

**Využití minimální reziduální nemoci v průběhu léčby relapsu a po
alogenní transplantaci kostní dřeně u dětských pacientů s akutní
lymfoblastickou leukémií**

Lucie Šrámková

Univerzita Karlova V Praze

2. lékařská fakulta

2006

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. MUDr. J. Trkovi Ph.D. za trpělivé vedení mého postgraduálního projektu a uvedení do molekulární genetiky a prof. MUDr. J. Starému DrSc. za neocenitelné zkušenosti z klinické praxe. Oběma děkuji za velmi přátelské a tvůrčí prostředí.

Bc. Kateřině Mužíkové děkuji za pomoc v praktických otázkách stanovení minimální reziduální nemoci, MUDr. O. Krejčímu Ph.D., Dr. E. Froňkové Ph.D. a Mgr. J. Madžovi Ph.D. za spolupráci na projektech týkajících se minimální reziduální nemoci.

Doc. MUDr. P. Sedláčkovi děkuji za uvedení do problematiky transplantace hematopoetických kmenových buněk a za mnoho užitečných pracovních diskusí. A nakonec bych chtěla poděkovat všem svým klinickým kolegům – dětským hematologům za spolupráci a přátelskou atmosféru.

| | |
|--|----|
| I. Úvod..... | 4 |
| Akutní lymfoblastická leukémie v dětském věku..... | 4 |
| Klinické a genetické prognostické faktory..... | 4 |
| Prognostický význam translokací u dětských ALL..... | 7 |
| Minimální reziduální nemoc..... | 8 |
| Pracovní skupina ESG-MRD-ALL, kontroly kvality..... | 10 |
| Diagnostika dětské ALL..... | 10 |
| Léčba dětské ALL..... | 12 |
| Relaps ALL..... | 13 |
| Transplantace hematopoetických kmenových buněk, adoptivní imunoterapie..... | 14 |
| II. Metody..... | 15 |
| Detekce minimální reziduální nemoci u akutní lymfoblastické leukémie pomocí kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory (Ig/TCR)..... | 15 |
| Detekce a výběr Ig/TCR cílů..... | 15 |
| Určení klonality..... | 16 |
| Navržení klonálně specifických primerů a optimalizace RQ-PCR..... | 18 |
| III. Výsledky..... | 20 |
| Minimální reziduální nemoc u dětí s relapsem ALL..... | 20 |
| Monitorování MRN v průběhu chemoterapie a indikace k alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk u dětí s relapsem ALL..... | 21 |
| Minimální reziduální nemoc po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk..... | 25 |
| Monitorování MRN u dětí po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk..... | 26 |
| Diskuze..... | 34 |
| IV. Závěr..... | 35 |
| Použité zkratky..... | 36 |
| Přílohy..... | 39 |
| Publikační a přednášková činnost..... | 51 |
| Použitá literatura..... | 56 |

I. Úvod

Akutní lymfoblastická leukémie v dětském věku

Akutní leukémie jsou nejčastějším nádorovým onemocněním dětského věku, přičemž přibližně 80% dětských leukémií tvoří akutní lymfoblastická leukémie (ALL) s některými podtypy specifickými pro dětský věk a jiným biologickým chováním než je ALL u dospělých. Akutní lymfoblastickou leukémií ročně onemocní v České republice přibližně 65 dětí s typickou věkovou distribucí. Vrchol výskytu je zaznamenáván ve věkové skupině předškolních dětí. Ve skutečnosti není ALL jedno homogenní onemocnění, ale spíše souhrn relativně přesně imunofenotypově a genotypově charakterizovaných podskupin. Tyto podskupiny se liší typickým věkem při nástupu nemoci, odpovědí na léčbu a pochopitelně i prognózou [1].

Klinické a genetické prognostické skupiny

Přestože se u ALL relativně často vyskytují i jiné genetické defekty (např. delece nebo bodové mutace), typický je výskyt zásadních chromozomálních aberací: změn v ploidii (častěji hyperdiploidie než hypodiploidie) a zejména častý výskyt určitých nenáhodných translokací. Tyto změny jsou klonální, což leukémie odlišuje od epiteliálních nádorů (karcinomů), u kterých nacházíme značnou karyotypovou diverzitu způsobenou chromozomální nestabilitou nádorových buněk [2]. Pro chromozomální translokace u ALL je dále typické i to, že se jedná většinou o reciproké nebo balancované změny a že jednotlivé aberace jsou spjaty s určitými biologickými subtypy ALL. Nejčastěji zachycované translokace u dětských ALL jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1: Nejčastěji zachycované translokace u dětských ALL

| chromozomální aberace | molekulární změna a její efekt | frekvence výskytu |
|------------------------------|--|---------------------------------|
| t(12;21)(p13;q22) | TEL/AML1, hybridní transkripční faktor | 20-24% |
| t(1;19)(q23;p13) | E2A/PBX1, hybridní transkripční faktor | 5% |
| t(9,22)(q34;p11) | BCR/ABL, aktivovaná kináza Abl | <5% |
| translokace se zlomy v 11q23 | MLL/AF4 a další, změna funkce genu | <5% (až 75% kojeneckých ALL) |
| del1q; t(1;14)(p32;q11) | SIL/TAL, dysregulovaný transkripční faktor | 25% T-prekurzorových ALL |

Mechanismus vzniku translokací je v hrubých rysech znám nebo alespoň predikován. V predilekčních místech dochází ke zlomům dvojřetězcové DNA, které jsou opraveny homologním nebo nehomologním rekombinačním mechanismem, případně jejich kombinací. Mezi místa, ve kterých zlomy a fúze vznikají, patří cílová místa V(D)J rekombinace, enzymu topoizomerázy II a lokusy DNA citlivé k působení apoptotických endonukleáz. Experimenty in vitro prokázaly, že vznik určitých typů translokací lze navodit pomocí apoptogenní stimulace [2].

Geny, které se nalézají v místech zlomu, mají za fyziologických okolností různé funkce a z jejich narušení potom vycházejí patologické změny vedoucí k leukemogenezi. Jak vidíme v Tabulce 1, nejčastější aberace u ALL vedou ke vzniku hybridních transkripčních faktorů (MLL/AF4, TEL/AML1, E2A/PBX1); výjimkou je fúzní gen BCR/ABL, který dává vznik trvale aktivované kináze. Hybridní transkripční faktory způsobují poruchy transkripce dalších

genů, zásadních pro proliferaci a diferenciaci hemopoetických buněk. Experimenty na transgenních zvířatech dokazují, že vnesení genu pro hybridní transkripční faktor nebo aktivovanou kinázu vede ke vzniku hematologické malignity, velmi podobné specifickému subtypu leukémie spojené s danou aberací. Tyto modely současně ukazují, že místem zásahu (a tedy vzniku translokace in vivo) jsou pravděpodobně kmenové buňky různého stupně diferenciaci. V případě fúze BCR/ABL, kterou nacházíme kromě ALL především u chronické myeloidní i akutní myeloidní leukémie, se zřejmě jedná o relativně nezralý společný myeloidně-lymfoidní progenitor. Stejně tomu bude v případě translokací postihujících gen MLL, které se také vyskytují u myeloidních a hybridních leukemií. Přestavby TEL/AML1 a E2A/PBX1 vznikají ve zralejším, lymfoidně orientovaném prekurzoru. Pro vznik ALL u dětí platí vícezásahová teorie vzniku maligního onemocnění. Prvním zásahem je podle současně uznávané hypotézy chromozomální translokací indukovaný vznik hybridního genu, který vede k diferenciační zástavě a vzniku „preleukemického“ klonu. Druhý zásah potom způsobuje proliferační výhodu klonu a vede již přímo k malignizaci [3]. Zatím je málo známo o povaze druhého zásahu a jeho časování. U TEL/AML1 pozitivních ALL by tímto zásahem mohla být delece druhé, netranslokované alely genu TEL, která je nalézána ve vysokém procentu TEL/AML1 pozitivních leukemií. Kumulace případů tohoto subtypu do batolecího a předškolního období napovídá, kdy by mohlo k druhému zásahu docházet. U dalších typů ALL by tuto roli mohla sehrát např. mutace kinázového genu Flt-3. Je však zřejmé, že např. u leukemií charakterizovaných přestavbami genu MLL, které jsou typické pro kojence, dochází k oběma zásahům krátce po sobě nebo sám hybridní transkripční faktor stimuluje další změny, vedoucí přímo k malignizaci. Tuto teorii potvrzuje i to, že hybridní gen MLL/AF4 se nenalézá v pupečnickových krvích zdravých novorozenců [4, 5].

Prognostický význam translokací u dětských ALL

Translokace u dětských ALL nemají význam pouze biologický, tedy pro poznání etiopatogeneze nemoci. Jsou důležité i z praktického léčebného hlediska jako prediktory prognózy jednotlivých subtypů. Z retrospektivních studií dnes víme, že např. hybridní gen MLL/AF4 je spojen s extrémně špatnými léčebnými výsledky u kojeneckých ALL. Proto jsou v současné době testovány nové léčebné protokoly zaměřené na kojenecké leukémie, včetně použití nových léčebných postupů. V rámci mezinárodního projektu Interfant je tak do stádia klinických zkoušek zaváděn inhibitor kinázy Flt-3. Podobně je tomu v případě BCR/ABL pozitivních ALL, které se častěji vyskytují u starších dětí a adolescentů. I tu těchto pacientů se dnes testuje použití nové generace protinádorových léků – tzv. cílených terapeutik, konkrétně inhibitoru aktivované kinázy Abl. Prognostická váha translokace t(1;19) závisí zřejmě na typu použitého léčebného protokolu, v protokolech používaných v České republice je neutrální. Stále je diskutován prognostický význam hybridního genu TEL/AML1. Přestože i u tohoto subtypu se vyskytují relapsy nemoci (zejména pozdní), prognóza dětí s TEL/AML1 pozitivní leukemií je nadprůměrně dobrá [6, 7, 8, 9]. Výborné jsou i léčebné výsledky dětí s hyperdiploidním obsahem DNA v leukemických buňkách, zatímco řídké případy hypodiploidních ALL mají velmi špatnou prognózu [1].

Zatím není jasné, co odděluje v rámci jednotlivých subtypů děti, které zůstanou v první kompletní remisi nemoci, od těch, u kterých dojde k relapsu. Hladina minimální reziduální nemoci, která je dobrým ukazatelem citlivosti leukemických buněk na chemoterapii a prediktorem relapsu, je pouze zástupným znakem [10, 11, 12]. Rozhodující roli budou zřejmě hrát další, přídatné genetické aberace, které v rámci jednotlivých subtypů ALL ovlivňují biologické vlastnosti leukemických buněk.

Minimální reziduální nemoc

Přes zpřesňování stratifikace pacientů do jednotlivých rizikových skupin pomocí klinických a genetických znaků nebylo donedávna možné **individuálně** hodnotit odpověď na léčbu a s větší přesností predikovat riziko relapsu onemocnění. Minimální reziduální nemoc (MRN) je definována jako stav, kdy běžnými cytologickými metodami detekujeme méně než 5% maligních buněk v kostní dřeni. V této situaci hovoříme o kompletní hematologické remisi, přesto může mít pacient v těle až 10^{10} maligních buněk. Toto množství je nadále obrovské a proto jsou od počátku 90.let ve větší míře rozvíjeny techniky, které detekují tuto submikroskopickou hladinu leukémie. K detekci MRN se používaly různé metody: klasická cytogenetika, FISH (fluorescenční in situ hybridizace), „Southern blot“, imunofenotypizace a metody založené na PCR. Nevýhodou většiny uvedených metod je nedostatečná senzitivita a specifita a často i náročnost metody. Z těchto důvodů se v posledních letech pro rutinní sledování MRN používá pouze imunofenotypizace a metody založené na PCR. Při imunofenotypizaci se využívá vícebarevná průtokové cytometrie (nejčastěji tří nebo čtyřbarevná), leukemické buňky jsou detekovány na základě přítomnosti aberantních antigenů, asynchronní exprese nebo atypického množství exprese antigenů nebo jejich kombinací [42-46]. Problémem detekce MRN pomocí průtokové cytometrie může být posun v imunofenotypu při relapsu onemocnění [47, 48]. Citlivost imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie se liší podle kombinace použitých antigenů a pohybuje v řádu 10^{-3} až 10^{-5} (tzn. jedna leukemická buňka mezi 10^3 až 10^5 nemaligních buněk).

Metody PCR detekce MRN jsou založeny na amplifikaci určitých úseků nukleových kyselin, které jsou specifické pro leukemické buňky. Avšak klasická kvalitativní „end-point“ PCR neumožňuje skutečnou kvantifikaci MRN. Proto se od poloviny 90. let rychle rozvíjejí další PCR metody a v posledních letech se již standardně používá kvantitativní PCR v reálném čase (RQ-PCR). Tato metoda umožňuje přesnou kvantifikaci množství nukleových kyselin přímo

v průběhu exponenciální fáze PCR [49-56]. Jako cílové sekvence specifické pro leukemické buňky se využívají buď oblasti zlomu specifických chromozomálních translokací nebo přestavby imunoreceptorových genů.

Detekce MRN pomocí kvantifikace určitého fúzního transkriptu (např. TEL/AML1) je metodicky jednodušší v tom, že jednou zavedený systém RT-RQ-PCR je již použitelný pro kteréhokoliv pacienta s TEL/AML1 pozitivní ALL. Na druhou stranu vyžaduje izolaci RNA, která je citlivější na transport a uchování než DNA. V naší práci jsme používali druhou metodiku tzn. kvantifikaci MRN pomocí přestaveb imunoreceptorových genů. Tato metodika se opírá o fakt, že lymfocyty v průběhu svého vývoje přestavují imunoreceptorové geny. Jako imunoreceptorové geny jsou označovány geny kódující těžké a lehké řetězce imunoglobulinů (IgH a IgL) a geny kódující T-buněčný receptor (TCR). U člověka se geny kódující IgH, TCR alfa a TCR delta nacházejí na 14.chromozómu (IgH 14q32, TCR alfa/delta 14q11), geny kódující IgL kappa na 2.chromozómu (2p12), geny kódující IgL lambda na 22.chromozómu (22q11) a geny kódující TCR beta a TCR gamma na 7.chromozómu (TCR beta 7q35, TCR gamma 7p14-15) [57-59]. Jednotlivé geny kódující imunoreceptory se skládají z V (Variable), J (Joining) a C (Constant) segmentů. U genů kódujících IgH, TCR beta a TCR delta jsou mezi segmenty V a J vloženy ještě D (Diversity) segmenty [57, 59-63]. Při vývoji lymfocytů dochází k přeskupení V(D) a J segmentů na úrovni DNA, po přepisu do RNA dojde k vystřížení nekódujícího úseku mezi přeskupenými V(D)J segmenty a C segmentem, čímž vzniká mRNA kódující imunoreceptorový řetězec. Při přestavbě V(D)J segmentů dochází k náhodné delecii nukleotidů na přilehlých koncích spojujících se segmentů, vzniku tzv. P (palindromatických) nukleotidů a k vložení náhodných nukleotidů působením terminální deoxyribonukleotidyl transferázy. Takto díky náhodnému vložení a delecii nukleotidů v oblasti V(D)J spojení vzniká DNA sekvence, která je unikátní pro každý lymfocyt, resp. klon z něj

vycházející. Kvantifikace MRN pomocí přestaveb imunoreceptorových genů je podrobně popsána v kapitole Metody.

Pracovní skupina ESG-MRD-ALL, kontroly kvality

Vzhledem k rozšiřování klinického využití MRN se stále zvyšují nároky na reprodukovatelnost a porovnatelnost výsledků jednotlivých laboratoří. Z tohoto důvodu byla ustavena pracovní skupina ESG-MRD-ALL (European Study Group on Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia), která sdružuje 30 evropských i mimoevropských laboratoří z 15 zemí. Skupina organizuje pravidelná pracovní setkání a dvakrát ročně i laboratorní kontroly kvality s následným vyhodnocením výsledků. Úsilí této skupiny, jejíž součástí je i naše laboratoř, přispělo významnou měrou k ujednocení pojmů a reprodukovatelnosti výsledků detekce MRN u ALL.

Diagnostika dětské ALL

Přes pokrok v molekulárně genetické diagnostice dětských leukémií jsou důvodem k vyšetřování dítěte jeho klinické obtíže. Klinické projevy ALL u dětí jsou často nespecifické, mezi obvyklé příznaky patří teploty, nechutenství, únava a bledost. U části dětí nacházíme kožní a slizniční krvácení, zvětšení lymfatických uzlin a hepatosplenomegalii. Přibližně třetina dětí si stěžuje na bolesti kostí a kloubů hlavně dolních končetin, malé děti často zcela přestávají chodit. V krevním obraze obvykle nacházíme různě těžkou anémii a trombocytopenii, avšak ani početně normální nebo jen lehce subnormální hodnoty nevylučují diagnózu ALL. Leukocyty mohou být sníženy až do hodnot těžké leukopenie nebo naopak zvýšeny s obrazem hyperleukocytózy. V diferenciálním rozpočtu leukocytů můžeme nacházet nezralé blasty mezi normálními zralými elementy bílé řady.

Při podezření na akutní leukémii je nutné komplexní vyšetření na specializovaném pracovišti dětské hematologie, kde se provádí vyšetření kostní dřeně. ALL je definována nálezem $\geq 25\%$ lymfoblastů v aspirátu kostní dřeně. Kromě morfologického a cytochemického vyšetření

aspirátu kostní dřeně je nedílnou součástí diagnózy i vyšetření imunofenotypu. Imunofenotyp zařadí ALL k řadě B nebo T-lymfocytární a určí stadium prekursoru, ze kterého pochází klon leukemických buněk. U dětí se nejčastěji vyskytuje ALL z nezralých B-prekursorů (80%), méně často z prekursorů a zralých T-lymfocytů (15%) a výjimečně ze zralých B-lymfocytů (2%) nebo z velmi nezralých prekursorů před vývojem lymfatické řady (hybridní leukémie). Samozřejmostí je i vyšetření cytogenetické, které určí karyotyp leukemického klonu a molekulárně genetické vyšetření, které zjišťuje nejčastější fúzní geny přítomné u dětských ALL. Při diagnóze též hodnotíme postižení jiných orgánů, velikost hepatosplenomegalie, přítomnost zvětšených lymfatických uzlin a tumoru mediastina a infiltraci testes u chlapců. Nedílnou součástí diagnostického vyšetření je i vyšetření mozkomíšního moku k odhalení leukemické infiltrace, při pozitivním nálezu zařazujeme v průběhu léčby intenzivnější intrathekální chemoterapie a radioterapii na neurokranium v terapeutických dávkách.

