

**Detekce přestaveb genů pro imunoreceptory u akutní  
lymfoblastické leukémie a u zdravých krevních buněk**

**Eva Froňková**

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**

**2006**

## **Poděkování**

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli Doc. J. Trkovi, jak za odborné vedení a přípravu mého postgraduálního projektu, tak za přátelský přístup v průběhu studia.

Bc. Kateřině Mužikové děkuji za zasvěcení do postupů stanovování minimální reziduální nemoci. Doc. O. Hrušákovi, Dr. O. Krejčímu, Dr. J. Zunovi a Dr. E. Mejstříkové děkuji za spolupráci na společných projektech. Dr. J. Madžovi bych chtěla poděkovat za uvedení do problematiky molekulární genetiky a jemu i všem dalším kolegům ze skupiny CLIP za pomoc v nejrůznějších situacích, jaké mohou v molekulárně-genetické laboratoři nastat. L. Řezníčkové děkuji za spolupráci na projektu Mini-Risk.

Prof. J. Starému děkuji za možnost pracovat na Klinice dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a za zprostředkování propojení laboratorních výstupů s klinickou praxí.

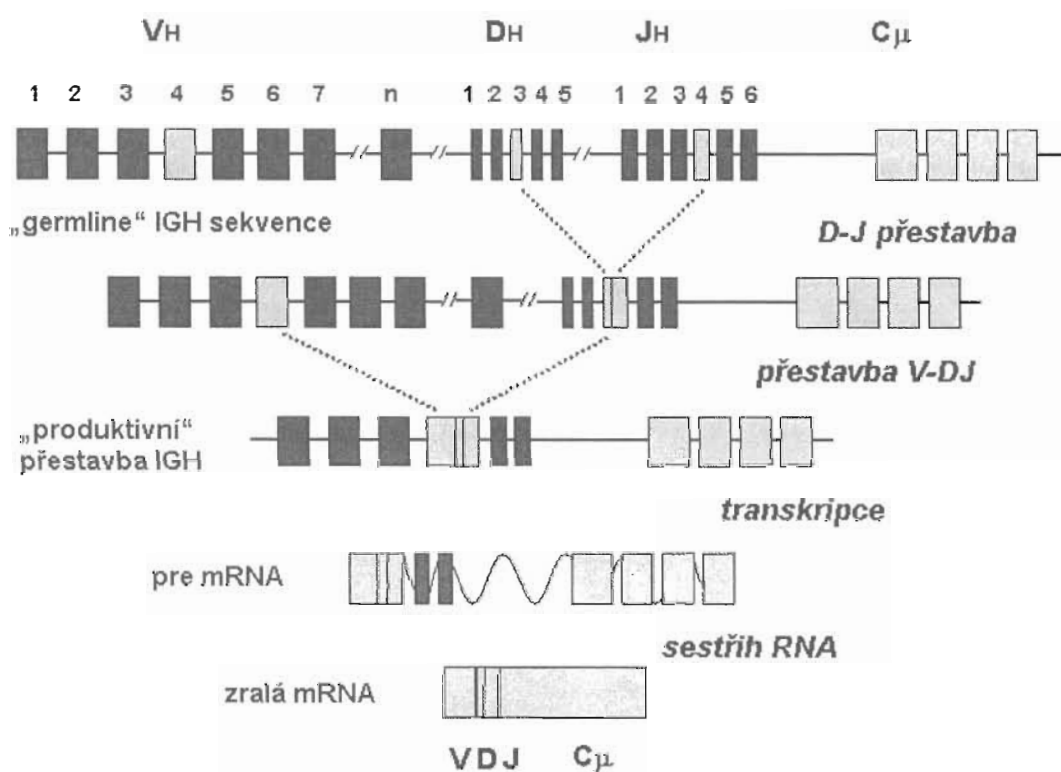
<b>ÚVOD</b> .....	<b>4</b>
<b>I. VYUŽITÍ PŘESTAVEB GENŮ PRO IG/TCR RECEPTORY PRO SLEDOVÁNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOCI U DĚTSKÝCH AKUTNÍCH LYMFOLASTICKÝCH LEUKÉMIÍ</b> .....	<b>7</b>
AKUTNÍ LYMFOLASTICKÁ LEUKÉMIE V DĚTSKÉM VĚKU .....	7
KLINICKÉ PROGNOŠTICKÉ FAKTORY .....	7
GENETICKÉ ZNAKY LEUKEMICKÝCH BUNĚK .....	8
<i>Změny v počtu chromosomů</i> .....	8
<i>Chromosomální translokace</i> .....	9
<i>Genetické znaky leukémií z T-řady</i> .....	11
<i>Komplexní změny karyotypu</i> .....	11
FARMAKODYNAMIKA A FARMAKOGENETIKA .....	12
MORFOLOGICKÁ ODPOVĚĎ NA INICIÁLNÍ FÁZI LÉČBY .....	12
MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOC .....	13
RIZIKOVÁ STRATIFIKACE V SOUČASNÝCH LÉČEBNÝCH PROTOKOLECH DĚTSKÉ ALL .....	15
PROTOKOL ALL IC-BFM 2002 .....	16
CÍLE I. ....	19
METODIKA I. ....	20
<i>Detekce minimální reziduální nemoci u akutních lymfoblastických leukémií pomocí kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory</i> .....	20
<i>Detekce minimální reziduální nemoci pomocí kvantifikace fúzního transkriptu TEL/AML1</i> .....	24
VÝSLEDKY I. ....	26
<i>Spektrum přestaveb Ig/TCR genů u TEL/AML1 pozitivních a negativních pacientů se liší</i> .....	26
<i>Kvantitativní detekce TEL/AML1 může doplnit klinicky orientované vyšetření minimální reziduální nemoci u dětských pacientů s ALL</i> .....	27
<i>Znaky nízkého rizika a rychlá morfoloická odpověď na iniciální fázi léčby nekoreluje s dynamikou minimální reziduální nemoci u dětí s ALL - předběžné výsledky studie Mini-Risk</i> .....	29
<b>II. PŘESTAVBY GENŮ PRO IMUNOGLOBULINY A T-BUNĚČNÉ RECEPTORY U FYZIOLOGICKÝCH KREVŇÍCH BUNĚK</b> .....	<b>32</b>
LINIOVĚ NESPECIFICKÉ PŘESTAVBY GENOVÝCH SEGMENTŮ V PRŮBĚHU VÝVOJE LYMFOCYTŮ .....	32
CÍLE II. ....	34
METODIKA II. ....	34
VÝSLEDKY II. ....	34
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>37</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>38</b>
<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>40</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>77</b>

## Úvod

Lidský imunitní systém se setkává s miliony nejrůznějších antigenů a antigenních epitopů. Schopnost lymfocytů specificky reagovat na tyto podněty je zajištěna obrovskou rozmanitostí antigenně-specifických receptorů - imunoglobulinů (Ig) u B lymfocytů a T-buněčných receptorů (TCR) u T lymfocytů. Kdyby byl celý tento repertoár kódován oddělenými geny, zabral by většinu genomu. Namísto toho vznikl v průběhu evoluce systém, který pomocí přeskupování omezeného množství genových segmentů dokáže vytvořit kombinace, které jsou jedinečné pro každý lymfocyt nebo lymfocytární klon [1, 2].

Povrchové i sekretované imunoglobuliny B lymfocytů se skládají ze dvou těžkých (IgH) a dvou lehkých (IgL) řetězců, spojených disulfidovou vazbou. Geny kódující IgH řetězce se nacházejí v genovém komplexu na chromosomu 14q32.3 v oblasti pokrývající asi 1250 kb. Tento komplex obsahuje v závislosti na haplotypu na 5' konci skupinu 46-52 funkčních sekvenčně podobných úseků V ("variabilita"), rozdělených na základě homologie do 6-7 rodin. Dále následuje skupina 27 úseků D ("diversita"), pak skupina 6 krátkých úseků J ("joining") a na 3' konci jsou uspořádány genové segmenty konstantní části těžkého řetězce (C), jejichž použitím jsou definovány jednotlivé třídy imunoglobulinů [3]. Po stranách jednotlivých V,D,J segmentů jsou situovány tzv. "RSS" (recombination signal sequence) sekvence, které jsou rozeznávány komplexem proteinů zajišťujícím tzv. V-D-J rekombinaci. Jedná se o specifický druh rekombinace DNA, která postihuje nehomologní genové segmenty a je zajišťována koordinovanou aktivitou několika enzymů. Některé z nich se nacházejí pouze ve vyvíjejících se lymfocytech (recombination activating genes, RAG 1, RAG 2), další patří k enzymům účastnícím se oprav DNA (Ku70, Ku80, DNA ligasa IV). U IGH začíná V-D-J rekombinace přeskupením segmentů D k J a je následována připojením V k D-J. Působením enzymu terminální deoxynukleotidyl transferázy (TdT) jsou mezi tyto úseky navíc vkládány náhodně tzv. N-nukleotidy, což ještě zvyšuje už beztak vysokou variabilitu těchto sekvencí. D-J přeskupení může probíhat i opakovaně, dokud jsou k dispozici nevyštěpené D a J segmenty; tento krok probíhá na obou chromozómech paralelně. Pokud je přestavba V-D-J na jednom chromosomu produktivní, je přepsána do mRNA, která po sestřihu začne produkovat těžký  $\mu$  řetězec. V tomto okamžiku je přestavování na druhém chromosomu zastaveno, takže každý B lymfocyt produkuje jen jeden těžký řetězec (tzv. alelická exkluze) [4, 5]. V okamžiku, kdy buňka začala produkovat  $\mu$  řetězec, se z ní stává preB lymfocyt. Těžký řetězec se však

zatím nemůže asociovat s lehkým, protože přeskupení jeho genů dosud neproběhlo. Místo IgL řetězců proto preB buňka syntetizuje tzv. "náhradní" L-řetězce ( $\psi$ L), které se skládají ze dvou malých proteinů, produktů genů zvaných VpreB a  $\lambda$ 5. Komplex membránového  $\mu$  řetězce s  $\psi$ L asociovaný s dimerem signálních proteinů Ig $\alpha$ -Ig $\beta$  se objevuje na povrchu preB buňky [6]. V tomto stádiu se pravděpodobně po stimulaci nějakým dosud neidentifikovaným ligandem zahajuje přeskupování genů pro IgL řetězce [7].



**Obrázek č. 1:** Schéma přestaveb genů pro těžké řetězce imunoglobulinů

Lehké řetězce jsou kódovány buď komplexem kappa (IGK) na chromosomu 2p11.2 nebo komplexem lambda (IGL) na chromosomu 22. Struktura těchto genových komplexů má podobné uspořádání jako IgH, ale je jednodušší (neobsahuje D segmenty a skládá se z menšího množství V a J úseků). Jako první se začínají současně přestavovat na obou alelách chromosomu 2 geny kódující IGK. Pokud je výsledná V-J přestavba produktivní a tedy poskytuje funkční IgL řetězec schopný vytvořit s IgH ( $\mu$ ) řetězcem kompletní povrchový imunoglobulin (IgM) náhradou za pre-B receptor, zastaví se přeskupování na druhém chromosomu. Pokud není přeskupování genů úspěšné ani na

jednom chromosomu, dojde k definitivnímu vyřazení IGK pomocí rekombinace V nebo VJ segmentu k tzv. kappa-deleting elementu (KDE) a je zahájeno přeskupování IgL [1, 8]. Pokud ani to není úspěšné, preB lymfocyt hyne. Expresí povrchového IgM se buňka stává nezralým B lymfocytem.

Molekuly receptorů T lymfocytů se skládají ze dvou řetězců, které jsou spojeny disulfidovým můstkem. Jsou popsány dva typy TCR: "klasický", který se skládá z řetězců  $\alpha$  (TCRA) a  $\beta$  (TCRB) a "alternativní", který je složen z řetězců  $\gamma$  (TCRG) a  $\delta$  (TCRD) [2, 9]. Většina zralých T lymfocytů (85% až 98%) v periferní krvi a ve většině lymfoidních tkání exprimuje TCR $\alpha\beta$ ; pouze malá část nese TCR $\gamma\delta$  [9]. Každý řetězec TCR se skládá ze dvou domén: variabilní a konstantní. Podobně jako u IgH řetězců je variabilní řetězec kódován libovolnou kombinací dostupných V, D a J segmentů v případě TCRB a TCRD; řetězce TCRA a TCRG postrádají D segmenty stejně jako lehké řetězce imunoglobulinů [2]. Genový komplex TCRD je lokalizován uvnitř genového komplexu TCRA, takže je při přeskupování TCRA kompletně vyštěpen. Rekombinace genových segmentů TCRD na rozdíl od dalších podjednotek obsahujících D segmenty (IgH a TCRB) probíhá v pořadí V-D >V-D-J. Do celkové struktury podjednotky TCRD mohou být navíc zavzaty 2-3 segmenty D, tj. V-D-D-J nebo V-D-D-D-J, což přispívá ke zvětšení variability TCRD, která je jinak oproti dalším podjednotkám omezena menším množstvím použitelných V, D a J segmentů [1].

Přeskupování TCR genů probíhá podobně jako přestavby Ig a je při něm používán i stejný komplex enzymů.

Buňky akutní lymfoblastické leukémie (ALL) jsou všeobecně pokládány za maligní protějšky nezralých lymfoidních buněk [10]. Celý maligní klon vzniklý nádorovou transformací jedné buňky potom nese stejné sekvence přestavěného Ig nebo TCR genu. Toho lze využít k jeho "stopování". Sledování a významu minimální reziduální nemoci zjištěné pomocí kvantifikace přestaveb Ig/TCR genů u dětských ALL je věnována první část této práce. Pomocí modifikace této metodiky jsme pak zkoumali fyziologickou přítomnost přestaveb TCR i u dalších linií krevních buněk. Výsledky této studie jsou popsány v druhé části práce.

# I. Využití přestaveb genů pro Ig/TCR receptory pro sledování reziduální nemoci u dětských akutních lymfoblastických leukémií

## Akutní lymfoblastická leukémie v dětském věku

Akutní lymfoblastická leukémie je nejčastějším nádorovým onemocněním u dětí, tvoří 80% leukémií dětského věku. Ročně v České republice onemocní 65-70 dětí. Jejich prognóza se v minulých desetiletích dramaticky zlepšila - procento trvale vyléčených dětí a adolescentů dosahuje 80% [11-14]. Stalo se tak především díky použití sjednocených léčebných protokolů, využívajících kombinaci cytostatik vybraných jako nejvhodnější pomocí randomizovaných studií. Důležitým faktorem je i kvalitní podpůrná péče, umožňující nasazení vysokodávkovaných cytostatik. Přes tyto pokroky je zřejmě pro část pacientů intenzita léčby stále příliš vysoká, s rizikem pozdních následků včetně sekundárních malignit. Malou skupinu dětí s vysoce rizikovými leukémiemi nelze pomocí stávajících prostředků vyléčit vůbec. Konečný výsledek léčby nezávisí pouze na použitém léčebném schématu, ale také na biologii leukemického klonu, jeho farmakodynamických a farmakogenetických vlastnostech.

Zásadním předpokladem je proto rozdělení pacientů do tzv. rizikových skupin, pro které je indikována různě intenzivní terapie. Tento postup umožňuje omezit toxicitu léčby pro děti s vysokou šancí na vyléčení (skupina tzv. standardního rizika) a naopak u skupiny s vysokým rizikem relapsu (skupina tzv. vysokého rizika) podávat maximálně intenzivní terapii, případně indikovat jiné způsoby léčby - transplantaci hemopoetických kmenových buněk (HSCT) nebo nasazení nových cílených léčiv.

## Klinické prognostické faktory

Mezi nejdůležitější prognostické faktory patří věk a leukocytóza (WBC) v době diagnózy [15, 16]. Za příznivý je pokládán věk 1-9 let a nízká iniciální leukocytóza ( $WBC < 50 \times 10^9/L$ ). Tyto parametry vycházejí jako prognosticky významné téměř ve všech léčebných studiích. Dobré výsledky pozorované u mladších dětí jsou dány především příznivými biologickými znaky blastů, které jsou v této věkové skupině často zastoupeny. Děti do 1 roku mají prognózu trvale špatnou, za což je z velké části odpovědná nepříznivá biologie translokací MLL genu, která je přítomna u 70% těchto pacientů. Iniciální

leukocytóza odráží nádorovou masu, spolu s dalšími znaky, jako jsou hepatosplenomegalie a infiltrace mediastina. Protokol skupiny BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) ALL-BFM 90 začlenil WBC, velikost jater a sleziny do jedné proměnné, která byla používána k rizikové stratifikaci [14].

Dalšími znaky, které se pravidelně ukazovaly být spojené s prognózou, jsou pohlaví a imunofenotyp. Dívky měly lepší přežití bez události (EFS) ve srovnání s chlapci [17]. Ve snaze snížit tento rozdíl prodloužily některé léčebné protokoly u chlapců délku udržovací léčby [14]. V nejnovějších protokolech s EFS 80% a více je už nepříznivý význam mužského pohlaví smazán [11, 18].

Přibližně 12-15% dětských ALL klasifikovaných jako leukémie z T buněk (T-ALL) má historicky horší prognózu než případy B prekurzorových leukémií (BCP-ALL) [19]. Proto většina center zařazuje tyto pacienty do skupin vyššího rizika. I když se v několika posledních studiích prognóza pacientů s nově diagnostikovanou T-ALL zlepšila [12, 20], výsledky léčby relapsu jsou i při využití HSCT stále neuspokojivé.

V rámci ALL z prekurzorů B-řady tvoří proB-ALL 5% (CD10 neg.), cALL ("common") 75% (CD10 pozit.) a preB-ALL 20% (cytoplazmatické IgM pozit.). Nejčastější imunologický subtyp - cALL - má vrchol výskytu mezi 2-6 lety věku a (kromě dalších aberací) pravidelně provází nález hyperdiploidního počtu chromozómů > 50 v leukemické buňce. ProB ALL se vyskytují typicky u kojenců, u kterých jsou spojeny s přestavbou chromosomu 11q23, a u dětí starších 10 let.

U 20% dětských ALL dochází ke koexpresi myeloidních antigenů na lymfoidních blastech (My+ ALL). Její význam zůstává stále sporný. Původní názor o negativním prognostickém vlivu nebyl při sledování několika znaků současně potvrzen [21, 22]. Studie naší skupiny z loňského roku ale prokázala, že samotná exprese myeloidního znaku CD33 u ALL je nezávislým prognostickým faktorem [23].

## **Genetické znaky leukemických buněk**

### ***Změny v počtu chromosomů***

U blastů ALL pravidelně nacházíme získané genetické abnormality, které umožňují vysvětlit patogenezi a značně ovlivňují prognózu onemocnění. Přibližně třetina případů vykazuje zvýšení počtu chromosomů v buňce (tzv. hyperdiploidní, definováno jako > 50 chromosomů v leukemické buňce). Vynikající senzitivitu hyperdiploidních blastů k chemoterapii vysvětluje jejich sklon ke spontánní apoptóze v kultuře in vitro



a akumulování vysokých koncentrací metotrexátu a jeho aktivních metabolitů - polyglutamátů [24]. Dobrý výsledek léčby spojený s hyperdiploidii je částečně připisován příznivému prognostickému významu skupiny se současnou trizomií chromosomů 4, 10 a 17 (tzv. "triple trisomy"). Pacienti s "triple trisomy" ALL mají EFS v 8 letech > 90% [25]. Při vyloučení těchto "příznivých trizomií" se již hyperdiploidie v této studii neukazuje jako nezávislý prognostický faktor. Na druhé straně, hypodiploidie s počtem chromosomů pod 45 znamená špatnou prognózu a pro skupinu téměř haploidní (méně než 28 chromosomů) je EFS 25%. Prognóza pacientů s počtem chromosomů 45 se neliší od prognózy pacientů s normálním karyotypem. Hypodiploidie je u dětí poměrně vzácná, vyskytuje se pouze u 3-9% pacientů, z toho 80% má zmíněný prognosticky příznivý počet chromosomů 45.

### **Chromosomální translokace**

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

#### **TEL/AML1**

Nejčastější translokací s výskytem až u 25% dětských ALL je  $t(12;21)(p13;q22)$ . Tato translokace fúzuje gen TEL na 12p2 (také nazývaný ETV6) s genem AML1 (nazývaným také CBFA2 nebo RUNX1). Výsledným fúzním transkriptem je transkripční faktor, který funguje jako korepresor genů ovlivňovaných AML1 [26]. Tato leukémie vychází z prekurzorů B-řady, má vrchol výskytu mezi 2.-5. rokem života, blasty často nesou na svém povrchu myeloidní znaky. Starší studie s kratší dobou sledování ukazovaly, že TEL/AML1 pozitivní leukémie mají menší procento relapsů [27, 28], studie skupiny BFM ale ukázala, že incidence této translokace ve skupině s relapsem je stejná jako při iniciální diagnóze. Relaps se většinou vyskytuje pozdě a jeho léčba má dobrou prognózu [29]. Oproti tomu studie z Dana Farber Cancer Institute prokázala pozitivitu TEL/AML1 pouze u 1 ze 32 vyšetřovaných relapsových vzorků [30]. Tyto rozdíly jsou patrně způsobeny odlišnými způsoby léčby podle daných protokolů. Studie *in vitro* ukázaly, že TEL/AML1 pozitivní blasty jsou zvýšeně citlivé k asparagináze, proto je jejich eliminace pravděpodobně úspěšnější na protokolech používajících větší dávky této látky [31]. Zajímavé výsledky studie provedené u dvojčat s ALL ukazují, že fúze TEL/AML1 může vzniknout mnoho let před diagnózou leukémie [32]. Pro plnou maligní transformaci buněk je zřejmě třeba dalších zásahů, jako je např. delece nepostižené alely genu TEL [33].

Některé teorie proto předpokládají, že pozdní relapsy těchto leukémií ve skutečnosti představují "de novo" vzniklé leukémie, které se vyvinou z původního premaligního TEL/AML1 pozitivního klonu. To by mohlo vysvětlovat dobré léčebné výsledky těchto relapsů [33, 34].

### **BCR/ABL**

Fúzní transkript BCR/ABL je produktem translokace t(9;22)(q34;q11), charakteristické pro chronickou myeloidní leukémii (CML). Protein jím kódovaný má alterovanou tyrosinkinázovou aktivitu, která je zodpovědná za maligní transformaci buněk. Vyskytuje se u 3-5% dětských ALL a až u 20% ALL dospělého věku [35]. BCR/ABL pozitivní ALL patří k nejobtížněji léčitelným ze všech dětských ALL, i když se i v jejich rámci vyskytuje podskupina s příznivějším EFS 50% (případy s nízkou iniciální leukocytózou a věkem pod 10 let) [36]. Dalším příznivým znakem ve skupině BCR/ABL pozitivních leukémií je rychlá odpověď na indukční fázi po prvních dvou týdnech léčby, pacienti také profitují z HSCT v první remisi [37]. Velkou naději přinesl objev specifického inhibitoru tyrosinkinázy BCR/ABL imatinib mesylátu (STI 571, Gleevec, Glivec). Jeho nasazení přineslo přechodný efekt u pacientů s relapsem, u většiny případů však došlo k rekurenci choroby. V současné době se testuje nasazení imatinibu při iniciální léčbě ve spojení s chemoterapií.

### **E2A/PBX**

Translokace t(1;19)(q23;q13), charakterizovaná fúzním genem E2A/PBX1 a preB imunofenotypem, se vyskytuje asi u 5-8% dětí [35]. V protokolech využívajících klasickou antimetabolitovou léčbu byla znakem špatné prognózy, při použití současné intenzivní léčby se však stala nejpríznivějším genetickým subtypem dětských ALL s dlouhodobým EFS přibližujícím se 90% [38].

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

Gen MLL (mixed lineage leukemia) na chromosomu 11 se účastní translokací s více než 30 partnerskými geny u asi 6% dětských ALL. Nejčastějším fúzním partnerem je gen AF4 na chromosomu 11. Tato translokace se vyskytuje až u 70% kojeneckých ALL a postihuje zejména děti do 6 měsíců věku [35]. Sdružuje se s nezralým proB fenotypem, vysokou iniciální leukocytózou, hepatosplenomegalií, iniciální infiltrací mozku a extrémně nepříznivou prognózou u dětí do 1 roku věku [39]. Blasty s přestavbou MLL/AF4 nesou na svém povrchu často myeloidní znaky, jsou *in vitro* citlivé na cytosin arabinosid (používaný k léčbě AML) a přítomnost cytoplazmatické myeloperoxidázy svědčí pro hybridní leukémii, proto současné protokoly léčby kojeneckých ALL kombinují schémata léčby

ALL a AML. Rozsáhlá studie skupiny ze St Jude Children's Research Hospital (SJCRH) v Memphisu ukázala, že se špatnou prognózou se pojí všechny translokace 11q23 (EFS 20%-25%) [39]. Studie provedené pomocí expresního profilování poměrně spolehlivě oddělují pacienty s přestavbou MLL genu od ostatních typů leukémie, na jejich základě bylo dokonce navrženo nové rozdělení leukémií na ALL, AML a MLL (mixed lineage leukemia) [40]. Gen MLL má dále také známou funkci ve vzniku sekundárních leukémií. Některé účinné látky používané při léčbě dětských ALL (etoposid, antracykliny) způsobují zlomy a přestavby tohoto genu, což vede (v závislosti na použitém protokolu) až u 3.8% dětí ke vzniku velmi špatně léčitelné sekundární AML [41-43].

### *Genetické znaky leukémií z T-řady*

Na základě expresního profilování se ukázalo, že T-ALL může být také rozdělena do skupin na základě zapojení jednoho nebo více specifických onkogenů a molekulárních drah. T-ALL může být takto rozdělena do pěti podtypů: (1) HOX11, (2) HOX11L2, (3) TAL1 plus LMO1/2, (4) LYL1 plus LMO2, a (5) MLL-ENL. Vysoce příznivou prognózu mají pacienti se zvýšenou expresí "homeobox" genu HOX11 (přítomna u 5-10% dětských T-ALL a u 30% T-ALL u dospělých) nebo s translokací MLL/ENL. Prognostický význam subtypu se zvýšenou expresí HOX11L2 závisí na použité léčbě [44]. V nedávné studii byly u více než 50% dětských T-ALL nalezeny aktivační mutace postihující intracelulární heterodimerizační doménu nebo C-terminální PEST doménu genu NOTCH-1, který reguluje normální vývoj T lymfocytů. Tyto mutace se vyskytují u všech výše uvedených genetických subtypů a do budoucna představují slibnou oblast pro cílenou terapii [45].

### *Komplexní změny karyotypu*

Komplexní karyotyp je definován jako nález tří nebo více chromosomálních aberací. Výsledky studií u dospělých pacientů s ALL ukázaly komplexní karyotyp jako negativní prognostický znak. Studie provedená u 79 dětských pacientů s ALL diagnostikovala komplexní změny karyotypu u 21 dětí (26,6%). U části z nich se komplexní karyotyp pojil s klasickými genetickými změnami (TEL/AML1, BCR/ABL, hyperdiploidie). Celkově se tento znak ukázal jako negativní prognostický faktor ovlivňující jak přežití bez události tak celkové přežití [46].

## Farmakodynamika a farmakogenetika

Zatímco biologických znaků leukemického klonu se v rizikové stratifikaci používá běžně, z charakteristik jeho nositelů se běžně zatím používá pouze věk. V posledních letech se pozornost zaměřuje také na genetické polymorfismy ovlivňující farmakodynamiku podávaných antileukemických látek. Dětská ALL představuje onemocnění, které by teoreticky mohlo nesmírně profitovat z individualizace terapeutických dávek. Pozornost se zaměřuje na souvislost genetických polymorfismů enzymů metabolizujících léky, transporterů a receptorů s výsledkem léčby [47]. Jedním z klíčových léků pro léčbu dětské ALL je 6-merkaptopurin. Homozygotní nebo heterozygotní deficit enzymu thiopurin metyltransferázy (TPMT), který katalyzuje inaktivaci merkaptopurinu, je spojen s lepší odpovědí na léčbu, ale také se zvýšeným rizikem sekundárních malignit [47]. Inaktivační polymorfismy glutathion *S*-transferázy (GSTM1), důležitého detoxifikačního enzymu eliminujícího např. organofosfáty, alkylační látky nebo polycyklické aromatické uhlovodíky, jsou také spojeny se zvýšenou toxicitou, ale s lepším léčebným výsledkem, pravděpodobně díky zvýšení dávky chemoterapeutik. Na druhou stranu, polymorfismy způsobující zvýšenou expresi thymidylátsyntetázy (TS), cílové látky několika používaných cytostatik včetně metotrexátu, byly asociovány s vyšším rizikem relapsu [48]. Pacienti s těmito polymorfismy (tandemové opakování trojice bází v promotoru genu pro TS) zřejmě pro optimální léčebnou odpověď potřebují zvýšenou dávku metotrexátu. Tím je zřejmě vysvětlen fakt, že studie skupiny BFM, jejíž protokol obsahuje vyšší dávky metotrexátu, prognostický význam těchto polymorfismů nepotvrdila [49]. Dosud se při farmakogenetických studiích pracovalo maximálně s několika vytipovanými geny, jejichž prognostický význam se ověřoval na souborech pacientů. Současné techniky už umožňují opačný, tzv. "genotype to phenotype" přístup, který postupně umožní zjistit, které z milionů genetických variací v genomu jsou funkčně důležité a mohou být použity k individualizaci léčby.

### Morfologická odpověď na iniciační fázi léčby

Jedním z největších počátečních úspěchů skupiny BFM bylo zjištění, že časná odpověď na léčbu, obzvláště pak odpověď na prednisonovou předfázi (absolutní počet blastů v den 8, po 7 dnech prednisonu a jedné intrathekální dávce metotrexátu), je nejsilnějším prognostickým faktorem. Pacienti, kteří mají v 8. dni léčby v periferní krvi stále více než 1000 blastů na  $\mu\text{L}$  (asi 10% ze všech), tvoří skupinu s mnohočetnou lékovou rezistencí,

tzv. "prednison poor responders"(PPR). Šance na přežití bez události v této skupině byla na protokolu ALL-BFM 83 při desetiletém sledování 39% ve srovnání s 66% ve skupině s dobrou odpovědí na prednison. Žádný jiný prognostický znak zatím sám o sobě nedokázal definovat tak velkou skupinu pacientů s EFS pod 50% [50]. Díky snadné dostupnosti a reprodukovatelnosti začlenila většina skupin tento znak do své rizikové stratifikace. Žádná ze změn v druhu nebo intenzitě léčby aplikovaná skupinou BFM nepřinesla dlouho pro skupinu PPR zlepšení. Teprve protokol ALL-BFM 95 signifikantně zlepšil přežívání v této skupině: 56% vs. 34% ve studii ALL-BFM 90 [14]. V pozdějších letech několik skupin hodnotilo morfologickou odpověď také v kostní dřeni. Oproti nátěrům z krve je toto vyšetření někdy limitováno nízkou buněčností a kvůli možným interpretačním neshodám je dobré ho provádět centralizovaně. Analýza léčebných výsledků protokolu ALL-BFM 90 ukázala, že hodnocení kostní dřene v den 15 (BM d15) může přidat další prognostickou informaci, především ve skupině s dobrou odpovědí na prednison (PGR). M3 dřeň (> 25% blastů) v d15 oddělila ve skupině PGR malou skupinu s EFS pouze 54%. Nedosažení kompletní remise indikované M2 (5-25% blastů) nebo M3 dřeni na konci indukční léčby (den 33) se v této studii ukázalo jako nejsilnější nepříznivý faktor (EFS 11%), tato skupina tzv. "non-responderů" (NR d33) však naštěstí tvoří jen 2,5% ze všech pacientů [14].

### **Minimální reziduální nemoc**

Navzdory neustále se zpřesňující rizikové stratifikaci dochází k většině relapsů ve skupinách pacientů s nižším rizikem, což je dáno poměrným zastoupením pacientů v rizikových skupinách. 70% relapsů na protokolu ALL-BFM 90 proběhlo ve skupině PGR, což ukazuje na nízkou specifitu tohoto rizikového znaku. Proto se úsilí zaměřilo na citlivější submikroskopické techniky pro hodnocení léčebné odpovědi, které by umožnilo identifikovat podskupinu s příznivými stávajícími prognostickými znaky, ale přesto s vysokým rizikem relapsu. Minimální reziduální nemoc (MRN) je definována jako subklinická úroveň leukémie, kdy v průběhu terapie již maligní buňky nejsou detekovatelné běžnými cytologickými metodami a jejich zastoupení v kostní dřeni je nižší než 5%. V této situaci hovoříme o kompletní hematologické remisi, pacient však může i za tohoto stavu mít v těle až  $10^{10}$  maligních elementů [51]. Zájem o fenomén MRN u akutních leukémií pochází už ze sedmdesátých let [52]. Pilotní studie z devadesátých let prokázaly přímý klinický význam hodnocení MRN a díky tomu se postupně tato metoda (původně

pouze výzkumná) začala upravovat pro klinické užití. Původní práce používaly k určování MRN kvalitativní nebo semi-kvantitativní metody [53, 54]. Postupně se ale ukazovalo, že samotná informace o přítomnosti či nepřítomnosti MRN nevede k přesnějším výsledkům. Ve druhé polovině devadesátých let se pozornost díky rozvoji nových metod, zejména PCR v reálném čase, postupně obracela ke kvantitativním metodám a ke sledování dynamiky MRN [55, 56]. V současné době existují u dětských pacientů s ALL tři základní způsoby detekce MRN, které mají dostatečnou citlivost a specifitu pro to, aby mohly být využity v klinickém rozhodování o léčbě pacienta. Dosud existuje jen málo studií zabývajících se porovnatelností či nahraditelností těchto tří metod navzájem, a většina publikovaných souborů navíc trpí metodickými nedostatky nebo malým počtem srovnávaných vzorků [57-62]. Z tohoto důvodu jsme se v naší práci na toto srovnání zaměřili. (viz Cíle I.)

