



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Dizertační práce

**Prognóza akutní lymfoblastické leukémie u dětí v závislosti
na nových klinicko-biologických faktorech**

MUDr. Jana Volejníková

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně v Laboratoři molekulární genetiky CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague) Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní Nemocnice Motol pod vedením své školitelky MUDr. Evy Froňkové, Ph.D. a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s využíváním práce ke studijním účelům a jejím citováním dle platných norem. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 17.10.2012

JANA VOLEJNÍKOVÁ

Poděkování

Vážím si příležitosti vykonávat postgraduální studium na 2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy.

Prof. MUDr. Janu Starému, DrSc. děkuji za možnost pracovat na Klinice dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol a kolegům z Kliniky dětské hematologie a onkologie za uvedení do klinické praxe.

Kolegům z Laboratoře molekulární genetiky a Laboratoře průtokové cytometrie CLIP bych ráda poděkovala za zasvěcení do zásad laboratorní práce, za spolupráci na společných projektech, přátelský přístup a možnost pracovat v podnětném a dynamickém prostředí.

Zejména děkuji svým školitelům MUDr. Evě Froňkové, Ph.D. a prof. MUDr. Janu Trkovi, Ph.D. za odbornou a metodickou pomoc, užitečné rady a důsledné vedení v průběhu postgraduálního studia.

Děkuji za podporu své rodině a přátelům.

Identifikační záznam:

VOLEJNÍKOVÁ, Jana. *Prognóza akutní lymfoblastické leukémie u dětí v závislosti na nových klinicko-biologických faktorech. [Prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia according to novel clinical and biological risk factors]*. Praha, 2012. 71 s., 6 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Klinika dětské hematologie a onkologie. Vedoucí závěrečné práce Froňková, Eva.

Klíčová slova: *akutní lymfoblastická leukémie (ALL), minimální reziduální nemoc (MRN), akutní leukémie se smíšeným fenotypem (MPAL), Ikaros (IKZF1)*

Keywords: *acute lymphoblastic leukemia (ALL), minimal residual disease (MRD), mixed phenotype acute leukemia (MPAL), Ikaros (IKZF1)*

ÚVOD	7
I. MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOC V PERIFERNÍ KRVI A JEJÍ VLIV NA PROGNÓZU DĚTSKÉ AKUTNÍ LYMFOBLASTICKÉ LEUKÉMIE	9
ZNAKY URČUJÍCÍ PROGNÓZU AKUTNÍ LYMFOBLASTICKÉ LEUKÉMIE U DĚTÍ	9
<i>Klinické prognostické faktory.....</i>	9
<i>Imunofenotyp.....</i>	10
<i>Genetické znaky leukemických buněk.....</i>	10
<i>Vrozená vnímavost k onemocnění ALL</i>	15
<i>Farmakodynamika a farmakogenetika.....</i>	15
<i>Minimální reziduální nemoc – definice, způsoby vyšetření a klinický význam</i>	16
<i>Moderní diagnostika a léčba ALL u dětí v České republice</i>	18
CÍLE I.	21
METODIKA I.	22
<i>Stanovení MRN pomocí kvantifikace klonálně-specifických přestaveb genů pro Ig/TCR</i>	22
<i>Stanovení MRN pomocí průtokové cytometrie</i>	26
<i>Statistická analýza.....</i>	28
VÝSLEDKY I.	29
<i>Hladiny minimální reziduální nemoci v kostní dřeni a periferní krvi u BCP-ALL spolu (na rozdíl od T-ALL) nekorelují</i>	29
<i>Vztah postižení periferní krve k dalším rizikovým faktorům</i>	30
<i>Minimální reziduální nemoc v periferní krvi v 15. dni léčby má u dětí s ALL důležitý prognostický význam</i>	31
<i>Minimální reziduální nemoc v periferní krvi v 15. dni léčby a riziková stratifikace</i>	32
DISKUZE A ZÁVĚRY I.	33
II. AKUTNÍ HYBRIDNÍ LEUKÉMIE V DĚTSKÉM VĚKU	35
SUBTYPY AKUTNÍ HYBRIDNÍ LEUKÉMIE A JEJICH CHARAKTERISTIKA.....	35
CÍLE II.	38
METODIKA II.	39
VÝSLEDKY II.	40
<i>Akutní hybridní leukémie s významnou koexpresí znaků různých linií</i>	40
<i>Akutní hybridní leukémie s líniovým přesmykem</i>	41
DISKUZE A ZÁVĚRY II.	43
III. TRANSKRIPČNÍ FAKTOR IKZF1 A JEHO ALTERACE.....	45
STRUKTURA A FUNKCE TRANSKRIPČNÍHO FAKTORU IKZF1 A TYPY JEHO ALTERACÍ.....	45
CÍLE III.....	47
METODIKA III.....	48
<i>Vyšetření genové exprese IKZF1.....</i>	48
<i>Vyšetření delecí genu IKZF1.....</i>	49
<i>Sekvenování vybraných oblastí IKZF1.....</i>	50
VÝSLEDKY III.	51
<i>Incidence alterací IKZF1 na úrovni genové exprese a jejich vliv na prognózu dětské ALL</i>	51
<i>Incidence alterací IKZF1 na genové úrovni a jejich vliv na prognózu dětské ALL.....</i>	51
<i>Diskrepance mezi aberacemi IKZF1 na genové úrovni a na úrovni genové exprese</i>	52
<i>Asociace alterací IKZF1 s dalšími rizikovými faktory (včetně MRN).....</i>	52
DISKUZE A ZÁVĚRY III.	54
ZÁVĚR.....	56

SOUHRN	57
SUMMARY	58
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	59
POUŽITÁ LITERATURA	62
PŘÍLOHY	72

Úvod

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) je nejčastějším maligním onemocněním dětského věku, ročně v České republice postihne přibližně 70 dětí. Jejich prognóza se během uplynulých 50 let, kdy se postupně rozvíjela diagnostická a léčebná strategie ALL u dětí, dramaticky zlepšila – celkové přežití dětí a adolescentů vzrostlo z 0% na počátku 60. let na současných téměř 90% [1-12], což je jeden z největších úspěchů medicíny 20. století. Oproti tomu akutní myeloidní leukémie (AML) s výjimkou akutní promyelocytární leukémie [13], přestože léčena odlišně a podstatně agresivněji, má stále horší prognózu, vyléčit se daří asi 50-60% pacientů [14-17].

Na úspěšnost léčby dětské ALL mají rozhodující vliv především následující faktory: jednak velmi intenzivní chemoterapie organizovaná do tzv. bloků zahrnujících kombinace cytostatik vybrané jako nejvhodnější pomocí velkých mezinárodních randomizovaných studií v rámci sjednocených léčebných protokolů, jednak kvalitní podpůrná péče, umožňující nasazení vysokodávkovaných cytostatik; a konečně také rozdělení (stratifikace) pacientů do léčebných skupin na základě rizika relapsu onemocnění, pro které je indikována různě intenzivní terapie [18]. V rizikové stratifikaci se v posledním desetiletí uplatňují nejmodernější vyšetřovací metody, především molekulární genetika a průtoková cytometrie [19,20].

