontrol kostní dřeně a periferní krve navýšenou o dvě směrodatné odchylky. Stanovení pozitivity či negativity vzorku však není u dosud publikovaných studií jednotné. Zpravidla se autoři shodují v tom, že své výsledky vztahují ke zdravým jedincům, avšak kriterium pozitivity bývá různě stanoveno: jako pozitivní může být označen i vzorek s aktivitou vyšší než byla nalezena u zdravé kontroly (např. Xu et al., 1998). Byla však publikovaná studie, kde byl za pozitivní označen nález telomerázové aktivity vyšší než byla průměrná hodnota TA stanovená u daného souboru pacientů (např. Gurkan et al., 2005). Jak již bylo uvedeno, v naší studii jsme zvolili přísnější kritérium, takže určená hranice, která je přibližně o 300% vyšší než je průměr negativních kontrol, by tudiž měla opravdu odrážet jen značný nárůst aktivity telomerázy. V ideálním případě by pacienti měli být srovnáváni s věkově odpovídajícími jedinci, díky zjištěným rozdílům v telomerázové aktivity a délce telomér v závislosti na věku jedince (Iwama et al. 1998). I přesto, že náš soubor zdravých dárců byl poměrně rozsáhlý (41 jedinců), jeho rozdělení na jednotlivé věkové kohorty by znamenalo vytvoření statisticky nevýznamných skupin. I touto cestou mohou vzniknout rozdíly ve výsledcích jednotlivých autorů v závislosti na složení kontrolního souboru. Polemizovat o důležitosti správného stanovení pozitivity a negativity vzorku se může zdát nepodstatné, přesto je právě prognostický odhad přežití za základě aktivity telomerázy tímto faktorem nejvíce ovlivněn. Pro individuálního pacienta je však spíše podstatnější sledování dynamiky telomerázové aktivity v průběhu onemocnění.

Dalším faktorem, který může být příčinou nejednotnosti výsledků různých studií je typ analyzované tkáně. Z porovnání našich výsledků aktivit telomerázy detekovaných v periferní krvi a kostní dřeni pacientů s MDS nevyplývá jednoznačný závěr, neboť aktivita stanovená v kostní dřeni nebyla vždy vyšší (jak bychom předpokládali díky přítomnosti většího podílu blastických buněk). Přesto Gurkan et al. (2005) detekoval

vyšší aktivitu v kostní dřeni, rozdíl však nepovažoval za signifikantní ve srovnání s periferní krví i přesto, že průměrná hodnota zde zjištěná byla přibližně o 30% nižší než ta v kostní dřeni.

7.1.2. Telomerázová aktivita u hematologických malignit

Myelodysplastický syndrom je heterogenní skupina onemocnění vznikající na základě poškození DNA kmenové hematopoetické buňky vedoucí výsledně k neefektivní hematopoéze díky předčasné apoptóze buněk. Prognóza pacientů je stanovena na základě skóre rizika určeného podle IPSS na základě podílu blastických buněk v kostní dřeni, cytogenetického nálezu a počtu cytopénii v periferní krvi. Do takto stanoveného odhadu rizika se ale nepromítou další potencionální prognostické faktory - genetické a epigenetické změny, které mohou vést k postupné transformaci buněk a přispívat k progresi onemocnění. Mezi tyto molekulárně genetické mechanismy jsou řazeny bodové mutace N-Ras genu, metylace tumor supresorového genu p15 a v neposlední řadě změny teloméro-telomerázového komplexu.

V naší studii jsme se zaměřili především na pacienty s MDS, kteří jsou vhodným modelem pro studium změn na molekulární úrovni souvisejících s možnou transformací v akutní myeloidní leukémii. Vzorky získané z poměrně rozsáhlého souboru pacientů, ve srovnání s dosud publikovanými údaji, nám umožnily sledovat vývoj změn telomero-telomerázového komplexu od časných forem MDS přes pokročilé formy až k sekundární AML z MDS, stejně jako jeho stav u primární akutní leukémie a odhalit tak změny složek teloméro-telomerázového komplexu předcházející leukemické transformaci a jejich využitelnost při charakteristice a prognóze onemocnění.

Naše výsledky ukazují, že pozitivní telomerázová aktivita, zvýšená oproti hodnotám zdravých kontrol, je u MDS časnou změnou, která předchází klinické znaky progrese onemocnění, jako je přítomnost blastických buněk v kostní dřeni. Její signifikantní nárůst byl zaznamenán v mononukleárních buňkách kostní dřeně téměř poloviny pacientů s časnými formami MDS, ačkoli většina dosud publikovaných prací výrazný nárůst telomerázové aktivity nedokládá (Ohyashiki et al., 2002). Telomerázová aktivita se dále zvyšuje směrem k blastickým formám MDS, její nárůst ale není již tak signifikantní. K podobnému závěru dospěl i Gurkan et al. (2005), který sice detekoval vyšší hladinu TA u pacientů s větším počtem blastů v kostní dřeni, ale rozdíl nebyl příliš významný v porovnání s pacienty s menším podílem blastů.

V našem souboru pacientů jsme neprokázali signifikantní korelaci aktivity telomerázy s podílem blastických buněk v kostní dřeni, což je částečně vysvětlitelné výše uvedenou skutečností. U individuálních pacientů sledovaných dlouhodoběji ale pokles a nárůst aktivity odpovídal změnám podílu blastických buněk v kostní dřeni. Hladina telomerázy rovněž nesouvisela se skórem rizika stanoveného dle IPSS, které odráží, kromě počtu pancytopenii v periferní krvi a karyotypického nálezu i podíl blastických buněk v kostní dřeni. Prognostickou významnost telomerázové aktivity naznačil již Gurkan et al. (2005), který zaznamenal signifikantně delší přežití u pacientů s negativními hodnotami telomerázové aktivity. Podobný trend jsme pozorovali i my, když déle než 5 let se dožíval podstatně menší podíl pacientů s pozitivní (30%), než negativní TA (75%), přestože Kaplan-Meierovy křivky přežití nebyly významně odlišné ($P = 0.071$). Zvýšená telomerázová aktivity byla zpravidla spojena se zkrácenými telomérami nebo eroze telomér předcházela nárůstu aktivity a byla tak v souladu s předpokladem teorie buněčného stárnutí, kdy reaktivace telomerázy je důsledkem kritického zkrácení telomér. Další podpůrný argument při využití TA jako prognostického faktoru je tedy signifikantní negativní korelace s délkou telomér ($P = 0.0465$). Právě stanovení délky telomér bývá autory pochopitelně spíše považováno za prognosticky významější, než stanovení aktivity telomerázy (Ohyashikiet al., 2002). Souvislost zkrácených telomér s indexem rizika (IPSS) jsme prokázali i my (Sieglová et al. 2004). Zdali budou u podílu pacientů s MDS detekovány jen zkrácené teloméry nebo už i zvýšená aktivity telomerázy je pravděpodobně závislé i na době, kdy dojde ke stanovení diagnózy. Zatímco u vzorků pacientů odebraných při stanovení diagnózy se setkáváme stejně často s jen erodovanými telomérami nebo s erodovanými telomérami a aktivovanou telomerázou, u kontrolních vzorků většiny pacientů odebraných v průběhu nemoci je zkrácení telomér již doprovázeno i zvýšenou aktivitou telomerázy.

Aktivita telomerázy dále postupně narůstá i u pacientů se sekundární AML z MDS a nejvyšší hladiny jsou zjištěné u pacientů s akutními leukemiemi. Zvýšená telomerázová aktivity je tak znakem většiny (80%) pacientů s AML a její hladina je významně vyšší než u pacientů s MDS a v průměru přibližně 100x vyšší než u zdravých dárců.

Vysoký podíl pacientů se zvýšenými hodnotami telomerázové aktivity byl pozorován i v dřívějších studiích: Seol et al. (1998) 100% pacientů s AML, Xu et al. (1998) 77% a Ohyashiki et al. (2002), který ve své práci shrnuje výsledky různých autorů, týkající se výzkumu telomerázové aktivity, uvádí, že přibližně jednu třetinu pacientů s akutní

leukémií charakterizuje zvýšená hladina aktivity telomerázy a polovinu pacientů vysoká hladina.

Mezi skupinami pacientů s jednotlivými FAB subtypy AML nebyly nalezeny rozdílné hladiny telomerázové aktivity v krvetvorných buňkách. Pravděpodobně tedy nezávisí na tom, z jaké prekurzorové řady se akutní leukémie vyvinula, a hladina telomerázové aktivity by tak mohla být nespecifickým markérem AML. Signifikantní variabilitu TA v závislosti na FAB subtypu AML neprokázal ve shodě s našimi výsledky ani Gurkan et al. (2005).

Prokázaná signifikantní korelace telomerázové aktivity s podílem blastů v analyzované tkáni tedy svědčí pro možnost využití této komponenty teloméro-telomerázového komplexu jako univerzálního markéru pro sledování úspěšnosti léčby pacientů s AML, pro prognózu progrese onemocnění, a to i přesto, že jsme neměli možnost longitudinálního sledování dynamiky telomerázové aktivity u více pacientů. Část z nich totiž postoupila léčbu alogenní transplantací HSCT a byla tak z dalšího sledování vyřazena. Zmenšení souboru o tyto pacienty, kteří většinou vykazovali pozitivní hladinu TA, může být jedním z důvodů neprůkazného rozdílu v přežívání pacientů s AML v závislosti na pozitivitě či negativitě výsledku stanovení TA. Dalším důvodem může být celkový charakter akutní leukemie – její molekulární podstata, spočívající v nahromadění změn v genomu kmenových buněk. I tyto změny se také mohou odrazit v odhadu přežití pacientů s AML a to pak nemusí nutně korespondovat s hladinou aktivity telomerázy.

7.2. EXPRESE STUDOVANÝCH GENŮ

7.2.1. Exprese genů *hTERT* a *c-Myc*

Katalytická subjednotka telomerázy, kódovaná genem *hTERT*, je považována za hlavní faktor ovlivňující aktivitu telomerázy. Její zvýšená exprese u maligních onemocnění byla popsána řadou autorů, jen málo prací se však zabývalo hematologickými malignitami. Cheng et al. (2003) popisuje signifikantně zvýšenou expresi genu *hTERT* pacientů s akutní leukémií v porovnání s normálními kontrolami a asociaci exprese *hTERT* genu se zvýšenými hladinami exprese genu *c-Myc* a telomerázové aktivity. Signifikantní korelaci *hTERT* s telomerázovou aktivitou u AML popsali i Xu et al. (1998) a Uchida et al. (1999). V našem souboru pacientů docházelo k nárůstu exprese

již u necelé poloviny pacientů s MDS, a to již u časných forem, stejně jako to publikoval i Bock et al. (2004). Hladina i podíl pacientů s pozitivní hladinou exprese byl nejvyšší u pacientů s AML. Studium exprese *hTERT* genu sice potvrdilo vztah s expresí genu *c-Myc*, pozitivní korelací s telomerázovou aktivitou jsme ale neprokázali. Lze však předpokládat, že telomerázová aktivita následuje nárůst genové exprese, ale v regulaci její činnosti se mohou uplatnit i další proteiny a tudíž telomerázová aktivita nemusí nutně kopírovat expresní profil *hTERT*.

7.2.2. Expresce genu *POT1*

I přesto, že Colgin et al. (2003) označil POT1 za pozitivní regulátor délky telomér závislý na telomeráze, Lei et al. (2000) ukázal, že jeho funkce se odvíjí od umístění jeho vazby vzhledem k 3' konci DNA. POT1 tak může inhibovat telomerázovou aktivitu nebo při vazbě blíže k centroméře umožní telomeráze lepší přístup k substrátu. Ve shodě s předpokladem, že jeho exprese bude působit v souladu s telomerázou, jsme prokázali signifikantní korelací individuální telomerázové aktivity a exprese genu *POT1* u pacientů s MDS. Neprokázali jsme však tentýž vztah u pacientů s AML a ani vliv *POT1* exprese na délku telomér, stejně tak jako byla neprůkazná korelace mezi telomerázovou aktivitou a délkou telomér daného souboru pacientů. Expresce genu vykazovala vzrůstající tendenci s progresí a leukemizací MDS s nejvyššími hodnotami detekovanými u pacientů se sekundární AML z MDS. Ačkoli exprese genu *POT1* u pacientů s MDS a akutní leukémií zatím studována nebyla, při studiu nádorů žaludku obdržel podobný trend jako my i Kondo et al. (2004), který u pacientů v pokročilejších stádiích III a IV častěji zjistil zvýšenou expresi *POT1* genu v porovnání se stádií I a II.

7.2.3. Expresce genu *TEP1*

Překvapivě zvýšená exprese genu *TEP1*, ačkoli ne příliš významně rozdílná oproti normálním kontrolám, byla detekovaná již u pacientů s MDS. Průměrná hodnota se ale pohybovala na negativní úrovni a teprve další nárůst do pozitivních hodnot exprese byl detekován u pacientů s transformací do sAML z MDS. V dosavadních studiích není tomuto genu přisuzována větší významnost v regulaci telomerázové aktivity, zpravidla díky zjištěním, že jeho exprese se neměnila ani v průběhu diferenciace hematopoetických buněk nebo mezi různými typy buněk (Uchida et al., 1999), ani mezi jednotlivými pacienty s AML (Xu et al., 1998).

Zvýšená exprese *hTERT* genu pravděpodobně znamená i zvýšenou potřebu proteinů, které jsou zapojeny do uspořádávání a lokalizace telomerázové ribonukleoproteinové partikule, jejichž představitelem je právě protein TEP1. Jeho zvýšená exprese by pak souvisela s expresí *hTERT* genu, tak jak jsme to i zjistili u pacientů s AML, ačkoli tento vztah nebyl zatím potvrzen jinými autory (Xu et al. 1998).

7.2.4. Expresi genu *TRF1*

Nečekaným výsledkem naší studie byla i zvýšená exprese genu *TRF1*, který působí především v negativní regulaci délky telomér a očekávali bychom tak spíše sníženou expresi u pacientů s MDS a AML ve srovnání se zdravými dárci, podobně jako ji obdrželi u AML Shi et al. (2006) a Sun et al. (2004b). Naše výsledky ukazují zvýšenou expresi již u podílu pacientů s MDS a hodnota exprese stejně jako podíl pozitivních pacientů je u AML vyšší než u MDS.

Zvýšenou expresi genu *TRF1* můžeme považovat za obranný mechanismus buňky, která se tak snaží vysytit dvouvláknové úseky telomér a zabránit tak přístupu telomerázy a její funkci. Vysoká exprese pak vede ke zkracování telomér, jak bylo např. dokumentováno studiemi na buněčných liniích (Smogorzewska et al., 2000). Zvýšenou expresi rovněž detekovali i Matsutani et al. (2001) u pacientů s nádory žaludku. Vysvětluje ji tím, že krátké telomery s chromosomovou nestabilitou mají potřebu se stabilizovat prostřednictvím T a D smyčky, pro jejichž tvorbu a udržení je *TRF1* protein důležitý. Výrazně zvýšenou expresi *TRF1* detekoval především u nádorů s velice krátkými telomérami (kratší než 2 kbp), které také exprimovali signifikantně vyšší hladiny telomerázové aktivity. Podobně jsme i my detekovali postupný nárůst exprese od zdravých kontrol, přes pacienty s MDS až k pacientům s AML, kteří byli také charakterizováni významnou erozí telomér (Sieglová et al. 2003). U pacientů s AML jsme navíc prokázali signifikantní negativní korelací exprese genu *TRF1* s délkou telomér, což podporuje výše zmíněnou teorii.

7.2.5. Expresi genu *TNKS*

Zvýšená exprese tankyrázy, považované za pozitivní regulátor telomerázové aktivity, byla popsána Sun et al. (2004a) v myeloidních leukemických liniích, ale u pacientů s hematologickými malignitami zatím studovaná nebyla. V našem souboru pacientů

dochází ke zvýšení exprese již u pacientů s MDS, přesto většina z nich vykazovala normální hladiny exprese. Up-regulace byla spíše znakem pacientů s AML, i když zrovna u tohoto souboru pacientů jsme neprokázali vztah ani s expresí genu *hTERT* ani s telomerázovou aktivitou.

7.2.6. Exprese regulátorů telomerázové aktivity u hematologických malignit

Exprese všech studovaných genů měla obecně vzrůstající tendenci od časných forem MDS přes pokročilé formy po konverzi do sAML z MDS, stejně tak byly vysoké hladiny charakteristické pro akutní leukémii před zahájením léčby. Na jedné straně stoupala hladina genové exprese a na straně druhé rostl podíl pacientů s jejími pozitivními hodnotami. Při vzájemném srovnání nárůstu exprese patří geny *TRF1* a *TEP1* k těm s menšími hodnotami, čímž mohou podporovat předpoklad, že nepůsobí v pozitivní regulaci teloméro-telomerázového komplexu, resp. plní jen doplňující, méně důležitou úlohu v regulaci telomerázové aktivity. Z tohoto pohledu se jeví jako nejvhodnější potencionální molekulární markéry preleukemických a leukemických buněk a pomocné prognostické faktory MDS a akutní leukémie především exprese genů *hTERT* a *c-Myc*, které vykazovaly nejvyšší nárůst vzhledem ke zdravým dárcům.

Vzájemné korelační vztahy jednotlivých částí teloméro-telomerázového komplexu zjištěné u pacientů s MDS naznačují určité změny, v porovnání se zdravými dárci, jakoby buňky začínaly postupně reagovat na jisté podněty (změny genomu), zatímco u pacientů s AML byly korelace velmi podobné těm, zjištěným u zdravým dárcům a exprese jen vykazovaly předpokládaný nárůst, pravděpodobně způsobený větší proliferací leukemických buněk. Významný nárůst exprese v krvetvorných buňkách pacientů s AML ve srovnání s pacienty s MDS byl zjištěn u všech studovaných genů, kromě genu *hTERT*. Tento stav může být podmíněn aktivací dalších genů, které se uplatňují v regulaci teloméro-telomerázového komplexu a působí především v negativní regulaci telomerázové aktivity a jejich studium nebylo předmětem této práce.

Navíc, kromě genetických změn, může být regulace délky telomér také ovlivněna epigenetickými modifikacemi telomérového chromatinu (Blasco, 2004) a nemusí vlastně být vůbec závislá na aktivitě telomerázy a expresi jejích regulátorů. Telomery leukemických buněk mohou být prodlužovány i alternativními mechanismy nezávislými na telomeráze.

8. ZÁVĚRY

1. V patogeneze MDS dochází k porušení fyziologické rovnováhy teloméro-telomerázového komplexu krvetvorných buněk již velmi brzy, v čase kdy klinický příznak leukemogeneze, jež jsou blastické buňky v kostní dřeni, ještě není přítomen. K signifikantnímu nárůstu telomerázové aktivity oproti zdravým dárcům dochází již u téměř poloviny pacientů s časnými formami MDS (RA a RARS; $P = 0.0006$).
2. Další nárůst telomerázové aktivity pokračuje, i když ne signifikantně, v progresi onemocnění a při leukemické transformaci, společně s počtem blastů v kostní dřeni, tedy směrem k pokročilým formám MDS (RAEB a RAEB) a k sAML z MDS, kdy se podíl pacientů s pozitivními hodnotami zvýšil na 77%. Pro prognostický význam zvýšené telomerázové aktivity pro progresi MDS a leukemizační proces svědčí signifikantní korelace se zkrácenými telomérami i skutečnost, že u pacientů s MDS jsou nízké hladiny aktivity spojené spíše s delším přežitím: ve skupině pacientů s nízkou hladinou TA přežívá více než 5 let 75% pacientů, kdežto ve skupině s vysokou TA pouze přibližně 30% z nich. Za lepší prognostický faktor MDS je však považována délka telomér, a to z důvodu časové posloupnosti jednotlivých změn (kromě jiných i Sieglová et al., 2004).
3. Telomerázová pozitivita se signifikantně vyššími hladinami aktivity než u MDS je charakteristickým znakem krvetvorných buněk většiny pacientů s akutní leukémií před zahájením léčby (80% AML; 86% ALL). Její hladina průkazně souvisí s počtem blastů v analyzované tkání a má klesající tendenci v průběhu léčby, avšak nemá vliv na délku přežití. Protože telomerázová aktivita nezávisí na prekurzorové řadě z niž se akutní leukémie vyvinula, může být jejím univerzálním markérem pro sledování úspěšnosti léčby a prognózu relapsu, a to zejména u pacientů, kteří nemají specifický markér leukemických buněk.
4. Skutečnost, že k porušení rovnováhy teloméro-telomerázového komplexu patří mezi brzké změny genomu v patogeneze MDS se projevuje i zvýšenou relativní expresí většiny studovaných genů pozorované u podílu pacientů s časnými formami MDS (*hTERT* 38%, *c-Myc* 26%, *POTI* 38%, *TEP1* 19%, *TNKS* 26%, *TRF1* 38%). Hodnoty exprese genů *hTERT* a *c-Myc* byly ve vzájemné pozitivní korelací a vykazovaly největší nárůst oproti zdravým dárcům a byly vysoce variabilní, což by mohlo představovat výhodu při sledování jejich dynamiky. Vysoké hodnoty exprese byly charakteristické spíše pro buňky kostní dřeně pacientů s pokročilými formami

- MDS. Přestože vysoká exprese genu *hTERT* nekorelovala s telomerázovou aktivitou, byla většinou doprovázena pozitivní hladinou TA a zkrácenými telomérami a byla významněji spojena s expresem genů *POT1* a *TNKS* a počtem blastů v analyzované tkáni. Expresi genu *c-Myc* byla též spojena se expresem pozitivních regulátorů telomerázové aktivity kódovaných geny *POT1* a *TNKS*.
5. Pozitivní hodnoty exrese studovaných genů jsou též charakteristické vždy pro více než polovinu pacientů s primární AML před zahájením léčby (*hTERT* 59%, *c-Myc* 81%, *POT1* 78%, *TEP1* 83%, *TNKS* 85%, *TRF1* 52%).
 6. Co se týče regulace telomerázové aktivity i délky telomér, naše výsledky naznačují, že se jedná o komplexnější proces než se dosud předpokládalo a v určitých fázích může být i potlačována role pozitivních regulátorů *hTERT* a *TNKS*. Hladina telomerázové aktivity totiž neodráží expresi *hTERT* genu, považovaného za její hlavní pozitivní regulátor. U pacientů s MDS telomerázová aktita významně korelovala s expresí genu *POT1*, jehož produkt v konečném důsledku umožnuje vazbu telomerázy na telomery a „ochraňuje“ je tak před erozí. Nejnižší nárůsty exprese studovaných genů byly zaznamenány u *TEP1* a *TRF1*, které jsou spíše důležité v uspořádání telomerázové ribonukleoproteinové partikule, resp. mají úlohu v negativní regulaci délky telomér a aktivity telomerázy. Zvýšená exprese *TRF1* a její signifikantní negativní korelace s délkou telomér naznačuje, úlohu TRF1 proteinu v obranném mechanizmu buňky prostřednictvím znemožnění vazby telomerázy na telomery.

Z výše uvedené rekapitulace hlavních výsledků vyplývá, že nadějnými prognostickými faktory MDS se jeví především expresní profily genu *hTERT*, kódující katalytickou subjednotku telomerázy, a genu kódujícího transkripční faktor *c-Myc*. Určení konkrétnějších závěrů o jejich prognostické významnosti však vyžaduje rozšíření souboru a delší sledování pacientů v průběhu onemocnění, což v současnosti probíhá v rámci výzkumného projektu č. 0002373601 Ministerstva zdravotnictví

Zvýšení exprese genu *hTERT* tedy považujeme za lepší prognostický faktor a nespecifický molekulární markér než je zvýšená aktita telomerázy, protože kromě jiného ji časově předchází. Přesto je, zejména vzhledem k výše uvedenému předpokladu větší komplexnosti regulace telomerázy, důležité i sledování její aktivity, protože právě na ní závisí stabilizace telomér leukemických buněk umožňující jejich neomezenou proliferaci. Navíc, citlivá metoda kvantifikace telomerázové aktivity modifikovanou

metodou TRAP má přednost pro rutinní klinickou praxi, spočívající v potřebě malého množství vstupního materiálu v porovnání s ostatními metodikami použitými v této práci.

Znalosti telomerázové aktivity a délky telomér spolu s precizním určením expresních profilů genů *hTERT* a *c-Myc*, prostřednictvím RT PCR v reálném čase, jsou důležité zejména u pacientů s časnými formami MDS, aby mohlo být upřesněno jejich individuální riziko a uplatněná optimální léčba i s perspektivou jejího zacílení na snížení telomerázové aktivity. Pro některé z těchto metodik budou vypracovány standardní operační postupy pro rutinní akreditované vyšetření v Národní referenční laboratoři pro DNA diagnostiku.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ODKAZŮ

1. Adam Z, Vorlíček J a kolektiv: Hematologie II. 2001 GRADA Publishing, spol. s.r. o.
2. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Základy buněčné biologie. 2003 Espero Publishing (český překlad)
3. Banik SSR, Guo Ch, Smith AC, Margolis SS, Richardson DA, Tiradao CA, Counter ChM: C-terminal regions of the human telomerase catalytic subunit essential for in vivo enzyme activity. Mol Cell Biol. 2002; 22: 6234-6246
4. Baumann P, Cech TR: Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. Science 2001; 292: 1771-1175
5. Baur JA, Zou Y, Shay JW, Wright WE: Telomere position effect in human cells. Science 2001; 292: 2075-2077
6. Bechter OE, Eisterer W, Dlaska M, Kühr T, Thaler T: CpG island methylation of the hTERT promoter is associated with lower telomerase activity in B-cell lymphocytic leukemia. Exp Hematol. 2002; 30: 26-33
7. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJM, Hokland P, Gabert J: Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using real-time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. Leukemia 2003; 17: 2474-2486
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br J Haematol. 1982;51(2):189-99.
9. Blasco MA: Telomeres in cancer therapy. J Biomed Biotechnol. 2001; 1: 3-4
10. Blasco MA: Telomere epigenetics: a higher-order control of telomere length in mammalian cells. Carcinogenesis 2004; 25 (7): 1083-1087
11. Bock O, Serinsoz E, Schlue J, Kreipe H: Different expression levels of the telomerase catalytic subunit hTERT in myeloproliferative and myelodysplastic diseases. Leuk Res. 2004; 28(5): 457-60
12. Bryan TM, Cech TR: Telomerase and the maintenance of chromosome ends. Curr Opin Cell Biol. 1999; 11: 318-324
13. Cerni Ch: Telomeres, telomerase, and myc. An update. Mutat Res. 2000; 462: 31-47
14. Colgin LM, Baran K, Baumann P, Cech TR, Reddel RR: Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. Curr Biol. 2003; 13: 942-946.

15. Corey DR: Telomerase inhibition, oligonucleotides, and clinical trials, *Oncogene*; 2002; 21: 631-637
16. Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S: Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 1995; 85 (9): 2315-20
17. Čermák J.: Myelodysplastický syndrom. Doporučené postupy pro praktické lékaře. 2002. www.cls.cz/dp
18. Delforge M.: Understanding of pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Hematol J.* 2003; 4 (5): 303-309
19. Dessain S. K., Yu H., Beijersbergen R. L., Weinberg R. A.: Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res.* 2000; 60 (3): 537-541
20. Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, Pettengell R, Han W, Moore MAS: Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 1997; 1: 182-193
21. Engelhardt M, Ozkaynak MF, Drulinsky P, Sandoval C, Tugal O, Jaybose S, Moore MAS: Telomerase activity and telomere length in pediatric patients with malignancies undergoing chemotherapy. *Leukemia* 1998; 12: 13-24
22. Fang JY, Chen YX, LU J, Lu R, Yang L, Zhu H, Gu WQ, Lu LG: Epigenetic modification regulates both expression of tumor-associated genes and cell cycle progression in human colon cancer cell lines: Colo-320 and SW1116. *Cell Res.* 2004; 14 (3): 217-226
23. Friedman B: *Hematologie v praxi*. 1994 Galén
24. Geng Z, Zhang D, Liu D: Expression of telomerase hTERT in human non-small cell lung cancer and its correlation with c-myc gene. *Chin Med J.* 2003; 116 (10): 1467-70
25. Goytisilo FA, Blasco MA: Many ways to telomere dysfunction: in vivo studies using mouse models. *Oncogene* 2002; 21: 584-591
26. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J: International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; 89(6): 2079-88.
27. Guilleret I., Yan P., Grange F., Braunschweig R., Bosman F. T., Benhettar J.: Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int J Cancer.* 2002; 101: 335-341
28. Gurkan E, Tanriverdi K, Baslamisli F: Telomerase activity in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2005; 29: 1131-1139

29. Hantina J, Reischig J: Molekulární biologie buněčné immortalizace a její vztah ke karcinogenezi. Klinická onkologie 2001; 14: 145-153
30. Harris NL, Jaffe DS, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.* 1999;17(12): 3835-49.
31. Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR: Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 2002; 21: 598-610
32. Herbert BS, Pitts AE, Baker SE, Hamilton SE, Wright WE, Shay JW, Corey DR: Inhibition of human telomerase in immortal cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1999; 96: 14276-14281
33. Hofmann W, Lübbert M, Hoelzer D, Koeffler HP: Myelodysplastic syndromes. *Hematol J.* 2004; 5: 1-8 Review
34. Cheng X, Chen ZX, Wang W, Fu JX, Cen JN, Ayo L: Relationship among telomerase activity, expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), and expression of c-myc in acute leukemia. *Ai Zheng.* 2003; 22 (11): 1175-9 (publikace v čínštině)
35. Chomczynski P, Sacchi N: Single stand method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162: 156-9
36. Iwama J, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Hayashi S, Yamata N, Ando K, Toyama K, Hoshika A, Takasaki M, Mori M, Shay JW: Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet.* 1998; 102: 397-402
37. Kaminker PG, Kim S-H, Tylor R, Zebarjadian Y, Funks WD, Morins GB, Yanswen P, Campisi J: TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem.* 2001; 276 (38): 35891-35899
38. Kickhoefer VA, Stephen AG, Harrington L, Robinson MO, Rome LH: Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1. *J Biol Chem.* 1999; 274: 32712-32717
39. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW: Specific association of human telomerase activity with immortal cell and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-2015
40. Kim NW, Wu F: advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acid Res.* 1997; 25 (13): 2595-2597

41. Kondo T, Oue N, Yoshida K, Mitani Y, Naka K, Nakayama H, Yasui W: Expression of POT1 is associated with tumor stage and telomere length in gastric carcinoma. *Cancer Res.* 2004; 64(2): 523-9
42. Lansdorp PM: Telomere length and proliferation potential of hematopoietic cells. *J Cell Sci.* 1995; 108: 1-6
43. Lei M, Zaug AJ, Podell ER, Cech TR: Switching human telomerase on and off hPOT1 protein in vitro. *J Biol Chem.* 2005; 280(21): 20449-56
44. Li B, Yang J, Andrews C, Chen Y, Toofanfar P, Huang R, Horvath E, Chopra H, Raza A, Preisler HD: Telomerase activity in preleukemia and acute myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 2000; 36: 579-587
45. Liu Y, Snow BE, Hande MP, Baerlocher G, Kickhoefer VA, Yeung D, Wakeham A, Itie A, Siderovski DP, Lansdorp PM, Robinson MO, Harrington L: Telomerase-associated protein TEP1 is not essential for telomerase activity or telomere length maintenance in vivo. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 8178-8184
46. Liu J-P: Studies of the molecular mechanism in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 1999; 13: 2091-2104
47. Loayza D, de Lange T.: POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 2003; 423: 1013-7
48. Mathieu N, Pirzio L, Freulet-Marriere M-A, Desmaze C, Sabatier L: Telomeres and chromozomal instability. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61: 641-656
49. Mayer J, Starý J a kolektiv: Leukemie. 2002 GRADA Publishing, spol. s. r. o.
50. Matsutani N, Yokozaki H, Tahara E, Tahara H, Kuniyasu H, haruma K, Chayama K, Yasui W, Tahara E: Expression of telomeric repeat binding factor 1 and 2 and TRF1-interacting nuclear protein 2 in human gastric carcinomas. *Int J Oncol.* 2001;19(3): 507-12.
51. Meng XL, Lin MF, Jin J: The expression of human telomerase reverse transcriptase mRNA and its significance in acute leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2003;11(1): 30-3. (publikace v čínštině)
52. NCBI, National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov
53. Neidle S, Parkinson G: Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery, *Nature* 2002; 1: 383-393
54. Nilsson P, Mehle C, Remes K, Roos G: Telomerase activity in vivo in human malignant hematopoietic cells. *Oncogene* 1994; 9: 3043-3048
55. Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Iwama H, Hayashi S, Toyama K, Shay JW: Clinical implications of telomerase activity levels in acute leukemia. *Clin Cancer Res.* 1997; 3: 619-625