První z používaných metod je mnohobarevná (tří až čtyřbarevná) průtoková cytometrie. Pomocí kombinací fluorescenčně značených protilátek proti povrchovým nebo cytoplazmatickým antigenům typickým pro leukemickou buňku umožňuje sledování MRN s citlivostí až 1 maligní buňky mezi  $10^4$  normálních buněk [63-65]. Leukemický klon je možné sledovat pomocí znaků, které jsou exprimovány buď asynchronně (netypicky pro očekávané vývojové stadium buněk) nebo aberantně (netypicky pro danou vývojovou linii buněk). Z toho také plynou nevýhody této jinak rychlé a velice přehledné metody - možnost ztráty či změny exprese sledovaných znaků během vývoje leukemického klonu a odlišení některých typů blastů od fyziologických prekurzorů B řady.

Dalším cílem pro monitorování MRN jsou fúzní geny, produkty chromozomálních translokací, které je možné detekovat na úrovni RNA transkriptu nebo přímo DNA. Kvantifikace mRNA nemonitoruje přímo množství leukemických buněk, ale hladinu exprese genu. Pro nutnost přepisu informace z RNA hovoříme o kvantitativní reverzně-transkriptázové PCR v reálném čase (RQ-RT-PCR). U dětských ALL z B řady je z tohoto pohledu pro své časté zastoupení nejvhodnější fúzní gen TEL/AML1, dále pak BCR/ABL, MLL/AF4, E2A/PBX1 a translokace postihující "promiskuitní" gen MLL (MLL/AF9, MLL/AF6, MLL/AF10, MLL/ENL, MLL/ELL a další) [35, 66, 67]. U T-ALL je možno poměrně snadno sledovat MRN přímo na DNA úrovni pomocí translokace SIL/TAL1 [68]. Výhodou metod pracujících s RNA je možnost společné analýzy více vzorků od různých pacientů pomocí jediného zavedeného RQ-RT-PCR systému. Nevýhodou práce s RNA je její nízká stabilita a snadná degradace, která s sebou přináší nutnost rychlého a opatrného zpracování vzorků a výběru vhodného kontrolního genu (viz

Metody I.). Není také dosud uspokojivě popsáno, jaký vliv na expresi jednotlivých genů má podání jednotlivých chemoterapeutik v průběhu léčby.

Metoda v současnosti považovaná za nejspolehlivější používá ke sledování MRN kvantitativní detekci klonálně-specifických přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory na DNA úrovni (dále jen kvantifikace Ig/TCR). Její výhodou proti průtokové cytometrii (FC) zůstává stabilita přestaveb na DNA úrovni i v případě měnícího se fenotypu leukemické buňky v průběhu terapie a celkově vyšší senzitivita. Na rozdíl od kvantifikace fúzních transkriptů je použitelná pro naprostou většinu pacientů (přibližně 95%), navíc není ovlivněna viabilitou analyzovaných buněk. Z těchto důvodů se tato metoda v posledních letech stává ve stále větší míře součástí léčebných protokolů, a to i přes svou značnou časovou, finanční i laboratorní náročnost (viz Metody I.).

V roce 1998 byla pomocí této metodiky provedena studie, která na souboru 240 pacientů léčených podle protokolů BFM ukázala, že hladiny MRN na konci indukční léčby (d33) a před začátkem konsolidační léčby v týdnu 12 (w12) představují nezávislý prognostický faktor, který dokáže definovat poměrně velkou skupinu (43%) s velmi nízkým rizikem relapsu (3% relapsů při 3 letech sledování) [56]. Skutečný význam detekce MRN v počáteční fázi léčby ale odhalí až vyhodnocení současných prospektivních studií (viz níže). Oblastí, která již potvrdila význam této metody, je léčba relapsů dětské ALL a transplantace hemopoetických progenitorů. Německý recidivový protokol ALL-REZ BFM 2002 při stratifikaci pacientů v největší skupině S2 vychází z práce, která ukázala na negativní prognostický význam vysoké hladiny MRN po indukční fázi léčby relapsu [69]. Pacienti s hladinou MRN v tomto časovém bodě vyšší než  $10^{-3}$  (1 leukemická mezi  $10^3$  zdravých buněk) jsou indikováni k nepřibuzenské transplantaci hemopoetických progenitorů, protože jejich šance na přežití při léčbě samotnou chemoterapií je téměř nulová. Evropská skupina *Pre-BMT-MRD-Study-Group*, jejímž členem je i naše laboratoř, prokázala, že jakákoliv hladina MRN před transplantací významně zvyšuje pravděpodobnost relapsu po transplantaci [70]. Monitorování hladin MRN po transplantaci umožňuje včasné léčebné zásahy, například v podobě adoptivní imunoterapie (infúze dárcovských lymfocytů - DLI, vysazení imunosuprese) [71].

### **Riziková stratifikace v současných léčebných protokolech dětské ALL**

Již zmíněná studie skupiny BFM z roku 1998 [56] ukázala novou cestu pro definování skupin, u kterých by bylo možno snížit léčbu a tím i toxické následky s ní spojené. Hlavní

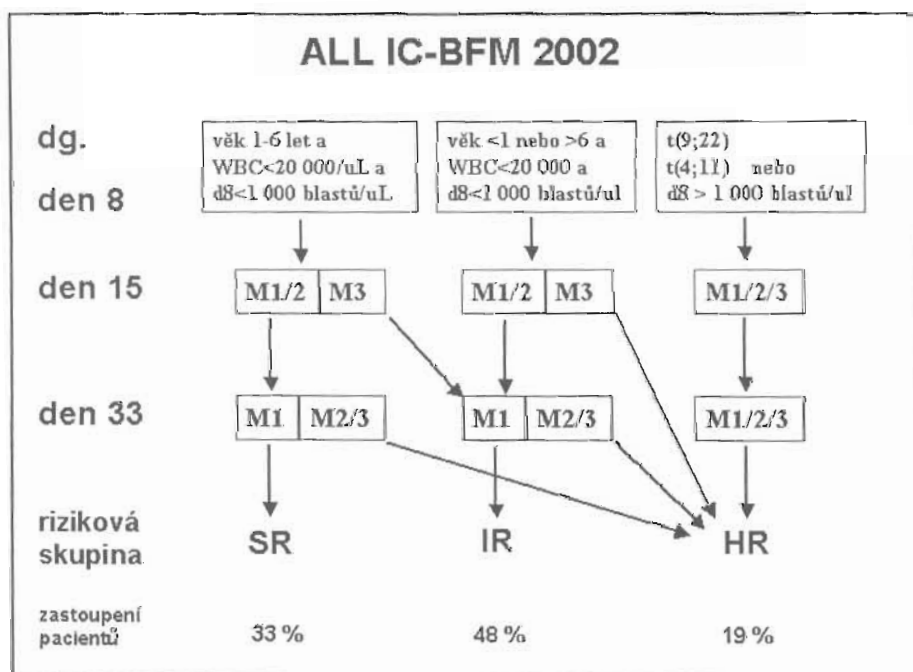
nevýhodou tohoto přístupu jsou enormní logistické a technologické nároky této metody při aplikaci u velkého množství pacientů. Skupiny BFM a AIEOP se přesto rozhodly vynechat téměř všechny dosavadní znaky používané pro stratifikaci do rizikových skupin (věk, WBC, imunofenotyp) a založit novou strategii pouze na odpovědi na prednison a hladině MRN v týdnu 5 (d33) a 12 (w12) léčby. Pacienti s přetrvávající vysokou hladinou MRN ve druhém časovém bodě ( $> 10^3$ ) jsou léčeni podle schémat vysokého rizika (spolu s pacienty se špatnou odpovědí na prednison, NR d33 nebo nositeli translokací BCR/ABL a MLL/AF4, což jsou jediné další prognostické faktory využité v tomto protokolu). Nově je zde definována skupina s nejnižším rizikem (standard risk, SR), která u části pacientů s negativní MRN v obou časových bodech indikuje snížení léčebných dávek. Podle protokolu AIEOP LLA-2000/ALL-BFM 2000 se začalo léčit v roce 2000. Jeho hlavní otázka zní: Může riziková stratifikace založená pouze na léčebné odpovědi zlepšit celkové přežití a zároveň snížit toxicitu u části pacientů bez rizika zhoršení léčebných výsledků pomocí takto "individualizovaného" odhadu rizika relapsu u každého pacienta? Také několik dalších skupin zahrnuje alespoň z části hodnocení MRN do své rizikové stratifikace, i když ne tak razantně jako skupina BFM. Francouzská EORTC se zaměřila na rychlou a snadno proveditelnou metodiku využívající fragmentační analýzy PCR produktů v kapilární elektroforéze, která nevyžaduje sekvenování a přípravu specifických oligonukleotidů, její senzitivita je však limitovaná. Tento postup umožňuje zachytit pacienty s vysoce rizikovou ALL, která by jinak unikla pozornosti [72]. Nemocnice SJCRH zvolila kombinaci FC a Ig/TCR metodik pro konečné přeřazování v rizikových skupinách na základě MRN po 6 týdnech terapie. Pro zařazení do skupiny s nejnižším rizikem je však třeba kromě negativy MRN splnění dalších podmínek: věk 1-10 let, WBC nižší než  $50 \times 10^9/L$ , přítomnost hyperdiploidie (DNA index  $\geq 1,16$ ) nebo fúze TEL/AML1 a zároveň nepřítomnost leukemické infiltrace testes či CNS, hypodiploidie pod 45 chromozomů, fúze E2A/PBX1 nebo přestavby genu MLL. Tento protokol navíc prospektivně testuje polymorfismy pro TPMT u všech pacientů a snižuje dávky merkaptopurinu u dětí s nízkou enzymovou aktivitou [73].

### **Protokol ALL IC-BFM 2002**

Výsledky prvních studií využívajících MRN ke své rizikové stratifikaci nebudou známy dříve než za minimálně pět let od jejich zahájení. Do té doby nebude známo, jestli obrovské úsilí věnované detekci MRN u velkých souborů pacientů přinese očekávané



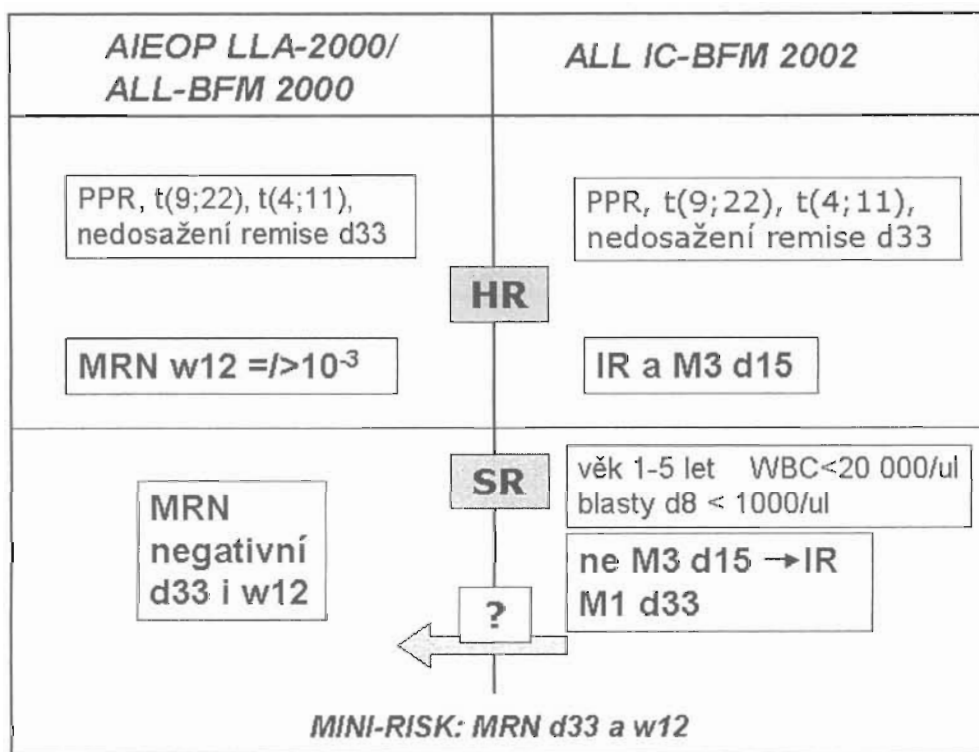
zlepšení. Proto se část členů mezinárodního konsorcia BFM (I-BFM) rozhodla navrhnout protokol, který by do své rizikové stratifikace zahrnul kritérium odpovědi na léčbu bez nutnosti použití složitých a drahých technik detekce MRN. Z dřívějších studií bylo zřejmé, že kombinace morfologického hodnocení odpovědi v periferní krvi ve dni 8 (d8), a v kostní dřeni ve dnech 15 a 33 by mohla takovouto informaci poskytnout. Základními kritérii pro stratifikaci do skupiny nejnižšího rizika (SR) je věk 1-6 let,  $WBC \leq 20 \times 10^9/L$  a dobrá odpověď na prednison. V této skupině se však na rozdíl od protokolu AIEOP LLA-2000/ALL-BFM 2000 nedochází k dezintensifikaci léčby. PPR, nedosažení hematologické remise v d33 a translokace BCR/ABL nebo MLL/AF4 zařazují pacienty do skupiny vysokého rizika. Ostatní pacienti jsou zařazováni do skupiny středního rizika (IR). Na základě nepříznivého morfologického hodnocení kostní dřene v d15 (M3) jsou pacienti ze stávajících rizikových skupin přerazováni do skupin vyššího rizika (viz obr. č. 2).



**Obrázek č. 2** Schéma stratifikace do rizikových skupin u protokolu ALL-IC-BFM 2002

Použité terapeutické bloky se až na výjimky shodují s protokolem AIEOP LLA-2000/ALL-BFM 2000 (viz Příloha P7). Do listopadu 2002 do září 2005 bylo podle protokolu ALL IC-BFM 2002 léčeno 1772 dětí z těchto zemí: Česká republika, Slovensko, Maďarsko, Polsko, Slovinsko, Srbsko, Chorvatsko, Ukrajina, Izrael, Hong Kong, Chile, Argentina, Uruguay a Kuba. V rámci protokolu byly naplánovány dvě vědecké studie. První z nich je studie nazvaná Mini-Mini, která je zaměřena na sledování MRN pomocí FC

a potenciální nahrazení "klasické" metody kvantifikace přestaveb Ig/TCR rychlejší a levnější průtokovou cytometrií. Studie Mini-Risk, která si klade za cíl určovat MRN pomocí kvantifikace Ig/TCR přestaveb v d33 a w12 u pacientů ze skupiny SR, by měla umožnit jednak již zmíněné srovnání s FC, jednak zjištění, zda se rizikové skupiny definované protokolem ALL IC-BFM 2002 překrývají se skupinami definovanými pomocí MRN u protokolu AIEOP LLA-2000/ALL-BFM 2000 (viz obr. č. 3).



**Obrázek č. 3:** Schematické srovnání rozdílů v zařazení do rizikových skupin mezi dvěma paralelními protokoly. Skupina středního rizika (IR) není z důvodu zjednodušení zobrazena.

## Cíle I.

- vyšetření klonálních přestaveb Ig/TCR genů u pacientů s ALL léčených v České republice podle protokolu ALL-IC BFM 2002, preferenčně u skupiny standardního rizika
- navržení specifických primerů na základě přechodových V-(D)-J oblastí imunoreceptorových genů a zavedení minimálně jednoho klonálně-specifického RQ-PCR systému pro každého z vyšetřovaných pacientů
- stanovení MRN v kostní dřeni nebo v periferní krvi v různých časových bodech léčby pomocí těchto RQ-PCR systémů
- stanovení MRN ve stejných časových bodech pomocí RT-RQ-PCR u TEL/AML1 pozitivních pacientů
- *porovnání stratifikace do rizikových skupin na základě MRN s protokolem ALL-BFM 2000 (studie Mini-Risk)*
- *porovnání molekulárně-genetických metod s průtokovou cytometrií v rámci studie Mini-Mini*

## Metodika I.

### *Detekce minimální reziduální nemoci u akutních lymfoblastických leukémií pomocí kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory*

Z výše uvedeného využití v klinických protokolech se může zdát, že tato metoda je již spolehlivě definována a prováděna v podstatě rutinně. To však platí jen pro laboratoře s největší zkušeností, ale i mezi nimi dosud dochází v některých případech k neshodám v interpretaci výsledků. Z těchto důvodů byla založena skupina ESG-MRD-ALL (European Study Group on Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia), která v současnosti sdružuje již 30 evropských i mimoevropských laboratoří z 15 zemí zabývajících se touto problematikou. Její členové se pravidelně setkávají na společných schůzkách, dvakrát ročně je pořádána i kontrola kvality. Na základě společných zkušeností jsou pak zpracovávána metodická doporučení a dále upravována pravidla pro interpretaci výsledků.

#### **Výběr Ig/TCR cílů**

Leukemický klon má uniformní vlastnosti a odráží stádium, ve kterém došlo k maligní transformaci. Pokud přeměna postihne lymfoidní prekurzor, který již zahájil proces V-(D)-J rekombinace, mají všechny jeho dceřinné buňky stejné sekvence přechodových oblastí podjednotek antigenových receptorů, specifické pro leukemický klon daného pacienta. Mezi nejčastěji detekované klonální přestavby u leukémií z B řady patří přestavby těžkých řetězců imunoglobulinů. Pomocí Southern blotu je lze detekovat u více než 95% dětských ALL z B řady. Většinu z nich tvoří kompletní přestavby V-D-J, v přibližně 20% lze nalézt nekompletní D-J přestavby [74]. Některé skupiny doporučují tento cíl spíše vynechávat z důvodu časté oligoklonality a relativní nestability, s možností vzniku následných přestaveb nahrazením původního V segmentu v rámci jednoho klonu [75-77]. Naše zkušenost s těmito cíli je velmi dobrá, protože díky dlouhým přechodovým oblastem umožňují dosahovat vysokou specifitu RQ-PCR. Opatrní při jejich výběru býváme pouze v případě, že nalezneme u jednoho pacienta více než dvě různé přestavby IgH, což ukazuje na oligoklonalitu s nebezpečím detekce pouhé části leukemického klonu. Namísto přestaveb IgH bývá doporučováno použití delečních přestaveb lehkého řetězce kappa (IgK), které detekujeme u přibližně 50% dětských ALL [78]. Tyto přestavby bývají považovány za stabilní, protože představují konečné stádium s nemožností následných přesunů. Tzv. kappa deleting element (KDE) se zde přestavuje buď k segmentům V<sub>K</sub> nebo

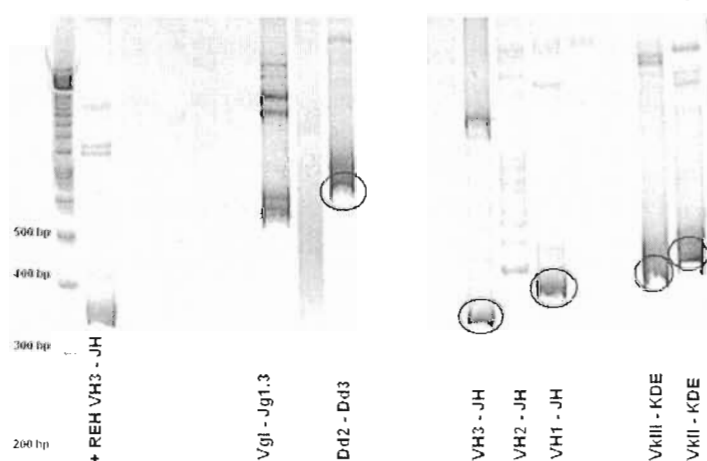
k RSS sekvenci mezi segmenty  $J\kappa$  a  $C\kappa$ , čímž eliminuje za fyziologických okolností neproduktivní přestavbu lehkého řetězce kappa a umožní začátek rekombinace řetězce lambda. I u těchto přestaveb umožňuje přítomnost delecí nukleotidů na koncích genových segmentů spolu s vmezeřenými N nukleotidy navržení specifických primerů, krátká přechodová oblast je však často příčinou malé specifity RQ-PCR systémů. U T-ALL je možno sledovat přestavby T buněčného receptoru gama (TCRG), delta (TCRD), a beta (TCRB), přestavby podjednotky alfa se pro přílišnou složitost tohoto vyšetření rutinně nedetekují. U leukémií z T řady se díky obdobné metodice spolu s přestavbami podjednotek TCR často zároveň vyšetřuje fúzní gen SIL/TALI. Zvláštním fenoménem u leukémií je tzv. liniová promiskuita, která způsobuje přestavování genů pro receptory T lymfocytů u B-ALL (TCRG, TCRB a nekompletní přestavby TCRD) a naopak výskyt nekompletních přestaveb IgH u T-ALL [79]. Tento jev nám u leukémií umožňuje rozšíření spektra sledovaných přestaveb, o jeho fyziologickém významu pojednáváme v druhé části práce.

V roce 1999 publikovala skupina laboratoří sdružených v programu BIOMED-1 standardizovaný postup pro detekci nejčastějších přestaveb imunoreceptorových genů vyskytujících se u ALL (IgH, IgK, TCRG, TCRD) [68, 80]. V roce 2003 byl tento soubor rozšířen skupinou BIOMED-2 na celkem 107 primerů v 18 multiplexních reakcích, jejichž kombinací je již možno teoreticky detekovat všechny klonální B lymfoproliferace, a to i u malignit s vysokým zastoupením somatických hypermutací. Totéž platí díky zahrnutí přestaveb TCR beta (TCRB) i pro klonální T buněčné populace [81]. V naší laboratoři používáme sadu 18 jednotlivých PCR reakcí u malignit z B řady (IgH, IgK, TCRG, nekompletní TCRD) a 12 reakcí u T-ALL (TCRG, kompletní i nekompletní TCRD, SIL/TALI, viz Příloha P6). Teprve když nenajdeme vhodné cíle pomocí tohoto panelu, provádíme detekci nekompletních přestaveb IgH a přestaveb TCRB.

### **Určení klonality**

Po získání PCR produktů je třeba odlišit klony s identickými přechodovými oblastmi od polyklonálních lymfoidních buněk. Při malých rozdílech v délce těchto oblastí nelze na klasickém agarózovém gelu určit, zda jde o směs různě dlouhých produktů nebo o jediný produkt. Na základě zkušeností zúčastněných laboratoří jsou doporučovány dvě techniky: analýza heteroduplexů a GeneScanning (analýza pomocí kapilární elektroforézy). Analýza heteroduplexů se provádí na 6-8% polyakrylamidovém gelu po denaturaci produktů PCR (5 minut při 95°C) následované rychlou renaturací (1 hodina při 4°C). Homoduplexy formované z monoklonálních produktů díky stejné rychlosti migrace vytvoří jediný

proužek, heteroduplexy vzniklé náhodným spojením polyklonálních produktů migrují v gelu pomaleji a vytvoří neostře ohraničený široký pruh ("smear"). Lze také dobře odlišit produkty bi- a oligoklonální [82]. GeneScanning odliší denaturované produkty PCR s velkým rozlišením pouze podle délky. Jde o metodu relativně rychlou a jednoduchou, nevýhodou zůstává potřeba značení PCR primerů fluorochromem a nemožnost odlišit stejně dlouhé, ale sekvenčně odlišné produkty PCR (např. biklonální) [81]. V naší laboratoři používáme k určení klonality analýzu heteroduplexů (viz obr. č. 4). Vhodné monoklonální proužky sterilně vyřízneme, eluujeme ve vodě, reamplifikujeme pomocí stejné sady primerů a získané produkty přečistíme a sekvenujeme na přístroji ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, USA).



**Obrázek č. 4.:** Výsledek analýzy heteroduplexů na polyakrylamidovém gelu z diagnostického vzorku pacienta s ALL. Označeny jsou monoklonální přestavby, které jsme vyřízli z gelu, reamplifikovali a sekvenovali. U produktu PCR na přestavbu VgI-JgI.3 dochází k tvorbě heteroduplexů, je tedy pravděpodobně biklonální nebo bialelická.

### Navržení klonálně specifických primerů a optimalizace RQ-PCR

Získané sekvence přechodových V-(D)-J oblastí lze vyhodnotit pomocí databází volně přístupných na internetu (např. <http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>, <http://www.dnplot.de>). K popisu sekvencí a návržení klonálně-specifických primerů používáme software VECTOR NTI 8 Suite (INFORMAX, Bethesda, MD, USA). Primery navrhujeme tak, aby je bylo možno použít v RQ-PCR s hydrolyzační sondou a reverzním primerem umístěnými v konsensus oblasti dané přestavby [83-87].

Pro tvorbu specifických primerů sice kromě obecných doporučení existují určitá pravidla, v zásadě ale při jejich navrhování záleží především na zkušenosti. Je výhodné vyzkoušet pro každý systém minimálně dva primery zasahující do různých oblastí přechodové V-(D)-J sekvence, protože rozdíly v dosažené senzitivě i specifitě RQ-PCR bývají velké. Pro kvantifikaci používáme v naší laboratoři přístroje PCR ABI PRISM 7700 (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, USA) a iCycler iQ™ (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Pro tvorbu standardní křivky je doporučeno ředit DNA z diagnostického vzorku pacienta do "negativní" DNA získané od zdravých dárců ("buffy coat"). Při měření používáme standardně ředění  $10^{-1}$ - $10^{-5}$ . Aby bylo později možné přesně stanovit hladinu MRN, je třeba stanovit koncentraci DNA diagnostického i všech sledovacích vzorků pomocí kvantifikace kontrolního genu. Většina laboratoří používá k tomuto účelu gen pro albumin [88]. Při optimalizaci RQ-PCR se pomocí změn teploty annealingu, poměru koncentrace primerů a změn koncentrace  $Mg^{2+}$  snažíme dosáhnout co největší senzitivity a specifity systému. Podle pravidel ESG-MRD-ALL je požadován pro každého pacienta nejméně jeden systém s minimální citlivostí  $10^{-4}$ . Je ale vždy lepší sledovat MRN pomocí dvou nezávislých cílů, protože v určitém procentu případů může docházet ke klonální evoluci s následkem ztráty daného cíle a možnou falešnou negativitou [89, 90]. Velkým problémem v případě genů pro imunoreceptory je pozadí zdravých lymfocytů, což platí zvláště pro systémy s menším množstvím rekombinovatelných genových segmentů a tedy s menším počtem pravděpodobně vzniklých kombinací. Jedná se tedy zejména o TCRG, TCRD a delece IgK. V případě krátkých N-segmentů nebo nevhodně navržených primerů může ale k nespecifickému nasedání primerů na DNA "zdravých" lymfocytů dojít v kterémkoli systému. Aby se v co největší míře zabránilo možnosti vzniku falešně pozitivního výsledku, používá se jako negativní kontrola DNA z "buffy coatu" smíchaná od co největšího počtu zdravých dárců (minimální doporučený počet je 5, většina laboratoří včetně naší používá 10), a to podle doporučení nejméně v šesti replikátech. Tím se ale poměrně komplikují definice pojmů senzitivita a specifita a samotná pravidla pro stanovování hladiny MRN. Pro správnou interpretaci výsledků bylo třeba zavést další pojem, tzv. rozmezí kvantifikovatelnosti (quantitative range, QR) [91]. Podrobně jsme všechna stávající doporučení pro metodicky správnou detekci MRN uvedli v přehledném článku. (viz Příloha P1)

Na schůzkách skupiny ESG-MRD-ALL jsou pravidla pro interpretaci výsledků na základě společných zkušeností neustále upřesňována. Pozornost se věnuje i klinickým aplikacím, pro které je daný RQ-PCR systém určen. Při použití této metody k vytipování skupiny

vhodné k dezintenzifikaci léčby (protokol AIEOP LLA-2000/ALL-BFM 2000) je třeba se důsledně vyhnout falešné negativitě. Naopak při snaze odvrátit hrozící relaps onemocnění po HSCT (např. pomocí DLI nebo vysazení imunosuprese) by mohla mít fatální následky případná falešná pozitivita. Proto je pozitivita definována "přísněji" vzhledem k výsledkům negativní DNA u aplikací, které na základě hladin MRN indikují jakýkoli léčebný zásah. Opatrně je třeba přistupovat i k hodnocení dynamiky MRN. Je třeba mít na paměti technické limity metody PCR: je-li rozdíl Ct ("crossing point", cyklus ve kterém fluorescence překročí hodnotu pozadí) mezi duplikáty vzorku pacienta  $\geq 1.0$ , výsledná hodnota koncentrace templátu ve vzorku bude kolísat o 100% a více. Hodnotit tedy dynamiku MRN mezi dvěma vzorky v tomto rozmezí hladin MRN je zavádějící. Za určitých okolností může například změna hladiny MRN z kvantifikovatelné hodnoty do oblasti vyjádřitelné pouze jako "pozitivita" znamenat pouze horší technickou kvalitu konkrétního RQ-PCR experimentu a nikoliv skutečný pokles nádorové zátěže (viz Příloha P1).

#### *Detekce minimální reziduální nemoci pomocí kvantifikace fúzního transkriptu TEL/AML1*

Metodický postup kvantifikace hladiny TEL/AML1 je jednodušší v tom, že jednou zavedený systém RT-RQ-PCR je beze změn použitelný pro všechny pacienty s touto aberací. Na druhé straně vyžaduje izolaci RNA z patientského materiálu a jeho výsledky mohou být teoreticky více ovlivněny kvalitou vzorku, dobou mezi odebráním a zpracováním krve či kostní dřeně a také tím, jak je exprese mRNA TEL/AML1 ovlivněna současně probíhající antileukemickou terapií. Používaný postup detekce MRN touto metodou byl již naší skupinou popsán v článku zabývajícím se klinickým významem hladin transkriptu TEL/AML1 v průběhu léčby [92]. Ve snaze o zhodnocení spolehlivosti této metody ve srovnání s metodou kvantifikace Ig/TCR jsme se dále snažili simulovat skutečnou situaci při transportu a zpracování vzorků. Odebírali jsme ze vzorku TEL/AML1 pozitivní kostní dřeně při pokojové teplotě postupně jednotlivé aliquoty, ve kterých jsme stanovovali expresi transkriptu TEL/AML1 spolu s expresí tzv. "housekeepingového genu", v našem případě beta-2-mikroglobulinu (B2M). Exprese obou genů v prvním dni značně kolísala a po 30 hodinách výrazně poklesla. Normalizovaná exprese TEL/AML1 k B2M ale zůstávala stejná i za 78 hodin po odběru. Podobné výsledky dokládající neměnnost takto normalizované hodnoty jsme získali při simulaci vlivu léčby přidáváním zvyšujících se dávek cytostatika asparaginázy. Doba mezi odběrem a zpracováním vzorků



by např. v rámci České republiky (do 1 dne) neměla bránit kvalitní detekci MRN touto metodou, stejně jako časový bod léčby, v němž se pacient nachází. Pokud však dojde k delší prodlevě ve zpracování vzorku, vzniká nebezpečí falešné negativity MRN díky snížení absolutní hladiny exprese TEL/AML1. Naše výsledky jsme popsali v metodickém článku v časopise *Transfuze a hematologie dnes*. (Příloha P2)

## Výsledky I.

### *Spektrum přestaveb Ig/TCR genů u TEL/AML1 pozitivních a negativních pacientů se liší*

Analyzovali jsme klonální Ig/TCR přestavby v kostní dřeni u celkem 88 nově diagnostikovaných pacientů s imunofenotypem common/preB ALL (z toho 42 TEL/AML1 pozitivních a 46 TEL/AML1 negativních). Použili jsme náš výše zmíněný standardní systém reakcí detekující většinu nejčastějších přestaveb Ig/TCR u dětských ALL. Zatímco počet pacientů s alespoň jednou přestavbou se mezi skupinami nelišil, při analýze celkového počtu přestaveb jsme našli statisticky významný rozdíl (TEL/AML1 pozitivní vs. TEL/AML1 negativní: 4,0 vs. 2,7 přestaveb na pacienta,  $p=0,0006$ ). Zvláště významný byl rozdíl v četnosti delecí přestaveb IgK (pozitivní vs. negativní: 74% vs. 26%,  $p<0,0001$ ), také množství přestaveb TCRG bylo významně vyšší u TEL/AML1 pozitivních pacientů (84% vs. 53%,  $p=0,0055$ ). Navíc se nám podařilo vybrat 36 pacientů z každé skupiny a vytvořit páry TEL/AML1 pozitivních vs. TEL/AML1 negativních pacientů s věkem při diagnóze lišícím se nejvýše o 6 měsíců v rámci každého páru. Analýza odhalila obdobné výsledky s významným rozdílem mezi TEL/AML1 pozitivní vs. TEL/AML1 negativní skupinou v celkové četnosti přestaveb ( $p=0,0044$ ) a frekvencí přestaveb IgK ( $p<0,0001$ ) a TCRG ( $p=0,0128$ ). Větší množství a určitá "vyšší zralost" těchto přestaveb by mohly být dokladem pro to, že vznik TEL/AML1 pozitivní leukémie spadá do zralejšího období vývoje lymfoblastů, což by mohlo také zčásti vysvětlovat dobré léčebné výsledky této skupiny. (Delece IgK patří přestavbám, které v rámci vývoje lymfocytu probíhají relativně pozdě). Nedávné studie zabývající genetickým profilováním leukémií poskytly hrubá data [93] ([http:// www.stjude-research.org/data/ALL1](http://www.stjude-research.org/data/ALL1)), ze kterých jsme pomocí metody popsané naší skupinou [94] spočítali, že mezi geny zvýšeně exprimované v TEL/AML1 pozitivních buňkách patří RAG1 ( $p<0,0001$ ) i RAG2 ( $p=0,0024$  a  $p=0,24$ , podle použité sady sond). Za vyšší množství Ig/TCR přestaveb v těchto buňkách je tedy s velkou pravděpodobností zodpovědná protražovaná aktivita rekombinázového systému způsobená samotným fúzním proteinem TEL/AML1. Tato zjištění jsme publikovali v časopise *Leukemia Research*. (viz Příloha P3)

**Tabulka 1:** Počet nalezených Ig/TCR přestaveb ve skupině TEL/AML1 pozitivních a TEL/AML1 negativních pacientů.

	IGH <sup>a</sup>	IGK <sup>a</sup>	TCRD <sup>a</sup>	TCRG <sup>a</sup>	celkem <sup>b</sup>
TEL/AML1+ (n=47)	79% (37/47)	72% (34/47)	53% (25/47)	81% (38/47)	186 (4.0/pt.)
TEL/AML1- (n=43)	65% (28/43)	26% (11/43)	56% (24/43)	56% (24/43)	116 (2.7/pt.)
p	0.17 <sup>c</sup>	<0.0001 <sup>c</sup>	0.83 <sup>c</sup>	0.0128 <sup>c</sup>	0.0006 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Počet pacientů s nejméně jednou klonální (mono- nebo bi-klonální/alelickou) přestavbou daného genu.