Přes tyto pokroky ale u části pacientů i nadále dochází k relapsu onemocnění, navíc se stále pohybujeme na hranici únosnosti léčebné zátěže, což přináší riziko toxických komplikací a pozdních následků léčby včetně sekundárních malignit. Velmi malé procento dětí s vysoce rizikovou leukémií nelze současnými postupy vyléčit vůbec. Konečný výsledek léčby nezávisí pouze na aplikovaném terapeutickém schématu, ale také na biologii leukemického klonu a jeho farmakodynamických a farmakogenetických vlastnostech.

Co nejpřesnější rozdělení pacientů do rizikových skupin umožňuje snížit dávky chemoterapie (a tedy omezit její toxicitu) u dětí s vysokou šancí na vyléčení (skupina tzv. standardního rizika) a naopak pacientům s vysokým rizikem relapsu (skupina tzv. vysokého rizika) podat co nejintenzivnější chemoterapii, případně indikovat jiné způsoby léčby - transplantaci hemopoetických kmenových buněk nebo nasazení nových cílených léčiv [4,21]. Hledání nových znaků umožňujících co nejpřesnější charakterizaci leukemických buněk pacienta tedy i nadále zůstává v celosvětovém měřítku prioritou pracovních skupin zabývajících se dětskou ALL a léčebné postupy zohledňující biologii leukemického klonu vedou k dalšímu zlepšování prognózy a kvality života pacientů [22].

Předkládaná dizertační práce je pro přehlednost rozdělena do tří částí. Jejich společným cílem je identifikace nových prognostických znaků, poznání jejich vzájemných souvislostí i vztahů s již existujícími rizikovými faktory za použití výše zmíněných moderních metod, zejména v souvislosti s významným imunitním mechanismem - přestavbami genů pro imunoglobuliny a receptory T-buněk (Ig/TCR) - a na něm založeném sledování tzv. minimální reziduální nemoci (MRN) jako citlivého ukazatele odpovědi na léčbu a subklinického leukemického postižení různých kompartmentů v organizmu. První část práce, *Minimální reziduální nemoc v periferní krvi a její vliv na prognózu dětské akutní lymfoblastické leukémie*, je věnována sledování MRN v kostní dřeni a periferní krvi u dětí v průběhu léčby ALL pomocí kvantifikace Ig/TCR [23-26] a jejímu prognostickému významu v časných časových bodech (zejména v 15. dni) indukční léčby. Ve druhé části práce nazvané *Akutní hybridní leukémie v dětském věku* se zabýváme vlastnostmi, prognózou a léčbou vzácné a dosud nedostatečně poznané akutní hybridní leukémie neboli leukémie s tzv. smíšeným fenotypem (AHL, MPAL) [27], a to jednak leukémie s významnou koexpresí znaků za normálních okolností příslušných buňkám jiné hematopoetické linie [28-30], jednak leukémie s tzv. přesmykem do odlišné linie („lineage switch“) během časné fáze indukční léčby [31,32], a uvádíme doporučení pro její správný klinický management.

Třetí část dizertační práce, *Transkripční faktor Ikaros (IKZF1) a jeho alterace*, popisuje vzájemný vztah aberací IKZF1, což je jeden z nových významných rizikových faktorů s potenciálem zařazení do klinické praxe v rámci mezinárodních léčebných protokolů [33-35], na genové úrovni, úrovni exprese mRNA a proteinové exprese. Ve spolupráci s Dětskou klinikou Univerzitní nemocnice Schleswig-Holstein v Kielu jsme zmapovali souvislost těchto alterací s ostatními klinicky významnými faktory včetně MRN a jejich vliv na prognózu dětí s ALL v rámci dvou různých typů léčebných protokolů.

Na základě našich výsledků uvádíme doporučení pro optimalizaci postupů pro diagnostiku i léčbu dětské ALL.

I. Minimální reziduální nemoc v periferní krvi a její vliv na prognózu dětské akutní lymfoblastické leukémie

Znaky určující prognózu akutní lymfoblastické leukémie u dětí

Klinické prognostické faktory

První stratifikační kritéria vznikla již před několika desetiletími přímým odvozením z klinické praxe, jsou jednoduchá, zřejmá, snadno dostupná a reprodukovatelná: mezi nejdůležitější „klasické“ prognostické faktory stále patří věk a počet leukocytů při diagnóze [36,37]. Za příznivý je pokládán věk 1-9 let, a to díky biologickým znakům leukemických buněk zastoupeným v této věkové skupině (viz níže). Naopak kojenci s ALL mají prognózu špatnou – až u 80% z nich jsou přítomny prognosticky nepříznivé translokace genu MLL [38,39]. I adolescenti a mladí dospělí mají horší přežití, zčásti rovněž kvůli asociaci s nepříznivými genetickými znaky, a profitují z intenzivnější léčby podle protokolů pro léčbu dětské ALL, nikoli ALL dospělých [40].

Iniciální leukocytóza odráží celkovou nádorovou masu spolu s hepatomegalií, splenomegalií a infiltrací mediastina [41]. Za prognosticky příznivý se považuje počet leukocytů pod $50 \times 10^9/l$. Oproti tomu prognostický význam počtu trombocytů na konci indukční léčby, odrážející rychlost regenerace hematopoezy, byl popsán teprve nedávno [42].

Již několik desetiletí je jedním z nejdůležitějších rizikových faktorů dětské ALL také časná morfoloická odpověď na léčbu. Pacienti, kteří mají po prvních 7 dnech podávání prednisonu a jedné intrathekální dávce metotrexátu v periferní krvi stále více než 1000 blastů na μl , tvoří skupinu s mnohočetnou lékovou rezistencí, tzv. "prednisone poor responders" (PPR, asi 10% pacientů). Jejich velmi špatné přežití bez události (EFS) bylo poněkud zlepšeno až v 90. letech díky dalšímu zvýšení intenzity léčby, eventuálně indikováním k transplantaci kmenových buněk krvetvorby [4,43].

Další významnou prognostickou informací přináší cytomorfoloické hodnocení kostní dřeně v 15. dni léčby: přežití bez události spojitě klesá s narůstající dřeňovou infiltrací v tomto časovém bodě (8-leté EFS=86% pro M1 dřeň, tj. <5% blastů, avšak pouze 46% pro M3 dřeň, tj. >25% blastů). U ALL z prekurzorů B-lymfocytů (viz níže) dokonce morfoloie kostní dřeně převáží prognostický vliv odpovědi na prednison [44]. Toto kritérium, stejně jako řada dříve prognosticky významných klinických a biologických znaků, však postupně ztrácí na důležitosti díky pokrokům v diagnostice a léčbě dětské ALL: například nepříznivý prognostický význam mužského pohlaví, způsobený vyšším výskytem pozdních, zejména

testikulárních, relapsů u chlapců léčených méně intenzivně ve skupině standardního rizika (SRG), byl v protokolu ALL-BFM 95 eliminován díky prodloužení udržovací terapie [4]. Stejně tak vliv rasové příslušnosti na prognózu již není v nejmodernějších léčebných protokolech signifikantní [8,45] – dříve publikované horší výsledky léčby dětí zejména černošského a hispánského etnika [46-49] byly vyrovnány přizpůsobením terapie asociovaným prognosticky nepříznivým znakům. Rovněž rozsáhlá čínská studie popsala vyšší výskyt nepříznivých rizikových faktorů u ALL dětí i dospělých [50]. V tomto směru stále existuje prostor pro objevování dalších rizikových faktorů a zlepšování léčebné strategie, o čemž svědčí nedávné klíčové práce popisující nové prognosticky nepříznivé znaky, tj. zvýšenou expresi genu CRLF2 spojenou s mutacemi genů pro transkripční faktor Ikaros (IKZF1) a kinázy JAK, a jejich asociaci s hispánským etnikem [51,52]. Určitou roli by mohly hrát i interrasiální rozdíly v compliance při léčbě [53].