56. Ohyashiki JH, Sashida G, Tauchi T, Ohyashiki K: Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. *Oncogene* 2002; 21: 680-687
57. Rezler EM, Bearss DJ, Hurley LH: Telomeres and telomerase as drug targets. *Curr Opin Pharmacol.* 2002; 2: 415-423
58. Seol JG, Kim ES, Park WH, Jung ChW, Kim BK, Lee YY: Telomerase activity in acute myelogenous leukemia: clinical and biological implications. *Br J Haematol.* 1998; 100: 156-165
59. Shay JW, Werbin H, Wright WE: Telomeres and telomerase in human leukemias. *Leukemia* 1996; 10: 1255-1261
60. Shi JM, Huang H, Chen QE, Lin MF: A study of the relationship between expression level of TRF1 protein and telomerase activity in human acute leukemia. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006; 7 (2): 154-158
61. Scheel Ch., Poremba Ch.: Telomere lengthening in telomerase-negative cells: the end are coming together. *Wirchows Arch* 2000, Vol. 440, 573-582
62. Sieglová Z, Žilovcová S, Čermák J, Žižková H, Březinová D, Dvořáková R, Marková M, Maaloufová J, Sajdová J, Březinová J, Zemanová Z, Michalová K: Dynamics of telomere length and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS: a marker of disease prognosis? *Leukemia Research.* 2004; 28, 1013-1021.
63. Smith S, Giriat I, Schmitt A, de Lange T: Tankyrase, a Poly (ADP-Ribose) Polymerase at human telomeres. *Science* 1998; 282: 1484-1487
64. Smith S, de Lange T: Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol.* 2000; 10: 1299-1302
65. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T: Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol.* 2000; 20 (5): 1659-1668
66. Van Steensel, de Lange T: Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 1998; 385: 740-743
67. Sun J, Huang H, Zhu YY: Study on the expression of tankyrase in malignant hematopoietic cells and its relation with telomerase activity. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2004; 12 (1): 11-5 (abstrakt, publikace v čínštině)
68. Sun J, Lai XY, Zhu YY, Lan JP, Tang LD, Li JY, Yu J, Tan YM, Lin MF, Huang H: Expression of human telomere repeat binding factor 1 (TRF1) in acute leukemia cells and its correlation with telomerase activities. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2004; 33 (6): 491-5 (abstract, publikace v čínštině)

69. Tomáška L., Nosek J.: Alternatívne stratégie replikácie telomér I. Vesmír 2001; 80: 392-396
70. Uchida N, Otsuka T, Shigematsu H, Maeda M, Sugio Y, Itoh Y, Niho Y: Differential gene expression of human telomerase-associated protein hTERT and TEP1 in human hematopoietic cells. Leuk Res. 1999; 23: 1127- 1132
71. Vaziri H, Dragowska W, Allsopi RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM: Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. Proc Natl Acad Sci. USA 1994; 91: 9857-9860
72. Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, Dalla-Favera R: Direct activation of TERT transcription by c-MYC; Nat Genet. 1999; Vol. 21: 220-224
73. Xu D, Gruber A, Peterson C, Pisa P: Telomerase activity and the expression of the telomerase components in acute myelogenous leukemia. Br J Hematol. 1998; 102: 1367-1375
74. Yajima T, Yagihashi A, Kameshima H, Furuya D, Kobayashi D, Hirata K, Watanabe N: Establishment of quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay for human telomerase-associated genes. Clin Chim Acta. 2000; 290: 117-127
75. Zaug AJ, Podell ER, Cech TR: Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. Proc Natl Acad Sci. USA 2005; 102 (31): 10864-9

10. PŘÍLOHA TABULEK

SEZNAM TABULEK

Tab. 10.1.: Stručná charakteristika pacientů s MDS s uvedenými výsledky analýzy telomerázové aktivity a délky telomér.

Tab. 10.2.: Stručná charakteristika pacientů se sekundární AML z MDS s uvedenými výsledky analýzy telomerázové aktivity a délky telomér.

Tab. 10.3.: Stručná charakteristika pacientů s AML s uvedenými výsledky analýzy telomerázové aktivity a délky telomér.

Tab. 10.4.: Stručná charakteristika pacientů s ALL s uvedenými výsledky analýzy telomerázové aktivity a délky telomér.

Tab. 10.5.: Stručná charakteristika pacientů s MDS s uvedenými výsledky genové exprese, telomerázové aktivity a délky telomér.

Tab. 10.6.: Stručná charakteristika pacientů se sekundární AML z MDS s uvedenými výsledky genové exprese, telomerázové aktivity a délky telomér.

Tab. 10.7.: Stručná charakteristika pacientů s AML s uvedenými výsledky genové exprese, telomerázové aktivity a délky telomér.

Tab. 10.8.: Matice Spearmanových korelačních koeficientů udávajících vztahy mezi telomerázovou aktivitou, délkou telomér a expresí studovaných genů u zdravých dárců.

Tab. 10.9.: Matice Spearmanových korelačních koeficientů udávajících vztahy mezi telomerázovou aktivitou, délkou telomér, expresí studovaných genů, IPSS a podílem blastů v analyzované tkáni u pacientů s MDS

Tab. 10.10.: Matice Spearmanových korelačních koeficientů udávajících vztahy mezi telomerázovou aktivitou, délkou telomér, expresí studovaných genů a podílem blastů v analyzované tkáni u pacientů s AML.

Pacient č.	Stádium	Diagnóza	Věk	Pohlaví	Tkáň	Počet blastů %	IPSS	TA	TRF (kbp)
1/1	Dg	RA	32	Ž	KD	2.4	0.5	0.0859	nd
1/2	K	RA	43	Ž	KD	1.2	0.5	0.0068	nd
2	Dg	RA	6	M	KD	0	nd	0.0112	nd
3	K	RA	59	Ž	KD	1.2	0.5	0.0008	nd
4	K	RA	33	M	KD	1.2	0.5	0.0096	nd
5	Dg	RA	53	M	KD	nd	nd	0.0674	nd
6	CR	RA	69	Ž	KD	2.8	0.5	0.6578	7.25
7	Dg	RA	60	M	PK	0	1.5	0.3756	5.0
8	K	RA	71	Ž	KD	2.5	0	0.0949	5.8
9	Dg	RA	23	Ž	KD	0.9	0	0.0015	7.4
10	K	RA	52	Ž	KD	1.4	0.5	0.0125	6.6
11	K	RA	65	Ž	PK	0	1	0.1694	nd
11	K	RA	65	Ž	KD	1.3	1	0.1467	6.1
12	Dg	RA	60	Ž	KD	3.4	0.5	0.1422	8.15
13	K	RA	56	Ž	KD	3.5	0	0.0262	5.6
14	Dg	RA	72	Ž	KD	2.6	0	0.3200	4.6
15	Dg	RA	62	Ž	KD	4.4	0.5	0.1307	4.3
16	K	RA	58	M	PK	0	0	0.0017	8.17
17/1	K	RA	42	Ž	KD	2.8	0.5	0.3605	nd
17/2	K	RA	44	Ž	KD	0.8	nd	0.0114	nd
17/3	K	RA	47	Ž	KD	3.2	0.5	0.2367	7.1
17/4	K	RA	48	Ž	KD	1	0.5	0.0034	nd
18	K	RA	67	M	KD	2.4	1.5	0.0698	nd
19	K	RA	79	Ž	KD	< 5	0	0.0896	5.03
19	K	RA	79	Ž	PK	< 5	0	0.0641	nd
20	Dg	RA	71	M	KD	< 5	0	0.0660	nd
21	K	RA	57	Ž	KD	3.3	0	0.0077	4.7
22	K	RA	63	Ž	KD	1.4	0	0.0064	10.5
23	Dg	RA	42	M	KD	1	0.5	0.0794	7.6
24	K	RA	54	M	KD	1.3	0.5	0.0261	6
25	Dg	RA	54	M	KD	2.8	0.5	0.0026	4.5
26/1	K	RA	66	Ž	KD	4.5	1	0.6488	nd
26/2	K	RAEB	68	Ž	KD	7	1.5	0.0462	nd
27	K	RA	60	M	KD	1.6	0.5	0.0657	5.71
28	K	RA	57	M	KD	1.5	1.5	0.0613	nd
29/1	K	RA	69	M	KD	0.8	0.5	0.1484	4.6
29/2	K	RA	60	M	KD	1.4	0.5	0.3534	5.8
30	K	RA	47	M	KD	0.4	1	0.0836	7.68
31	K	RA	60	M	KD	1.9	0.5	0.0284	7.4
32	K	RA	66	M	KD	1.3	0.5	0.0004	7.7
33	Dg	RA	30	M	KD	1	1	0.0534	8.3
34	K	RA	50	M	KD	2.6	0	0.0736	6.2
35	Dg	RA	53	M	PK	0	1.5	0.0770	nd
36	K	RA	42	Ž	PK	0	0.5	0.4137	nd
37	K	RA	76	Ž	KD	3.8	0.5	0.0149	nd
38	K	RA	34	Ž	KD	1	0.5	0.0367	nd
39/1	Dg	RARS	64	Ž	KD	2	0	0.0016	nd
39/2	K	RARS	69	Ž	KD	2.6	0	0.0145	11
40/1	K	RARS	72	Ž	PK	0	0.5	0.0214	4.6
40/2	K	RARS	72	Ž	KD	< 5	0.5	0.0026	nd
41	K	RARS	71	Ž	PK	nd	nd	0.0034	8.26
42	K	RARS	78	M	KD	nd	nd	0.0365	nd
43	K	RARS	68	Ž	KD	< 5	0.5	0.4994	6.0
44	Dg	RAEB	57	Ž	KD	8.8	0.5	0.1161	nd
45/1	K	RAEB	68	M	KD	6.1	1	0.0265	4.2
45/2	K	RAEB	68	M	KD	5.8	1	0.0608	6.8
45/3	K	RCMD	69	M	KD	4.6	1	0.1801	nd
46	Dg	RAEB	50	M	KD	7	1.5	0.0052	6.64
47	K	RAEB	45	M	KD	17.2	2	0.3257	nd
48	K	RAEB	19	Ž	KD	6.3	1	0.0148	6.8
49	Dg	RAEB	59	M	KD	15.4	1.5	0.0123	nd
50	Dg	RAEB	49	M	PK	1	1	0.3379	nd

Pacient č.	Stádium	Diagnóza	Věk	Pohlaví	Tkání	Počet blastů %	IPSS	TA	TRF (kbp)
51	Dg	RAEB	51	Ž	PK	5	2	0.0921	nd
52	Dg	RAEB	67	Ž	KD	6.2	0.5	0.0016	6.4
53/1	K	RAEB	67	M	PK	0	1	0.0519	4.9
53/2	K	RAEB	67	M	KD	10.2	1	0.1953	4.4
53/3	K	RAEB	68	M	KD	5.2	1	0.0033	nd
54/1	Dg	RAEB	48	M	KD	8.4	1	0.5663	nd
54/2	K	RAEB	48	M	KD	7.3	1	0.0812	nd
55/1	Dg	RAEB	59	M	KD	6.5	1	0.0016	5.8
55/2	K	RAEB	60	M	PK	1	1	0.1030	nd
56	Dg	RAEB	47	M	KD	6	2	0.0371	nd
57/1	Dg	RAEB	61	M	KD	8.9	1.5	0.0741	5.6
57/2	L	RAEB-t	62	M	KD	16	2	0.0361	5.5
57/3	L	RAEB-t	62	M	KD	19.6	0.5	0.0159	nd
57/4	CR	RA	62	M	KD	1.7	0.5	0.0014	nd
57/5	CR	RA	62	M	KD	2.6	0.5	0.0118	7.62
58	CR	RAEB-t	57	M	KD	1,6	0.5	0.2759	nd
59	Dg	RAEB-t	42	Ž	KD	21	2.5	0.0003	nd
60	Dg	RAEB-t	67	Ž	KD	29	3	0.1301	nd
61	L	RAEB-t	55	M	KD	26	3	0.0012	6.88
62	Dg	RAEB-t	47	Ž	KD	25.4	nd	0.0875	5.11
63	Dg	RAEB-t	2	M	KD			0.5910	nd
64	R	RAEB-t	62	Ž	KD	19.6	3.5	0.1130	7.15
65	CR	RAEB-t	81	Ž	PK	0	0	0.0343	nd
66	CR	RAEB-t	75	Ž	PK	0	0	0.0141	nd
66	CR	RAEB-t	75	Ž	KD	< 5	0	0.0014	nd
67/1	Dg	RAEB-t	40	Ž	PK	4.5	2	0.0959	nd
67/1	L	RAEB-t	40	Ž	KD	9.4	1	0.0025	4.76
68	Dg	RAEB-t	54	M	PK	0	2	0.0085	nd
68	Dg	RAEB-t	54	M	KD	10	2	0.0171	nd
69	Dg	RAEB-t	66	M	PK	2	2.5	0.0074	nd
70	K	CMMoL	64	Ž	PK	0	0	0.0004	8.3
70	K	CMMoL	64	Ž	KD	1.3	0	0.0579	7.7

Tab. 10.1.: Stručná charakteristika pacientů s MDS s uvedenými výsledky analýzy telomerázové aktivity. Červeně jsou označeny výsledky pozitivních hodnot TA a erodovaných telomér. (Dg. – odběr v době stanovení diagnózy; K, odběr vzorku neléčeného pacienta; KD, kostní dřeň; nd, nebylo stanoveno; PK, periferní krev; R – odběr v době relapsu onemocnění, PR/CR – odběr v době parciální/kompletní remise onemocnění; TRF, terminální repetiční fragment)

Pacient č.	Stádium	Diagnóza	Věk	Pohlaví	Analyzovaná tkáň	počet blastů v %	TA	TRF (kbp)
1	Dg	sAML	57	M	PK	41	0.2032	8.11
2	Dg	sAML	52	Ž	PK	3	0.0484	5.3
3	Dg	sAML	56	Ž	PK	6	0.3860	nd
4	Dg	sAML	69	M	PK	26	0.0884	6.98
5	Dg	sAML	50	Ž	PK	3	0.1900	nd
6	Dg	sAML	60	Ž	PK	25	0.1640	6.8
7	Dg	sAML	62	M	PK	4	0.0071	nd
8	Dg	sAML	58	Ž	KD	36.5	0.0015	8.92
9	Dg	sAML	37	Ž	PK	87	2.3580	nd
10	Dg	sAML	57	M	PK	2	0.0267	5.7
10	Dg	sAML	57	M	KD	7.2	0.0685	5.8
11	Dg	sAML	60	Ž	PK	31	0.4401	4.0
12	Dg	sAML	58	Ž	KD	12	0.2116	nd
13	Dg	sAML	65	Ž	PK	39	0.2646	nd

Tab. 10.2.: Stručná charakteristika pacientů se sekundární AML z MDS s uvedenými výsledky analýzy telomerázové aktivity a délky telomér. Červeně jsou označeny výsledky pozitivních hodnot telomerázové aktivity a erodovaných telomér. (Dg, stanovení diagnózy; PK, periferní krev; KD, kostní dřeň; TA, telomerázová aktivita; TRF, terminální repetiční fragment; nd, nebylo stanoveno)

Pacient č.	Stadium nemoci	FAB subtyp	Věk	Pohlaví	Analyzovaná tkání	počet blastů v %	TA	TRF (kbp)
1	R	M0	63	M	PK	60	0.0251	4.08
2	Dg	M0	48	M	KD	91	0.3200	4.61
3	Dg	M1	37	M	PK	70	2.7333	nd
4	Dg	M1	56	M	PK	50	0.0532	nd
5/1	Dg	M1	66	M	PK	81	0.2642	4.52
5/2	CR	M1	66	M	PK	0	0.0895	nd
6	R	M1	59	Ž	KD	94.4	0.6671	nd
7/1	Dg	M1	25	M	PK	94	0.1660	6
7/2	PR	M1	25	M	PK	0	0.0185	7.2
8	Dg	M1	37	M	KD	75	0.9178	nd
9	Dg	M1	64	M	PK	80	0.0761	4.3
10	Dg	M1	31	M	PK	95	0.0470	7.69
11	Dg	M1	30	Ž	PK	79	3.1330	5.4
12	Dg	M2	52	Ž	PK	75	0.5172	nd
13	Dg	M2	75	M	PK	0	0.0608	nd
14	Dg	M2	11	M	KD	47.6	0.0669	nd
15	Dg	M2	39	M	PK	98	0.1158	4.18
16	Dg	M2	32	M	PK	89	0.7447	3.23
17	Dg	M2	55	Ž	PK	43	0.0128	nd
18	Dg	M2	14	Ž	KD	17.6	0.0215	9.4
19/1	Dg	M2	41	M	PK	35	0.0016	5.5
19/2	CR	M2	41	M	PK	0	0.0090	8.33
20	Dg	M2	16	M	KD	57.2	0.5966	nd
21	Dg	M2	67	M	PK	79	2.0160	nd
22	Dg	M2	59	Ž	PK	4	0.1958	nd
23	Dg	M2	24	Ž	PK	6	0.2208	4.02
24	Dg	M2	71	M	PK	69	0.5818	6.97
25	Dg	M3	64	Ž	PK	13	0.1684	nd
26	Dg	M3	35	Ž	PK	91	0.1700	nd
27	Dg	M3	7	Ž	KD	90	0.2276	nd
28	Dg	M3	52	Ž	KD	82	0.0362	3.09
29	Dg	M3	27	M	PK	75.5	0.2076	2.55
30	Dg	M3	40	M	PK	43	0.0250	nd
31	Dg	M3	14	Ž	KD	90.4	0.2850	6.24
32	Dg	M3	13	Ž	KD	72	0.4639	3.1
33	Dg	M4	66	Ž	PK	62	8.5385	nd
34	Dg	M4	64	M	PK	17	26.1458	5.01
35	Dg	M4	47	Ž	KD	46.4	2.3361	6.82
36/1	Dg	M4	37	Ž	PK	37	0.2266	4.68
36/2	R	M4	38	Ž	PK	54	0.2431	nd
37	Dg	M4	15	M	PK	84	0.7716	8.69
38	Dg	M4	15	Ž	PK	60	0.0130	nd
39	Dg	M4	21	Ž	PK	44	0.1500	nd
40	Dg	M4	21	M	PK	28	0.3653	5.75
41	Dg	M4	41	M	PK	69	0.1524	3.9
42	Dg	M4	56	M	PK	40	0.0876	6.45
43	Dg	M4	17	M	KD	66.4	21.6838	nd
44	Dg	M4	28	Ž	PK	48	7.4839	nd
45	Dg	M4	58	Ž	PK	18	0.2028	4.3
46/1	Dg	M4	42	M	PK	86	0.1364	nd
46/2	CR	M4	43	M	PK	0	0.0329	7.0
47	Dg	M4	69	M	PK	27	0.0091	3.7
48	Dg	M4	62	Ž	PK	22	0.3106	4.9
49	Dg	M4	66	M	PK	22	0.2096	4.7
50	Dg	M5	53	M	PK	6	0.0238	5.3
51	Dg	M5	54	M	PK	84	5.8800	nd
52	Dg	M5	46	M	PK	47	22.4750	nd

Tab. 10.3.: Stručná charakteristika pacientů s AML s uvedenými výsledky analýzy telomerázové aktivity. Červeně jsou označeny výsledky pozitivních hodnot telomerázové aktivity a erodovaných telomér. (Dg. – odběr v době stanovení diagnózy, KD, kostní dřeň; nd, nebylo stanoveno; PK, periferní krev; R – odběr v době relapsu onemocnění, PR/CR – odběr v době parciální/kompletní remise onemocnění)

Pacient č.	Stádium	Subtyp	Věk	Pohlaví	Analyzovaná tkáň	Počet blastů v %	TA	TRF (kbp)
1	Dg	B	41	Ž	PK	90	1.0501	3.44
2	Dg	B	52	M	PK	39	3.1889	6.23
3	CR	B	30	M	KD	2.2	0.0743	8.3
4	Dg	B	3	Ž	KD	90.8	1.0383	nd
5	Dg	B	53	M	PK	84	1.3871	4.57
6	Dg	B	56	Ž	PK	93	0.0330	5.5
7	Dg	B	50	M	PK	62	0.5277	nd
8/1	L	T	36	M	PK	0	0.0705	nd
8/2	L	T	37	M	PK	0	0.0028	nd
9	Dg	B	61	M	PK	92	0.8991	4.6

Tab. 10.4.: Stručná charakteristika pacientů s ALL s uvedenými výsledky analýzy telomerázové aktivity.

Červeně jsou označeny výsledky pozitivních hodnot TA a erodovaných telomér.

(Dg, odběr v době stanovení diagnózy; KD, kostní dřeň; L, odběr v průběhu léčby; nd, nebylo stanoveno
PK, periferní krev; TA, telomerázová aktivita; TRF, terminální repetiční fragment;)

Pacient č.	Stádium	F _{AB} subtyp	Věk	Pohlaví	Analyzovaná tkáň	Počet blastů v %	IPSS	hTERT	c-Myc	POTI	TEPI	TNKS	TRFI	TA	TRF (kbp)
1	K	RA	42	M	KD	1	0.5	11	nd	nd	nd	nd	nd	0.0794	7.6
2	K	RA	43	Ž	KD	1.2	0.5	5	nd	nd	nd	nd	nd	0.0068	5
3	Dg	RA	60	M	PK	0	1.5	0	13	15	52	29	23	0.3756	5
4/1	K	RA	52	Ž	KD	1.4	0.5	148	34	51	15	55	123	0.0125	6.6
4/2	K	RA	54	Ž	KD	1.6	0.5	1371	310	nd	66	nd	nd	nd	nd
5	Dg	RA	54	M	KD	2.8	0.5	2	2	21	31	46	23	0.0026	5.4
6	K	RA	69	M	KD	0.8	0.5	1074	91	99	165	183	155	0.1484	4.6
7/1	K	RA	67	M	KD	1.3	0.5	122	61	32	38	64	55	0.0004	8.3
7/2	K	RA	77	M	KD	1.4	0.5	138	108	27	27	72	79	nd	4.8
8	Dg	RA	29	M	KD	1	1	23	nd	nd	nd	nd	nd	0.0534	7.4
9	K	RA	34	Ž	KD	1	0.5	12	nd	nd	nd	nd	nd	0.0367	nd
10	K	RA	66	Ž	KD	3.8	0.5	1425	16	nd	nd	30	nd	0.0149	nd
11	K	RA	62	M	KD	3.4	0.5	42	nd	nd	nd	nd	nd	0.1458	nd
12	K	RA	57	M	KD	1	0.5	453	126	267	37	124	99	nd	nd
13	K	RA	49	M	KD	3.2	nd	4	52	380	56	174	215	nd	nd
14	K	RA	57	Ž	KD	3.3	0	12	nd	nd	nd	nd	nd	0.0077	4.7
15	K	RA	58	M	PK	0	0	5	nd	nd	nd	nd	nd	0.0017	8.17
16	K	RA	62	Ž	KD	1.4	0	240	63	136	47	98	87	0.0064	10.5
17	K	RA	57	Ž	KD	3	0.5	36	73	130	38	259	171	nd	nd
18	Dg	RA	72	Ž	KD	2.6	0	15	24	118	103	78	42	0.3200	4.3
19	Dg	RA	40	Ž	KD	3.4	0.5	98	53	44	75	68	65	0.1422	8.15
20	Dg	RA	71	Ž	KD	< 5	0	72	nd	nd	nd	nd	nd	0.0660	nd
21	K	RA	48	Ž	KD	1	0.5	3	1	nd	nd	7	nd	0.0034	nd
22	K	RARS	57	M	KD	1.2	nd	10	9	20	29	13	5	nd	nd
22	K	RARS	57	M	PK	0	nd	30	29	74	30	74	34	nd	nd
23	K	RARS	69	Ž	KD	2.6	0	809	142	38	72	68	110	0.0145	11
24	K	RARS	68	Ž	KD	< 5	0.5	3071	591	155	166	248	226	0.4994	6
25/1	Dg	RAEB	61	M	KD	8.9	1.5	117	49	218	73	186	87	0.0741	5.6
25/2	CR	RA	62	M	KD	2.6	0.5	228	60	37	46	44	38	0.0118	7.62
26	Dg	RAEB	59	M	KD	15.4	1.5	40	nd	nd	nd	nd	nd	0.0123	nd
27	Dg	RAEB	47	M	KD	6	2	30	35	21	43	51	22	0.0371	nd
28	Dg	RAEB	67	Ž	KD	6.2	0.5	84	24	22	81	48	34	0.0016	6.4
29	K	RAEB	67	M	KD	10.2	1	334	58	120	102	139	57	0.1953	4.4
30	K	RAEB	70	M	KD	6.8	1	200	116	194	31	114	136	nd	nd
31	Dg	RAEB-t	47	Ž	KD	25.4	nd	220	740	176	157	355	120	0.0875	5.11
32	K	RAEB-t	68	M	KD	28	3.5	35	29	nd	nd	54	nd	nd	nd

Tab.10.5.: Stručná charakteristika pacientů s MDS s uvedenými výsledky genové exprese, telomerázové aktivity a délky telomér. Červeně jsou označeny hodnoty představující zvýšenou expresi, pozitivní hodnotu telomerázové aktivity a erodované telomery. (CR, kompletní remise; Dg, stanoveni diagnózy; K, vzorek odebřaný před zahájením léčby; PK, periferní krev; RAEB, periferní krev; TRF, telomerázová aktivity; TA, kostní dřeň; TRF, telomerázové aktivity; TNKS, terminální repetiční fragment; nd, nebylo stanoveno)

Pacient č.	Stádium	Diagnóza	Věk	Pohlaví	Analyzovaná tkání	Počet blastů v %	<i>hTERT</i>	c-Myc	<i>POTI</i>	<i>TEPI</i>	<i>TNKS</i>	<i>TRFI</i>	TA	TRF (kbp)
1	R	sAML	56	Ž	PK	13	67	104	44	103	78	29	0.0099	8.02
2	Dg	sAML	58	Ž	KD	35.6	1	nd	nd	nd	nd	nd	0.0015	8.92
3	Dg	sAML	37	Ž	PK	87	17	76	nd	nd	261	nd	2.3580	nd
4/1	Dg	sAML	61	Ž	PK	1	17	70	207	186	192	122	0.5200	nd
4/2	K	sAML	61	Ž	PK	29	31	46	nd	nd	77	nd	nd	nd
5	Dg	sAML	30	M	PK	83	31	rd	nd	nd	nd	nd	2.3714	3.54
6	Dg	sAML	60	Ž	PK	31	190	413	371	126	367	142	0.4401	4

Tab. 10.6: Stručná charakteristika pacientů se sekundární AML z MDS s uvedenými výsledky genové expresce, telomerázové aktivity a délky telomér. Červeně jsou označeny hodnoty představující zvýšenou expresi, pozitivní hodnotu teloméru a erodované telomery. (Dg, stanovení diagnózy; K, vzorek odebraný před zahájením léčby; PK, periferní krev; KD, kostní dřen; TA, telomerázová aktivita; TRF, terminální repetiční fragment; nd, nebylo stanoveno)

Pacient č.	Stádium	FAB subtyp	Vek	Pohlaví	Analyzovaná tkání	Počet blastů v %	HTERT	c-Myc	POTI	TEPI	TNKS	TRFI	TA	TRF (kbp)
1/1	Dg.	M1	25	M	PK	94	65	125	275	208	530	159	0.1660	6
1/2	PR	M1	25	M	PK	0	53	25	47	114	80	54	0.0185	7.2
2	Dg.	M1	64	M	PK	80	78	354	193	127	324	111	0.0761	4.3
3	Dg.	M1	30	Z	PK	79	37	377	347	113	354	93	3.1330	5.4
4	Dg.	M1	31	M	PK	95	38	96	167	66	96	50	0.0470	7.69
5	Dg.	M1	37	M	PK	70	58	1241	nd	nd	448	nd	2.7333	nd
6	Dg.	M1	42	M	PK	53	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	Dg.	M2	39	M	PK	98	2246	3579	653	534	1326	367	0.1158	4.18
8	Dg.	M2	41	M	PK	35	173	82	287	230	305	86	0.0016	5.5
9	Dg.	M2	14	Z	KD	17.6	3126	955	196	207	197	98	0.0215	9.4
10	Dg.	M2	71	M	PK	69	212	897	249	472	639	159	0.5818	6.97
11	Dg.	M2	52	Z	PK	75	212	3374	651	517	1271	459	0.5172	nd
12	Dg.	M2	67	M	PK	79	27	559	nd	nd	325	nd	2.016	nd
13	Dg.	M3	27	M	PK	75.5	574	1403	256	198	278	193	0.2076	2.55
14	Dg.	M3	35	Z	PK	91	25	126	140	142	227	54	0.17	nd
15	Dg.	M3	58	Z	PK	88	7	251	134	20	59	90	nd	nd
16	Dg.	M3	31	M	PK	91	3	124	78	72	201	58	nd	nd
17	Dg.	M4	64	M	PK	17	85	388	176	170	255	146	26.1458	5.01
18	Dg.	M4	66	M	PK	22	134	64	71	131	88	53	0.2096	4.7
19	Dg.	M4	21	M	PK	28	564	401	171	501	369	244	0.3653	5.75
20	Dg.	M4	37	Z	PK	37	2391	689	117	197	133	149	0.2266	4.68
21	Dg.	M4	56	M	PK	40	602	228	60	87	55	39	0.0876	6.47
22/1	Dg.	M4	42	M	PK	86	1397	731	498	537	569	364	0.1364	nd
22/2	L	M4	42	M	PK	87	110	460	269	573	396	244	0.0697	3.21
22/3	PR	M4	43	M	PK	0	8	nd	nd	nd	nd	0.0329	7	
23	Dg.	M4	41	M	PK	69	152	214	513	360	725	326	0.1524	3.9
24	Dg.	M4	62	Z	PK	22	153	92	99	160	205	59	0.3106	4.9
25	Dg.	M4	58	Z	PK	18	146	298	229	186	180	185	0.2028	4.3
26	Dg.	M4	47	Z	KD	46.4	1014	157	233	132	212	72	2.3361	6.82
27	Dg.	M4	28	Z	PK	48	178	1307	nd	nd	904	nd	7.4839	nd

Tab. 10.7.: Stručná charakteristika pacientů s AML s uvedenými výsledky genové exprese, telomerázové aktivity a délky telomérů. Červeně jsou označeny hodnoty představující zvýšenou expresi, pozitivní hodnoty teloméru a erodované teloméru (TRF). (Dg, stanovení diagnózy; KD, kostní dřeň; L, vzorek odebraný v příběhu léčby; PK, periferní krev; PR, parciální remise; TA, telomerázová aktivita; TRF, terminální repetiční fragment; nd, nebylo stanoveno)

NC	TA	TRF	<i>hTERT</i>	<i>Myc</i>	POTI	TEPI	TRFI	TNKS
TA		r = -0.1429 P = 0.7825	r = 0.5188 P = 0.1618	r = 0.3182 P = 0.3403	r = 0.1888 P = 0.5567	r = 0.7005 P = 0.0112	r = 0.3853 P = 0.2161	r = 0.1856 P = 0.5635
TRF	r = -0.1429 P = 0.7825		r = 0.3214 P = 0.4976	r = 0.3353 P = 0.4279	r = 0.2500 P = 0.5206	r = -0.3353 P = 0.4279	r = -0.0167 P = 0.9816	r = 0.4184 P = 0.2696
<i>hTERT</i>	r = 0.5188 P = 0.1618	r = 0.3214 P = 0.4976		r = 0.8787 P = 0.0002	r = 0.8546 P = 0.0004	r = 0.7785 P = 0.0048	r = 0.8276 P = 0.0009	r = 0.9072 P < 0.0001
<i>Myc</i>	r = 0.3182 P = 0.3403	r = 0.3353 P = 0.4279	r = 0.8787 P = 0.0002		r = 0.6806 P = 0.0074	r = 0.2479 P = 0.4141	r = 0.5976 P = 0.0240	r = 0.8084 P = 0.0005
POTI	r = 0.1888 P = 0.5567	r = 0.2500 P = 0.5206	r = 0.8546 P = 0.0004	r = 0.6806 P = 0.0074		r = 0.6183 P = 0.0184	r = 0.8311 P = 0.0001	r = 0.9097 P < 0.0001
TEPI	r = 0.7005 P = 0.0112	r = -0.3353 P = 0.4279	r = 0.7785 P = 0.0048	r = 0.2479 P = 0.4141	r = 0.6183 P = 0.0184		r = 0.7500 P = 0.0020	r = 0.3789 P = 0.1816
TRFI	r = 0.3853 P = 0.2161	r = -0.0167 P = 0.9816	r = 0.8276 P = 0.0009	r = 0.5976 P = 0.0240	r = 0.8311 P = 0.0001	r = 0.7500 P = 0.0020		r = 0.6726 P = 0.0060
TNKS	r = 0.1856 P = 0.5635	r = 0.4184 P = 0.2696	r = 0.9072 P < 0.0001	r = 0.8084 P = 0.0005	r = 0.9097 P < 0.0001	r = 0.3789 P = 0.1816	r = 0.6726 P = 0.0060	

Tab. 10.8.: Matice Spearmanových korelačních koeficientů udávajících vztahy mezi telomerázovou aktivitou (TA), délkom telomer (TRF) a relativní expresí studovaných genů u zdravých dárců. Oranžově je znázorněn signifikantní, modré nesignifikantní korelační vztah.