<sup>b</sup> Celkový počet přestaveb ve skupině (počet přestaveb na pacienta).

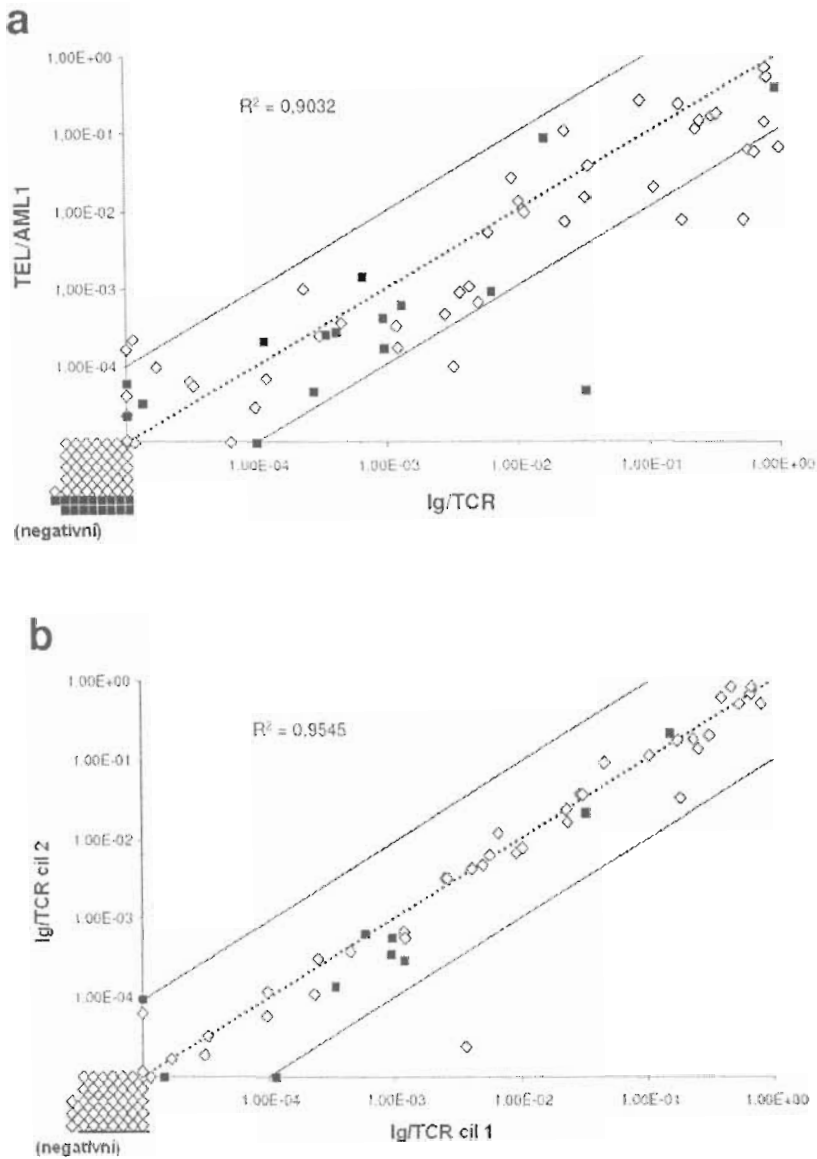
<sup>c</sup> Statistická významnost (p) spočítaná užitím Fisherova exaktního testu.

<sup>d</sup> Statistická signifikance (p) spočítaná pomocí Mann-Whitneyho testu.

#### ***Kvantitativní detekce TEL/AML1 může doplnit klinicky orientované vyšetření minimální reziduální nemoci u dětských pacientů s ALL***

Jak už bylo zmíněno, fúzní transkript TEL/AML1 je lákavým alternativním cílem pro kvantitativní sledování MRN až u 25% pacientů s B-prekursorovou ALL. Všechny dosavadní publikované studie srovnávající detekci MRN pomocí Ig/TCR a TEL/AML1 trpěly technickými nedostatky a nedostatečným počtem vzorků [58-60]. V naší studii jsem porovnal celkem 117 vzorků od 28 TEL/AML1 pozitivních ALL (20 diagnostických vzorků pacientů léčených podle protokolu ALL IC-BFM 2000; 8 relapsů vyšetřovaných v rámci recidivového protokolu ALL-REZ BFM 2002). 25 z 28 pacientů mělo dva nezávislé Ig/TCR cíle; u 48 z těchto celkem 53 cílů jsme dosáhli citlivosti nejméně  $10^{-4}$  a u zbývajících 5 cílů byla citlivost  $5 \times 10^{-4}$ . Přestože korelace mezi kvantitativní detekcí Ig/TCR a TEL/AML1 nedosáhla kvality korelace dvou Ig/TCR cílů ( $R^2=0,903$  vs.  $R^2=0,955$ ), pouze u 8 ze 117 vzorků se hladina MRN lišila o více než jeden řád (viz obr. č. 5). Protože naše skupina už dříve prokázala prognostickou hodnotu kvantitativní detekce TEL/AML1 u nově diagnostikovaných pacientů s ALL v iniciální fázi léčby [92], považujeme TEL/AML1 za vhodný doplňkový cíl pro klinicky využitelnou detekci MRN u této podskupiny pacientů. Na základě našich výsledků dokládáme, že riziko falešně pozitivních výsledků je zanedbatelné. Protože však u malé skupiny (asi 5%) případů kvantitativní detekce TEL/AML1 podhodnotila reziduální nemoc o více než 1 řád,

doporučovali bychom její užití v klinickém rozhodování pouze buď v případě nenalezení žádného vhodného Ig/TCR cíle a nebo jako alternativní možnosti v případě protokolů vyžadujících užití dvou nezávislých cílů. Tyto výsledky jsme publikovali v časopise *Leukemia*. (viz Příloha P4)



**Obrázek č. 5:** Srovnání dvou cílů pro monitoraci MRN.

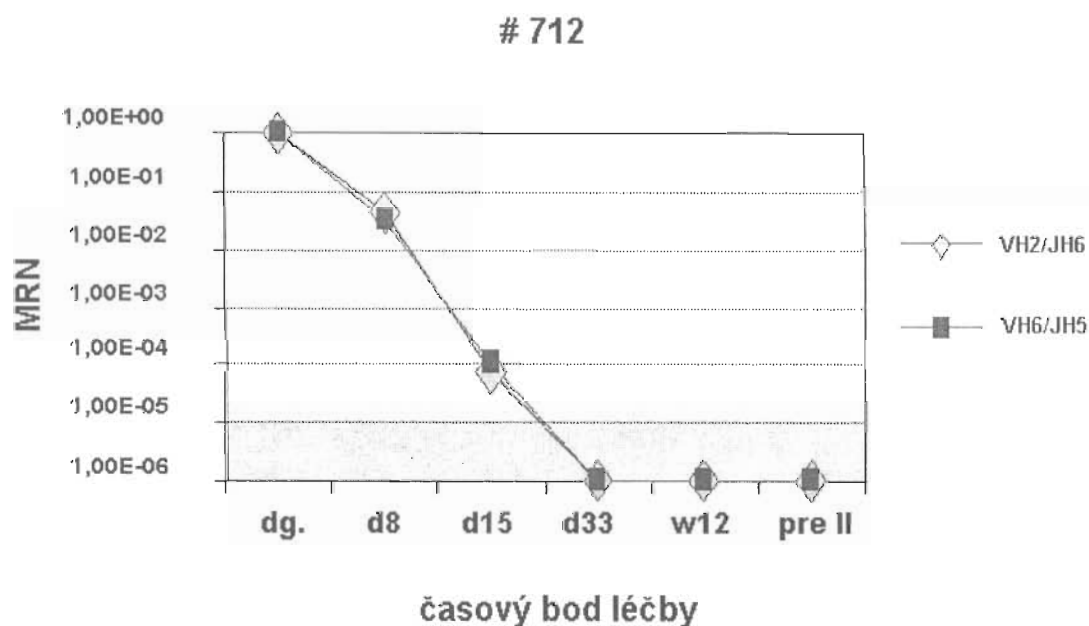
(a) Srovnání přístupu založeného na DNA (Ig/TCR) s přístupem založeným na RNA (TEL/AML1) u 117 vzorků. Oblast mezi přímkami ukazuje teoretickou optimální korelaci v rozmezí jednoho řádu. Pouze 8 vzorků leží mimo tuto oblast

(b) Srovnání dvou nezávislých Ig/TCR cílů u 96 ze 117 vzorků analyzovaných v této studii.

◇ - pacienti v iniciální fázi léčby; ■ - pacienti v léčbě relapsu;  $R^2$  = korelační koeficient

**Znaky nízkého rizika a rychlá morfologická odpověď na iniciační fázi léčby nekorelují s dynamikou minimální reziduální nemoci u dětí s ALL - předběžné výsledky studie Mini-Risk**

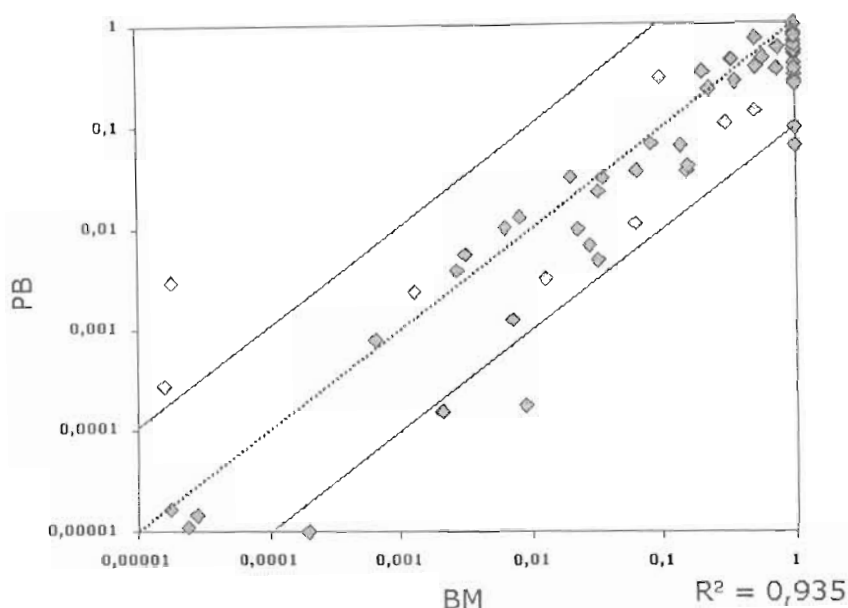
V České republice bylo od počátku používání protokolu ALL-IC BFM 2002 (listopad 2002) do konce roku 2004 léčeno celkem 135 pacientů. Dosud jsme vyšetřili 102 pacienty (45 SR, 44 IR, 13 HR); u 98 (96%) z nich jsme našli alespoň jeden Ig/TCR cíl pro sledování MRN s citlivostí  $10^{-4}$  podle pravidel ESG-MRD-ALL. 65% pacientů lze sledovat pomocí dvou nezávislých Ig/TCR cílů. pomocí zavedených systémů jsme vyšetřili hladinu MRN v kostní dřeni v různých časových bodech: obligatorně d33 a w12, pokud byly k dispozici dále d8, d15, konec léčby, případně jiné (příklad viz.obr.č.6). U pacientů s T-ALL jsme současně vyšetřovali i periferní krev. Celkem jsme dosud vyšetřili 639 vzorků kostní dřene a 78 vzorků periferní krve.



**Obrázek č. 6:** Pokles hladiny reziduální nemoci v průběhu léčby u pacienta ze skupiny standardního rizika. Hodnoty MRN jsou měřeny pomocí kvantifikace dvou nezávislých přestaveb těžkých řetězců imunoglobulinů. Negativní výsledky jsou z důvodu zobrazení v logaritmickém měřítku vyneseny jako 1,00E-06.

Výsledky u pacientů s T-ALL ukázaly, že již dříve popsaná dobrá korelace hladin MRN v periferní krvi a kostní dřeni [95] platí i při léčbě podle jiného protokolu (viz obr. č. 7). Pouze u 2 z 19 vyšetřovaných pacientů této skupiny byla MRN nulová v obou rozhodujících časových bodech, nezávisle na tom, zda byl pacient zařazen do středního

nebo vysokého rizika. Žádný pacient s T-ALL nevyhověl kritériím SR. Dynamika MRN v této skupině dokládá odlišné biologické vlastnosti a odpověď na léčbu u leukémií z T-řady.



**Obrázek č. 7:** Korelace hladin MRN v kostní dřeni (BM) a v periferní krvi (PB) u 78 vzorků pacientů s T-ALL.

U 12 ze 43 pacientů (28%) skupiny nejnižšího (standardního) rizika jsme našli v d33 a/nebo v týdnu 12 detekovatelnou MRN v rozmezí  $6,3 \times 10^{-5}$  -  $1,5 \times 10^{-2}$ . Tito pacienti by se v protokolu ALL-BFM 2000 nemohli kvalifikovat do skupiny SR. Naopak, 14 ze 41 pacientů (34%) skupiny středního rizika dosáhlo negativity MRN v obou daných časových bodech.

Tyto předběžné výsledky dokládají, že rozdíl v praktické stratifikaci pacientů v protokolech ALL IC-BFM 2002 a ALL-BFM 2000 je značný. Ukazuje se, že rychlá morfoloická odpověď na léčbu (BM M1 nebo M2 v den+15) spolu s dalšími známkami nízkého rizika nezbytně nekorrespondují s rychlým poklesem MRN. Je ale třeba zdůraznit, že pro pacienty ze skupiny SR na protokolu ALL IC-BFM 2002 nebyla naplánována dezintensifikace léčby (tak jako pro randomizovanou část SR pacientů na protokolu ALL-BFM 2000). Skutečný význam všech těchto zjištění ukáže až analýza léčebných výsledků obou protokolů. Předběžné výsledky naší studie jsme prezentovali na sjezdu ASH v San Diegu formou posteru [96], kompletní analýzu MRN u pacientů z České republiky, Israele,

Hong-Kongu a Uruguaye připravujeme k publikaci. V současnosti probíhá také vyhodnocování výsledků průtokové cytometrie.

## II. Přestavby genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory u fyziologických krevních buněk

### Liniově nespecifické přestavby genových segmentů v průběhu vývoje lymfocytů

Oba dva lidské RAG geny jsou situovány na chromosomu 11p13 a jsou exprimovány v kostní dřeni během vývoje B-lymfocytů a v thymu během vývoje T-lymfocytů [97-99]. RAG proteiny jsou nezbytné k zahájení rekombinace Ig a TCR lokusů [100]. Regulační mechanismy, které umožňují proces V(D)J rekombinace "zpřístupněním" chromatinu Ig/TCR genů rekombinázovému aparátu, dosud nejsou plně prostudovány. Předpokládá se, že V(D)J rekombinace je v závislosti na enhanceru a promotoru regulována změnami struktury chromatinu, což umožní RAG proteinům přístup ke specifickým RSS sekvencím [101]. Skutečná podstata změn chromatinu nebyla dlouho známa. Studie z roku 1999 ukázala, že "sbalení" RSS sekvencí do nukleosomů inhibuje iniciaci V(D)J rekombinace [102]. To znamená, že součástí procesu rekombinace musí být narušení těchto chromatinových struktur, pravděpodobně hyperacetylací histonů způsobenou histon acetyltransferázovou aktivitou transkripčních koaktivátorů [103]. Tuto teorii potvrdila práce z roku 2000, která použila měření acetylace histonu H3 spolu s transgenním reportérem V(D)J rekombinace [104]. Autoři další studie inkubovali leukemickou buněčnou linii s inhibítorem deacetyláz histonů trichostatinem A a poté prokázali aktivaci rekombinace IGK v leukemických buňkách (bez současného zvýšení exprese RAG genů a aktivity RAG proteinů) [105]. Proces V(D)J rekombinace je tedy přísně regulován pomocí specifické acetylace histonů v závislosti na vývojovém stádiu buňky a na konkrétním regionu DNA nesoucím segmenty příslušných podjednotek [106].

Dlouho používané schéma předpokládalo, že B lymfocyty přestavují pouze geny pro imunoglobuliny a ne pro TCR, a naopak T lymfocyty přestavují pouze geny pro TCR [107]. Zároveň se ale vědělo, že buňky většiny leukémií z B řady toto pravidlo porušují [79]. K nejčastěji přestavovaným TCR genům u B-prekurzorových leukémií patří TCRG (59%) a TCRD (55%), následované TCRB (35%) [79, 108]. Tento fakt vedl k několika hypotézám, které tuto "neadekvátní" regulaci spojovaly s maligním procesem a vysvětlovaly ji buď jako jeho následek [79, 109], a nebo dokonce jako jeho přímou příčinu [109-111]. Usuzovalo se, že přestavby genů pro TCR mohou vznikat již ve velmi časných stádiích vývoje B lymfocytů a že jejich přítomnost může pro buňku znamenat



zástavu diferenciaci a maturace. Následkem toho by buňky s těmito tzv. "cross-lineage" přestavbami TCR (stejně jako prekursorů B lymfocytů bez funkčních přestaveb IGH) podlely apoptóze, pokud by se nestaly maligními. Z toho by se zdálo, že onkogenní transformace postihuje především prekursorové B buňky s přestavbami TCR. Alternativní hypotézou byla možnost, že "cross-lineage" přestavby jsou důsledkem přetrvávající aktivity rekombinázového systému po maligní transformaci a zástavě maturace. To by vysvětlovalo dříve předpokládanou nepřítomnost těchto přestaveb u fyziologických zralých B lymfocytů.

Studie naší skupiny z roku 2003 ale prokázala, že nekompletní přestavby TCRD, které jsou na molekulární úrovni nerozlišitelné od přestaveb přítomných v blastech B-prekursorové leukémie, lze nalézt i v B lymfocytech zdravých dárců [112]. Tyto "cross-lineage" nebo také "liniově promiskuitní" přestavby tedy nejsou specifickou vlastností leukemických buněk, a nabízí se tak jako přirozené markery proběhlé rekombinázové aktivity i pro další typy buněk.

## Cíle II.

- vysortování NK buněk, B1, B2 lymfocytů, naivních a paměťových B lymfocytů, T lymfocytů, monocytů a granulocytů z periferní krve zdravých dárců ("buffy coatu")
- stanovení podílu buněk s přestavěným TCRD a TCRG pomocí RQ-PCR v daných populacích

## Metodika II.

Buňky jsme sortovali pomocí přístrojů FACSVantage a FACSAria. (Přesný popis kombinací protilátek viz Příloha P5).

Pro kvantitativní analýzu celkového množství různých přestaveb TCR v daném vzorku DNA jsme použili systémy využívané k detekci MRN u pacientů s ALL - kombinaci forwardového "screeningového" primeru umístěného ve "V" nebo "D" oblasti s reverzním primerem a fluorescenčně značenou sondou ve specifickém "D" nebo "J" úseku. Forwardový primer VgI byl navržen tak, aby detekoval přestavby všech 8 členů této rodiny. Jako reference pro diluční řady jsme použili buď DNA z leukemické buněčné linie REH nebo diagnostický vzorek pacienta s ALL nesoucí ve většině buněk danou (zde monoklonální) přestavbu. Jako negativní kontrolu jsme použili DNA z buněčných linií Hela, HT29 a BT474, které by měly mít všechny Ig/TCR geny v zárodečné konfiguraci. Přítomnost nekompletních přestaveb TCRD jsme ověřili na polyakrylamidovém gelu a pomocí kapilární elektroforézy. Získané produkty PCR jsme klonovali do E. coli a z jednotlivých kolonií jsme získali různé sekvence nekompletních přestaveb TCRD.

## Výsledky II.

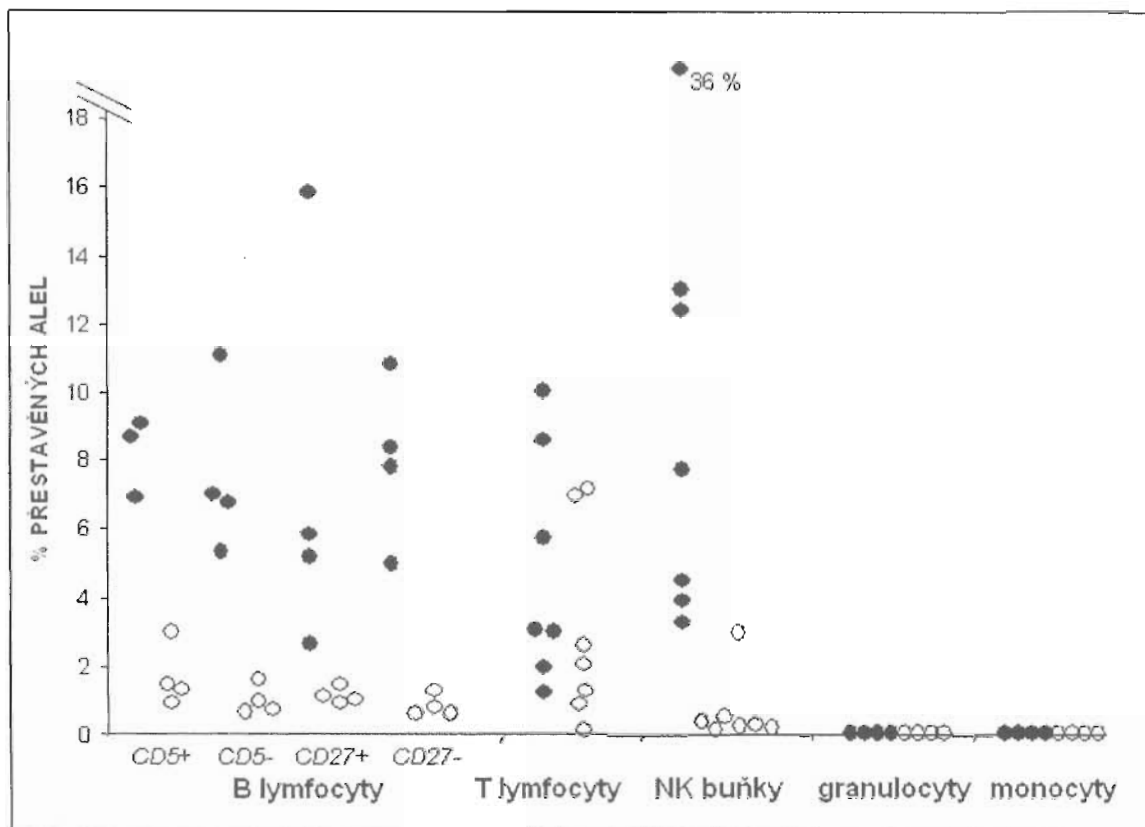
U všech sortovaných vzorků NK buněk jsme pomocí RQ-PCR detekovali nekompletní přestavby TCRD VD2-DD3 u 3-36% alel (viz obr. č. 8). Paralelně sortované vzorky T lymfocytů nesly tuto přestavbu v 1-9 % alel, což při dosažené čistotě sortované populace (viz Příloha P5) vylučuje falešnou pozitivitu způsobenou kontaminací T lymfocyty. V návaznosti na předchozí práci naší skupiny prokazující přítomnost přestaveb VD2-DD3 u B lymfocytů [112] jsme chtěli dále zjistit, zda v některé subpopulaci B lymfocytů toto

zastoupení není výrazně odlišné. Všechny vyšetřované subpopulace - B1 (CD 19<sup>pos</sup> 5<sup>pos</sup>), B2 (CD 19<sup>pos</sup> 5<sup>neg</sup>), naivní (CD19<sup>pos</sup> 27<sup>neg</sup>) a paměťové (CD 19<sup>pos</sup> 27<sup>pos</sup>) lymfocyty - nesly tuto přestavbu v podobném množství jako celková frakce B lymfocytů (5-21%). U vzorků granulocytů a monocytů, stejně jako u buněčných linií Hela, HT29 a BT474 jsme žádný nárůst signálu RQ-PCR nepozorovali.

Získané sekvence přestaveb TCRD v subpopulacích B lymfocytů a NK buňkách se neodlišují v délce vymezených "N" úseků ani v počtu deletovaných nukleotidů od sekvencí těchto přestaveb v T lymfocytech.

Oproti tomu, přestavby TCRG jsme ve všech liniích kromě T lymfocytů našli pouze v nepatrném množství, které může být ve většině případů zdůvodněno kontaminací sortovaných buněk T lymfocyty. Přítomnost přestaveb TCRG v buňkách BCP-ALL tedy na rozdíl od přestaveb TCRD neodráží situaci u fyziologických B lymfocytů.

Během vývoje T lymfocytů se nejprve začíná přestavovat TCRD, následovaný TCRB a TCRG [113]. Teprve po vyštěpení celého lokusu TCRD u TCR $\alpha\beta$  T lymfocytů se může začít přestavovat TCRA. Nalezené nekompletní přestavby TCRD mohly tedy proběhnout již v nezralých progenitorech společných pro B, T a NK řadu ("common lymphoid progenitor", CLP [114]). Některé práce z posledních let zpochybňují existenci CLP a navrhují existenci společných lymfomyeloidních progenitorů (B/myeloidní, T/myeloidní, NK/myeloidní) [115-118]. Naše výsledky podávají důkaz o proběhlé aktivaci rekombinázového systému ve všech lymfoidních buněčných liniích, na rozdíl od buněk myeloidní řady, což nepřímo podporuje teorii o existenci odděleného společného lymfoidního progenitoru. Tuto práci jsme publikovali v časopise *Journal of Immunology*. (viz Příloha P5)



Obrázek č. 8: Procento přestavěných alel  $V\delta 2-D\delta 3$  (●) and  $D\delta 2-D\delta 3$  (○) v sortovaných buňkách.

## Závěr

Dokud nebudou objeveny nové způsoby léčby dětské akutní lymfoblastické leukémie, bude nutné používat léčbu pomocí současných chemoterapeutik. Stávající metody detekce minimální reziduální nemoci umožňují poměrně přesně monitorovat odpověď daného pacienta na léčbu. Proto se moderní léčebné protokoly snaží různým způsobem zařazovat detekci zbytkové choroby do rizikové stratifikace pacientů. Kvantifikace reziduální nemoci pomocí klonálně-specifických přestaveb Ig/TCR genů je přes svou finanční i metodickou náročnost v současnosti jedinou univerzálně použitelnou metodou. I při jejím použití je ale třeba důsledně dodržovat neustále se zpřesňující metodická doporučení, aby nedocházelo k chybám ve stanovení hladin, případně k falešně pozitivním či negativním výsledkům. Použití dalších metod detekce zbytkové choroby, jako je průtoková cytometrie nebo kvantifikace transkriptů fúzních genů, dosud nebylo plně standardizováno a ověřeno na velkých souborech pacientů. Doufáme, že naše výsledky pomohou při zavádění co nejefektivnějšího způsobu stanovování MRN v příštích letech. Moderní protokoly umožní díky těmto metodám definování skupin pacientů, u kterých bude možno snížit terapeutickou zátěž a s tím riziko pozdních následků léčby. Zároveň ale bude možné včas odhalit malou skupinu dětí, která má pomocí stávajících metod minimální šanci na vyléčení. U této skupiny pak bude plně ospravedlněno použití nejmodernějších experimentálních léčebných prostředků.

## Seznam použitých zkratek

ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AIEOP	Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica
AML	akutní myeloidní leukémie
ASH	American Society of Hematology
B2M	beta-2-microglobulin
BCP-ALL	B cell precursor acute lymphoblastic leukemia
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
CLP	common lymphoid progenitor
CLIP	Childhood Leukaemia Investigation Prague
CML	chronická myeloidní leukémie
d33	33. den léčby
EFS	event free survival
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ESG-MRD-ALL	European Study Group on Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia
FC	flow cytometry
GSTM1	glutathion S-transferáza
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation
IgH	immunoglobulin heavy chain
IgK	lehký řetězec imunoglobulinů κ
IgL	immunoglobulin light chain
IgM	imunoglobulin M
IR	intermediate risk (group)
KDE	kappa deleting element
MRN	minimální reziduální nemoc
NR d33	nedosažení remise 33.den léčby ("non-response")
PGR	prednison good response
PPR	prednison poor response
QR	quantitative range
RAG	recombination activating gene
RQ-RT-PCR	real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

RSS	recombination signal sequence
SJCRH	St Jude Children's Research Hospital
SR	standard risk (group)
TCR	T cell receptor
TCRA	$\alpha$ podjednotka T-buněčného receptoru
TCRB	$\beta$ podjednotka T-buněčného receptoru
TCRG	$\gamma$ podjednotka T-buněčného receptoru
TCRD	$\delta$ podjednotka T-buněčného receptoru
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TPMT	thiopurin metyltransferáza
TS	thymidylátsyntetáza
w12	12. týden léčby
WBC	White Blood Cell Count

## Přílohy

**P1.** Froňková E., Trka J.: Detekce minimální reziduální nemoci u akutních lymfoblastických leukémií pomocí kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory: jak se vyhnout špatné interpretaci výsledků. *Transfuze a hematologie dnes* 2005, 3(11):110-115



# Detekce minimální reziduální nemoci u akutních lymfoblastických leukemií pomocí kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory: jak se vyhnout špatné interpretaci výsledků

Froňková E., Trka J.

CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague,

Laboratorní centrum Kliniky dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF Praha

## Souhrn

Hodnocení minimální reziduální nemoci u akutních lymfoblastických leukemií pomocí kvantifikace klonálně specifických přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory je v současné době považováno za standardní laboratorní postup. Výsledky této metody jsou stále častěji využívány v léčebných protokolech pro stratifikaci pacientů do rizikových skupin s různě intenzivní terapií nebo přímo pro volbu konkrétních léčebných postupů. Vzhledem k náročnosti metodiky je třeba dodržovat technická a interpretační kritéria, která umožňují plnou reprodukovatelnost metody a zaručují klinickou validitu výsledků. Autoři shrnují současný pohled na provádění a interpretaci této moderní laboratorní metody a upozorňují na možná rizika plynoucí z nedodržení těchto kritérií.

**Klíčová slova:** akutní lymfoblastická leukemie; RQ-PCR; přestavby Ig/TCR; minimální reziduální nemoc

## Summary

Froňková E., Trka J.: Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using quantification of immunoglobulin and T-cell receptor genes rearrangements. How to avoid misinterpretation of the results

Currently, qualification of clonal immunoglobulin and T-cell receptor rearrangements is considered to be a standard laboratory investigation to evaluate minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Benefit of this method contributes more often to therapeutic protocols that stratify patients into the groups according to the need of differently intensive therapy or particular therapeutic regimen. Regarding complexity of the method, it is necessary to follow technical and interpretative criteria that enable reproducibility and clinical validity of the method. The authors summarize current view on design and interpretation of this modern laboratory method. They also notice possible risks when these criteria were broken.

**Key words:** acute lymphoblastic leukemia, RQ-PCR, Ig/TCR rearrangements, minimal residual disease

*Trans. Hemat. dnes, 11, 2005, No. 3, p. 110–114.*

## Úvod

Zájem o fenomén minimální reziduální nemoci (MRN) u akutních leukemií pochází už ze sedmdesátých let (1). Pionýrské práce z devadesátých let prokázaly přímý klinický význam hodnocení MRN (2–4) a díky tomu se postupně tato metoda (původně pouze výzkumná) začala upravovat pro klinické užití.

V případě akutních lymfoblastických leukemií (ALL) je zatím uznávána jako nejspolehlivější metoda kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory specifických pro daný leukemický klon pomocí PCR v reálném čase. Její výhodou proti průtokové cytometrii (jediné další metodě s téměř univerzálním uplatněním) zůstává stabilita přestaveb na DNA úrovni i v případě měněního se fenotypu leukemické buňky v průběhu terapie a celkově vyšší senzitivita. Na rozdíl od kvantifikace řízcích transkriptů (např. TEL/AML1, BCR/ABL, MLL/AF4) je použitelná pro naprostou většinu pacientů (přibližně 95 %),

navíc není ovlivněna viabilitou analyzovaných buněk. Z těchto důvodů se tato metoda v posledních letech stává ve stále větší míře součástí léčebných protokolů, a to i přes svou značnou časovou, finanční i laboratorní náročnost. Německý protokol ALL-BFM 2000 a italský protokol AIEOP LLA 2000 pro léčbu dětské ALL vychází mimo jiné z retrospektivní analýzy, která ukázala, že hladiny MRN na konci indukční léčby (týden 5) a před začátkem konsolidační léčby (týden 12) dobře odděluje pacienty s nízkým a s vysokým rizikem relapsu (3). Tyto dva protokoly definují rizikové skupiny pro léčbu právě podle prospektivně měřených hladin MRN. Dalším využitím této metody je léčba relapsů dětské ALL. Německý protokol ALL-REZ BFM 2002 při stratifikaci pacientů v největší skupině S2 vychází z práce, která ukázala na negativní prognostický význam vysoké hladiny MRN po indukční fázi léčby relapsu (5). Pacienti s hladinou MRN v tomto časovém bodě vyšší než  $10^{-3}$  jsou indikováni k nepřibuzenské transplantaci hemopoetických progenitorů (HSCT). Evropská skupina *Pre-BMT-MRD-Study-Group*, jejímž členem je i naše laboratoř, prokázala, že

jakákoli hladina MRN před transplantací významně zvyšuje pravděpodobnost relapsu po transplantaci (6). Monitorování hladin MRN po transplantaci umožňuje včasné léčebné zásahy, například v podobě adoptivní imunoterapie (infuze dárceovských lymfocytů - DLI, vysazení imunosuprese) (7).