Imunofenotyp

Rovněž asi 15% dětských ALL klasifikovaných podle imunofenotypu jako leukémie z T buněk (T-ALL), historicky s výrazně horší prognózou než ALL z prekurzorů B-řady (BCP-ALL), nyní dosahuje přežití 75-80%, i když většinou za cenu zařazení těchto pacientů do skupin vyššího rizika [4,22]. Zvláštní podskupinou je T-ALL z velmi časných prekurzorů se špatnou prognózou, která bude podrobněji zmíněna ve 2. části dizertační práce.

BCP-ALL dělíme podle zralosti na následující imunofenotypicky definovaná stádia: tzv. proB-ALL (5% všech BCP-ALL, antigen CD10 negativní), cALL ("common ALL", 75% BCP-ALL, CD10 pozitivní) a preB-ALL (20% BCP-ALL, cytoplazmatický IgM pozitivní). Nejčastější cALL je asociována s věkem 2-6 let a hyperdiploidií (viz níže), a tedy s příznivou prognózou. Zcela opačná je situace u proB-ALL.

Genetické znaky leukemických buněk

Dětské ALL tvoří heterogenní skupinu zahrnující široké spektrum subtypů charakterizovaných odlišnými chromozomálními i submikroskopickými genetickými alteracemi. Význam genotypu ALL pro její prognózu je znám od 90. let 20. století. Získané genetické abnormality leukemických buněk se spolu s časnou odpovědí na léčbu staly nejdůležitějšími prognostickými faktory a umožňují také vysvětlit patogenezi onemocnění. V posledních pěti letech se do popředí dostávají nové metody schopné detekovat i submikroskopické léze minimálního rozsahu založené na profilování pomocí microarray:

komparativní genomová hybridizace a analýza jednonukleotidových polymorfismů (SNP microarray), sekvenování kandidátních genů a nejnověji sekvenování nové generace (sekvenování exomu, transkriptomu nebo celogenomové sekvenování). Díky klesající finanční náročnosti se tyto metody velmi pravděpodobně budou stále více prosazovat nejen při komplexním vyšetření genomu, ale mají potenciál podstatně změnit tvář diagnostiky (nejen) dětské ALL nahrazením některých, či dokonce většiny, doposud používaných diagnostických metod, jako je cytogenetika, identifikace fúzních genů a dalších charakteristických aberací a s drobnými výhradami i kvantifikace MRN.

Změny počtu chromozómů

Asi u tří čtvrtin dětí s ALL jsou přítomny změny počtu chromozómů (aneuploidie). Prognosticky významné aneuploidie zahrnují jednak zmnožení chromozómů v leukemické buňce na 51 a více - tzv. vysokou hyperdiploidii, spojenou s dobrou citlivostí k chemoterapii a výbornými léčebnými výsledky [54,55]. Příznivý prognostický vliv byl však potvrzen pouze u hyperdiploidní ALL se současnou trizomií chromozómů 4, 10 a 17 - tzv. "triple trisomy" [56,57]. Naopak méně časté nízké hypodiploidní (s počtem chromozómů 32 - 39) a zejména téměř haploidní (24 - 31 chromozómů) ALL mají prognózu nepříznivou [55,58,59] a jsou často asociovány s mutacemi aktivujícími signální dráhu Ras a s alteracemi členů rodiny transkripčních faktorů Ikaros (Holmfeldt et al., ASH Annual Meeting 2010).

Translokace chromozómů a fúzní geny

Další významnou skupinou genetických aberací jsou chromozomální translokace, přítomné téměř u třetiny ALL při absenci změn v počtu chromozómů. Pro účely této práce budou zmíněny pouze nejčastější a klinicky nejdůležitější aberace, které identifikují unikátní podskupiny pacientů (v pořadí podle frekvence výskytu).

I. ETV6/RUNX1 (TEL/AML1)

Fúzní transkript vzniklý translokací t(12;21)(p13;q22) kóduje transkripční faktor, který působí jako korepresor genů ovlivňovaných RUNX1 (AML1)[60]. ETV6/RUNX1-pozitivní leukémie je nejčastějším subtypem BCP-ALL a tvoří až 25% ALL u dětí. Je spojena s velmi dobrou prognózou [61,62] mj. díky zvýšené citlivosti k asparagináze [63] a dobrým výsledkům léčby relapsů, které se většinou vyskytují později než u ostatních ALL [64]. Analýzy Guthrieho kartiček a studie monozygotních dvojčat s ALL ukazují, že fúze ETV6/RUNX1 může vzniknout už prenatálně a dát vznik tzv. preleukemickému klonu [65],

pro jehož maligní transformaci jsou však nutné další zásahy, nejčastěji delece nepostižené alely genu ETV6. Pozdní relapsy ETV6/RUNX1-pozitivní ALL by tedy mohly představovat leukémie vzniklé de novo z původního premaligního ETV6/RUNX1-pozitivního klonu [66], což by mohlo vysvětlovat jejich dobré léčebné výsledky. Komplexnější analýza změny počtu kopií (copy number alterations, CNA) ale nepotvrdila pozdější nástup relapsů s charakteristikou odpovídající popsané situaci (tj. s kompletně odlišným spektrem CNA oproti diagnóze) [67].

Blasty ETV6/RUNX1-pozitivní ALL často nesou na svém povrchu myeloidní znaky a jsou rovněž charakteristické vyšším počtem přestaveb genů pro Ig/TCR [68].

II. BCR/ABL

Translokace t(9;22)(q34;q11) dává vznik fúznímu transkriptu BCR/ABL, který je zodpovědný za konstitutivní aktivaci tyrozinkinázy a následnou maligní transformaci buněk. Tato fúze je typická pro chronickou myeloidní leukémii (CML); u dětských ALL je vzácná (výskyt ve 3-5%), ale vede k velmi agresivnímu onemocnění se špatnou odpovědí na „klasickou“ léčbu [69]. Příznivý zvrat v léčbě BCR/ABL-pozitivní ALL přinesl objev specifického inhibitoru tyrozinkinázy BCR/ABL imatinib mesylátu (STI 571, Gleevec, Glivec), jehož přidání ke konvenční chemoterapii zlepšilo EFS pacientů ze 35% na 80% [70]. V současné době se testují tyrozinkinázové inhibitory 2. generace (dasatinib).

Analogicky CML v progresi nebo lymfoidní blastické krizi se u většiny BCR/ABL-pozitivní ALL vyskytují alterace (převážně delece) genu IKZF1 klíčového pro lymfoidní diferenciaci, jejichž důsledkem je ztráta funkce IKZF1 nebo dominantně-negativní efekt [71]. Tento jev je velmi významný pro prognózu ALL a potenciální vývoj cílené léčby.