Všechny tyto informace o subtypu leukémie společně s další faktory jako je věk pacienta, iniciální leukocytóza a odpověď na léčbu zařadí pacienta do určité rizikové skupiny v rámci léčebného protokolu. Odpověď na léčbu je hodnocena jako redukce blastů v periferní krvi po týdnu podávání prednisonu a jedné intrathekální aplikaci methotrexátu a dále jako redukce blastů v kostní dřeni v polovině a na konci měsíční indukční chemoterapie. Podle všech těchto faktorů lze rozdělit pacienty do tří rizikových skupin, nejlepší prognózu mají děti mezi 1-6 lety, s iniciální leukocytózou pod $20 \times 10^9/l$, bez nepříznivých chromozomálních změn a s dobrou odpovědí na terapii. Skupinu vysokého rizika tvoří pacienti se špatnou odpovědí na terapii a/nebo s nepříznivými chromozomálními aberacemi jako je BCR/ABL nebo MLL/AF4 přestavba. Největší skupinu tzv. středního rizika tvoří děti starší 6 let a/nebo děti s vyšší iniciální leukocytózou. Nejhorší prognózu mají kojenci, zvláště pod 6 měsíců, u kterých často nacházíme přestavby MLL genu a významnou hyperleukocytózu. Jednotlivé rizikové skupiny se vzhledem k prognóze liší i v intenzitě léčby.

Léčba dětské ALL

Historie léčby dětské ALL je historií jednoho z největších léčebných úspěchů v hematologii a onkologii vůbec. Ještě počátkem šedesátých let minulého století byla kurabilita dětské ALL prakticky nulová. Na přelomu 20. a 21. století již má dítě, které onemocní touto chorobou a je léčeno podle moderního léčebného protokolu, šanci na úplné vyléčení až 80%. [13, 14, 15, 16]

V České republice jsou již mnoho let používány německé protokoly tzv. BFM (Berlin-Frankfurt-Münster), které mají jedny z nejlepších výsledků ve světě. Léčba se skládá z několika základních částí. První je tzv. indukce v trvání 1 měsíce, která slouží k navození remise onemocnění, tato fáze zahrnuje prednison, vinkristin, daunorubicin a l-asparaginasu. Léčba pokračuje konsolidační fází, kdy je podáván cytosinarabinosid, merkaptopurin, cyklofosfamid a vysokodávkovaný methotrexát a přibližně za 6 měsíců od zahájení terapie následuje pozdní intenzifikace, kdy je zopakována obdoba indukční fáze. Nedílnou součástí terapie je i intratekální podávání methotrexátu k prevenci a léčbě leukemické infiltrace mozku, pro některé rizikové pacienty je zařazeno i ozařování neurokrania. Po skončení intenzivní chemoterapie následuje udržovací léčba merkaptopurinem a methotrexátem do celkové délky terapie 2 roky. Transplantace kostní dřeně v první remisi ALL je využívána pouze pro přesně definovanou skupinu dětí s velmi vysoce rizikovou ALL. Aktuálně používaným protokolem pro děti s ALL v České republice je protokol ALL IC BFM 2002. Pro skupinu dětí pod 1 rok, vzhledem k odlišnému typu ALL (velmi nezralé prekurzory s přestavbou MLL genu) a velmi špatné odpovědi na standardní chemoterapie, je používán mezinárodní protokol Interfant, který v sobě spojuje léčebné prvky z terapie jak akutní lymfoblastické, tak i akutní myeloidní leukémie. Předběžné výsledky po několika letech používání tohoto protokolu se jeví velmi nadějně.

Další specifickou skupinou jsou pacienti s BCR/ABL pozitivní ALL, pro které je nově používán mezinárodní protokol EsPhALL (European intergroup study on post-induction treatment of Ph positive ALL). Tento protokol společně s kombinovanou intenzivní chemoterapií ve snaze o zlepšení prognózy tohoto nepříznivého typu ALL zařazuje lék nové generace, kterým je specifický inhibitor patologické BCR/ABL tyrosinkinázy – imatinib mesylát.

Relaps ALL

Přes veškerou snahu nadále zůstává nejčastější příčinou neúspěchu léčby ALL relaps onemocnění, který prodělává 20-25% dětí. Z hlediska další prognózy je velmi důležitá doba od diagnózy a místo, kde relaps vzniká. Nejhorší prognózu mají velmi časný relapsy v kostní dřeni, které vznikají do 18 měsíců od diagnózy. Relativně nejlepší prognózu mají pozdní relapsy mimodřeňové, které vznikají v centrálním nervovém systému nebo u chlapců v testes. Léčba relapsů je opět protokolární, v současné době je v České republice používán protokol ALL REZ BFM 2002. Léčba je rozdělena do 3 rizikových skupin, pro skupinu s nejnižším rizikem (S1) je zařazena pouze intenzivní chemoterapie systémem vysokodávkovaných bloků s 2-3 týdenními pauzami, pro skupiny s nejvyšším rizikem (S3-4) je intenzivní chemoterapie zakončena transplantací hematopoetických kmenových buněk od HLA-identického sourozence či od nepříbuzného dárce. Skupina s intermediární prognózou (S2) je stratifikována k transplantaci nebo pouze k chemoterapii podle odpovědi na léčbu měřené hladinou minimální reziduální nemoci po prvních dvou blocích indukční chemoterapie. Přes veškerou snahu jsou výsledky léčby relapsu významně horší než výsledky primární ALL.

Transplantace hematopoetických kmenových buněk, adoptivní imunoterapie

Transplantace hematopoetických kmenových buněk je vzhledem ke své náročnosti a toxicitě vyhrazena u dětské ALL pro poměrně úzkou skupinu pacientů, u kterých selhává léčba vysokodávkovanou chemoterapií. Jedná se o skupinu pacientů s velmi vysoce rizikovou ALL v 1.kompletní remisi a dále velkou část pacientů s relapsem ALL. Konečný výsledek transplantace ovlivňuje celé řada faktorů: dárce (příbuzný vs. nepříbuzný, HLA shoda vs. neshoda, věk, virologický status), použitý štěp (kostní dřev vs. periferní kmenové buňky vs. pupečnicková krev), typ předtransplantační přípravy, typ prevence reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) a v neposlední řadě i stav pacienta před transplantací. Těžká GVHD ohrožuje život pacienta po transplantaci, naopak snaha o její maximální potlačení eliminuje velmi podstatný imunologický efekt štěpu proti leukémii (GvL). Proto existuje neustálá snaha o řízenou “přiměřenou” formu GVHD, která by zajistila GvL efekt, ale pacienta neohrozila. Možnosti, které v současné době existují jsou poměrně omezené, jedná se na prvním místě o nastavení míry prevence GVHD v časném peritransplantačním období různou kombinací a dávkou nejčastěji cyklosporinu A (CsA), antithymocytárního globulinu (ATG) a methotrexátu (MTX) v závislosti na typu dárce a riziku potransplantačního relapsu. Dále se jedná o časně potransplantační vysazování imunosupresivní léčby. Jednou z možností, která je u ALL diskutabilní je i podání infúze dárcovských lymfocytů k indukci GVHD a tedy i GvL efektu ať již preventivně či v případě detekovaného hrozivcího relapsu na úrovni MRN. Všechny tyto metody se shrnují pod pojem adoptivní imunoterapie.

II. Metody

Detekce minimální reziduální nemoci u akutní lymfoblastické leukémie pomocí kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory

Detekce a výběr Ig/TCR cílů

Leukemický klon má uniformní vlastnosti a odráží stádium, ve kterém došlo k maligní transformaci. Pokud tato transformace postihne lymfoidní prekurzor, který již zahájil proces V-(D)-J rekombinace, mají všechny jeho dceřinné buňky stejné sekvence přechodových oblastí podjednotek antigenových receptorů, která jsou pak individuálně specifické pro leukemický klon daného pacienta. Mezi nejčastěji detekované klonální přestavby u leukémií z B řady patří přestavby těžkých řetězců imunoglobulinů, které lze detekovat u více než 95% dětských ALL z B řady. Většinu z nich tvoří kompletní V-D-J přestavby, u 20% lze nalézt nekompletní D-J přestavby [17]. Některé zahraniční skupiny doporučují tento cíl spíše vynechávat z důvodu časté oligoklonality a relativní nestability [18, 19, 20]. Naše zkušenost s těmito cíli je ale velmi dobrá, protože díky dlouhým přechodovým oblastem umožňují dosahovat vysokou specifitu RQ-PCR. Namísto přestaveb IgH je doporučováno využití delečních přestaveb lehkého řetězce kappa (IgK), které se detekuje u přibližně 50% dětských ALL [21]. Tyto přestavby bývají považovány za stabilní, protože představují konečné stádium bez možnosti dalších přesunů. Tzv. kappa deleting element (KDE) se zde přestavuje buď k segmentům Vk nebo k RSS sekvenci mezi segmenty Jk a Ck, 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 vymezenými N nukleotidy navržení specifických primerů, krátká přechodová oblast je však častou příčinou malé specifity RQ-PCR systémů.

U T-ALL je možno sledovat přestavby T buněčného receptoru gama (TCRG), delta (TCRD) a beta (TCRB), přestavby podjednotek alfa se pro přílišnou složitost tohoto vyšetření rutinně neprovádějí. U leukémií z T řady se díky obdobné metodice spolu s přestavbami TCR často vyšetřuje zároveň fúzní gen SIL/TAL1. Zvláštním fenoménem u leukémií je tzv. liniová promiskuita, tento pojem vyjadřuje přestavování genů pro receptory T lymfocytů u ALL z B řady (TCRG, TCRB a nekompletní přestavby TCRD) a naopak výskyt nekompletních přestaveb IgH u T-ALL. Tento jev nám umožňuje rozšíření spektra sledovaných přestaveb.

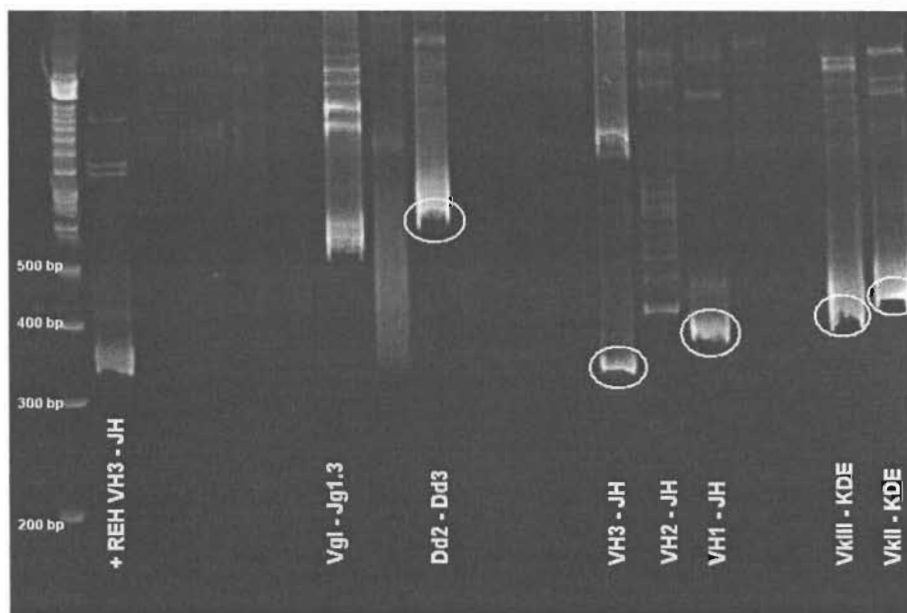
V roce 1999 byl publikován laboratorní skupinou BIOMED-1 standardizovaný postup pro detekci nejčastějších přestaveb imunoreceptorových genů u ALL (IgH, IgK, TCRG, TCRD) [22, 23]. V roce 2003 byl tento soubor rozšířen skupinou BIOMED-2 na celkem 107 primerů v 18 multiplexních reakcích, jejichž kombinací je již možno teoreticky detekovat všechny klonální B-lymfoproliferace a to i malignit s vysokým zastoupením somatických hypermutací. Totéž platí díky zahrnutí TCR beta (TCRB) i pro klonální T buněčné populace [24]. V naší laboratoři používáme 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/TAL1), viz Příloha 1 a 2. Teprve když nenajdeme vhodné cíle pomocí tohoto základního panelu, provádíme detekci nekompletních přestaveb IgH a přestaveb TCRB.

Určení klonality

Po získání PCR produktů je nezbytné odlišit klony s identickými přechodovými oblastmi od polyklonálních lymfoidních buněk. Vzhledem k malým rozdílům v délce těchto oblastí není možné na klasickém agarózovém gelu určit, zda jde o směs různě dlouhých produktů nebo o jediný produkt. K určení klonality jsou tak doporučovány dvě techniky: analýza heteroduplexů nebo GeneScanning (analýza pomocí kapilární elektroforézy). Analýza heteroduplexů se provádí na 6-8% polyakrylamidovém gelu po denuraci produktů PCR (5

minut při 95°C) následované rychlou renaturací (1 hodina při 4°C). Homoduplexy vytvořené z monoklonálních produktů díky stejné rychlosti migrace v gelu vytvoří jediný pruh, heteroduplexy vzniklé náhodným spojením polyklonálních produktů migrují pomaleji a vytvoří neostře ohraničený široký pruh („smear“). Lze také dobře odlišit produkty biklonální a oligoklonální [25]. 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) [24]. V naší laboratoři používáme k určení klonality analýzu heteroduplexů. Na obr.1 je příklad analýzy heteroduplexů na polyakrylamidovém gelu konkrétního pacienta. Vhodné monoklonální proužky sterilně vyřízneme, eluujeme ve vodě, reamplifikujeme pomocí stejné sady primerů. Získané produkty pak přečistíme a sekvenujeme na přístroji ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, USA).

Obr. 1 : Výsledek analýzy heteroduplexů na polyakrylamidovém gelu z diagnostického vzorku pacienta s ALL. Označeny jsou monoklonální přestavby.



Navrzení klonálně specifických primerů a optimalizace RQ-PCR

Získané sekvence přechodových V-(D)-J oblastí lze vyhodnocovat pomocí databází volně přístupných na internetu (např. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>, <http://www.dnplot.de>, <http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire>). K popisu sekvencí a návržení klonálně specifických primerů používáme software VECTOR NTI 8 Suite (INFORMAX, Bethesda, MD, USA). Primery navrhujeme tak, aby je bylo možné použít v RQ-PCR s hydrolyzační sondou a reverzním primerem, které jsou umístěny v konsensus oblasti dané přestavby [26, 27, 28, 29, 30]. Existují určitá základní pravidla pro tvorbu specifických primerů, ale neméně důležitá je i zkušenost. Je výhodné navrhnout pro každý systém minimálně dva primery zasahující do různých oblastí přechodové V-(D)-J sekvence, protože rozdíly v dosažené senzitivě a specifitě PCR bývají výrazné. 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 standardně používáme ředění 10^{-1} až 10^{-5} po jednotlivých řádech. Abychom mohli později přesně stanovit hladinu MRN, musíme stanovit koncentraci DNA diagnostického a všech dalších vzorků pacienta pomocí kvantifikace kontrolního genu. Většina laboratoří používá k tomuto účelu albumin [31]. Při optimalizaci RQ-PCR se pomocí změn teplot fáze annealingu, poměru koncentrace primerů a změn koncentrace Mg^{2+} snažíme docílit co nejvyšší specifity a senzitivity konkrétního systému. Podle pravidel ESG-MRD-ALL je požadován pro každého pacienta minimálně jeden systém s citlivostí 10^{-4} , vždy je ale lepší sledovat MRN pomocí dvou nezávislých cílů, protože v určitém procentu případů může docházet ke klonální evoluci v průběhu vývoje choroby s následkem ztráty daného cíle a možnou falešnou negativitou [32, 33]. Velkým problémem je v případě genů pro imunoreceptory pozadí zdravých lymfocytů, což platí zvláště u systémů s menším množstvím

rekombinovatelných genových segmentů a tedy s menším počtem náhodně vzniklých kombinací. Jedná se zejména o TCRG, TCRD a delece IgK. Avšak v případě krátkých N-segmentů nebo nevhodně navržených primerů může dojít k nespecifickému nasedání primerů na DNA „zdravých“ lymfocytů v kterémkoliv systému. Aby se co nejučinněji zabránilo 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 směs kontrolní DNA od 10 dárců), vše se provádí nejméně v šesti replikátech. Tímto se poměrně komplikují definice pojmů senzitivita a specifita a samotné stanovení vlastní hladiny MRN. Pro správnou interpretaci výsledků bylo nutné zavést pojem rozmezí kvantifikovatelnosti (quantitative range, QR) a zavést několik dalších pravidel. Podrobně jsou všechna nyní platná doporučení shrnuta v článku publikovaném naší laboratoří [34]. Na pravidelných schůzkách skupiny ESG-MRD-ALL jsou pravidla pro interpretaci výsledků neustále upřesňována, zvláště proto, že výsledky vyšetření MRN se již používají v některých protokolech v klinických aplikacích. Např. při použití této metody pro určení skupiny pacientů vhodných k snížení intenzity léčby (protokol ALL BFM 2000) je nutné vyhnout se falešné negativitě. Naopak při indikaci zásahů, které se snaží odvrátit např. hrozící potransplantační relaps onemocnění je nezbytná obezřetnost vzhledem k možné falešné pozitivitě. Opatrně je třeba přistupovat i k hodnocení dynamiky MRN vzhledem k technickým limitům metody PCR: je-li rozdíl Ct („crossing point“, cyklus ve kterém fluorescence překročí hodnotu pozadí) mezi duplikáty pacienta ≥ 1.0 , bude výsledná hodnota koncentrace templátu ve vzorku kolísat o 100% a více. Hodnotit tedy dynamiku MRN mezi dvěma vzorky v tomto rozmezí hladin MRN je zavádějící. Za určitých okolností může např. změna hladiny MRN z kvantifikovatelného rozmezí do oblasti vyjádřené pouze jako „pozitivita“ znamenat pouze horší technickou kvalitu konkrétního RQ-PCR a nikoliv skutečný pokles nádorové zátěže.