V naší laboratoři se zabýváme metodou kvantifikace přestavěb imunoreceptorových genů od roku 2001, v současné době ji rutinně používáme u pacientů s relapsem léčených podle protokolu ALL-REZ BFM 2002 a dále u všech pacientů podstupujících HSCT. Pacienti se záchytem ALL jsou v České Republice léčeni podle protokolu ALL IC-BFM 2002, který pro stratifikaci pacientů do rizikových skupin nepoužívá kvantitativní detekci MRN. Tu provádíme pouze jako výzkumnou součást protokolu, abychom zjistili, zda jiná kritéria pro stratifikaci (věk, odpověď na prednison, leukocytóza, pokles blastů ve dřeni podle morfologických kritérií ve dnech 15 a 33 léčby) mohou korespondovat s poklesem MRN (8).

Z výše uvedeného využití v klinických protokolech se může zdát, že se jedná o metodu rutinní a spolehlivé definovanou. To však platí jen pro laboratoře s největší zkušeností, ale i mezi nimi dochází dosud v některých případech k neshodám v interpretaci výsledků. Z těchto důvodů byla založena skupina *ESG-MRD-ALL* (European Study Group on Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia), která sdružuje 23 evropských a nyní i mimoevropských laboratoří, zabývajících se touto problematikou. Její členové se pravidelně setkávají na společných schůzkách, dvakrát ročně je pořádána i kontrola kvality. Na základě společných zkušeností jsou pak zpracovávána metodická doporučení a jsou dále upravována pravidla pro interpretaci výsledků. Otevřenými tématy stále zůstává výběr vhodných Ig/TCR cílů a jejich stabilita, postup v případech oligoklonálních přestavěb a především interpretace výsledků s vyloučením možnosti falešné pozitivita a negativita.

### Výběr cílů

V roce 1999 publikovala skupina laboratoří sdružených v programu BIOMED-1 standardizovaný postup pro detekci nejčastějších přestavěb imunoreceptorových genů vyskytujících se u ALL. Jedná se o kompletní V-(D)-J přestavby těžkých řetězců imunoglobulinů (IgH) (9), klonálně specifické delece lehkého řetězce kapa (Igk) a přestavby T buněčného receptoru gama (TCR $\gamma$ ) a delta (TCR $\delta$ ) (10). V roce 2003 byl tento soubor rozšířen skupinou BIOMED-2 na celkem 107 primerů v 18 multiplexních reakcích, jejichž kombinací je již možno teoreticky detekovat všechny klonální B lymfoproliferační a to i u malignit s vysokým zastoupením somatických hypermutací. Totéž platí díky zahrnutí přestavěb TCR $\beta$  i pro klonální T buněčnou populaci (11).

### Určení klonality

Po získání PCR produktů je třeba odlišit klony s identickými přechodovými oblastmi od polyklonálních lymfoidních buněk. Při malých rozdílech v délce těchto

oblastí nelze na klasickém agarózovém gelu určit, zda jde o směs různých dlouhých produktů nebo o jediný produkt. Na základě zkušeností zúčastněných laboratoří jsou doporučovány dvě techniky: analýza heteroduplexů a GeneScanning (analýza pomocí kapilární elektroforézy). Analýza heteroduplexů se provádí na 6-8% polyakrylamidovém gelu po denaturaci produktů PCR (5 minut při 95 °C) následované rychlou renaturací (1 hodina při 4 °C). Homoduplexy formované z monoklonálních produktů díky stejné rychlosti migrace vytvoří jediný proužek, heteroduplexy vzniklé náhodným spojením polyklonálních produktů migrují v gelu pomaleji a vytvoří neostře ohraničený široký pruh („smear“). Lze také dobře odlišit produkty bi- a oligoklonální. GeneScanning odliší denaturované produkty PCR s velkým rozlišením pouze podle délky. Jde o metodu relativně rychlou a jednoduchou, nevýhodou zůstává potřeba značení PCR primerů fluorochromem a nemožnost odlišit stejně dlouhé, ale sekvenčně odlišné produkty PCR (např. biklonální). V naší laboratoři používáme k určení klonality analýzu heteroduplexů. Vhodné monoklonální proužky sterilně vyřízneme, eluujeme ve vodě, reamplifikujeme pomocí stejné sady primerů a získané produkty přečistíme a sekvenujeme (12).

### Navržení klonálně specifických primerů a optimalizace RQ-PCR

Získané sekvence přechodových V-(D)-J oblastí lze vyhodnotit pomocí databází volně přístupných na internetu například:

<http://imgt.cines.fr/textes/IMGTRepertoire>.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>,

<http://www.dnapiot.de>.

K popisu sekvencí a návrhu klonálně specifických primerů používáme software VECTOR NTI 8 Suite\* (INFORMAX, Bethesda, MD, USA). Primery navrhujeme tak, aby je bylo možno použít v RQ-PCR s hydrolyzační sondou a reverzním primerem umístěnými v konsensus oblastí dané přestavby (13-17).

Pro tvorbu specifických primerů sice kromě obecných doporučení existují určitá pravidla, v zásadě ale při jejich navrhování záleží především na zkušenosti. Je výhodné vyzkoušet pro každý systém minimálně dva, protože rozdíly v dosažené senzitivitě i specifitě RQ-PCR bývají velké. Pro kvantifikaci používáme v naší laboratoři přístroje PCR ABI PRISM 7700 (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, USA) a iCycler iQ™ (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Pro tvorbu standardní křivky je doporučeno ředit DNA z diagnostického vzorku pacienta do „negativní“ DNA získané od zdravých dárců („buffy coat“). Při měření používáme standardně ředění 10<sup>-1</sup>-10<sup>-5</sup>. Aby bylo později možné přesně stanovit hladinu MRN, je třeba stanovit koncentraci DNA diagnostického i všech sledovacích vzorků pomocí kvantifikace kontrolního genu. Většina laboratoří používá k tomuto účelu gen pro albumin (18). Při optimalizaci RQ-PCR se pomocí změny annealingové teploty, poměru koncentrace pri-

merů a změn koncentrace  $Mg^{2+}$  snažíme dosáhnout co největší senzitivity a specifity systému. Podle pravidel ESG-MRD-ALL je požadován pro každého pacienta nejméně jeden systém s minimální citlivostí  $10^{-4}$ . Definice pojmů senzitivity a specifity je poměrně složitá:

#### Slovníček

Ct = hodnota Ct stoupá s klesající koncentrací templátu ve vzorku

Ředění = se zvyšujícím se ředěním klesá koncentrace templátu ve vzorku

#### Kritéria pro senzitivitu RQ-PCR (19)

(upraveno na poslední schůzce skupiny ESG-MRD-ALL v červnu 2004)

Senzitivitou PCR rozumíme nejvyšší ředění, které:

- se specificky amplifikuje (dobré amplifikační křivky),
- má nejméně jeden vzorek z replikátu pozitivní; rozdíl Ct („threshold cycle“) replikátů nerozhoduje,
- má nejvyšší Ct replikátů v rozmezí 20 cyklů od Ct neředěného vzorku nebo
- má nejvyšší Ct replikátů v rozmezí 20 cyklů od interceptu standardní křivky.

Pro potřeby přesné interpretace výsledků byl nově definován pojem rozmezí kvantifikovatelnosti („quantitative range“, QR). Všechny pozitivní hodnoty pod touto hodnotou by měly být uváděny pouze jako „pozitivní“, bez uvedení číselné hodnoty výsledku.

#### Kritéria pro rozmezí kvantifikovatelnosti RQ-PCR

Rozmezím kvantifikovatelnosti nazýváme nejnižší ředění, které:

- se specificky amplifikuje (dobré amplifikační křivky)
- rozdíl Ct replikátů  $\leq 1,5$
- jeho průměrná hodnota Ct je o 3,0-4,0 cykly větší než předchozí 10x nižší ředění (nebo o 0,5-1,5 cyklu vyšší než předchozí 5x nižší ředění)
- standardní křivka se zahrnutím tohoto ředění má sklon („slope“) mezi -3,1 a -3,9 a korelační koeficient  $\geq 0,98$ .

#### Kritéria pro specifitu RQ-PCR

Velkým problémem v případě genů pro imunoreceptory je pozadí zdravých lymfocytů, což platí zvláště pro systémy s menším množstvím rekombinovatelných genových segmentů a tedy s menším počtem pravděpodobně vzniklých kombinací. Jedná se tedy zejména o TCR $\gamma$ , TCR $\delta$  a delece Ig $\kappa$ . V případě krátkých N-segmentů nebo nevhodně navržených primerů může ale k nespecifickému nasedání primerů na DNA „zdravých“ lymfocytů dojít v kterémkoli systému. Aby se v co největší míře zabránilo možnosti vzniku falešně pozitivního výsledku, používá se jako negativní kontrola DNA z „buffy coatu“ smíchaná od co největšího počtu zdravých dárců (minimální doporučený počet je 5, většina

laboratoří včetně naší používá 10), a to podle doporučení nejméně v šesti replikátech. Tím přibývají k výše uvedeným pravidlům pro interpretaci další.

Rozmezí kvantifikovatelnosti tedy musí splňovat všechny předešlé podmínky a zároveň:

- jeho průměrná hodnota Ct musí být nejméně o 3 cykly nižší než nejnižší Ct hodnota pozadí. Senzitivitou pak nazýváme takovou hodnotu ředění, která splňuje všechny předešlé podmínky a zároveň:
- nejméně jedna hodnota Ct je o nejméně jeden cyklus nižší než nejnižší Ct hodnota pozadí.

#### Analýza MRN v daném vzorku

Kritéria pro interpretaci výsledků se liší v závislosti na protokolu, společná zůstávají tato základní pravidla:

Hodnotu MRN ve vzorku lze vyjádřit numericky pomocí standardní křivky s korekcí podle kontrolního genu, jestliže:

- průměrná Ct hodnota replikátů  $\leq$  nejvyšší Ct rozmezí kvantifikovatelnosti a  $\Delta$  Ct replikátů vzorku je  $\leq 1,5$ . Pokud je průměrná Ct hodnota replikátů  $\geq$  nejvyšší Ct rozmezí kvantifikovatelnosti, hodnotí se vzorek pouze jako „pozitivní“.

Vzorek je dále pokládán za pozitivní, pokud:

- Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je v rozmezí 4 cyklů od senzitivity systému a
- Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je o  $\geq 1,0$  nižší než nejnižší Ct pozadí.

Toto poslední pravidlo patří vzhledem k možnosti vzniku falešné positivity k nejspornějším a nejdiskutovanějším, proto bylo na schůzce ESG-MRD-ALL v roce 2004 dále rozšířeno s ohledem na to, pro jaké klinické aplikace bude výsledek použit.

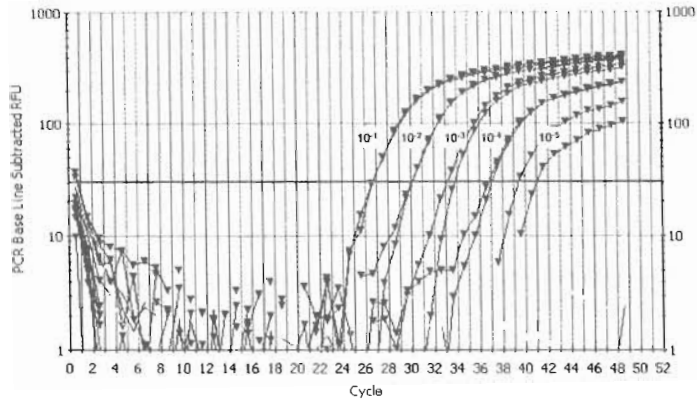
Při použití pro aplikace, kde je třeba se vyhnout falešné negativitě, například z důvodů redukce léčby MRN negativních pacientů, je vzorek pokládán za pozitivní, pokud:

- Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je o  $\geq 1,0$  nižší než nejnižší Ct pozadí.
- Při použití pro aplikace, kde je třeba se vyhnout falešné pozitivitě, například z důvodu nasazení DLI po HSCT, je vzorek pokládán za pozitivní, pokud:
- Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je o  $\geq 3,0$  nižší než nejnižší Ct pozadí.

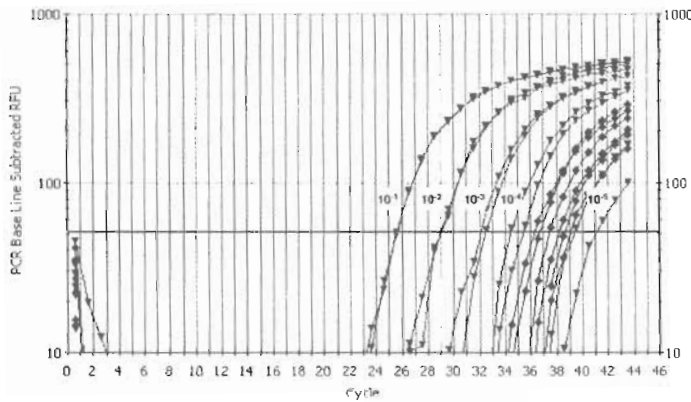
## Diskuse

Detekce MRN u akutních leukemií už v tuto chvíli prokazuje svou klinickou hodnotu. Zejména v léčebných protokolech pro terapii dětských ALL jsou kritéria MRN použita jako stratifikační (např. ALL-BFM 2000 a AIEOP LLA 2000) nebo jako přímo rozhodující pro léčebnou strategii (protokol ALL-REZ BFM 2002 pro léčbu relapsů dětské ALL). Důležitou úlohu hraje stanovení MRN také v regulaci potransplantační péče.

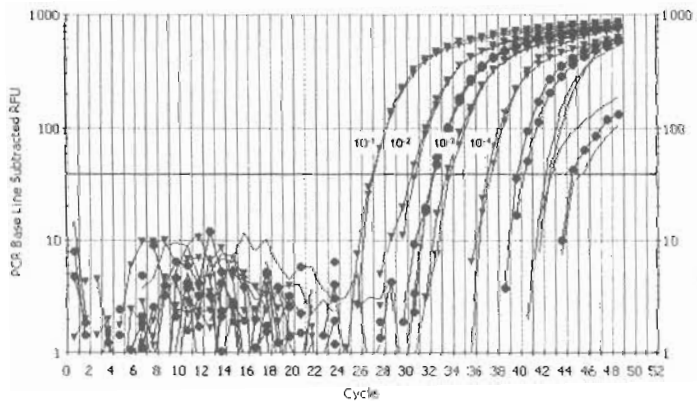
Rozhodnutí o významném zásahu do dalšího průběhu, jakým je například indikace HSCT v léčbě relapsu dětské



**Obr. 1.** Amplifikace klonálně specifické delecce Igκ u pacienta s ALL. Senzitivita systému je  $10^{-5}$  (poslední ředění, které se amplifikuje), rozmezí kvantifikovatelnosti je  $10^{-4}$ , protože  $\Delta Ct$  replikátů u ředění  $10^{-5}$  je větší než 1,5.



**Obr. 2.** Amplifikace klonálně specifické přestavby IGH u pacienta s ALL. Senzitivita systému je  $10^{-4}$ , protože jeden vzorek z duplikátu má Ct o více než 1 cyklus nižší než je nejnižší Ct „buffy coatu“ (zelené křivky). Rozmezí kvantifikovatelnosti je ale pouze  $10^{-3}$ . V případě tohoto systému je vhodné přidat ředění  $5 \times 10^{-4}$ . Pokud by jeho průměrné Ct vyšlo o více než 3 cykly před „buffy coatem“, zvýší se QR na  $5 \times 10^{-4}$ .



**Obr. 3.** Amplifikace klonálně specifické přestavby TCRδ u pacienta s ALL. Senzitivita i rozmezí kvantifikovatelnosti systému je  $10^{-4}$ . Měřeny byly dva vzorky pacienta v triplicátu (modré křivky). Hodnotu MRN ve vzorku č. 1 lze po úpravě podle kontrolního genu vyjádřit číselně jako posměr k počtu blastů v diagnóze. Vzorek č. 2 by byl označen jako „pozitivní“, pokud by byl použit při rozhodování o zařazení do nízké skupiny (například v protokolu ALL-BFM 2000). Na základě jeho výsledku by se ale nemělo terapeuticky zasáhnout, pokud by se rozhodovalo např. o aplikaci DLI po transplantaci: nejnižší Ct pozadí (zelené křivky) není o více než 3 cykly vyšší než nejnižší Ct vzorku.

ALL vyžaduje spolehlivou metodiku měření hladin MRN a zejména správnou interpretaci těchto výsledků. Právě v posledně zmíněném protokolu je rozhodující úroveň MRN (stanovenou arbitrážně na základě retrospektivní analýzy rozsáhlého souboru pacientů) (5) hladina  $10^{-3}$ . Teoreticky tak pacient s typem relapsu S2

a s hladinou MRN v daném časovém bodu protokolu rovnou  $1,1 \times 10^{-3}$  podstoupí HSCT, zatímco pacient s hladinou rovnou  $9,9 \times 10^{-3}$  bude pokračovat pouze v chemoterapii. Přesná kvantifikace je tedy naprostou nutností. V případě protokolů ALL-BFM 2000 a AIEOP LLA 2000, kde se přeřazení z nízké rizikové do středně riziko-

vé větve protokolu může rozhodnout jakákoli detekovaná pozitivita, je třeba ji zase přesně oddělit od falešné positivity pozadí.

Přesné a detailní pokyny, přijaté skupinou ESG-MRD-ALL, přesně definují jak senzitivitu, tak specifitu daného systému RQ-PCR. Nemůže se tedy stát, že se hladina MRN určí podle technicky nedokonalého, špatně optimalizovaného systému - pravidla pro sklon a chybu standardní křivky to vylučují. Použití hexaplikátu negativní kontroly, kterou je vždy polyklonální DNA z normálních lymfocytů a nikoli pouze voda, zase oddělí falešně pozitivní výsledky v reziduálních vzorcích. Protože pouhý mechanistický pohled na tato kritéria nemusí vždy vyhovovat realitě, byla kritéria upravena pro situace, kdy je třeba se vyhnout falešně negativitě nebo falešně pozitivitě (viz výše).

Opatrně a koncizně je třeba přistupovat i k hodnocení dynamiky MRN. Je třeba mít na paměti technické limity metody PCR: je-li rozdíl Ct mezi duplikáty vzorku pacienta  $\geq 1,0$ , výsledná hodnota koncentrace templátu ve vzorku bude kolísat o 100 % a více. Hodnotit tedy dynamiku MRN mezi dvěma vzorky v tomto rozmezí hladin MRN je zavádějící.

Obtížněji definovatelným, ale důležitým prvkem hodnocení hladin MRN, je komunikace mezi pracovníky laboratoře a lékaři/kliniky. V ideálním případě by vyšetření až do fáze stanovení hladiny MRN ve vzorku mělo probíhat bez znalosti současného klinického stavu pacienta. Toto pravidlo není často možno dodržet, protože se na laboratorní práci lékaři přímo podílejí. To je naopak výhodou při interpretaci výsledků sledování. Intenzivní kontakt laboratoř-klinika a přesné pochopení termínů, které se objevují na písemně vydávaných protokolech o vyšetření, jsou nezbytné. Jen tak je možno spolehlivě interpretovat např. fakt, že za určitých okolností nemusí „pokles“ hladiny MRN z kvantifikovatelných hodnot do oblastí „pozitivita“ znamenat skutečnou změnu v dynamice MRN, ale pouze horší technickou kvalitu konkrétního RQ-PCR experimentu.

Pracoviště, které hodlá využívat tuto metodiku pro klinicky relevantní stanovení hladin MRN (tedy k indikaci léčebných zásahů), by mělo mít jistotu, že zavedené postupy bezchybně fungují. Mezinárodní kontrola kvality skupiny ESG-MRD-ALL, která vyžaduje analýzu klonality, detailní rozbor zadaných sekvencí přestaveb a určení hladiny MRN slepých vzorků a probíhá dvakrát ročně od roku 2001, tuto záruku poskytuje.

Kvantitativní detekce klonálně specifických přestaveb Ig/TCR je tedy velmi významný a účinný nástroj v hodnocení odpovědi na léčbu u pacientů s ALL. Při dodržení všech technických a interpretačních pravidel může pomoci pacientům snížit jak riziko relapsu, tak i rizika spojená s přeléčením („over-treatment“) jejich nemoci.

## Literatura

1. Gutterman JU, Mavligit G, Burgess MA, et al. Immunodiagnosis of acute leukemia: detection of residual disease. *J Natl Cancer Inst* 1974; 53: 389-92.
2. Brisco J, Hughes E, Neoh SH, et al. Relationship between minimal residual disease and outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996; 87: 5251-6.
3. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998; 352: 1731-8.
4. Goulden NJ, Knechtli CJ, Garland RJ, et al. Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1998; 100: 235-44.
5. Eckert C, Biondi A, Seeger K, et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2001; 358: 1239-41.
6. Krejci O, Van der Velden V, Bader P, et al. Level of Minimal Residual Disease Prior to Haematopoietic Transplantation Predicts Prognosis in Paediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukaemia: A Report of the pre BMT MRD Study Group. *Lett. Bone Marrow Transplantation* 2003; 37: 849-51.
7. Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, 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.
8. Fronkova E, Reznickova L, Muzikova K, et al. Minimal Residual Disease Identifies Differences between the Risk Group Defined by the ALL-IC-BFM 2002 and the ALL-BFM 2000 Protocols. Poster, 46th ASH Meeting, San Diego, California. *Blood* 2004; 104: 1085.
9. Szczepanski T, Pongers Willemse MJ, Langerak AW, et al. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. *Blood* 1999; 93: 4079-85.
10. Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TALI deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 110-18.
11. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17: 2257-2317.
12. Madžo J, Mužíková K, Fronková E, et al. Je fúzní gen TEL/AML1 vhodným znakem pro sledování reziduální nemoci u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií? *Transfúze a hematologie dnes*. 2004;10: 137-142.
13. Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, et al. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 1426-1435.
14. van der Velden VH, Willemse MJ, van der Schoot CE, Hahlen K, van Wering ER, van Dongen JJ. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia* 2002; 16: 928-36.
15. van der Velden VH, Wijkhuijs JM, Jacobs DC, van Wering ER, van Dongen JJ. T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lym-

- phoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. *Leukemia* 2002; 16: 1372-80.
16. Langerak AW, Wolvers-Tettero H, van Gastel-Mol EJ, Oud ME, van Dongen JJ. Basic helix-loop-helix proteins E2A and HEB induce immature T-cell receptor rearrangements in non-lymphoid cells. *Blood* 2001; 98: 2456-2465.
  17. van der Velden VH, Bruggemann M, Hoogeveen PG, et al. TCRB gene rearrangements in childhood and adult precursor-B-ALL: frequency, applicability as MRD-PCR target, and stability between diagnosis and relapse. *Leukemia* 2004; 18: 1971-80.
  18. Pongers Willemse MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia* 1998; 12: 2006-14.
  19. van Der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, Van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17: 1013-34.

Došlo do redakce: 18. 3. 2005  
Přijato: 10. 7. 2005

Korespondující autor:  
Doc. MUDr. J. Trka, Ph.D.  
jan.trka@lfmotol.cuni.cz

#### Podpora

Práce byla podpořena grantem IGA MZ 6929, výzkumným záměrem MŠMT MSM0021620813 a VZ MZ 00064203.

MUDr. E. Froňková  
CLIP – Childhood Leukaemia Investigation Prague  
Laboratorní centrum  
Kliniky dětské hematologie a onkologie  
UK 2, LF Praha  
V Úvalu 84  
150 06 Praha 5

## PSYCHOFARMAKA V MEDICÍNĚ

Jaroslav Bouček, Vladimír Pidrman

Monografie určená pro postgraduální vzdělávání informuje lékařskou obec o současném stavu vývoje a dostupnosti psychofarmak u nás, o jejich léčebném využití v psychiatrii a v ostatních lékařských oborech. Je určena psychiatrům, klinickým psychologům, praktickým lékařům, internistům, neurologům a lékařům dalších odborností.

Vydala Grada Publishing v roce 2005, ISBN 80-247-1136-2, B5, šitá vazba, 288 stran, cena 399 Kč.

Publikaci můžete objednat na adrese: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz

Jaroslav Bouček, Vladimír Pidrman

### PSYCHOFARMAKA V MEDICÍNĚ



**P2.** Madžo J., Mužíková K., Froňková E., Šrámková L., Zemanová L., Zuna J., Starý J., Trka J.: Je fúzní gen TEL/AML1 vhodným znakem pro sledování minimální reziduální nemoci u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií? *Transfúze a hematologie dnes* 2004, 4(10):137-142

## Je fúzní gen TEL/AML1 vhodným znakem pro sledování reziduální nemoci u dětí s akutní lymfoblastickou leukemií?

Madžo J.<sup>1,2</sup>, Mužíková K.<sup>1</sup>, Froňková E.<sup>1</sup>, Šrámková L.<sup>1</sup>, Zemanová L.<sup>1</sup>, Zuna J.<sup>1</sup>, Starý J.<sup>3</sup>, Trka J.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> CLIP – Childhood Leukaemia Investigation Prague, Klinika dětské hematologie a onkologie, <sup>2</sup> Ústav fyziologie, UK 2. LF, Praha, <sup>3</sup> Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF a FN v Motole, Praha, \* korespondující autor

### Souhrn

Za standardní postup při sledování minimální reziduální nemoci u dětských akutních lymfoblastických leukemií se v současné době považuje kvantitativní detekce klonálně specifických přestavb imunoreceptorových genů (receptorů T buněk a imunoglobulinů). Optimalizace detekce dvou výše uvedených nezávislých přestavb s citlivostí alespoň jedné maligní buňky mezi desetitisícem normálních buněk se však nezdaří u všech pacientů. Fúzní gen TEL/AML1 je nejčastější chromozomální aberací u dětských akutních lymfoblastických leukemií a nalézá se u více než 20 % pacientů. Srovnání hladin reziduální nemoci paralelně vyšetřených pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce na transkript TEL/AML1 a na přestavby imunoreceptorových genů ve 41 vzorku ukázalo celkově velmi dobrou korelaci s pouhými dvěma výjimkami ( $R^2 = 0,847$ ). Kvantitativní detekce transkriptu TEL/AML1 tedy může posloužit jako alternativní cíl pro sledování MRN u pacientů s TEL/AML1 pozitivní leukemií s nedostatkem citlivých standardních znaků – přestavb imunoreceptorových genů. Mezi 52 pacienty s vyšetřenou hladinou reziduální nemoci na konci indukce detekovatelné TEL/AML1 pozitivní buňky jednoznačně oddělily pacienty se špatnou prognózou (přežití bez relapsu = 50 %; 7 relapsů ze 14 dětí) od dětí s výbornou šancí na přežití (přežití bez relapsu = 92 %; 3 děti z 38;  $p = 0,0007$ ). Detekovatelné TEL/AML1 pozitivní buňky na konci indukce tedy předpovídají s vysokou pravděpodobností relaps, i když se vyskytne až 57 měsíců od diagnózy.

**Klíčová slova:** dětská akutní lymfoblastická leukemie, TEL/AML1, kvantitativní PCR, minimální reziduální nemoc

### Summary

Madžo J., Mužíková K., Froňková E., Šrámková L., Zemanová L., Zuna J., Starý J., Trka J.: Is TEL/AML1 fusion gene appropriate marker for minimal residual disease monitoring in children with acute lymphoblastic leukaemia?

Currently the quantitative detection of clonal-specific rearrangements of immunoreceptor genes (T-cell receptors and immunoglobulins) is considered to be the standard approach in minimal residual disease (MRD) monitoring in childhood acute lymphoblastic leukaemia. However, optimisation of two independent rearrangements with sensitivity of at least one malignant cell among 10 000 normal cells is not successful in all patients. TEL/AML1 fusion gene is the most common chromosomal aberration in childhood acute lymphoblastic leukaemia and is present in more than 20% of patients. Comparison of residual disease levels examined simultaneously by quantitative polymerase chain reaction on TEL/AML1 transcript and on immunoreceptor gene rearrangements in 41 samples showed very good overall correlation with only two exceptions ( $R^2=0,847$ ). Thus, quantitative detection of TEL/AML1 transcript can serve as an alternative target for MRD monitoring in patients with TEL/AML1-positive leukaemia and a lack of sensitive standard markers – immunoreceptor gene rearrangements. Among 52 patients with residual disease level tested at the end of induction therapy, the presence of TEL/AML1-positive cells reliably separated patients with poor prognosis (relapse free survival = 50%, 7 relapses in 14 patients) from children with excellent outcome (relapse free survival = 92%, 3 relapses in 38 patients,  $p=0,0007$ ). Detectable TEL/AML1-positive cells at the end of induction therapy thus predict relapse with a high probability even though the relapse occurs 57 months from the original diagnosis.

**Key words:** childhood acute lymphoblastic leukemia, TEL/AML1, quantitative PCR, minimal residual disease



## Úvod

Minimální reziduální nemoc (MRN) je definována jako subklinická úroveň leukemie, kdy v průběhu terapie již maligní blasty nejsou běžnými cytologickými metodami detekovatelné a jejich zastoupení v kostní dřeni se pohybuje pod 5 %. V této situaci hovoříme o kompletní hematologické remisi, avšak pacient může mít i za tohoto stavu v těle až  $10^{10}$  maligních elementů (1). Právě tyto přežívající nádorové buňky, které léčbě unikly, mohou později způsobit relaps leukemie. Na velkých souborech pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) bylo dokázáno, že rychlost „čištění“ kostní dřene od maligních buněk je nezávislým prognostickým ukazatelem (2, 3). Tento fakt vedl k tomu, že v řadě léčebných protokolů (mimo jiné i v protokolech největší evropské skupiny BFM) je dnes vyšetření MRN jedním ze základních kritérií pro stratifikaci pacientů do rizikových skupin. Konkrétně v protokolech BFM jsou po iniciačním rozdělení do skupin se standardním, středním a vysokým rizikem (podle věku, leukocytózy a přítomnosti chromozomálních aberací) pacienti s detekovatelnými hladinami MRN ( $\geq 10^{-4}$ , tj. nejméně jedna leukemická buňka mezi  $10^4$  mononukleárními buňkami kostní dřene a/nebo periferní krve) přeřazováni podle přesně stanovených kritérií do skupiny s vyšším rizikem relapsu a tedy intenzivnější terapií.

Nejčastěji používaná metodika ke sledování MRN využívá kvantitativní detekce klonálně-specifických přestaveb genů pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TCR) na DNA úrovni. Z důvodu možných změn přestaveb v průběhu terapie vyžadují kritéria vyšetřování pacientů současné monitorování alespoň dvou různých přestaveb Ig/TCR s citlivostí  $\geq 10^{-4}$ . Současné moderní způsoby kvantifikace MRN jsou založeny na metodě kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RQ-PCR).

Alternativním klonálně-specifickým cílem pro sledování MRN u dětských ALL jsou fúzní geny vzniklé z chromozomálních translokací. Nejvýznamnější z tohoto pohledu je zřejmě fúzní gen TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) vznikající jako produkt translokace t(12;21)(p13;q22), neboť se nachází až u čtvrtiny všech dětských ALL (4). Jeho detekce je založena na kvantifikaci mRNA, nemonitoruje tedy přímo množství leukemických buněk, ale hladinu exprese genu. Jejím základem jsou rovněž PCR techniky, avšak pro nutnost přepisu informace z RNA hovoříme o kvantitativní reverzně-transkriptázové PCR v reálném čase (RQ-RT-PCR).

Zatímco výhodou klasické metody pomocí Ig/TCR přestaveb je použití DNA (snadnější izolace nukleové kyseliny, nezávislost na stavu exprese v leukemických buňkách), nevýhody jsou ve značné pracnosti postupu. Jen úvodní screening zahrnuje podle doporučení skupiny BIOMED-1 celkem 18 PCR systémů

pro detekci přestaveb Ig a TCR u ALL z B řady a navíc každý pacient vyžaduje optimalizaci dvou systémů s jedinečnými pacient-specifickými primery. Alternativní postup je jednodušší v tom, že jednou zavedený systém na kvantifikaci hladiny TEL/AML1 je bez změny použitelný pro všechny pacienty s touto aberací. Na druhé straně vyžaduje izolaci RNA z patientského materiálu a jeho výsledky mohou být teoreticky více ovlivněny kvalitou vzorku, časem mezi odebráním a zpracováním krve či kostní dřene a také tím, jak je exprese TEL/AML1 mRNA ovlivněna současně probíhající antileukemickou terapií.

V naší studii jsme se pokusili srovnat hodnoty MRN pacientů s TEL/AML1 pozitivní leukémií získané oběma popsány metodami a ověřit použitelnost obou metod v klinické praxi. Za tím účelem jsme museli také vyšetřit, jak je exprese fúzního genu TEL/AML1 ovlivněna časem mezi odběrem a zpracováním vzorku a také jaký vliv na ni má probíhající terapie.

## Materiál a metodika

### *Pacienti a vzorky*

Do studie bylo zahrnuto 8 dětských pacientů s ALL pozitivní na fúzní gen TEL/AML1, od kterých byly k dispozici vzorky kostní dřene z diagnózy a z dalšího průběhu léčby. Šest pacientů prodělalo S2 relaps, dva jsou stále v první remisi onemocnění. Celkově byl vyšetřen 41 vzorek. Vzorky byly získány s písemným souhlasem pacientů či jejich zákonných zástupců. Děti byly léčeny podle protokolů ALL-BFM 95 a ALL IC-BFM 2002.