Nedávné studie pomocí expresního profilování identifikovaly podskupinu ALL podobnou BCR/ABL-pozitivní ALL (tzv. BCR/ABL-like ALL) bez přítomnosti typické translokace, avšak s velmi podobnými charakteristikami ve smyslu aktivace tyrozinkináz, časté alterace IKZF1 a zvýšené exprese receptoru CRLF2. Důležité je, že BCR/ABL-like ALL má obdobně špatnou prognózu jako BCR/ABL-pozitivní ALL, ale je více než 3x častější [33,51,72]. Sekvenováním transkriptomu byly u všech vyšetřených případů BCR/ABL-like ALL identifikovány aberace v genech pro cytokinové receptory a regulátory kinázové signalizace [73]. Problematika IKZF1 bude podrobně popsána ve 3. části dizertační práce.

III. E2A/PBX (TCF3/PBX1)

Translokace t(1;19)(q23;q13) charakterizovaná preB imunofenotypem, se vyskytuje asi u 5-8% dětí. V dřívějších léčebných protokolech vedla ke špatné prognóze, při použití současné intenzivní léčby je EFS E2A/PBX-pozitivních ALL srovnatelné s ostatními BCP-ALL. Podle některých studií je v této podskupině dokonce nižší incidence hematologických relapsů, ale naopak zvýšené riziko izolovaného CNS relapsu [45,74].

IV. Přestavby genu MLL

Gen MLL (mixed lineage leukemia) na dlouhém raménku 11. chromozómu (11q23) kóduje DNA-vazebný protein významný pro metylaci histonů. Dosud bylo identifikováno již více než 60 translokačních partnerů genu MLL [75], nejčastějšími fúzními partnery jsou geny AF4, AF9 a ENL. Tyto translokace se vyskytují pouze asi u 6% dětských ALL, avšak jsou velmi časté u kojeneckých ALL (60-80%), zejména do 6 měsíců věku [76]. Jsou asociovány s nezralým proB fenotypem, vysokou leukocytózou při diagnóze, hepatosplenomegalií a infiltrací centrálního nervového systému [77]. Leukemické buňky s přestavbou MLL/AF4 často nesou na svém povrchu i v cytoplazmě znaky typické pro myeloidní krevní řadu a jsou in vitro citlivé na cytosin arabinosid používaný k léčbě AML [78], proto současná léčba kojenecké ALL používá chemoterapeutika cílená na lymfoidní i myeloidní řadu současně [38]. Prognóza dětí ale zůstává i na těchto protokolech špatná. Vysoce rizikové případy jsou indikovány k transplantaci kostní dřeně, další naději by mohl přinést inhibitor tyrozinkinázy FLT3 lestaurtinib [79].

ALL s přestavbou genu MLL mají specifický expresní profil jasně odlišný od ostatních typů leukémie [80], který je pravděpodobně způsoben hypermethylací genových promotorů [81,82]. Stupeň metylace koreluje s prognózou pacientů, což poukazuje na terapeutický potenciál cílené epigenetické léčby (např. inhibitorů DNA metyltransferázy a inhibitorů deacetyláz histonů). Nejnovější studie poukázala na prognostický význam exprese genů FLT3, IRX2 a TACC2 [83].

IV. Intrachromozomální amplifikace chromozómu 21 (iAMP21)

Tato aberace je spojena s mnohočetnou amplifikací genu RUNX1 a vyskytuje asi u 2% (většinou starších) dětí s BCP-ALL [84,85]. Je spojena s vysokým rizikem relapsu a špatnou prognózou [86,87], proto jsou v některých léčebných protokolech pacienti s iAMP21 řazeni do skupiny vysokého rizika.

Genetické alterace identifikované novými celogenomovými metodami

Genomy ALL mají typicky méně rozsáhlých strukturních aberací než solidní tumory, ale existuje více než 50 rekurentních lézí (nejčastěji fokálních delecí) zasahujících pouze malý počet genů často významných pro lymfoidní vývoj, diferenciaci (např. PAX5, IKZF1, EBF1, LEF1, VPREB) a signalizaci (BTLA, CD200, TOX), regulaci apoptózy (BTG1) a buněčného cyklu a tumor supresorové geny (CDKN2A (p16), CDKN2B (INK4/ARF), TP53, PTEN, RB1), geny pro transkripční faktory a regulátory (ERG, TBL1XR1, CREBBP) a receptory pro léčiva (NR3C1) [88-90]. Mezi nejčastější a nejvýznamnější patří alterace genu IKZF1, které se u BCR/ABL-negativní ALL vyskytují asi v 15% případů a jsou asociovány se zvýšenou expresí receptoru CRLF2 (způsobenou translokací IGH@-CRLF2 nebo P2RY8-CRLF2), s aktivačními mutacemi Janus kináz (JAK 1, 2, 3) a významně horší prognózou [51]. Přestože vyšetřování alterací IKZF1 by podle dostupných publikací bylo přínosné [33-35], do klinické praxe zatím nebylo zavedeno.

Genetické znaky leukémií z T-řady

T-ALL se vyskytuje převážně u starších dětí a adolescentů. Spektrum genetických aberací je zde odlišné než u BCP-ALL a jejich dopady na prognózu a terapeutické implikace nejsou zcela jednoznačné. Až expresním profilováním byly identifikovány následující onkogeny aktivující alterace typické pro T-ALL, odpovídající jednotlivým vývojovým stádiím T lymfocytů: HOX11L2, LYL1 plus LMO2, TAL1 plus LMO1/LMO2, TLX1 (HOX11) a MLL-ENL. Dobrou prognózu mají pacienti se zvýšenou expresí genu TLX1 nebo s translokací MLL/ENL, naopak zvýšená exprese HOX11L2 a aktivace LYL1 a TAL1 jsou spíše prognosticky nepříznivé [91,92]. Časté a potenciálně klinicky významné jsou aktivační mutace genu NOTCH-1 (regulátora normálního vývoje T lymfocytů) [93] a FBXW7 s příznivou prognózou a výskytem u více než 50% dětských T-ALL napříč uvedenými genetickými podskupinami. Mezi další alterace identifikované celogenomovými přístupy patří delece a mutace genu PTEN, delece RB1, duplikace MYB a fúze SET nebo ABL1 s NUP214 [88]. Translokace SIL/TAL1, typická pro T-ALL, bude zmíněna níže.

Komplexní karyotyp

je definován jako přítomnost tří nebo více chromozomálních aberací v genomu leukemických buněk pacienta. Vyskytuje se asi u čtvrtiny pacientů a jeho dopad na prognózu je negativní [94].

Vrozená vnímavost k onemocnění ALL

Celogenomový přístup dokonce dokázal identifikovat i znaky spojené s vrozenou predispozicí k ALL, např. polymorfismus genu IKZF1 a zejména polymorfismy ARID5B, genu důležitého pro embryonální vývoj, buněčnou diferenciaci a regulaci buněčné exprese, které jsou spojeny se zvýšeným rizikem hyperdiploidní ALL [95-97].

Farmakodynamika a farmakogenetika

Jedním z nejdůležitějších trendů v léčbě dětské ALL je individualizace terapie, zejména co do její intenzity. Dosud je založena především na stanovení vlastností a agresivity leukemických buněk, pro výsledek léčby jsou však významné i charakteristiky samotného organismu pacienta, zejména věk (viz výše) a genetické polymorfismy ovlivňující funkci enzymů metabolizujících chemoterapeutika, transportérů a receptorů. Znalosti o těchto polymorfismech a jejich dopadu na výsledek léčby se postupně promítají do klinické praxe.