MDS	TA	TRF (kbp)	hTERT	Myc	POTI	TEPI	TRFI	TNKS	IPSS	% blastů v anal. tkání
TA	r = -0.4851 P = 0.0301	r = 0.2332 P = 0.2417	r = 0.2116 P = 0.3994	r = 0.4451 P = 0.0492	r = 0.6706 P = 0.0045	r = 0.2882 P = 0.2790	r = 0.4634 P = 0.0528	r = 0.3165 P = 0.1151	r = 0.0891 P = 0.6718	
TRF (kbp)	r = -0.4851 P = 0.0301	r = 0.1199 P = 0.6047	r = 0.2059 P = 0.4443	r = -0.1723 P = 0.4941	r = -0.3676 P = 0.1612	r = 0.1176 P = 0.6643	r = -0.2765 P = 0.2999	r = -0.2557 P = 0.2765	r = -0.1680 P = 0.4790	
<i>hTERT</i>	r = 0.2332 P = 0.2417	r = 0.1199 P = 0.6047		r = 0.7128 P < 0.0001	r = 0.3468 P = 0.0746	r = 0.3130 P = 0.1496	r = 0.5623 P = 0.0052	r = 0.3559 P = 0.0744	r = 0.0316 P = 0.8661	r = 0.3148 P = 0.0748
<i>Myc</i>	r = 0.2116 P = 0.3994	r = 0.2059 P = 0.4443		r = 0.7128 P < 0.0001	r = 0.5464 P = 0.0070	r = 0.2441 P = 0.2617	r = 0.7213 P = 0.0001	r = 0.6677 P = 0.0002	r = -0.0652 P = 0.7730	r = 0.1659 P = 0.4539
<i>POTI</i>	r = 0.4451 P = 0.0492	r = -0.1723 P = 0.4941		r = 0.3468 P = 0.0746	r = 0.5464 P = 0.0070	r = 0.2955 P = 0.1711	r = 0.7596 P < 0.0001	r = 0.8656 P < 0.0001	r = -0.1049 P = 0.6692	r = 0.3160 P = 0.1520
<i>TEPI</i>	r = 0.6706 P = 0.0045	r = -0.3676 P = 0.1612		r = 0.3130 P = 0.1496	r = 0.2441 P = 0.2617	r = 0.2955 P = 0.1711		r = 0.2727 P = 0.2080	r = 0.4565 P = 0.0285	r = -0.1025 P = 0.6764
<i>TRFI</i>	r = 0.2882 P = 0.2790	r = 0.1176 P = 0.6643		r = 0.5623 P = 0.0052	r = 0.7213 P = 0.0001	r = 0.7596 P < 0.0001	r = 0.2727 P = 0.2080		r = 0.7737 P < 0.0001	r = -0.2461 P = 0.3098
<i>TNKS</i>	r = 0.4634 P = 0.0528	r = -0.2765 P = 0.2999		r = 0.3559 P = 0.0744	r = 0.6677 P = 0.0002	r = 0.8656 P < 0.0001	r = 0.4565 P = 0.0285	r = 0.7737 P < 0.0001		r = 0.0786 P = 0.7281
IPSS	r = 0.3165 P = 0.1151	r = -0.2557 P = 0.2765		r = 0.0316 P = 0.8661	r = -0.0652 P = 0.7730	r = -0.1049 P = 0.6692	r = -0.1025 P = 0.6764	r = -0.2461 P = 0.3098	r = 0.0786 P = 0.7281	r = 0.3451 P = 0.0667
% blastů v anal. tkání	r = 0.0891 P = 0.6718	r = -0.1680 P = 0.4790		r = 0.3148 P = 0.0748	r = 0.1659 P = 0.4539	r = 0.3160 P = 0.1520	r = 0.4010 P = 0.0644	r = 0.1875 P = 0.4033	r = 0.3280 P = 0.1094	r = 0.3451 P = 0.0667

Tab. 10.9.: Matice Spearmanových korelačních koeficientů udávajících vztahy mezi telomerázovou aktivitou (TA), délku telomerů (TRF), relativní expresi studovaných genů, IPSS a podílem blastů v analyzované tkáni u pacientů s MDS. Oranžově je znázorněn signifikantní, zeleně téměř signifikantní, modře nesignifikantní korelační vztah.

AML	TA	TRF	<i>hTERT</i>	<i>Myc</i>	<i>POTI</i>	<i>TEP1</i>	<i>TRFI</i>	<i>TNKS</i>	% blastů v anal. tkání
TA	r = -0.2137 P = 0.3523	r = 0.0037 P = 0.9855	r = 0.3354 P = 0.0939	r = 0.0545 P = 0.8055	r = 0.0011 P = 0.9946	r = 0.1601 P = 0.4628	r = 0.2814 P = 0.1638	r = 0.0138 P = 0.9457	
TRF	r = -0.2137 P = 0.3523		r = -0.1338 P = 0.5631	r = -0.3001 P = 0.1986	r = -0.3716 P = 0.1067	r = -0.3528 P = 0.1271	r = -0.6085 P = 0.0044	r = -0.3633 P = 0.1154	r = -0.3482 P = 0.1219
<i>hTERT</i>	r = 0.0037 P = 0.9855	r = -0.1338 P = 0.5631		r = 0.4696 P = 0.0117	r = 0.2923 P = 0.1562	r = 0.5715 P = 0.0028	r = 0.4069 P = 0.0435	r = 0.2009 P = 0.3054	r = -0.2151 P = 0.2537
<i>Myc</i>	r = 0.3354 P = 0.0939	r = -0.3001 P = 0.1986		r = 0.4696 P = 0.0117	r = 0.5400 P = 0.0053	r = 0.5815 P = 0.0023	r = 0.7485 P < 0.0001	r = 0.85840 P = 0.0011	r = 0.1347 P = 0.4942
<i>POTI</i>	r = 0.0545 P = 0.8055	r = -0.3716 P = 0.1067	r = 0.2923 P = 0.1562	r = 0.5400 P = 0.0053		r = 0.6931 P = 0.0001	r = 0.7754 P < 0.0001	r = 0.8554 P < 0.0001	r = 0.3314 P = 0.1056
<i>TEP1</i>	r = 0.0011 P = 0.9946	r = -0.3528 P = 0.1271	r = 0.5715 P = 0.0028	r = 0.5815 P = 0.0023	r = 0.6931 P = 0.0001		r = 0.8315 P < 0.0001	r = 0.7769 P < 0.0001	r = -0.0027 P = 0.9898
<i>TRFI</i>	r = 0.1601 P = 0.4628	r = -0.6085 P = 0.0044	r = 0.4069 P = 0.0435	r = 0.7485 P < 0.0001	r = 0.7754 P < 0.0001	r = 0.8315 P < 0.0001		r = 0.7938 P < 0.0001	r = 0.1605 P = 0.4434
<i>TNKS</i>	r = 0.2814 P = 0.1638	r = -0.3633 P = 0.1154	r = 0.2009 P = 0.3054	r = 0.8584 P = 0.0011	r = 0.8554 P < 0.0001	r = 0.7769 P < 0.0001	r = 0.7938 P < 0.0001		r = 0.3352 P = 0.0812
% blastů v anal. tkání	r = 0.0138 P = 0.9457	r = -0.3482 P = 0.1219	r = -0.2151 P = 0.2537	r = 0.1347 P = 0.4942	r = 0.3314 P = 0.1056	r = -0.0027 P = 0.9898	r = 0.1605 P = 0.4434	r = 0.3352 P = 0.0812	

Tab. 10.10.: Matrice Spearmanových korelačních koeficientů udávajících vztahy mezi telomerázovou aktivitou (TA), délkom telomér (TRF), relativní expresí studovaných genů a podílem blastů v analyzované tkáni u pacientů s AML. Oranžově je znázorněn signifikantní, zeleně témeř signifikantní, modré nesignifikantní korelační vztah.

11. PREZENTACE A PUBLIKACE

11.1. PUBLIKACE

Sieglová, Z., Loudová M., Dvořáková R., Honzátková L., **Říhová H.**, Brdička, R.: Fatherless cases in our paternity expertises praxis. In Sensabaugh, G. F.; Lincoln, P. J.; Olaisen, B. (ed.). Progress in forensic genetics 8. Amsterdam : Elsevier, 2000. s. 368-370. ISBN 0-444-50303-X.

Dvořáková R., **Říhová H.**, Žilovcová S., Krsková L., Formánková R., Sieglová Z., Brdička R.: Long-term follow-up of chimerical state of the patients transplanted for different hematologic diseases. *Sbor.lék.* 2003, roč. 104, č. 2, s. 209-215.

Formánková R., Sedláček P., Krsková L., **Říhová H.**, Šrámková L., Starý J.: Chimerism-directed adoptive immunotherapy in the prevention and treatment of post-transplant relapse of leukemia in childhood. *Haematologica.* 2003, vol. 88, no. 1, s. 117-118.

Starý J., Sedláček P., Kobylka P., Loudová M., **Říhová H.**, Ivašková E., Pittrová H., Kořínská P., Michalová K., Šrámková L., Formánková R., Vávra V., Smíšek P., Keslová P., Komrska V., Gajdoš P.: Léčba dětí s myelodysplastickým syndromem transplantací krvetvorných buněk v České republice 1997-2002. *Transfuz Hemat Dnes.* 2003; 9 (1): 22-29.

Sieglová Z., Žilovcová S., Čermák J., **Žižková H.**, Březinová D., Dvořáková R., Marková M., Maaloufová J., Sajdová J., Březinová J., Zemanová Z., Michalová K.: Dynamics of telomere length and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS: a marker of disease prognosis? *Leukemia Research.* 2004; 28, 1013-1021.

Špíšek R., Mejstříková E., Formánková R., **Žižková H.**, Vávra V., Hrušák O., Šedivá A., Sedláček P., Starý J.: Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis caused by perforin deficit can be successfully treated by hematopoietic stem cell transplantation - the first diagnosed case in the Czech Republic. *Cas Lek Cesk.* 2006; 145 (1): 50-4.

Žižková H., Čermák J., Maaloufová J., Neuwirtová R., Sieglová Z.: Increased levels of the POT1 gene expression correlate with telomerase activity in myelodysplastic syndromes and in acute myelogenous leukemia. Zasláno do *Leukemia Research.*

11.2. ABSTRAKTA Z TUZEMSKÝCH A MEZINÁRODNÍCH KONFERENCÍ

Říhová H., Čermák J., Sajdová J., Hrabánek J., Starý J., Sieglová Z.: Kvantitativní stanovení mutací N-Ras protoonkogenu u pacientů s AML a MDS minisekvenováním na pevném podkladě. X. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 19. – 20. 6. 1997, s. 23

Sieglová Z., Honzatková L., Dvořáková R., **Říhová H.**, Zavadil J., Čermák J., Hrabánek J., Sajdová J., Brdička R.: The 11p15 band microsatellite instability and changes of the calcitonin gene methylation in acute myeloid leukemia. *Acta Haematol-Basel.* 1998, vol. 100, no. S1, s. 66.

Sieglová Z, Honzátková L, **Říhová H**, Čermák J, Brdička R: Methylation pattern of the calcitonin gene, microsatellite instability, and mutations of N-ras oncogene in myelodysplastic syndromes. Leukemia Res. 1999, vol. 23, no. S1, s. S16.

Březinová D, Dvořáková R, **Říhová H**, Brdička R, Sieglová Z: Specifické metody izolace DNA pro potřeby molekulární diagnostiky a paternitních expertíz. In Pecka, M.; Malý, J. (ed.). Laboratorní hematologie. Hradec Králové: HK Credit, 2000. s. 61. ISBN 80-902753-2-X.

Dvořáková R, **Říhová H**, Březinová D, Brdička R, Sieglová Z: Molekulární analýzy hemopoetického chimerizmu po alogenní TKD. In Pecka, M.; Malý, J. (ed.). Laboratorní hematologie. Hradec Králové: HK Credit, 2000. s. 59. ISBN 80-902753-2-X.

Říhová H, Dvořáková R, Krsková L, Čermák J, Sieglová Z: Telomerase activity in myelodysplastic syndromes and acute leukemia patients. Acta Haematol-Basel. 2000, vol. 103, no. S1, s. 30.

Říhová H, Dvořáková R, Stöckbauer P, Sieglová Z: Telomerase activity in leukemia cell lines. Acta Haematol-Basel. 2000, vol. 103, no. S1, s. 29.

Formankova R, Sedlacek P, Stary J, Krskova L, **Rihova H**, Moravcova J, Sramkova L: Chimerism-directed adoptive immunotherapy in prevention and/or treatment of post-transplant relapse of leukemia in childhood. In 2nd symposium on hematopoietic stem cell transplantation in children. Poznan : n.s., 2001. nestr.

Sieglova Z, **Rihova H**, Brezinova D: Multiplex fluorescence PCR of STR loci as a highly efficient tool of testing blood stain archived for a decade : the paternity case report. In The second European-American intensive course in clinical and forensic genetics. Dubrovnik : n.s., 2001. s. 56.

Sieglova Z, **Rihova H**, Dvorakova R, Brezinova D, Cermak J, Neuwirtova R: Telomerase activity in separated bone marrow cell subpopulations obtained from the patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia Res. 2001, vol. 25, no. S1, s. 9.

Rihova H, Dvorakova R, Zilovcova S, Brezinova D, Cermak J, Sajdova J, Sieglova Z: The level of telomerase activity in pre-leukemic and leukemic cells: a prognostic marker of hematological malignancies. Hematol.J. 2002, vol. 3, no. S1, s. 197-198.

Říhová H, Dvořáková R, Krsková L, Březinová D, Čermák J, Hrabánek J, Sajdová J, Stáry J, Sieglová Z: Molekulární mechanizmy obecně působící při transformaci hematopoetických buněk a jejich význam pro prognózu myelodysplastického syndromu a leukémie. In XIII.český a slovenský hematologický a transfuziologický kongres s mezinárodní účastí. Praha: Agentura Carolina, 2002. s. P/62.

Sieglova Z, Zilovcova S, **Rihova H**, Dvorakova R, Brezinova D, Cermak J, Brezinova J, Zemanova Z, Michalova K: Dynamics of telomere length and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS. Hematol.J. 2002, vol. 3, no. S1, s. 197.

Sieglová Z, **Řihová H**, Žilovcová S, Dvořáková R, Březinová D, Čermák J, Marková M, Sajdová J, Březinová J, Zemanová Z, Michalová K: Změny telomérotelomerázového komplexu souvisí s nestabilitou genomu a jsou významným prediktivním faktorem konverze myelodysplastického syndromu do akutní myelogenní leukemie. In XIII. český a slovenský hematologický a transfuziologický kongres s mezinárodní účastí. Praha : Agentura Carolina, 2002. s. P/58.

Sieglová Z, **Řihová H**, Žilovcová S, Čermák J, Březinová D, Dvořáková R, Březinová J, Zemanová Z, Michalová K: Heterogeneity of telomere length and telomerase activity in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia (AML) and their prognostic value for leukemic transformation. The Hematology Journal 2003, 4, Suppl. 2, 29 – 30.

Žilovcová S, Čermák J, **Řihová H**, Březinová D, Dvořáková R, Březinová J, Zemanová Z, Michalová K, Sieglová Z: Relations of telomere length in myelodysplastic syndromes and secondary acute myelogenous leukemia to karyotype and to individual risk of disease progression towards overt leukemia. Leukemia Research 2003, 27, Suppl. 1, 58 – 59.

Řihová H, Žilovcová S, Březinová D, Čermák J, Starý J, Sieglová Z: Telomerase activity as a prospective molecular marker of myelodysplastic syndromes. Leukemia Research 2003, 27, Suppl. 1, 63 – 64.

Žilovcová S, Dvořáková R, **Žižková H**, Čermák J, Starý J, Březinová D, Sieglová Z: Telomere length reflects a portion of autologous hematopoiesis in patients with acute leukemia and MDS treated by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (AlHSCT). The Hematology Journal 2004, 5, Suppl. 2, 258.

Žižková H, Dvořáková R, Žilovcová S, Březinová D, Čermák J, Starý J, Sieglová Z: Telomerase activity and expression of the hTERT gene in myelodysplastic syndromes and acute leukemia. The Hematology Journal 2004, 5, Suppl. 2, 77-78.

Sieglová Z, Čermák J, Žilovcová S, **Žižková H**, Michalová K: Telomere length reduction in patients with early myelodysplastic syndrome (MDS) is connected with presence of karyotype abnormalities and with shortened survival and may serve as an additional prognostic factor. Blood 2004, 104, 11, 653a.

Žilovcová S, Dvořáková R, **Žižková H**, Čermák J, Starý J, Sieglová Z: Does telomere length reflect a portion of autologous hematopoiesis in patients with acute leukemia and MDS treated by allogeneic haematopoietic stem cell transplantation? Bone Marrow Transplantation 2005, 35, Suppl. 2, 159.

Žižková H, Dvořáková R, Žilovcová S, Březinová D, Čermák J, Starý J, Sieglová Z: Variation of Telomere-Telomerase Complex Components in Myelodysplastic Syndromes: Telomere Length and Expression of the hTERT Gene seem to be the most valuable for disease prognosis. Haematologica 2005, s2, s. 405.

Sieglová Z, Čermák J, Žilovcová S, **Žižková H**, Březinová J, Zemanová Z, Michalová K: Measurement of telomere length in patients with early MDS may serve as a prognostic factor. Leukemia Research 2005, 29 Suppl. 1, S3.

Sieglová Z, **Žižková H**, Žilovcová S, Březinová J, Zemanová Z, Michalová K, Čermák J: Telomere length, telomerase activity and expression profiles of associated genes in myelodysplastic syndromes: Telomere length and the hTERT gene expression are the most powerful for disease prognosis. Turkish Journal of Haematology 2005, 22, Suppl.: 78 – 79.

11.3. PŘEDNÁŠKY

Říhová H, Čermák J, Sajdová J, Hrabánek J, Schwarz J, Starý J, Sieglová Z: Detekce bodových mutací N-Ras protoonkogenu u pacientů s myelodysplastickým syndromem a akutní myeloidní leukémií minisekvenováním na pevném podkladě. Celostátní konference DNA diagnostiky Praha, 9. – 10. 12. 1998

Říhová H, Dvořáková R, Stöckbauer P, Hrabánek J, Čermák J, Sieglová Z: Aktivita telomerázy v leukemických buňkách. 5. Onkogenetický den, Praha 14.6.2000

Žižková H, Žilovcová S, Sieglová Z: Nespecifické molekulární markéry myelodysplastického syndromu a akutní leukémie. FN Motol, 19.4.2004

12. PŘÍLOHA PUBLIKACÍ

Increased levels of the POT1 gene expression correlate with telomerase activity in myelodysplastic syndromes and in acute myelogenous leukemia

Hana Žížková^a, Jaroslav Čermák^a, Jacqueline Maaloufová^a, Radana Neuwirtová^b, Zuzana Sieglová^a

^a Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, U Nemocnice 1, 128 20 Prague, Czech Republic

^b 1st Medical School, Charles University Hospital, Prague, Czech Republic

Key words: POT1 gene; Telomerase activity; Myelodysplastic syndromes; Acute myelogenous leukemia; Prognostic factor

Running title: POT1 gene expression in MDS and AML

Acknowledgements

This work was supported by the grant from the Ministry of Health of Czech Republic no. 0002373601

Corresponding author

Hana Žížková, MSc.

Department of Molecular Genetics

Institute of Hematology and Blood Transfusion

U Nemocnice 1

128 20 Prague 2, Czech Republic

E-mail address: Hana.Zizkova@uhkt.cz

Tel.: +420 221 977 117

Fax: +420 221 977 371

Abstract

We have studied POT1 gene expression in 27 patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia (AML) to find out whether it might serve as a prognostic factor of MDS and a molecular marker of leukemic cells. Up-regulation of POT1 was observed in 53% patients with MDS ($P=0.001$) and in 90% of patients with AML ($P=0.004$). Positive findings were detected in 38% patients with early forms of MDS and expression increased towards disease progression. The highest levels were found in patients with AML. Significant correlation of POT1 expression with telomerase activity supports its role in positive regulation of telomere length.

1. Introduction

Telomere-telomerase complex has recently become one of the most extensively studied topics, while its misbalance involving telomere erosion and subsequent increased activity of ribonucleoprotein telomerase were detected in majority of tumors including hematological malignancies[1]. As misbalance of telomere-telomerase complex may be a critical step in development of leukemia, data on dynamics of its components in hematopoietic cells of patients with myelodysplastic syndromes (MDS), considered as a credible tool for studying genome changes accompanying development towards overt leukemia, might help to elucidate molecular background of leukemogenesis and moreover, to identify MDS patients in risk.

The catalytic subunit of telomerase (hTERT), responsible for reverse transcription of telomeric repeats, is thought to be main regulator of telomerase activity. Except of hTERT, there are other proteins involved in a signaling pathway of telomere-telomerase complex, including Pot1 (Protection Of Telomeres 1) encoded by POT1 gene. Pot1 is a G-rich stranded telomeric DNA binding protein playing an important role in telomere length maintaining, based on observation that rapid loss of telomeric DNA occurs following deletion of POT1 gene[2]. Participation of Pot1 in telomerase regulation was not elucidated entirely yet, nevertheless, its putative functions might involve direct binding to single-stranded 3'overhanging DNA or indirect action through the interaction with duplex telomere DNA binding protein TRF1 (Telomeric Repeat Binding Factor 1) [3]. Also, it has been suggested that effect of Pot1 may be determined by location of it's binding at DNA 3'end: either it may inhibit telomerase action or it constitutes a preferred substrate for telomerase [4]. Thus, Pot1

may allow telomerase greater access to the telomere resulting in increased telomere length, therefore act as telomerase-dependent positive regulator of telomere length [5].

However, the impact of POT1 gene expression in molecular changes preceding leukemic transformation has not been studied *in vivo* yet. We present here data on POT1 gene expression in 27 patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and primary acute myelogenous leukemia (AML) before treatment. We intended to find out whether expression of POT1 gene is up-regulated in progression of MDS towards overt leukemia, thus whether it might serve as an additional prognostic factor and a molecular marker of leukemic cells, moreover to determine its relationship to telomerase activity.

2. Materials and methods

2.1. Patients and samples

Patients included into the study were divided into subgroups according to FAB (French-American-British) criteria as follows: MDS - 12 x refractory anemia (RA), 1 x RA with ringed sideroblasts (RARS), 3 x RA with excess of blasts (RAEB), 1 x RAEB in transformation (RAEB-t); primary AML: 4 x AML M1, 2 x AML M2, 1 x AML M4, 2 x AML M5, 1x AML M6). Patients with MDS were stratified on the base of bone marrow blast count, number of peripheral blood cytopenias and karyotype into risk groups according to the International Prognostic Scoring System (IPSS) [6]. Analyses were performed on bone marrow (BM) samples of MDS patients and BM or peripheral blood (PB) samples of patients with AML.

2.2. RNA extraction and reverse transcription

Total RNA from 10^7 mononuclear cells was extracted by modified method of Chomczynski [7]. Reverse transcription (RT) was performed in final volume of 20 μ l containing 1x buffer (Gibco BRL), 10mM dithiotreitol, 5nM hexamers (Amersham Biosciences), 20U of rRNasin® RNase Inhibitor (Promega), 200U of SuperScript™ II Rnase H (Invitrogen), 0.5mM dNTP mixture (Fermentas) and 6 μ l of total RNA. RNA and hexamers were first denatured at 70°C for 5 min and chilled on ice. Samples with RT mixture were then incubated at 25°C for 13 min and than at 42°C for 90min and finally incubated at 93°C for 3 min to inactivate reaction.

2.3. Real time quantitative RT-PCR

Real time quantitative RT-PCR was performed in RotorGene 3000A (Corbett Research) using primers for POT1: 5' gacggagcatcattcttctaaagg 3', 5' cttgccacatgaacatggtatcg 3' and specific TaqMan probe 5' tggcaccaggacaccattccatcttg 3' (designed by Proligo). Cycling parameters were as follows: 95°C for 10min, 45 cycles for (95°C for 15s, 60°C for 60s). PCR assays were conducted in doublets for each sample, and mean value was used for calculation. Relative expression of POT1 gene was determined as a ratio of POT1 gene expression to expression of the housekeeping gene beta-2-microglobulin (B2M, primers in [8]). Mononuclear cells of 16 healthy bone marrow or peripheral blood progenitor cells donors (range 3-42 years, Me = 31.5 years) served as normal controls (NC). The ratio higher than 2.345 (mean + 2 S.D. of healthy donors) was postulated as the POT1 gene expression positive result.

2.4. Telomerase activity

Protein extracts from 10^6 mononuclear cells were prepared by adding 200 μ l of CHAPS lysis buffer (Scintila), incubated at 4°C for 30 min and than centrifuged at 10 000g for 25 min. Protein extract equivalent to 1 000 cells were analyzed for telomerase activity using modified TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) Assay - TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} kit (Roche). Telomerase activity (TA) was evaluated according to manufacturer's instructions. Level of TA was determined in comparison to internal standard and value of TA > 0.0548 (mean + 2 S.D. of 41 BM/PB progenitor cells of healthy donors, range 3 –60 years, Me = 36 years) was marked as positive result.

2.5. Statistical analysis

Non-parametric t- tests of significance and Spearman's correlation coefficient were calculated using GraphPad Instat2 software.

3. Results and discussion

Significantly increased values of POT1 gene expression, in comparison to healthy controls, were obtained in a roughly one third (5/13) of patients with early forms of MDS (RA/RARSS: 2.785 ± 2.297 vs. NC: 0.814 ± 0.765 ; $P = 0.010$). The number of patients with positive POT1 gene expression, as well as the expression level was increased in advanced forms of MDS (RAEB, RAEB-T: 5.334 ± 2.086). The highest values of POT1 gene expression (6.024 ± 4.594) were found in a majority (90%, 9/10) of patients with AML (Fig. 1A), however not significantly different from findings in MDS patients.

Correspondingly, telomerase had significantly increased activity, in more than half (7/11) of patients with early forms of MDS (0.104 ± 0.130 vs. 0.016 ± 0.019 ; $P = 0.032$). In patients with untreated primary AML telomerase activity showed remarkable, approximately hundredfold increasing in comparison to healthy controls (1.826 ± 2.000 vs. 0.016 ± 0.019 ; $P = 0.038$) making significant difference in telomerase activity ($P = 0.045$) between groups of MDS and AML patients (Fig. 1B).

A highly significant correlation between individual values of POT1 gene expression and telomerase activity in MDS and AML patients ($r = 0.5505$, two-tailed $P = 0.008$) supports premise role of the POT1 gene in telomere elongation. On the other hand, no relationship was found between POT1 gene expression/telomerase activity and neither with individual MDS patients risk score (IPSS) nor with the proportion of blasts in BM/PB both in MDS and AML. The evidence of up-regulation of POT1 gene as well as telomerase activity in a portion of patients with early forms of MDS points out on an event of early misbalance of these components of telomere telomerase complex at the time when clinical features of leukemogenesis, i.e. more than 5% of blast cells in bone marrow were not yet present. Thus, a lack of correlation with IPSS prognostic score does not seem to be controversy. On the other hand, we showed that POT1 is up regulated already in early forms of MDS and that its expression has an increasing trend corresponding with disease progression. Also, significantly increased POT1 gene expression is a feature of mononuclear BM/PB cells in majority of patients with primary AML at the time of diagnosis. Our preliminary observations predestine POT1 gene expression at least as an additional prognostic factor of MDS and a helpful molecular marker of AML. Nevertheless, further clinical studies are required to confirm our observations and to elucidate the role of Pot1 in regulation of telomere-telomerase complex in hematological malignancies.

References

1. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cell and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-5
2. Baumann P, Cech TR: Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 2001; 292: 1771-5
3. Loayza D, de Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 2003; 423: 1013-7
4. Lei M., Zaug AJ, Podell ER, Cech TR. Switching human telomerase on and off hPOT1 protein in vitro. *J Biol Chem* 2005; 280(21): 20449-56
5. Colgin LM, Baran K, Baumann P, Cech TR, Reddel RR. Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Curr Biol* 2003; 13: 942-6
6. Greenberg P, Cox Ch, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sany G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079-88
7. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9
8. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using real-time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; 17: 2474-86

Figure captions

Fig. 1: Relative expression of POT1 gene (a) and telomerase activity (b) with marked mean values in negative controls, patients with MDS and primary AML. Statistical comparison of mean values and S.D. is reported as P value.