### *Izolace jaderných / mononukleárních buněk*

Buňky byly z kostní dřene / periferní krve izolovány pomocí centrifugace na hmotnostním gradientu (Ficoll Paque, PHARMACIA, Uppsala, Sweden) nebo osmotickou lýzou. Počet živých buněk pro experimenty byl počítán ve světelném mikroskopu pomocí trypanové modři.

### *Extrakce RNA a příprava cDNA*

RNA byla extrahována pomocí upravené jedнокrokové metody Chomczynského & Sacchi (5). Integrita a množství izolované RNA byly ověřeny pomocí agarozové elektroforézy. Pro přípravu komplementární DNA (cDNA) byly použity náhodné hexamery a reverzní transkriptáza MMLV (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA) a byl zachován postup podle návodu výrobce.

### *Amplifikace TEL/AML1 cDNA (RT-PCR)*

Klasická dvoukolová PCR detekce transkriptu TEL/AML1 byla prováděna podle postupu popsaného dříve (4). Citlivost metody dosahovala  $10^{-4}$  až  $10^{-5}$  (jedna TEL/AML1 pozitivní buňka mezi 10 000 až

100 tisíci ostatními jadernými buňkami kostní dřevě), jak bylo ověřeno pomocí diluční řady.

#### *Kvantitativní detekce TEL/AML1 cDNA (RQ-RT-PCR)*

Amplifikační systém TEL/AML1 zahrnuje exon 5 genu TEL až exon 3 genu AML1. Primery a sondy byly připraveny ve spolupráci s firmou TIB Molbiol (Berlín, SRN). Hybridizační sondy byly značeny na přilehlých koncích fluorescenčními barvami 3'-fluoresceinem a 5'-LC Red 640, ke kvantitativní detekci byl použit přístroj pro „real-time“ PCR LightCycler (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim, SRN). Expres TEL/AML1 byla normalizována vůči expresi kontrolního genu pro beta-2-mikroglobulin (B2M) z důvodu odstranění variací koncentrace jednotlivých vzorků. Oba amplifikační systémy již byly popsány v předchozích studiích (6). Všechny vzorky byly analyzovány v duplikátech.

#### *Extrakce DNA*

DNA byla extrahována pomocí QIAamp DNA Blood Mini kitu (QIAGEN, Hilden, SRN) a její množství a čistota ověřeny na spektrofotometru.

#### *Detekce Ig/TCR přestavby*

Detekce přestavby Ig/TCR byla provedena pomocí PCR, jak bylo popsáno dříve (7). Ke screeningu přestavby Ig a TCR genů v diagnostickém materiálu bylo využito 18 různých PCR systémů s „konsensus“ primery pro jednotlivé rodiny a podrodiny genových segmentů V (variable), D (diverse) a J (join) (8, 9). PCR reakce byla provedena u všech systémů shodným teplotním profilem: 2 min. při 94 °C; 35 cyklů: 45 s při 92 °C, 45 s při 60 °C a 45 s při 72 °C; a závěrečná elongace 10 min. při 72 °C. Přítomnost přestavby se následně orientačně detekovala pomocí horizontální gelové elektroforézy.

#### *Analýza heteroduplexů*

V případě pozitivního screeningu na přestavby IRG byla určena monoklonalita/biklonalita (resp. oligoklonalita) tohoto signálu pomocí analýzy heteroduplexů v polyakrylamidovém gelu.

Produkt PCR byl nejprve denaturován při 95 °C/15 min. a pak rychle zchlazen na teplotu 4 °C/60 min., čímž byla umožněna zpětná renaturace a formace homo- respektive heteroduplexů. Detekce homo- a heteroduplexů byla prováděna v 8 % nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu při 4 °C a konstantním napětí 10 mA během 24 hodin. Gel byl po elektroforéze obarven ethidium-bromidem a vizualizován pomocí dokumentačního systému GEL DOC (BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

#### *Analýza sekvencí*

Po heteroduplexní analýze byly sterilně vyříznuty pozitivní proužky odpovídající monoklonálním pře-

stavbám, DNA byla eluována z gelu a eluát byl následně reamplifikován. Produkt byl separován v agarórové elektroforéze a přečištěn pomocí QIAquick PCR Purification kitu (QIAGEN, Hilden, SRN).

DNA byla sekvenována pomocí kapilární elektroforézy ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, USA). Získané sekvence byly analyzovány pomocí softwaru CHROMAS 1.5 (TECHNELYSIUM, Queensland, Australia), VECTOR NTI 8 Suite (INFORMAX, Bethesda, MD, USA) a softwaru BLAST (NCBI, Bethesda, MD, USA).

#### *IRG RQ-PCR*

Kvantitativní detekce klonálně specifické přestavby byla provedena pomocí specifického PCR systému. Forward primer pro každý systém byl vytvořen jako alelo-specifický oligonukleotid (ASO), podle sekvence Ig nebo TCR přestavby, na specifickém úseku přechodu genových segmentů: VDJ, VD nebo VJ – v závislosti na použitém systému. Primer byl navrhnut tak, aby ho bylo možno použít v RQ-PCR s hydrolyzační sondou a reverzním primerem umístěnými v konsensus oblasti. Cílem bylo nalézt u každého pacienta v optimálním případě dva cíle pro sledování MRN. Každý systém byl optimalizován samostatně tak, aby dosáhl detekční citlivost alespoň  $10^{-1}$ . Kvantitativní detekce klonálně specifických přestavby IRG byly provedeny s použitím přístroje pro „real-time“ PCR ABI PRISM 7700 (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, USA) nebo iCycler iQ™ (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) v triplikátech.

#### *Stanovení exprese TEL/AML1 po cytostatické léčbě*

TEL/AML1 pozitivní REH buněčná linie byla kultivována v Roswell Park Memorial Institute (RPMI) mediu 1640 s 10 % fetálního hovězího séra a 2mM L-glutaminem. Buňky byly ošetřeny cytostatikem L-Asparagináza (Kidrolase; RHONE-POULENC, Bellon, Francie) v logaritmičsky naředěných koncentracích: 0,4 U/ml, 4,0 U/ml, 40,0 U/ml, a 400,0 U/ml. Následně po 24 a 48 hodinách kultivace byly buňky sklizeny a byla z nich extrahována celková RNA a kvantifikovaná normalizovaná exprese TEL/AML1 fúzního genu. Experimenty byly provedeny v triplikátech.

## **Výsledky**

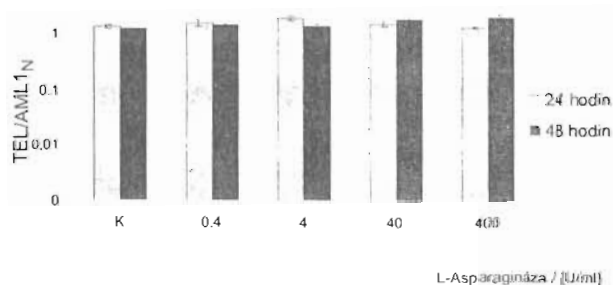
#### *Stabilita transkriptu TEL/AML1 v čase*

Simulovali jsme transport vzorku TEL/AML1 pozitivní ALL. Při pokojové teplotě jsme odebírali ze vzorku TEL/AML1 pozitivní kostní dřevě identický alikvot (10 milionů buněk) a zpracovali ho standardním způsobem. Pomocí RQ-RT-PCR jsme hodnotili celkové množství mRNA ve vzorku (pomocí kvantifikace vnit-

řního standardu tzv. housekeeping genu, v našem případě genu pro B2M), množství transkriptu TEL/AML1 a změnu jejich vzájemného poměru (TEL/AML1<sub>N</sub>). Prokázali jsme, že v průběhu prvních 24 hodin po odběru kolísá exprese TEL/AML1 i B2M v rámci jednoho řádu, po 30 hodinách dochází v obou hodnotách k výraznějšímu poklesu. Normalizovaná TEL/AML1<sub>N</sub> je však stabilní v čase po dobu nejméně 78 hodin od odběru vzorku do jeho zpracování.

#### Stabilita exprese TEL/AML1 po léčbě cytostatiky

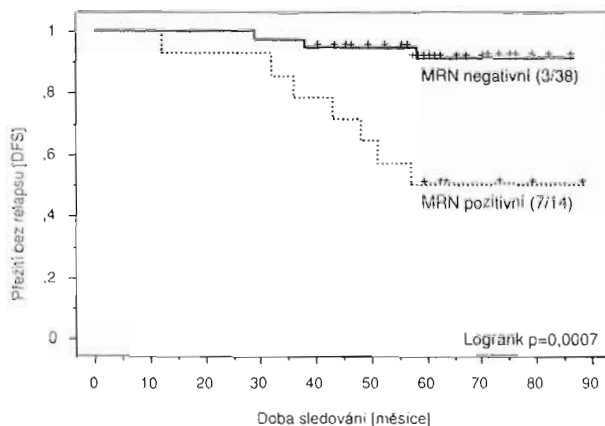
Abychom ověřili, zda chemoterapie ovlivňuje expresi hybridního genu TEL/AML1, simulovali jsme in vitro léčbu maligních buněk nesoucích gen TEL/AML1 pomocí cytostatika L-asparaginázy, která je důležitou komponentou protileukemické léčby. Do buněčné kultury TEL/AML1 pozitivní leukemické linie REH jsme přidávali L-asparaginázu v rostoucí koncentraci (0,4 – 400 U/ml) a měřili normalizovanou expresi TEL/AML1 (TEL/AML1<sub>N</sub>). Zjistili jsme, že u buněk, které léčbu cytostatikem přežily, se TEL/AML1<sub>N</sub> nezměnila (obr. 1). Tento výsledek potvrzuje, že kvantitativní detekce transkriptu TEL/AML1 v průběhu terapie skutečně monitoruje počet reziduálních buněk.



**Obr. 1.** Normalizovaná exprese hybridního genu TEL/AML1 se významně nemění ani po relativně vysokých dávkách L-asparaginázy v porovnání s kontrolou.

#### Detekovatelné TEL/AML1 pozitivní buňky na konci indukční léčby předpovídají relaps leukémie

Měli jsme k dispozici celkem 52 vzorky dětí s TEL/AML1 pozitivní ALL léčených podle protokolu ALL-BFM 95, odebraných na konci indukční části léčby (den +33). Mezi 52 pacienty s vyšetřenou hladinou reziduální nemoci na konci indukce detekovatelné TEL/AML1 pozitivní buňky jednoznačně oddělily pacienty se špatnou prognózou (přežití bez relapsu = 50 %; 7 relapsů ze 14 dětí) od dětí s výbornou šancí na přežití (přežití bez relapsu = 92 %; 3 děti z 38;  $p = 0,0007$ ) (obr. 2). Medián sledování souboru je 62 měsíců, relapsy se objevily 12–58 měsíců od diagnózy nemoci. Kvantitativní analýza hladin MRN nepřinesla signifikantní výsledek, relapsy byly distribuovány prakticky rovnoměrně ve skupině s vyšší hladinou

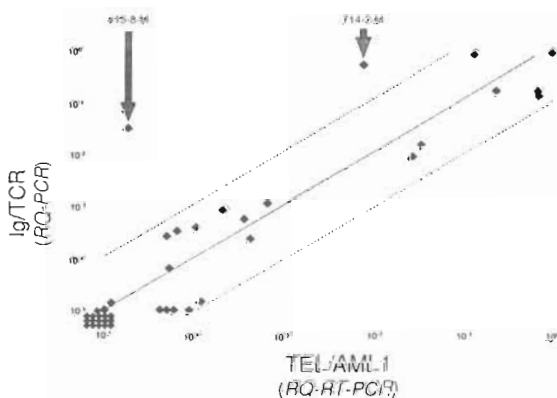


**Obr. 2.** Analýza 52 pacientů s TEL/AML1 pozitivní ALL ukazuje prognostický význam detekovatelné MRN na konci indukční léčby. Přežití bez relapsu (Disease Free Survival – DFS) je vysoce signifikantně horší ve skupině 14 pacientů s detekovatelnou MRN; 7 z nich již prodělal relaps.

MRN ( $10^{-2}$ – $10^{-4}$ ; 4 relapsy ze 7 pacientů) a nižší hladinou MRN ( $<10^{-4}$ ; 3 relapsy ze 7 dětí). Ani interval mezi diagnózou nemoci a relapsem se u těchto skupin signifikantně neliší (32–43 měsíce versus 12–57 měsíců; 29–58 měsíců pro děti bez detekovatelné MRN).

#### Srovnání hladin MRN podle RQ-PCR a RQ-RT-PCR

Porovnali jsme výsledky analýzy MRN podle dvou metod u celkem 41 vzorku od 8 pacientů s TEL/AML1 pozitivní ALL. Vzorky pocházely od pacientů sledovaných pro relaps ALL ( $n = 6$ ) a od pacientů standardního rizika léčených podle nového protokolu ALL-IC 2002 ( $n = 2$ ). Všechny vzorky byly vyšetřeny v každém z porovnávaných bodů individuálně určenou a optimalizovanou IRG RQ-PCR s citlivostí alespoň  $1:10^{-4}$ . Pět pacientů mělo dva cíle, tři pacienti byli vyšetřeni pomocí jednoho cíle. Použili jsme 8x přestavbu Ig-kappa, 1x přestavbu IgH, 2x TCRdelta a 2x TCRgamma. Současně jsme všechny vzorky analyzovali pomocí jednotné metodiky pro RQ-RT-PCR detekci transkriptu TEL/AML1.



**Obr. 3.** Graf ukazuje velmi dobrou korelaci dvou nezávislých metod pro zjišťování MRN na celkem 41 vzorku ( $R^2=0,847$ ). Dva označené body ukazují odběry, ve kterých IRG RQ-PCR detekuje významně vyšší hladiny MRN než TEL/AML1 RQ-RT-PCR.

V 17 případech obě metody prokázaly negativní výsledek, tj. nedetekovatelnou hladinu MRN, 22 vzorků bylo pozitivních oběma metodami a korelovaly v rozmezí menším než jeden řád, ve dvou případech RQ-RT-PCR podhodnotila hladinu MRN určenou podle přestaveb IRG o více než jeden řád (obr. 3). Celková korelace obou měření byla velmi dobrá ( $R^2 = 0,847$ ).

## Diskuse

Kvantitativní metodika sledování MRN u dětských ALL pomocí RQ-PCR zaměřené na přestavby IRG je velmi spolehlivým, mezinárodně standardizovaným postupem. Bohužel se jedná o metodu mimořádně pracnou, časově náročnou a drahou. Je to dáno zejména tím, že přestože je díky designu systémů IRG RQ-PCR možné používat pouze omezený počet fluorescenčně značených sond pro všechny pacienty, pro každého z nich je třeba navrhnout a optimalizovat individuální primery na základě sekvence jednotlivých přestaveb. Navíc se ne vždy podaří nalézt dostatečně citlivý cíl, ať už pro nedostatek klonálně specifických přestaveb nebo pro nemožnost navrhnout, případně optimalizovat dostatečně specifickou a přitom senzitivní RQ-PCR (např. pro nedostatek vložených N nukleotidů u přestaveb TCRgamma). Použití kvantitativní detekce množství transkriptu často se vyskytujícího hybridního genu (jakým je u dětských ALL gen TEL/AML1) se proto jeví pro svou relativní jednoduchost (stejný systém pro všechny TEL/AML1 pozitivní pacienty) jako zajímavá alternativa.

Rozšíření tohoto systému do klinického použití dosud hrání obava, zda je skutečně hladina exprese mRNA shodná u všech pacientů a zda se nemění v průběhu terapie (10). Aby tyto potenciální námitky mohly být vyvráceny, bylo třeba provést několik in vitro experimentů a především přímé porovnání obou výše zmíněných metod. Důležitým předpokladem kvantitativního hodnocení množství transkriptu TEL/AML1 je výběr vhodného kontrolního („housekeeping“) genu. Ten se používá jako interní standard množství mRNA, ke kterému se vztahuje počet kopií TEL/AML1 mRNA. Rychlost degradace mRNA kontrolního a cílového genu by měla být stejná nebo velmi blízká, aby v době mezi odběrem vzorku a jeho zpracováním (izolací mRNA) nedošlo k ovlivnění poměru cílového a kontrolního genu a tím k arteficiálnímu nadhodnocení nebo podhodnocení výsledné hladiny MRN. Podle literárních údajů jsme zvolili gen B2M, jiné skupiny použily např. gen ABL (10, 11). Naše experimenty prokázaly, že rychlost odbourávání transkriptů B2M a TEL/AML1 je takřka identická v průběhu 78 hodin od odběru vzorku kostní dřeně a zaručuje tedy neměnnost normalizované exprese TEL/AML1. Nicméně již po uplynutí 24 hodin dochází k signifikantnímu poklesu množství obou mRNA.

Přestože jejich vzájemný poměr není ovlivněn, ztráta absolutního množství transkriptů může vést k omezení citlivosti a k falešně negativním výsledkům. Vzorek kostní dřeně nebo krve by tedy měl být zpracován pro účely monitorování MRN nejpozději do jednoho dne po odebrání. V podmínkách České republiky je možno tento požadavek splnit a naprostá většina vzorků v naší retrospektivní studii byla zpracována tímto způsobem.

Zajímavým zjištěním je, že cytostatická léčba (třebaže se jedná pouze o monoterapii L-asparaginázou) v in vitro experimentu neovlivňuje hladinu exprese TEL/AML1. Tento výsledek napovídá, že kvantitativní detekce transkriptu TEL/AML1 určuje skutečnou hladinu MRN v různých fázích léčby, bez ohledu na prodělanou chemoterapii.

Prediktivní hodnota kvantitativní detekce transkriptu TEL/AML1 pro relaps dětské ALL byla dosud v literatuře doložena pouze naší skupinou (6). V rozšířené analýze, která je součástí této práce, dokazujeme, že detekovatelná hladina TEL/AML1 mRNA na konci indukce je významným rizikovým prognostickým faktorem pro relaps leukemie. Stejně jako v případě využití IRG RQ-PCR nacházíme pacienty, kteří měli v den skončení indukce nedetekovatelnou MRN a přesto u nich došlo k relapsu. Z toho je zřejmé, že i nižší hodnoty MRN (pod hranici detekční citlivosti všech dnes používaných metod) mohou vést k relapsu. Relativně omezený počet pacientů s následným relapsem v naší studii (daný celkově dobrou prognózou této genotypové skupiny dětských ALL) nedovoluje určit, zda výše hladiny MRN rozhoduje o výši rizika relapsu či okamžiku jeho nástupu.

Samotné srovnání dvou metodik detekce MRN využívá vcelku příznivě pro TEL/AML1 RQ-RT-PCR. Jedná se dosud o největší publikovaný soubor paralelně vyšetřených vzorků TEL/AML1 pozitivní ALL, i ve srovnání s jedinou další významnější publikovanou prací (10). Velmi blízká detekční citlivost obou postupů (rovná nebo lepší  $1:10^4$ ) umožňuje přímé porovnání. Výborná korelace ve vzorcích pod tímto detekčním prahem (celkem 17) i v odběrech s pozitivními hodnotami (celkem 22) dokládá praktickou aplikovatelnost TEL/AML1 RQ-RT-PCR. Úmyslně byli pro analýzu vybráni především pacienti s relapsem ALL, u kterých je v období před a/nebo po relapsu větší pravděpodobnost zachytu leukemických buněk, a tak bylo zaručeno srovnávání hladin MRN v pozitivních hodnotách. Oba nekorelující vzorky mají velmi vysokou hladinu MRN podle IRG RQ-PCR. Přestože naše in vitro experimenty (viz výše) prokazují opak, mohlo v těchto vzorcích dojít k ovlivnění exprese genu TEL/AML1, degradaci mRNA způsobené transportem či technické chybě. Podstatné je, že přestože rozdíl v hladinách MRN převyšil akceptovatelný jeden řád, i TEL/AML1 RQ-RT-PCR potvrdilo přítomnost MRN. Současně výsledky porovnání těchto dvou nezávislých metod detekce MRN prokazují, že je z kli-

nického hlediska nesprávně přeceňovat dynamiku MRN v úzkém detekčním rozpětí.

Celkově naše výsledky dokazují, že v případě nedostatku (druhého) dostatečně citlivého markeru na úrovni DNA je možno pro sledování MRN použít kvantitativní detekci transkriptu TEL/AML1. Je však třeba přísně dodržovat veškerá technická opatření, počínaje co nejkratší dobou od odběru po zpracování vzorku až po užívání adekvátního kontrolního genu a multiplikátů v kvantitativní PCR.

## Literatura

1. **Campana D, Pui CH.** Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995; 85: 1416–1434.
2. **van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al.** Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998; 352: 1731–1738.
3. **Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, et al.** Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia* 2000; 14: 1939–1943.
4. **Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Stary J, Trka J.** TEL/AML 1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group. *Leukemia* 1999; 13: 22–24.
5. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–159.
6. **Madzo J, Zuna J, Muzikova K, et al.** Slower molecular response to treatment predicts poor outcome in patients with TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia: prospective real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Cancer* 2003; 97: 105–113.
7. **Madzo J, Mužíková K, Zörnerová T, et al.** Intrauteriní původ akutní lymfoblastické leukemie u dětí: průkaz leukemického klonu v archivních vzorcích novorozenecké krve. *Transfuzie a hematologie dnes*. 2003; 9: 80–84.
8. **Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, et al.** Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TALI deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 110–118.
9. **Szczepanski T, Willemse MJ, van Wering ER, van Weerden JF, Kamps WA, van Dongen JJ.** Precursor-B-ALL with D(H)-J(H) gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14. *Leukemia* 2001; 15: 1415–1423.
10. **de Haas V, Breunis WB, Dee R, et al.** The TEL-AML 1 real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) might replace the antigen receptor-based genomic PCR in clinical minimal residual disease studies in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2002; 116: 87–93.
11. **Pallisgaard N, Clausen N, Schroder H, Hokland P.** Rapid and sensitive minimal residual disease detection in acute leukemia by quantitative real-time RTPCR exemplified by t(12;21) TEL-AML1 fusion transcript. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 26: 355–365.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ 6509.

Doc. MUDr. J. Trka, Ph.D.  
CLIP – Childhood Leukaemia Investigation Prague  
Vedoucí Laboratorního centra molekulární genetiky  
Klinika dětské hematologie a onkologie UK,  
2. lékařská fakulta, Praha  
V Úvalu 84  
150 00 Praha 5  
e-mail: jan.trka@lfmotol.cuni.cz

Došlo do redakce: 8. 9. 2004  
Přijato: 25. 10. 2004

## Upozornění

Naléhavě žádáme autory, aby věnovali zvýšenou pozornost přípravě rukopisů. Imprimovaná verze článků je konečná a při korektuře není možné měnit věty či jejich slovosled, vypouštět odstavce či doplňovat text. Při korektuře lze opravovat pouze chyby vzniklé při přepisu textu v tiskárně. Děkujeme za pochopení.

Redakce

**P3.** Zuna J., Krejci O., Madzo J., Fronkova E., Sramkova L., Hrusak O., Kalina T., Vaskova M., Stary J., Trka J.: TEL/AML1 and immunoreceptor gene rearrangements-which comes first? *Leukemia Research* 2005;29:633-39

## TEL/AML1 and immunoreceptor gene rearrangements—*which comes first?*

Jan Zuna<sup>a,b,\*</sup>, Ondrej Krejci<sup>a,b</sup>, Jozef Madzo<sup>a,b</sup>, Eva Fronkova<sup>a,b</sup>,  
Lucie Sramkova<sup>a,b</sup>, Ondrej Hrusak<sup>a,c</sup>, Tomas Kalina<sup>a,c</sup>, Martina Vaskova<sup>a,c</sup>,  
Jan Stary<sup>b</sup>, Jan Trka<sup>a,b</sup>

The Czech Paediatric Haematology Working Group (CPH)

<sup>a</sup> CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague, 2nd Medical School, Charles University Prague, V Uvalu 84, Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Paediatric Haematology and Oncology, 2nd Medical School, Charles University Prague, V Uvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Immunology, 2nd Medical School, Charles University Prague, V Uvalu 84, Prague, Czech Republic

Received 10 August 2004; accepted 23 November 2004

Available online 18 January 2005

### Abstract

TEL/AML1 fusion gene is present in 20–25% of childhood acute lymphoblastic leukaemias. In order to unravel at which stage of B-cell precursor development the fusion is originated, we analysed frequency and pattern of immunoreceptor (immunoglobulin and T-cell receptor) gene rearrangements in 47 TEL/AML1-positive and 43 TEL/AML1-negative cases of the same CD10+ immunophenotype. Moreover, we compared corresponding immunoreceptor gene rearrangements in 11 cases of TEL/AML1-positive leukaemia at diagnosis and relapse. More mature immunogenotype of TEL/AML1-positive cases and changes in 37% of rearrangements between diagnosis and relapse suggest that in most cases the TEL/AML1 fusion is formed during immunoreceptor gene rearrangement process.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Acute lymphoblastic leukaemia; TEL/AML1; Immunoglobulin; T-cell receptor; Rearrangement; Relapse

### 1. Introduction

Leukaemias with TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion gene (resulting from t(12; 21) translocation) form the most common genetically defined subgroup of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL) with 20–25% of all cases [1]. This subgroup is relatively homogeneous and a significant part of its characteristics regarding biological and clinical features, behaviour, prognosis and also aetiology has been revealed. However, a number of questions still remain unanswered. One of these questions concerns the timing of initiating event of the leukaemic process. It is believed that the fusion of TEL and AML1 genes is the first or initiating hit in these leukaemias. It has been shown that this hit

occurs already during prenatal development in most cases [2–4] and recent data suggest that it does not necessarily lead to overt leukaemia [5]. However, it is still not clear at which stage of B-cell precursor (BCP) development this fusion takes place.

In our study we compare the number and pattern of immunoglobulin (Ig) and T-cell receptor (TCR) gene rearrangements at initial diagnosis in the groups of TEL/AML1-positive and -negative patients diagnosed with ALL of the same CD10+ immunophenotype and, moreover, we compare Ig/TCR rearrangements at diagnosis and relapse of the TEL/AML1-positive leukaemia. In discussion, we offer scenarios that are compatible with our own data as well as the other data published so far—particularly, we analyse hypotheses concerning the question in the background of Ig/TCR rearrangements and TEL/AML1 fusion relationship: which comes first?

\* Corresponding author. Tel.: +420 22443 6580; fax: +420 22443 6521.  
E-mail address: [jan.zuna@lfmotol.cuni.cz](mailto:jan.zuna@lfmotol.cuni.cz) (J. Zuna).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Immunoreceptor gene rearrangements analysis

We examined pattern of Ig/TCR gene rearrangements in bone marrow samples of ALL patients using the set of 18 reactions covering the vast majority (>90%) of Ig-heavy chain (IgH), Ig-kappa (Igκ), TCR-delta (TCRδ) and TCR-gamma (TCRγ) rearrangements in B-cell precursor ALL (IgH: VH1/7–JHcons, VH2–JHcons, VH3–JHcons, VH4–JHcons, VH5–JHcons; Igκ: VKI–Kde, VKII–Kde, VKIII–Kde, VKIV–Kde, intron RSS–Kde; TCRδ: Vδ2–Dδ3, Dδ2–Dδ3; TCRγ: VγI–Jγ1.1/2.1, VγI–Jγ1.3/2.3, VγII–Jγ1.1/2.1, VγII–Jγ1.3/2.3, VγIV–Jγ1.1/2.1, VγIV–Jγ1.3/2.3). Sequences of primers and PCR conditions were specified elsewhere [6,7]. To reliably distinguish clonal PCR products from polyclonal we performed heteroduplex analysis of fragments using polyacrylamide gel. Clonal PCR products were excised and purified using QIAquick gel extraction kits (QIAGEN, Valencia, CA). Purified PCR fragments were sequenced directly on ABI PRISM® 310 capillary sequencer using Big Dye Terminator Chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA). Variable (*V*), diversity (*D*) and joining (*J*) regions of immunoreceptor genes were identified by comparison with sequences in GeneBank using the ImMunoGeneTics (IMGT) Database (<http://imgt.cines.fr>, IMGT, European Bioinformatics Institute, Montpellier, France) and the IGBlast search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

### 2.2. Patients

All patients included in this study were treated in one of the Czech Paediatric Haematology Working Group (CPH) centres according to Berlin–Frankfurt–Munster (BFM) ALL protocols. Informed consent was obtained from patients or their guardians. We compared the number and pattern of Ig/TCR rearrangements at initial diagnosis in the groups of 47 TEL/AML1-positive and 43 TEL/AML1-negative patients diagnosed with ALL of the same CD10+ immunophenotype (TEL/AML1-positive: common ALL  $n=30$ , praе-B ALL  $n=17$ ; TEL/AML1-negative: common ALL  $n=27$ , praе-B ALL  $n=16$ ) and of the same age at presentation. Moreover, we examined Ig/TCR rearrangements in corresponding diagnostic and relapse samples of 11 patients diagnosed with relapsed TEL/AML1-positive ALL. The TEL/AML1 status was determined using reverse transcriptase (RT)-PCR method as described elsewhere [1].

### 2.3. Cell cycle analysis

CycleTEST<sup>+</sup> PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA) was used for analysis of nuclear DNA from cell suspension according to the manufacturer's instructions. The distribution of cell cycle phases was analysed with CELLQuest (Becton Dickinson

and ModFit (Verity House, Topsham, ME, USA) software applications.

### 2.4. Statistical analysis

Fisher's exact test and Mann–Whitney test were used for statistical analysis.

## 3. Results

### 3.1. Ig/TCR rearrangements in TEL/AML1+ and TEL/AML1– ALL

The results of this analysis are summarised in Table 1. The number of patients with at least one detectable clonal (i.e. only mono- or bi-clonal/allelic) rearrangement is comparable within both selected cohorts (94% versus 95% for TEL/AML1-positive and TEL/AML1-negative groups, respectively;  $p=1.0$ ). However, we found a significantly higher total number of clonal rearrangements in the TEL/AML1-positive patients ( $p=0.0006$ ). The most significant difference between the two groups was identified in Igκ segment (72% versus 26%;  $p<0.0001$ ) and also the TCRγ rearrangements were significantly more frequent in the TEL/AML1-positive group (81% versus 56%;  $p=0.0128$ ). The frequency of clonal TCRδ and IgH rearrangements did not differ significantly in the TEL/AML1-positive compared to -negative patients (53% versus 56%;  $p=0.8349$  and 79% versus 65%;  $p=0.1658$ , respectively).

### 3.2. Ig/TCR rearrangements at diagnosis and relapse

Summary of Ig/TCR rearrangements found in diagnostic and corresponding relapse samples of 11 patients with relapsed TEL/AML1-positive ALL is shown in Table 2. In four patients the pattern of rearrangements was the same at diagnosis and relapse (2, 3, 4 and 5 rearrangements, respectively). In five patients we found loss of some markers at relapse,

Table 1  
Number of patients with clonal (mono- or bi-clonal/allelic) rearrangements

	IgH <sup>a</sup>	Igκ <sup>a</sup>	TCRδ <sup>a</sup>	TCRγ <sup>a</sup>	≥1 <sup>b</sup>	Overall <sup>c</sup>
TEL/AML1+ ( $n=47$ )	79% (37/47)	72% (34/47)	53% (25/47)	81% (38/47)	94% (44/47)	186 (4.0/pt.)
TEL/AML1– ( $n=43$ )	65% (28/43)	26% (11/43)	56% (24/43)	56% (24/43)	95% (41/43)	116 (2.7/pt.)
<i>p</i>	0.17 <sup>d</sup>	<0.0001 <sup>d</sup>	0.83 <sup>d</sup>	0.0128 <sup>d</sup>	1.0 <sup>d</sup>	0.0006 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Number of patients with at least one clonal (mono- or bi-clonal/allelic) rearrangement of particular gene.

<sup>b</sup> Number of patients with at least one clonal rearrangement.

<sup>c</sup> Total number of clonal rearrangements within the group (number of rearrangements per patient).

<sup>d</sup> Statistical significance (*p*) calculated using Fisher's exact test.

<sup>e</sup> Statistical significance (*p*) calculated using Mann–Whitney test.