Klinicky významné jsou zejména následující polymorfismy:

- 1) inaktivační polymorfismy thiopurin metyltransferázy (TPMT), který katalyzuje mj. inaktivaci 6-merkaptopurinu, jsou spojeny s vyšším rizikem toxických účinků (mírná toxicita u heterozygotů, závažná myelosuprese u TPMT-deficientních homozygotů) i sekundárních malignit. Jejich detekce je založena na analýze jednonukleotidových polymorfismů (SNP) [98]. V rámci protokolu AIEOP-BFM ALL 2009, jehož je Česká republika členem, se provádí vyšetření centrálně v Kielu a existují mezinárodně platné pokyny pro modifikaci léčby u rizikových pacientů.
- 2) deficit glutathion S-transferázy (GSTM1), důležitého enzymu eliminujícího řadu cytostatik používaných v léčbě ALL (např. alkylační látky), také vede k vyšší toxicitě, ale paradoxně i k lepším léčebným výsledkům, pravděpodobně díky zvýšení hladiny chemoterapeutik [99].
- 3) tymidylát syntáza (TS) hraje roli v syntéze a reparaci DNA a je inhibována některými cytostatiky, zejména metotrexátem a fluorouracilem. Polymorfismy způsobující její zvýšenou expresi jsou asociovány s vyšším rizikem relapsu, které by se pravděpodobně dalo eliminovat podáním vyšších dávek metotrexátu [100].
- 4) polymorfismy v promotoru dihydrofolát reduktázy (DHFR), jejímž je metotrexát kompetitivním inhibitorem, vedou k horší prognóze ALL pravděpodobně prostřednictvím zvýšení exprese DHFR a následně syntézy tetrahydrofolátu [101].

5) metylentetrahydrofolát reduktáza (MTHFR) je další klíčový enzym v metabolismu folátů a umožňuje remetylaci homocysteinu na methionin. Pacienti se sníženou aktivitou MTHFR jsou náchylnější k toxicitě metotrexátu.

Mnohé z uvedených polymorfismů ovlivňují nejen samotnou odpověď na léčbu ALL, ale i náchylnost ke vzniku tohoto onemocnění [102,103].

Minimální reziduální nemoc – definice, způsoby vyšetření a klinický význam

Minimální reziduální nemoc (MRN) se během uplynulého desetiletí stala jedním z rozhodujících stratifikačních kritérií v léčebných protokolech nejen pro dětskou ALL, ale i celou řadu dalších, nejen hematologických, malignit dětí i dospělých. Jedná se o tzv. subklinickou úroveň leukémie, kdy se v průběhu terapie pacient nachází v kompletní hematologické remisi, zastoupení maligních buněk v kostní dřeni je nižší než 5% a nelze je již detekovat běžnými cytologickými metodami. Vyšetřením MRN je tedy možné mnohem přesněji určit infiltraci jednotlivých kompartmentů v organismu - nejčastěji kostní dřeň, ale i periferní krve, mozkomíšního moku nebo tkání (např. varlat) - leukemickými blasty.

Vyšetřování MRN se začalo prosazovat do klinické praxe od 90. let 20. století, zejména díky rozvoji nových diagnostických metod v oblasti molekulární genetiky a průtokové cytometrie [19,20], které dosahují citlivosti až 10^{-4} , tj. umožňují detekci 1 maligní buňky mezi 10^4 normálních buněk. Zmíníme tři základní způsoby detekce MRN používané u dětské ALL.

Nejlépe standardizovanou technikou pro sledování MRN je detekce a kvantifikace klonálně-specifických přestaveb genů pro imunoglobuliny a receptory T-buněk (Ig/TCR) pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (RQ-PCR) [23-25], která je jako v současnosti jako jediná mezinárodně standardizovaná metoda univerzálně použitelná pro většinu pacientů s malignitami z lymfoidní řady. Je však náročná metodicky, časově i finančně a i při dodržení všech pravidel pro interpretaci výsledků přináší nebezpečí falešné positivity u vzorků s regenerací kostní dřene [104].

Druhou mezinárodně rozšířenou metodou je průtoková cytometrie, metoda založená na průchodu buněk laserovým paprskem a excitaci fluorescenčně značených monoklonálních protilátek proti povrchovým nebo cytoplazmatickým antigenům buňky. Detekujeme tzv. imunofenotyp asociovaný s leukémií (LAIP) na základě znaků, které jsou exprimovány odchylně od očekávané vývojové linie nebo vývojového stádia buněk [105,106]. Pro klinické rozhodování je velkou předností průtokové cytometrie její rychlost a nižší cena, nevýhodami naopak možnost ztráty či změny exprese sledovaných znaků během vývoje leukemického

klonu a obtížné odlišení některých typů blastů od fyziologických prekurzorů B řady. Technické pokroky v metodice (zejména umožnění detekce osmi i více fluorochromů současně) a identifikace nových markerů [107] pomáhají tyto problémy překonat a pokračuje rovněž standardizace metodiky v rámci mezinárodní skupiny EuroFlow [108].

Další možnost pro monitorování MRN poskytují fúzní geny (viz výše), které je možné detekovat přímo na úrovni DNA (translokace SIL/TAL1 u T-ALL) nebo častěji na úrovni genové exprese kvantifikací RNA transkriptu pomocí reverzně-transkriptázové RQ-PCR (RQ-RT-PCR) a normalizací výsledku k expresi kontrolního genu [109,110]. Zatímco průtoková cytometrie i detekce přestaveb genů pro Ig/TCR jsou při detekci MRN úspěšné až v 95% případech, chromozomální translokace vhodné jako cíl pro sledování MRN se vyskytují u méně než 50% dětí s ALL [111]; s objevováním nových fúzních genů však bude tento podíl i nadále stoupat.

Důležitou otázkou je korelace výsledků MRN získaných odlišnými metodami: fúzní gen TEL/AML1 je vedle přestaveb Ig/TCR dobrým alternativním cílem pro sledování MRN [112], u pacientů s translokacemi BCR/ABL [113] a genu MLL je kvantifikace exprese fúzního genu metodou první volby pro stanovení MRN.

Kvantifikace přestaveb genů pro Ig/TCR a průtoková cytometrie nejsou pro účely měření MRN v jednotlivých časových bodech zaměnitelné, v dosud největší provedené studii byla korelace výsledků těchto metod slabá zejména ve 33. dni léčby (tj. v jednom z časových bodů klíčových pro rizikovou stratifikaci) a u vzorků s nižší MRN [114]. Velmi výhodné pro řízení terapie pacientů v současných i budoucích léčebných protokolech by mělo být komplementární zapojení obou metod.

Zásadní studie provedená v roce 1998 metodou kvantifikace přestaveb Ig/TCR zjistila velmi silný prognostický význam MRN zejména na konci indukční léčby (33. den léčebného protokolu) a před začátkem konsolidační léčby (12. týden protokolu): pacienti s negativní MRN v těchto časových bodech měli velmi nízké riziko relapsu [20]. Podobné výsledky přinesla i průtoková cytometrie [19]. Od té doby byl důležitý prognostický vliv MRN shodně potvrzován mnoha studiemi v rámci různých typů léčebných protokolů po celém světě [9,115-120] a dokonce převážil význam celé řady dalších znaků dříve používaných pro rizikovou stratifikaci, např. věku, počtu leukocytů při diagnóze, odpovědi na prednison a genotypu [5]. Některé práce se zaměřily i na hodnocení vlivu MRN v časnější fázi indukční terapie, tj. v 15. dni léčby, pomocí RQ-PCR [121,122] nebo průtokové cytometrie [123-125]. Vyšetření MRN hraje důležitou roli také v léčbě dětí s relapsem ALL, při indikaci transplantace hematopoetických kmenových buněk a v před- a potransplantační péči [126,127].