Abbreviations: AML, acute myelogenous leukemia; NC, negative controls; MDS, myelodysplastic syndromes

Figure 1A

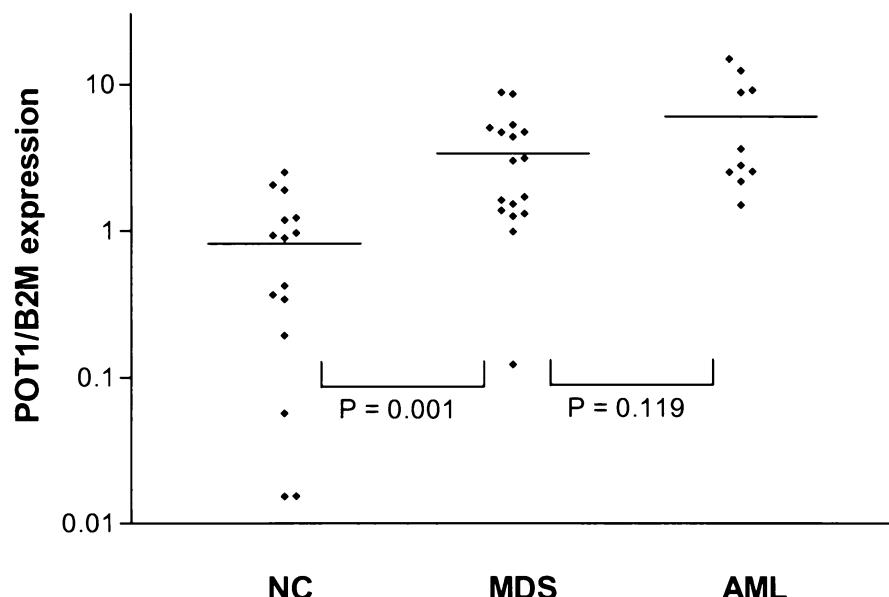
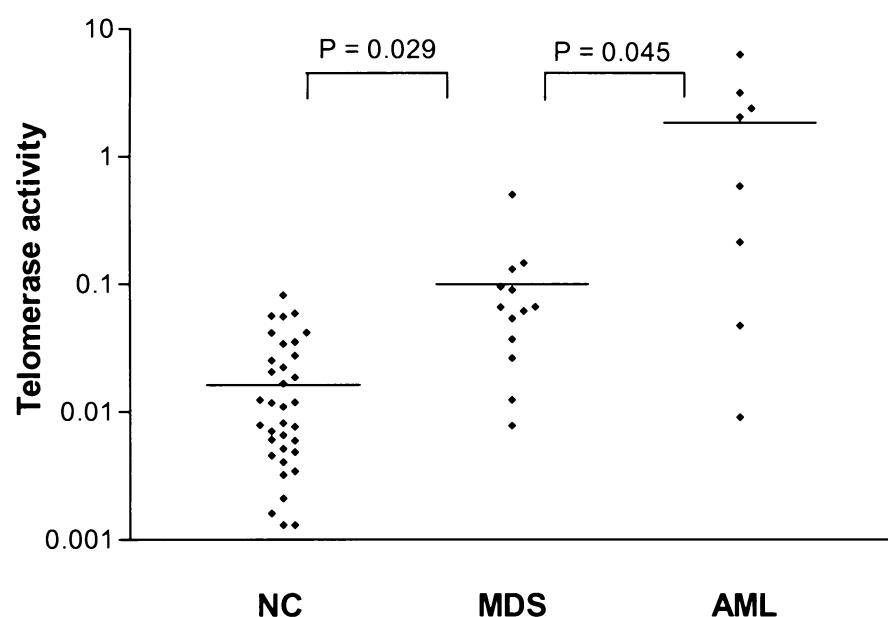


Figure 1B



Dynamics of telomere erosion and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS: a marker of disease prognosis?

Zuzana Sieglová^{a,*}, Soňa Žilovcová^a, Jaroslav Čermák^a, Hana Říhová^a, Dagmar Březinová^a, Renáta Dvořáková^a, Markéta Marková^a, Jacqueline Maaloufová^a, Jana Sajdová^a, Jana Březinová^b, Zuzana Zemanová^b, Kyra Michalová^b

^a Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 20 Prague, Czech Republic

^b Center of Oncocytogenetics, General Faculty Hospital and 1st Medical Faculty of Charles University, Prague, Czech Republic

Received 2 January 2003; accepted 25 November 2003

Available online 24 May 2004

Abstract

Telomere length was evaluated by terminal repeat fragment method (TRF) in 50 patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia (AML) arising from MDS and in 21 patients with untreated primary AML to ascertain, whether telomere erosion was associated with progression of MDS towards overt leukemia. Heterogeneity of TRF among MDS FAB subgroups ($P = 0.004$) originated from its shortening in increased number of patients during progression of the disease. Chromosomal aberrations were present in 32% MDS patients with more eroded telomeres ($P = 0.022$), nevertheless a difference between mean TRF in the subgroups with normal and abnormal karyotype diminished during progression of MDS. A negative correlation between individual TRF and IPSS value ($P = 0.039$) showed that telomere dynamics might serve as a useful prognostic factor for assessment of an individual MDS patient's risk and for decision of an optimal treatment strategy.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Telomere erosion; Myelodysplastic syndromes; Acute myeloid leukemia; Genome instability; Chromosomal aberrations; IPSS risk groups; Prognosis of MDS

1. Introduction

During the last decade, both the telomeres—ends of human chromosomes and enzyme telomerase have been subjected to intensive investigation as potential molecular markers important for diagnosis and prognosis of almost all neoplasms including leukemia (reviewed in [1–8] recently published).

Abbreviations: AML, acute myelogenous leukemia; BM, bone marrow; bp, kbp, basepair, kilobasepair; CR, complete remission; FAB, French-American-British; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; IPSS, International Prognostic Scoring System; ISCN, International System for Human Cytogenetics Nomenclature; PRINS, primed *in situ* labeling; LOH, loss of heterozygosity; MDS, myelodysplastic syndromes; RA, refractory anemia; RARS, RA with ring sideroblasts; RAEB, RA with excess of blasts; RAEB-T, RAEB in transformation; RER+, replication error phenotype; RTA, relative telomerase activity; TRF, terminal repeat fragment

* Corresponding author. Tel.: +420-2-21977308;
fax: +420-2-21977371.

E-mail address: sieglova@uhkt.cz (Z. Sieglová).

Telomeres represent structural and functional units composed of protein and non-coding repetitive DNA sequences (TTAGGG)_n. The role of telomeres is to ensure the integrity of chromosomes and to protect them from degradation, recombination and from a loss of DNA sequences. Physiological long-term telomere shortening in peripheral blood cells by roughly 40–80 bp per year [9] is supposed to be enhanced during malignant transformation. Rapid erosion of telomeres results in an extensive DNA instability. Once a length of 5–7 kbp has been reached, genomic instability gradually progresses until a critical length of 3–4 kbp, which results in rapid elimination of altered cells. However, a small number of cells may escape from this “mortality phase” and give rise to a clone with unlimited proliferative potential [9]. This is almost always accomplished by activation of ribonucleoprotein telomerase to maintain the function of telomeres by synthesizing telomeric repeats. Both reactivation of telomerase as well as its increased expression leads to elongation or stabilization of telomeres and hence to immortalization

of cells with genetic damage [10]. An intensive study of pathways responsible for regulation of telomere length and telomerase activity might elucidate a molecular basis of malignant transformation of cells and may serve for therapeutic approaches targeting telomere–telomerase complex and affecting “immortality” of telomerase expressing malignant cells (reviewed in [11,12]).

Hematopoietic cells of patients with the myelodysplastic syndromes (MDS) constitute a valid object for investigation of molecular mechanisms preceding malignant transformation and development of overt leukemia. MDS represents a heterogeneous group of clonal disorders of multipotent hematopoietic stem cells characterized by ineffective hematopoiesis connected with peripheral blood cytopenia, bone marrow morphological abnormalities and with tendency to progress into acute leukemia in approximately one third of cases.

Despite a considerable progress bringing new insights into the etiology and pathogenesis of MDS, the molecular background of MDS evolution towards leukemia has not been entirely elucidated yet. A modified dynamics of telomere–telomerase complex may be one of the critical factors playing an important role in this process. A rapid proliferation of hematopoietic stem cells in MDS patients may lead to an accelerated telomere shortening and consequently to genome instability.

We have focused on evaluation of telomere length in bone marrow and peripheral blood cells obtained from patients with MDS and acute myelogenous leukemia (AML). The aim of our study was to find out, whether a rapid telomere shortening is associated with the progression of MDS from early phases to advanced phases and subsequently towards acute leukemia. We investigated a possible relationship between telomere length and leukemic progression by comparing the results obtained in different MDS risk groups evaluated according to International Prognostic Scoring System (IPSS). We also studied relations between telomere erosion and genome instability manifested by chromosomal aberrations, mainly by complex rearrangements of karyotype.

2. Patients and samples

Molecular analyses were performed on mononuclear bone marrow and peripheral blood cells of 52 samples of 50 patients with FAB subtypes of primary myelodysplastic syndromes and acute myelogenous leukemia arising from MDS. Moreover, 21 patients with untreated primary AML (FAB subtypes M0–M4) were also investigated. Majority (66) of investigated patients were adults at the age ranging from 21 to 80 years (median = 49 years) treated at the Institute of Hematology and Blood Transfusion in Prague. Samples taken from five children and adolescents ranging from 12 to 17 years (median = 13 years), were sent from the Department of Pediatrics of 2nd Medical School of Charles

University. The MDS patients were classified according to the FAB [13] and WHO criteria [14] and divided into FAB subgroups as follows: refractory anemia (RA), 18; RA with ring sideroblasts (RARS), 2; RA with excess of blasts (RAEB), 17; two of them in complete remission after (CR) chemotherapy, RAEB in transformation (RAEB-T), 3, one of them in CR; and 10 with acute myelogenous leukemia arising from MDS. On the base of bone marrow blasts count, number of peripheral blood cytopenias and karyotype 35 patients with MDS were stratified according to the International Prognostic Scoring System [15] into four risk groups: low risk (0), intermediate 1 (0.5–1.0), intermediate 2 (1.5–2.0), and high risk ≥2.5. Two of 50 patients with MDS and AML from MDS were studied repeatedly during the course of the disease. Mononuclear bone marrow cells obtained from 10 age-matched donors served as controls.

3. Methods

Mononuclear cells obtained from bone marrow and peripheral blood samples were separated by Ficoll-Paque density gradient centrifugation. High molecular weight genomic DNA was extracted by modification of the salting-out method according to the standard protocol.

Telomere lengths were measured by terminal repeat fragment (TRF) method performing non-radioactive chemiluminescent assay. The method is based on Southern blot hybridization with the oligonucleotide labeled by digoxigenine containing TTAGGG repeats after digestion of 2 µg high-molecular weight DNA with *Hinf*I and *Rsa*I restriction enzymes, followed by chemiluminescent detection (TeloTAGGG Telomere Length Assay, Roche Molecular Biochemicals). Telomere length in kilobases—TRF index, representing average data on telomeres from all chromosome ends, was estimated according to the instruction of the manufacturer. In addition to a template provided by producer, we considered as positive controls also immortalized leukemic cell lines with TRFs evaluated by us as follows: NB4, 4.74 kbp; HL60, 4.3 kbp; PS1, 4.1 kbp; ML1, 3.4 kbp; and SD1, 2.2 kbp. Normal and shortened telomeres lengths were determined according to the results of Boultonwood et al. [16] with regard to results of TRF measurement in healthy age-matched donors from our study. Cytogenetic analysis was performed by classical G-banding method and karyotypes were prepared according to ISCN [17]. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with specific DNA probes (VYSISTM, CAMBIOTM) and multicolor-FISH with 24Xcyte color kit (MetaSystemsTM) were performed for a more detailed analysis of karyotype abnormalities. The patients with more than three chromosomal abnormalities in one cell were classified as having a complex rearrangement of karyotype in bone marrow cells. A prognostic significance of karyotype was evaluated according to IPSS.

4. Results

4.1. Dynamics of telomere length in MDS and AML

On the base of our results of TRF of healthy age-matched donors (mean TRF = 8.29 ± 0.79 , range 7.16–9.82), we postulated cases with TRF shorter than 7.5 kbp as cases with reduced telomeres, similarly as in work of Boultwood et al. [16].

The results on TRFs, karyotyping and stratifying of MDS patients according to the IPSS are showed in Tables 1 and 2. A considerable heterogeneity of telomere length, defined as terminal restriction fragment (TRF) was found in bone marrow cells of MDS patients regardless of the proportion of blast cells (Fig. 1). In fact, 46% (17/37) out of our MDS patients at diagnosis and as much as 80% (8/10) of patients with conversion to acute leukemia showed telomere reduction in comparison to age-matched healthy individuals. Our results also indicate an increasing rate of patients with eroded telomeres when comparing early phases of MDS—RA and RARS (30%; 6/20) with advanced forms of the disease—RAEB and RAEB-T (65%; 11/17) and further with AML arisen from MDS (80%; 8/10). We observed remarkable erosion of telomeres in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells obtained from all investigated patients with primary AML.

Progression of the disease and conversion of MDS to AML was also connected with heterogeneity and with progressive decrease in telomere length. Evaluated by average values of TRFs, telomere length in RA, and RARS was 8.04 ± 1.55 kbp in contrast to 6.84 ± 1.72 kbp in advanced forms of MDS (RAEB + RAEB-T) and to 5.75 ± 1.96 kbp in secondary AML from MDS. Variation of telomere lengths

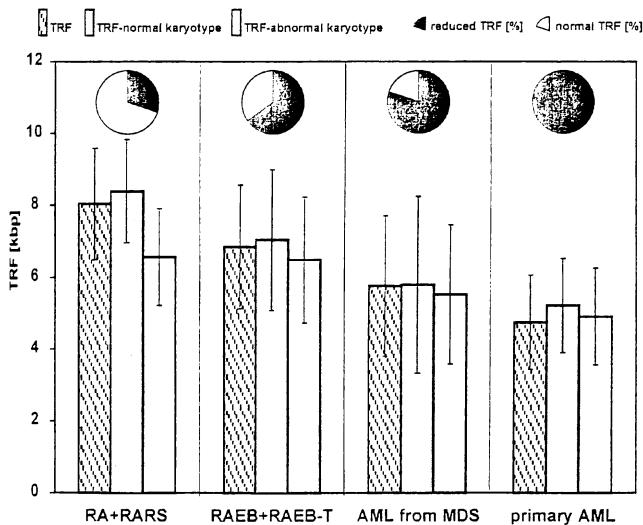


Fig. 1. Progressive telomere shortening in MDS and AML. One-way analysis (ANOVA) showed very significant heterogeneity of TRF among FAB subgroups of MDS and AML from MDS ($F = 6.387$; $P = 0.004$); the difference in TRF between primary AML and secondary AML from MDS was not significant ($t = 1.465$; $P = 0.084$).

among these subgroups was highly significant ($F = 6.387$; $P = 0.004$). A maximum of telomere reduction was observed in patients with primary AML investigated before treatment (TRF = 4.75 ± 1.31 kbp), however, the difference in TRF between patients with primary AML and secondary AML from MDS was not statistically significant ($P = 0.084$). We confirmed a significant negative correlation between TRF and the number of myeloblasts in patients with advanced forms of MDS and with conversion of MDS to acute leukemia ($r = -0.404$; two tailed P value = 0.033). Also in primary AML was individual TRF negatively correlated with number of blast cells in the tissue from which the analyzed specimens was taken ($r = -0.453$; two tailed P value = 0.039).

4.2. Telomere length and prognosis of MDS

We observed a significant negative correlation between individual TRFs in bone marrow cells of MDS patients and IPSS score, dividing the patient into four risk groups with unequivocal probability of surviving and conversion into acute leukemia (Fig. 2; non-parametric Spearman's correlation coefficient $r = -0.351$; two tailed P value = 0.039). Although the correlation is relatively weak, it suggests shortened telomeres as a risk factor in MDS patients.

4.3. Telomere length and karyotype

Chromosomal aberrations concerning deletion of 5q, monosomy 7, trisomy 8, together with four cases of complex rearrangements of karyotype were observed in 32.4% (11/34) of our MDS and 55.5% (5/9) patients with AML from MDS with known karyotype (Table 1, Fig. 3). The MDS patients with abnormal karyotype possessed significantly more eroded telomeres ($TRF_{abn} = 6.51 \pm 1.48$ kbp) in contrast to the patients with normal karyotype ($TRF_n = 7.92 \pm 1.73$ kbp), regardless of the stage of the disease (two-tailed $P = 0.022$). Nevertheless, the difference between mean telomere length in the subgroups with normal

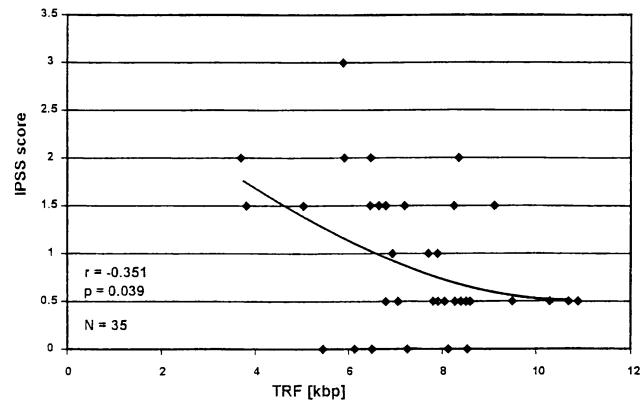


Fig. 2. Significant negative correlation between individual TRFs of patients with MDS and risk of the disease according to IPSS score: Spearman $r = -0.351$; two-tailed $P = 0.039$.

Table 1

The results on telomere length (TRF in kbp), proportion of blasts in corresponding tissue, number of cytopenia in peripheral blood, karyotyping, and scoring according to the International Prognostic Scoring System (IPSS) in patients with MDS

Patient #	MDS FAB subtype	Age(years)	Tissue BM/PB	Blasts in BM (%)	TRF (kbp)	Karyotype	Cytopenias in PB	IPSS score
1	RA	25	BM		9.70	46,XX		
2	RA	28	BM	4.0	9.50	46,XY	3	0.5
3	RA	51	BM		5.04	46,XX,complex karyotype		
4	RARS	49	BM	4.0	8.27	47,XY,+mar	2	0.5
5	RA	67	BM	0.0	6.79	46,XX,del(5)(q13q33) [6]/46,XX [14]	2	0.5
6	RA	65	BM	5.0	8.54	46,XY	1	0
7	RA	61	BM	2.0	10.70	46,XX	3	0.5
8	RA	69	BM	2.8	5.45	46,XY	0	0
9	RA	22	BM	0.0	10.90	46,XX	3	0.5
10	RA	49	BM	0.0	8.05	46,XX	2	0.5
11	RA	80	BM	0.0	8.61	Not done		
12	RA	53	BM	2.3	8.40	46,XX		
13	RA	19	BM	0.0	8.60	46,XY [17]/polyploidy [3]	3	0.5
14	RARS	63	BM	0.0	7.91	46,XY	2	0.5
15	RA	27	BM	0.0	7.80	46,XY	2	0.5
16	RA	22	BM	0.0	8.51	46,XX	3	0.5
17	RA	50	BM	0.0	6.50	46,XX	1	0
18	RA	69	BM	4.8	7.25	46,XX,1qh+	0	0
19	RA	40	PB	0.0	8.13	46,XX	1	0
20	RA	52	BM	3.1	6.13	46,XX,del(5)(q13q33) [22]	1	0
21/1	RAEB	70	BM	7.0	7.90	46,XX,del5q(q13q33) [20]	2	1.0
21/2	RAEB	71	BM	12.0	5.88	46,XX [1]/47,XX,del(5)(q13q33)+8 [19]	2	3.0
22	RAEB	58	BM	6.0	8.25	46,XX	3	1.5
23	RAEB	21	BM	12.0	6.47	46,XY	2	2.0
24	RAEB	41	BM		7.40	Not done		
25	RAEB	60	PB	9.6	5.03	46,XX [7]/46,XX,del(7)t(1;7) [1]/47,XX,+8	0	1.5
26	RAEB	34	BM	14.0	8.35	46,XX	2	2.0
27	RAEB	74	BM	9.0	6.79	46,XX	2	1.5
28	RAEB	58	BM	11.2	3.69	46,XY	3	2.0
29	RAEB	38	BM	8.8	10.30	46,XX	0	0.5
30	RAEB	44	PB	15.0	3.81	46,XX,pinv(9)	1	1.5
31	RAEB	70	BM	9.0	9.12	45,XY,-7	1	1.5
32	RAEB	50	BM	7.0	6.64	46,XYdel(5)(q13q33)ins(17;21) [15]/46,XY,ins(17;21) [7]	1	1.5
33	RAEB	47	BM	6.4	7.70	n = 48–67,XY,complex karyotype	3	1.0
34	RAEB	30	PB	10.4	6.46	46,XX	3	1.5
35	RAEB	26	BM	10.0	7.19	46,XX/([18]/46,XX,del(9)(q)) [2]	3	1.5
36	RAEB	51	BM	3.0	6.93	45,XY,t(13;14)(q10;q10) [17]/45,XY,t(13;14)(q10;q10), del(20)(q11) [3]	0	1
37 ^a	RAEB	23	BM	4.4	7.05	46,XX	2	0.5
38	RAEB-T	13	BM	24.0	7.37	Not done		
39	RAEB-T	59	BM	24.0	5.91	46,XX	1	2.0
40+	RAEB-T	35	BM	2.0	8.40	46,XY	2	0.5

Two samples (21/1; 21/2) of the same RAEB female patient with deletion 5q showed sequential reduction of telomeres (TRF₁ = 7.9; TRF₂ = 5.9) with new appearance of trisomy of chromosome 8. Complex karyotype—more than three chromosomal breaks in one cell; mFISH or any molecular cytogenetic analysis was not performed if the quality of metaphase chromosomes was not satisfactory, or if there was not enough fixed cells. In some patients the quality of chromosomes was not sufficient even for precise G-banding analysis.

^a RAEB in complete remission: +RAEB-T in CR.

Table 2

The results on telomere length (TRF in kbp) and karyotyping in patients with AML from MDS and with primary AML

Patient #	Diagnosis	Age (years)	Tissue BM/PB	Blasts in corresponding tissue (%)	TRF (kbp)	Karyotype
AML from MDS						
41	AML	17	BM	20.0	2.69	45,XY,-7
42	AML	53	BM		2.43	46,XY
43	AML	44	BM		7.41	46,XX
44/1	AML M1	64	BM	69.0	5.65	46,XY,complex karyotype ^a
44/2	AML M1	64	BM	11.8	7.50	46,XY,complex karyotype ^a
45	AML	55	BM	36.0	5.14	47,XY,+8
46	AML M4	57	PB	44.8	8.11	45,XY,t(13;14)(q10;q10)
47	AML	44	BM	34.0	5.50	46,XX
48	AML	21	BM		6.79	Not done
49	AML	53	PB	35.7	6.00	46,XX,pinv(9)
Primary AML						
50	AML M4	56	BM	44.0	7.82	46,XX
51	AML M1	30	PB	83.0	3.54	46,XY
52	AML M4	64	PB	27.2	5.01	No mitosis
53	AML M0	63	PB	95.0	4.08	46,XY
54	AML M4	42	PB	43.0	7.30	46,XY
55	AML	48	BM	91.0	4.61	46,XY
56	AML M0	37	PB	43.0	4.68	Not done
57	AML M3	52	BM	80.0	3.09	Not done
58	AML M2	39	PB	98.0	4.18	46,XY,del(9)(q)
59	AML	15	BM	61.5	6.63	46,XY,pinv(16),complex karyotype ^a
60	AML	26	PB	71.4	6.23	48,XX,iso(8)(q),+der(8)t(8;10),der(10)t(10;22),+19[7]/idem,t(4;6)[1] ^a
61	AML M2	65	PB	61.0	4.18	42,XX,complex karyotype ^a
62	AML M3	23	BM	60.0	3.86	47,XX,pinv(16),+22[20]/46,XX[2]
63	AML M2	32	PB	89.0	3.23	No mitosis
64	AML M3	27	PB	70.0	4.84	46,XX
65	AML M4	40	PB	88.0	5.83	46,XX
66	AML M3	13	BM	55.0	6.24	46,XX
67	AML	69	BM	51.0	5.18	n = 38–52,complex karyotype ^a
68	AML	68	PB	80.0	3.10	No mitosis
69	AML M3	12	BM	72.0	3.10	46,XX,21p+[13]/46,XX,t(17;?),21p+[9]
70	AML M2	24	PB	91.2	4.02	46,XX,del(12)(p13)
71	AML M1	44	PB	73.5	6.81	46,XX,complex karyotype ^a

In sequential samples of patient # 44 with AML M1 from MDS we observed longer telomeres (TRF = 7.5; 12% of blasts) after induction treatment when compared to their reduced status at the time of diagnosis (TRF = 5.6; 69% of blasts), together with significant decrease of proportion of cells with complex rearrangements of karyotype.

^aComplex karyotype—more than three chromosomal breaks in one cell.

and abnormal karyotype diminished during progression of the disease. The mean TRF in RA and RARS patients with abnormal karyotype was significantly reduced ($TRF_{abn} = 6.56 \pm 1.35$ kbp) compared to those with normal karyotype ($TRF_n = 8.4 \pm 1.44$ kbp; $P = 0.038$). In advanced forms of MDS (RAEB, RAEB-T) the difference of mean TRF in both subgroups was not significant ($TRF_n = 7.03 \pm 1.96$ kbp; $TRF_{abn} = 6.48 \pm 1.76$ kbp; $P = 0.289$). In the same way, a conversion of MDS to AML was accompanied by similar erosion of telomeres in both patients with normal or abnormal karyotype ($TRF_n = 5.79 \pm 2.46$ kbp; $TRF_{abn} = 5.52 \pm 1.94$ kbp, $P = 0.179$).

Deletions of 9q, 12p, inversion of chromosome 16 and four cases of complex rearrangements of karyotype were found in as much as 56.2% (9/16) of the patients with primary AML (Table 2, Fig. 4). Mean telomere length was al-

most equal, both in AML patients with normal karyotype, as in patients with abnormal karyotype ($TRF_n = 5.21 \pm 1.31$ kbp; $TRF_{abn} = 4.91 \pm 1.35$ kbp, $P = 0.331$), similarly as in patients advanced forms of MDS and in AML from MDS.

5. Discussion

Only small number of studies trying to elucidate dynamics of telomere shortening in preleukemic and leukemic cells and its association with clinical status and with frequency of chromosomal aberrations have been published (reviewed in [18]). Our findings confirmed an anticipated tendency of accelerated telomere erosion connected with progression of MDS towards overt leukemia, described by some authors

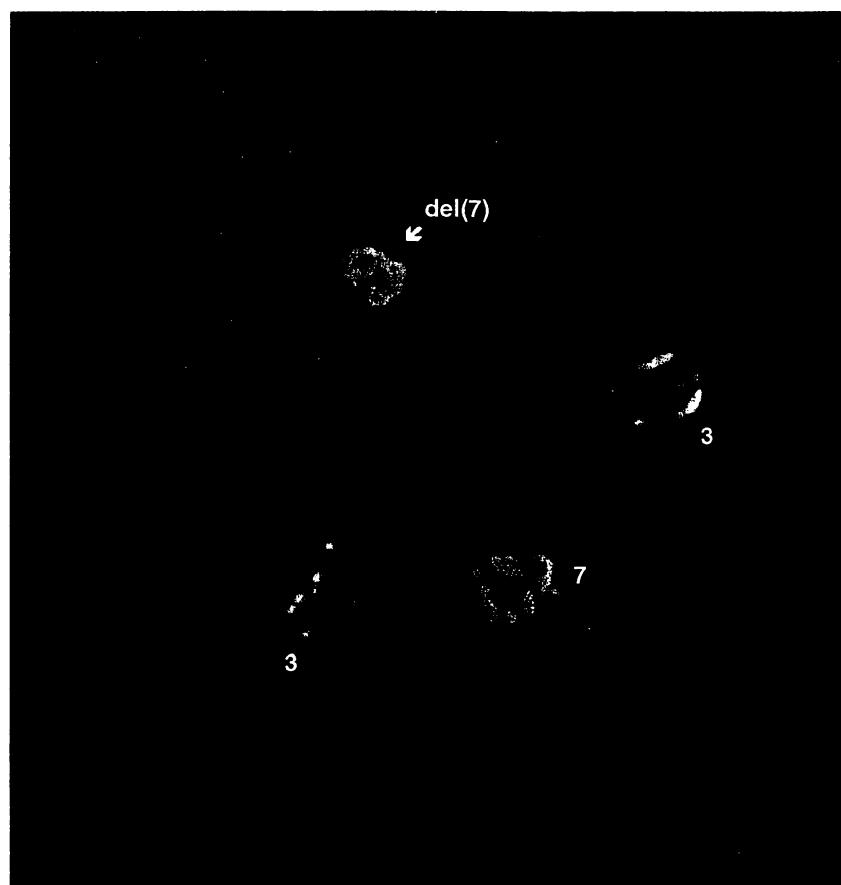


Fig. 3. Metaphase spread from bone marrow cell of female patient with MDS RA # 3 (TRF = 5.03; 51 years) after double-color hybridization with whole chromosome painting probes (WCP) for the chromosomes 3, red signal; and 7, green signal showing deletion del(7)(q).

[16,19]. Abnormal telomere reduction was already present in approximately one third of our patients with RA and RARS indicating a determining role of individual proliferation pattern, rather than other phenomena, and pointing out an event of early misbalance of telomere–telomerase complex at the time when clinical features of leukemogenesis, e.g. blast cells in bone marrow were not yet present. However, the trend of continuous telomere shortening observed during the course of MDS was clearly associated with increasing number of bone marrow blasts in progressive forms of MDS and in AML from MDS as shown by a significant negative correlation between telomere length and number of blast cells in fraction of bone marrow mononuclears ($P = 0.033$). In the same way, in untreated patients with primary AML a degree of telomere reduction depended on the number of blast cells ($P = 0.039$). Also, significantly shorter telomeres from bone marrow compared to peripheral blood specimens in patients with untreated acute leukemia [20] point at the same event. Obviously, predominance of normal cells may lead to underestimation of telomere loss, as it has been documented on specimens obtained from patients with solid tumors [21].

Although estimated telomere length is influenced by a ratio of various cell subpopulations in specimens [21,22], de-

tection of TRF in patients with MDS and leukemia is commonly performed on non-fractionated mononuclear cells of bone marrow and/or peripheral blood because of a small number of cells for analysis, especially in patients with hypoplastic forms of MDS.