III. Výsledky

Minimální reziduální nemoc u dětí s relapsem ALL

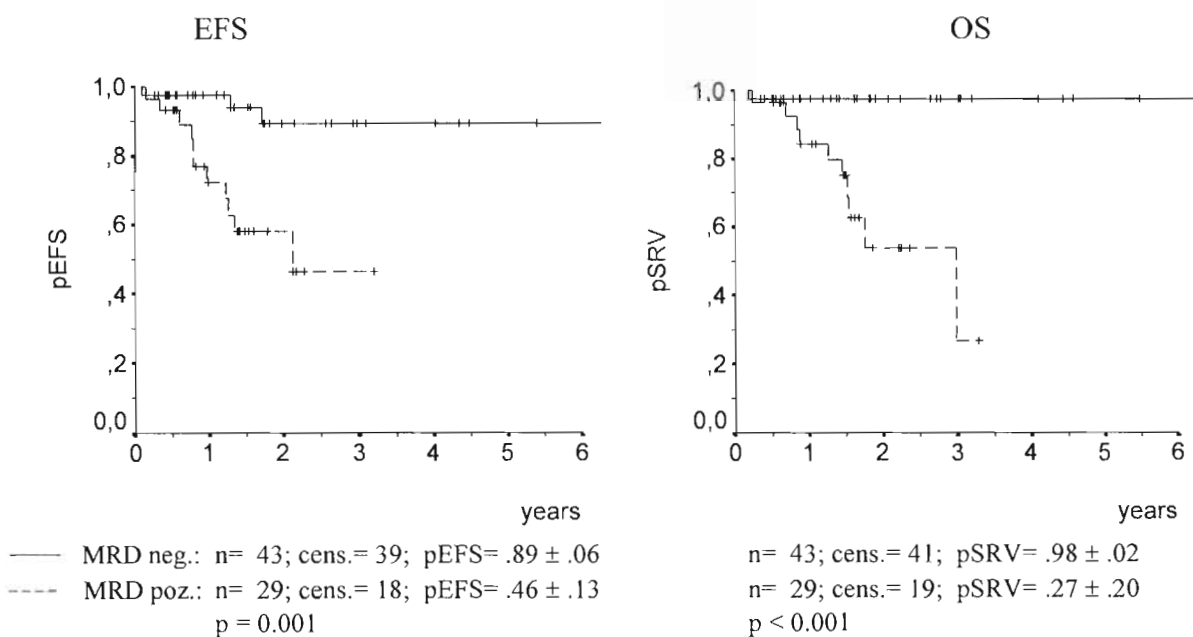
V roce 2002 jsme se v celé České republice zapojili do prvního protokolu pro léčbu relapsu dětské ALL, který přímo integruje používání hladiny MRN jako hledisko další stratifikace léčby. Jedná se o protokol ALL REZ BFM 2002, který vznikl v Německu. V rámci tohoto protokolu se používá celosvětově uznávané rozdělení relapsů do 3 základních skupin, zde označované jako S1, S2, S3-4. Poměrně komplikovaná kritéria zařazení do jednotlivých skupin shrnuje Tabulka 2.

Tabulka 2: Definice rizikových skupin relapsů ALL (S1 až S4)

| Lokalizace Doba | Imunofenotyp: non – T | | | Imunofenotyp: (pre-) T | | |
|--------------------|-----------------------------|-------------|----------------------|-----------------------------|-------------|----------------------|
| | Extramedulární izolovaný | Kombinovaný | Dřeňový izolovaný | Extramedulární izolovaný | Kombinovaný | Dřeňový izolovaný |
| Velmi časný | S2 | S4 | S4 | S2 | S4 | S4 |
| Časný | S2 | S2 | S3 | S2 | S4 | S4 |
| Pozdní | S1 | S2 | S2 | S1 | S4 | S4 |

Léčebná strategie zahrnuje pro S1 skupinu pouze chemoterapii, pro skupinu S3-4 je vysokodávkovaná chemoterapie zakončena alogenní transplantací kostní dřeně od sourozence nebo alternativního dárce. Avšak největší část pacientů spadá do skupiny S2. Zde je otázkou, zda zatěžovat pacienty riziky spojenými s transplantací, či a pro které z nich je léčba pouze chemoterapií dostatečná [35]. Určitou odpověď dala retrospektivní studie MRN po indukční chemoterapii pro tuto skupinu na předchozím protokolu ALL REZ BFM 96-97, jak ukazuje obr.2, kde je jasně patrný rozdíl v přežívání mezi pacienty MRN pozitivními a negativními [36].

Obr. 2: EFS a OS podle hladiny MRN po 2. bloku chemoterapie ve skupině S2 na protokolu ALL-REZ BFM 95/96 (vyhodnoceno k 8/01)



Na základě této studie bylo pro skupinu S2 zavzáto do protokolu ALL REZ BFM 2002 rozhodnutí o alogenní transplantaci od alternativního dárce, které se opírá o hladinu MRN. Jako hranice mezi dvěma skupinami byla určena hladina MRN $\geq 10^{-3}$ po 2 blocích indukční chemoterapie. Základní principy léčebného protokolu ALL REZ BFM 2002 jsou shrnuty v Příloze 3.

Monitorování MRN v průběhu chemoterapie a indikace k alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk u dětí s relapsem ALL

Celkem jsme v České republice od července 2002, kdy bylo zahájeno používání nového léčebného protokolu, zařadili do studie 39 pacientů s 1. relapsem ALL do 18 let bez předchozí transplantace. Do S1 skupiny byli zařazeni 3 pacienti (7.7%), do S2 skupiny 27 pacientů (69.3%) a 9 pacientů do S3-4 (23%). Z 27 pacientů S2 skupiny bylo 13 stratifikováno pro další léčbu (chemoterapie vs. transplantace) podle hladiny MRN po 2 blocích indukční

chemoterapie. Ostatní pacienti z S2 skupiny byli indikováni k transplantaci z jiných důvodů bez ohledu na MRN (pacienti s HLA-identickým sourozencem, pacienti s Ph pozitivní ALL, pacienti zařazení do zvláštního protokolu autologní transplantace pro vysocerizikové CNS relapsy). Z těchto 13 pacientů, jsme nezískali u 1 pacienta dostatečný vzorek kostní dřeně z diagnózy relapsu, vyšetřeno tedy bylo 12 pacientů, u všech jsme byli schopni detekovat hladinu MRN. Přičemž 5 pacientů spadalo do skupiny s $MRN \geq 10^{-3}$ a 7 pacientů do skupiny s MRN méně než 10^{-3} . V průběhu léčby relapsu byly vyšetřovány všechny dostupné vzorky kostní dřeně pacientů, tyto výsledky však nebyly dostupné pro klinické využití. Souhrn námi vyšetřených 13 pacientů ukazuje Tabulka 3.

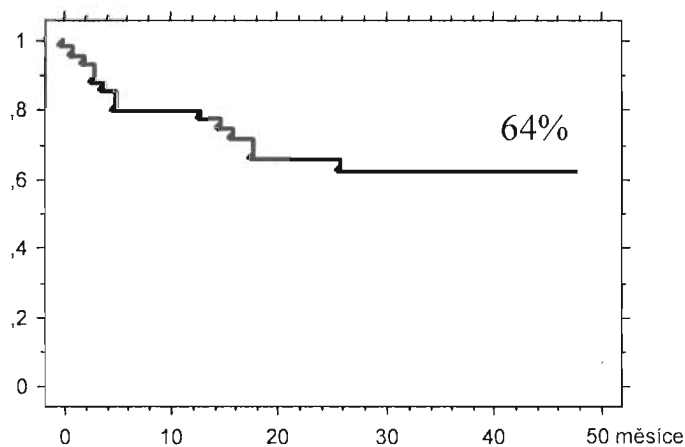
Tabulka 3: Pacienti s S2 relapsem stratifikovaní k chemoterapii vs. transplantaci na základě MRN

| Pacient č. | Podtyp ALL | Počet IRG cílů | Hladina MRN po indukční terapii | HSCT v CR2 | Poznámky |
|------------|------------|----------------|---------------------------------|------------|--|
| 1 | TEL/AML1 | 2 | 3.39E10-4, 1.39 E10-4 | Ne | prodělal 2.relaps |
| 2 | TEL/AML1 | 1 | neg. | Ne | Žije v CR2 |
| 3 | BCP | 1 | neg. | Ne | Žije v CR2 |
| 4 | TEL/AML1 | 1 | 3.25E10-2 | Ano | Žije v CR2 po HSCT |
| 5 | BCP | 1 | 1.69E10-1 | Ne | netransplantován v CR2 (rodiče odmítli), prodělal 2.relaps, HSCT v CR3 |
| 6 | BCP | 2 | 1.12E10-1, 1.48E10-1 | Ne | prodělal 2.relaps před HSCT transplantován v PR3 |
| 7 | TEL/AML1 | 1 | 9.54E10-4 | Ano | žije v CR2 po HSCT |
| 8 | BCP | 2 | 4.26E10-4, 3.06E10-4 | Ne | žije v CR2 |
| 9 | BCP | 2 | neg., neg. | Ne | žije v CR2 |
| 10 | BCP | 2 | 8.84E10-1, 6.6 E10-1 | Ano | žije v CR2 po HSCT |
| 11 | BCP | 2 | 1.05E10-4 4.56E10-5 | Ne | žije v CR2 |
| 12 | BCP | 2 | 2.61E10-4 1.34E10-4 | Ne | žije v CR2 |
| 13 | BCP | - | nelze málo materiálu | Ne | žije v CR2 |

Na základě pomalejší clearance hladiny MRN po indukční chemoterapii jsme tedy přímo indikovaly 5 dětí k nepřibuzenské transplantaci kostní dřeně. U pacienta č.5 rodiče transplantaci odmítli, proto byla dokončena léčba pouze chemoterapií. Tento pacient následně prodělal relaps onemocnění a byl po dosažení 3.kompletní remise transplantován. Pacient č.6 prodělal 2. velmi časný dřeňový relaps ALL na intenzivní chemoterapii před plánovanou transplantací. Po změně chemoterapie dosáhl parciální remise s vymizením blastů v KD, avšak bez obnovy krvetvorby a v této fázi byl transplantován. U všech transplantovaných pacientů byla následně monitorována MRN i po alogenní transplantaci.

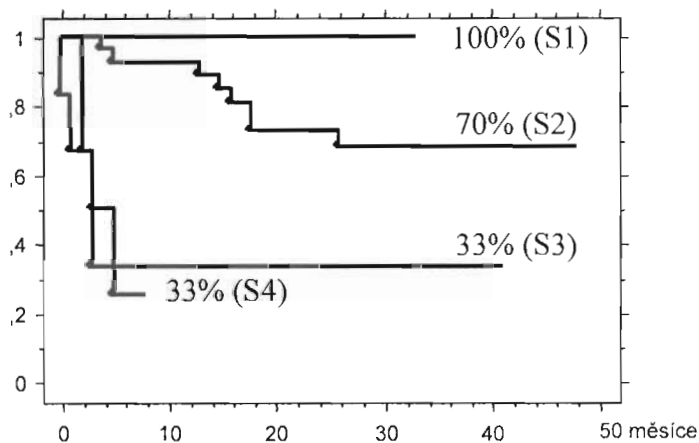
Celkové předběžné léčebné výsledky nového protokolu představují výrazný posun v léčbě dětí s relapsem ALL, který je kromě zlepšení podpůrné péče a zkušeností, způsoben i odlišným složením jednotlivých skupin ve smyslu snížení počtu těch nejrizikovějších a nejhůře ovlivnitelných relapsů oproti předchozímu protokolu. Celkem dosáhlo v naší skupině 39 pacientů 2.kompletní remise (CR2) 36 pacientů (92.3%), 1 pacient zemřel v indukční fázi léčby na sepsi a encefalopatii, 2 pacienti byli hodnoceni jako non-respondeři. V celé skupině prodělalo 9 pacientů 2.relaps a 3 děti zemřely v remisi onemocnění na potransplantační komplikace. Celkem žije 31 dětí (25xCR2, 5xCR3 a 1xCR4). Celkové přežití bez události (EFS) je při době sledování 4-48 měsíců (medián 32 měsíců) 64 %, jak ukazuje obr. 3.

Obr. 3: Protokol ALL REZ BFM 2002 – Česká republika, celkový EFS



Ve shodě se zahraničními zkušenostmi zůstává nadále neuspokojivý osud pacientů ve skupině S3-4, v současné době jsou pro tuto skupinu pacientů plánovány některé experimentální léčebné studie. Naopak můžeme potvrdit velmi dobrou prognózu pacientů S1 skupiny. V největší S2 skupině pacientů se očekává zlepšení výsledků díky zařazení stratifikace dle MRN, tuto hypotézu bude možné potvrdit až z větším časovým odstupem. Na obr. 4 jsou patrné výrazně odlišné výsledky léčby jednotlivých rizikových skupin relapsů ALL.

Obr. 4: Protokol ALL REZ BFM 2002 – Česká republika EFS dle rizikových skupin



Minimální reziduální nemoc před a po alogenní **transplantaci** hematopoetických kmenových buněk

Jak je známo z několika retrospektivních studií, je **hladina MRN** těsně před alogenní HSCT důležitým nezávislým prognostickým znakem u dětských pacientů s ALL [37, 38, 39, 40]. Pacienti, kteří vstupují do předtransplantační přípravy s vysokou hladinou MRN mají signifikantně horší prognózu díky vysokému riziku potransplantačního relapsu. Pouze velmi malá část pacientů s potransplantačním relapsem má šanci na vyléčení díky 2. transplantaci v kombinaci s chemoterapií a imunoterapií. Všechna tato léčba je zatížena vysokou morbiditou a velmi špatným přežitím. Vzhledem k relativně malým počtům dětských pacientů s ALL, kteří podstupují transplantaci hematopoetických kmenových buněk byla založena mezinárodní skupina (pre BMT MRD study group), která zahájila prospektivní monitorování dětských pacientů s ALL před a po transplantaci. Tato skupina zahrnuje laboratoře a dětská transplantační centra v Holandsku, Velké Británii, Německu, Dánsku a České republice.

Nyní prezentujeme data, která shrnují monitorování MRN u všech dětských pacientů s ALL následně transplantovaných v České republice od srpna 2000 do července 2004 na Transplantační jednotce II.dětské kliniky a následně Kliniky dětské hematologie a onkologie, Fakultní nemocnice v Motole v Praze, kteří byly sledováni v Laboratoři molekulární genetiky při stejné instituci. Individuální monitorování MRN bylo využíváno pro rychlou indikaci adoptivní imunoterapie (vysazení imunosuprese, infúze dárcovských lymfocytů) v případech **hrozícího** potransplantačního relapsu.

Monitorování MRN u dětí po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk

Od srpna 2000 do července 2004 jsme do naší studie zahrnuli 34 dětských pacientů ve věku

1.1 – 19 let, kteří byli transplantováni v našem centru (Tabulka 4).

Tabulka 4: Transplantovaní pacienti s ALL

| Č. | Věk/ pohlaví | Podtyp ALL | Remise | Předtransplantační příprava | Dárce (HLA shoda) | Stupeň GVHD |
|----|-----------------|--------------------------|--------|--------------------------------|----------------------|----------------|
| 1 | 11/m | T-ALL | CR1 | CTO 12 Gy, VP16 | MSD | III., cGVHD |
| 2 | 12/m | TEL/AML1 | PR3 | CTO 12 Gy, VP16 | MSD | II. |
| 3 | 10/m | TEL/AML1 | CR3 | CTO 14.4Gy,VP16 | UD (10/10) | II. |
| 4 | 8/m | T-ALL | CR1 | CTO 12 Gy, VP16 | MSD | II |
| 5 | 7/m | T-ALL | CR2 | CTO 14.4, CPH | UCB (5/6) | II. |
| 6 | 15/m | MLL/AF4 | CR1 | CTO 12 Gy, VP16 | MSD | I., cGVHD |
| 7 | 10/m | TEL/AML1 | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | MSD | II. |
| 8 | 10/m | BCR/ABL | CR1 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II. |
| 9 | 11/m | BCR/ABL | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | - |
| 10 | 15/ž | BCR/ABL | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (9/10) | - |
| 11 | 12/m | BCR/ABL | CR1 | CTO 14.4Gy, CPH | UD (9/10) | - |
| 12 | 19/m | BCP | CR3 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II. |
| 13 | 16/m | BCP | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II. |
| 14 | 10/m | TEL/AML1 | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (7/10) | II. |
| 15 | 8/ž | TEL/AML1 | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | MSD | - |
| 16 | 7/ž | TEL/AML1 | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | MSD | II. |
| 17 | 3/m | T-ALL | CR1 | CTO 12 Gy, VP16 | MSD | II. |
| 18 | 10/ž | BCR/ABL | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | - |
| 19 | 2/m | MLL přestavba | CR2 | BuCy, VP16 | UD (10/10) | - |
| 20 | 8/m | BCR/ABL | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (9/10) | II. |
| 21 | 8/m | BCP | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (9/10) | II. |
| 22 | 1/ž | T-ALL (MLL přestavba) | CR1 | BuCy, VP16 | UD (10/10) | II. |
| 23 | 8/m | T-ALL | CR1 | CTO 12 Gy, VP16 | MFD (10/10) | II. |
| 24 | 10/ž | TEL/AML1 | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (9/10) | II. |
| 25 | 6/m | BCP | PR3 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II. |
| 26 | 2/m | MLL/AF6 | CR2 | BuCy, Mel | MSD | II. |
| 27 | 12/m | BCR/ABL | CR1 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (8/10) | II. |
| 28 | 9/m | BCP | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (9/10) | IV. |
| 29 | 5/m | BCR/ABL | CR1 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II. |
| 30 | 8/m | TEL/AML1 | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II. |
| 31 | 12/m | BCP | PR3 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II. |
| 32 | 16/m | BCP | PR3 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | - |
| 33 | 9/m | BCP | CR2 | CTO 12 Gy, VP16 | MSD | II. |
| 34 | 17/ž | BCR/ABL | CR1 | CTO 12 Gy, VP16 | UD (7/10) | II. |

U všech pacientů jsme vyšetřovali vzorky kostní dřeně z primární diagnózy a relapsu z důvodu ověření stability klonu. Dále jsme vyšetřovali vzorek kostní dřeně před zahájením předtransplantační přípravy a pravidelně po transplantaci: den +28, +60, +100, +180 a později 9, 12, 18 a 24 měsíců, pokud byly dostupné. U dětí s velmi vysokým rizikem relapsu jsme navíc monitorovali MRN v periferní krvi každý měsíc v prvních šesti měsících po transplantaci a později každé 3 měsíce. V naší sledované skupině bylo 28 dětí s B-prekurzorovou ALL a 6 dětí s T-ALL. Celkem bylo 11 dětí transplantováno v 1.kompletní remisi (CR1); všechny pro vysoce rizikovou ALL (T-ALL a prednison poor response (4), BCR-ABL pozitivní (5), MLL přestavba (2)); 19 dětí bylo transplantováno v 2. nebo další kompletní remisi, 4 děti byly transplantovány v parciální remisi bez zvýšeného počtu blastů v kostní dřeni, avšak bez regenerace normální hematopoézi. Dárce hematopoetických kmenových buněk byl v 10 případech HLA-identický sourozenec, ve 22 případech nepříbuzný dárce z registru s různou mírou shody HLA (od 7 do 10/10 antigenů na úrovni high resolution PCR), 1 pacient byl transplantován nepříbuznou pupečnickovou krví z registru a 1 pacient od fenotypicky identické matky.

U většiny transplantací (n=30) jsme použili velmi podobnou předtransplantační přípravu založenou na celotělovém ozáření (CTO) v dávce 12 nebo 14,4 Gy a etoposid 60mg/m², v případě pupečnickové transplantace byla na základě protokolu použita příprava celotělovým ozářením (CTO) a cyklofosfamidem 2x60mg/kg; u 3 dětí transplantovaných ve věku pod 2 roky jsme použili přípravu založenou na busulfanu (2x busulfan, cyklofosfamid a melfalan, 1x busulfan, cyklofosfamid a etoposid). U většiny nepříbuzných transplantací (n=19) jsme podávali antithymocytární globulin v dávce 10mg/kg po dobu 4 dní.