Table 2  
Immunoreceptor gene rearrangements of 11 TEL/AML1-positive patients at diagnosis and relapse

Patient	Immunoreceptor gene rearrangements	
	Diagnosis	Relapse
1	VH4/JH	–
	VH5/JH	VH5/JH
	VkI/Kde	VkI/Kde
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3
	VgII/Jg1.3–2.3	VgII/Jg1.3–2.3
2	VkI/Kde	VkI/Kde
	–	RSS/Kde
	Vd2/Dd3	Vd2/Dd3
	VgI/Jg1.3–2.3 (1)	–
	–	VgI/Jg1.3–2.3 (2)
3	VH3/JH	–
	VkIV/Kde	–
	RSS/Kde	RSS/Kde
	Vd2/Dd3	–
	VgI/Jg1.3–2.3 (1)	VgI/Jg1.3–2.3 (1)
VgII/Jg1.3–2.3 (2)	VgII/Jg1.3–2.3 (2)	
4	VH3–33/DH3–10/JH6	–
	–	VH3–38/DH3–10/JH6
	VH4/JH	–
	VH5–51/DH3–10/JH6 (1)	–
	–	VH5–51/DH3–10/JH6 (2)
	VkII/Kde	VkII/Kde
	Vd2/Dd3	Vd2/Dd3
VgI/Jg1.3–2.3	–	
5	VkI/Kde	VkI/Kde
	RSS/Kde	RSS/Kde
	Vd2/Dd3	Vd2/Dd3
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3
	VgII/Jg1.3–2.3	–
6	VH3/JH	–
	VkII/Kde	–
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3
7	VkI/Kde	–
	VkII/Kde	VkII/Kde
	Vd2/Dd3	–
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3
VgII/Jg1.3–2.3	–	
8	VH2/JH	VH2/JH
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3
	VgII/Jg1.3–2.3	VgII/Jg1.3–2.3
9	VH2/JH	VH2/JH
	VgIV/Jg1.1–2.1	VgIV/Jg1.1–2.1
10	VH3/JH	VH3/JH
	RSS/Kde	RSS/Kde
	Vd2/Dd3	Vd2/Dd3
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3
11	VH2/JH	VH2/JH
	VH3/JH	VH3/JH
	VkI/Kde	VkI/Kde
	VkII/Kde	VkII/Kde
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3

but at least one dominant rearrangement was maintained between the diagnosis and relapse in all of these children. In the remaining two patients the changes were more complex. Patient number two had clonal rearrangements in V $\delta$ 2–D $\delta$ 3, V $\kappa$ I–Kde and V $\gamma$ I–J $\gamma$ 1.3/2.3 systems at diagnosis. At relapse, in addition to identical V $\delta$ 2–D $\delta$ 3 and V $\kappa$ I–Kde, she gained RSS–Kde rearrangement and the V $\gamma$ I–J $\gamma$ 1.3/2.3 rearrangement showed a different sequence. Unfortunately, the limited amount of diagnostic DNA material did not allow us to backtrack the latter clones back to diagnosis. The diagnostic sample of the patient number 4 was positive in systems VH3–JH6, VH4–JH4, VH5–JH6, V $\delta$ 2–D $\delta$ 3, V $\kappa$ II–Kde and V $\gamma$ I–J $\gamma$ 1.3/2.3. At relapse the VH4–JH4 and V $\gamma$ I–J $\gamma$ 1.3/2.3 rearrangements were lost and the VH3–JH6 and VH5–JH6 rearrangements showed change of the VH segment with DH–JH sequence maintained. This change is likely to be caused by a clonal evolution of the rearrangement between diagnosis and relapse. Altogether, in our cohort of 11 patients with relapsed TEL/AML1-positive ALL we detected 47 Ig/TCR rearrangements at diagnosis and 36 rearrangements at relapse. We found 37% of Ig/TCR rearrangements to be changed between the two time points.

### 3.3. Cell cycle analysis of TEL/AML1-positive and -negative patients

In 59 cases (34 TEL/AML1-positive and 25 TEL/AML1-negative) we were able to evaluate a cell cycle of the leukaemic population analysing the DNA content using propidium iodide. The proportion of the cells in G0–G1 phase was identical in both groups (median 92% (71–97%) and median 91% (76–96%) for the TEL/AML1-positive and -negative patients, respectively; non-significant).

## 4. Discussion

In normal B- and T-lymphoid precursors the rearrangement process begins with IgH and TCR $\delta$  genes, respectively, followed by TCR $\gamma$  (T-lymphocytes) and finally Ig $\kappa$  (B-lymphocytes) in more advanced stages of differentiation [8]. It has been shown recently that TCR rearrangements typical for BCP-leukaemic cells are present also in normal B-cell precursors [9]. Therefore, the presence of TCR rearrangements in BCP-ALLs probably reflects physiological situation and also the physiological order of recombination is preserved in childhood BCP leukaemias [10]. The higher overall number of clonal Ig/TCR rearrangements and particularly the predominance in the Ig $\kappa$  and TCR $\gamma$  loci thus indicates more mature immunogenotype of the TEL/AML1-positive ALL compared to other childhood leukaemias of the same immunophenotype. In the traditional view, age at diagnosis of ALL could possibly be a factor influencing the relative immunogenotypic maturity of the leukaemic blasts. However, age at presentation did not differ significantly between our groups (TEL/AML1-positive: median 53 months

(15–167 months); TEL/AML1-negative: median 65 months (4–218 months);  $p = 0.47$ ). To further eliminate any possible bias caused by the different presentation age we performed also an age-matched analysis of the two groups. We were able to select 33 patients from each group and made TEL/AML1-positive versus TEL/AML1-negative pairs with age at diagnosis differing by fewer than six months within each pair. The analysis revealed similar result with significant difference between the positive and negative groups in the overall frequency of rearrangements ( $p = 0.0089$ ) and frequency of Ig $\kappa$  ( $p = 0.0002$ ) and TCR $\gamma$  ( $p = 0.0332$ ) rearrangements. Again, the number of patients with at least one rearrangement as well as frequency of TCR $\delta$  and IgH rearrangements showed no statistically significant difference ( $p = 0.24$ ,  $p = 0.45$  and  $p = 0.57$ , respectively). Comparable results were recently obtained in a similar study performed by Hubner et al. [11].

If we want to disclose the reason *why* the TEL/AML1-positive leukaemias have significantly more mature immunogenotype compared to others the key question—in our opinion—is whether Ig/TCR rearrangement precedes TEL/AML1 fusion or vice versa. There are three conceivable scenarios: (1) TEL fuses to AML1 before the initiation of Ig/TCR rearrangements; (2) TEL fuses to AML1 after the Ig/TCR rearrangements are completed; (3) TEL fuses to AML1 during the Ig/TCR rearrangement process. Let us analyse the three possible situations in the light of the presented data and also with respect to other recently published studies briefly summarised below.

TEL/AML1 fusion often arises pre-natally—the patient-specific intronic fusion of the two genes can be “backtracked” to the patient’s newborn DNA material [4]. However, the fusion itself does not necessarily lead to leukaemia (approximately 1% of cord blood samples taken from healthy newborns harbour the TEL/AML1-positive cells [5] and our unpublished data). A subsequent, postnatal hit (silencing of the non-translocated TEL seems to be the most probable candidate [5,12,13]) is needed to trigger an overt leukaemia—it is usually diagnosed in the pre-school age but the pre-leukaemic phase can span more than 10 years [3]. The Ig/TCR gene rearrangements specific for the leukaemic clone can also be detected in the patient’s newborn DNA material in both TEL/AML1-positive and -negative cases [14]. Twins with concordant TEL/AML1-positive leukaemia shared an identical genomic TEL/AML1 fusion sequence as well as an identical Ig rearrangement, but another rearrangement of Ig gene was detected only in one twin [2]. Among TEL/AML1-positive relapses (recalculated from Refs. [12,15] and our presented data), 25/26 patients with relapsed TEL/AML1-positive leukaemia retained at least one dominant clonal immunoreceptor gene rearrangement between the diagnosis and relapse; in the last case the rearrangements dominant at relapse were present at original diagnosis at the level of  $10^{-4}$  (~1 positive cell among 10.000 negative cells). In total, about 55% of rearrangements were maintained without change; all rearrangements were identical between diagnosis and relapse

in 11/26 patients. Even in cases with different TEL deletion at relapse compared to original diagnosis (such relapses are believed to originate from pre-leukaemic clone by an independent second hit (TEL deletion)) the Ig/TCR rearrangements are maintained [12,13]. Peham et al. [15] used minimal residual disease monitoring techniques and they found “exclusive” relapse rearrangements back at original diagnosis in all relapsed TEL/AML1-positive patients (albeit at different levels). The results suggest that some clonal proliferation occurs already during the pre-leukaemic phase and implies that the pre-leukaemic population is clonal with respect to the TEL/AML1 fusion but in terms of Ig/TCR rearrangements it is, in fact, a mixture of differently related subclones.

Possible scenarios of the TEL/AML1 and Ig/TCR rearrangements timing (schematically illustrated in Fig. 1):

#### 4.1. TEL/AML1 precedes Ig/TCR rearrangement

In case TEL/AML1 fusion is the first event, the chimaeric product itself would then stimulate the formation of mature Ig/TCR rearrangements from the fully germline configuration. Several mechanisms could be envisaged including a cell cycle retardation in the TEL/AML1-positive cells [11]. However, there are facts questioning this scenario. As TEL/AML1 is a leukaemia-specific fusion gene we can assume proliferation of the positive cell before the Ig/TCR genes start to rearrange. If the Ig/TCR rearrangement process begins after the first cell division of the TEL/AML1-positive cell with Ig/TCR genes in germline configuration, we would find different TEL/AML1-positive subclones completely unrelated in terms of Ig/TCR. This would lead to a polyclonal pattern of rearrangements within the (prae-)leukaemic population. The importunate questions are:

- Why the second hit strikes the cells with the same rearrangement in case of concordant leukaemia in twins diagnosed at the age of 3 and 4 [2]?
- Why are the cells with a specific Ig/TCR rearrangement, which will be a clonal marker of fully leukaemic cells several years later, present in the newborn material already as a relatively large clone [14]?
- Why the subsequent hit turning the pre-leukaemic cell to the leukaemic one occurs in the precursor with the same Ig/TCR rearrangement even in the cases of “relapse” triggered by an independent TEL deletion [12,13]?

Taken together we presume this first scenario applies seldom—if ever—for TEL/AML1-positive leukaemias.

We also tried to confirm the theory of the cell cycle retardation in TEL/AML1-positive ALL suggested previously [11]. In case TEL/AML1 fusion leads to a retardation of a cell cycle one would expect a higher number of cells in the G0–G1 phase. However, the proportion of these cells was identical in both (TEL/AML1+ and –) groups. Thus, if the TEL/AML1 fusion causes a cell cycle retardation this effect might be noticeable only in pre-leukaemic cells, but it is definitely abolished in the leukaemic blasts. Moreover, to our knowl-

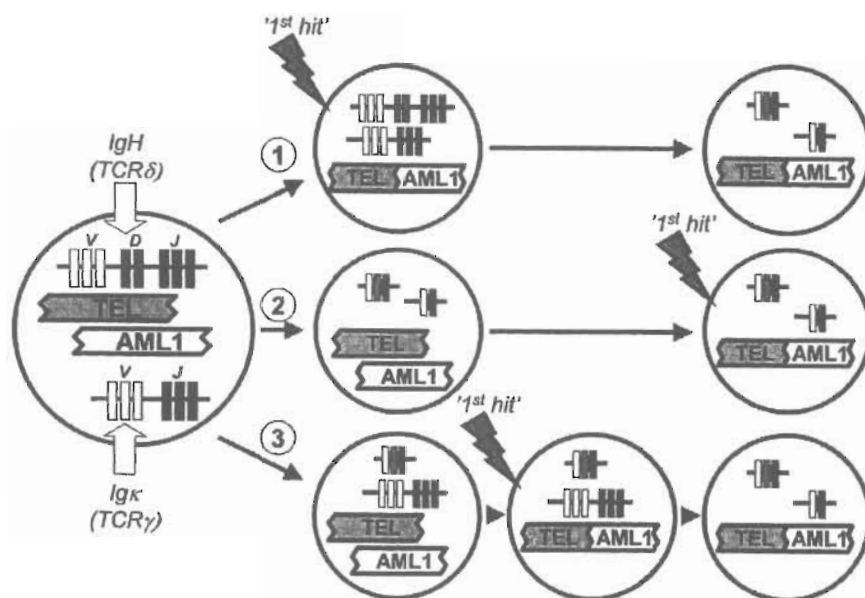


Fig. 1. The three possible scenarios of TEL/AML1 and Ig/TCR rearrangements relationship as described in the text. (1) TEL fuses to AML1 before the Ig/TCR rearrangements are initiated. TEL/AML1 stimulates/allows the Ig/TCR rearrangement machinery to finish all rearrangements. (2) TEL fuses to AML1 after the Ig/TCR rearrangements are finished (=TEL/AML1 fusion is originated in a relatively mature precursor). (3) TEL fuses to AML1 during the Ig/TCR rearrangement process; some Ig/TCR genes are already rearranged. TEL/AML1 then stimulates/allows the cell to finish the rest. More comments in the text. *V*, variable; *D*, diversity; *J*, joining regions of immunoreceptor genes.

edge, the assumption of the TEL/AML1 blocking the G1 to S progression is not supported by direct experimental data.

#### 4.2. Ig/TCR rearrangement precedes TEL/AML1

This scenario presumes TEL/AML1 fusion occurs when the Ig/TCR genes are already rearranged. If the Ig/TCR rearrangement process were already definitively finished at the time of TEL/AML1 fusion, then all TEL/AML1-positive cells would keep the same Ig/TCR pattern. It is not the case for the majority of patients as demonstrated by the differences between the diagnostic and relapse samples and by the oligoclonality in about 20% of diagnostic samples [11]. Also the spectrum of the rearrangements in the TEL/AML1-positive patients showing some non-physiological features [11] suggests that at least some Ig/TCR rearrangements may be completed or changed after the malignant turn of the cell. However, in cases of TEL/AML1-positive ALL with fully identical Ig/TCR pattern at all examined time points this scenario cannot be ruled out. The "mature" origin of the progenitor originally affected by the TEL/AML1 fusion might also contribute to the superior treatment results of this subgroup of childhood ALL.

#### 4.3. TEL/AML1 arises during the Ig/TCR rearrangement

When TEL/AML1 fusion is formed some Ig/TCR rearrangements are already made and others are yet to be finished. Generally, we have three time points where analysis

of TEL/AML1 and Ig/TCR can be done—birth (indirectly in twin studies or directly using backtracking on Guthrie cards), diagnosis and relapse—and at least two of them can be compared in more than 30 cases described to date. All but one of these cases have at least one dominant Ig/TCR rearrangement maintained but many rearrangements are changed during the evolution process. This makes this scenario the most plausible from our point of view. It is probably impossible to prove whether the more mature pattern of Ig/TCR rearrangements in TEL/AML1-positive ALL is rather due to more mature progenitor originally affected by the fusion (with most of the rearrangements already finished) or whether it is a function of the TEL/AML1 protein that, somehow, stimulates the activity of the rearrangement machinery. We believe that combination of both might be responsible for the resultant picture. Only fragments of data are available at the moment to support any of the hypotheses. From the raw data obtained by expression profiling of childhood ALL [16] (<http://www.stjude-research.org/data/ALL/>), we recalculated that the expression of the RAG1 gene is significantly higher in the TEL/AML1-positive ALL compared to other subtypes; in the analysis based on 79 TEL/AML1-positive and 205 TEL/AML1-negative B-cell precursor childhood ALL cases the difference reached statistically extremely significant value ( $p < 0.0001$ ). Also the expression of RAG2 is increased in TEL/AML1-positive cases but not to such extent ( $p = 0.0024$  and  $p = 0.24$ , according to probe set used). This supports the theory that the fusion gene has some secondary impact on the Ig/TCR rearrangements. Despite the fact that

the process is certainly more complex, we might speculate that as there is no difference in the frequency of IgH and TCR $\delta$  rearrangements between the TEL/AML1-positive and -negative cases, the fusion of TEL and AML1 genes takes place in the B-cell precursor that already finished the rearrangement process of these genes. Increased RAG activity in the TEL/AML1-positive cases could then stimulate rearrangements of Ig $\kappa$  and TCR $\gamma$ . This would fit with the data we present here and with the third scenario proposed in the discussion.

In our study, we provide results of two different analyses concerning immunoreceptor gene rearrangements in the large group of TEL/AML1-positive childhood ALLs. We show that TEL/AML1-positive leukaemias have more mature pattern of immunoreceptor gene rearrangements compared to the negative cases. Our results as well as other recent data allow us to analyse detailed scenarios on the timing of the origin of TEL/AML1 fusion with respect to the Ig/TCR rearrangements. The third scenario proposed in this study fits best with the data from the analysis of the Ig/TCR rearrangements in twins, in the Guthrie cards and in the TEL/AML1-positive ALL at diagnosis and relapse. We believe this scenario is applicable to the majority of TEL/AML1-positive cases. However, we feel that much additional work must be done before this "which comes first" problem is definitively solved.

#### Acknowledgements

Collaboration of all Czech Paediatric Haematology (CPH) centres (leaders: B. Blazek (Ostrava), Z. Cerna (Plzen), Y. Jabali (Ceske Budejovice), V. Mihal (Olomouc), D. Prochazkova (Usti nad Labem), J. Stary (Praha), J. Sterba (Brno), K. Tousovska (Hradec Kralove)) is highly appreciated. The work was supported by grants 62/2004 (GAUK), 301/P041 (GACR), 7430 (IGA MZ) and Programs #111300003 and #0021620813 from the Czech Ministry of Education.

**Contributions.** Jan Zuna contributed to conception and design (1), analysis and interpretation of data (2), drafting the article (3), final approval of article (5). Ondrej Krejci contributed to conception and design (1), analysis and interpretation of data (2), final approval of article (5). Jozef Madzo contributed to technical support (9), critical revision of the article for important intellectual content (4), final approval of article (5). Eva Fronkova contributed to technical support (9), final approval of article (5). Lucie Sramkova contributed to provision of study materials (6), technical support (9), final approval of article (5). Ondrej Hrusak contributed to technical support (9), critical revision of the article for important intellectual content (4), final approval of article (5). Tomas Kalina contributed to technical support (9), critical revision of the article for important intellectual content (4), final approval of article (5). Martina Vaskova contributed to technical support (9), final approval of article (5). Jan Stary contributed

to provision of study materials (6), logistic support (9), final approval of article (5). Jan Trka contributed to conception and design (1), critical revision of the article for important intellectual content (4), final approval of article (5).

#### References

- [1] Zuna J, Hrušák O, Kalinova M, Muzikova K, Stary J, Trka J, Czech Paediatric Haematology Working Group. TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? *Leukemia* 1999;13:22–4.
- [2] Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukaemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4584–8.
- [3] Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood* 1999;94:1057–62.
- [4] Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 1999;354:1499–503.
- [5] Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8242–7.
- [6] Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, D'aniello E, Gameiro P, Pisa P, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements and TALI deletions as PCR targets: report of the biomed-1 concerted action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:110–8.
- [7] Szczepanski T, Willems MJ, van Wering ER, van Weerden JF, Kamps WA, van Dongen JJ. Precursor-B-ALL with D(H)-J(H) gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14. *Leukemia* 2001;15:1415–23.
- [8] Van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T-cell receptor genes. Part I: basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* 1991;198:1–91.
- [9] Krejci O, Prouzova Z, Horvath O, Trka J, Hrusak O. Cutting edge: TCR delta gene is frequently rearranged in adult B lymphocytes. *J Immunol* 2003;171:524–7.
- [10] van der Burg M, Barendregt BH, Szczepanski T, van Wering ER, Langerak AW, van Dongen JJ. Immunoglobulin light chain gene rearrangements display hierarchy in absence of selection for functionality in precursor-B-ALL. *Leukemia* 2002;16:1448–53.
- [11] Hubner S, Cazzaniga G, Flohr T, van der Velden VH, Konrad M, Potschger U, et al. High incidence and unique features of antigen receptor gene rearrangements in TEL-AML1-positive leukemias. *Leukemia* 2004;18:84–91.
- [12] Ford AM, Fasching K, Panzer-Grumayer ER, Koenig M, Haas OA, Greaves MF. Origins of "late" relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion genes. *Blood* 2001;98:558–64.
- [13] Zuna J, Ford A, Peham M, Patel N, Saha V, Eckert C, et al. TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2004;10:5355–60.
- [14] Taub JW, Konrad MA, Ge Y, Naber JM, Scott JS, Matherly LH, et al. High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:2992–6.

- [15] Peham M, Konrad M, Harbott J, König M, Haas OA, Panzer-Grümayer ER. Clonal variation of the immunogenotype in relapsed ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia indicates subclone formation during early stages of leukemia development. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:156–60.
- [16] Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002;1:133–43.

**P4.** Fronkova E., Madzo J., Zuna J., Reznickova L., Muzikova K., Hrusak O., Sary J., Trka J.: TEL/AML1 real-time quantitative reverse transcriptase PCR can complement minimal residual disease assessment in childhood ALL. *Leukemia* 2005; 19: 1296-97

## TEL/AML1 real-time quantitative reverse transcriptase PCR can complement minimal residual disease assessment in childhood ALL

*Leukemia* (2005) **19**, 1296–1297. doi:10.1038/sj.leu.2403759  
Published online 28 April 2005

### TO THE EDITOR

Minimal residual disease (MRD) quantified by immunoglobulin and/or T-cell receptor (Ig/TCR) genes rearrangements real-time quantitative PCR (RQ-PCR) is used for the risk stratification in some of the modern treatment protocols for childhood acute lymphoblastic leukaemia. This accurate and almost generally applicable approach is also laborious and costly. Moreover, in a minority of the patients, a suitable marker (Ig/TCR rearrangement adequately sensitive and specific) cannot be identified, thus precluding proper risk stratification. TEL/AML1 fusion gene – found in approximately 25% of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias (ALL) – is a tempting target for the MRD monitoring using reverse transcriptase RQ-PCR (RQ-RT-PCR). Its use overcomes the need for the individual design and optimisation of RQ-PCR systems, thus lowering both the costs and laboriousness. Our recent study already clearly demonstrated that slower clearance of TEL/AML1 fusion transcript measured by RQ-RT-PCR predicted relapse.<sup>1</sup> If proven to correlate with MRD dynamics assessed by Ig/TCR RQ-PCR, this mRNA-based approach could complement the latter technique in MRD detection in childhood ALL.

Previous reports trying to show such correlation suffered from various limitations; in general, low numbers of samples were studied (particularly those with MRD detectable by at least one target:  $n=6$ ,<sup>2</sup>  $n=13$ <sup>3</sup> and  $n=17$ ,<sup>4</sup> respectively). The inadequate sensitivity of TEL/AML1-targeted RQ-RT-PCR<sup>4</sup> and some of the Ig/TCR RQ-PCR systems used<sup>2</sup> might have also influenced the analyses. De Haas *et al* used only a limited spectrum of Ig/TCR targets (complete Ig heavy chain and TCR delta rearrangements), and only one sample was analysed by two independent Ig/TCR targets,<sup>3</sup> thus not reflecting the real situation in MRD detection. In two of the reports, methods other than RQ-PCR were partially used for target quantitation – competitive PCR<sup>2</sup> and dot-blot approach,<sup>4</sup> respectively. In our recent study, we adhered to the very strict criteria set for Ig/TCR RQ-PCR by the *European Study Group on MRD in ALL*.<sup>5</sup> These apply to the number of targets (two independent rearrangements for each patient), specificity (six independent negative polyclonal controls in each reaction), sensitivity (at least  $10^{-4}$ ) and the rules for calculation of the numerical MRD values. We analysed a total of 117 follow-up bone marrow samples from 28 TEL/AML1-positive patients – 20 newly diagnosed (all treated according to ALL IC-BFM 2002 protocol) and eight relapsed (ALL-REZ BFM 2002).

Both methods we compare here were described previously.<sup>1,5–8</sup> All but three patients were investigated by two independent Ig/TCR targets; the sensitivity was better than  $10^{-4}$

for 48/53 targets and  $5 \times 10^{-4}$  for 5/53 targets. Figure 1 shows the correlation between TEL/AML1 and the Ig/TCR-based method (1a) and between two independent Ig/TCR targets (1b). Although the correlation between TEL/AML1 and Ig/TCR did not reach the excellence of the correlation between two Ig/TCR targets ( $R^2 = 0.903$  and  $0.955$ , respectively), only 8/117 (<7%) samples differed by more than 1 log. This result supports our previous findings that normalised TEL/AML1 expression (TEL/AML1:housekeeping gene ratio) in surviving leukaemic blasts is stable, influenced neither by the cytostatic treatment<sup>1</sup> nor by the sampling-to-processing time within first 48 h (our unpublished data).

From the results of this prospective study (the largest published so far), we conclude that TEL/AML1 RQ-RT-PCR can conveniently complement MRD analysis for the protocol-required risk stratification in childhood ALL if the second Ig/TCR target is not available or not adequately sensitive/specific. There is virtually no risk of false-positive result. However, as an underestimation of MRD level by TEL/AML1 RQ-RT-PCR remains conceivable in a small percentage of samples (~5%), TEL/AML1 should be used as a second-choice target only and always in a combination with Ig/TCR-based technique.

### Acknowledgements

This work was supported by grants IGA-MZ6929, GAUKR62/2004 and MSM0021620813 for the Czech Paediatric Haematology Working Group (CPH).

E Fronkova<sup>1,2</sup>  
J Madzo<sup>1,2</sup>  
J Zuna<sup>1,2</sup>  
L Reznickova<sup>1,2</sup>  
K Muzikova<sup>1,2</sup>  
O Hrusak<sup>1,3</sup>  
J Stary<sup>2</sup>  
J Trka<sup>1,2</sup>

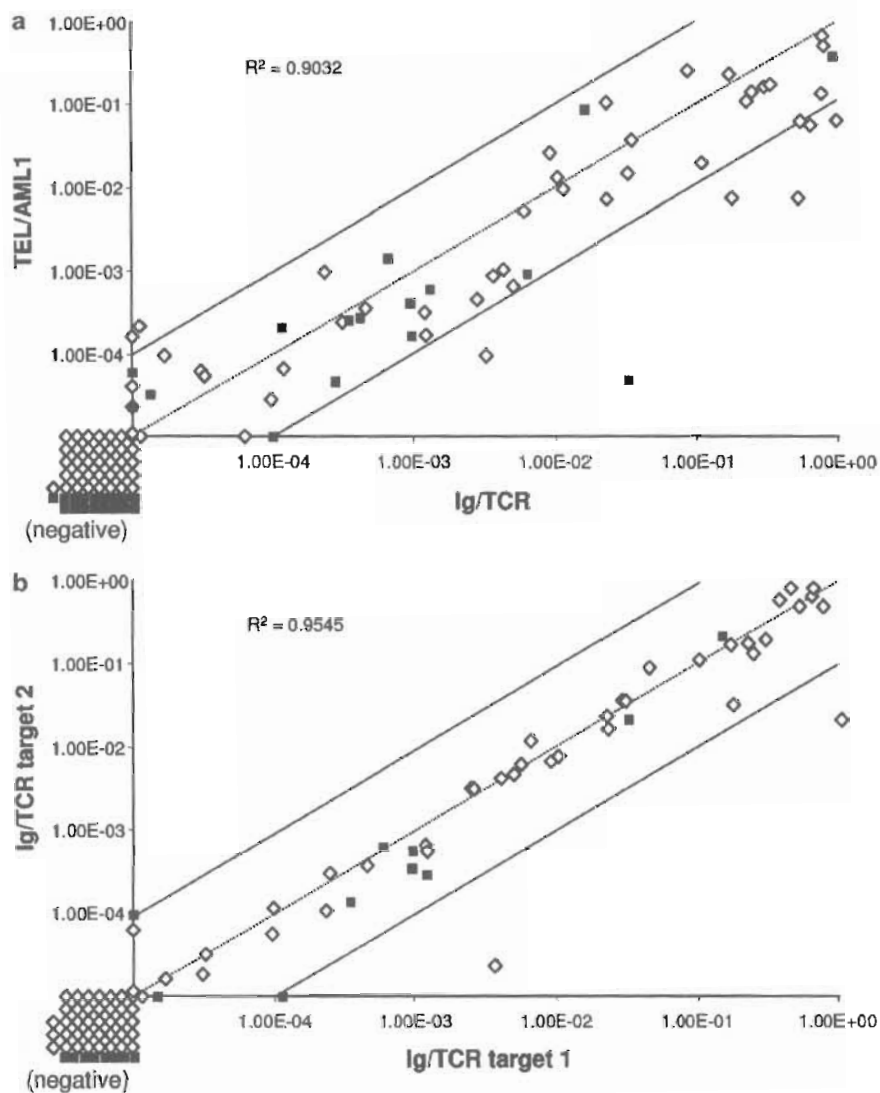
<sup>1</sup>CLIP – Childhood Leukaemia Investigation  
Prague, 2nd Medical School, Charles University,  
Prague, Czech Republic;  
<sup>2</sup>Department of Paediatric Haematology/  
Oncology, 2nd Medical School, Charles  
University, Prague, Czech Republic; and  
<sup>3</sup>Department of Immunology, 2nd Medical  
School, Charles University, Prague, Czech  
Republic

### References

- Madzo J, Zuna J, Muzikova K, Kalinova M, Krejci O, Hrusak O *et al*. Slower molecular response to treatment predicts poor outcome in patients with TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia: prospective real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Cancer* 2003; **97**: 105–113.
- Drunat S, Olivi M, Brunie G, Grandchamp B, Vilmer E, Bieche I *et al*. Quantification of TEL-AML1 transcript for minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; **114**: 281–289.
- de Haas V, Breunis WB, Dee R, Verhagen OJ, Kroes W, van Wering ER *et al*. The TEL-AML1 real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) might replace the antigen receptor-based genomic PCR in clinical minimal residual disease studies in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2002; **116**: 87–93.
- Taube T, Eckert C, Korner G, Henze G, Seeger K. Real-time quantification of TEL-AML1 fusion transcripts for MRD detection in

Correspondence: Dr J Trka, Department of Paediatric Haematology/Oncology, 2nd Medical School, Charles University, V ulu 84, 15006 Prague 5, Czech Republic; Fax: +420 2 2443 6521; E-mail: jan.trka@lfmotol.cuni.cz

Received 18 February 2005; accepted 8 March 2005; Published online 28 April 2005



**Figure 1** Comparison between two targets for MRD monitoring. (a) Comparison of the DNA-based (Ig/TCR) and RNA-based (TEL/AML1) approach. In agreement with ESG-MRD-ALL directions, the higher Ig/TCR value of two available targets was used for comparison. In total, 117 samples were analysed by both methods. Majority of samples (64/117) were positive in at least one system. Area between the lines shows theoretical optimal correlation with <1 log difference between both methods. Only eight samples (<7%) lie outside this area. (b) Comparison of two independent Ig/TCR targets for 96/117 samples analysed in this study.  $\diamond$  – patients on frontline treatment;  $\blacksquare$  – relapsed patients;  $R^2$  = correlation coefficient. For the mathematical analysis, positive samples with MRD values below the quantitative range (otherwise referred as 'positive' only) were set numerically.

- relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. Comparison with antigen receptor-based MRD quantification methods. *Leuk Res* 2004; 28: 699–706.
- 5 Van Der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, Van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17: 1013–1034.
- 6 Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, Wijkhuijs AJ, Jacobs DC, Joosten SA et al. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 1426–1435.

- 7 Szczepanski T, Pongers Willemse MJ, Langerak AW, Harts WA, Wijkhuijs AJ, van Wering ER et al. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. *Blood* 1999; 93: 4079–4085.
- 8 Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 110–118.



**P5.** Fronkova E., Krejci O., Kalina T., Horvath O., Trka J., Hrusak O.: Lymphoid Differentiation Pathways Can Be Traced by TCR $\delta$  Rearrangements. *Journal of Immunology* 2005; 175(4):2495-500

# Lymphoid Differentiation Pathways Can Be Traced by TCR $\delta$ Rearrangements<sup>1</sup>

Eva Froňková,<sup>2\*</sup> Ondřej Krejčí,<sup>2,3\*</sup> Tomáš Kalina,<sup>2\*</sup> Ondrej Horváth,<sup>5</sup> Jan Trka,<sup>\*†</sup> and Ondřej Hrušák<sup>4\*</sup>

*TCR* gene rearrangement generates diversity of T lymphocytes by V(D)J recombination. Ig genes are rearranged in B cells using the same enzyme machinery. *TCRD* (TCR  $\delta$ ) genes are frequently incompletely rearranged in B precursor leukemias and recently were found in a significant portion of physiological B lymphocytes. Incomplete *TCRD* rearrangements (V-D) thus serve as natural indicators of previous V(D)J recombinase activity. Functional V(D)J recombinase has recently been found in murine NK precursors. We tested whether physiological NK cells and other leukocyte subpopulations contained *TCR* rearrangements in humans. This would provide evidence that V(D)J recombinase was active in the ancestry cells and suggest common pathways among the positive cell types. *TCRD* were rearranged in 3.2–36% of NK cells but not in nonlymphoid leukocytes. The previously known phenomenon of *TCRD* transcription in NK cells is a possible mechanism that maintains the chromatin open at the *TCRD* locus. In comparison, *TCRG* rearrangements were frequent in T cells, low to negative in B and NK cells, and negative in nonlymphoid cells, suggesting a tighter control of *TCRG*. Levels of *TCRD* rearrangements were similar among the B lymphocyte subsets (B1-B2, naive-memory). In conclusion, human NK cells pass through a differentiation step with active V(D)J recombinase similar to T and B lymphocytes and unlike nonlymphoid leukocytes. This contradicts recent challenges to the concept of separate lymphoid and myeloid differentiation. *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 2495–2500.

Physiological B, T $\alpha\beta$ , and T $\gamma\delta$  lymphocytes express the IgH + IgL (Ig H and L chains), TCR $\alpha\beta$  or TCR $\gamma\delta$  molecules, respectively. This concept was conserved throughout the last 450 million years of vertebrate development (1). The diversity of an adaptive immune response originates from the rearrangements of multiple gene loci (called V, D, and J) coding for Ig and TCR (2). The general organization of the V, D, and J gene loci as well as the enzyme machinery (including RAG-1, RAG-2, and nonhomologous end-joining DNA repair enzymes) involved in their rearrangement are similar among various *TCR* and *IG* genes (2). The regulatory mechanisms that allow V(D)J rearrangement of the appropriate genes include chromatin accessibility of either *TCR* or *IG* genes (3). However, the events driving the precursor cell toward rearrangement of *TCR* vs *IG* genes are not yet completely understood. These events appear to be connected to the fundamental T vs B lineage decision. In this respect, a previously accepted concept proposed that B cells exclusively rearrange *IG* genes, but not *TCR* genes, and vice versa for T cells (2). Leukemia cells from B and NK lineages break this rule by rearranging *TCR* genes in most cases (4). The most frequently rearranged *TCR* genes in B precursor leukemias are *TCRG* and *TCRD* (59 and 55%

respectively), followed by *TCRB* (35%) (4, 5). *TCRD* rearrangements have been reported in NK leukemia (6). Frequent *TCR* rearrangements in B precursor leukemias led to several hypotheses linking the inadequate regulation of recombinase activity to the malignant process (4, 7–9).