The question arises, whether and to what extent is erosion of telomeric repeats compensated by reverse transcription activity of telomerase. The data on telomerase activity and telomere length in hematopoietic progenitor cells from fetal liver, cord blood, peripheral blood, and bone marrow in the study of Engelhardt et al. [23] suggest that telomerase activity in hematopoietic cells reduces, but does not prevent, telomere shortening on proliferation. Telomerase activity seems to be increased already in MDS and is further up-regulated in AML [24]. Although its level in patients with MDS is elevated in comparison with healthy individuals, a high level of telomerase is not common in MDS [25]. Our preliminary results on telomerase activity [26] showed its significant elevation ($RTA = 4.96 \pm 3.78$) in mononuclear bone marrow cells of 32% (6/19) of patients with RA and RARS, in comparison with bone marrow cells of healthy donors ($RTA = 0.04 \pm 0.19$) and RTA was found to be positive in all investigated patients with advanced forms of MDS and with AML. Thus, prolongation of telomeres in

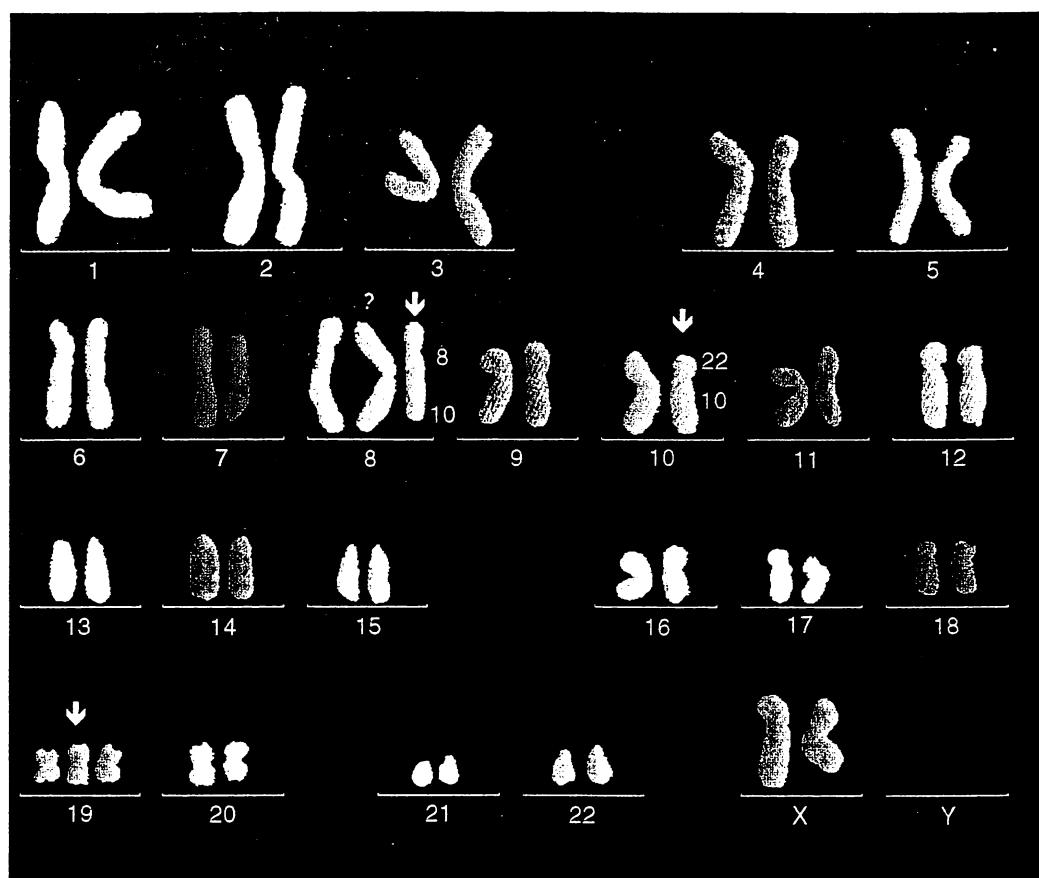


Fig. 4. Karyotype of female patient # 60 with primary AML (TRF = 6.23; 26 years, 71.4% blasts in BM) with complex chromosomal rearrangements proved by m-FISH: 48.XX.i(8)(q10).+der(8)t(8;10).der(10)t(10;22),+19.

the patient with AML from MDS after induction treatment when compared to the status at diagnosis together with reduction of proportion of cells with complex karyotype rearrangements, presumably does not reflect only decreased proportion of blast cells in bone marrow, but also an effect of enhanced telomerase activity during malignant transformation of hematopoietic cells. Besides, in pediatric acute leukemia (predominantly ALL) with the loss of leukemic burden after an induction chemotherapy longer mean TRFs were found as a reflection of the re-population with normal cells, although the degree of telomere regeneration after chemotherapy remains to be determined [20].

Similar findings, showing relationship between erosion of telomeres and severity of the disease according to IPSS, were formerly published by Ohyashiki's group [25]. They found a significant correlation of shortened telomeres in myelodysplasia with leukemic transformation and aberrations of karyotype. Comparing telomere dynamics to IPSS risk groups they observed that patients with shortened telomeres had a significantly low hemoglobin concentration, a high percentage of blasts in bone marrow and high incidence of cytogenetic abnormalities. They concluded that dynamics of TRF length rather than telomerase activity might be useful in the future to stratify patients according to risk scoring systems. Furthermore, in agreement with

previous study [25], we confirmed a positive correlation between abnormal reduction of telomeres on one hand and genome instability presented on cytogenetic level as single aberrations or complex karyotype on the other hand. Nevertheless, it is not clearly elucidated, whether also genomic alterations on molecular level, namely a relatively common phenomenon of microsatellite instability in hematopoietic cells, is affected by loss of telomere maintenance. Almost the same results as reported by our group from 22 different microsatellite loci and showing 33% incidence of replication error phenotype (RER+) in MDS [27], were presented on the panel of seven loci by Ohyashiki's team [28]. Moreover, they assessed an association to telomere dynamics and concluded that in most MDS patients RER+ did not seem to be directly linked to telomere reduction. However, according to the suggestion of Johansson et al. [29], profound rearrangements of karyotype are probably secondary manifestation of genome instability resulting from initiation events on molecular level, which may include mutations of genes responsible for genomic stability and DNA repair. It seems to be plausible that accelerated telomere shortening probably due to cell rapid division in patients with MDS might be one of these early key mechanisms potent to initiate huge genome changes leading to malignant transformation of hematopoietic cells. Besides, an increasing frequency of

genetic recombination toward telomeres due to intercalation of telomeric repeats into non-telomeric chromosome sites making them more fragile has been documented [30]. These findings, together with a frequent incidence of LOH at sub-telomeric region 11p15.5 in preleukemic and leukemic cells [31] and so called “position effect” leading to silencing of genes near telomeres [32] strengthen the hypothesis on particularly active role of telomeric DNA in the genome.

We showed that the presence of shortened telomeres in the proportion of MDS patients was associated with disease progression towards the more advanced forms with more frequent chromosomal aberrations including complex rearrangements of karyotype and with unfavorable prognosis. Importantly, a significant negative correlation between an individual telomere length and IPSS risk score supports a hypothesis that the intensity of telomere reduction may serve as an useful prognostic factor in the assessment of the individual patient's risk and as a helpful parameter for decision of an optimal individual treatment.

Acknowledgements

This study was supported by the grants of IGA MZ CR: NC/5903-3, NC/7606-3, NK/7713-3, 237360001, and GACR 301/01/0200.

Contributions. (1) Conception and design: Z. Sieglová. (2) Analysis and interpretation of data: S. Žilovcová, Z. Sieglová, J. Čermák, K. Michalová, H. Řihová, R. Dvořáková, J. Březinová, Z. Zemanová. (3) Drafting the article: Z. Sieglová. (4) Critical revision of the article for important intellectual content: J. Čermák, K. Michalová. (5) Final approval of article: Z. Sieglová. (6) Provision of study material or patients: J. Čermák, M. Marková, J. Maaloufová, J. Sajdová. (7) Statistical expertise: Z. Sieglová. (8) Obtaining finding: Z. Sieglová, J. Čermák, K. Michalová. (9) Administrative, technical or logistic support: D. Březinová. (10) Collection or assembly of data: D. Březinová.

References

- [1] Dhaene K, Van Marck E, Parwaresh R. Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch* 2000;437:1–16.
- [2] Shay JW, Werbin H, Wright WE. Telomeres and telomerase in human leukemias. *Leukemia* 1996;10:1255–61.
- [3] Blasco MA. Telomeres and cancer: a tale with many endings. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:70–6.
- [4] Wu X, Zhu CI, Zhao H, Grossman BH, Shay JW, Luo S, et al. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1211–8.
- [5] Franco S, Ozkaynak MF, Sandoval C, Tugal O, Jayabose S, Engelhardt M, et al. Telomere dynamics in childhood leukemia and solid tumors: a follow-up study. *Leukemia* 2003;17:401–10.
- [6] Lee JJ, Nam CE, Cho SH, Park KS, Chung IJ, Kim HJ. Telomere length shortening in non-Hodgkin's lymphoma patients undergoing chemotherapy. *Ann Hematol* 2003;82:492–5.
- [7] Yokota T, Suda T, Igarashi M, Kuroiwa T, Waguri A, Kawai H, et al. Telomere length variation and maintenance in hepatocarcinogenesis. *Cancer* 2003;98:110–8.
- [8] Rosenberg R, Gertler R, Stricker D, Lassman S, Werner M, Nekarda H, et al. Telomere length and hTERT expression in patients with colorectal carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 2003;162:177–81.
- [9] Iwama H, Tauchi T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Hayashi S, Hayashi S, et al. Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet* 1998;102:397–402.
- [10] Shay JW, Wright WE, Werbin H. Defining the molecular mechanism of human cell immortalization. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072:1–7.
- [11] Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:677–85.
- [12] Helder MN, Wisman GB, van der Zee AGJ. Telomerase and telomeres: from basic biology to cancer treatment. *Cancer Invest* 2002;20:82–101.
- [13] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1982;51:189–99.
- [14] Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *Hematol J* 2000;1:53–66.
- [15] Greenberg P, Cox Ch, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079–88.
- [16] Boultwood J, Fidler C, Kusec R, Rack K, Elliot PJ, Atoyebi O, et al. Telomere length in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol* 1997;56:266–71.
- [17] Mittelman F, editors. ISCN an International System for Human Cytogenetics Nomenclature. Basel: S Karger; 1995.
- [18] Ohyashiki JH, Sashida G, Tauchi T, Ohyashiki K. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. *Oncogene* 2002;21:680–7.
- [19] Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Fujimura T, Kawakubo K, Shimamoto T, Iwabuchi A, et al. Telomere shortening associated with disease evolution pattern in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res* 1994;54:3557–60.
- [20] Engelhardt M, Ozkaynak MF, Drullinsky P, Sandoval C, Tugal O, Jayabose S, et al. Telomerase activity and telomere length in pediatric patients with malignancies undergoing chemotherapy. *Leukemia* 1998;12:13–24.
- [21] Engelhardt M, Albanell J, Drullinsky P, Han W, Guillem J, Scher HI, et al. Relative contribution of normal and neoplastic cells determine telomerase activity and telomere length in primary cancers of prostate, colon, and sarcoma. *Clin Cancer Res* 1997;10:1849–57.
- [22] Leber B, Bacchetti S. Telomeres and telomerase in normal and malignant hematologic cells. *Leukemia Lymphoma* 1996;24:1–9.
- [23] Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, Pettengell R, Han W, Moore MAS. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 1997;90:182–93.
- [24] Counter CM, Gupra J, Hurley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 1995;85:2315–20.
- [25] Ohyashiki JH, Iwama H, Yahata N, Ando K, Hayashi S, Shay JW, et al. Telomere stability is frequently impaired in high groups of patients with myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res* 1999;5:1155–60.
- [26] Řihová H, Dvořáková R, Žilovcová S, Březinová D, Čermák J, Sajdová J, et al. The level of telomerase activity in pre-leukemic and leukemic cells—a prospective prognostic marker of hematological malignancies. *Hematol J* 2002;3(Suppl 1):197.
- [27] Krsková-Honzátková L, Čermák J, Sajdová J, Starý J, Sedláček P, Sieglová Z. Microsatellite instability in hematological malignancies. *Leukemia Lymphoma* 2001;43:1979–86.
- [28] Ohyashiki K, Iwama H, Yahata N, Tauchi T, Kawakubo K, Shimamoto T, et al. Telomere dynamics in myelodysplastic syndromes and acute leukemic transformation. *Leukemia Lymphoma* 2001;423:291–9.

- [29] Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities—balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 1996;16:155–63.
- [30] Slugboom PE, Droog S, Boomsma GI. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 1993;52:661–7.
- [31] Krsková-Honzátková L, Čermák J, Sajdová J, Starý J, Sedláček P, Siegllová Z. Loss of heterozygosity and heterogeneity of its appearance and persisting in the course of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia Res* 2001;25:45–53.
- [32] Baur JA, Zou Y, Shay JW, Wright WE. Telomere position effect in human cells. *Science* 2001;292:2075–7.

Familiární hemofagocytující lymfohistiocytóza na podkladě deficitu perforinu úspěšně léčená transplantací hematopoetických kmenových buněk – první diagnostikovaný případ v České republice

Špišek R., Mejstříková E., ¹Formáneková R., ²Žižková H., ¹Vávra V., Hrušák O., Sedivá A., ¹Sedláček P., ¹Starý J.

¹Ústav imunologie 2. LF UK, Praha

²Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FNMC, Praha

²Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

SOUHRN

Familiární hemofagocytující lymfohistiocytóza (FHL) je geneticky podmíněná heterogenní onemocnění, charakterizované porušenou cytotoxicckou funkcí T lymfocytů a NK buněk, které se typicky projevuje během prvních měsíců po narození. Není-li adekvátně léčeno, je během několika měsíců bez výjimky fatalní. FHL se v kavkazské rase vyskytuje s incidencí přibližně 1 případ na 50 000 porodů. Jedinou kauzální léčbou je transplantace hematopoetických kmenových buněk. V posledních letech byl objasněn genetický podklad několika podskupin FHL. Přibližně u 30 % pacientů je FHL způsobeno mutací v genu, který kóduje perforin. U další třetiny pacientů je podkladem FHL mutace genu *UNC13D*, který kóduje protein hMunc13-4. Zcela nedávno byl identifikován další gen *STX11*, který je lokalizován na 6. chromozomu a který kóduje bílkovinu syntaxin 11. Absence všech třech identifikovaných proteinů narušuje proces exocytózy cytotoxicckých granul. V této práci popisujeme pacientku s klinickým obrazem FHL. Soubor experimentálních metod buněčné imunologie a molekulární biologie vedl k rychlé identifikaci deficitu perforinu jako příčiny onemocnění a ověření diagnózy. Pacientka podstoupila transplantaci hematopoetických kmenových buněk od nepříbuzného HLA shodného dářce, po které došlo k úpravě klinických i laboratorních projevů onemocnění a k normalizaci cytotoxicke aktivity T lymfocytů a NK buněk. U pacientky se FHL projevila typickými příznaky klinickými i laboratorními. Při adekvátní léčbě s následnou transplantací kmenových hematopoetických buněk se podařilo dostat onemocnění pod kontrolu a v současné době je dívka bez příznaků nemoci a normálně prospívá. Jde o první případ FHL v České republice, kde byl jako příčina potvrzen deficit perforinu jak na buněčné, tak na molekulární úrovni.

Klíčová slova: familiární hemofagocytující lymfohistiocytóza, perforin, cytotoxicke testy, transplantace kostní dřeně, smíšený chimerismus.

SUMMARY

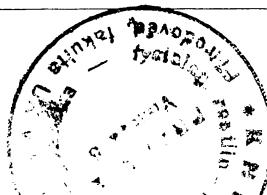
Špišek R., Mejstříková E., Formáneková R. et al.: *Familial Haemophagocytic Lymphohistiocytosis Caused by Perforin Deficit Can Be Successfully Treated by Haematopoietic Stem Cell Transplantation – The First Diagnosed Case in the Czech Republic*

Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) is an inherited disorder characterized by an impaired cytotoxicity of T lymphocytes and NK cells typically manifesting within first few months after birth. If not treated adequately, it is inevitably fatal within several months. The incidence in Caucasians has been estimated to 1: 50 000 births. Haematopoietic stem cell transplantation represents the only curative treatment for FHL. Recently, several genetic defects underlying molecular defects in FHL have been identified. In approximately 30% of patients FHL is caused by mutations in PRF1 gene coding for perforin. Further 30% of patients were found to have mutations in *UNC13D* coding for hMunc13-4 protein. Very recent report has identified another cause of FHL, mutations in *STX11* gene on chromosome 6, coding for syntaxin 11. Absence of any of those proteins severely impairs the process of exocytosis of cytotoxic granules. We describe patient with clinical symptoms of FHL. Immunological and molecular biology methods led to the identification of perforin mutation as a cause of the disease. Patient received an allogeneic SCT from HLA-matched unrelated donor. SCT was followed by rapid normalization of clinical symptoms and laboratory findings. In patient described in this study, FHL manifested with typical clinical and laboratory symptoms. Adequate immunosuppressive treatment and subsequent SCT led to the sustained remission of FHL and correction of molecular defect. This is the first case of FHL in Czech Republic where perforin mutation was identified as a molecular cause both at cellular and molecular level.

Key words: familial haemophagocytic lymphohistiocytosis, perforin, test of cytotoxicity, bone marrow transplantation, mixed chimerism.

Sp.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, pp. 50–54.



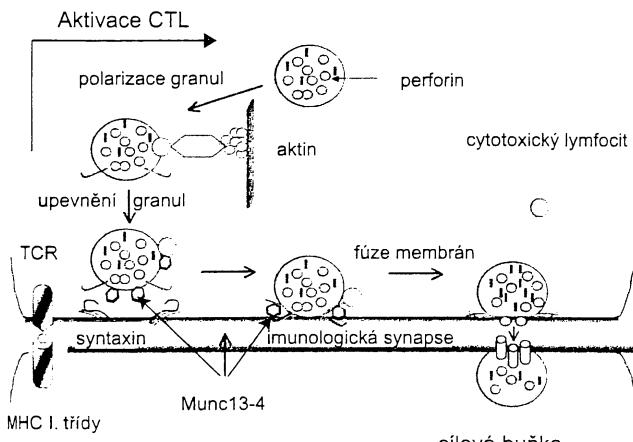
Familiární hemofagocytující lymfohistiocytóza (FHL, někdy také označovaná jako primární hemofagocytující lymfohistiocytóza (HLH)) je geneticky podmíněné heterogenní onemocnění, které se typicky projevuje během prvních měsíců po narození (1). Není-li adekvátně léčeno, je během několika měsíců bez výjimky fatální. FHL se v kavkazské rase vyskytuje s incidencí přibližně 1 případ na 50 000 porodů. Před klinickou manifestací onemocnění nejeví pacienti žádné odchylky v laboratorních vyšetřeních. Jedinou kauzální léčbou je transplantace hematopoetických kmenových buněk (SCT). Manifestace onemocnění je pravděpodobně spouštěna infekcí. Imunitní systém pacientů reaguje na infekci nepřiměřeně a není schopen vytvořit efektivní imunitní odpověď. FHL se klinicky nejčastěji projevuje horečkou, výraznou hepatosplenomegalii, koagulopatií a často i neurologickými příznaky z postižení CNS. Laboratorní vyšetření prokazuje různý stupeň cytopenie, postižení jaterního parenchymu, hypertriglyceridémii, hypofibrinogenemii a výrazně zvýšený feritin. Patogenetickým podkladem těchto změn je nekontrolovaná proliferace aktivovaných T lymfocytů a aktivace makrofágů, které fagocytují krevní elementy (hemofagocytóza). Důležitým

a sekundární formou HLH má zásadní význam pro volbu léčebné strategie, není ale zejména na počátku onemocnění často možné. Pacienty s primární HLH je nutné indikovat k transplantaci kostní dřeně časné v průběhu nemoci, což znamená neodkladně zahájit hledání vhodného dárce. U pacientů se sekundární HLH naopak není transplantace indikována. Identifikace genů zodpovědných za FHL a následná možnost genetického vyšetření je tedy velmi důležitá pro rychlou diagnostiku onemocnění u pacientů s FHL především tam, kde chybí rodinná anamnéza onemocnění. V posledních letech byl objasněn genetický podklad několika podskupin FHL. Geny, jejichž mutace vedou k rozvoji FHL, kodují proteiny, které se podílejí na správné funkci cytotoxických mechanizmů zajišťovaných systémem perforin/granzym. Přibližně u 30 % pacientů je FHL způsobeno mutací v genu, který kóduje perforin (PRF1 na 10. chromozómu) (7). Perforin a granzym jsou skladovány v intracelulárních granulech, které po rozpoznání, aktivaci a vazbě T lymfocytů nebo NK buněk na cílovou buňku polarizují do místa imunologické synapse a jejich obsah je uvolněn do mezičubuňného prostoru. Perforin poté zprostředkovává vstup serinové proteázy granzymu B do cílové buňky. Granzym B štěpí v cílové buňce prokaspázu 3 na její aktivní formu kaspazu 3 a zahajuje tak kaskádu proteolytických štěpení, kterého se účastní další enzymy ze skupiny kaspáz. Důsledkem je apoptóza buňky s poškozením intracelulárních patogenů, bránící dalšímu šíření infekce. U FHL způsobené mutací v genu kódujícím perforin tato imunologická reakce selhává a je tak vysvětlením chybějící cytotoxické funkce T lymfocytů a NK buněk in vitro a neschopnosti zvládnout infekci in vivo. V roce 2003 byla popsána skupina dětí, u kterých je podkladem FHL mutace genu UNC13D na 17. chromozómu. Tento gen kóduje protein hMunc13-4. Tato bílkovina hraje důležitou roli v procesu splynutí membrány cytotoxických granul s plazmatickou membránou CTL nebo NK buňky. I když přesný podíl mutací UNC13D na incidenci FHL není dosud znám, zdá se, že defekty tohoto genu lze nalézt ucca 1/3 pacientů s FHL (8). Zcela nedávno byl identifikován další gen, jehož mutace vede k FHL. Jde o gen STX11, který je lokalizován na 6. chromozómu a který kóduje bílkovinu syntaxin 11 (9). I když přesná funkce této bílkoviny není známa, další zástupci rodiny syntaxinů se v kooperaci s hMunc13-4 podílí na upevnění cytotoxických granul na plazmatickou membránu v místě imunologické synapse. Absence všech třech identifikovaných proteinů tedy významným způsobem naruší proces exocytózy cytotoxických granul a vysvětluje poruchu cytotoxické funkce T lymfocytů a NK buněk (obr. 1). Objasnění příčin FHL zároveň ilustruje klíčovou roli cytotoxických mechanizmů závislých na systému granzym-perforin pro homeostázu imunitní reakce. Klinický a laboratorní obraz primárních i sekundárních hemofagocytárních syndromů byl v české literatuře nedávno podrobně popsán (2). V této práci popisujeme pacientku, u které byl jako příčina FHL identifikován defekt v genu pro perforin. Pacientka podstoupila transplantaci hematopoetických kmenových buněk od nepříbuzného HLA shodného dárce, po které došlo k úpravě klinických i laboratorních projevů onemocnění.

POUŽITÉ METODY

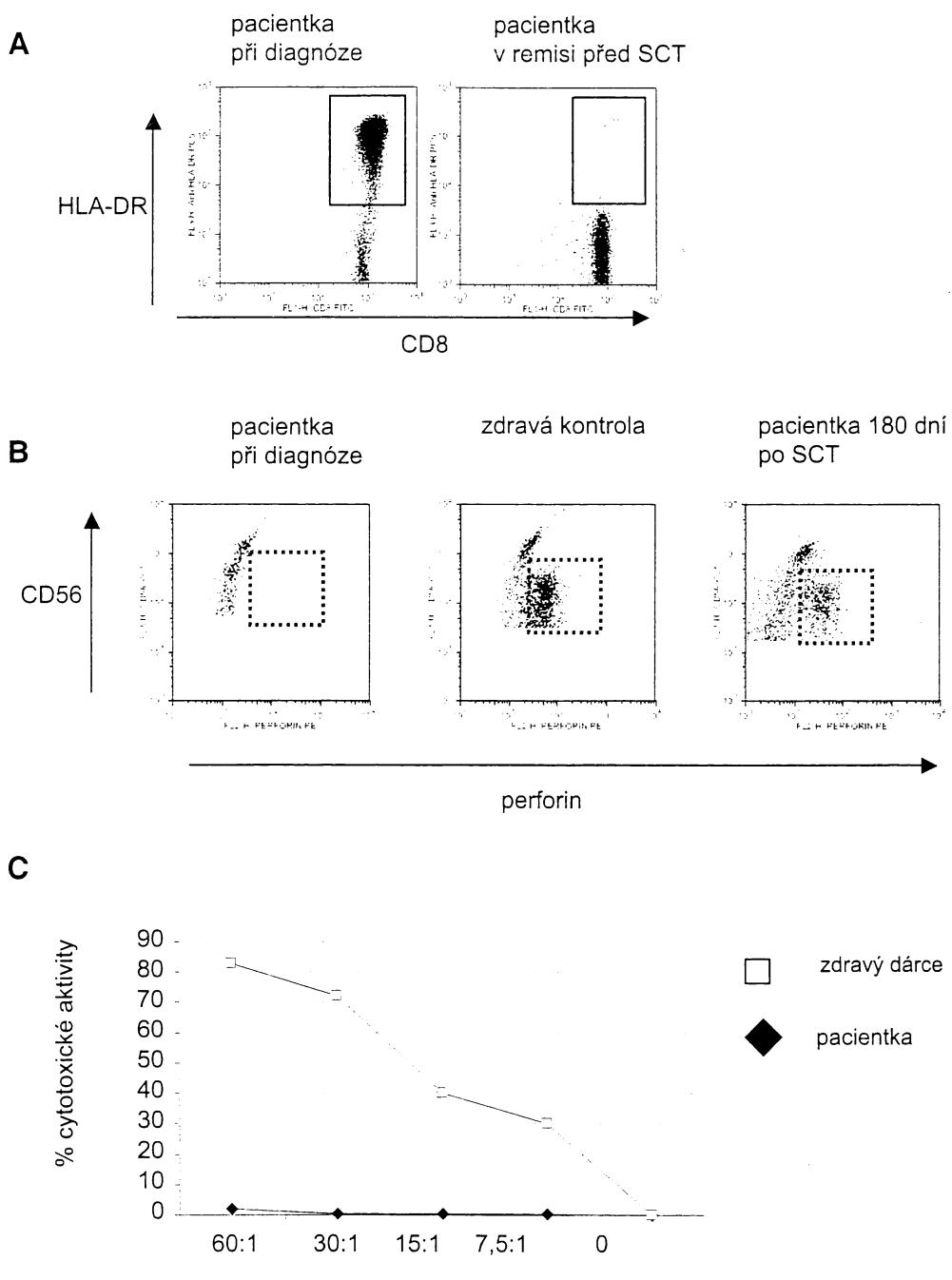
Průtoková cytometrie

100 µl periferní krve bylo označeno směsí protilátek proti povrchovým molekulám CD3 (Caltag, klon S4.1), CD8 (BD, klon SK.1) a CD56 (Immunotech, klon N901). Po inkubaci 15 minut při pokojové teplotě byly buňky fixovány, permeabilizovány a inkubovány s protilátkou proti perforinu (BD, klon delta G9). Vzorky byly měřeny na přístroji FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA) a následně analyzovány pomocí softwaru FlowJo (TreeStar, USA).



Obr. 1. Schematické znázornění dosud známých příčin FHL
(se souhlasem autorů upraveno podle (13))

znakem aktivovaných T lymfocytů je exprese HLA II. třídy. Speciálním vyšetřením lze prokázat defekt v cytotoxické aktivitě T lymfocytů a NK buněk (3, 4). Aktivované buňky infiltrují různé orgány, především kostní dřeň, jaterní parenchym, slezinu a lymfatické uzly. Infiltrace buňkami imunitního systému má za následek nekrózu tkání, orgánové selhání a smrt, pokud se onemocnění neléčí imunosupresivy. Klinický obraz i laboratorní nálezy je možné do značné míry vysvětlit jako následek vysoké a dlouhodobé produkce cytokinů aktivovanými buňkami. Aktivované T lymfocyty produkuje zejména IFN α , který aktivuje makrofágy. Aktivované makrofágy produkuje IL-1, IL-6 a TNF, které způsobují horečku, hyperlipidémii (inhibici lipoproteinové lipázy) a koagulopatií. Aktivované makrofágy a buňky prezentující antigen účinněji zpracovávají a předkládají antigeny, které pochází z infekčního agens, a tím ještě zesilují aktivaci T lymfocytů. Léčba imunosupresivy a cytostatiky založená na kombinaci glukokortikoidů, etoposidu a cyklosporinu A může vést k dočasně kontrole onemocnění. Remise jsou ale pouze dočasně a všichni pacienti postupně zrelabují a umírají, jestliže nejsou léčeni SCT (5). Klinický obraz hemofagocytárního syndromu se může rozvinout i sekundárně v asociaci se systémovou infekcí, nádorovým onemocněním nebo onemocněním autoimunitním (tzv. sekundární HLH). Neléčená primární FHL vede vždy ke smrti, sekundární HLH může spontánně odeznít, častěji příznivě zareagovat na imunosupresivní léčbu (nebo léčbu cílenou na etiologické agens, např. leishmaniozu (6)), ale může rovněž probíhat fatálně. Rozlišení mezi primá-



Obr. 2.

A. Aktivace CD8 T lymfocytů

Obrázky ukazují expresi CD8 a HLADR na CD3^{pos} buňkách (dot plot, gate CD3).
HLA DR pozitivních bylo při diagnóze 92 %, v remisi před SCT 3 % buněk).

B. Expressie perforinu v NK buňkách

Obrázky ukazují expresi perforinu a CD56 v CD56^{pos} buňkách (dot plot, gate CD56+CD3neg). 0 % u pacientky při diagnóze,
75 % u kontrolní pacientky a 44 % u pacientky den 180 po SCT).

C. Cytotoxická aktivita lymfoblastů při diagnóze onemocnění

Cytotoxické testy

Periferní mononukleární buňky byly stimulovány fytohemaglutinem (1 µg/ml) a IL-2 (20 UI/ml) po dobu 24 hodin. Následně byly aktivované lymfoblasty stimulovány po dobu 1–2 týdnů v přítomnosti 40 UI/ml IL-2. Po dostatečném namnožení byly lymfoblasty aktivovány monoklonální protilátkou proti molekule CD3 (laskavě zapůjčena prof. V. Hořejším, LMG, AV ČR) a jejich cytotoxická aktivita byla hodnocena standardním 6 hodinovým testem založeným na uvolňování radioaktivního chromu⁵¹ (Cr⁵¹). Jako cílové buňky byly použity Fas-deficitní L1210 buňky (10^4 buněk, označených Cr⁵¹). Absence molekuly Fas způsobuje, že tato linie je citlivá pouze k cytotoxicitě zprostředkováné systémem granzym/perforin. Cytotoxické buňky byly přidány v různých poměrech a procento

cytotoxické aktivity vypočteno podle vzorce: $100 \times (\text{uvolnění Cr}^{51} \text{ při inkubaci s lymfoblasty-spontánní uvolnění Cr}^{51} \text{ cílovými buňkami}) / (\text{maximální uvolnění Cr}^{51} \text{ při lýze cílových buněk detergem-spontánní uvolnění Cr}^{51} \text{ cílovými buňkami})$.

Analýza genu kódujícího perforin

DNA byla izolována z mononukleárních buněk periferní krve. Exony 2 a 3 genu PRF1 byly amplifikovány pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR) se specifickými primery v Karolinska Institutet, Švédsko, tak jak bylo dříve publikováno (10). Sekvence amplifikovaných exonů prokázala homozygotní mutaci G>C v exonu 2 na pozici 658. Mutace vede k záměně glycinu za arginin v pozici 220.

KAZUISTIKA

Dívka, věk při manifestaci základního onemocnění: 1 měsíc. Rodinná anamnéza: sestra, 4 roky, adnátní infekce, jinak zdráva.

Nynější onemocnění: porod v 38+5 týdnu, bez komplikací, porodní hmotnost 2750 g, porodní délka 47 cm, AS 9-10-10, 3 dny fototerapie pro ikterus. Z porodnice propuštěna 4. den, normální hodnoty krevního obrazu. Od třetího týdne po propuštění z porodnice nápadně bledá, 25. den života febrilie kolem 39 st., přijata na dětské oddělení, neklidná, přetrávají febrilie, při fyzikálním vyšetření zachycena hepatosplenomegalie, játra +5 cm, slezina +4 cm pod oblouk žeberní, vysloveno podezření na akutní leukémii a pacientka přeložena na Kliniku dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol. Krevní obraz: hemoglobin 97 g/l, leukocyty $44 \times 10^9/l$, neutrofily 35 %, monocity 9 %, lymfocyty 56 %, trombocyty $31 \times 10^9/l$. Biochemie při přijetí: ferritin 40640 (N 145 až 588 $\mu\text{g}/l$). Vyšetření koagulací: APTT: 72,0 (N 30,90), quick: 25%, NR: 3,58, trombinový čas: 20,80 (N 18,80), fibrinogen: 0,58 g/l (N 1,5–4 g/l), antitrombin III: 32%, D dimer: nad 1000 ng/ml, prozin C: 2%, protein S: 24%.