Jako prevence reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease – GVHD) byl použit intravenózní CsA v dávce 3mg/kg, pokud byl dárce HLA-identický sourozenec a kombinace CsA 5mg/kg a methotrexátu (MTX) podávaného den +1, 3 a 6 u nepříbuzných

dárců, vždy s přechodem na p.o. CsA v odpovídajících dávkách v období obnoveného perorálního příjmu pacientů. Od února 2003 jsme začali používat protokol redukované GVHD profylaxe s cílenou dávkou CsA s požadovanou sérovou hladinou 80- 130 ug/l (metoda FPIA). Pouze v jednom případě transplantace pupečnickovou krví jsme použili v prevenci GVHD kombinaci CsA a methylprednisolonu dle doporučení protokolu. Incidence akutní GVHD byla v naší skupině poměrně nízká, 1 dítě vyvinulo akutní GVHD grade I, u 24 dětí jsme diagnostikovali akutní GVHD grade II a 7 dětí neprodělalo žádnou akutní GVHD. Zaznamenali jsme pouze 2 případy těžké akutní GVHD (1x grade III, 1x grade IV). Příloha 4 shrnuje definice jednotlivých stupňů GVHD.

Hladiny MRN byly kvantitativně sledovány pomocí detekce přestaveb imunoreceptorových genů výše popsanou metodikou. Z celkem 34 pacientů jsme byli schopni vyhodnotit hladinu MRN před transplantací pomocí Ig/TCR přestaveb u 22 z nich, ve 2 případech nebyl předtransplantační vzorek dostupný z důvodu těžké aplázie kostní dřeně, ve 4 případech jsme nenalezli žádný cíl a 6 pacientů bylo monitorováno pouze prostřednictvím specifického fúzního genu (BCR/ABL, TEL/AML1, MLL/AF4) pomocí dvoukolové RT-PCR nebo kvantitativní PCR. Všech 22 pacientů bylo pravidelně monitorováno pomocí Ig/TCR přestaveb (2 cíle u 13 pacientů, 1 cíl u 9 pacientů), s citlivostí minimálně 10^{-4} pro 1 cíl u každého pacienta. Jedinou výjimkou byl pacient č.12, u kterého byl nalezen pouze 1 cíl s citlivostí 10^{-3} . Většina neúspěšných detekcí spadá do prvního období kvantitativního monitorování MRN, s přibývajícím zkušeností se naše výsledky zlepšovali, avšak vždy zůstane malá skupina pacientů, u kterých nelze MRN pomocí Ig/TCR přestaveb monitorovat.

Podle hladiny MRN v kostní dřeni před zahájením předtransplantační přípravy jsme rozdělili pacienty do 2 skupin (Tabulka 5), první skupina (MRN pozitivní) zahrnuje pacienty s hladinou MRN detekovatelnou v rámci kvantitativního rozmezí metody, což znamená více než 10^{-4} nebo 10^{-3} podle citlivosti jednotlivého cíle. Druhá skupina (MRN negativní) zahrnuje

pacienty s nedetekovatelnou hladinou MRN před transplantací nebo s velmi nízkou hladinou pod kvantitativním rozmezím.

Tabulka 5: Hladiny MRN v kostní dřeni před zahájením předtransplantační přípravy a přežití pacientů

| Pacient č. | Podtyp ALL | Počet IRG cílů | Hladina MRN | Relaps po HSCT | Poznámky |
|------------|---------------------------|----------------|-------------------------------------|----------------|--|
| 2 | TEL-AML1 | 1 | 1.47E10-4 | Ano | Zemřel v remisi (systémová mykóza, těžká indukovaná GVHD po DLI) |
| 8 | BCR-ABL | 2 | 5.3E10-2, 9.2E10-2 | Ano | Zemřel v remisi (systémová mykóza) |
| 9 | BCR-ABL | 2 | negat., 1.3E10-4 | Ano | Zemřel na progresi nemoci (při léčbě relapsu) |
| 10 | BCR-ABL | 1 | 1.2E10-3 | Ano | Zemřel na progresi nemoci |
| 11 | BCR-ABL | 2 | 2.3E10-4, 6.2E10-4 | Ano | Zemřel v remisi (systémová mykóza, těžká indukovaná GVHD po DLI) |
| 13 | BCP | 1 | 2.8E10-2 | Ne | Zemřel na multiorgánové selhání při G-sepsi den+66 |
| 22 | T-ALL Přestavba MLL | 1 | 6.4E10-3 | Ano | Žije v CR po 2.HSCT |
| 1 | T | 2 | negat., negat. | Ne | Žije v CR |
| 4 | T | 1 | pozit.(pod kvantitativním rozmezím) | Ne | Žije v CR |
| 12 | BCP | 1 | negat. | Ne | Žije v CR |
| 15 | TEL-AML1 | 2 | negat., negat. | Ne | Žije v CR |
| 16 | BCP | 1 | neg. | Ne | Žije v CR |
| 17 | T-ALL | 2 | negat., negat. | Ne | Žije v CR |
| 18 | BCR-ABL | 2 | negat., negat. | Ne | Žije v CR |
| 20 | BCR-ABL | 1 | negat. | Ne | Žije v CR |
| 21 | BCP | 2 | pozit.(pod kvantitativním rozmezím) | Ne | Žije v CR |
| 23 | T-ALL | 2 | negat., negat. | Ne | Žije v CR |
| 24 | TEL-AML1 | 1 | negat. | Ne | Žije v CR |
| 26 | MLL-AF6 | 2 | negat., negat. | Ne | Žije v CR |
| 27 | BCR-ABL | 2 | negat., negat. | Ne | Žije v CR |
| 29 | BCR-ABL | 2 | negat., negat. | Ne | Žije v CR |
| 31 | BCP | 2 | negat., negat. | Ne | Žije v CR |

MRN pozitivní skupina představuje 7 pacientů (č. 2, 8, 9, 10, 11, 13 a 22). Jeden z nich zemřel časně na potransplantační komplikace (den+66 – multiorgánové selhání při Gram negativní sepsi), 6 dětí prodělalo hematologický relaps, ačkoliv všichni dosáhli přechodné potransplantační negativity. U 5 z nich jsme zaznamenali minimálně 1 pozitivní vzorek a u 3 pacientů jsme měli i dostatek času odvrátit hrozící relaps, avšak navzdory veškeré snaze, všichni tito pacienti nakonec relabovali. Doba od první MRN positivity po transplantaci do hematologického relapsu byla 0-486 dní (0,30,36, 330, 365 a 486 dní).

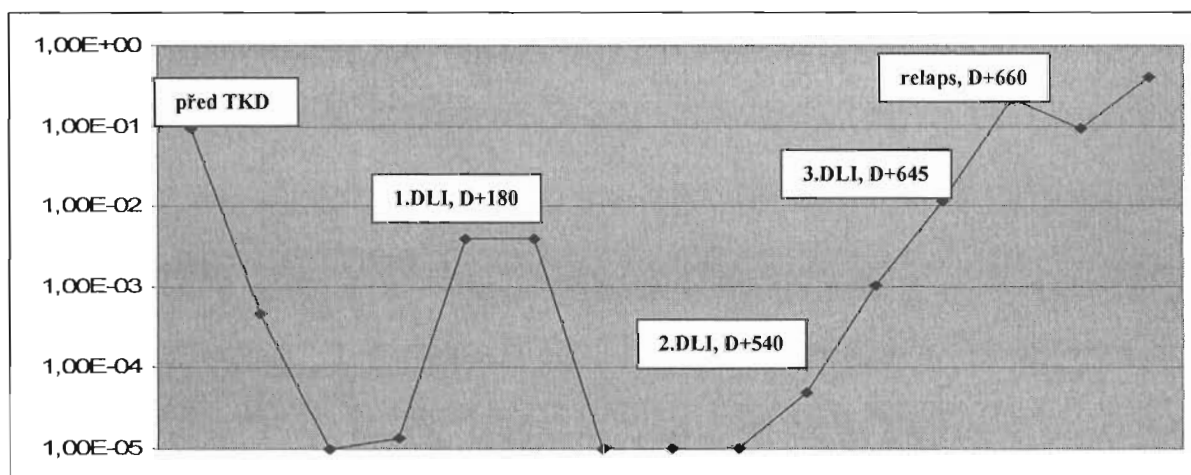
Léčba potransplantačního relapsu byla velmi různorodá, v jednom případě (pacientka č.10) jsme po dohodě s rodiči neindikovali žádnou další léčbu tohoto velmi agresivního 2.relapsu BCR/ABL pozitivní ALL. Pacient č. 2 prodělal relaps relativně pozdně (den+480), byl to pacient TEL/AML1 pozitivní transplantovaný v CR3. Použili jsme léčbu redukovanou indukční chemoterapií (prednison, vinkristin, asparagináza, daunorubicin) a po měsíci chemoterapie jsme podali infúzi dárcovských lymfocytů v dávce 1×10^8 /kg CD3+buněk. Pacient dosáhl molekulárně genetické remise onemocnění, avšak vyvinul těžkou sekundární jaterní GVHD grade IV (jaterní) s minimální odpovědí na kombinovanou imunosupresivní terapii a zemřel na systémovou infekci *Candida crusei* 4 měsíce po diagnóze relapsu v molekulárně genetické remisi ALL.

Potransplantační hematologický relaps pacienta č.11 (1.relaps BCR/ABL pozitivní ALL) jsme léčili vysazením imunosuprese a podáním infúze dárcovských lymfocytů v dávce 1×10^6 /kg CD3+ buněk se současným podáváním imatinib mesylátu, specifického inhibitoru BCR/ABL kinázy. Pacient dosáhl molekulárně genetické remise po 2 měsících léčby, avšak také vyvinul těžkou sekundární GVHD grade IV (střevní a jaterní) a zemřel na následky systémové aspergilózy den+226 po transplantaci.

U pacienta č. 8 jsme díky intenzivnímu monitorování MRN detekovali prudký nárůst hladiny den +180 (5×10^{-3}) a situaci jsme uzavřeli jako molekulárně genetický relaps. Tento pacient

byl již preventivně léčen od dne+80 imatinib mesylátem, proto jsme mu navíc podali DLI v dávce 5.7×10^6 /kg CD3+ buněk a zvýšili dávku imatinib mesylátu. Pacient dosáhl molekulárně genetické remise bez manifestace sekundární GVHD. Po 6 měsících trvající molekulárně genetické remise jsme přerušili podávání imatinib mesylátu, které bylo následováno rychlým vzestupem hladiny MRN. Proto jsme znovu zahájili podávání tohoto léku a současně jsme podali 2.dávku DLI. Přestože hladina MRN dočasně klesla (měřeno v periferní krvi), následoval opakovaný vzestup. Pokusili jsme se proto k léčbě přidat interferon alfa s významnou hematologickou toxicitou a bez efektu na hladinu MRN. Den+645 po transplantaci jsme podali 3.DLI pro trvale narůstající hladinu MRN, ani tímto zásahem jsme neindukovali sekundární GVHD. Den+660 jsme diagnostikovali hematologický relaps. Průběh hladin MRN ve vztahu k léčebným zásahům shrnuje obr. 5. Tento pacient byl po hematologickém relapsu léčen chemoterapií s následnými DLI a plánovali jsme provedení 2.transplantace, avšak pacient zemřel na multiorgánové selhání při gram negativní sepsi v období těžké aplázie kostní dřeně.

Obr. 5.: Pacient č.8 - průběh hladin MRN v kostní dřeni a léčebné zásahy

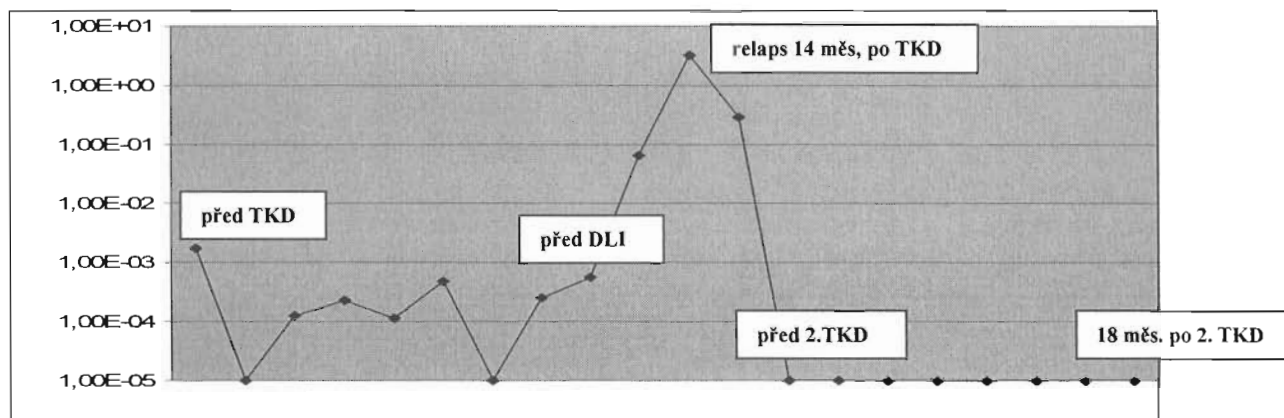


U pacienta č.9 jsme detekovali molekulárně genetický relaps den+360, hladina MRN v tomto období stoupla z negativity do pozitivita na hladině 10^{-4} , pacient byl léčen pro limitovanou chronickou GVHD kombinovanou imunosupresí. Proto jsme ukončili imunosupresivní terapii

a zahájili podávání imatinib mesylátu. Pacient manifestoval sekundární kožní GVHD grade II, která byla léčena pouze lokálními kortikosteroidy a dosáhl molekulárně genetické remise. Po 6 měsících jsme ukončili podávání imatinib mesylátu a za dalších 6 měsíců jsme detekovali opětovný vzestup MRN positivity v kostní dřeni a současně jsme diagnostikovali infiltraci lymfoblasty v mozkomíšním moku. Zahájili jsme léčbu kombinací nízkodávkované systémové chemoterapie, intenzivní intrathekální léčby a imatinib mesylátu. Plánovali jsme podání DLI, avšak pacient zemřel 3 týdny po přijetí na nezvládnutelnou progresi leukémie v CNS.

U posledního pacienta z této skupiny, pacientky č. 22, jsme detekovali první MRN pozitivitu 60 dní po transplantaci, z tohoto důvodu jsme rychle začali snižovat imunosupresivní terapii (kortikosteroidy, CsA), kterou jsme ukončili den+90, v tomto období byl také detekován smíšený chimerismus (10% autologní hematopoezi). Pacientka vyvinula kožní GVHD grade III, léčenou nejprve kortikoidy 1mg/kg, při minimální odpovědi byl znovu přidán CsA. Po 1 měsíci léčby jsme dosáhli dobré odpovědi kožní GVHD, proto mohla být imunosuprese redukována a následně ukončena den+135. Den+155 jsme podali 1.dávku DLI (1×10^6 CD3+/kg), během následujících 2 měsíců jsme nezaznamenali žádnou GVHD, byl detekován pouze dárcovský chimerismus a pacientka se stala MRN negativní den+180. Od 11 měsíce po transplantaci jsme opět detekovali narůstající MRN pozitivitu, proto jsme podali 2 dávky DLI (1×10^7 CD3+/kg, 1×10^8 CD3+/kg) v intervalu 5 týdnů bez vyvolání sekundární GVHD. V době podání poslední dávky DLI, byl opět detekován i smíšený chimerismus a po 2 týdnech jsme diagnostikovali hematologický relaps ALL (13 měsíců po HSCT). Pacientka dosáhla 2.kompletní remise po vysokodávkované chemoterapii a současně i molekulárně genetické negativity před 2.alogenní transplantací. V současné době je po transplantaci, v dobrém klinickém stavu a v molekulárně genetické remisi onemocnění. Průběh hladin MRN shrnuje obr. 6.

Obr.6.: Pacientka č.22 - průběh hladin MRN v kostní dřeni a léčebné zásahy

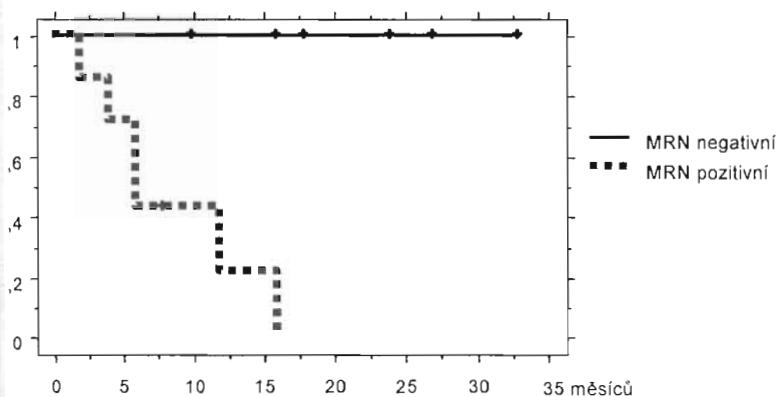


Skupina MRN negativních pacientů zahrnuje 15 dětí (č. 1, 4, 12, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29 a 31), všichni žijí v hematologické remisi s dobou sledování 8-53 měsíců (medián 20 měsíců). Pouze u tří dětí z této skupiny jsme detekovali jakoukoliv MRN pozitivitu po transplantaci, ve dvou případech (pacient č. 18 a 23) to byla pouze tranzitní pozitivita pod kvantitativním rozmezím metody, ve třetím případě (pacient č. 26) jsme detekovali opakovanou hladinu MRN kolem 10^{-4} . Tento pacient je po 2 dávkách DLI bez projevů GVHD a s trvalou nízkou intermitentní MRN pozitivitou.

Přežití bez události (EFS) a celkové přežití (OS) skupiny MRN negativních pacientů je signifikantně lepší než skupiny pacientů s pozitivní MRN před alogenní transplantací (Obr.7).

Obr. 7:

Přežití bez události (EFS) podle hladin MRN před HSCT (log rank test $p=0.002$)



Diskuze

Detekce hladiny MRN se stává nedílnou součástí léčby dětských pacientů s ALL před a po alogenní transplantaci. Na základě našich výsledků, navzdory relativně malým počtům pacientů, můžeme přesvědčivě prokázat velmi úzkou korelaci mezi předtransplantační hladinou MRN a rizikem potransplantačního relapsu. Přes nesporný pokrok v léčbě dětí s ALL, zůstávají výsledky léčby relapsu v potransplantačním období velmi špatné. Možné řešení tohoto problému se tak ubírá dvěma základními směry. První jsou změny v transplantačních postupech ve smyslu redukce prevence GVHD u vysocerizikových pacientů a současně rychlá detekce hrozícího relapsu s využitím metod adoptivní imunoterapie (vysazení imunosuprese, infúze dárcovských lymfocytů). Avšak všechny tyto postupy jsou velmi riskantní u již významně předléčených pacientů vzhledem k riziku rozvoje těžké GVHD s následnými komplikacemi zvláště ve smyslu bakteriálních a mykotických infekcí. tato rizika můžeme demonstrovat na příkladu našich dvou pacientů, kteří zemřeli na systémovou mykotickou infekci při nezvladatelné těžké sekundární GVHD po DLI. Ačkoliv jsme schopni dosáhnout pomocí adoptivní imunoterapie molekulárně genetické remise ALL, nezaznamenali jsme žádné dlouhodobější přežití bez hematologického relapsu v případě jasně detekované narůstající MRN positivity.