Our recent study has shown that incomplete *TCRD* rearrangements that are indistinguishable on the molecular level from those observed in typical B precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL)<sup>5</sup> lymphoblasts could be found in B cells of all normal subjects tested (10). Thus, the “cross-lineage” rearrangements in leukemia may be facilitated by a physiological situation in which developing B lymphoid cells allow incomplete *TCRD* rearrangements. In fact, end-point PCR results of Steenbergen et al. (11) in the mid-1990s already indicated the presence of *TCRD* rearrangements in healthy peripheral B cells. No quantitative data were available until the real-time quantitative (RQ)-PCR results, which confirmed that *TCRD* are present in up to 16% of the alleles of purified B cells in normal human subjects (10). These findings suggest that rearrangements in *TCRD* genes can be used as naturally occurring markers of recombinase activity also in other human cell types. Therefore, we used this approach to analyze incomplete *TCRD* rearrangements in all major subsets of human peripheral blood leukocytes. This approach shows which cells have passed through a developmental step with active recombinase and may add important information to the recent reappraisal of leukocyte differentiation pathways (12). The situation, however, appears to be more complicated with other *TCR* and *IG* genes, which are rearranged later in the respective lineage differentiation (13) and different strength of regulation applies to them (14). To test whether *TCRG* genes rearrange in the “improper” lineage with

<sup>1</sup>Childhood Leukemia Investigation Prague, Czech Republic; <sup>2</sup>Department of Pediatric Hematology/Oncology and <sup>3</sup>Department of Immunology, Charles University 2nd Medical School, Prague, Czech Republic; and <sup>4</sup>Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

Received for publication August 31, 2004. Accepted for publication June 1, 2005.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>5</sup>This work was supported by Projects MSM0021620813, IGA NE7430-3, GAUK 62/2002 and NR0269-3/2005.

<sup>6</sup>E.F. and O.K. contributed equally to this work.

<sup>7</sup>Current address: Cincinnati Children's Hospital Medical Center, OH.

<sup>8</sup>Address correspondence and reprint requests to Dr. Ondřej Hrušák, Childhood Leukemia Investigation Prague, Department of Immunology, Vukala 84, 150 06 Praha 5, Czech Republic. E-mail address: Ondrej.Hrusak@fnmotl.cuni.cz

<sup>9</sup>Abbreviations used in this paper: ALL, acute lymphoblastic leukemia; RQ, real-time quantitative;  $\beta 2m$ ,  $\beta_2$ -microglobulin; CLP, common lymphoid progenitor; pos, positive; neg, negative.

the same frequency (as one might speculate due to their high frequency in B-lineage ALL), we adopted a similar RQ-PCR system for the detection of *TCRG*.

## Materials and Methods

### Cells and donors

Cells were isolated from peripheral blood of healthy donors by Ficoll-Paque (density, 1.077 g/ml; Pharmacia) density centrifugation. DNA from cell lines HT29 (colon carcinoma), BT474 (breast carcinoma), HeLa, and AC (XX cells from amniocentesis) served as a negative control. Peripheral blood from a patient with a complete DiGeorge syndrome containing <0.1% CD3<sup>pos</sup> cells (of lymphocytes) was used for B and NK cell sorting. Manipulation with volunteer donor and patient cells was performed after obtaining an informed consent and in compliance with the institutional ethical board.

### Cell separation and DNA isolation

**Sorting of NK cells.** Cells were stained with a combination of FITC-labeled anti-CD3 and either PE-labeled anti-CD56 (samples 1 and 2) or pooled PE-labeled anti-CD56 and anti-CD16 (Immunotech). CD3<sup>neg</sup>CD16<sup>neg</sup>CD56<sup>pos</sup> cells were sorted either on FACS Vantage<sup>SE</sup> cell sorter (samples 1–5) or on FACS Aria (samples 6 and 7) (both from BD Biosciences). The purity of sorted NK cells was verified by reanalysis of the samples on the cell sorter (total purity: samples 1–5, >99% NK cells; samples 6 and 7, 96% NK cells; all samples, 0.0–0.1% CD3<sup>pos</sup> cells in sorted NK fraction).

**Sorting of B cell subsets.** Cells were stained with PE-labeled anti-CD19 (Diatec) combined with a FITC-labeled mAb against either CD5 (Serotec) or CD27 (BD Biosciences). In addition, biotinylated mAbs against CD3 and CD56 (Serotec) were added followed by a streptavidin-tricolor (Caltag Laboratories) staining. Propidium iodide was added to exclude dead cells. All B cells were sorted as CD19<sup>pos</sup>CD3<sup>neg</sup>CD56<sup>neg</sup>propidium iodide<sup>neg</sup> and the subsets were sorted as: B1, CD5<sup>pos</sup>; B2, CD5<sup>neg</sup>, memory CD27<sup>pos</sup>, and naive CD27<sup>neg</sup>. The purity of sorted B fractions was >97.8%, in all except one sample (one B2 sorted sample was 96.5% pure, containing 3.3% events negative for all Ags assessed). Possible CD3<sup>pos</sup> contamination ranged from 0.0 to 0.38%, median 0.0%.

**Sorting of T cells.** T cells were sorted along with the sorting of total B cells (10) (five specimens) as CD3<sup>pos</sup>CD19<sup>neg</sup> or in combination with the NK sorting of specimens 6 and 7 (described above) as CD3<sup>pos</sup>CD16<sup>neg</sup> cells. Granulocytes were obtained by magnetic depletion of CD3<sup>pos</sup> and CD19<sup>pos</sup> cells (Miltenyi Biotec) from granulocyte-erythrocyte fractions after Ficoll-Paque density centrifugation. The purity was >99% of CD3<sup>neg</sup>CD19<sup>neg</sup> cells. Monocytes were obtained by repeated magnetic separation of CD14<sup>pos</sup> cells (Miltenyi Biotec). The purity was >94% of CD14<sup>pos</sup> and >98% of CD3<sup>neg</sup>CD19<sup>neg</sup> cells, CD3<sup>pos</sup> cells ranging from 0.16 to 0.52%, median 0.38% per sorted population. Genomic DNA from sorted cells was isolated by a QIAamp DNA Blood micro Kit or Mini kit (both from Qiagen). DNA was stored in  $-20^{\circ}\text{C}$  before processing.

### RQ-PCR

RQ-PCR for *TCRD* was performed as described previously (10) in the LightCycler rapid thermal cycler system (Roche Diagnostics). RQ-PCR for *TCRG* was performed in the iCycler IQ thermal cycler system (Bio-Rad). Forward V $\gamma$ I, V $\gamma$ II, and V $\gamma$ IV family-specific primers were described previously (15). For V $\gamma$ I-J $\gamma$  and V $\gamma$ II-J $\gamma$  rearrangements, the J $\gamma$  1.3/2.3–3' reverse primer and T $\gamma$ 1.3/2.3 germline TaqMan probe are designed to recognize both the J $\gamma$ 1.3 and J $\gamma$ 2.3 gene segments (16). V $\gamma$ IV-J $\gamma$  rearrangements were detected in the analogous manner using the consensus forward V $\gamma$ IV primer, J $\gamma$ 1.1/2.1 reverse primer, and T $\gamma$ 1.1/2.1 TaqMan probe (16). PCR amplification was conducted in 1 $\times$  reaction buffer (20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 50 mmol/L KCl, and 3.0 mmol MgCl<sub>2</sub>) containing 200  $\mu\text{mol/L}$  of each dNTP, 0.25  $\mu\text{mol/L}$ , 0.5  $\mu\text{mol/L}$ , and 0.5  $\mu\text{mol/L}$  of V $\gamma$ I, V $\gamma$ II and V $\gamma$ IV forward primers, respectively, 0.5  $\mu\text{mol/L}$  of reverse primer, 0.2  $\mu\text{mol/L}$  of the probe, BSA in a final concentration of 0.04%, and 1 U of Platinum TaqDNA polymerase (Invitrogen Life Technologies) in a final reaction volume of 25  $\mu\text{l}$ . For each PCR, 1  $\mu\text{l}$  of DNA at a concentration of 0.01–0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  was used. The cycling conditions were as follows: initial denaturing at 94 $^{\circ}\text{C}$  for 5 min, 50 cycles of denaturing at 94 $^{\circ}\text{C}$  for 15 s, and annealing-extension at 64 $^{\circ}\text{C}$  for 1 min.  $\beta_2$ -microglobulin housekeeping gene ( $\beta_2\text{m}$ ) was used to normalize the DNA concentration and quality. The system for quantification of  $\beta_2\text{m}$  was described previously (17). Quantification was performed with iCycler IQ Optical System software, version 3.0a.

The starting concentration of template was measured against a dilution series of positive control DNA in buffered water. The REH cell line served as a positive control for the V $\delta$ 2-D $\delta$ 3, V $\gamma$ I-J $\gamma$ 1.3/2.3, and V $\gamma$ II-J $\gamma$ 1.3/2.3 rearrangements. For the D $\delta$ 2-D $\delta$ 3 and V $\gamma$ IV-J $\gamma$ 1.1/2.1 systems, patient samples bearing monoclonal rearrangement were used as a reference. Each sample was run in duplicate and the mean value was used for further analysis. The sensitivity of all RQ-PCR systems was better than  $3 \times 10^{-4}$ , representing approximately four to eight rearranged alleles per reaction. The amount of rearranged alleles presented here is a ratio between the concentration of rearranged genes and  $\beta_2\text{m}$ . Any non-T specimen was considered positive if the specific *TCR* signal exceeded the sensitivity threshold, given as the frequency of alleles of possible T cell contaminants. PAGE analysis of PCR products was performed on 5% polyacrylamide gel (Sigma-Aldrich).

GeneScan analysis was performed using the VD2 primer labeled at its 5' end with FAM. Aliquots of PCR products (1  $\mu\text{l}$ ) were mixed with 10  $\mu\text{l}$  of Hi-Di formamide and 0.5  $\mu\text{l}$  of the GeneScan-500 [ROX] internal size standard (Applied Biosystems). The products were separated on 3100 POP-6 polymer (Applied Biosystems) and analyzed by 310 GeneScan 3.7 software (Applied Biosystems).

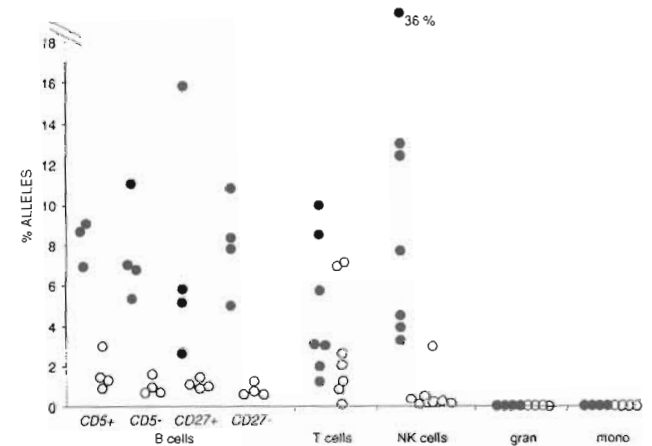
### Cloning and DNA sequencing

Cloning of PCR products was performed with a TOPO TA Cloning kit (Invitrogen Life Technologies). Plasmid DNA from 45 single colonies (2–3 colonies per sorted population) was isolated using a JETPREP Plasmid Miniprep kit (GENOMED). The presence of the V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 insert was verified by PCR using primers identical to those used in the RQ-PCR analysis. Forty colonies with a clear monoclonal band on PAGE were selected for sequencing. Sequencing was performed in the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer with a BigDye Primer v3.0 Sequencing kit (Applied Biosystems).

## Results

### TCRD gene loci rearrange in NK cells

RQ-PCR analysis of purified CD3<sup>neg</sup>CD56<sup>pos</sup> cells of two different donors showed a clear positivity of the rearranged *TCRD* gene, which corresponded to 4.5 and 12.4% of the alleles, respectively. Similarly, a subsequent analysis of CD3<sup>neg</sup>CD56<sup>pos</sup> cells from five different donors showed rearrangement V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 in 3.2–36% of the alleles and D $\delta$ 2-D $\delta$ 3 in 0.13–3.0% of the alleles (Fig. 1). In addition, we analyzed sorted B and NK cells of a patient with a complete DiGeorge syndrome for presence of rearranged V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 alleles; they were present in 24 and 32%, respectively. No T cell contamination



**FIGURE 1.** Percentage of *TCRD* rearranged alleles in sorted cells. Frequency of V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 (●) and D $\delta$ 2-D $\delta$ 3 (○) rearranged alleles in B cell subsets, including B1 (CD5<sup>pos</sup>), B2 (CD5<sup>neg</sup>), naive (CD27<sup>neg</sup>) and memory (CD27<sup>pos</sup>), T cells (CD3<sup>pos</sup>), NK cells (sorted either as CD3<sup>neg</sup>CD56<sup>pos</sup> or CD3<sup>neg</sup>CD56<sup>pos</sup>), monocytes, and granulocytes. The percentage is derived from a dilution curve of a positive control (100%) bearing monoclonal rearrangement. REH cell line (V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 rearrangement) and primary lymphoblasts from a patient with ALL (D $\delta$ 2-D $\delta$ 3 rearrangement) were used as a positive control.

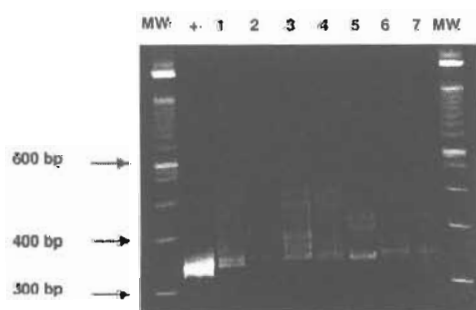
(0 among >4200 acquired events) was detected in the sorted specimens. No amplification signal was detected in the non-lymphoid DNA samples (granulocytes and monocytes) during the entire RQ-PCR analysis. The PCR products were reanalyzed by PAGE. In all blood NK cell specimens, the products contained oligoclonal to polyclonal DNA (Fig. 2). Both positive controls, REH lymphoblastic cell line, and a sample of an ALL patient with one *TCRD*-rearranged allele, showed a clear monoclonal band. The fact that the patterns of PCR products differ among the donors virtually excludes false positivity due to the contamination by PCR products. It should be noted that our system detects only an incomplete *TCRD* rearrangement since rearrangement of any *Jδ* locus to the *TCRDδ3* would prevent binding of the reverse primer (18). Therefore, incomplete rearrangements of *TCRD* are present in peripheral NK cells. Along with our previous finding that both B and T lymphocytes contain the *TCRD* rearrangement, we now show that all major lymphoid lineages, unlike other cells investigated, contain rearranged *TCRD* genes. NK cells thus, similarly as T and B lymphocytes, pass through a stage with an active V(D)J recombinase apparatus.

#### Size of the PCR products corresponds with the expected base pair length

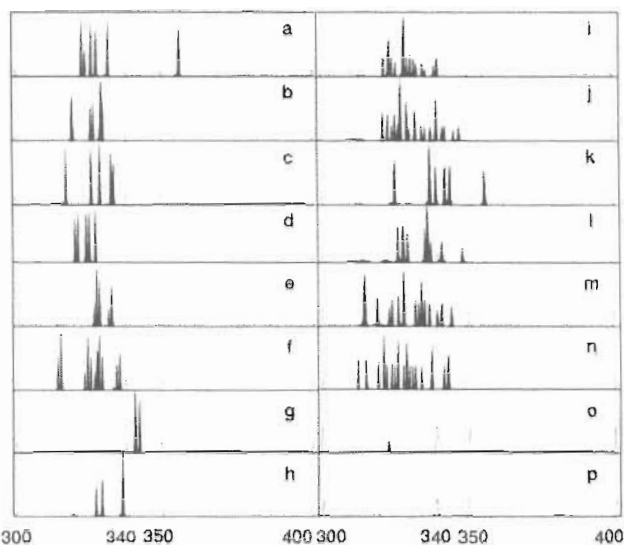
To address the size of the PCR products, we performed a capillary electrophoresis under denaturing conditions. Specific PCR products are expected to have approximately the same size (300–350 bp in our system). As shown in Fig. 3, the sizes of the products fit to the expected range in all of the lymphocytic subsets tested as well as in the control leukemic cell line. Patterns of the amplified PCR products vary among different aliquots of the same sample, suggesting different unique sequences are amplified in each individual PCR. The calculated numbers of rearranged alleles range from 60 to 300/aliquot. Therefore, the interaliquot differences can be viewed as a consequence of random amplification.

#### Sequencing confirms *TCRD* rearrangements

We have cloned RQ-PCR *Vδ2-Dδ3* products in *Escherichia coli* to obtain monoclonal copies of incompletely rearranged *TCRD* locus genes suitable for sequencing. Plasmid DNA from 40 single colonies was sequenced. Two colonies revealed an unspecific signal and sequences of all others are shown in Table I. In six observations, two colonies representing PCR products from the same specimen had identical sequences. Capillary electrophoresis performed at the end stage of PCR revealed that a limited number of products dominated the reaction. It is therefore not unlikely to observe the same PCR product to be cloned in different bacterial colonies. All 13 different colonies selected from 7 peripheral NK cell samples contained a sequence of the *Vδ2-Dδ3* rearrangement. Nucleotides (1–9 bp) were inserted in each sequence. Deletions of nucleotides



**FIGURE 2.** PAGE analysis of *Vδ2-Dδ3* rearrangements. Peripheral NK lymphocyte samples are shown in lanes 1–7. Positive control REH cell line is shown (+). MW indicates 100-bp molecular marker.



**FIGURE 3.** GeneScan electrophoretograms from ABI 310 Genetic Analyzer. *VD2-DD3* PCR products from  $CD3^{pos}$  (a and b),  $CD3^{neg}CD56^{pos}$  (c and d),  $CD3^{neg}CD16,56^{pos}$  (e and f),  $CD19^{pos}5^{pos}$  (g and h),  $CD19^{pos}CD5^{neg}$  (i and j),  $CD19^{pos}CD27^{pos}$  (k and l), and  $CD19^{pos}CD27^{neg}$  (m and n); duplicates of each sorted subpopulation are always acquired from the same donor. A 324-bp REH cell line monoclonal product (100× diluted) is shown in o, the HeLa cell line sample did not show any amplification (p).

from the 3' end of the V segment or the 5' end of the D segment were present each time in 12 clones.

#### No difference in *TCRD* rearrangement pattern among B cell subsets

We have previously found *Vδ2-Dδ3* and *Dδ2-Dδ3* rearrangements in 8.3–15% and 6.5–16% alleles of human adult peripheral B lymphocytes, respectively (10). Our next aim was to investigate whether B1 and B2 subsets of B lymphocytes contain different proportions of the *TCRD* rearrangement, which would suggest a different regulation of the rearrangement activity within these two lineages and/or interactions between *TCRD* rearrangements and B1/B2 decision making. With respect to the *IG* rearrangement, there are differences between the B1 and B2 repertoires, although less prominent than previously thought (19). However, we found no difference among the percentage of cells with *TCRD* rearrangements between B1 and B2 subsets (*Vδ2-Dδ3*, 6.9–21%, 5.3–11%; *Dδ2-Dδ3*, 0.9–3%, 0.6–1.6% in B1 and B2 cells, respectively; Fig. 1). We then asked whether the process of affinity maturation influenced the percentage of B cells with cross-lineage *TCRD* rearrangements. We found no differences between the naive ( $CD27^{neg}$ ) and memory ( $CD27^{pos}$ ) B cells regarding the percentage of cells with *TCRD* rearrangements (*Vδ2-Dδ3*, 5–11% and 2.6–16%; *Dδ2-Dδ3*, 0.6–1.4% and 0.6–1.2% in naive and memory B cells, respectively). B cells bearing the *TCRD* rearrangement are thus functional B lymphocytes capable of maturation upon Ag stimulation, not defective cells arrested in a naive form. There is no obvious difference in the number of inserted and deleted nucleotides between the investigated subsets (Table I).

#### Low level of *TCRG* rearrangements in B subsets and NK cells

We further examined whether some rearrangements of *TCRG* ( $\gamma$ ) are also present in sorted cell populations. We analyzed rearrangements in *Vγ1*, *Vγ11*, and *Vγ14* families using family-specific forward primers and reverse primers located in the respective *Jγ* segments. In all sorted T lymphocytes, a high percentage of

Table I. Sequence of TCRD V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 rearrangements in NK, T, B1, and B2 cells<sup>a</sup>

Sample	Colony	V $\delta$ 2 3' End	Inserted Nucleotides	D $\delta$ 3	
				Coding Sequence	3' Recombination Signal Sequence
Germline Sequence					
NK 1	A,B	ctgtgacac...		actgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
2	A	ctgtg.....	GA	.....ggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	B	ctgtgacacc	GACACTCC	..ctgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	C	ctgtgacac.	CTGAT	..ctgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
3	A	ctgtgacac.	TTC	.....ggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	B	ctgtg.....	T	.....ggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	C	ctgtgacacc	GGAAGGGGG	.....	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
4	A,B	ctgtgac....	ACTTGA	... tgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
5	A	ctgtg.....	CCGT	actgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	B	ctgtgacacc	CACAC	..ctgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	C	ctgtgacac.	GT	actgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
6	A,B	ctgtgacacc	GGAGGGA	.....gggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
7	A	ctgtg.....	GGAA	actgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	B	ctgtg.....	GGT	actgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
T 1	A	ctgtgac....	CCGT	..ctgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	B	ctgtgac....	GGG	actgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
2	A	ctgtgacac.	TGTGCTGGAAC	..ctgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	B	ctgtgac....	CCTCTT	..ctgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
B1 1	A,B	ctgtgacacc	CCTATAAAGT	actgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
2	A,B	ctgtgacacc	AGCTT	actgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
3	A	ctgtg.....	TCCGATPCC	.....gggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	B	ctgtgacacc	CTGGT	actgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	C	ctgtgacacc	GG	actgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
4	A,B	ctgtgacac.	AA	actgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	C	.....		.....tacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
B2 1	A	ctgtg.....	GCGGAGGCGAGGGGGCGGAG	actgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	B	ctgtg.....	CTGTGA	.....gggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
2	A	ctgtg.....	ACCCPCCCCAGT	actgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	B	ctgtgacacc	AGAGATGGTGTAGA	.....g	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
3	A	ctgtgacac.	AA	.....gggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	B	ctgtgacacc	ACGAGAA	.....atacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
4	A	ctgtgacacc		... tgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct
	B	ctgtgacacc	GCCAGGCTCCGG	... tgggggatacg	cacagtgtctacaaaacctacagagacctgtacaaaacct

<sup>a</sup> Amplified DNA was cloned and colonies were sequenced. At least two colonies from each donor were sequenced. In donors 1, 4, and 6 (NK cells) and donors 1, 2, and 4 (B1 cells), two colonies presented identical sequences. Germline sequence from NCBI (accession number NG\_001332) is in bold. The entire sequence of the V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 junction is shown. The 3' end of V $\delta$ 2 segment, inserted nucleotides, and the D $\delta$ 3 segment with 3' adjacent recombination signal sequence are indicated. Heptamer and nonamer of the recombination signal sequence are marked with gray background. Dots represent deleted nucleotides.

rearranged *TCRG* alleles was present (Table II). Clearly, *TCRG* is often rearranged in both alleles, as described previously (20). In contrast, B cell subpopulations contained only low levels of rearranged *TCRG* alleles. Similarly, the level of *TCRG* rearranged alleles in sorted NK cells was low to negative (Table II). As in the case of *TCRD*, PAGE analysis confirmed oligoclonal to polyclonal rearrangements in positive samples, whereas all T cell samples showed a polyclonal smear (data not shown). We found no such rearrangements in granulocytes, monocytes, and non-blood cells.

## Discussion

### Incomplete rearrangements of TCRD are present in peripheral NK cells

Presented data show that NK cells as well as T and B lymphocytes contain incomplete *TCRD* rearrangements. This complies with the recent data by Borghesi et al. (21), which proved high RAG2 ex-

pression in murine NK precursors; the cells indeed did rearrange an artificial recombinase target. In addition, TdT<sup>pos</sup> cells do develop also into NK cells (22). Furthermore, 3 of 62 splenic murine NK cells contained D-J $\delta$  joins when analyzed by single-cell PCR (21). To date, there is no known physiological recombinase target in NK lineage and this is the first report showing a natural outcome of RAG gene activity in the form of V(D)J rearrangements in human NK cells. Early studies could not find *TCRD* rearrangements in NK cells by Southern blot (23, 24). The incomplete VD rearrangements that are described possibly evaded the detection by Southern blot, because <5% of rearranged alleles are likely to remain undetected unless they represent a single clone. Because there is no evidence showing the expression of immunoreceptor genes by NK cells, only incomplete V(D)J rearrangements are likely to be present in NK cells. A possible explanation of the observed data is that the final decision for NK lineage commitment

Table II. Percentage of rearranged TCRG alleles in sorted cells<sup>a</sup>

Cell Population	V $\gamma$ 1-J $\gamma$ 1.3/2.3		V $\gamma$ 11-J $\gamma$ 1.3		V $\gamma$ 1V-J $\gamma$ 1.1	
	Positive Total	Median (Range) (%)	Positive Total	Median (Range) (%)	Positive Total	Median (Range) (%)
T cells	7/7	113 (82-142)	7/7	18 (1.3-34)	7/7	4.16 (2.2-5.7)
B cells	5/5	0.8 (0.76-3.8)	2/5	0 (0-1.18)	1/4	0 (0-0.52)
Memory B cells	4/4	0.32 (0.19-2.9)	3/4	0.18 (0-0.29)	1/4	0 (0-0.31)
Naive B cells	3/4	0.28 (0-0.38)	1/4	0 (0-0.31)	0/4	0 (0-0)
B2 cells	4/4	0.36 (0.19-0.68)	2/4	0.06 (0-0.16)	0/4	0 (0-0)
B1 cells	3/4	0.37 (0-1.55)	1/4	0 (0-0.29)	0/4	0 (0-0)
NK cells	1/7	0 (0-0.38)	0/7	0 (0-0)	0/7	0 (0-0)

<sup>a</sup> RQ-PCR with family-specific primers in the V $\gamma$  segment and reverse primers in the respective J loci were used to quantify the rearranged alleles in each sorted population. Frequencies of positive results and percentage of rearranged alleles are indicated. Note that the percentage of rearranged *TCRG* alleles in non-T cell populations is close to the sensitivity limit of the method, contrasting with the results for *TCRD*.

takes place in developmental stages, in which some V(D)J rearrangements are allowed. One can speculate whether the definitive NK lineage decision prevents completion of V(D)J rearrangement or whether the complete V(D)J rearrangement is the principal factor that determines the lineage decision towards B, T $\alpha\beta$ , or T $\gamma\delta$  lineages.

Mature NK cells do not contain RAG-1 activity (24), indicating that the *TCRD* rearrangements occur early during differentiation. Complying with this, the *TCRD* rearrangements in the NK cells appear to have occurred at early stages when TdT is active, since N nucleotides are inserted. In addition, NK cells are known to transcribe the *TCRD* locus. The resulting transcripts vary in length (0.8–2.3 kb), transcribe the J and C regions of *TCRD*, and have an unknown function. The analysis of their sequence locates the transcription initiation site immediately downstream of the D $\delta$ 3 gene segment. Therefore, the VD rearrangements described in this article would not affect the size of these transcripts. Germline transcription of the VDJ regions is important for opening the chromatin before the V(D)J rearrangements (25). To our knowledge, *TCRD* transcripts have not been studied in NK cell precursors. A possible link between *TCRD* transcripts and the V(D)J rearrangements should be addressed in appropriate differentiation stages.

#### *TCR $\gamma$ and TCR $\delta$ : relationships between biological importance and cross-lineage rearrangements*

There are multiple checkpoints on which the rearrangements and expression of immunoreceptor genes are regulated. One of the key regulatory mechanisms is chromatin accessibility, which is driven mostly by *cis*-acting transcriptional elements allowing germline transcription, sequence-specific transcription factors, and chromatin structure changes (14). Complex regulatory mechanisms cause various loci to be rearranged at different stages of cell differentiation, *TCRD* being among the earliest, and also that some loci are nonrandomly preferred for recombination (14). Recently, murine B cell precursors have been shown to express functional V(D)J recombinase, even before the chromatin of *IGH* genes opens for its activity (26). The immunoreceptor genes with open chromatin that is rearranged by such recombinase activity would result in findings that are described here and previously (10).

Our data showing V $\gamma$ 1-J $\gamma$ 1.3 rearrangements as the most frequent among T cells (followed by V $\gamma$ II and V $\gamma$ IV) are in line with the observed frequency of V $\gamma$  rearrangements in ALL, showing 56, 18, and 1% of childhood ALL cases with V $\gamma$ 1, II, and IV rearrangements, respectively (4). However, the *TCRG* genes are rearranged much less frequently than *TCRD* in healthy non-T cells and in some cases even below the detection limit of the method used in this study. The hypothesis that *TCRD* rearrangements in leukemic cells just represent a physiologically occurring phenomenon cannot be generalized and certainly is not true for immunoreceptor genes under tighter regulation. Presented data only show that *TCRG* rearrangements do occur in normal B cells. The reason why they are so frequent in B precursor ALL may be explained by one of the previously posed hypotheses: protracted V(D)J recombinase activity could lead to rearrangements of the "improper loci" (7); leukemic cells could develop from those B cells that fail to die by apoptosis (4); and unregulated V(D)J recombinase could also take place in the malignant transformation itself (9). Alternatively, cells with rearranged *TCRG* could be prone to the malignant transformation. Another hypothesis, which in the authors' opinion does not have much support from immunophenotyping or other recent studies, proposed that malignant cells could derive from a yet undetermined B/T precursor (8).

Interestingly, V $\delta$ 2<sup>pos</sup> T $\gamma\delta$  cells represent probably the first lymphocyte subpopulation that matures in human ontogeny after birth

(27). Although the crucial target Ags (comprising low molecular mass nonprotein molecules (1)) for these V $\delta$ 2<sup>pos</sup> cells are yet to be specified, their high biological significance has been envisaged (27). Unlike T $\alpha\beta$  cells, the crucial role of T $\gamma\delta$  lymphocytes is in local immunity, with no or limited possibility of positive selection leading to clonal expansion (28, 29). Therefore, it seems important to keep the V $\delta$ 2 locus accessible for recombination machinery. Recent study shows that a principle of allelic exclusion is applied to the human *TCRD* gene at the level of completed rearrangement (30). Analogously, regulatory mechanisms that prevent the ectopic *TCR $\delta$*  expression are utilized only downstream of the V to D rearrangement, leading to the absence of completed VDJ $\delta$  rearrangements in non-T cells (10).

#### *Developmental perspective*

The presented data collectively shows that *TCRD* rearrangements can be used to track progeny cells of precursors with an active V(D)J recombinase. Obviously, both presented data and our previous findings (10) show that only every tenth cell in each population appears to have the V $\delta$ 2D $\delta$ 3 rearrangement. Therefore, a sufficient number of cells need to be sorted to obtain quantifiable RQ-PCR data. This method showed that leukocyte lineages that are traditionally considered to be derived from a common lymphoid progenitor (except for lymphoid dendritic cells, which were not tested) pass through a stage with active V(D)J recombinase, whereas myeloid/monocytic cells do not. For the first time, human NK cells were shown to rearrange any V(D)J, which complements recent findings of *IG* rearrangements in mice (21).

Separate lymphoid and myeloid development stemming from the respective common progenitors have been included in the hematology textbooks for many years. Katsura (12) has recently challenged this concept, showing that sorted mouse fetal cells rarely give rise to B and T lineages in fetal thymic organ culture, whereas bi-potent B myeloid or T myeloid precursors could be identified. The authors interpreted this as an indication that B and T lineages first separate from each other and only then each of these lineages separates from myeloid fate. Other studies do not support this view, characterizing progenitors of lymphoid developmental potential by multiple approaches, including gene expression profiling (31, 32). The refusal of the common lymphoid progenitor (CLP) has been contested from several viewpoints, including possible *in vitro* cellular interactions that may inhibit CLP function in the model (33). Alternatively, a cell committing to the T lineage in this clonal assay may inhibit neighboring cells to become B cells.

Presented *TCRD* rearrangement data expand expression profiling studies identifying RAG2 as one of the genes discriminating CLP (32). Based on these data, all lymphoid cell lines pass through a stage with an active VDJ complex in ancestry, and *TCRD* rearrangements serve as a suitable marker of commitment to lymphoid lineage. Moreover, our data strongly support the existence of distinct lymphoid and myeloid progenitors.

#### **Disclosures**

The authors have no financial conflict of interest.