Byla provedena punkce kostní dřeně s nálezem zmnožených makrofágů pohlcujících ostatní krevní elementy. V periferní krvi bylo výrazné zmnožení aktivovaných CD8+ T lymfocytů (92% CD8+ T lymfo bylo HLA DR pozitivních, normální hodnota <15 %) (obr. 2A). Test cytotoxicke aktivity prokázal zcela chybějící schopnost T lymfocytů zabíjet cílové buňky (obr. 2C). V NK buňkách jsme prokázali deficit perforinu (normálně v nestimulované periferní krvi je většina NK buněk pozitivních). Klinický obraz onemocnění i laboratorní vyšetření byla v souladu s diagnózou FHL. DNA izolovaná z mononukleárních buněk periferní krve byla odebrána na zahraniční pracoviště k sekvenaci genu pro perforin, následným potvrzením mutace.

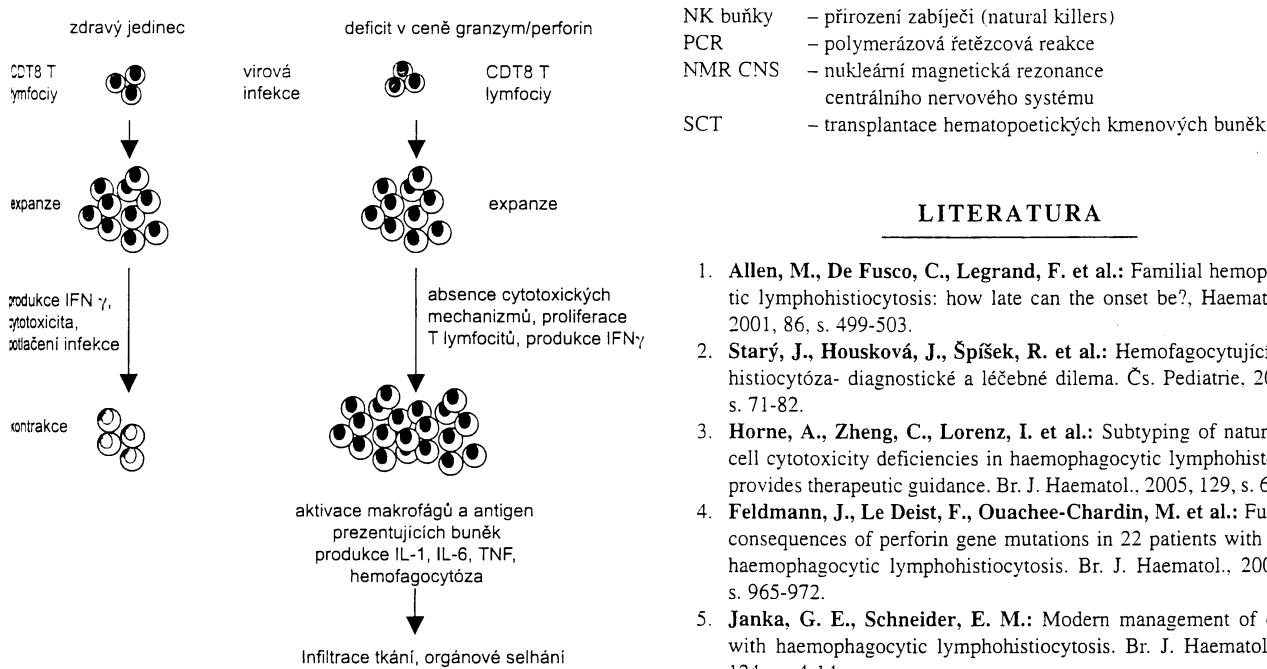
Druhý den po přijetí byla zahájena terapie podle protokolu HLH-004. Přes léčbu dochází k rychlému zvětšování břišních orgánů, regressi tachypnoe a hyposaturace, proto byla pacientka 4. den hospitalizace přeložena na ARK k umělé plnicí ventilaci. Na ARK pokračovala léčba dle protokolu, rychlá úprava klinického stavu, hepatosplenomegalie a hodnot krevního obrazu. 8. den extubována. provedena NMR CNS s normálním nálezem; 14. den hospitalizace kvůli komplikován sepsí (*Pseudomonas aeruginosa*), která byla řešena kombinovanou antibiotickou terapií. Dva měsíce po zátku onemocnění byla dívka v remisi FHL přeložena na jednotku transplantace kostní dřeně k plánované transplantaci kmenových buněk krvetvorby od HLA-shodného nepříbuzného dárce po přípravném režimu busulfan, vepesid, cyclofosfamid, anti-thymocytárglobulin. Potransplantační průběh byl bez závažnějších komplikací do ambulantního sledování propuštěna den + 85 po transplantaci. Pro narůstající podíl původní krvetvorby bylo den + 44 končeno podávání cyklosporinu A a den + 125 byla dívce podána infuze dárcovských CD3 lymfocytů. V kontrolních imunologických vyšetřeních provedených 180 dní po transplantaci bylo detektováno jen 3 % HLA-DR pozitivních CD8 T lymfocytů (normální hodnota) a potvrzena exprese perforinu v NK buňkách. V dalším sledování (nyní 8 měsíců po transplantaci) je dívka v dobrém stavu, ale bez známek reakce štěpu proti hostiteli, prospívá, přibližně ½ NK buněk a T lymfocytů má dárcovský genotyp.

DISKUZE

Exocytóza granul, která obsahuje granzym a perforin, je hlavním efektorovým mechanismem v obraně proti virovým infekcím, bakteriálním intracelulárním infekcím a v prevenci vzniku nádorů. Na obraně proti infekcím se koordinovaně podílí systémy přirozené specifické imunity. Cílem imunitní reakce je efektivní eliminace

patogenu bez poškození vlastních tkání a vznik paměťových buněk, které umožňují účinnější a rychlejší rozvoj imunitní odpovědi při dalších setkáních se specifickým antigenem. Virová infekce indukuje masivní expanzi antigen-specifických cytotoxických CD8 T lymfocytů, které produkují celou řadu cytokinů, např. IFN α a zabíjejí infikované buňky. Jednou z důležitých rolí IFN je aktivace buněk prezentujících antigen, které následně předkládají antigeny pocházející z infekčního agens s vyšší účinností a snadněji aktivují další antigen-specifické T lymfocyty (11). Po eliminaci infekčního agens následuje ukončení imunitní reakce, při které vymizí efektorové buňky a v organizmu přetrávají paměťové T a B lymfocyty. Pro efektivní imunitní odpověď je tedy důležitá rovnováha mezi patogenem a jím vyvolanou reakcí. Nedostatečná imunitní odpověď ohrožuje hostitele nekontrolovanou nebo perzistující infekci. Nadměrná, nepřiměřená imunitní reakce může svým rozsahem vést k poškození vlastních buněk a tkání hostitele. Typickým příkladem narušení fyziologického průběhu imunitní reakce je FHL, při níž probíhá nekontrolovaná a fatální expanze T lymfocytů specifických pro antigen. Podíl exogenního stimulu, zřejmě virové infekce, na spuštění FHL je velmi pravděpodobný. Perforin deficientní myši vyvinou hemofagocytární syndrom pouze po infekci virem lymfocytární choriomeningitidy (12). U člověka se za pravděpodobné „spouštěče“ FHL považují virus Epstein-Barr (EBV), herpetické viry, některé intracelulární bakterie a parazité. Jak bylo zmíněno v úvodu, podkladem klinického i laboratorního obrazu FHL je obrovská expanze T lymfocytů, především CD8 cytotoxickeých T lymfocytů, které si přes porušenou cytotoxickou aktivitu zachovávají schopnost produkovat cytokiny, především IFN α -aktivátor makrofágů a buněk prezentujících antigen. Při nenarušeném průběhu imunitní reakce dojde po eliminaci patogenu k retrakci kompartmentu efektorových T lymfocytů. Fatalní důsledky defektů v cestě perforin/granzym ukazují, že tento cytotoxický mechanismus je pro eliminaci efektorových buněk klíčový (13). Efektorové cytotoxicke T lymfocyty za normálních okolností rozpoznávají kromě virem infikovaných buněk i vlastní antigen-prezentující buňky, které mají na svém povrchu molekuly MHC I. třídy a virové抗原 a zabíjí je. Tím je zajištěna limitace množství prezentovaných antigenů a je zamezeno aktivaci a expanzi dalších T lymfocytů v okamžiku, kdy je infekce eliminována. Při kontaktu cytotoxickeých T lymfocytů s cílovou buňkou také dochází k přenosu malého množství MHC molekul s navázanými antigeny. Cytotoxický T lymfocyt se tak sám stává cílem pro okolní T lymfocyty (14, 15). Tím je především zajištěna retrakce poolu T lymfocytů (obr. 3). Identifikace molekulárního podkladu FHL tedy zcela zásadním způsobem přispěla k pochopení procesu exocytózy cytotoxicckých granul a k objasnění významu tohoto mechanizmu pro homeostázu imunitní reakce. Důležitost systémového perforin/granzym pro eliminaci patologické aktivace T lymfocytů je možno dokumentovat i na námi popisovaném případu. U naší pacientky se po provedené SCT postupně zvyšoval podíl autologní krvetvorby, pro který byla podána infuze dárcovských lymfocytů. V současné době přetrává stabilní smíšený chimerismus v T lymfocytech a NK buňkách. Přetrávání původní krvetvorby po SCT pro FHL není výjimečným jevem. Přítomnost dárcovských T lymfocytů je ovšem dostatečná k tomu, aby zabránila novému relapsu patologické reakce, kterou by zapříčinily perforin-deficitní T lymfocyty přijemce (16). Důvodem je zřejmě to, že dárcovské T lymfocyty úspěšně eliminují jak virem infikované buňky, tak aktivované T lymfocyty hostitele, a tím brání přetrávající aktivaci CD8 T lymfocytů a nadměrné produkci IFN α .

Jedinou léčebnou modalitou, vedoucí k vyléčení pacientů, je transplantace krvetvorných buněk, po níž následuje normalizace defektní cytotoxicke funkce T lymfocytů a NK buněk. V případě HLA-identického sourozence jako možného dárce existuje riziko, že dítě rovněž trpí FHL, která se dosud neprojevila, protože věk



Obr. 3. Schematické znázornění homeostázy cytotoxicických CD8 T lymfocytů

manifestace v postižených rodinách nemusí být (i když většinou je) dočasný. „Relaps“ nemoci po úspěšné transplantaci s následným nemocněním „zdravého“ dárce byl popsán. V ideálním případě je možno potvrdit vhodnost sourozence jako dárce kmenových buněk genetickým vyšetřením. Není-li genetická podstata identifikována, je možno provést vyšetření cytotoxicke aktivity lymfocytů a NK buněk. Od roku 1994 byla zahájena mezinárodní studie léčby dětí s FHL kombinací dexametazonu, etoposidu a cyklosporinu a s následnou transplantací krvetvorných buněk od příbuzných nepříbuzných dárčů provedenou časně v průběhu nemoci, jejíž výsledky byly v roce 2002 publikovány (17). Soubor 113 dětí absolvoval léčbu protokolem HLH 94 a 65 z nich podstoupilo transplantaci. Imunosupresivní léčbou bylo dosaženo remise u 53 % a 32 % pacientů zaznamenalo zlepšení nemoci, nikoliv ale remisi. 4 % dětí byly non-respondery a 11 % dětí zemřelo před provedením transplantace. Při mediánu sledování 3,1 roku je 3leté přežívání pro celý soubor pacientů 55 %. Z 65 dětí, které podstoupily transplantaci (většinou od nepříbuzného dárce), žije 62 %. Nejčastější příčinou úmrtí po transplantaci byly potransplantační komplikace, 4 děti ale zemřely na aktivní FHL, kterou se nepodařilo transplantaci dostat pod kontrolu.

U naší pacientky se FHL projevila typickými příznaky klinickými i laboratorními. Při adekvátní léčbě s následnou transplantací kmenových hematopoetických buněk se podařilo dostat onemocnění pod kontrolu a v současné době je dívka bez příznaků nemoci normálně prospívá. Jde to první případ FHL v České republice, kdy byl jako příčina potvrzen deficit perforinu jak na buněčné, tak a molekulární úrovni.

Kratky

AK	- anesteziologicko-resuscitační klinika
NS	- centrální nervová soustava
CL	- cytotoxicický lymfocyt
F ⁺	- radioaktivní chrom ⁵¹
DNA	- kyselina deoxyribonukleová
EBV	- virus Epstein-Barrové
HL	- familiární hemofagocytující lymfohistiocytóza
HLH	- primární hemofagocytující lymfohistiocytóza
MHC	- major histocompatibility complex

LITERATURA

- Allen, M., De Fusco, C., Legrand, F. et al.: Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: how late can the onset be?, Haematologica, 2001, 86, s. 499-503.
- Starý, J., Housková, J., Špíšek, R. et al.: Hemofagocytující lymfohistiocytóza- diagnostické a léčebné dilema. Čs. Pediatrie, 2004, 59, s. 71-82.
- Horne, A., Zheng, C., Lorenz, I. et al.: Subtyping of natural killer cell cytotoxicity deficiencies in haemophagocytic lymphohistiocytosis provides therapeutic guidance. Br. J. Haematol., 2005, 129, s. 658-666.
- Feldmann, J., Le Deist, F., Ouachée-Chardin, M. et al.: Functional consequences of perforin gene mutations in 22 patients with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. Br. J. Haematol., 2002, 117, s. 965-972.
- Janka, G. E., Schneider, E. M.: Modern management of children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. Br. J. Haematol., 2004, 124, s. 4-14.
- Suková, M., Starý, J., Housková, J., Nohýnková, E.: Hemofagocytující lymfohistiocytóza jako manifestace viscerální leishmaniozy. Čas. Lék. čes., 2002, 141, s. 581-584.
- Stepp, S. E., Dufourcq-Lagelouse, R., Le Deist, F. et al.: Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Science, 1999, 286, s. 1957-1959.
- Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G. et al.: Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). Cell, 2003, 115, s. 461-473.
- zur Stadt, U., Schmidt, S., Kasper, B. et al.: Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. Hum. Mol. Genet., 2005, 14, s. 827-834.
- Goransdotter Ericson, K., Fadeel, B., Nilsson-Ardnor, S. et al.: Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Am. J. Hum. Genet., 2001, 68, s. 590-597.
- Špíšek, R., Bougras, G., Ebstein, F. et al.: Transient exposure of dendritic cells to maturation stimuli is sufficient to induce complete phenotypic maturation while preserving their capacity to respond to subsequent restimulation. Cancer Immunol. Immunother., 2003, 52, s. 445-454.
- Kagi, D., Odermatt, B., Mak, T. W.: Homeostatic regulation of CD8+ T cells by perforin. Eur. J. Immunol., 1999, 29, s. 3262-3272.
- Menasche, G., Feldmann, J., Fischer, A., de Saint Basile, G.: Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis. Immunol. Rev., 2005, 203, s. 165-179.
- Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S., Griffiths, G. M.: The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. Immunity, 2001, 15, s. 751-761.
- Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G. M.: Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. Science, 2004, 305, s. 55-59.
- Almousa, H., Ouachée-Chardin, M., Picard, C. et al.: Transient familial haemophagocytic lymphohistiocytosis reactivation post-CD34 haematopoietic stem cell transplantation. Br. J. Haematol., 2005, 130, s. 404-408.
- Henter, J. I., Samuelsson-Horne, A., Arico, M. et al.: Treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis with HLH-94 immunochemotherapy and bone marrow transplantation. Blood, 2002, 100, s. 2367-2373.

Tato práce byla podpořena Výzkumnými záměry Ministerstva školství MSM 0021620812, MSM 0021620813 a 6. rámcovým projektem EU Allostem LSHB-CT-2004-503319.

Léčba dětí s myelodysplastickým syndromem transplantací krvetvorných buněk v České republice 1997–2002

Starý J.¹, Sedláček P.¹, Kobylka P.², Loudová M.², Říhová H.², Ivašková E.³, Pittrová H.⁴, Kořínská P.², Michalová K.⁵, Šrámková L.¹, Formánková R.¹, Vávra V.¹, Smišek P.¹, Keslová P.¹, Komrska V.¹, Gajdoš P.⁶

¹II. dětská klinika UK 2.LF a FN Motol, Praha, ²Ústav hematologie a krevní transfuse, Praha, ³Český registr dárců kostní dřeně, Praha, ⁴Český národní registr dárců dřeně o.p.s., Plzeň, ⁵Centrum nádorové cytogenetiky UK 1. LF a VFN, Praha, ⁶Státní zdravotní ústav, Praha

Souhrn

Myelodysplastic syndrom (MDS) je klonálním onemocněním pluripotentní kmenové buňky a alogenní transplantace krvetvorných buněk (SCT) je za současných znalostí jeho jedinou kurativní léčbou. SCT byla u dětí stejně jako u dospělých dlouhodobě zatížena vysokou mortalitou na potransplantaci komplikace a častým relapsem. Mezinárodní studie EWOG-MDS, které se Česká republika účastní, indikuje děti k alogenní SCT časně v průběhu nemoci s využitím intenzivní myeloablativní přípravy složené ze tří alkylačních agens – busulfanu, cyklofosfamidu a melfalanu. Cílem je snížit výskyt potransplantačního relapsu. V letech 1997–2002 podstoupilo alogenní SCT od HLA identického sourozence ($n = 7$) nebo nepříbuzného dárce ($n = 7$) 14 dětí s primárním MDS (JMML: 5, RC: 4, RAEB: 2, RAEBt: 2, MDSr-AML: 1). Medián věku při SCT byl 5,8 roku, medián intervalu mezi diagnózou MDS a SCT byl 5 měsíců. Předtransplantační příprava kombinací 3 alkylačních agens byla použita u 12 dětí, dva pacienti s refrakterní cytopenií byli transplantováni od nepříbuzného dárce po nemyeloablativní přípravě kombinací fludarabin a thiotepa. V prevenci GVH reakce byl použit cyclosporin A samostatně ($n = 5$) nebo v kombinaci s metotrexátem ($n = 7$) nebo steroidy ($n = 1$). K přihojení štěpu došlo u všech dětí. Klinicky významná akutní GVH reakce se vyskytla u 57 % dětí, extenzivní chronická GVH nemoc u 20 % pacientů. Čtyři děti (28,5 %) zemřely na potransplantační komplikace a jedno dítě po syngenní transplantaci (7 %) prodělalo relaps, který byl léčen nepříbuznou transplantací. Při mediánu sledování 1,9 roku žije 10 (71 %) pacientů v remisi základního onemocnění. Alogenní transplantace podle doporučení EWOG-MDS skupiny významně zlepšila prognózu dětí s MDS v České republice.

Klíčová slova: myelodysplastic syndrom, děti, transplantace krvetvorných buněk, relaps, reakce štěpu proti hostiteli

Summary

Starý J., Sedláček P., Kobylka P., Loudová M., Říhová H., Ivašková E., Pittrová H., Michalová K., Kořínská P., Šrámková L., Formánková R., Vávra V., Smišek P., Keslová P., Komrska V. Stem Cell Transplantation in Children with Myelodysplastic Syndrome in the Czech Republic 1997–2002

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a rare, clonal abnormality of the pluripotent haematopoietic stem cell. Stem cell transplantation (SCT) is the only curative treatment modality which has been for a long time connected with high transplant related mortality and relapse. The Czech Republic participates in the international study EWOG-MDS. In this study children are indicated to SCT early using a very intensive myeloablative conditioning regimen comprising 3 alkylating agents – busulfan, cyclophosphamide and melphalan. Between 1997–2002, 14 children with primary MDS (JMML: 5, RC: 4, RAEB: 2, RAEBt: 2, MDSr-AML: 1) were transplanted from HLA identical siblings ($n = 7$) or unrelated donors ($n = 7$). Median age at the SCT was 5.8 years; median time from diagnosis to SCT was 5 months. A conditioning regimen of 3 alkylating agents was used in 12 children; two patients with refractory cytopenia were transplanted from unrelated donors using a non-myeloablative conditioning regimen of fludarabin and thiotepa. As GVHD prophylaxis cyclosporin was used alone ($n = 5$) or in combination with methotrexate ($n = 7$) or steroids ($n = 1$). All patients engrafted. Acute GVHD grades II–IV developed in 57 % patients and extensive chronic GVHD in 20 % children. Four children (28.5 %) died due to transplant related causes and one patient (7 %) after syngeneic SCT developed a relapse treated by a second SCT from an unrelated donor. After a median follow-up of 1.9 years, 10 children (71 %) are alive in complete remission. Allogeneic SCT performed according to the EWOG-MDS recommendations improved significantly the prognosis of children with MDS in the Czech Republic.

Key words: myelodysplastic syndrome, children, stem cell transplantation, relapse, graft-versus-host disease

Úvod

Myelodysplastický syndrom (MDS) je klonálním onemocněním pluripotentní kmenové buňky a alogenní transplantace krvetvorných buněk (SCT) je za současných znalostí jeho jedinou kurativní léčbou. Na rozdíl od dospělých, kde MDS postihuje většinou staré lidi a SCT v jejich léčbě je reálnou alternativou pouze pro mladší pacienty, jsou děti v současné době indikovány k alogenní SCT časně v průběhu nemoci. Výjimkou jsou děti s Downovým syndromem a myeloidní malignitou, stojící na pomezí MDS a akutní myeloidní leukémie, jejichž nemoc je velmi dobře léčitelná chemoterapií (1). Tak jako u dospělých s MDS, byla SCT u dětí dlouhodobě zatížena vysokou mortalitou na potransplantacní komplikace a častým relapsem (2). Sami jsme v letech 1990–1996 provedli pouze tři transplantace pro MDS. Ve dvou případech byl dárce HLA identický sourozenecký, jedenkrát byla použita jako štěp nepříbuzná pupečníková krev. Všechny děti zemřely – jedno v relapsu a dvě na časné (krvácení do mozku) a pozdní (smrt doma na pseudomonádovou sepsi 15 měsíců po transplantaci) potransplantacní komplikace.

Do roku 1998 byli dětstí pacienti v České republice diagnostikováni a léčeni v regionálních centrech a k transplantaci referováni na základě rozhodnutí ošetřujícího lékaře. V červenci 1998 byla zahájena mezinárodní prospektivní studie diagnostiky a léčby MDS u dětí (EWOG-MDS), které se Pracovní skupina pro dětskou hematologii České republiky účastní spolu se SRN, Rakouskem, Švýcarskem, Nizozemím, Itálií a Skandinávií. První etapa studie byla ukončena 30. 6. 2002. Všichni pacienti byli při diagnóze vyšetřeni na II. dětské klinice FN Motol. Morfologická, cytogenetická a kultivační vyšetření (kultivace CFU-GM *in vitro* k potvrzení diagnózy juvenilní myelomonocytární leukémie) byla provedena v referenčních laboratořích. Po stanovení diagnózy byl doporučen postup sledování a léčby v závislosti na podtypu nemoci. Jednotlivé podtypy MDS byly klasifikovány podle FAB klasifikace (3). Název juvenilní myelomonocytární leukémie (JMML) nahradil po dosažení mezinárodního konсенzu dříve používané názvy chronická myelomonocytární leukémie nebo juvenilní chronická myeloidní leukémie (4). Název refrakterní anémie byl nahrazen termínem refrakterní cytopenie (RC), která podle názoru EWOG-MDS lépe charakterizuje odlišnosti od refrakterní anémie dospělých (5). Rozlišení mezi refrakterní anémií s excesem blastů (RAEB) a refrakterní anémií s excesem blastů v transformaci (RAEBt) bylo provedeno na základě počtu blastů v periferní krvi a kostní dřeni. Nález Auerových tyčí v blastech neznamenal automatické zařazení onemocnění jako RAEBt (6).

Jednotná předtransplantacní příprava byla zvolena kombinací tří alkylačních agens busulfanu, cyklofos-

famidu a melfalanu na základě pilotní zkušenosti italských autorů, prokazujících významné snížení rizika relapsu MDS po transplantaci při akceptovatelné toxicitě (7).

Pacienti a metody

U všech pacientů bylo po stanovení diagnózy neodkladně zahájeno hledání dárce pro transplantaci v rodině a registrech dobrovolných dárců. Děti s *refrakterní cytopenií* byly léčeny pouze transfuzemi erytrocytů a prováděno cytogenetické vyšetření kostní dřeni v 3–6měsíčních intervalech. SCT byla indikována při závislosti na transfuzích erytrocytů a krevních destiček nebo při vývoji klonální chromozomové odchylky. Děti s *refrakterní anémií s excesem blastů* měly provedeno kontrolní vyšetření 4 týdny od stanovení diagnózy. Došlo-li k vzestupu blastů v kostní dřeni nad 15 %, byla zahájena intenzivní chemoterapie dvěma bloky protokolu pro AML, po níž následovala SCT. Děti s méně než 15 % blastů v kostní dřeni byly indikovány k transplantaci bez předchozí chemoterapie. Děti s *refrakterní anémií s excesem blastů v transformaci* měly stejně jako děti s RAEB při diagnóze vyšetřeny nejčastější fúzní geny AML (AML1/ETO, CBF β /MYH11, PML/RAR α). V případě pozitivního nálezu byly zařazeny do studie léčby AML. V případě negativního nálezu bylo vyšetření kostní dřeni opakováno za 2 týdny od diagnózy. Při vzestupu blastů nad 30 % byli pacienti hodnoceni a léčeni jako AML a zařazeni do studie léčby AML. Při počtu blastů pod 30 % byli hodnoceni a zařazeni jako MDS. V případě HLA identického sourozence byla indikována SCT. Nebyl-li rodinný dárce nalezen, bylo rozhodnuto v kompetenci národního koordinátora a regionálního centra – SCT od nepříbuzného dárce nebo intenzivní chemoterapie podle protokolu pro AML. Děti s *juvenilní myelomonocytární leukémií* byly vždy indikovány k transplantaci. Intenzivní chemoterapie u nich nebyla prováděna. Před transplantací byly léčeny merkaptopurinem (6-MP) a v případě enormně zvětšené spleziny byla před SCT indikována splenektomie.

První SCT s využitím předtransplantacní přípravy kombinací busulfanu, cyklofosfamidu a melfalanu byla na II. dětské klinice FN Motol provedena v srpnu 1997. V průběhu 5 let do srpna 2002 podstoupilo alogenní SCT od HLA identického sourozence nebo HLA kompatibilního nepříbuzného dárce 14 dětí s primárním MDS. U dvanácti z nich byla SCT provedena po 1. 7. 1998 a tito pacienti byli zařazeni do EWOG-MDS studie a vyšetřeni v referenčních laboratořích. Charakteristika souboru pacientů je uvedena na tabulce 1.

Medián věku při transplantaci byl 5,8 roku (0,7–17,7 r). Medián intervalu mezi diagnózou MDS

Tab. 1. Charakteristika souboru pacientů.

Pohlaví	
Chlapci	8
Dívčata	6
Typ MDS	
RC	4
RAEB	2
RAEBt/AML	3
JMML	5
Cytogenetika	
Diploidie	6
Monosomie 7	4
Komplexní karyotyp	1
Jiné změny	3
Léčba před SCT	
AML protokol	2
6-merkaptopurin	4
VP-16 + prednison	1
Pouze transfuze	4
Splenektomie	3
Žádná	3

a SCT byl 5 měsíců (1–31 m). V rámci FAB klasifikace je uvedeno nejpokročilejší stadium nemoci v předtransplantačním období. Zastoupení cytogenetických nálezů představovalo nejčastější změny karyotypu popisované u dětského MDS. Nejčastější chromozomální změnou byla monosomie 7 u 29 % dětí. Všichni pacienti s RC měli normální chromozomální nález. Tři pacienti (21 %) měli jiné přidružené onemocnění: Maffucciho syndrom (enchondromatóza s hemangiomy): 1, kraniostenóza s rozštěpem patra: 1, neurofibromatóza 1. typu: 1. Splenektomie byla provedena u 3 dětí s JMML. Čtyři z 5 dětí s JMML byly léčeny před SCT 6-MP. Pacienti s RC dostávali pouze transfuze krevních složek. Více než 5 % blastů v kostní dřeni měly v době zahájení předtransplantační přípravy 3 děti – 2 pacienti s JMML (15 % a 21,2 % blastů) a pacient s RAEBt (15,6 % blastů). Léčbou před SCT byl u těchto pacientů 6-MP (JMML), kombinace VP-16 s prednisonem (JMML) a sledování bez léčby (RAEBt).

Druh předtransplantační myeloablativní přípravy zvolený v našem souboru pacientů je v tabulce 2. Kombinace tří alkylačních agens byla použita u 12 dětí, režim s redukovanou intenzitou předtransplantační přípravy fludarabin a thiotepa byl použit u dvou dětí s RC bez chromozomální klonální odchylky. Busulfan byl u dětí mladších 5 let podán v dávce 20 mg/kg a u dětí starších v dávce 16 mg/kg. Důvodem je vyšší clearance busulfantu u malých dětí (8). Dávka busulfantu byla individuálně upravena podle

Tab. 2. Předtransplantační příprava.

Předtransplantační příprava	Denní dávka	Celková dávka	Den podání
Příprava 1 busulfan cyklosporin A melfalan	4–5 mg/kg 60 mg/kg 140 mg/m ²	16–20 mg/kg 120 mg/kg 140 mg/m ²	-7 až -4 -3 až -2 -1
Příprava 2 thiotepa fludarabin	5 mg/kg 40 mg/m ²	15 mg/kg 160 mg/m ²	-8 až -6 -5 až -2

výpočtu plochy pod křivkou (AUC) na základě měření hladiny léku v krvi po první dávce (8).

Prevence reakce štěpu proti hostiteli (GVH) je uvedena v tabulce 3. Cyklosporin A (CsA) byl u dětí transplantovaných od HLA identického sourozence podáván v dávce 1 mg/kg/den ($n = 2$) nebo 3 mg/kg/den od dne -3 i.v., perorální dávka byla dvojnásobná. Vysazování CsA bylo zahájeno po dni +60 při nepřítomnosti GVH reakce. U jediné pacientky, která obdržela štěp periferních kmenových buněk (PBPC) byl cyklosporin kombinován s metotrexátem v dávce 10 mg/m² den +1, +3 a +6. Pacienti transplantovaní od nepříbuzných dárce obdrželi kombinaci cyklosporinu A a metotrexátu v dávce 15 mg/m² den +1 a 10 mg/m² den +3, +6 a +11 ($n = 2$) nebo pouze ve třech dávkách den +1, +3 a +6 ($n = 4$). Pacient transplantovaný nepříbuznou pupečníkovou krví obdržel kombinaci CsA a methylprednisolonu v dávce 2 mg/kg/den. Vysazování cyklosporinu bylo po nepříbuzné transplantaci zahájeno ode dne +180 při chybění chronické reakce štěpu proti hostiteli. Všechny děti léčené transplantací od nepříbuzného dárce obdržely v předtransplantační přípravě antitymocytární globulin (ATG) v prevenci rejekce štěpu i reakce štěpu proti hostiteli. U 5 dětí byl použit ATG Fresenius v dávce 40 mg/kg, u dvou dětí ATG Sangstat (Thymoglobulin) v dávce 16 mg/kg.