Druhou možností je úsilí o maximální možné předtransplantační snížení hladiny MRN pomocí intenzifikace terapie [41], tento postup se nám jeví jako nadějnější. Nové cílené léky (monoklonální protilátky, specifické inhibitory kináz) kombinované s běžným typem léčby by mohly přispět k lepším výsledkům. V současné době je v mezinárodním měřítku plánováno několik prospektivních studií zaměřených na tuto problematickou skupinu pacientů s vysokou hladinou MRN před alogenní trasplantací.

IV. Závěr

Přestože výsledky léčby dětské ALL představují jeden z největších úspěchů onkologie, nadále zůstává nezanedbatelná skupina pacientů s velmi špatnou prognózou. Rozvoj a zavádění metod kvantitativního monitorování MRN do klinické praxe je velkým přínosem, neboť umožňuje odhalit na individuální úrovni pacienty, jejichž nemoc špatně odpovídá na terapii mnohem přesněji než dosud používané metody. V části případů jsou to pacienti se známými genetickými faktory (např. přítomnost fúzních genů BCR/ABL nebo MLL/AF4, přítomnost hypodiploidie), ale určitou skupinu tvoří i pacienti, jejichž předpoklad špatné citlivosti na chemoterapii bychom dosud používanými klinickými a laboratorními postupy neodhalili. Vlastnosti leukemických buněk těchto pacientů můžeme pak podrobit podrobnějšímu zkoumání, můžeme odhalovat další přídavné genetické faktory, které se podílí na nepříznivém chování leukemické buňky. Tento postup nám pak umožní pochopit více o leukemogenezi obecně. V neposlední řadě výsledky monitorování MRN slouží již ke každodenní klinické praxi. První klinické použití bylo zaznamenáno právě u pacientů po transplantaci. Vzhledem k nesporným výhodám, které detekce MRN přináší, dochází v současné době k rychlému zavádění MRN do běžných léčebných protokolů. Existují již léčebné protokoly, které přímo zohledňují hladiny MRN pro stratifikaci pacientů, jak pro léčbu iniciální ALL, tak pro léčbu relapsu ALL. Zdá se, že díky těmto postupům jsme schopni dobře odhalit pacienty neléčitelné běžnou chemoterapií včetně velmi agresivních léčebných protokolů. A to je okamžik, kdy přichází další úkol: najít šanci na vyléčení pro tyto pacienty. Určitou naději skrývá tzv. cílená léčba (inhibitory kináz, monoklonální protilátky atd.), které mohou v kombinaci se standardní terapií, jak ukazují některé studie, přinést další zlepšení léčebných výsledků. Výsledky vyšetření MRN nám tedy mimo jiné umožňují zacílit tyto nové léčebné postupy na jasně definované skupiny pacientů, kterým mohou přinést užitek.

Použité zkratky:

| | |
|-------------|--|
| ALL | akutní lymfoblastická leukémie |
| ATG | antithymocytární globulin |
| BCP-ALL | B cell precursor acute lymphoblastic leukemia |
| BFM | Berlin-Frankfurt-Münster |
| BMT | bone marrow transplantation |
| BuCy | busulphan, cyclophosphamide |
| cGVHD | chronic graft versus host disease |
| CPH | cyclophosphamide |
| CR | complete remission |
| CsA | cyklosporin A |
| CTO | celotělové ozáření |
| DLI | donor lymphocyte infusion |
| DNA | deoxyribonucleotid acid |
| EFS | event free survival |
| ESG-MRD-ALL | European Study Group on Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia |
| EsPhALL | European intergroup study on post-induction treatment of Ph positive ALL |
| HLA | human leukocyte antigen |
| HSCT | hematopoetic stem cell transplantation |
| GVHD | graft versus host disease |
| GvL | graft versus leukemia |

| | |
|--------|--|
| IgH | immunoglobulin heavy chain |
| IgK | lehký řetězec imunoglobulinů kappa |
| IRG | immune receptor gene |
| KD | kostní dřeň |
| KDE | kappa deleting element |
| Mel | melphalan |
| MFD | matched family donor |
| MRD | minimal residual disease |
| MRN | minimální reziduální nemoc |
| MSD | matched sibling donor |
| MTX | methotrexát |
| OS | overall survival |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PR | parciální remise |
| QR | quantitative range |
| RQ-PCR | real time quantitative polymerase chain reaction |
| RT-PCR | reverse transcription polymerase chain reaction |
| TCR | T cell receptor |
| TCRA | alfa podjednotka T-buněčného receptoru |
| TCRB | beta podjednotka T-buněčného receptoru |
| TCRG | gamma podjednotka T-buněčného receptoru |
| TCRD | delta podjednotka T-buněčného receptoru |

| | |
|------|----------------------|
| UCB | umbilical cord blood |
| UD | unrelated donor |
| VP16 | etoposid |

Přílohy:

Příloha 1.: Základní panel primerů používaný pro **detekci přestaveb** IgH/TCR genů používaný pro B-prekurzorové ALL

IgH VH1/7-JHcons

VH2 -JHcons

VH3 - JHcons

VH4/6- JHcons

VH5 - JHcons

IgK VkI - KDE

VkII - KDE

VkIII - KDE

VkIV - KDE

Intron - KDE

TCRD DD2 - DD3

VD2 - DD3

TCRG VGI - JG1.1/2.1

VGI - JG1.3/2.3

VGII - JG1.1/2.1

VGII - JG1.3/2.3

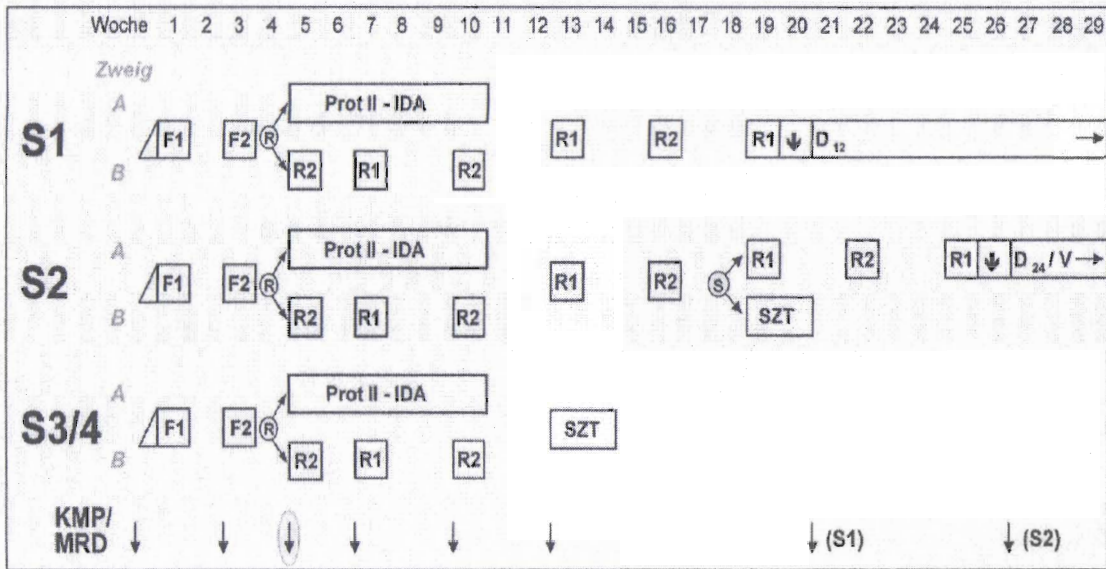
VGIV - JG1.1/2.1

VGIV - JG1.3/2.3

Příloha 2.: Základní panel primerů používaný pro detekci přestaveb IgH/TCR genů pro T-ALL

| | |
|-----------------|---------------------|
| TCRD | DD2 -DD3 |
| | DD2 - JD1 |
| | VD2 - DD3 |
| | VD1 - JD1 |
| | VD2 - JD1 |
| | VD3 - JD1 |
| TCRG | VGI -JG1.1/2.1 |
| | VGI -JG1.3/2.3 |
| | VGII -JG1.3/2.3 |
| | VGIII-JG1.3/2.3 |
| | VGIV-JG1.3/2.3 |
| SIL/TAL1 | Sildb-5'-tal1db1-3' |
| | Sildb-5'-tal1db2-3' |

Therapieübersicht ALL - REZ BFM 2002



Příloha 4: Akutní GVHD

Staging akutní GVHD podle orgánových systémů

| Stage | Kůže | Játra (bilirubin) | Střeva |
|-------|--|-------------------|--|
| + | rash do 25% těla | 1-3 mg/dl | průjmy nad 10ml/kg/den |
| ++ | rash 25-50% těla | 3-6 mg/dl | nad 15 ml/kg/den |
| +++ | generalizovaná erythrodermie | 6-15 mg/dl | nad 20 ml/kg/den nebo křeče nebo přítomnost krve nebo ileus |
| ++++ | generalizovaná erythrodermie s tvorbou bul a deskvamací | nad 15mg/dl | přítomnost 2 kritérií pro stage +++ |

Grading akutní GVHD

| Grade | Kůže | Játra | Střeva |
|-------|----------|-------------|---------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| I | + nebo++ | 0 | 0 |
| II | +++ | nebo + | nebo + |
| III | 0 až+++ | nebo++až+++ | nebo++ až +++ |
| IV | ++++ | nebo++++ | nebo++++ |

Příloha 5:

L.Sramkova, K. Muzikova, E. Fronkova, O. Krejci, P. Sedlacek, R. Formankova,
E.Mejstrikova, J.Stary, J. Trka

Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia

Pediatr Blood Cancer. 2006 Mar 6

Detectable Minimal Residual Disease Before Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Predicts Extremely Poor Prognosis in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia

Lucie Sramkova, MD,^{1,2} Katerina Muzikova, Bc,^{1,2} Eva Fronkova, MD,^{1,2} Ondrej Krejci, MD, PhD,^{1,2} Petr Sedlacek, MD, PhD,² Renata Formankova, MD, PhD,² Ester Mejstrikova, MD,^{1,3} Jan Stary, MD, PhD,² and Jan Trka, MD, PhD,^{1,2*}, for the Czech Pediatric Hematology Group (CPH)

Background. The level of minimal residual disease (MRD) prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has been shown to be an independent prognostic factor for outcome of pediatric patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia (ALL). Retrospective studies which used (semi-) quantitation of clone-specific immunoglobulin/T-cell receptor (Ig/TCR) rearrangements have documented the feasibility and practicality of this technique. This approach has also been disputed due to the occurrence of clonal evolution and generally high MRD levels prior to HSCT. **Procedure.** In our prospective study, MRD before and after HSCT was monitored using quantitative real-time PCR in a cohort of 36 children with ALL consecutively transplanted in our center between VIII/2000 and VII/2004. **Results.** In 25 of 36 patients, MRD level prior HSCT was assessed. Seventeen patients were classified as MRD-negative and eight were MRD-positive up to 9×10^{-2} . In MRD-positive subgroup,

seven events (six relapses) occurred post-transplant in striking contrast to only one relapse in MRD-negative subgroup (event-free survival (EFS) log-rank $P < 0.0001$). MRD proved to be the only significant prognostic factor in a multivariate analysis ($P < 0.0001$). Adoptive immunotherapy including donor lymphocyte infusions in patients with adverse dynamics of MRD after HSCT had only limited and/or temporary effect. Clonal evolution did not present a problem precluding MRD monitoring in any of patients suffering a post-transplant relapse. **Conclusions.** We show that MRD quantitation using clonal Ig/TCR rearrangements successfully assesses the risk in pediatric ALL patients undergoing allogeneic HSCT. As our ability to respond to detectable MRD levels after HSCT is very limited, alternative strategies for MRD-positive patients prior HSCT are necessary. *Pediatr Blood Cancer* 2006;00:1-8.

© 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key words: acute lymphoblastic leukemia; childhood; hematopoietic stem cell transplantation; immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements; minimal residual disease

INTRODUCTION

Despite the overall improvement in the chemotherapy-based front-line treatment of the childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), the hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) remains an important treatment option for the patients with resistant, very high-risk, and/or relapsed disease. However, the curative effect of allogeneic HSCT is hampered by a relapse occurrence that represents a major cause of the HSCT failure. Already in 1998, Knechtli et al. showed that the level of minimal residual disease (MRD) prior HSCT represents an important prognostic factor [1]. They used a semi-quantitative approach for the detection of immunoreceptor gene—immunoglobulin and T-cell receptor genes (Ig/TCR) rearrangements. In their cohort, all children entering the pre-transplant conditioning with a high-level MRD suffered a post-transplant event and children with low-level MRD had significantly poorer outcome compared to MRD-negative subgroup. Similar data were obtained in the subsequent studies, partly using the new technique of real-time quantitative PCR (RQ-PCR) [2,3].

When this quantitative technique for MRD detection was completely introduced and progressively standardized, the international *Pre-BMT MRD Study Group* (part of the *European Study Group on Minimal Residual Disease in ALL—ESG—MRD—ALL*) [4] retrospectively analyzed the pre-transplant MRD levels and the post-transplant outcome in a cohort of 140 pediatric ALL patients [5]. MRD proved to

be a highly significant ($P < 0.001$) independent factor to influence event-free survival (EFS) of this group. High MRD burden, together with a shorter duration of the first complete remission (CR), *MLL* gene rearrangements, and pro-B immunophenotype proved to be the only negative risk factors.

This large multicenter, retrospective study was recently disputed by Imashuku et al. [6]. Their analysis, based on a group of 95 transplanted patients (age < 20 years), showed no correlation between the pre-transplant MRD burden and the post-transplant relapse. Imashuku and colleagues made a couple of rather surprising observations: first, they found 96% of their patients to be MRD-positive prior HSCT.

¹CLIP^{Q1}—Childhood Leukemia Investigation Prague, Prague, Czech Republic; ²Department of Pediatric Hematology and Oncology, Charles University, 2nd Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; ³Department of Immunology, Charles University, 2nd Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Grant sponsor: FNM; Grant number: 9735; Grant sponsor: MZ; Grant number: 6929-3; Grant sponsor: GAUK; Grant number: 62/2004; Grant sponsor: MZ; Grant number: 00064203; Grant sponsor: MSM; Grant number: 0021620813.

*Correspondence to: Jan Trka, Department of Pediatric Hematology and Oncology, Charles University, 2nd Medical School, V ulvalu 84, 150 06—Prague 5, Czech Republic. E-mail: jan.trka@lfmotol.cuni.cz

Received 30 August 2005; Accepted 11 January 2006

Second, their ability to predict the relapse after HSCT was hampered by the clonal evolution of Ig/TCR rearrangements. Eleven of 14 patients having relapse after HSCT showed a totally different rearrangement pattern at relapse when compared to the initial screening. This is in striking contrast to previously published data that show more than 95% of relapsed patients have preserved rearrangements allowing the MRD follow-up [7]. On the basis of their results, Imashuku et al. dispute the practicality of the Ig/TCR-based approach.

Here, we present a series of 36 pediatric ALL patients who consecutively underwent allogeneic HSCT using unmanipulated grafts at our institution. In 25 of them, we were able to assess MRD level prior and after the transplant using RQ-PCR-based detection of Ig/TCR rearrangements. We show that detectable MRD before HSCT is a very strong negative

prognostic factor and that the clonal evolution of the Ig/TCR rearrangements does not hamper the relapse prediction. Therefore, our study clearly demonstrates for one thing the feasibility of the method and for another a very strong clinical value of this approach for the identification of patients at the risk of relapse after allogeneic HSCT.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Treatment

Between August 2000 and September 2004, 36 consecutive pediatric patients (age 1.1–19 years) with ALL indicated to HSCT were enrolled to our study (Table I). This cohort comprised all such pediatric patients from the Czech Republic in the given period of time and all transplants were

TABLE I. Transplanted Patients With ALL

| No. | Age/sex | Immunophenotype | Fusion gene | Remission | Conditioning | Donor (HLA match) | GVHD grade | Follow-up (months) |
|-----|---------|-----------------|-------------------|-----------|-------------------|-------------------|------------|--------------------|
| 1 | 11/m | T-ALL | Not detected | CR1 | TBI 12 Gy, VP16 | MSD | III, cGVHD | 61 |
| 2 | 12/m | pro-B | ETV6/RUNX1 | PR3 | TBI 12 Gy, VP16 | MSD | II | 15* |
| 3 | 10/m | cALL | ETV6/RUNX1 | CR3 | TBI 14.4 Gy, VP16 | UD (10/10) | II | 55 |
| 4 | 8/m | T-ALL | Not detected | CR1 | TBI 12 Gy, VP16 | MSD | II | 52 |
| 5 | 7/m | T-ALL | Not detected | CR2 | TBI 14.4, Cy | UCB (5/6) | II | 4* |
| 6 | 15/m | pro-B | MLL/AF4 | CR1 | TBI 12 Gy, VP16 | MSD | I, cGVHD | 46 |
| 7 | 10/m | cALL | ETV6/RUNX1 | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | MSD | II | 44 |
| 8 | 10/m | AHL/cALL | BCR/ABL | CR1 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II | 21* |
| 9 | 11/m | cALL | BCR/ABL | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | — | 24* |
| 10 | 15/f | praeB/cALL | BCR/ABL | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (9/10) | — | 6* |
| 11 | 12/m | praeB/cALL | BCR/ABL | CR1 | TBI 14.4 Gy, Cy | UD (9/10) | — | 4* |
| 12 | 19/m | praeB/cALL | Not detected | CR3 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II | 38 |
| 13 | 16/m | cALL | Not detected | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II | 2* |
| 14 | 10/m | cALL | ETV6/RUNX1 | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (7/10) | II | 9* |
| 15 | 8/f | cALL | ETV6/RUNX1 | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | MSD | — | 32 |
| 16 | 7/f | cALL | Not detected | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | MSD | II | 32 |
| 17 | 3/m | T-ALL | Not detected | CR1 | TBI 12 Gy, VP16 | MSD | II | 31 |
| 18 | 10/f | cALL | BCR/ABL | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | — | 30 |
| 19 | 2/m | pro-B | MLL rearrangement | CR2 | BuCy, VP16 | UD (10/10) | — | 0* |
| 20 | 8/m | AHL/pro-B | BCR/ABL | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (9/10) | II | 26 |
| 21 | 8/m | cALL | Not detected | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (9/10) | II | 26 |
| 22 | 1/f | T-ALL | Not detected | CR1 | BuCy, VP16 | UD (10/10) | II | 12* |
| 23 | 8/m | T-ALL | SIL/TAL1 | CR1 | TBI 12 Gy, VP16 | MFD (10/10) | II | 23 |
| 24 | 10/f | cALL/pro-B | ETV6/RUNX1 | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (9/10) | II | 22 |
| 25 | 6/m | cALL | Not detected | PR3 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II | 19 |
| 26 | 2/m | pro-B | MLL/AF9 | CR2 | BuCy, Mel | MSD | II | 18 |
| 27 | 12/m | cALL | BCR/ABL | CR1 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (8/10) | II | 18 |
| 28 | 9/m | praeB | Not detected | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (9/10) | IV | 1* |
| 29 | 5/m | cALL | BCR/ABL | CR1 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II | 17 |
| 30 | 8/m | cALL | ETV6/RUNX1 | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II | 17 |
| 31 | 12/m | pro-B/cALL | Not detected | PR3 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | II | 16 |
| 32 | 16/m | praeB | Not detected | PR3 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | — | 1* |
| 33 | 9/m | cALL | Not detected | CR2 | TBI 12 Gy, VP16 | MSD | II | 15 |
| 34 | 17/f | AHL | BCR/ABL | CR1 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (7/10) | II | 14 |
| 35 | 7/m | cALL/praeB | ETV6/RUNX1 | CR3 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (9/10) | II | 12 |
| 36 | 14/m | cALL | BCR/ABL | CR1 | TBI 12 Gy, VP16 | UD (10/10) | — | 10* |

Bu, busulphan; Cy, cyclophosphamide; Mel, melphalan; VP16, vepesid; CR, complete remission; PR, partial remission; TBI, total body irradiation; MSD, matched sibling donor; UD, unrelated donor; UCB, unrelated cord blood; MFD, matched family donor; GVHD, graft-versus-host disease; cGVHD, chronic graft-versus-host disease.