#### **References**

- Hayday, A. C. 2000.  $\gamma\delta$  Cells: a tight time and a tight place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 975–1025.
- Rich, R. R. 2001. The human immune response. In *Clinical Immunology. Principles and Practice*, Vol. 1. J. H. W. Schroeder, ed. Mosby, London, p. 1.1.
- Stanhope Baker, P., K. M. Hudson, A. L. Shaffer, A. Constantinescu, and M. S. Schliessel. 1996. Cell type-specific chromatin structure determines the targeting of V(D)J recombinase activity *in vitro*. *Cell* 85: 887–897.
- Szczepanski, T., A. Beisbiizen, M. J. Pongers-Willemse, K. Hählen, E. R. Van Wering, A. J. Wijkhuijs, G. J. Tibbe, M. A. De Bruijn, and J. J. Van Dongen. 1999. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur

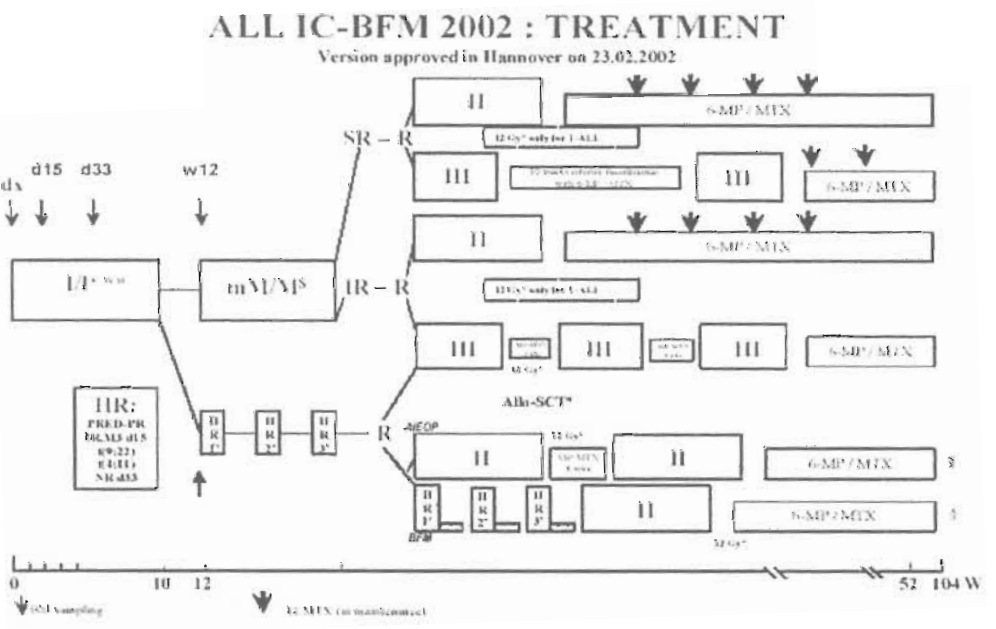
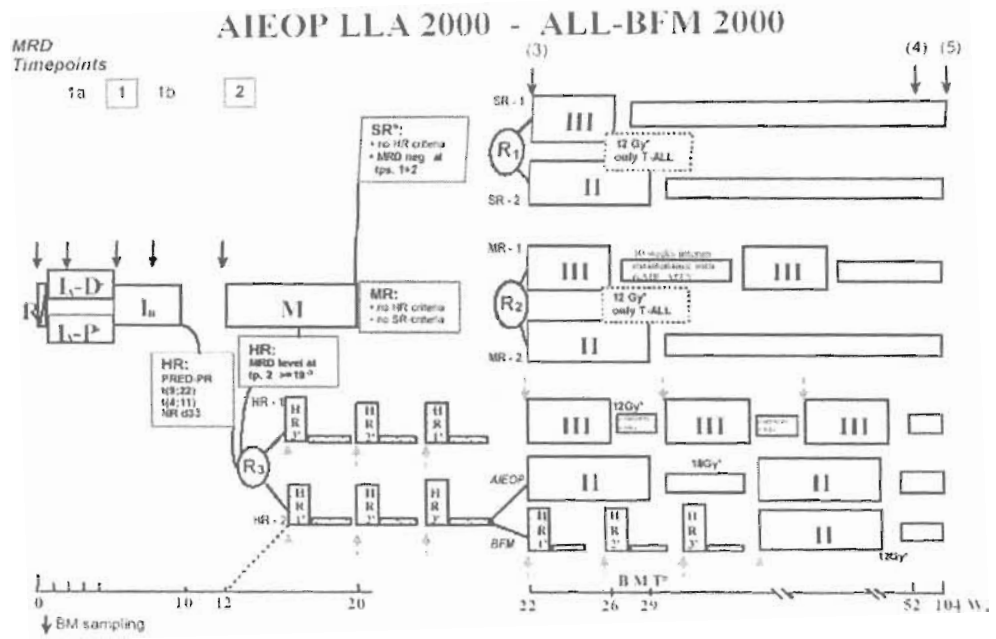
- in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 13: 196–205.
5. Brumpt, C., E. Delabesse, K. Beldjord, F. Davi, J. M. Cayuela, C. Millien, P. Villarese, P. Quartier, A. Buzyn, F. Valensi, and E. Macintyre. 2000. The incidence of clonal T-cell receptor rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia varies with age and genotype. *Blood* 96: 2254–2261.
  6. Stagno, F., P. Guglielmo, A. Santonocito, and R. Giustolisi. 2004. T cell receptor  $\delta$ -chain gene rearrangement in a novel case of adult NK cell leukemia. *Acta Haematol.* 111: 225–227.
  7. LeBien, T. W., R. L. Elstrom, M. Moseley, J. H. Kersey, and F. Griesinger. 1990. Analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in human fetal bone marrow B lineage cells. *Blood* 76: 1196–1200.
  8. Griesinger, F., J. M. Greenberg, and J. H. Kersey. 1989. T cell receptor  $\gamma$  and  $\delta$  rearrangements in hematologic malignancies. Relationship to lymphoid differentiation. *J. Clin. Invest.* 84: 506–516.
  9. Greaves, M. F., L. C. Chan, A. J. Furley, S. M. Watt, and H. V. Molgaard. 1986. Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia. *Blood* 67: 1–13.
  10. Krejci, O., Z. Prouzova, O. Horvath, J. Trka, and O. Hrusak. 2003. Cutting edge: TCR  $\delta$  gene is frequently rearranged in adult B lymphocytes. *J. Immunol.* 171: 524–527.
  11. Steenbergen, E. J., O. J. Verhagen, E. F. van Leeuwen, H. van den Berg, A. E. von dem Borne, and C. E. van der Schoot. 1995. Frequent ongoing T-cell receptor rearrangements in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: implications for monitoring minimal residual disease. *Blood* 86: 692–702.
  12. Katsura, Y. 2002. Redefinition of lymphoid progenitors. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 127–132.
  13. Blom, B., M. C. Verschuren, M. H. Heemskerk, A. Q. Bakker, E. J. van Gastel Mol, I. L. Wolvers Tettero, J. J. van Dongen, and H. Spits. 1999. TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood* 93: 3033–3043.
  14. Livak, F., and H. T. Petrie. 2002. Access roads for RAG-ged terrains: control of T cell receptor gene rearrangement at multiple levels. *Semin. Immunol.* 14: 297–309.
  15. Pongers-Willense, M. J., T. Seriu, F. Stolz, E. d'Aniello, P. Gameiro, P. Pisa, M. Gonzalez, C. R. Bartram, E. R. Panzer-Grumayer, A. Biondi, et al. 1999. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13: 110–118.
  16. van der Velden, V. H., J. M. Wijkhuijs, D. C. Jacobs, E. R. van Wering, and J. J. van Dongen. 2002. T cell receptor  $\gamma$  gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. *Leukemia* 16: 1372–1380.
  17. Zuna, J., K. Mažková, J. Mažžo, O. Krejci, and J. Trka. 2002. Temperature non-homogeneity in rapid airflow-based cyler significantly affects real-time PCR. *BioTechniques* 33: 508.
  18. Langerak, A. W., I. L. Wolvers-Tettero, E. J. van Gastel-Mol, M. E. Oud, and J. J. van Dongen. 2001. Basic helix-loop-helix proteins E2A and HEB induce immature T-cell receptor rearrangements in nonlymphoid cells. *Blood* 98: 2456–2465.
  19. Herzenberg, L. A. 2000. B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol. Rev.* 175: 9–22.
  20. van Dongen, J. J., and I. L. Wolvers-Tettero. 1991. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin. Chim. Acta* 198: 1–91.
  21. Borghesi, L., L. Y. Hsu, J. P. Miller, M. Anderson, L. Herzenberg, M. S. Schlissel, D. Allman, and R. M. Gerstein. 2004. B Lineage-specific regulation of V(D)J recombinase activity is established in common lymphoid progenitors. *J. Exp. Med.* 199: 491–502.
  22. Kouro, T., V. Kumar, and P. W. Kincade. 2002. Relationships between early B- and NK-lineage lymphocyte precursors in bone marrow. *Blood* 100: 3672–3680.
  23. Biondi, A., P. Allavena, V. Rossi, R. Bassan, T. Barbui, E. Champagne, T. W. Mak, M. D. Minden, A. Rambaldi, and A. Mantovani. 1989. T cell receptor  $\delta$  gene organization and expression in normal and leukemic natural killer cells. *J. Immunol.* 143: 1009–1014.
  24. Biassoni, R., S. Verdiani, A. Cambiaggi, P. H. Romeo, S. Ferrini, and L. Moretta. 1993. Human CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> natural killer cells express the hGATA-3 T cell transcription factor and an unrearranged 2.3-kb TcR  $\delta$  transcript. *Eur. J. Immunol.* 23: 1083–1087.
  25. Jung, D., and F. W. Alt. 2004. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116: 299–306.
  26. Borghesi, L., and R. M. Gerstein. 2004. Developmental separation of V(D)J recombinase expression and initiation of IgH recombination in B lineage Progenitors in vivo. *J. Exp. Med.* 199: 483–489.
  27. De Rosa, S. C., J. P. Andrus, S. P. Perfetto, J. J. Mantovani, L. A. Herzenberg, and M. Roederer. 2004. Ontogeny of  $\gamma\delta$  T cells in humans. *J. Immunol.* 172: 1637–1645.
  28. Hayday, A., E. Theodoridis, E. Ramsburg, and J. Shires. 2001. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat. Immunol.* 2: 997–1003.
  29. Grigoriadou, K., L. Boucontet, and P. Pereira. 2002. T cell receptor- $\gamma$  allele-specific selection of V $\gamma$ 1/V $\delta$ 4 cells in the intestinal epithelium. *J. Immunol.* 169: 3736–3743.
  30. Couedel, C., E. Lippert, K. Bernardeau, M. Bonneville, and F. Davodeau. 2004. Allelic exclusion at the TCR $\delta$  locus and commitment to  $\gamma\delta$  lineage: different modalities apply to distinct human  $\gamma\delta$  subsets. *J. Immunol.* 172: 5544–5552.
  31. Miyamoto, T., H. Iwasaki, B. Reizis, M. Ye, T. Graf, I. L. Weissman, and K. Akashi. 2002. Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev. Cell* 3: 137–147.
  32. Terskikh, A. V., T. Miyamoto, C. Chang, L. Diatchenko, and I. L. Weissman. 2003. Gene expression analysis of purified hematopoietic stem cells and committed progenitors. *Blood* 102: 94–101.
  33. Spangrude, G. J. 2002. Divergent models of lymphoid lineage specification: do clonal assays provide all the answers? *Immunol. Rev.* 187: 40–47.

**P6. Kombinace primerů používaných pro vyhledávání přestaveb Ig/TCR genů v diagnostických vzorcích pacientů s ALL (základní panel pro screening bez nekompletních přestaveb IGH a TCRB)**

<b>BCP-ALL:</b>	<b><u>IGH</u></b>	VH1/7- JHcons VH2 - JHcons VH3 - JHcons VH4/6- JHcons VH5 - JHcons	
	<b><u>IGK</u></b>	VkI - KDE VkII - KDE VkIII - KDE VkIV - KDE Intron - KDE	
	<b><u>TCRD</u></b>	DD2 - DD3 VD2 - DD3	
	<b><u>TCRG</u></b>	VG1 - JG1.1/2.1 VG1 - JG1.3/2.3 VGII - JG1.1/2.1 VGII - JG1.3/2.3 VGIV - JG1.1/2.1 VGIV - JG1.3/2.3	
	<b>T-ALL:</b>	<b><u>TCRD</u></b>	DD2 - DD3 DD2 - JD1 VD2 - DD3 VD1 - JD1 VD2 - JD1 VD3 - JD1
		<b><u>TCRG</u></b>	VG1 - JG1.1/2.1 VG1 - JG1.3/2.3 VGII - JG1.3/2.3 VGIII - JG1.3/2.3 VGIV - JG1.3/2.3
		<b><u>SIL/TAL1</u></b>	Sildb-5'- tal1db1-3' Sildb-5'- tal1db2-3'



# P7. Léčebné schéma protokolů ALL IC-BFM 2002 a AIEOP LLA-2000/ ALL-BFM 2000



## P8. Seznam publikací, abstrakt a přednášek

### Publikace:

Sramkova L., Muzikova K., Fronkova E., Krejci O., Sedlacek P., Formankova R., Mejstrikova E., Sary J., Trka J.: Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*. Přijato k tisku

Fronkova E., Krejci O., Kalina T., Horvath O., Trka J., Hrusak O.: Lymphoid Differentiation Pathways Can Be Traced by TCR $\delta$  Rearrangements. *Journal of Immunology* 2005; 175(4):2495-500 (IF=6,5)

Fronkova E., Madzo J., Zuna J., Reznickova L., Muzikova K., Hrusak O., Sary J., Trka J.: TEL/AML1 real-time quantitative reverse transcriptase PCR can complement minimal residual disease assessment in childhood ALL. *Leukemia* 2005; 19: 1296-97 (IF=5.8)

Zuna J., Krejci O., Madzo J., Fronkova E., Sramkova L., Hrusak O., Kalina T., Vaskova M., Sary J., Trka J.: TEL/AML1 and immunoreceptor gene rearrangements-which comes first? *Leukemia Research* 2005;29:633-39 (IF=2.2)

Froňková E., Trka J.: Detekce minimální reziduální nemoci u akutních lymfoblastických leukémií pomocí kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory: jak se vyhnout špatné interpretaci výsledků. *Transfuzie a hematologie dnes* 2005, 3(11):110-15

Madzo J., Mužíková K., Froňková E., Šrámková, L., Zemanová, L., Zuna, J., Starý, J., Trka, J.: Je fúzní gen TEL/AML1 vhodným znakem pro sledování minimální reziduální nemoci u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií? *Transfuzie a hematologie dnes* 2004, 4(10):137-42

### Abstrakta v časopisech s IF:

Zuna J., Eckert C., Cavé H., Meyer C., Schneider B., Fronkova E., Muzikova K., Mendelova D., Boutard P., Schrauder A., Sterba J., Marschalek R., Sary J., Trka J.: Childhood secondary ALL after ALL treatment. 47th ASH Annual Meeting, Atlanta, Georgia, 2005. *Blood* 2005, 106(11):852

Muzikova K., Fronkova E., Reznickova L., Sramkova L., Formankova R., Sedlacek P., Sary J., Trka J. : Minimal residual disease before haematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukaemia. 47th ASH Annual Meeting, Atlanta, Georgia, 2005. *Blood* 2005, 106(11):2037

Fronkova E., Reznickova L., Muzikova K., Mejstrikova E., Hrusak O., Schrappe M., Sary J., Trka J.: Minimal Residual Disease Detection Identifies Differences Between the Risk Groups Defined by the ALL IC-BFM 2002 and the ALL-BFM 2000 Protocols. 46th ASH Annual Meeting, San Diego, California, 2004. *Blood* 2004, 104(11):1085

Hanzsch N., Eckert C., Acquaviva C., Fronkova E., von Stackelberg A., zur Stadt U., Schrauder A., Trka J., Seeger K., Henze G., Cave H.: Prognostic impact of MRD in the bone marrow of children at first isolated extramedullary relapse of ALL.  
46th ASH Annual Meeting, San Diego, California, 2004. *Blood* 2004, 104(11):1087

Mejstrikova E. Batinic D., Dubravcic K., Ng M., Leung Y., Kappelmayer J., Luria D., Izraeli S., Kalina T., Vaskova M., Fronkova E., Stary J., Trka J., Hrusak O.: Detection of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia by 4color Cytometry in International Multicenter Trial Minimini.  
46th ASH Annual Meeting, San Diego, California, 2004. *Blood* 2004, 104(11):1092

Zuna J. Krejci O., Madzo J., Fronkova E., Hrusak O., Trka J.: Spectrum of Immunoreceptor Gene Rearrangements Suggests More Mature Origin of TEL/AML1-positive Blasts.  
45th ASH Annual Meeting, San Diego, California, 2003. *Blood* 2003, 102(11):1353

Muzikova K., Fronkova E., Reznickova L., Sramkova L., Sedlacek P., Stary J., Trka J.: Minimal residual disease level prior HSCT is the best predictor of outcome in transplanted children with ALL.  
31st Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Prague, Czech Republic 2005. *Bone Marrow Transplantation* 2005, 35(2):S22

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

Hrusak O., Krejci O., Fronkova E., Zuna J., Vaskova M., Vavra V., Cerna Z., Maroz Y., Smisek P., Kalina T., Trka J., Zemanova Z., Jarosova M., Stary J.: Tracking Acute Lymphoblastic Leukemia during the Pre-Leukemic Phase.  
SIOP XXXVI Congress Meeting, Oslo, Norway, 2004. *Pediatric Blood & Cancer* 2004; 43:414

### **Přednášky:**

Fronkova E., Trka J. (2005): TEL/AML1 as alternative target for MRD detection.  
8<sup>th</sup> ESG-MRD-ALL Meeting, Roosendaal, NL

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

Fronková E., Řezníčková L., Mužiková K., Mejstříková E., Hrušák O., Schrapppe M., Starý J., Trka J. (2005): Znaky nízkého rizika a rychlá morfoloogická odpověď na iničiální fázi léčby nekorelují s dynamikou minimální residuální nemoci u dětí s ALL. Interim analyza pro PSDH ČR  
XIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc

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

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

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

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

Froňková E., Krejčí O., Kalina T., Prouzová Z., Horváth O., Trka J., Starý J., Hrušák O. (2004): Liniově nepříslušné přestavby T buněčného receptoru ukazují na společný původ B, T a NK buněčných řad

XVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc

Froňková E., Krejčí O., Prouzová Z., Horváth O., Trka J., Hrušák O. (2003): Liniově promiskuitní přestavby imunoreceptorových genů jsou fyziologickým jevem  
XIII. pracovní konference českých a slovenských dětských hematoonkologů, Lednice

## Použitá literatura

1. van Dongen, J.J. and I.L. Wolvers Tettero, *Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects*. Clin Chim Acta, 1991. **198**(1-2): p. 1-91.
2. Davis, M.M. and P.J. Bjorkman, *T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition*. Nature, 1988. **334**(6181): p. 395-402.
3. Matsuda, F., et al., *The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus*. J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2151-62.
4. Froland, S.S. and J.B. Natvig, *Class, subclass, and allelic exclusion of membrane-bound Ig of human B lymphocytes*. J Exp Med, 1972. **136**(2): p. 409-14.
5. Hayashi, K., et al., *Distinct signaling requirements for Dmu selection, IgH allelic exclusion, pre-B cell transition, and tumor suppression in B cell progenitors*. Immunity, 2003. **18**(6): p. 825-36.
6. Melchers, F., et al., *The surrogate light chain in B-cell development*. Immunol Today, 1993. **14**(2): p. 60-8.
7. Miyazaki, T., et al., *Lambda5 is required for rearrangement of the Ig kappa light chain gene in pro-B cell lines*. Int Immunol, 1999. **11**(8): p. 1195-202.
8. Langerak, A.W., et al., *Unraveling the consecutive recombination events in the human IGK locus*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3878-88.
9. van Dongen, J.J., et al., *Development of human T lymphocytes and their thymus-dependency*. Thymus, 1990. **16**(3-4): p. 207-34.
10. Greaves, M.F., *Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes*. Science, 1986. **234**(4777): p. 697-704.
11. Silverman, L.B., et al., *Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1211-8.
12. Pui, C.H., et al., *Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2690-6.
13. Gaynon, P.S., et al., *Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995*. Leukemia, 2000. **14**(12): p. 2223-33.
14. Schrappe, M., et al., *Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3310-22.
15. Crist, W., et al., *Clinical and biologic features predict poor prognosis in acute lymphoid leukemias in children and adolescents: a Pediatric Oncology Group review*. Med Pediatr Oncol, 1986. **14**(3): p. 135-9.
16. Sather, H.N., *Age at diagnosis in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Med Pediatr Oncol, 1986. **14**(3): p. 166-72.
17. Pui, C.H., D. Campana, and W.E. Evans, *Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives*. Lancet Oncol, 2001. **2**(10): p. 597-607.
18. Pui, C.H., et al., *Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children*. JAMA, 2003. **290**(15): p. 2001-7.
19. Pui, C.H., *Quest for effective agents to combat T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Eur J Cancer, 2005. **41**(9): p. 1243-1245.

20. Goldberg, J.M., et al., *Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience*. J Clin Oncol, 2003. **21**(19): p. 3616-22.
21. Uckun, F.M., et al., *Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen positive acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group*. Blood, 1997. **90**(1): p. 28-35.
22. Pui, C.H., et al., *Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid-associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia*. J Clin Oncol, 1998. **16**(12): p. 3768-73.
23. Mejstrikova, E., et al., *Correlation of CD33 with poorer prognosis in childhood ALL implicates a potential of anti-CD33 frontline therapy*. Leukemia, 2005. **19**(6): p. 1092-4.
24. Trueworthy, R., et al., *Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study*. J Clin Oncol, 1992. **10**(4): p. 606-13.
25. Sutcliffe, M.J., et al., *High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative*. Leukemia, 2005. **19**(5): p. 734-40.
26. Guidez, F., et al., *Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein*. Blood, 2000. **96**(7): p. 2557-61.
27. Seeger, K., et al., *TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group*. Blood, 1998. **91**(5): p. 1716-22.
28. Zuna, J., et al., *Significantly lower relapse rate for TEL/AML1-positive ALL [letter]*. Leukemia, 1999. **13**(10): p. 1633.
29. Seeger, K., et al., *TEL-AML1 fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1999. **94**(1): p. 374-6.
30. Loh, M.L., et al., *Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1998. **92**(12): p. 4792-7.
31. Ramakers van Woerden, N.L., et al., *TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2000. **96**(3): p. 1094-9.
32. Wiemels, J.L., et al., *Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero*. Blood, 1999. **94**(3): p. 1057-62.
33. Zuna, J., et al., *TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5355-60.
34. Konrad, M., et al., *Late relapses evolve from slow-responding subclones in t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia: evidence for the persistence of a preleukemic clone*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3635-40.
35. van Dongen, J.J., et al., *Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia*. Leukemia, 1999. **13**(12): p. 1901-28.
36. Arico, M., et al., *Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med, 2000. **342**(14): p. 998-1006.

37. Roy, A., et al., *Early response to induction is predictive of survival in childhood Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia: results of the Medical Research Council ALL 97 trial.* Br J Haematol, 2005. **129**(1): p. 35-44.
38. Pui, C.H., M.V. Relling, and J.R. Downing, *Acute lymphoblastic leukemia.* N Engl J Med, 2004. **350**(15): p. 1535-48.
39. Pui, C.H., et al., *Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region.* Lancet, 2002. **359**(9321): p. 1909-15.
40. Armstrong, S.A., et al., *MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia.* Nat Genet, 2002. **30**(1): p. 41-7.
41. Ng, A., et al., *Effects of topoisomerase 2 inhibitors on the MLL gene in children receiving chemotherapy: a prospective study.* Leukemia, 2005. **19**(2): p. 253-9.
42. Libura, J., et al., *Therapy-related acute myeloid leukemia-like MLL rearrangements are induced by etoposide in primary human CD34+ cells and remain stable after clonal expansion.* Blood, 2005. **105**(5): p. 2124-31.
43. Pui, C.H., et al., *Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia.* N Engl J Med, 1991. **325**(24): p. 1682-7.
44. Ferrando, A.A. and A.T. Look, *Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia.* Semin Hematol, 2003. **40**(4): p. 274-80.
45. Weng, A.P., et al., *Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia.* Science, 2004. **306**(5694): p. 269-71.
46. Jarosova, M., et al., *Complex karyotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: cytogenetic and molecular cytogenetic study of 21 cases.* Cancer Genet Cytogenet, 2003. **145**(2): p. 161-8.
47. Evans, W.E. and M.V. Relling, *Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics.* Nature, 2004. **429**(6990): p. 464-8.
48. Krajcinovic, M., I. Costea, and S. Chiasson, *Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia.* Lancet, 2002. **359**(9311): p. 1033-4.
49. Lauten, M., et al., *Thymidylate synthase gene polymorphism and its association with relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.* Haematologica, 2003. **88**(3): p. 353-4.
50. Schrappe, M., *Evolution of BFM trials for childhood ALL.* Ann Hematol, 2004. **83** Suppl 1: p. S121-3.
51. Campana, D. and C.H. Pui, *Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance.* Blood, 1995. **85**(6): p. 1416-34.
52. Gutterman, J.U., et al., *Immunodiagnosis of acute leukemia: detection of residual disease.* J Natl Cancer Inst, 1974. **53**(2): p. 389-92.
53. Brisco, M.J., et al., *Effect of the Philadelphia chromosome on minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia.* Leukemia, 1997. **11**(9): p. 1497-500.
54. Goulden, N.J., et al., *Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia.* Br J Haematol, 1998. **100**(1): p. 235-44.
55. Coustan Smith, E., et al., *Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia.* Blood, 2000. **96**(8): p. 2691-6.
56. van Dongen, J.J., et al., *Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood.* Lancet, 1998. **352**(9142): p. 1731-8.

57. Malec, M., et al., *Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping*. *Leukemia*, 2004. **18**(10): p. 1630-6.
58. Drunat, S., et al., *Quantification of TEL-AML1 transcript for minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2001. **114**(2): p. 281-9.
59. de Haas, V., et al., *The TEL-AML1 real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) might replace the antigen receptor-based genomic PCR in clinical minimal residual disease studies in children with acute lymphoblastic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2002. **116**(1): p. 87-93.
60. Taube, T., et al., *Real-time quantification of TEL-AML1 fusion transcripts for MRD detection in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. Comparison with antigen receptor-based MRD quantification methods*. *Leuk Res*, 2004. **28**(7): p. 699-706.
61. Kerst, G., et al., *Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR*. *Br J Haematol*, 2005. **128**(6): p. 774-82.
62. Neale, G.A., et al., *Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2004. **18**(5): p. 934-8.
63. Campana, D. and F.G. Behm, *Immunophenotyping of leukemia*. *J Immunol Methods*, 2000. **243**(1-2): p. 59-75.
64. Campana, D. and E. Coustan-Smith, *Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow*. *Cytometry*, 1999. **38**(4): p. 139-52.
65. Hrusak, O. and A. Porwit-MacDonald, *Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. Review*. *Leukemia*, 2002. **16**(7): p. 1233-1258.
66. Gabert, J., et al., *Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program*. *Leukemia*, 2003. **17**(12): p. 2318-57.
67. Pallisgaard, N., et al., *Rapid and sensitive minimal residual disease detection in acute leukemia by quantitative real-time RT-PCR exemplified by *t(12;21)* TEL-AML1 fusion transcript*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999. **26**(4): p. 355-65.
68. Pongers-Willemse, M.J., et al., *Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia*. *Leukemia*, 1999. **13**(1): p. 110-8.
69. Eckert, C., et al., *Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia*. *Lancet*, 2001. **358**(9289): p. 1239-41.
70. Madžo, J., et al., *Intrauteriní původ akutní lymfoblastické leukémie u dětí: průkaz leukemického klonu v archivních vzorcích novorozenecké krve*. *Transfuze a hematologie dnes.*, 2003. **9**(2): p. 80-84.
71. Bader, 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**(12): p. 2079-86.
72. Cave, H., et al., *Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *European Organization for Research and Treatment*



- of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med*, 1998. **339**(9): p. 591-8.
73. Pui, C.H., et al., *Rationale and design of Total Therapy Study XV for newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Ann Hematol*, 2004. **83 Suppl 1**: p. S124-6.
  74. Szczepanski, T., et al., *Precursor-B-ALL with D(H)-J(H) gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14*. *Leukemia*, 2001. **15**(9): p. 1415-23.
  75. Beishuizen, A., et al., *Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis and subsequent relapse: implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis*. *Blood*, 1994. **83**(8): p. 2238-47.
  76. Steenbergen, E.J., et al., *Distinct ongoing Ig heavy chain rearrangement processes in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 1993. **82**(2): p. 581-9.
  77. Wasserman, R., et al., *VH gene rearrangement events can modify the immunoglobulin heavy chain during progression of B-lineage acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 1992. **79**(1): p. 223-8.
  78. Beishuizen, A., et al., *Heterogeneity in junctional regions of immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in B cell leukemias: a new molecular target for detection of minimal residual disease*. *Leukemia*, 1997. **11**(12): p. 2200-7.
  79. Szczepanski, T., et al., *Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease*. *Leukemia*, 1999. **13**(2): p. 196-205.
  80. Szczepanski, T., et al., *Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage*. *Blood*, 1999. **93**(12): p. 4079-85.
  81. van Dongen, J.J., et al., *Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936*. *Leukemia*, 2003. **17**(12): p. 2257-317.
  82. Langerak, A.W., et al., *Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations*. *Leukemia*, 1997. **11**(12): p. 2192-9.
  83. Verhagen, O.J., et al., *Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2000. **14**(8): p. 1426-35.
  84. van der Velden, V.H., et al., *Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR*. *Leukemia*, 2002. **16**(5): p. 928-36.
  85. Boeckx, N., et al., *Fusion gene transcripts and Ig/TCR gene rearrangements are complementary but infrequent targets for PCR-based detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2002. **16**(3): p. 368-75.
  86. Langerak, A.W., et al., *Basic helix-loop-helix proteins E2A and HEB induce immature T-cell receptor rearrangements in nonlymphoid cells*. *Blood*, 2001. **98**(8): p. 2456-65.

87. van der Velden, V.H., et al., *TCRB gene rearrangements in childhood and adult precursor-B-ALL: frequency, applicability as MRD-PCR target, and stability between diagnosis and relapse*. *Leukemia*, 2004. **18**(12): p. 1971-80.
88. Pongers Willemse, M.J., et al., *Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes*. *Leukemia*, 1998. **12**(12): p. 2006-14.
89. Szczepanski, T., et al., *Comparative analysis of T-cell receptor gene rearrangements at diagnosis and relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows high stability of clonal markers for monitoring of minimal residual disease and reveals the occurrence of second T-ALL*. *Leukemia*, 2003. **17**(11): p. 2149-56.
90. Szczepanski, T., et al., *Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease*. *Blood*, 2002. **99**(7): p. 2315-23.
91. Van Der Velden, V.H., et al., *Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects*. *Leukemia*, 2003. **17**(6): p. 1013-34.
92. Madzo, J., et al., *Slower molecular response to treatment predicts poor outcome in patients with TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia: prospective real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction study*. *Cancer*, 2003. **97**(1): p. 105-13.
93. Yeoh, E.J., et al., *Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling*. *Cancer Cell*, 2002. **1**(2): p. 133-43.
94. Vaskova, M., et al., *Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2005. **19**(5): p. 876-8.
95. van der Velden, V.H., et al., *Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL*. *Leukemia*, 2002. **16**(8): p. 1432-6.
96. Fronkova, E., et al., *Minimal Residual Disease Identifies Differences between the Risk Group Defined by the ALL IC-BFM 2002 and the ALL-BFM 2000 Protocols. Poster. 46th ASH Meeting, San Diego, California*. *Blood*, 2004. **104**(11): p. 1085.
97. Oettinger, M.A., et al., *The recombination activating genes, RAG 1 and RAG 2, are on chromosome 11p in humans and chromosome 2p in mice*. *Immunogenetics*, 1992. **35**(2): p. 97-101.
98. Schatz, D.G., M.A. Oettinger, and D. Baltimore, *The V(D)J recombination activating gene, RAG-1*. *Cell*, 1989. **59**(6): p. 1035-48.
99. Schwarz, K., et al., *Confirmation of the localization of the human recombination activating gene 1 (RAG1) to chromosome 11p13*. *Hum Genet*, 1994. **93**(2): p. 215-7.
100. Oettinger, M.A., et al., *RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination*. *Science*, 1990. **248**(4962): p. 1517-23.
101. Sleckman, B.P., J.R. Gorman, and F.W. Alt, *Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements*. *Annu Rev Immunol*, 1996. **14**: p. 459-81.
102. Golding, A., et al., *Nucleosome structure completely inhibits in vitro cleavage by the V(D)J recombinase*. *EMBO J*, 1999. **18**(13): p. 3712-23.

103. Wolffe, A.P., J. Wong, and D. Pruss, *Activators and repressors: making use of chromatin to regulate transcription*. *Genes Cells*, 1997. **2**(5): p. 291-302.
104. McMurry, M.T. and M.S. Krangel, *A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination*. *Science*, 2000. **287**(5452): p. 495-8.
105. McBlane, F. and J. Boyes, *Stimulation of V(D)J recombination by histone acetylation*. *Curr Biol*, 2000. **10**(8): p. 483-6.
106. Krangel, M.S., *Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(7): p. 624-30.
107. Stanhope Baker, P., et al., *Cell type-specific chromatin structure determines the targeting of V(D)J recombinase activity in vitro*. *Cell*, 1996. **85**(6): p. 887-97.
108. Brumpt, C., et al., *The incidence of clonal T-cell receptor rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia varies with age and genotype*. *Blood*, 2000. **96**(6): p. 2254-61.
109. Greaves, M.F., et al., *Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia*. *Blood*, 1986. **67**(1): p. 1-11.
110. Yancopoulos, G.D., et al., *Introduced T cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cells: evidence that B and T cells use a common recombinase*. *Cell*, 1986. **44**(2): p. 251-9.
111. Height, S.E., et al., *Analysis of clonal rearrangements of the Ig heavy chain locus in acute leukemia*. *Blood*, 1996. **87**(12): p. 5242-50.
112. Krejci, O., et al., *Cutting edge: TCR delta gene is frequently rearranged in adult B lymphocytes*. *J Immunol*, 2003. **171**(2): p. 524-7.
113. Blom, B., et al., *TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation*. *Blood*, 1999. **93**(9): p. 3033-43.
114. Galy, A., et al., *Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset*. *Immunity*, 1995. **3**(4): p. 459-73.
115. Katsura, Y., *Redefinition of lymphoid progenitors*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(2): p. 127-32.
116. Perez, S.A., et al., *A novel myeloid-like NK cell progenitor in human umbilical cord blood*. *Blood*, 2003. **101**(9): p. 3444-50.
117. Hou, Y.H., et al., *Identification of a human B-cell/myeloid common progenitor by the absence of CXCR4*. *Blood*, 2005. **105**(9): p. 3488-92.
118. Adolfsson, J., et al., *Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment*. *Cell*, 2005. **121**(2): p. 295-306.