Dárcem byl v 6 případech HLA identický sourozelec, jedenkrát jednovaječné dvojče a 7 transplantací bylo provedeno od nepříbuzného dárce. Shoda v HLA systému mezi dárcem a příjemcem u nepříbuzných transplantací je uvedena v tabulce 4. Antigeny HLA I. třídy byly u sourozeneckých transplantací určovány sérologickými metodami, definice shody v alelách HLA II. třídy byla provedena PCR-SSP genotypizací

Tab. 3. Prevence GVH reakce.

Prevence GVH reakce	N
CsA	6
CsA + MP	1
CsA + MTX	7

Vysvětlivky: CsA = cyklosporin A, MP = methylprednisolon, MTX = metotrexát

Tab. 4. Shoda v HLA systému mezi nepříbuzným dárcem a příjemcem.

Typ shody	N
HLA-A, B, DRB1	
6/6	5
5/6	1
4/6	1
HLA-A, B, Cw, DRB1, DQB1	
10/10	2
9/10	2
8/10	1
7/10	1
4/8	1 (CBT)

na úrovni LR (low resolution). U nepříbuzných transplantací byly antigeny HLA-A, B do roku 1998 určovány sérologickými metodami, od roku 1999 byla i zde prováděna genotypizace alel jednotlivých HLA lokusů pomocí PCR-SSP (LR), v posledních letech však i na vysokém stupni rozlišení (high resolution, HR). Alely lokusů Cw, DRB1 a DQB1 byly genotypizovány pomocí PCR-SSP na úrovni HR (9).

Periferní chimerismus byl u pacientů vyšetřován 1krát týdně po dobu prvních 100 dnů po transplantaci, později 1krát za 2 týdny do dne +180, dále 1krát měsíčně do konce prvního roku a následně v pravidelných 3–6měsíčních intervalech v závislosti na diagnóze. DNA jaderných buněk periferní krve byla vyšetřována amplifikací polymorfních VNTR a sex specifických lokusů polymerázovou řetězovou reakcí (10). *Kompletní chimerismus (CC)* je stav, kdy jsou ve vzorku DNA na informativních lokusech detekovány pouze alely typické pro dárcem. *Smíšený chimerismus (MC)* je stav, kdy jsou ve vzorku DNA detekovány kromě alel dárcovských i původní alely pacienta před transplantací.

Pacienti byli po transplantaci izolováni v boxech s HEPA filtry vzduchu. V období neutropenie dostávali profylakticky antibiotika a antimykotika. Vysokodávkovaný acyklovir byl podáván 5 dní před transplantací a 30 dní po transplantaci v prevenci infekce herpes simplex a cytomegalovirem (CMV). U nepříbuzných transplantací byl do konce roku 2000 od dne +30 do dne +100 podáván profylakticky ganciklovir nebo foscarnet 5 dnů v týdnu v prevenci CMV infekce, od roku 2001 byla tato léčba zahájena pouze při nárůstu CMV virémie v krvi kvantitativně detekované metodou RQ-PCR, která byla prováděna 1krát týdně do dne +100 (11). Od roku 2001 byla rovněž kvantitativně detekována hodnota EBV virémie v krvi metodou RQ-PCR v reálném čase. Imunoglobuliny byly substituovány s cílem držet hladinu IgG > 6 g/l v prvních 6 měsících po transplantaci. G-CSF nebyl pravidelně podáván po transplantaci za účelem rychlejšího přihojení granulocytů. Rodiče nemocných dětí poskytli informovaný souhlas s trans-

plantací i s eventuálním odběrem štěpu nezletilému sourozenci.

Křivky přežití byly konstruovány podle metody Kaplan-Meiera (12). Pro stanovení přežití do selhání (EFS = event-free-survival) byly jako selhání hodnoceny smrt po transplantaci, relaps nebo sekundární malignita. Pro hodnocení pravděpodobnosti přežití (OS = overall survival) byla jako selhání hodnocena pouze smrt po transplantaci. Sledování souboru pacientů bylo ukončeno 31. 10. 2002.

Výsledky

V období 1997–2002 bylo provedeno 15 alogenních transplantací krvetvorných buněk u 14 dětí. Jeden pacient s JMML prodělal relaps po syngenní transplantaci a podstoupil nepříbuznou transplantaci od dárce shodného s pacientem v 8 z 10 vyšetřených znaků (1 neshoda v lokusu C a 1 neshoda v lokusu DRB1 ve směru hostitel proti štěpu). Medián jaderných buněk ve štěpu kostní dřeně/periferní krve byl $5,7(2,1-9,6)\times 10^8/\text{kg}$ příjemce, medián CD34+ buněk byl $5,7(2,2-13,4)\times 10^6/\text{kg}$. Dva pacienti podstoupili transplantaci pupečníkové krve (CBT). Štěpy obsahovaly $2,5\times 10^8/\text{kg}$ a $3,6\times 10^7/\text{kg}$ jaderných buněk a $1,4\times 10^6/\text{kg}$ a $2,1\times 10^5/\text{kg}$ CD34+ kmenových buněk. K přihojení štěpu došlo ve všech případech.

Klinicky významná akutní GVH reakce II.–IV. stupně se vyskytla u 8 dětí (57 %), akutní GVH reakce III.–IV. stupně postihla 5 pacientů (37 %). Významná akutní GVH reakce postihla 5 ze 7 dětí (71 %) transplantovaných od sourozence a 3 ze 7 dětí (43 %) léčených transplantací od nepříbuzného dárce. Pět dětí bylo úspěšně léčeno methylprednisolonem v dávce 2 mg/kg/den, dvě děti v dávce 5 mg/kg/den a jedno dítě dostalo pro neúspěch léčby kortikoidy ATG. Chronic-ká GVH nemoc se vyskytla u 2 z 10 dětí (20 %), které přežily 100 dnů po transplantaci. V obou případech se jednalo o extenzivní formu nemoci, která postihla děti po transplantaci od HLA identického sourozence. U jednoho pacienta nemoc vyhasla po dlouhodobé imunosupresivní léčbě kombinací CsA + prednison + thalidomid, druhý pacient pokračuje v inhalační léčbě steroidy pro bronchiolitis obliterans.

Na potransplantacní komplikace zemřely 4 děti (28,5 %), všechny časnou smrtí do dne +100 po transplantaci. Tři děti zemřely po nepříbuzné transplantaci, jedno po transplantaci od sourozence. Příčinou úmrtí byla u dvou dětí venookluzivní nemoc jater s následným multiorgánovým selháním, akutní GVH reakce IV. stupně a EBV indukovaný maligní lymfom. Z dalších závažných, život ohrožujících komplikací se v souboru vyskytly trombotická trombocytopenická purpura/hemolyticko-uremický syndrom (TTP/HUS), vyžadující léčbu plazmaferézou a vysazení cyklosporinu A u dvou dětí, akutní renální selhání s nutností

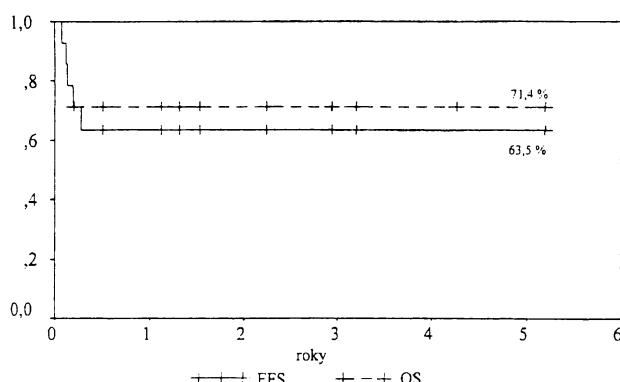
hemodialýzy, alveolární hemoragie, pneumokoková meningitis a sepse *Klebsiella pneumoniae*.

Relaps prodělal jeden pacient (7 %). Chlapec s JMML prodělal celkem 3 relapsy po dvou transplantacích a žije v kompletní remisi. První relaps následoval 100 dní po syngenní transplantaci a byl indikací k provedení nepříbuzné transplantace 8 měsíců po transplantaci první s použitím celotělového ozáření v přípravném režimu. Osmadesát dní po tomto výkonu se objevil hematologický relaps s cytogenetickou evolucí leukemického klonu do komplexního karyotypu. Vysazení imunosuprese a krátká léčba 6-MP vedly ke kompletní hematologické i cytogenetické remisi, která trvala 4 měsíce. Následoval druhý hematologický relaps se stejným komplexním karyotypem. Infuze lymfocytů (DLI) původního nepříbuzného dárce ($CD3+ 2,4 \times 10^8 / kg$) vedla k dosažení kompletní hematologické i cytogenetické remise a kompletní dárcovské krvetvorby v chimerismu. Pacient žije v remisi po DLI 30 měsíců s DLI indukovanou chronickou extenzivní GVH nemocí vyžadující imunosupresivní léčbu CsA, kortikoidy a MTX.

Medián sledování žijících pacientů po transplantaci je 1,9 roku (0,2–5,2 r). Žije 10 dětí (71 %), 9 z nich v první remisi. Po nepříbuzné transplantaci žijí 4 děti ze 7 (57 %), po transplantaci od sourozence žije 6 dětí ze 7 (86 %). Pravděpodobnost přežití do selhání (EFS) a celkového přežití (OS) je uvedena v grafu 1. Všichni žijící pacienti dosáhli kompletního dárcovského chimerismu.

Diskuse

První úspěšná transplantace u dítěte s JMML byla provedena ve Fred Hutchinson Cancer Research Center v Seattlu v 70. letech (13). Francouzská pracovní skupina EORTC definovala na základě dlouhodobé zkušenosti v polovině 90. let zásady přístupu k léčbě dětí s JMML, které další autoři potvrdili (4, 14, 15). Intenzivní chemoterapie podle AML protokolů dokáže



Graf 1. Pravděpodobnost přežití do selhání (EFS) a celkového přežití (OS) 14 dětí s myelodysplastickým syndromem léčených transplantací krvetvorných buněk

vyléčit pouze ojedinělé pacienty a nemá u JMML smysl. Z 28 pacientů léčených EORTC bez SCT 26 zemřelo s mediánem přežití 17 měsíců. Osmnáct dětí bylo léčeno SCT a 11 žilo v kompletní remisi. Intenzivní chemoterapie před transplantací neznamenala výhodu, naopak splenektomie měla pozitivní vliv na výsledek transplantace. Locatelli v retrospektivní studii EWOG-MDS shrnul výsledky transplantací u 43 dětí s JMML provedených v letech 1987–1995. Riziko relapsu bylo pro celou skupinu 58 %, smrt na potransplantační komplikace postihla 9 % po transplantaci sourozenec a 46 % dětí po nepříbuzné transplantaci. EFS dětí s předtransplantační přípravou obsahující busulfan byl lepší než u dětí připravovaných k transplantaci celotělovým ozářením (62 % vs. 11 %, $p < 0,01$). EFS celé skupiny byl 31 % (16). Podobných výsledků dosáhla americká transplantační centra v období 1990–1997. Přežití 46 dětí po nepříbuzné transplantaci bylo 42 % (přežití bez relapsu 24 %). Relaps postihl 58 % dětí a úmrtnost na potransplantační komplikace byla 26 %. Většina dětí (76 %) absolvovala přípravu obsahující celotělové ozáření. V mnohorozměrné analýze snižovala chronická reakce štěpu proti hostiteli riziko relapsu (17). Dokladem přítomnosti efektu štěpu proti leukémii (GVL) u dětí s JMML jsou práce, uvádějící kazuistiky pacientů, kteří dosáhli po potransplantačním relapsu nové remise pouhým vysazením imunosupresivní léčby nebo kombinací s infuzí lymfocytů původního dárce (18, 19). Vysoké riziko vzniku relapsu po transplantaci pro JMML v 80. a první polovině 90. let vedlo k tomu, že výsledky léčby tohoto vzácného onemocnění byly v jednotlivých centrech s malým počtem pacientů často zklamáním. Například v jednom z předních světových center na Univerzitě v Minnesotě bylo transplantováno 7 pacientů, 6 z nich prodělalo relaps a pět zemřelo (20).

Evropská skupina pro transplantaci krvetvorných buněk EBMT publikovala v roce 1998 retrospektivní studii SCT od HLA identického sourozence u pacientů s MDS. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u pacientů mladších 20 let, transplantovaných do 4 měsíců od diagnózy pro MDS s nízkým počtem blastů (refrakterní anémie, RAEB). Důvodem byla nižší potransplantační mortalita a nižší výskyt potransplantačního relapsu (21). Otázka vhodnosti intenzivní chemoterapie před transplantací u pacientů s pokročilými stadiemi MDS (RAEB, RAEBt, MDSr-AML) nebyla rozřešena. Vyšší riziko relapsu u neléčených bylo kompenzováno vyšší potransplantační toxicitou pacientů po předchozí chemoterapii, takže výsledky se nelišily (22, 23). Někteří autoři doporučují rádit děti s RAEB, RAEBt a MDSr-AML (AML s předfází MDS) do protokolů léčby AML a transplantaci provést v případě přítomnosti HLA identického sourozence po dosažení první remise, nepříbuznou transplantaci až v případě relapsu. Webb shrnul výsledky léčby 31 dětí s RAEB/RAEBt zařazených ve Velké Británii do dvou

protokolů léčby AML. Přežití dětí s RAEBt (63 %) se nelišilo od výsledků léčby dětí s primární AML. Výsledky léčby dětí s RAEB byly horší (OS 28 %), z 12 dětí s monosomií 7 žily pouze tři (24). V letech 1989–1995 američtí autoři zařadili do protokolu léčby AML 75 dětí s RAEB/RAEBt/MDSr-AML. Zatímco pro děti s RAEB byla úspěšnost v dosažení remise nízká (48 %), pro děti s pokročilejšími stadiemi MDS se nelišila od primární AML (69 % a 81 %). Přežití bylo pro skupinu RAEB 29 %, pro RAEBt 30 % a pro MDSr-AML 50 %, což nebylo významně odlišné od přežití pacientů s primární AML (45 %) (25).

Skupina EWOG-MDS se při tvorbě své prospektivní studie snažila využít všech výše uvedených zkušeností. Vysoké riziko vzniku relapsu po transplantaci u pacientů s JMML a RAEB/RAEBt mělo být sníženo velmi účinnou myeloablativní přípravou složenou z 3 alkylačních agens (7). Efekt štěpu proti leukémii měl být posílen snížením intenzity potransplantační imunosuprese – u HLA identického sourozence bylo navrženo pouze podání izolovaného cyklosporinu A v dávce 1 mg/kg/den. Tato dávka snižuje výskyt potransplantačního relapsu při zvýšeném výskytu reakce štěpu proti hostiteli (26). Děti s RAEB/RAEBt a přítomností známých fúzních genů AML byly řazeny do protokolů léčby AML. Děti s více než 15 % blastů v kostní dřeni měly doporučenu intenzivní chemoterapii za účelem redukce blastů před transplantací. Naši pacienti byli léčeni podle těchto doporučení.

Transplantace byla provedena časně v průběhu nemoci (medián 5 měsíců). Nejdélší interval 2 roky a 7 měsíců mezi diagnózou a transplantací byl způsoben nemožností nalézt dárce v registrech. Relaps prodělal pouze jeden pacient, který byl transplantován ve věku 7 roků 5 měsíců s 15 % blastů v kostní dřeni pro JMML a byl úspěšně léčen vysazením imunosupresivní léčby a infuzí dárkových lymfocytů při současném rozvoji extenzivní chronické GVH nemoci pro další dva relapsy, které následovaly po druhé nepříbuzné transplantaci. Jeho průběh je dokladem nepříznivé prognózy dětí s JMML a vyším množstvím blastů nebo starších 2 let při transplantaci i na současném režimu a současně existence GVL efektu u tohoto onemocnění (17–19, 27). Z 5 dětí s JMML žijí v našem souboru 3 pacienti. Poslední průběžná analýza EWOG-MDS studie vykazuje u 71 dětí s JMML 3leté přežití bez známek nemoci 56 %. Potransplantační mortalita je u transplantací od HLA identického sourozence ($n = 36$) 6 % a u nepříbuzné transplantace ($n = 35$) 22 %. Z 18 relapsů (36 %) se všechny s jednou výjimkou manifestovaly v prvním roce po transplantaci. Osud pacientů s provedenou splenektomii se nelišil od výsledků léčby pacientů bez splenektomie (27).

Vysoká potransplantační mortalita v našem malém souboru 7 pacientů transplantovaných od nepříbuzného dárce (43 %) není odlišná od zkušeností jiných pracovišť, používajících stejný přípravný režim. Locatelli v průběžné analýze SCT pro MDS s výjimkou

JMML vykazuje potransplantační mortalitu $36 \pm 15\%$ v souboru 54 dětí transplantovaných od nepříbuzného dárce (28). Potransplantační mortalita v jeho souboru klesá v čase s délkou trvání studie. Dvě úmrtí na venookluzivní nemoc v našem souboru jsou u dětí neobvyklou komplikací a jsou dokladem zvýšené toxicity předtransplantační přípravy skládající se z tří alkylačních agens. Rovněž vyšší výskyt dalších orgánových toxicických postižení včetně dvou případů TTP/HUS (jeden z nich ovšem vznikl po druhé transplantaci u pacienta s JMML) podporuje toto tvrzení. Na druhé straně dokladem účinnosti tohoto režimu na základní onemocnění je dosažení kompletního dárkovského chimerismu u všech pacientů. Jedno úmrtí na EB virem indukované lymfoproliferativní onemocnění zapadlo do období zvýšeného výskytu této mimořádně závažné komplikace na naší jednotce spojené s podáním jedné šarže Thymoglobulinu Sangstat s nadměrným imunosupresivním efektem (29). Současné schéma podání ATG na našem oddělení (ATG Fresenius 40 mg/kg) se z tohoto pohledu jeví být bezpečné. Vyšší výskyt akutní GVH reakce II.–IV. stupně u pacientů po transplantaci od sourozenců ve srovnání s transplantací od nepříbuzných dárce není náhodný. Zatímco prevencí GVH reakce u nepříbuzných transplantací byla kombinace CsA + MTX + ATG, u sourozenecckých transplantací jsme s jednou výjimkou podali samotný cyklosporin A. Protokolem doporučená dávka 1 mg/kg byla podána u dvou dětí. 15letá dívka vyvinula akutní GVH reakci IV. stupně a zemřela, 1,5letý chlapec prodělal těžkou akutní GVH reakci III. stupně s následným rozvojem extenzivní chronické GVH nemoci. Průběžná analýza EWOG-MDS studie odhalila, že izolovaný CsA byl podán pouze u 25 % sourozenecckých transplantací, dávka nebyla uvedena. Pravděpodobnost akutní GVH reakce byla v Locatelliovi souboru 29 %, zatímco v našem 71 % (28). Dvě z našich 7 nepříbuzných transplantací byly provedeny od dárce neshodného s pacientem ve všech 6 základních transplantačních znacích HLA systému. Zatímco pacientka s JMML a neshodou v jednom antigenu A lokusu prodělala akutní GVH reakci II. stupně, dobře odpovídající na léčbu kortikoidy, pacient s JMML transplantovaný placentární krví neshodnou v jednom antigenu lokusu B a jednom v DRB1 zemřel na venookluzivní nemoc jater při probíhající GVH reakci II. stupně. Transplantace pupečníkové krve umožňuje transplantaci přes bariéry HLA bez vyššího výskytu GVH reakce ve srovnání s HLA identickou nepříbuznou kostní dření (30). Hlavní podmínkou úspěchu je dostatečně buněčný štěp, což bylo u našeho pacienta dodrženo. Výskyt chronické GVH nemoci nebyl v našem souboru pacientů vysoký (20 %), dokládaje nižší výskyt této komplikace u dětí ve srovnání s dospělými a nelišil se od výskytu této komplikace v celém souboru pacientů EWOG-MDS studie (39 % u příbuzných a 16 % u nepříbuzných dárce).

EFS pacientů s RC je v originální studii při průběžné analýze 75 %, EFS pacientů s RAEB 49 % a pacientů s RAEBt/AML 60 % při mediánu sledování 12 měsíců (28). Riziko vzniku relapsu je pouze 15 %, přičemž u pacientů s RC se relaps dosud nevyskytl. Tato fakta spolu s vyšším rizikem potransplantačního úmrtí vedla vedení studie k návrhu změny předtransplantační přípravy pro pacienty s RC bez klonální chromozomální změny. Pilotní výsledky transplantace s použitím nemyeloablativního režimu fludarabin a thiotepa jsou nadějné. Naši dva pacienti transplantovaní tímto režimem od HLA identického nepříbuzného dárdce (shoda 10/10) dosáhli kompletního dárcovského chimerismu, neprodělali akutní ani chronickou GVH reakci a žijí v remisi.

Doporučený postup EWOG-MDS léčit pacienty s RAEB/RAEBt a více než 15 % blastů v kostní dřeni před transplantací intenzivní chemoterapií nebyl všeobecně přijat. Niemeyerová prezentovala průběžné výsledky SCT u 51 dětí s pokročilým MDS (mimo JMML). EFS celé skupiny byl 47 % a nelíšil se u dětí s méně než 5 % blastů v kostní dřeni, 5–19 % blastů a ≥ 20 % blastů před zahájením předtransplantační přípravy. Výsledky SCT s a bez předchozí intenzivní chemoterapie podle AML protokolů se nelíší (31). Náš jediný pacient s RAEBt a zvýšeným počtem blastů v kostní dřeni (15,6 %) žije po transplantaci bez předchozí chemoterapie 6 měsíců v remisi.

Závěr

Ze 14 dětí transplantovaných pro MDS na našem pracovišti v posledních 5 letech žije 71 %. Výsledky transplantace od HLA identických sourozenců a nepříbuzných dárců nejsou významně odlišné. Jde o identické výsledky s průběžně publikovanými daty mezinárodní EWOG-MDS studie, do které jsou naši pacienti zařazeni. Systematický přístup k diagnostice a léčbě dětí s MDS v rámci této studie znamenal významný nárůst počtu transplantací v posledních letech. Zatímco v letech 1990–1996 byly transplantací léčeny 3 děti, v letech 1997–2002 14 dětí! Transplantace s využitím tří alkylačních agensů vykazuje ve srovnání s předchozími postupy u MDS významně nižší výskyt potransplantačního relapsu, a tím významně lepší výsledky. Daní za účinnost této léčby je vyšší výskyt toxických komplikací a reakce štěpu proti hostiteli. Proto byl tento režim u pacientů s refrakterní cytopenií a nízkým rizikem relapsu zaměněn za méně toxický režim nemyeloablativní. V prevenci reakce štěpu proti hostiteli jsme u transplantace od HLA identických sourozenců na základě dosavadních zkušeností rozhodli u malých dětí ponechat samotný cyklosporin A, ale ve zvýšené dávce 3 mg/kg/den, u dospívajících přidáme k cyklosporinu metotrexát. U nepříbuzných transplantací nebudeme prevenci re-

akce štěpu proti hostiteli měnit. Úkolem EWOG-MDS skupiny do budoucna je změna přístupu k dětem s JMML starším 2 let při transplantaci a vysokým procentem blastů v kostní dřeni, jejichž výsledky léčby nejsou uspokojivé. Rozhodnutí o optimálním postupu u dětí s pokročilými typy MDS dosud nemohlo být uděláno. Pacienti s RAEB těží z transplantace, výsledky chemoterapie nejsou v této skupině uspokojivé. Pacienti s RAEBt a MDSr-AML mohou jistě být léčeni v protokolech léčby AML, protože jejich výsledky se neliší od výsledků léčby primární AML. Správné rozhodnutí o volbě nejúčinnějšího postupu by nemělo být uděláno bez znalosti genotypu MDS, ale i AML. Pacienti s RAEBt a monosomií 7 dosahují chemoterapií špatných výsledků a transplantace i od nepříbuzného dárdce by pro ně měla být metodou první volby (6, 25). Totéž ale platí pro malou skupinu asi 4 % dětí s primární AML a monosomií 7 (32). V případě plánované transplantace u pacientů s monosomií 7 je vždy nutné u sourozenecného dárdce provést cytogenetické vyšetření kostní dřeně k vyloučení familiárního výskytu monosomie 7 (33). Na závěr je možné konstatovat, že včasná diagnóza a transplantace podle doporučení EWOG-MDS skupiny významně zlepšila prognózu dětí s MDS v České republice.

Poděkování

Studie byla podpořena granty IGA MZ ČR NE/56764-4 a 6512. Autoři děkují MUDr. D. Procházkové z Ústí nad Labem, MUDr. Z. Černé z Plzně, MUDr. Y. Jabalimu z Českých Budějovic, MUDr. K. Touškové z Hradce Králové, MUDr. B. Blažkovi z Ostravy, prof. MUDr. V. Mihálovi, CSc. z Olomouce, doc. MUDr. H. Hrstkové, CSc. a doc. MUDr. J. Štěrbovi, PhD. z Brna za referování pacientů k transplantaci a za spolupráci při jejich sledování v potransplantačním období.

Literatura

1. Creutzig U, Ritter J, Vormoor J, et al. Myelodysplasia and acute myelogenous leukemia in Down's syndrome. A report of 40 children of the AML-BFM Study Group. Leukemia 1996; 10: 1677–86.
2. Hasle H. Myelodysplastic syndrome in childhood – classification, epidemiology, and treatment. Leukemia and Lymphoma 1994; 13: 11–26.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 1982; 51: 189–99.
4. Niemeyer CM, Arico M, Biondi A, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: A retrospective analysis of 110 cases. Blood 1997; 89: 3534–43.
5. Kardos G, Baumann I, Passmore J, et al. Refractory cytopenia in childhood: a retrospective analysis of 67 cases. Blood, v tisku.
6. Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. Leukemia, v tisku.
7. Locatelli F, Pession A, Bonetti F, et al. Busulfan, cyclophosphamide and melphalan as conditioning regimen for

- bone marrow transplantation in children with myelodysplastic syndromes. Leukemia 1994; 8: 844–9.
8. Hassan M, Ljungman P, Bolme P, et al. Busulfan bioavailability. Blood 1994; 84: 2144–50.
 9. Loudová M, Šrámková I, Cukrová V, et al. Frequencies of HLA-DRB1, -DQB1 and -DPB1 alleles in Czech population. Folia Biol. 1999; 45: 27–30.
 10. Formánková R, Honzátková L, Sieglová Z, et al. Detailed monitoring of hematopoietic chimerism in a child treated by adoptive immunotherapy for high risk of relapse after BMT for acute myeloid leukemia. Bone Marrow Transplant 2000; 25: 453–6.
 11. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, et al. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. Lancet 2000; 355: 2032–36.
 12. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Assoc 1958; 53: 457–81.
 13. Sanders JE, Buckner CD, Thomas ED, et al. Successful treatment of juvenile chronic granulocytic leukemia with marrow transplantation. Pediatrics 1979; 63: 44–6.
 14. Lutz P, Zix-Kieffer I, Souillet G, et al. Juvenile myelomonocytic leukemia: analyses of treatment results in the EORTC Children's Leukemia Cooperative Group. Bone Marrow Transplant 1996; 18: 1111–16.
 15. Hasle H, Kerndrup G, Yssing M, et al. Intensive chemotherapy in childhood myelodysplastic syndrome. A comparison with results in acute myeloid leukemia. Leukemia 1996; 10: 1269–73.
 16. Locatelli F, Niemeyer C, Angelucci E, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a report from the European Working Group on Myelodysplastic Syndrome in Childhood. J Clin Oncol 1997; 15: 566–73.
 17. Smith FO, King R, Nelson G, et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for children with juvenile myelomonocytic leukaemia. Br J Haematol 2002; 116: 716–24.
 18. Orchard PJ, Miller JS, McGlennen R, et al. Graft-versus-Leukemia is sufficient to induce remission in juvenile myelomonocytic leukemia. Bone Marrow Transplant 1998; 22: 201–3.
 19. Rassam SMB, Katz F, Chessells JM, et al. Successful allogeneic bone marrow transplantation in juvenile CML: conditioning or graft-versus-leukaemia effect? Bone Marrow Transplant 1993; 11: 247–50.
 20. MacMillan ML, Davies SM, Orchard PJ, et al. Haemopoietic cell transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukaemia. Br J Haematol 1998; 103: 552–8.
 21. Runde V, de Witte T, Arnold R, et al. Bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as first-line treatment in patients with myelodysplastic syndromes: early transplantation is associated with improved outcome. Bone Marrow Transplant 1998; 21: 255–61.
 22. Creutzig U, Bender-Gotze C, Ritter J. The role of intensive AML-specific therapy in treatment of children with RAEB and RAEBt. Leukemia 1998; 12: 652–9.
 23. Sutton L, Chastang C, Ribaud P, et al. Factors influencing outcome in de novo myelodysplastic syndromes treated by allogeneic bone marrow transplantation: a long-term study of 71 patients. Blood 1996; 88: 356–65.
 24. Webb DKH, Passmore SJ, Hann IM, et al. Results of treatment of children with refractory anaemia with excess blasts (RAEB) and RAEB in transformation (RAEBt) in Great Britain 1990–99. Br J Haematol 2002; 117: 33–9.
 25. Woods WG, Barnard DR, Alonso TA, et al. Prospective study of 90 children requiring treatment for juvenile myelomonocytic leukemia or myelodysplastic syndrome: a report from the Children's Cancer Group. J Clin Oncol 2002; 20: 434–40.
 26. Locatelli F, Zecca M, Rondelli R, et al. Graft versus host disease prophylaxis with low-dose cyclosporine-A reduces the risk of relapse in children with acute leukemia given HLA-identical sibling bone marrow transplantation: results of a randomized trial. Blood 2000; 95: 1572–79.
 27. Locatelli F, Noelke P, Zecca M, et al. Allogeneic stem cell transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukemia: results of prospective study of the EWOG-MDS/EBMT groups. Blood 2001; 98: 848a.
 28. Locatelli F, Zecca M, Zintl F, et al. Busulfan, cyclophosphamide and melphalan as preparative regimen to allogeneic stem cell transplantation in childhood MDS: results of the second interim analysis of the EBMT/EWOG-MDS study. Bone Marrow Transplant 2001; 27 (Suppl 1): S69.
 29. Sedláček P, Starý J, Roubalová K, et al. Outbreak of EBV-LPD in children receiving rabbit anti-thymocyte globulin. Bone Marrow Transplant 2001; 27 (Suppl 1): S207.
 30. Barker JN, Davies SM, DeFor T, et al. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. Blood 2001; 97: 2957–61.
 31. Niemeyer CM, Duffner U, Bender-Gotze C, et al. AML-type intensive chemotherapy prior to stem cell transplantation does not improve survival in children and adolescents with primary myelodysplastic syndromes. Blood 2000; 96: 521a.
 32. Hasle H, Arico M, Basso G, et al. Myelodysplastic syndrome, juvenile myelomonocytic leukemia, and acute myeloid leukemia associated with complete or partial monosomy 7. Leukemia 1999; 13: 376–85.
 33. Shannon KM, Turhan AG, Chang SSY, et al. Familial bone marrow monosomy 7. J Clin Invest 1989; 84: 984–9.