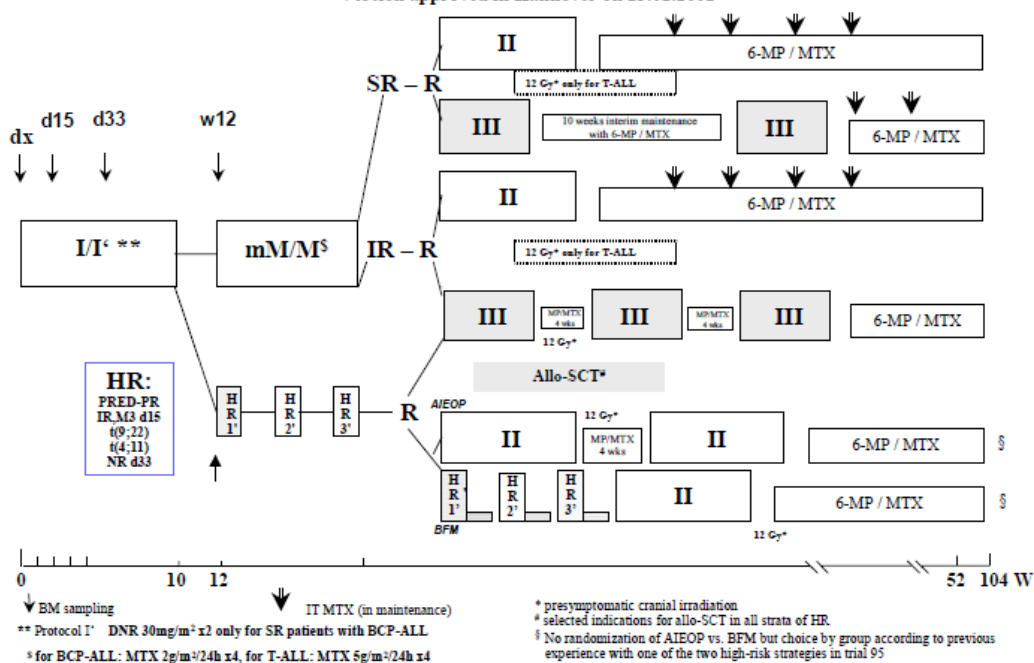
Moderní diagnostika a léčba ALL u dětí v České republice

Naše pracoviště provádí centrální vyšetření vzorků všech dětí léčených pro ALL v České republice včetně morfologie, imunofenotypu, fúzních genů a sledování MRN všemi zmíněnými metodami.

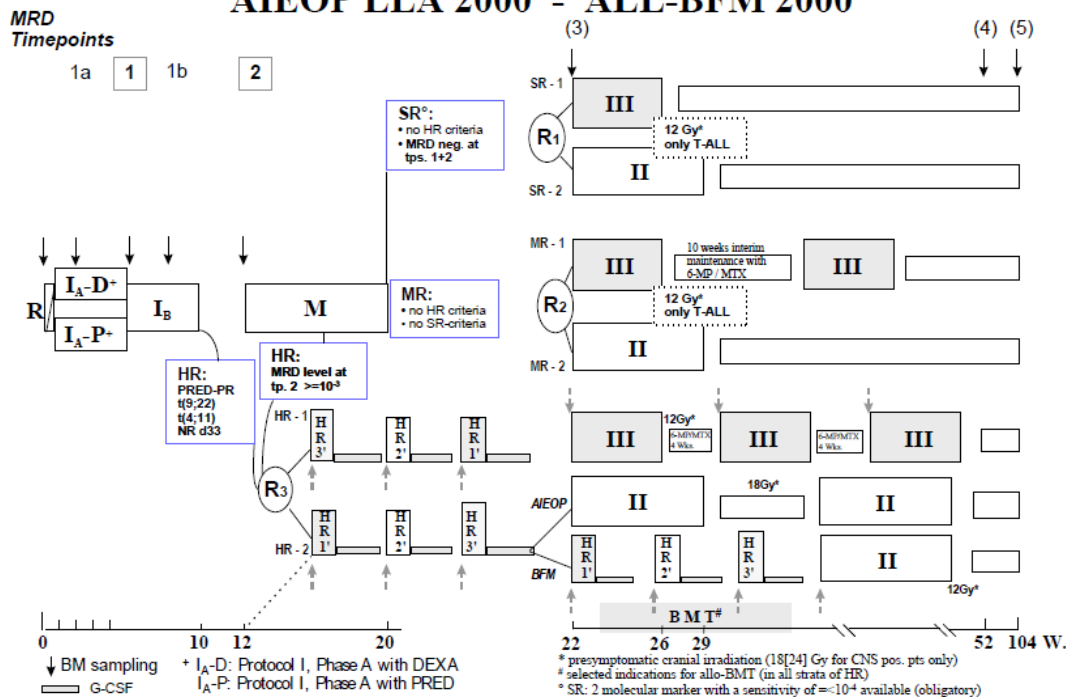
V letech 2002-2007 byly děti s ALL v ČR léčeny podle protokolu ALL IC-BFM 2002, používaného celkem 14 zeměmi světa, jehož riziková stratifikace nebyla založena na kvantifikaci MRN kvůli technické a finanční náročnosti metody, pokusila se však o co nejpřesnější zařazení pacientů pomocí „klasických“ rizikových faktorů (věk, leukocytóza při diagnóze, přítomnost translokací BCR/ABL a MLL/AF4) i zohlednění časně léčebné odpovědi ve formě morfologie kostní dřeně, odpovědi na prednison a dosažení hematologické remise na konci indukční terapie. Léčebné schéma protokolu ALL IC-BFM 2002 bylo velmi podobné protokolu AIEOP LLA-2000/ALL-BFM 2000 používaného paralelně v nejnávštěvnějších zemích (viz obr. 1). Studie provedená naší skupinou prokázala, že zařazení pacientů do rizikových skupin v rámci těchto dvou analogických protokolů typu BFM (zkratka podle center stojících u zrodu léčby dětské ALL – Berlin, Frankfurt, Münster) se překrývá pouze částečně [26] a že měření MRN je nepostradatelné pro identifikaci pacientů s velmi nízkým rizikem relapsu.

ALL IC-BFM 2002 : TREATMENT

Version approved in Hannover on 23.02.2002



AIEOP LLA 2000 - ALL-BFM 2000



Obrázek 1: Léčebné schéma protokolů ALL IC-BFM 2002 a AIEOP LLA-2000/ALL-BFM 2000. MRD – minimální reziduální nemoc; timepoints – časové body; R – randomizace; SR, MR, HR – nízké, střední a vysoké riziko; BM sampling – odběr kostní dřeně; SCT, BMT – transplantace kmenových buněk krvetvorby; I, M, II, III, HR1', 2', 3' – bloky chemoterapie

Díky preciznímu zavedení kvantifikace MRN přistoupila Česká republika jako jediná ze zemí bývalého východního bloku od roku 2010 k nejmodernějšímu protokolu AIEOP-BFM ALL 2009, jehož riziková stratifikace je založena mj. na kombinaci hodnot MRN v kostní dřeni měřených v 15. dni léčby pomocí průtokové cytometrie a ve 33. dni a 12. týdnu léčby pomocí RQ-PCR.