*— time to event.

performed at our institution. The group of patients consisted of 30 children with B-cell precursor (BCP) ALL and 6 children with T-cell ALL. Twelve children were transplanted in the first CR, all of them due to high-risk ALL (T-ALL and prednisone poor response (4), BCR-ABL-positive (7), MLL rearranged (1)); 20 children were transplanted in the second or higher remission; and 4 children in partial remission (without increased number of blast cells in the bone marrow but without recovery of hematopoiesis). Donors of hematopoietic stem cells were HLA-identical siblings in 10 cases, unrelated donor from BMT registries with variable rate of HLA match (from 7 to 10/10 antigen match on high resolution PCR level) in 24 cases; one patient was transplanted using unrelated cord blood and one patient from phenotypically identical mother.

In the majority of transplants ($n = 32$), we used a similar pre-transplant conditioning regimen based on the total body irradiation (TBI) in the dose 12 or 14.4 Gy and etoposide 60 mg/m², in the cord blood transplantation TBI plus cyclophosphamide 2 × 60 mg/kg. In three children under 2 years of age a busulphan-based conditioning (2 × busulphan, cyclophosphamide, and melphalan, 1 × busulphan, cyclophosphamide, and etoposide) was used. In the majority of unrelated donor transplants ($n = 19$) we used rabbit antithymocytic globulin (ATG, Fresenius) at 10 mg/kg for 4 days.

Graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis consisted of intravenous (i.v.) cyclosporin A (CsA) in the dose 3 mg/kg/day in HLA-identical sibling donors and using the combination of CsA 5 mg/kg/day and methotrexate (MTX) administered days +1, +3, and +6 in unrelated donor transplants, always with transition to oral CsA in the adequate dosage. Since February 2003, we started reduced GVHD prophylaxis according to ALL SCT-BFM 2002 protocol where only targeted dose of CsA with required serum levels between 80 and 130 µg/l (Fluorescence Polarization Immunoassay method) was given. Only in one case (the cord blood transplant) the combination of CsA and methylprednisolone was used. Incidence of acute GVHD was low in our group with 1 child developing acute GVHD Grade I, 24 children experiencing acute GVHD Grade II, and 7 children having no acute GVHD. We have registered only two cases of acute GVHD Grade III-IV. Follow-up of the whole group ranges from 12 to 61 months with median 26 months after HSCT.

MRD Assessment

For the MRD assessment we examined BM samples from both diagnosis and relapse, 1 week before the start of the pre-transplant conditioning and then after HSCT, on a regular basis: days +28, +60, +100, +180, and later 9, 12, 18, and 24 months after HSCT (or more frequently in MRD-positive patients when adoptive immunotherapy was considered). In children with a very high-risk of relapse, additional

peripheral blood (PB) samples were taken every month during first 6 months after HSCT and every 3 months later on. Mononuclear cells from the diagnostic or relapse BM samples were isolated by Ficoll-Paque (density 1.077 g/ml, Pharmacia, Uppsala, Sweden) density centrifugation. Follow-up BM or PB samples were processed by erythrocyte lysis.

Genomic DNA was isolated by QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). DNA was stored at -20°C before processing. Primers and protocols for immunoglobulin heavy chain (IGH), immunoglobulin light chain kappa (IGK), T-cell receptor gamma (TCRG), T-cell receptor delta (TCRD) gene rearrangements, and TAL1 deletions detection were described previously [8,9]. Clonality of PCR products was confirmed by the heteroduplex analysis [10]. Monoclonal PCR products were cut from the gel, reamplified with the same set of primers, and purified by QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Sequencing was performed in the ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer with BigDye[™] Primer v3.0 Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Variable (V), diversity (D), and joining (J) regions of the immunoreceptor gene were identified by comparison with sequences in GenBank using the Im Muno Gene Tics (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).

Patient-specific forward primers for RQ-PCR were designed using the VECTOR NTI 8 Suite Software (Informax, Bethesda, MD). Family-specific reverse primers and probes for IGH, IGK, TCRD, and TCRG were described previously [11-14]. Ig/TCR RQ-PCR was performed in the iCycler IQTM Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, Hercules, CA) and in the ABI PRISM[®] 7700 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Standard curves were prepared by diluting the diagnostic (HSCT in CR1) or relapse DNA samples in polyclonal DNA from healthy donors. The albumin gene was used to normalize the DNA concentration and quality [15]. The ESG-MRD-ALL criteria for RQ-PCR sensitivity and quantitative range (QR) interpretation were used [4]. In six patients who suffered from relapse after HSCT, BM samples were re-analyzed for the presence of clonal Ig/TCR rearrangements to evaluate the extent of clonal evolution.

RESULTS

Feasibility of the Approach

We were able to evaluate MRD level prior HSCT using Ig/TCR rearrangements in 25 of 36 patients. In two cases, the pre-transplant sample was not available due to severe bone marrow aplasia, and in nine cases we did not find a target with adequate sensitivity and specificity. All 25 patients were regularly monitored using Ig/TCR rearrangements (two

targets in 14 patients, one target in 9). At least one target with sensitivity 10^{-4} was available for all but one patient (No. 12), where only one target with sensitivity 10^{-3} was found.

Clonal Evolution of Ig/TCR Rearrangements

In our cohort, clonal evolution did not preclude MRD monitoring in any of the patients. All post-transplant relapse samples when compared to the diagnosis/first relapse specimen showed at least one stable Ig/TCR rearrangement.

MRD Level Prior HSCT Predicts Post-transplant Outcome

According to MRD level in BM prior the conditioning regimen we divided our patients into two groups (Table II). The first group (MRD-positive) consisted of patients with MRD detectable within the QR of the method. The second group (MRD-negative) included patients with undetectable or very low MRD positivity (below the QR; $n = 2$) prior to the transplant.

The MRD-positive subgroup consisted of eight patients (Nos. 2, 8, 9, 10, 11, 13, 22, and 35). One of them died due to post-transplant complications (day +66—multiorgan failure after gram-negative sepsis), six children experienced a hematological relapse, although all of them achieved

transient post-transplant MRD negativity, and one is alive in continuous hematological remission. However, the latter patient (No. 35) suffered from molecular genetic relapse and was treated with the adoptive immunotherapy with a follow-up of 12 months.

The group of MRD-negative patients included 17 children (Nos. 1, 4, 12, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 31, and 36), all of whom are alive except one and in complete hematological remission with a follow-up of 16–61 months (median 26 months). One patient of this group (No. 36) suffered a relapse 10 months after HSCT. Interestingly, although MRD-negative by Ig/TCR approach, BCR/ABL fusion gene reverse-transcriptase PCR analysis prior HSCT showed borderline positivity (data not shown).

EFS analysis clearly supports the hypothesis that MRD positivity prior transplant is a significant adverse prognostic factor (log-rank $P < 0.0001$; Fig. 1). Further division into the subgroups with high MRD positivity ($\geq 10^{-3}$; $n = 4$) and low MRD positivity ($> 10^{-4}$ and $< 10^{-3}$; $n = 4$) did not show any effect, evidently due to a low number of patients and a high frequency of events (data not shown). Multivariate analysis (including also sex, age at diagnosis, first CR duration, type of donor, and fusion gene—BCR/ABL, MLL/AF4, and ETV6/RUNX1—presence) identified pre-transplant MRD as the only significant risk factor ($P < 0.0001$).

TABLE II. MRD Levels in the Bone Marrow Before Conditioning and Survival of the Patients

| Patient no. | ALL subtype | Number of Ig/TCR targets | MRD level | Relapse after HSCT | Comments |
|-------------|-------------|--------------------------|---|--------------------|--|
| 2 | ETV6/RUNX1 | 1 | 1.47×10^{-4} | Yes | Died in remission (systemic fungal infection, severe induced GVHD after DLI) |
| 8 | BCR/ABL | 2 | 5.3×10^{-2} , 9.2×10^{-2} | Yes | Died in remission (systemic fungal infection) |
| 9 | BCR/ABL | 2 | Negative, 1.3×10^{-4} | Yes | Died in progression of disease (on treatment of relapse) |
| 10 | BCR/ABL | 1 | 1.2×10^{-3} | Yes | Died in progression of disease |
| 11 | BCR/ABL | 2 | 2.3×10^{-4} , 6.2×10^{-4} | Yes | Died in remission (systemic fungal infection, severe induced GVHD after DLI) |
| 13 | BCP | 1 | 2.8×10^{-2} | No | Died due to multiorgan failure in gram-negative sepsis day +66 |
| 22 | T-ALL | 1 | 6.4×10^{-3} | Yes | Alive in CR2; after 2nd HSCT |
| 35 | ETV6/RUNX1 | 2 | 4.1×10^{-4} , 3.5×10^{-4} | No | Alive in CCR |
| 1 | T | 2 | Negative, negative | No | Alive in CCR |
| 4 | T | 1 | Positive (below QR) | No | Alive in CCR |
| 12 | BCP | 1 | Negative | No | Alive in CCR |
| 15 | ETV6/RUNX1 | 2 | Negative, negative | No | Alive in CCR |
| 16 | BCP | 1 | Negative | No | Alive in CCR |
| 17 | T-ALL | 2 | Negative, negative | No | Alive in CCR |
| 18 | BCR/ABL | 2 | Negative, negative | No | Alive in CCR |
| 20 | BCR/ABL | 1 | Negative | No | Alive in CCR |
| 21 | BCP | 2 | Positive (below QR) | No | Alive in CCR |
| 23 | T-ALL | 2 | Negative, negative | No | Alive in CCR |
| 24 | ETV6/RUNX1 | 1 | Negative | No | Alive in CCR |
| 26 | MLL/AF9 | 2 | Negative, negative | No | Alive in CCR |
| 27 | BCR/ABL | 2 | Negative, negative | No | Alive in CCR |
| 29 | BCR/ABL | 2 | Negative, negative | No | Alive in CCR |
| 30 | ETV6/RUNX1 | 2 | Negative, negative | No | Alive in CCR |
| 31 | BCP | 2 | Negative, negative | No | Alive in CCR |
| 36 | BCR-ABL | 1 | Negative | Yes | Died, systemic fungal infection |

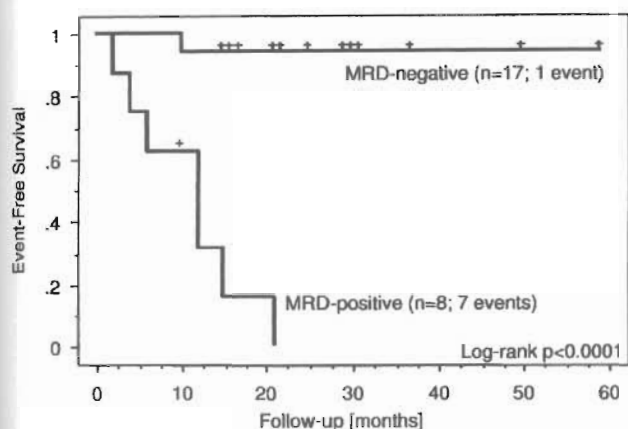


Fig. 1. EFS in MRD-positive and MRD-negative patients. Median follow in MRD-negative group = 25 months.

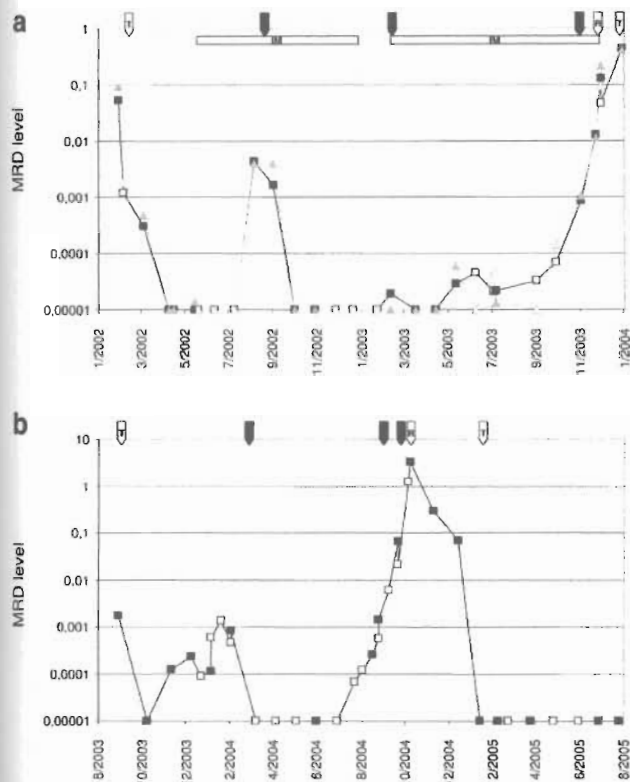


Fig. 2. Disease course and MRD follow-up in Patients 8 and 22. a: Disease progression after HSCT in BCR/ABL-positive patient (No. 8) was only temporarily retarded by imatinib treatment and DLI. Squares = Ig rearrangement target (No. 1); triangles = Ig rearrangement target (No. 2) (full symbols = BM samples; open symbols = PB samples); black arrows = DLI; IM = imatinib mesylate; R = relapse; T = allogeneic HSCT. b: Pre-transplant MRD status determines post-transplant course of the disease in T-ALL infant patient. Squares = TCR delta incomplete rearrangement target (full symbols = BM samples; open symbols = PB samples).

MRD Monitoring and Treatment Strategies After HSCT

Post-transplant MRD dynamics was monitored in all patients with detectable targets. In the group of pre-transplant MRD-positive patients, five displayed minimally one MRD-positive sample before the emergence of relapse. In three patients, there was a time-frame for an attempt to avert the relapse manifestation, but despite our effort all three patients subsequently relapsed. Period from the first MRD positivity after transplantation to the diagnosis of hematological relapse was 0–486 days (0, 30, 36, 330, 365, and 486 days). Treatment of post-transplant hematological relapse was heterogeneous and it is summarized in Table III.

DISCUSSION

Detection of MRD levels has already become an integral part of treatment of childhood ALL patients including those undergoing HSCT. Ongoing front-line treatment trials, based on previous retrospective studies [16,17], aim to demonstrate the benefit of MRD-based stratification in the prospective setting. Retrospective single- and multicenter analyses of MRD in transplanted pediatric ALL children showed clearly the significant impact of pre-transplant MRD on outcome [1–3,5]. Imashuku et al. questioned these data, showing a surprisingly high proportion of MRD-positive patients at the start of a conditioning regimen (96%) and strikingly high frequency of the clonal evolution hampering MRD detection itself [6]. Although they did not use an up-to-date methodology (specific probe hybridization was employed instead of RQ-PCR) and a full spectrum of Ig/TCR rearrangements, their results cast doubt upon the practicality of the whole approach.

In this study, we concentrated on Ig/TCR quantitation only, despite the fact that significant proportion of patients bear the fusion genes (*BCR/ABL*, *ETV6/RUNX1*, *MLL/AF4*, *MLL/AF6*) as potential targets for MRD detection as well. As already mentioned, the clonal Ig/TCR quantitation methodology has been increasingly standardized throughout the last years within the ESG-MRD-ALL. This standardization process and also newly developed interpretation criteria improved significantly its clinical value. When properly applied, this method provides a reliable, clinically useful tool, as it was proved by numerous international quality controls [4]. However, this is not the case for the quantitative analysis of the fusion genes expression in pediatric ALL. We have recently shown a very good correlation between *ETV6/RUNX1* transcript levels and Ig/TCR quantitation but in the cohort that consisted dominantly from the front-line treated patients [18]. In the current study, we observed a minor but significant discrepancy between BCR/ABL and Ig/TCR MRD levels in Patient 36. He displayed borderline positivity in nested qualitative PCR for BCR/ABL prior to the transplant and he was the only patient in the Ig/TCR MRD-negative subgroup who developed relapse after HSCT.

TABLE III. Patients With Post-Transplant Hematological Relapse and Their Treatment

| Patient no. | Molecular genetic relapse (day) | Treatment | Secondary GVHD | Molecular remission achieved | Hematological relapse (day) | Treatment | CR achieved | Secondary GVHD | Cause of death |
|-------------|---------------------------------|--|----------------|------------------------------|-----------------------------|---|-------------|----------------|---------------------------|
| 2 | D + 480 | — | — | — | D + 480 | Reduced chemotherapy DLI | Yes | Yes, Grade IV | Systemic fungal infection |
| 8 | D + 180 | Imatinib mesylate, three doses of DLI IFN alfa | No | Yes | D + 660 | Reduced chemotherapy DLI | Yes | No | Systemic fungal infection |
| 9 | D + 360 | Immunosuppression tapering, imatinib mesylate | Yes, Grade II | Yes | D + 640 | Imatinib mesylate reduced chemotherapy | No | No | Disease progression |
| 10 | D + 180 | — | — | — | D + 192 | No | — | — | Disease progression |
| 11 | D + 130 | — | — | — | D + 139 | Immunosuppression tapering DLI imatinib mesylate | Yes | Yes, Grade IV | Systemic fungal infection |
| 22 | D + 60 | Immunosuppression reducing, three doses of DLI | Yes, Grade II | Yes | D + 395 | High dose chemotherapy 2nd HSCT | Yes | No | Alive in CR2 |
| 36 | D + 90 | Immunosuppression tapering, three doses of DLI imatinib mesylate | No | Yes | D + 317 | Chemotherapy | Yes | No | Systemic fungal infection |

Our prospective single-center study clearly documents the feasibility and applicability of the Ig/TCR quantitation technique of MRD detection in the transplant setting. The efficacy of this approach, in terms of the identification of at least one target with adequate specificity and sensitivity per patient, increased steadily throughout the study: it was 61% in the first half of the cohort and 80% in the latter. Our results are in agreement with the previously published data [1–3,5,19] and in striking contrast to the study by Imashuku et al. [6]. Both survival and multivariate analyses demonstrate the significance of MRD level before HSCT. Patients who enter the transplant conditioning phase of treatment with MRD level higher than 10^{-4} are at high-risk of post-transplant relapse.