Došlo do redakce: 22. 11. 2002

Přijato: 15. 1. 2003

Doc. MUDr. J. Starý, DrSc.
Sázavská 11
120 00 Praha 2

- Program. *N Engl J Med* 1998;339:1177-85.
2. Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, Martin PJ, Mickelson EM, Smith AG, et al. The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 1995;86:1606-13.
 3. Speiser DE, Tiercy JM, Rufer N, Grundschober C, Gratwohl A, Chapuis B, et al. High resolution HLA matching associated with decreased mortality after unrelated bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:4455-62.
 4. Kanda Y, Mineishi S, Saito T, Saito A, Ohnishi M, Niija H, et al. Response-oriented preemptive therapy against cytomegalovirus disease with low-dose ganciclovir: a prospective evaluation. *Transplantation* 2002;73:568-72.
 5. Gajewski JL, Khouri I, Champlin RE, Saliba RM, McMannis JD, Donato ML, et al. Anti-thymocyte globulin (ATG) reduces primary graft failure (GF) risk and may reduce acute graft versus host disease (aGVHD) in 212 non-myeloablative blood and marrow transplant (BMT) patients (pts) receiving unrelated or 1 antigen (Ag) mismatched (MM) related donor grafts. Proceedings of ASCO 2002;21: 420a[abstract 1676].
 6. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Civitelli G, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998;91:756-63.
 7. Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, Chakraverty RK, Chakrabarti S, Robinson S, et al. In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood* 2000;96: 2419-25.
 8. Schetelig J, Kroger N, Heid TK, Thiede C, Krusch A, Zabelina T, et al. Allogeneic transplantation after reduced conditioning in high-risk patients is complicated by a high incidence of acute and chronic graft-versus-host disease. *Haematologica* 2002;87:299-305.

Chimerism-directed adoptive immunotherapy in the prevention and treatment of post-transplant relapse of leukemia in childhood

We present the role of frequent monitoring of hematopoietic chimerism in the prediction of post-transplant relapse and our initial experience with adoptive immunotherapy in the prevention and treatment of hematologic relapse in children after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Haematologica 2003;88:117-118
(http://www.haematologica.org/2003_01/88117.htm)

Relapse of leukemia remains the major cause of treatment failure in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children. In a prospective study we used frequent monitoring of hematopoietic chimerism (HC)^{1,2} to identify patients with a high risk of post-transplant relapse and thus indicated for adoptive immunotherapy (AI).³⁻⁶ Between January 1997 and June 2001 we performed a total of 54 unmanipulated allogeneic HSCT from HLA-identical siblings (28) or matched unrelated donors (26) in 50 consecutive children with hematologic malignancies in the University Hospital Motol, Prague. Fifty-two evaluable follow-ups from forty-eight patients at a median age of 10 years (2-18 years) with acute lymphoblastic leukemia (ALL; 18/17), acute myelogenous leukemia (AML; 17/14), chronic myelogenous leukemia (CML; 8), myelodysplastic syndrome (MDS; 6) and juvenile myelomonocytic leukemia (JMML; 3) were included in this prospective chimerism study. Written informed consent was obtained from the parents. We analyzed HC in peripheral blood samples using polymerase chain reaction of variable number of tandem repeats (ApoBII,

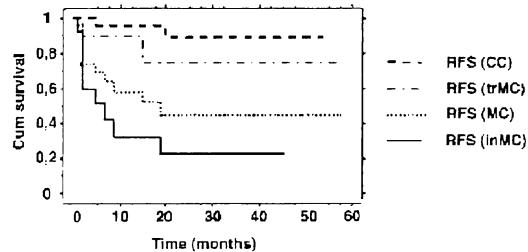


Figure 1. Kaplan-Meier estimates of relapse-free survival for the CC and the MC groups. Forty-four patients were evaluable for RFS. RFS for the CC group was 20/22, whilst that for the MC group was 11/22. RFS for the MC group was 7/9 as compared to 4/13 for that in the inMC group.

Col2A1, YNZ22, D1S80, HVR-Ig, TPO) with a maximum sensitivity of 0.5%.⁷ Peripheral blood samples were taken weekly from day +8 until day +100, then once a month during the first year following HSCT and thereafter according to clinical and laboratory outcome.¹ Complete donor chimerism (CC), characterized by the disappearance of recipient cells until day +28 and sustained emergence of donor cells was documented in 29/52 follow-ups. Mixed chimerism (MC), characterized by the re-emergence or persistence of recipient cells after day +28, was found in 23/52 follow-ups. Transient MC (trMC) was seen in 9 follow-ups and increasing MC (inMC) in 14 follow-ups. Considering the transplant-related mortality until day +100, 44 follow-ups were evaluable for relapse-free survival (RFS). At a median follow-up of 16.5 months RFS for the CC group was 20/22, while that for the MC group was 11/22. RFS for the trMC group was 7/9 as compared to 4/13 for the inMC group (Figure 1). Two patients with CC (1 ALL, 1 AML) relapsed after transplantation without prior detection of MC; in both extramedullary relapse occurred.

AI was used in the prevention and treatment of post-transplant relapse in 13 patients/14 follow-ups (ALL 4, AML 5, CML 3, JMML 1/2). Treatment was started on the basis of inMC (9), in molecular relapse⁸ (1) or in hematologic relapse (3/4). Withdrawal of post-transplant immunosuppression (IS) was performed in 11 patients, 5 patients with no or only transient response to withdrawal of IS received second-line therapy by donor lymphocyte infusion (DLI). In 3 follow-ups without IS, DLI was applied as a front-line therapy.⁴ Doses of CD3+ cells varied between 1×10^5 and 2.4×10^8 /kg body weight according to type of donor and indication for DLI. Complete response to AI, defined as sustained recurrence of CC and continuous complete remission (CCR), was documented in 6/14 follow-ups (second post-transplant relapse in a patient with JMML, 3/3 patients with CML, and in only 2/9 patients with acute leukemia) at a median follow-up of 28 months (range 6 to 46 months). One patient with ALL achieved CC but died soon after of severe graft-versus-host disease (GVHD). Only temporary responses (transient decrease or disappearance of MC) were seen in 3 follow-ups (2 AML, 1 JMML) with subsequent hematologic relapse 8, 9 and 20 months after the initiation of AI. No response to AI was seen in 4 follow-ups (2 ALL, 2 AML). Overall survival of the patients treated with AI was 8/13 (ALL 1/4, AML 3/5, CML 3/3, JMML 1/1). Out of 3 patients/4 follow-ups treated in hematologic relapse only 1 (JMML) is alive in CCR. Pre-emptive AI was performed in 10 patients. Initial response was documented in

8/10 children with recurrence of CC in 6 of them. In 2 children, a significant long-term decrease of MC was documented and AI probably postponed hematologic relapse. This allowed us to perform a second transplantation in both patients.⁹ Secondary GVHD grade I-III was seen in 5/14 follow-ups and was fatal in one patient.

We confirmed that patients with increasing MC have a significantly higher risk of hematologic relapse.¹ Continuous CC together with trMC usually proved to be a good prognostic factor, but in our experience had limited value in predicting extramedullary relapse. Detection of HC is a simple, reliable and rapid method and when performed frequently, allows us to identify patients indicated for AI. A graft-versus-leukemia effect of AI in our small cohort was evident in patients with CML and JMML, was less effective in patients with AML, and was questionable in patients with ALL. We speculate that in patients with acute leukemia AI methods are more effective when initiated early before full leukemia recurrence.

*Renata Formáková, Petr Sedlacek, Lenka Krsková,
Hana Rihová, Lucie Srámková, Jan Stary
for the Czech Pediatric Hematology Working Group*

Correspondence: Renata Formáková, MD, 2nd Department of Pediatrics, University Hospital Motol, V Úvalu 84, CZ-150 06, Prague 5, Czech Republic. Phone & Fax: international +420 24432220. E-mail: renata.formankova@lfmotol.cuni.cz

Key words: leukemia, post-transplant relapse, hematopoietic chimerism, adoptive immunotherapy.

Funding: This work was partially supported by grants from the Ministry of Health of the Czech Republic, IGA 6512-3 and IGA 5676-4.

Manuscript processing

This manuscript was peer-reviewed by two external referees and by Dr. Jordi Sierra, who acted as an Associate Editor. The final decision to accept this paper for publication was taken jointly by Dr. Sierra and the Editors. Manuscript received July 4, 2002; accepted November 7, 2002.

References

- Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, et al. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 1998;21:487-95.
- Socie G, Lawler M, Gluckman E, McCann SR, Brison O. Studies on hemopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation in the molecular biology era. *Leuk Res* 1995;19:497-504.
- Helg C, Starobinski M, Jeannet M, Chapuis B. Donor lymphocyte infusion for the treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 1998;29:301-13.
- Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, et al. 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;13:2079-86.
- Singhal S, Powles R, Kulkarni S, Treleaven J, Saso R, Mehta J. Long-term follow-up of relapsed acute leukemia treated with immunotherapy after allogeneic transplantation: the inseparability of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia, and the problem of extramedullary relapse. *Leuk Lymphoma* 1999;32:505-12.
- Elmaagachi AH, Beelen DW, Trenn G, Schmidt O, Nahler M, Schaefer UW. Induction of a graft-versus-leukemia reaction by cyclosporin A withdrawal as immunotherapy for leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:771-7.
- Formáková R, Honzatkova L, Moravcová J, Sieglova Z, Dvorakova R, Nadvornikova S, et al. Prediction and reversion of post-transplant relapse in patients with chronic myeloid leukemia using mixed chimerism and residual disease detection and adoptive immunotherapy. *Leuk Res* 2000;24:339-47.
- Moravcová J, Lukásová M, Stary J, Haskovec C. Simple competitive two-step RT-PCR assay to monitor minimal residual disease in CML patients after bone marrow transplantation. *Leukemia* 1998;12:1303-12.
- Formáková R, Honzatkova L, Sieglova Z, Stary J, Sedlacek P, Brdicka R. Detailed monitoring of hematopoietic chimerism in a child treated by adoptive immunotherapy for high risk of relapse after BMT for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:453-6.

Inversion of intron 1 of the factor VIII gene for direct molecular diagnosis of hemophilia A

An intron 1 inversion of the factor VIII gene has been recently described as a consequence of an intrachromosomal recombination involving a 1041bp specific duplon inside and outside the gene. We investigated the intron 1 inversion in a cohort of 201 Spanish hemophilia A (HA) families. The inversion was detected in 4 families with severely affected cases of HA and no inhibitor history. The frequency of the inversion among cases of severe HA cases was 5% (4/79), confirming that this inversion is a recurrent mutational event.

Haematologica 2003;88:118-120
(http://www.haematologica.org/2003_01/88118.htm)

The most frequent mutation in severe hemophilia A patients is an inversion of intron 22 of the factor VIII gene, described 8 years after the cloning of the gene.^{1,2} In 1996 an inversion breaking intron 1 was detected in two hemophilic monozygotic twins.³ This was originally regarded as a rare event, but 6 years later, the same group in the United Kingdom reported that this inversion was a recurrent event in patients with hemophilia A (HA).⁴ A 1041-base pair sequence (int1h-1) of the intron 1 was found to be duplicated (int1h-2) and oriented in the opposite direction 140 kb outside the gene between the C6.1A and VBP1 genes. This inversion arises from a recombination event between the two homologous sequences int1h-1 and int1h-2 (Figure 1).

One hundred and eighty-five unrelated HA patients and 16 mothers of deceased hemophiliacs, in whom inversion of intron 22 had been excluded, were investigated for the presence of inversion of intron 1. Out of 201 cases, 79 had severe disease, 53 had moderate disease and the remaining 69 had a mild phenotype. For inversion analysis, two polymerase chain reactions (PCR) were performed as previously described⁴ with slight modifications. In the first reaction, primers specific for int1h-1 (9F, 9cR) plus the primer int1h-2F were used in an amplification reaction that yielded a 1908 bp product from normal DNA and a 1323 bp product if the inversion was present (Figures 1 and 2). In the second reaction, primers specific for int1h-2 (int1h-2F, int1h-2R) plus the primer 9F yielded a 1191 bp product from normal DNA and a 1776 bp product in the presence of an inversion, assuming that the interchange is reciprocal. The pattern of the carriers had both bands (Figure 2). For haplotype analysis, four intragenic (Intron 13 CA repeat, BclI intron 18 and Intron 22 CA repeat by PCR and KpnI/XbaI intron 22 by Southern blot) and two extragenic (DXS52 by PCR and DX13 by Southern blot) markers were used as previously described.^{5,6}

The test was positive in 3 out of 185 HA patients and in one out of the 16 HA mothers. The overall frequency of intron 1 inversion in all hemophiliacs without intron 22 inversion was 4/201 (2%). The calculated frequency was 5% (4/79) when considering only severe cases. Three were familial cases and in

LONG-TERM FOLLOW-UP OF CHIMERICAL STATE OF THE PATIENTS TRANSPLANTED FOR DIFFERENT HAEMATOLOGIC DISEASES

R. Dvořáková¹, H. Říhová¹, S. Žilovcová¹, L. Krsková²,
R. Formánková³, Z. Siegllová¹, R. Brdička^{1,4}

¹Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague; ²Institute of Pathology and ³Ind Department of Paediatrics of 2nd Medical Faculty of Charles University, ⁴EuroMISE – Cardio Centre

ABSTRACT: Long-term follow-up of peripheral cellular chimerism in patients treated with BMT or PBSCT revealed the usefulness of their continuous monitoring at molecular level. Our results are based on monitoring of 120 patients, who were followed for at least 24 months. Comparison of the patients treated for chronic myelogenous leukemia (CML), acute myelocytic leukemia (AML), acute lymphocytic leukemia (ALL), myelodysplastic syndromes (MDS) and aplastic anaemia (AA) revealed that mixed chimerism was practically absent in MDS and relatively long-lasting in ALL and AA (regardless to substantially different post-transplantation treatment). The first disease relapses signalized by molecular checking of mixed peripheral chimerism were observed also after a period of remission lasting for several years. Molecular watching enables us to detect relapses at their very beginning that would remain hidden to less sensitive methods. We believe that all of the transplanted patients ought to be monitored for residual disease i.e. cellular chimerism using molecular methods without time limits. On the other hand low level of mixed cellular chimerism is not necessarily a sign of disease progression and can remain unchanged as "status quo" for a very long period.

Key words: Onco-haematological diseases – Bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation – Cellular chimerism – Residual disease monitoring

Dlouhodobé sledování buněčného chimérismu hematologických pacientů po transplantaci kostní dřeně.
Dvořáková R., Říhová H., Žilovcová S., Krsková L., Formánková R., Siegllová Z., Brdička R.

Sborn. lék., Vol. 104 (2003) No. 2, p. 209–215

Klíčová slova: Buněčný chimérismus – Transplantace kostní dřeně – Chronická myeloidní leukemie – Akutní myeloidní leukemie – Akutní lymfocytární leukemie – Aplastická anémie – Myelodysplastické syndromy

The research was partially supported by the project LN00B107 of the Ministry of Education and CEZ MZ 00237360001 and IGA NC6512-3 of the Ministry of Health of the Czech Republic.

Mailing address/Adresa autora: Prof. MUDr. R. Brdička, DrSc., Institute of Haematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2 (Czech Republic) Fax: +420 2 21977196
e-mail: r brdicka@uhkt.cz

© Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha 2003

INTRODUCTION

Significant improvement of healthy life expectations appeared within the last two decades due to the introduction of molecular methods into laboratory diagnostics and new ways of treatment of many onco-haematological diseases. If we stress bone marrow transplantation in the first place, on interferon and STI the most modern treatment aid, molecular diagnostic methods, which have become very sensitive and capable to distinguish one pathologic cell from 100,000 normal cells, are not less important. Our nearly 10 year long observation on transplanted patients allowed us to obtain several results which were not so clearly evident at the beginning of our study.

MATERIAL AND METHODS

Of all the patients treated with bone marrow or peripheral stem cells transplantation and checked in our laboratory (265) within the period of 1990–2000 only those who survived more than 24 months were included into this study. Our results are based on a sample of 120 patients followed for more than two up to ten years.

According to diagnoses our set of patients (120) consisted mostly of chronic myeloid leukemia (CML) 44, acute myeloid leukemia (AML) 21, acute lymphocytic leukemia (ALL) 16 – including three adults, myelodysplastic syndromes (MDS) 16, aplastic anaemia (AA) 11 and 12 patients suffering from other diseases, which had no significance for our study because of a very limited number of individual diagnoses.

Distribution of age at the time of transplantation was in our sample characterized by the range of youngest (8 months) and the oldest patient (55 years) and by the average age 23.95 years (32.93 for CML patients). According to sex the sample consisted of 48 females and 72 males. Twenty-eight of male recipients were grafted from female donors.

Practically all of the patients underwent the traditional induction (chemotherapy and X-rays whole-body irradiation) and were treated with BMT and/or PBSCT. PBSCT as a only source of blood stem cells (9/120) has become more frequent since 2000 only.

Majority of stem cells donors were HLA identical $106/120 = 88.3\%$ ($205/265 = 77.3\%$) and only $14/120 = 11.7\%$ ($60/265 = 22.6\%$) were transplanted across the HLA barrier.

Cellular chimerism was monitored at molecular level using DNA polymorphisms of VNTR and STR types by testing following loci [1]:

- VNTR: ApoB, Col2A1, MCT118, HVR-Ig, YNZ22, TPO, PAH;
- sex-specific: AMG, DYZ1, DXZ1/DYZ3 and
- STR: THO1, TPOX, CSF1PO.

Performing allelotyping of a set of mentioned loci in pairs recipient-donor, 100 % of informativity was reached. Nevertheless the sensitivity varied substantially within the range of 10^{-1} – 10^{-6} , the lowest one concerned VNTR loci TPO 1–10 %, ApoB, Col2A, HVR-Ig 1–5 %, YNZ22 0.8–1 %, MCT118, PAH 0.5–1 %, at least one grade higher sensitivity is obtained by nested PCR (MCT118, ApoB) and the highest one by typing sex-specific alleles (10^{-5} – 10^{-6}). The situation is specific for each pair of donor and recipient and depends on genotypes involved. In the cases of mixed chimerism (MC), quantification of a portion of allogeneic and autologous haematopoiesis was performed by assessment of density of donors' and recipients' specific alleles (software UVP GelBase).

Statistical evaluation of the frequency of mixed chimerism (MC) in different diagnostic groups has been done using a simple Fischer's exact test.

RESULTS

Three types of peripheral cellular chimerism, which is often called mixed chimerism (MC), have been distinguished:

a – the “early” (EMC) one, which was characterized by the presence of recipient cells for prolonged period in peripheral blood, was arbitrarily settled to more than 30 days;

b – the “late” (LMC) one when the peripheral cellular chimerism appeared after a period during which no recipients blood cells have been detected;

c – “continuous” or “permanent” (CMC) with the presence of recipient blood cells since the time of transplantation till the end of observation period.

1. Of all patients followed for more than 24 months (120) 40 exhibited MC detected by checking autosomal polymorphisms. Only EMC exhibited 10 patients. On the other hand two patients were chimerical throughout the whole observation period (CMC). LMC could be observed in one patient for the first time after a period of 90 months of complete chimerism (CC) as documented in Fig. 1 (patient No. 5). The very long duration of MC was observed in the patients with ALL and AA (Fig. 3 and 5) and no LMC and only short-term EMC was observed in the patients with MDS (Fig. 4).

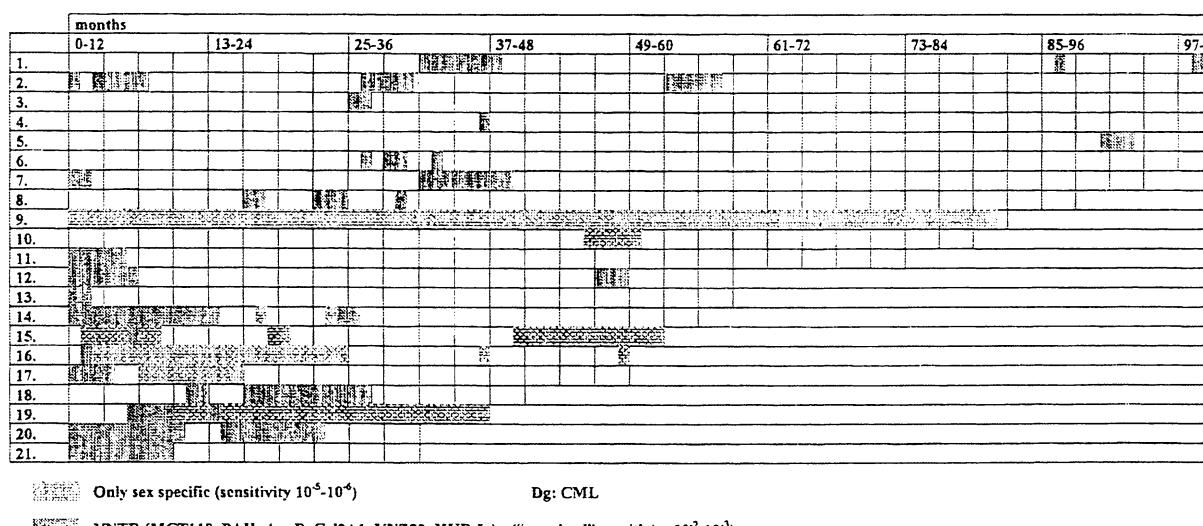
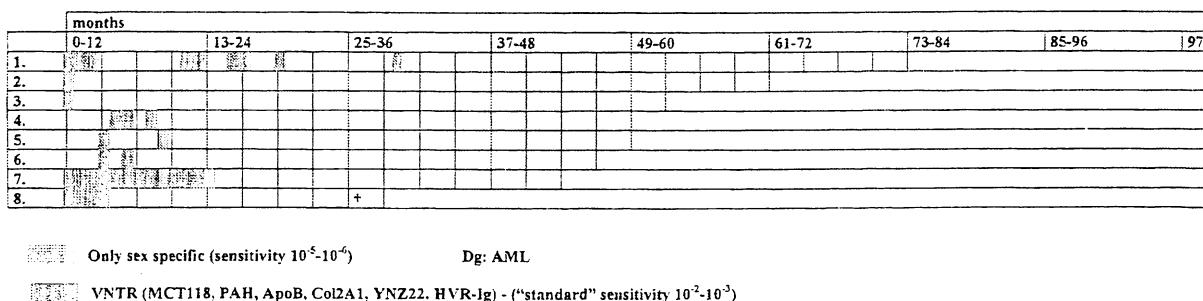


Fig. 1–5 – Positive detection of MC expressed at two levels of sensitivity and time intervals of one month. Only chimerical patients are presented. The sex-specific detection system with the highest sensitivity was used only in case of male recipient and female donor. † – discontinuation of monitoring because of the death of the patient.



	months	0-12	13-24	25-36	37-48	49-60	61-72	73-84	85-96	97-
1.										
2.										
3.										
4.										
5.										
6.										
7.										
8.						t				

Only sex specific (sensitivity 10^{-5} - 10^{-6}) Dg: ALL

VNTR (MCT118, PAH, ApoB, Col2A1, YNZ22, HVR-Ig) - ("standard" sensitivity 10^{-2} - 10^{-3})

(No adult patient exhibited MC!)

	months	0-12	13-24	25-36	37-48	49-60	61-72	73-84	85-96	97-
1.										
2.										

Only sex specific (sensitivity 10^{-5} - 10^{-6}) Dg: MDS

VNTR (MCT118, PAH, ApoB, Col2A1, YNZ22, HVR-Ig) - ("standard" sensitivity 10^{-2} - 10^{-3})

	months	0-12	13-24	25-36	37-48	49-60	61-72	73-84	85-96	97-
1.										
2.										
3.										
4.										
5.										

Only sex specific (sensitivity 10^{-5} - 10^{-6}) Dg: AA

VNTR (MCT118, PAH, ApoB, Col2A1, YNZ22, HVR-Ig) - ("standard" sensitivity 10^{-2} - 10^{-3})

- Sorting of MC according to diagnoses revealed not significant excess of MC in patients suffering from CML and ALL and a little lower frequency of MC expressed patients treated for AML (Fig. 2) and AA (Fig. 5). For the statistical evaluation two cases of EMC (MDS) were neglected (Tab. 1).
- In CML patients in which BCR/ABL as a specific marker was monitored in parallel to cellular chimerism, both methods gave similar results with a certain advantage of specific marker but a relative discrepancy occurred three times. In all these cases in contrast to mixed chimerism no BCR/ABL transcript could have been detected in peripheral blood.

Table 1a, b – MC distribution observed among patients with different diagnoses. Fischer's exact test. No MC detected with sex-specific marker only has been included in the table.

a – includes MDS – two cases of EMC and one of AA near to the arbitrarily established limits of 30 days were not considered. No significant differences were observed with the exception marked *. b – omits MDS. No significant differences observed.

a

Parameter	CML	AML	ALL	MDS	AA	Σ
MC	19	8	7	0	3	37
All	44	21	16	16	11	108
%	43.2	38.1	43.7	0	27.3	34.3
P	0.3550	0.8041	0.5767	0.0028*	0.7487	–
OR	1.457	1.181	1.492	0.05778	0.7196	–
CI	0.7120 to 2.987	0.4492 to 3.104	0.5145 to 4.329	0.00337 to 0.9907	0.1800 to 2.876	–

P – two-sided P value, OR – odds ratio, CI – 95 % confidence interval; * very significant

b

Parameter	CML	AML	ALL	AA	Σ
MC	19	8	7	3	37
All	44	21	16	11	92
%	43.2	38.1	43.7	27.3	40.2
P	0.8525	1.000	0.7899	0.5223	—
OR	1.130	0.9148	1.156	0.5574	—
CI	0.5456 to 2.339	0.3452 to 2.424	0.3957 to 3.378	0.1387 to 2.241	—

P – two-sided P value, OR – odds ratio, CI – 95 % confidence interval

DISCUSSION

There exists, of course, also a quantitative aspect of chimerism that could be expressed as a relative amount of recipient or donor cells in the peripheral blood that is dependent on detection techniques used mostly. From this point of view we have to mention that nowadays the sensitivity of our methods is so high that we can detect e.g. cells with BCR/ABL fusion not only in patients suffering from CML [2] but also in healthy people [3]. In other patients lacking a specific marker of their disease, the only tool, which helps us to evaluate the situation, is to distinguish between recipient's and donor's cells using tests checking non-specific markers. Albeit the general sensitivity in that case is not as high, in favourable combination of donor and recipient whose gender is different, especially when we have a male recipient the detection of residual disease by unspecific marker is comparably high [4].

No other approaches with the exception of hybridization *in situ* could compete with two-step or real-time PCR. Cytological methods and classical karyotyping are far less sensitive.

From this point of view the report on chimerism ought to express also the approximate level of sensitivity and the use of an adjective **molecular** could indicate the highest level. Even classification of chimerical state according to time of its occurrence bears several problems. The so-called early chimerism is deeply dependent on the way of conditioning. It seems that the weaker the conditioning regimen, the longer early chimerism. Moreover, EMC can also indicate graft failure. The continuous or persisting chimerism is related to the level of sensitivity of adopted technique – the more sensitive, the more difficult to consider a residuum of recipient cells as residual **disease** and makes very problematic distinguishing between complete (donor) and mixed chimerism too. The most important signal of molecular relapse seems to be the increase of recipient's cells observed at least by two consecutive examinations within a period of four weeks [5], in other words dynamics of mixed chimerism. In case we have a specific marker at our disposal correlation to the level of mixed chimerism is of a great value. In most cases there does not exist any substantial difference, but because the technique of fuse-genes checking is based on transcription activity quantification, and mixed chimerism testing on genotyping, certain discrepancies are not only possible but realistic observation. The situation with the absence of fusion gene products e.g. in CML and positive mixed chimerism is usually explained as resurrection of own "healthy" haematopoiesis [6]. We have also to take into account that very small amount of recipient cells found after BMT could be caused by long-term surviving of T-lymphocytes (memory cells).

As molecular relapses can be treated more effectively than relapses detected at high amount

of pathologic cells when using less sensitive methods for relapse detection, the primary disease can be more easily controlled and negative clinical symptoms reduced or even eliminated. Also, we have take into account that number of relapses signalized by MC is still high and in leukemic patients reaches nearly 50% e.g. in AML [7]. At the beginning of our study we supposed to classify a recurrent mixed chimerism (RMC) as a separate entity, but we abandoned this idea because we were not able to distinguish spontaneous remission from medically induced one. We have only to admit that also spontaneous remission could occur especially when the number of neoplastic cells is still low – this opinion was supported by fluctuation of positive and negative results at high sensitivity detection levels. In fact, practically each molecular relapse led to changes in treatment to avoid the risk of sudden acceleration of the disease. Relapses observed after a long-lasting remission could be interpreted as a “new disease” – a new pathologic clone propagation, which could be solved by comparing genotypes of the original and the new disease.

CONCLUSIONS

Our results indicate the usefulness of molecular monitoring of transplanted patients throughout the whole post-transplant period with a one month periodicity within the first two years and at least six months periodicity finally, which can reveal most of eventual relapses at molecular level. Quantitative evaluation is to be preferred. The more sensitive way of checking is the better, though the very low level of recipient cells sometimes observed as steady state could be a parallel to the situation observed in healthy people and does not mean a warning signal. If monitoring leads to the conclusion that the number of recipient cells is increasing a more frequent checking becomes strongly recommended.

Acknowledgements: We would like to express our thanks to M. Loudová, M. Vraná, M. Dobrovolná, J. Moravcová and V. Zmenková for providing us with some laboratory data, to all clinicians who supplied us with blood samples and to all other molecular laboratory staff members who participated in the study.

Abbreviations

AA	aplastic anaemia
ALL	acute lymphocytic leukemia
AML	acute myelocytic leukemia
BCR/ABL	fusion gene
BMT	bone marrow transplantation
CC	complete chimerism (only donor's cells in peripheral blood)
CMC	continuous mixed chimerism
CML	chronic myelocytic leukemia
EMC	early mixed chimerism
LMC	late mixed chimerism
MC	mixed chimerism (both donor's and recipient's cells in peripheral blood)
MDS	myelodysplastic syndrome
PBSCT	peripheral blood stem cell transplantation
PCR	polymerase chain reaction
RMC	recurrent mixed chimerism
STR	short tandem repeats
VNTR	variable number of tandem repeats

REFERENCES

1. BRDIČKA R., SIEGLOVÁ Z., HONZÁTKOVÁ L., DVOŘÁKOVÁ R., HRABÁNEK J., KOBYLKA P., VÍTEK A., SEDLÁČEK P., STARÝ J.: DNA polymorfismy, allogenní transplantace kostní dřeně a periferní buněčný chimérismus. (DNA polymorphisms, allogeneic bone marrow transplants and peripheral cellular chimerism). Čas. Lék. Čes. 1998, 137, p. 110–119 (*in Czech*).
2. MORAVCOVÁ J., LUKÁŠOVÁ M., STARÝ J., HAŠKOVEC C.: Simple competitive two-step RT-PCR assay to monitor minimal residual disease in CML patients after bone marrow transplantation. Leukemia 1998, 12, p. 1303–1312.
3. DOSE S., DEININGER M., GORA-TYBOR J., GOLDMAN J., MELO J.: The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: Biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. Blood 1998, 92, p. 3562–3267.
4. FEHSE B., CHUKLOVIN A., KUHLCKE K., MARINETZ O., VORWIG O., RENGES H., KRUGER W., ZABELINA T., DUDINA O., FINCKENSTEIN F. G., KROGER N., KABISCH H., HOCHHAUS A., ZANDER A. R.: Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring haematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. J. Hematother. Stem Cell Res. 2001, 10, p. 419–425.
5. ELMAAGACLI A. H., RUNKEL K., STECKEL N., OPALKA B., TRENSCHEL R., SEEBER S., SCHAEFER U. W., BEELEN D. W.: A comparison of chimerism and minimal residual disease between four different allogeneic transplantation methods in patients with chronic myelogenous leukemia in first chronic phase. Bone Marrow Transpl. 2001, 27, p. 809–815.
6. MAURY S., BELHADJ K., CHAMI I., KUENTY M., CORDONNIER C., BORIES D.: Autologous reconstitution combined with durable leukemic remission after allogeneic BMT for CML. Bone Marrow Transpl. 2001, 28, p. 717–720.
7. MATTSON J., UZUNEL M., TAMMIK L., ASCHAN J., RINDGEN O.: Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. Leukemia 2001, 15, p. 1976–1985.