Treatment of these relapses has been very disappointing so far. Three different approaches may lead to a potential solution of this problem: (1) reduction of the malignant clone prior to the transplant using intensified or additional treatment, (2) modification of the HSCT procedure, and (3) post-transplant treatment modifications based on the close follow-up of MRD levels. Pre-transplant treatment intensification is complicated by the fact that vast majority of patients have been heavily pre-treated. The idea of employment of some drugs that are not normally used in the front-line treatment failed to show a significant effect. Potentially, introduction of new agents (e.g., kinase inhibitors, monoclonal antibodies, new antimetabolites, such as clofarabine) might be an option [20]. However, no convincing data are available thus far.

Modification of transplant procedure based on MRD positivity prior to HSCT aims for the reduction of GVHD prophylaxis, thus boosting the graft-versus-leukemia effect. Removing ATG, targeted dose of CsA and rapid immunosuppression tapering may lead to this effect. Although partly encouraging, results of an ongoing Dutch study have thus far been inconclusive [19]. In some patients in our cohort, we used targeted dose of CsA. In patients younger than 16 years of age transplanted from matched sibling, we did not use MTX in GVHD prophylaxis and in some patients transplanted from well-matched unrelated donor even ATG was omitted. Due to the small numbers and heterogeneity of patients with ALL, it is difficult to prove any noticeable effect of this strategy in terms of relapse prevention. We should be cautious as this strategy may significantly increase the risk of transplant-related morbidity and mortality without clear evidence of efficacy.

Adoptive immunotherapy after the transplantation was generally not successful in our cohort. In our hands, interventions, such as early and rapid discontinuation of immunosuppression, infusion of DLI in 4–6 weeks interval, and/or use of imatinib mesylate in BCR/ABL-positive ALL were not sufficient enough to prevent onset of relapse. Application of these approaches in patients with imminent relapse have led to extended remission but often at a price of severe, uncontrolled GVHD, and life-threatening invasive

fungal infections. Moreover, no permanent effect was seen in our group of patients. Heavily pre-treated patients bearing a chemoresistant leukemia have an extreme morbidity and mortality. Therefore, an early initiation of adoptive therapy might at least postpone, if not prevent, relapse, and facilitate further efficacious chemotherapy; if subsequent remission is reached, these patients should be indicated for re-transplantation. A second HSCT may be curative in such settings. Our results demonstrate that the possibilities of treatment of the post-transplant relapse are extremely limited. Introduction of new treatment modalities is desirable for the patients with molecular genetic relapse after HSCT. These should include not only those mentioned above (kinase inhibitors, monoclonal antibodies, new antimetabolites) but also the inhibitors of enzymes controlling epigenetic modifications, specifically DNA methyltransferases and histone deacetylases [21].

In our study, we demonstrate feasibility of MRD quantitation using clonal Ig/TCR rearrangements as an approach for the pre-transplant risk assessment in pediatric ALL patients undergoing allogeneic HSCT. We show that, although, we are able to identify the patients in an almost certain risk of relapse, our ability to respond and to avert an impending relapse is very limited. In spite of the use of currently available set of treatment approaches after HSCT, we failed to permanently avert a predicted relapse. The change of the approach to MRD-positive patients prior to HSCT is necessary because of very questionable benefit of HSCT in these children. We are confident that all efforts should be aimed to better control pre-transplant MRD levels.

ACKNOWLEDGMENT

All pediatric hematology centers in the Czech Republic are acknowledged for their cooperation and reporting the patients to the transplantation center: Brno—J. Sterba, Olomouc—V. Mihal, Ostrava—B. Blazek, Hradec Králové—J. Hak, Ceske Budejovice—Y. Jabali, Plzen—Z. Cerna, Usti nad Labem—D. Prochazkova. We would like to thank Jozef Madzo, Ph.D. for the help with the data analysis.

REFERENCES

1. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, et al. Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998;92:4072–4079.
2. Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, et al. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia* 2002;16:1668–1672.
3. van der Velden VH, Joosten SA, Willemse MJ, et al. Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children

- with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001;15:1485–1487.
4. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17:1013–1034.
5. 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. *Letter. Bone Marrow Transplant* 2003;32:849–851.
6. Imashuku S, Terui K, Matsuyama T, et al. Lack of clinical utility of minimal residual disease detection in allogeneic stem cell recipients with childhood acute lymphoblastic leukemia: Multi-institutional collaborative study in Japan. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:1127–1135.
7. Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, 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;99:2315–2323.
8. Pongers-Willemsse 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 tall 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, 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;93:4079–4085.
10. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann 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.
11. van der Velden VH, Wijkhuijs JM, Jacobs DC, et al. 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* 2002;16:1372–1380.
12. van der Velden VH, Willemse MJ, van der Schoot CE, 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;16:928–936.
13. Langerak AW, Wolvers-Tettero IL, van Gastel-Mol EJ, et al. Basic helix-loop-helix proteins c2a and heb induce immature T-cell receptor rearrangements in nonlymphoid cells. *Blood* 2001;98:2456–2465.
14. 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.
15. 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;12:2006–2014.
16. 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.

17. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998;351:550–554.
18. Fronkova E, Madzo J, Zuna J, et al. Tel/aml 1 real-time quantitative reverse transcriptase PCR can complement minimal residual disease assessment in childhood ALL. *Leukemia* 2005;19:1296–1297.
19. Schilham MW, Balduzzi A, Bader P, et al. Is there a role for minimal residual disease levels in the treatment of ALL patients who receive allogeneic stem cells? *Bone Marrow Transplant* 2005;35:S49–S52.
20. Pui CH, Jeha S, Kirkpatrick P, et al. Clofarabine. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:369–370.
21. Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429:457–463.

Q1: Please check the affiliation. Is it ok?

Q2: Please cite figure 2 in text.



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

Jan Zuna^{a,b,*}, Ondrej Krejci^{a,b}, Jozef Madzo^{a,b}, Eva Fronkova^{a,b},
Lucie Sramkova^{a,b}, Ondrej Hrusak^{a,c}, Tomas Kalina^{a,c}, Martina Vaskova^{a,c},
Jan Stary^b, Jan Trka^{a,b}

The Czech Paediatric Haematology Working Group (CPH)

^a CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague, 2nd Medical School, Charles University Prague, V Uvalu 84, Prague, Czech Republic

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

^c 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 (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: VH17–JHcons, VH2–JHcons, VH3–JHcons, VH4–JHcons, VH5–JHcons; Igκ: VκI–Kde, VκII–Kde, VκIII–Kde, VκIV–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, pre-B ALL *n*=17; TEL/AML1-negative: common ALL *n*=27, pre-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

CycleTESTt 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 ^a | Igκ ^a | TCRδ ^a | TCRγ ^a | ≥1 ^b | Overall ^c |
|------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|---------------------|------------------|----------------------|
| TEL/AML1+ (<i>n</i> =47) | 79% (37/47) | 72% (34/47) | 53% (25/47) | 81% (38/47) | 94% (44/47) | 186 (4.0/pt.) |
| TEL/AML1– (<i>n</i> =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 ^d | <0.0001 ^d | 0.83 ^d | 0.0128 ^d | 1.0 ^d | 0.0006 ^e |

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

^b Number of patients with at least one clonal rearrangement.

^c Total number of clonal rearrangements within the group (number of rearrangements per patient).

^d Statistical significance (*p*) calculated using Fisher's exact test.

^e 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) |
| | VgI/Jg1.3–2.3 (2) | VgI/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 | – |
| | VkIII/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 δ 2–D δ 3, V κ I–Kde and V γ I–J γ 1.3/2.3 systems at diagnosis. At relapse, in addition to identical V δ 2–D δ 3 and V κ I–Kde, she gained RSS–Kde rearrangement and the V γ I–J γ 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 δ 2–D δ 3, V κ II–Kde and V γ I–J γ 1.3/2.3. At relapse the VH4–JH4 and V γ I–J γ 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 δ genes, respectively, followed by TCR γ (T-lymphocytes) and finally Ig κ (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 κ and TCR γ 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 κ ($p=0.0002$) and TCR γ ($p=0.0332$) rearrangements. Again, the number of patients with at least one rearrangement as well as frequency of TCR δ 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 important 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-

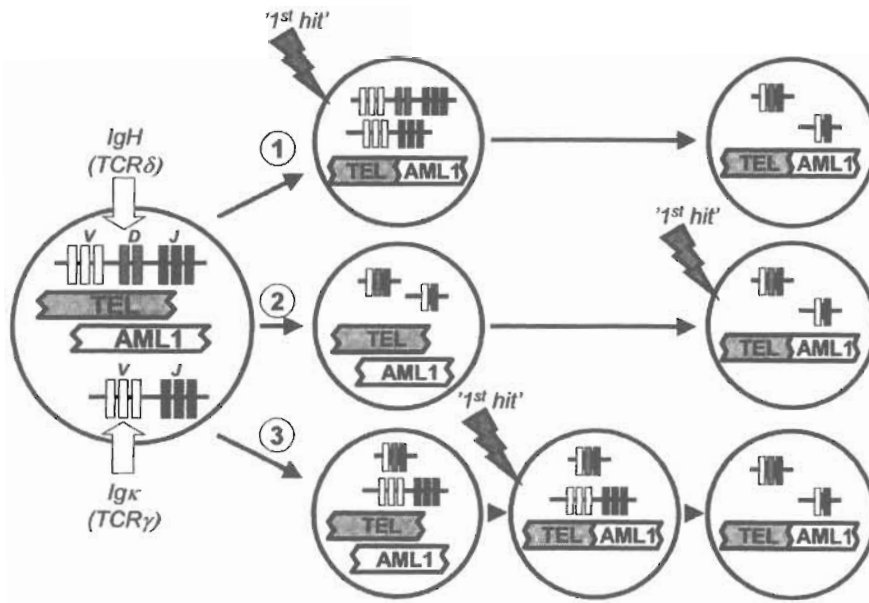


Fig. 1. The three possible scenarios of TEL/AML1 and Ig/TCR rearrangements relationship as described in the text. (1) TEL fuses to AML1 before the Ig/TCR rearrangements are initiated. TEL/AML1 stimulates/allows the Ig/TCR rearrangement machinery to finish all rearrangements. (2) TEL fuses to AML1 after 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.stjudersearch.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 δ 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 κ and TCR γ . 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 TALL 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-Grumayer 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.

Příloha 7:

R. Formankova, P. Sedlacek, L. Krskova, R. Rihova, L. Sramkova, J. Stary
Chimerism directed adoptive immunotherapy in prevention and treatment of post-transplant
relapse of leukemia in childhood
Hematologica, 2003 Jan, 88 (1), 117-118

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

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

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

Haematologica 2003;88:117-118

(http://www.haematologica.org/2003_01/88117.htm)

Relapse of leukemia remains the major cause of treatment failure in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children. In a prospective study we used frequent monitoring of hematopoietic chimerism (HC)^{1,2} to identify patients with a high risk of post-transplant relapse and thus indicated for adoptive immunotherapy (AI).³⁻⁶ Between January 1997 and June 2001 we performed a total of 54 unmanipulated allogeneic HSCT from HLA-identical siblings (28) or matched unrelated donors (26) in 50 consecutive children with hematologic malignancies in the University Hospital Motol, Prague. Fifty-two evaluable follow-ups from forty-eight patients at a median age of 10 years (2-18 years) with acute lymphoblastic leukemia (ALL; 18/17), acute myelogenous leukemia (AML; 17/14), chronic myelogenous leukemia (CML; 8), myelodysplastic syndrome (MDS; 6) and juvenile myelomonocytic leukemia (JMML; 3) were included in this prospective chimerism study. Written informed consent was obtained from the parents. We analyzed HC in peripheral blood samples using polymerase chain reaction of variable number of tandem repeats (ApoB1,

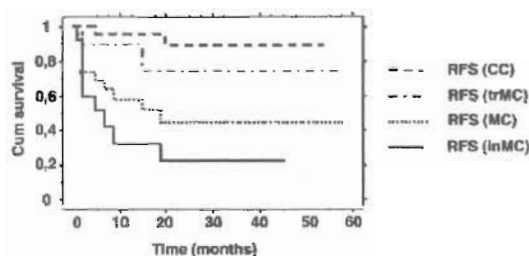


Figure 1. Kaplan-Meier estimates of relapse-free survival for the CC and the MC groups. Forty-four patients were evaluable for RFS. RFS for the CC group was 20/22, whilst that for the MC group was 11/22. RFS for the MC group was 7/9 as compared to 4/13 for that in the MC group.

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

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

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

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

Renata Formánková, Petr Sedláček, Lenka Krsková,
Hana Rihová, Lucie Srámková, Jan Stary
for the Czech Pediatric Hematology Working Group

Correspondence: Renata Formánková, MD, 2nd Department of Pediatrics, University Hospital Motol, V Úvalu 84, CZ-150 06, Prague 5, Czech Republic. Phone & Fax: international +42.02.24432220. E-mail: renata.formankova@lfmotol.cuni.cz

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

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

Manuscript processing

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

References

- Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, et al. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 1998;21:487-95.
- Socie G, Lawler M, Gluckman E, McCann SR, Brison O. Studies on hemopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation in the molecular biology era. *Leuk Res* 1995;19:497-504.
- Helg C, Starobinski M, Jeannot M, Chapuis B. Donor lymphocyte infusion for the treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 1998;29:301-13.
- Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, et al. Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. *Leukemia* 1999;13:2079-86.
- Singhal S, Powles R, Kulkarni S, Treleaven J, Saso R, Mehta J. Long-term follow-up of relapsed acute leukemia treated with immunotherapy after allogeneic transplantation: the inseparability of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia, and the problem of extramedullary relapse. *Leuk Lymphoma* 1999;32:505-12.
- Elmaagacii AH, Beelen DW, Trenn G, Schmidt O, Nahler M, Schaefer UW. Induction of a graft-versus-leukemia reaction by cyclosporin A withdrawal as immunotherapy for leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:771-7.
- Formankova R, Honzatkova L, Moravcova J, Sieglava Z, Dvorakova R, Nadvornikova S, et al. Prediction and reversion of

post-transplant relapse in patients with chronic myeloid leukemia using mixed chimerism and residual disease detection and adoptive immunotherapy. *Leuk Res* 2000;24:339-47.

- Moravcova J, Lukasova M, Stary J, Haskovec C. Simple competitive two-step RT-PCR assay to monitor minimal residual disease in CML patients after bone marrow transplantation. *Leukemia* 1998;12:1303-12.
- Formankova R, Honzatkova L, Sieglava Z, Stary J, Sedlacek P, Brdicka R. Detailed monitoring of hematopoietic chimerism in a child treated by adoptive immunotherapy for high risk of relapse after BMT for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:453-6.

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

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

Haematologica 2003;88:118-120

(http://www.haematologica.org/2003_01/88118.htm)

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

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

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

Příloha 8:

Madžo J., Mužíková K., Froňková E., Šrámková L., Zemanová Z., Zuna J., Starý J. Trka J.
Je fúzní gen TEL/AML1 vhodným znakem pro sledování reziduální nemoci u dětí s akutní
lymfoblastickou leukémií

Transfúze a hematologie dnes, 10/2004

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

Madžo J.^{1,2}, Mužíková K.¹, Froňková E.¹, Šrámková L.¹, Zemanová L.¹, Zuna J.¹, Starý J.³, Trka J.^{1,*}

¹ CLIP – Childhood Leukaemia Investigation Prague, Klinika dětské hematologie a onkologie, ² Ústav fyziologie, UK 2. LF, Praha, ³ 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 iniciálním 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) přerazováni 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 beze 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 popsanými 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 Chomczynskiho & 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 dřeň, 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 značené 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 přestaveb

Detekce přestaveb Ig/TCR byla provedena pomocí PCR, jak bylo popsáno dříve (7). Ke screeningu přestaveb 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 positivity 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 agaróзовé 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^{-4} . Kvantitativní detekce klonálně specifických přestaveb IRG byly provedeny s použitím přístroje pro „real-time“ PCR ABI PRISM 7700 (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, USA) nebo iCycler iQTM (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

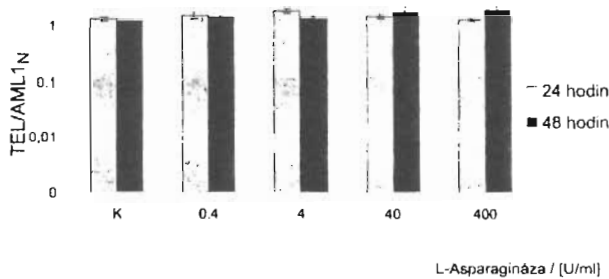
Stabilita transkriptu TEL/AML1 v čase

Simulovali jsme transport vzorku TEL/AML1 pozitivní ALL. Při pokojové teplotě jsme odebírali ze vzorku TEL/AML1 pozitivní kostní dřeň 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_N). 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_N je však stabilní v čase po dobu nejméně 78 hodin od odběru vzorku do jeho zpracování.

Stabilita exprese TEL/AML1 po léčbě cytostatiky

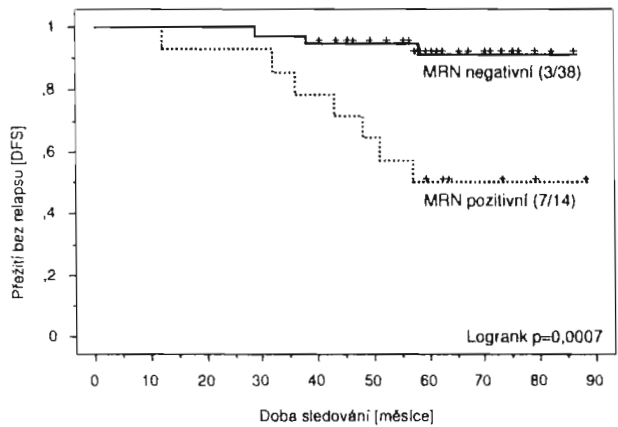
Abychom ověřili, zda chemoterapie ovlivňuje expresi hybridního genu TEL/AML1, simulovali jsme in vitro léčbu maligních buněk nesoucích gen TEL/AML1 pomocí cytostatika L-asparaginázy, která je důležitou komponentou protileukemické léčby. Do buněčné kultury TEL/AML1 pozitivní leukemické linie REH jsme přidávali L-asparaginázu v rostoucí koncentraci (0,4 – 400 U/ml) a měřili normalizovanou expresi TEL/AML1 (TEL/AML1_N). Zjistili jsme, že u buněk, které léčbu cytostatikem přežily, se TEL/AML1_N 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 leukemie

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

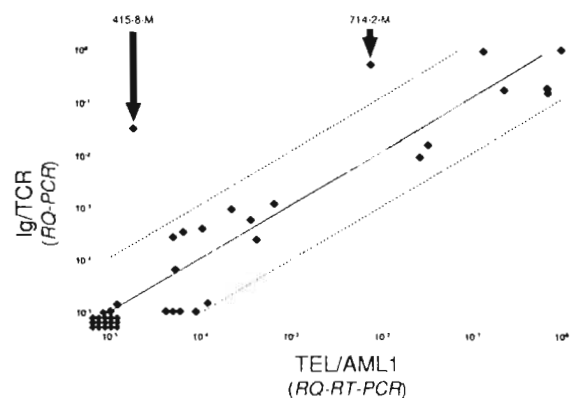


Obr. 2. Analýza 52 pacientů s TEL/AML1 pozitivní ALL ukazuje prognostický význam detekovatelné MRN na konci indukční léčby. Přežití bez relapsu (Disease Free Survival – DFS) je výsokce signifikantně horší ve skupině 14 pacientů s detekovatelnou MRN: 7 z nich již prodělalo relaps.

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 nelišil (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 brání 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_N. 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 případech 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 vyznívá 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/AML1 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, Muzikova 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-Willemsse 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, Willemsse 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-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.
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

Publikační a přednášková činnost:

Spoluautor kapitoly v monografii:

Trendy soudobé pediatrie, Dětská hematologie, Jan Starý et al.
Galén 2005

kapitola „Vrozená selhání kostní dřeně“: Jan Starý, Lucie Šrámková

Články v zahraničních časopisech:

Low mortality of children undergoing hematopoietic stem cell transplantation from 7 to 8/10 human leukocyte antigen allele-matched unrelated donors with the use of antithymocyte globulin

P.Sedlacek, R.Formankova, P.Keslova, L.Sramkova, P.Hubacek, L.Krol, M.Kulich, J.Stary
Bone Marrow Transplant. 2006 Oct 16, přijato k tisku

Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia

L.Sramkova, K. Muzikova, E. Fronkova, O. Krejci, P. Sedlacek, R. Formankova, E.Mejstrikova, J.Stary, J. Trka

Pediatr Blood Cancer, 2006 Mar 6, přijato k tisku

TEL/AML1 nad immunoreceptor gene rearrangements – which comes first?

J. Zuna, O. Krejci, J. Madzo, E. Fronkova, L. Sramkova, O. Hrusak, T. Kalina, M. Vaskova, J. Stary, J. Trka

Leukemia Research, 29 (2005), 633-639

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

R. Formankova, P. Sedlacek, L. Krskova, R. Rihova, L. Sramkova, J. Stary

Hematologica, 2003 Jan, 88 (1), 117-118

Protocol combining GnRH agonists and GnRH antagonists for rapid suppression and prevention of gonadal damage during cytotoxic therapy

Mardesic T, Snajderova M, Sramkova L, Keslova P, Sedlacek P, Stary J.

Eur J Gynaecol Oncol. 2004;25(1):90-2

Články v domácích časopisech:

Bolesti kostí a kloubů jsou častým příznakem při diagnóze leukémie v dětském věku –

L.Šrámková, P. Smíšek, V. Vávra, P. Sedláček, J. Starý

Česká a slovenská pediatrie, 2002, roč. 57, č.5, str.232-235

Novorozenecké nádory

Válková J., Šrámková L., Šmelhaus V., Švábová, Cháňová M., Starý J., Koutecký

Česká a slovenská pediatrie, 2003, roč. 58, č.8, str. 478-483

Hybridní gen TEL/AML1 asociovaný s akutní leukémií vzniká v průběhu normálního fetálního vývoje a je detekovatelný v pupečnickových krvích zdravých novorozenců

Trka J., Zuna J. Hrušák O., Zemanová Z., Mužíková K., Kalinová M., Zörnerová T., Brabencová A., Madžo J., Krejčí O., Starková J., Pončáková I., Šrámková L., Hölzelová E., Poloučková A., Horák J., Starý J.

Česká a slovenská pediatrie, 2003, roč. 58, č.8, str. 471-477

Hemofagocytující lymfohistiocytóza – diagnostické a léčebné dilema

Starý J., Housková J., Špišek R., Vávra V., Sedláček P., Mihál V., Smíšek P., Hrušák O., Zdráhalová K., Šrámková L., Keslová P., Komrská V., Cinek O., Kodet R.

Česká a slovenská pediatrie, 2004, roč. 59, č. 2, str. 70-82

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

Madžo J., Mužíková K., Froňková E., Šrámková L., Zemanová Z., Zuna J., Starý J. Trka J.

Transfúze a hematologie dnes, 10/2004

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

Starý J., Sedláček P., Kobylka P., Loudová M., Říhová H., Pittrová H., Ivašková H.,

Šrámková L., Formánková R.

Transfúze a hematologie dnes, 3/2003

Abstrakta posterů a zahraničních přednášek publikovaná v časopisech s IF:

27th Meeting European Group for Blood and Marrow Transplantation, 2001, Maastricht

abstrakt: Bone Marrow Transplantation Vol.27, Suppl.1, March 2001

Outbreak of EBV-LPD in children receiving rabbit anti-thymocyte globulin

P. Sedlacek, J.Stary, K.Roubalova, D.Pilat, R.Kodet, O.Hrusak, A.Polouckova, L.Sramkova

European Society of Pediatric Haematology and Immunology Annual Meeting, Luzern

6/2001

abstrakt: Pediatric Research Vol.49, No.6, June 2001

Bone marrow transplantation and postransplant care in Diamond-Blackfan anemia: report of three cases

L.Sramkova, P.Sedlacek, D.Pospisilova, K.Petrylova, J.Stary

43rd ASH Annual Meeting, 2001, Orlando

abstrakt: Blood 2001, 98 (12): 241

RQ-PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance and excellent correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry

Trka J., Kalinova M., Hrusak O., Zuna J., Polouckova A., Sedlacek P., Sramkova L., Vavra V., Michalova K., Jarosova M. and Stary J.

Chimerism-directed adoptive immunotherapy in prevention and/or treatment of posttransplant relapse of leukemia in childhood

abstrakt: Reports of practical oncology and radiotherapy, Vol.26, Suppl.1, 2001

R.Formankova, P.Sedlacek, J.Stary, L.Krskova, H.Říhova, J.Moravcova, L.Sramkova

Pediatric EBMT, Frankfurt n.M., September 2002

abstrakt: Bone marrow transplantation, Vol. 30, S1, Nov 2002

EBV viral load in patients after HSCT: prospective quantitative observation compared to retrospective analysis of four fatal EBV-LPD cases

P.Sedlacek, O.Cinek, J. Stary, L. Sramkova, A. Vrzalova, P. Keslova, P.Drevinek

41th European Society for Paediatric Endocrinology, 25-28 September 2002, Madrid

abstrakt: Hormon Research, Vol. 58, Suppl.2

Haematological cancer nad bone marrow transplantation: late effects in children, adolescents and in young adults

M. Snajderova, D. Zemkova, P. Sedlacek, L.Sramkova, J. Stary

5th International Symposium on Leukemia and Lymphoma, 12-15 March 2003, Amsterdam, The Netherlands

abstrakt: Leukemia, March 2003, Vol. 17, No. 3

Molecular relapse of acute leukemia detected by residual disease analysis can be reverted by combination of adoptive immunotherapy and STI571

L.Sramkova, J. Trka, K. Muzikova, M.Kalinova, O. Krejci, O. Hrusak, E. Mejstrikova, P.Sedlacek, P.Keslova, J.Sterba, J.Stary

abstrakt: Gynecological endocrinology, Vol 17, Suppl No 1, 2003

Protocol for prevention of gonadal damage during cytotoxic therapy

T. Mardesic, M. Snajderova, L.Sramkova, P. Keslova, P. Sedlacek, J. Stary

29th Meeting European Group for Blood and Marrow transplantation, 2003, Istanbul

abstrakt: Bone Marrow Transplantation Vol.31, Suppl.1, March 2003

Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: A report of the pre-BMT MRD Study Group

L.Sramkova, O. Krejci, V.H.J. van der Velden, P. Bader, H. Kreyenberg, N. Goulden, M.W. Schilham, T. Revesz, J.J.M. van Dongen pre BMT MRD

I.cena za nejlepsi oralni prezentaci EBMT kongresu

abstrakt: European Journal of Gynaecological Oncology, Vol 15, 2004, pp.90-93

Protocol combining GnRH agonists and antagonists for rapid suppression and prevention of gonadal damage during cytotoxic therapy

T. Mardesic, M. Snajderova, L.Sramkova, P. Keslova, P. Sedlacek, J. Stary

31th Meeting European Group for Blood and Marrow transplantation, 2005, Prague

abstrakt: Bone Marrow Transplantation Vol.35, Suppl.2, March 2005

Gonadal protection combining GnRH agonists a antagonists in postpubertal girls receiving a cytotoxic therapy – chance for fertility preservation in young patients

P.Keslova, T. Mardesic, M. Snajderova, K.Zdrahalova, P.Sedlacek, R.Formankova, L.Sramkova, V.Vavra, J.Stary

21th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, 2005, Copenhagen

abstrakt: Human Reproduction Vol.20, Suppl.1,2005

GnRH analogues in gonadal protection

M. Snajderova, T. Mardesic, P.Keslova, P.Sedlacek, L.Sramkova, K.Zdrahalova, P. Smisek, V.Vavra, M. Ganevova, J.Stary

Přednášky:

Slovenské pediatrické dny, Stará Lesná, 1/2001

Transplantace kostní dřeně u dětí

L. Šrámková, R. Formánková, P. Sedláček, J. Starý

Společná konference britských a českých pediatriů, 25.5.2001, Praha

RT-RQ-PCR and flow cytometry in a child with AML undergoing BMT

L. Šrámková, K. Mužíková, O. Krejčí, O. Hrušák, P. Sedláček, J. Starý, J. Trka

XI. pracovní konference českých a slovenských dětských hematologů – 22.-24.6.2001, Špičák na Šumavě – „Naše zkušenosti s transplantací kostní dřeně u Diamond-Blackfan anémie“, abstrakt ve sborníku

L. Šrámková, R. Formánková, P. Sedláček, D. Pospíšilová, J. Starý

International workshop on Nijmegen breakage syndrome, 26.4.2002, Praha

Hematological malignancies in children with ataxia teleangiectasia and Nijmegen breakage syndrome, abstrakt – ČLČ, 8/2002

L. Šrámková, M. Cháňová, V. Mihál, J. Hak, Y. Jabali, D. Kopečná, J. Starý

XII. pracovní konference slovenských a českých dětských hematologů, 31.5.-2.6.2002, Bratislava: Hematologické malignity u dětí s Nijmegen breakage syndromem a ataxia teleangiectasia, abstrakt ve sborníku

L. Šrámková, M. Cháňová, V. Mihál, J. Hak, Y. Jabali, L. Kopečná, J. Starý

V. Český pediatrický kongres, Teplice, 6.9.2002, abstrakt ve sborníku

Minimální reziduální nemoc před a po transplantaci hematopoetických kmenových buněk u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií

L. Šrámková, K. Mužíková, O. Krejčí, R. Formánková, P. Sedláček, J. Starý, J. Trka

XVII. Olomoucké hematologické dny, 4-7.6.2003, abstrakt ve sborníku

Vysoká hladina minimální reziduální nemoci před transplantací kostní dřeně predikuje relaps nemoci

L. Šrámková, K. Mužíková, O. Krejčí, R. Formánková, P. Sedláček, J. Starý, J. Trka

I-BFM meeting, Paris, 2.-4. dubna 2003

Results of retrospective study of CNS relapses of ALL in the Czech Republic

MRD detection in S2 group of relapsed patients – experiences of Czech Pediatric Hematology group

L. Šrámková, B. Blažek, Z. Černá, Y. Jabali, L. Kopečná, V. Mihál, K. Toušovská, K. Mužíková, P. Sedláček, J. Trka, J. Starý

XIII. pracovní konference českých a slovenských dětských hematologů, Lednice 3.-5.10. 2003

Retrospektivní analýza relapsů akutní lymfoblastické leukémie s postižením CNS a další perspektivy jejich léčby

L. Šrámková, B. Blažek, Z. Černá, Y. Jabali, L. Kopečná, V. Mihál, K. Toušovská, K. Mužíková, P. Sedláček, J. Trka, J. Starý pro Pracovní skupinu dětské hematologie v ČR

Minimální reziduální nemoc v léčbě relapsu dětské akutní lymfoblastické leukémie
L. Šrámková, E. Froňková, K. Mužíková, O. Krejčí, P. Sedláček, J. Trka, J. Starý pro
Pracovní skupinu dětské hematologie v ČR (PSDH)

XIV. pracovní konference českých a slovenských dětských hematologů, Průhonice, říjen
2004

První výsledky léčby relapsu ALL podle protokolu ALL-REZ BFM 2002

Šrámková L., Štěrbá J., Jabali Y., Procházková D., Blažek B., Mihál V., Trka J., Sedláček P.,
Starý J.

Použitá literatura:

1. Pui, C.H. et al., *Acute lymphoblastic leukemia in children*. *Curr Opin Oncol*, 2000. 12(1): p.3-12.
2. Greaves, M.F., Wiemels, J., *Origins of chromosome translocations in childhood leukemia*. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3 (9), p: 639-49.
3. Greaves, M., *Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukemia*. *Eur J Cancer*, 1999. 35(14): p.1941-53.
4. Kim-Rouille, M.H., Mac Gregor, A., *MLL-AF4 fusions in normal newborns*. *Blood*, 1999. 93(3), p: 1107-8.
5. Trka, J., Zuna, J., *No evidence for MLL/AF4 expression in normal cord blood samples*. *Blood*. 1999, 93 (3), p: 1108-10.
6. Zuna, J., et al., *Significantly lower relapse rate for TEL/AML positive ALL*. *Leukemia*, 1999. 13 (10), p: 1633.
7. Seeger, K., et al. *TEL/AML 1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Münster Study Group*. *Blood*, 1998. 91: p. 1716-1722.
8. Seeger, K., et al., *TEL/AML1 fusion in relapsed acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 1999. 94 (1): p. 374-6.
9. Loh, M.L., et al., *Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 1998. 92 (12): p. 4792-7.
10. Cave, H., van den Werff ten Bosch, J., *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.
11. van Dongen, J.J., Seriu, T., *Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood*. *Lancet*, 1998. 352 (9142), p:1731-8.
12. Madzo, J., Zuna, J., *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.
13. 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.
14. Pui, C.H., et al., *Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIIB at St Jude Children's Research Hospital*. *Blood*, 2004. 104(9): p. 2690-6.

15. Gaynon, P.S., et al., *Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995*. *Leukemia*, 2000. 14(12): p. 2223-33.
16. Schrappe, M., et al., *Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM90*. *German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group*. *Blood*, 2000. 95 (11): p.3310-22.
17. Szczepanski, T., et al., *Precursor B-ALL with D(H)-J(H) gene rearrangements have an immature immunogenotype with high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14*. *Leukemia*, 2001. 15 (9): p. 1415-23.
18. 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.
19. 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
20. 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.
21. 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.
22. Pongers-Willemse, M.J., et al., *Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin an T-cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia*. *Leukemia*, 1999. 13 (1): p. 110-8.
23. 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.
24. 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 BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936*. *Leukemia*, 2003. 17(12): p. 2257-317
25. Langerak, A.W., et al., *Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations*. *Leukemia*, 1997. 1(12): p. 2192-9

26. 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.
27. 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.
28. Boeck, 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.
29. Langerak, A.W., et al., *Basic helix-loop-helix proteins E2A and HEB induce immature T-cell receptor rearrangements in non-lymphoid cells*. Blood, 2001. 98(8): p. 2456-65.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Szczepanski, T., et al., *Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and 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.
34. 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*. Transfúze a hematologie dnes, 2005, 3(11): p. 110-115.
35. Wheeler, K., et al., *Comparison of bone marrow transplant and chemotherapy for relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia - the MRC UKALL experience*. British Journal of Haematology, 1998.101: p. 93-102.
36. Eckert, C., et al., *Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet, 2001. 358: p.1239-1241.
37. Bader, P., et al. *Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL*. Leukemia, 2002. 16: p.1668-1672.

38. Knechtli, C.J., et al., *Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 1998. 92: p. 4072-4079.
39. Uzunel, M., et al., *The significance of graft-versus-host disease and pretransplantation minimal residual disease status to outcome after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2001. 98(6):p. 1982-4.
40. van Dongen, J.J.M., et al. *Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia*. *Lancet*, 1998. 352: p. 1731-1738.
41. Moppett, J., et al., *Additional Cyto-reduction Pre-Transplant for MRD Positive Children with ALL in CR2 - Feasibility and Outcome*. *Blood*, 2001. 98: p. 386.
42. Campana, D. et al. *Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance*. *Blood*, 1995. 85:p.1416-34.
43. Hrusak, O. et al. *Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemia*. *Leukemia*, 2002. 16:p.1233-58.
44. van Dongen, J.J. et al. *Detection of minimal residual disease in acute leukemia patients*. *Cytokines Mol Ther*, 1996. 2:p.121-133.
45. Porwit-MacDonald, A. et al. *BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2000. 14:p.816-25.
46. Lucio, P. et al. *Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry*. *Leukemia*, 1999. 13:p.419-27.
47. Campana, D. et al. *Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry*. *Cytometry*, 1999. 38:p.139-52.
48. van Wering, E.R. et al. *Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 1995. 9:p.1523-33.
49. Szczepanski, T. et al. *Minimal residual disease in leukemia patients*. *Lancet Oncol.*, 2001. 2:p.409-17.
50. Heid, C.A. et al. *Real time quantitative PCR*. *Genome Res*, 1996. 6:p.986-94.
51. Holland, P.M. et al. *Detection of specific polymerase chain reaction product utilising the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991. 88:p.7276-80.

52. 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:p.2006-14.
53. 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:p.1426-35.
54. Bruggemann, M. et al. *Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR*. Leukemia, 2000. 14:p.1419-25.
55. Eckert, C. et al. *Potential of LightCycler technology for quantification of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2000. 14:p.316-23.
56. Seeger, K. et al. *Treatment response and residual-disease monitoring in initial and relapsed TEL-AML1 positive childhood ALL*. Leukemia, 2001. 15:p.280-2.
57. Abbas, A.K. et al. *Maturation, activation and regulation of lymphocytes*. Cellular and Molecular Immunobiology, Vol.1, p.123-233, W.B.Saunders Co, Philadelphia, 2000.
58. Lefranc, M.P. et al. *the international ImMunoGeneTics database*. Nucleic Acids Res, 1997. 27:p.209-12.
59. van Dongen, J.J. et al. *Immunobiology of leukemia*. Leukemia, vol.1:p.85-131. W.B.Saunders Co, Philadelphia, 2002.