MRN se u dětské ALL standardně měří v kostní dřeni a nikoli v periferní krvi, a to zejména na základě výsledků předchozích prací, které zjistily dobrou korelaci hladin MRN v kostní dřeni a krvi u T-ALL, ale pouze slabou korelaci u BCP-ALL s významně nižší MRN v periferní krvi [128,129]. Tyto studie však obsahovaly pouze malý počet vzorků z rozhodující časně (indukční) fáze léčby s pozitivní MRN v obou uvedených kompartmentech. O prognostickém vlivu MRN v periferní krvi bylo publikováno překvapivě málo, přestože nahrazení odběrů kostní dřene pouhým vyšetřením periferní krve by bylo mnohem méně zatěžující pro dětské pacienty a snazší pro ošetřující personál. Pouze Brisco et al. detekovali měřitelnou MRN v periferní krvi s poměrně velkým časovým odstupem před dřevnými relapsy ALL [130] a Coustan-Smith et al. zjistili, že pozitivita MRN v krvi i kostní dřeni na konci indukční léčby znamená výrazně horší prognózu než přítomnost MRN pouze v kostní dřeni [128]; počet pacientů vyšetřených v těchto studiích byl ale opět velmi nízký.

V naší práci jsme se tedy zaměřili na sledování hladin MRN v periferní krvi u dětí s BCP-ALL i T-ALL a jejich porovnání s MRN v kostní dřeni v klíčových časových bodech v průběhu celé léčby, avšak zejména se zřetelem na velmi časnou fázi léčby s MRN pozitivní v obou kompartmentech. Pokusili jsme se zjistit, zda a ve kterých časových bodech by bylo možné nahradit pro účely vyšetření MRN kostní dřev periferní krví a zda má hladina MRN v periferní krvi prognostický význam, tak, aby získané poznatky mohly být v ideálním případě využity v mezinárodním měřítku v klinické praxi ke zpřesnění stávající diagnostiky a rizikové stratifikace.

Cíle I.

- 1. vyšetřit klonální přestavby genů pro Ig/TCR v kostní dřeni a periferní krvi pacientů s ALL léčených v České republice podle protokolu ALL-IC BFM 2002**
- 2. navrhnout specifické primery na základě přechodových V-(D)-J oblastí imunoreceptorových genů a optimalizovat alespoň jeden klonálně-specifický RQ-PCR systém s minimální citlivostí 10^{-4} pro každého pacienta**
- 3. stanovit MRN v kostní dřeni a v periferní krvi pomocí těchto RQ-PCR systémů v následujících časových bodech léčby: diagnóza, 8., 15. a 33. den léčby, 12. týden léčby, před zahájením udržovací terapie a po ukončení léčby**
- 4. porovnat zjištěné hladiny MRN v kostní dřeni a v periferní krvi u BCP-ALL i T-ALL**
- 5. vyhodnotit vztah MRN v periferní krvi k ostatním klinicky významným znakům a stratifikačním kritériím protokolů ALL-IC BFM 2002 a ALL-BFM 2000**
- 6. stanovit vliv MRN v periferní krvi na prognózu dětí s ALL a formulovat doporučení pro klinickou praxi**

Metodika I.

Stanovení MRN pomocí kvantifikace klonálně-specifických přestaveb genů pro Ig/TCR

Metodika využívá unikátního mechanismu přeskupování genových segmentů V ("variabilita"), D ("diverzita") a J ("joining") kódujících variabilní části řetězců antigenně-specifických receptorů - těžkých i lehkých řetězců imunoglobulinů (IgH, IgL) u B lymfocytů a T-buněčných receptorů (TCR) u T lymfocytů. Tento proces, který dává vznik jedinečné sekvenci DNA charakteristické pro každý lymfocyt, a tedy i celý lymfocytární klon, hraje klíčovou roli ve fungování imunitního systému a zajišťuje jeho schopnost reagovat na co nejširší spektrum antigenů a antigenních epitopů. Při onemocnění ALL tedy mají buňky vzniklé maligní transformací jednoho lymfocytárního prekursoru identické sekvence přeskupených genů pro Ig/TCR charakteristické a vysoce specifické pro daný leukemický klon, čehož lze využít k jeho sledování [131]. Samotný proces V-(D)-J rekombinace je podrobně popsán v mnoha publikacích [132,133] a učebnicích imunologie. Je založen na náhodném vyšťepování určitého počtu genových segmentů z DNA sekvence koordinovanou aktivitou řady enzymů, zejména tzv. rekombináz (recombination activating genes, RAG 1, RAG 2) a následném spojování zbylých úseků DNA terminální deoxynukleotidyl transferázou (TdT), která mezi úseky náhodně vkládá krátké sekvence, tzv. N-nukleotidy. U IgH V-D-J rekombinace začíná přeskupením segmentu D k J a je následována připojením V k D-J. Tento proces může probíhat i opakovaně.

Sledování MRN pomocí detekce přestaveb genů pro Ig/TCR zahrnuje následující kroky:

1. Izolaci mononukleárních buněk
2. Izolaci DNA
3. Screening a stanovení klonality přestaveb Ig/TCR
4. Navržení specifických primerů na základě přechodové sekvence
5. Optimalizaci pacient-specifické RQ-PCR
6. Stanovení MRN a interpretaci výsledků

Ad 1) Mononukleární buňky (lymfocyty a monocyty) jsou separovány centrifugací ze vzorků kostní dřeně a periferní krve pomocí hustotního gradientu (Ficoll-Paque Research Grade, PharmaTech) podle návodu výrobce. Pelety o 10 milionech buněk zamrazujeme v -80°C.

Ad 2) Izolaci DNA provádíme pomocí QIAampDNA Mini Kitu (QIAGEN GmbH, Hilden, SRN) podle návodu výrobce a DNA skladujeme při -20°C.

Ad 3) Pro vyhledávání přestaveb Ig/TCR genů v diagnostických vzorcích pacientů s ALL provádíme řadu PCR reakcí s následujícími kombinacemi primerů [23]:

U BCP-ALL:

Kompletní IgH: VH1/7–JHcons; VH2–JHcons; VH3–JHcons; VH4/6–JHcons; VH5–JHcons

Nekompletní IgH: DH1-6-JHcons; DH7-JHcons

Igκ: VkI-KDE; VkII-KDE; VkIII-KDE; VkIV-KDE; Intron-KDE

TCRδ: Dd2-Dd3; Vd2-Dd3; Vd2-Ja29

TCRγ: 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

U T-ALL:

Nekompletní IgH: DH1-6-JHcons; DH7-JHcons

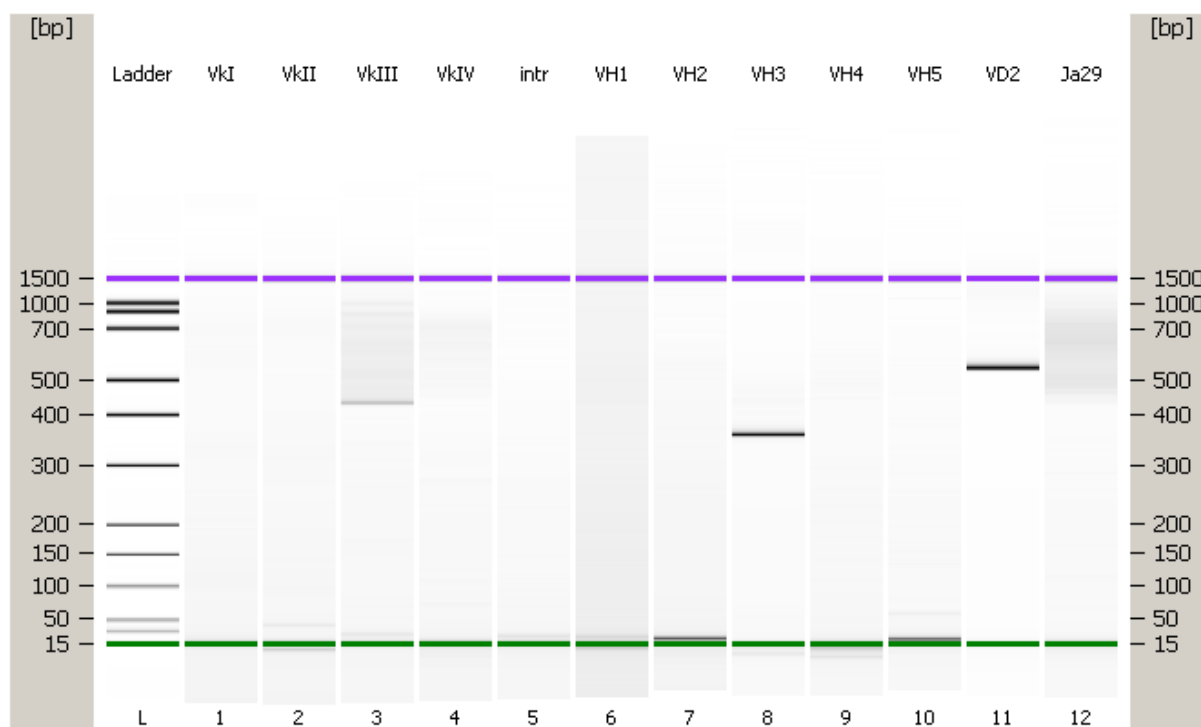
TCRδ: Dd2-Dd3; Dd2-Jd1; Vd2-Dd3; Vd1-Jd1; Vd2-Jd1; Vd3-Jd1

TCRγ: 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

TCRβ: 3x multiplexní směs primerů podle BIOMED II [24]

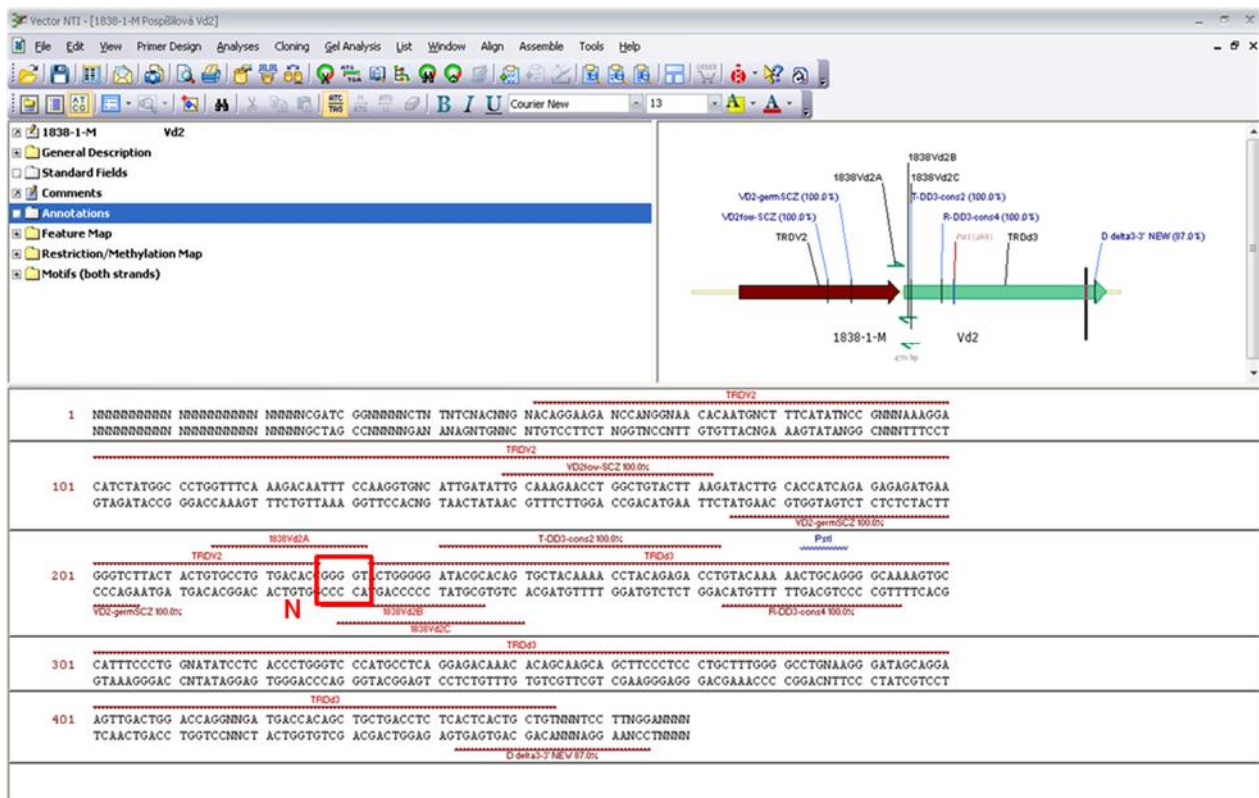
SIL/TAL1: Sildb-5'-Tal1db1-3'; Sildb-5'-Tal1db2-3'

Analýza klonality umožňuje odlišit monoklonální produkty PCR typické pro leukemické buňky od bi- a oligoklonálních a od polyklonálního pozadí nemaligních lymfocytů [134]. Původně jsme používali metodu analýzy heteroduplexů na polyakrylamidovém gelu, která je založena na denaturaci a rychlé renaturaci produktů PCR a následné detekci tzv. homoduplexů (v případě monoklonality) nebo heteroduplexů. V současnosti získané produkty PCR analyzujeme pomocí přístroje 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s použitím kitu DNA Series II Kit (DNA 1000 Assay) a Agilent 2100 Expert Software [135,136]. Produkty s prokázanou monoklonalitou (jednoduchý signál - „peak“ - ve správné velikosti, obr. 2) přeneseme do místnosti pro práci s produkty PCR a následně přečistíme pomocí kitu MiniElute PCR Purification Kit (QIAGEN) podle návodu výrobce.



Obrázek 2: Výsledek analýzy PCR produktů z diagnostického vzorku pacientky s ALL na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer. K sekvenaci byly vybrány monoklonální přestavby VκIII-KDE, VH3-JHcons a Vd2-Dd3.

Ad 4) Přečištěné produkty sekvenujeme na přístroji ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, USA). Vyhodnocování sekvencí Ig/TCR provádíme pomocí programu VECTOR NTI 8 Suite Software (INFORMAX, Bethesda, MD, USA). Sekvence porovnáváme s databázemi volně přístupnými na internetu: IMGT (<http://imgt.cines.fr/textes/vquest>), NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) a IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>), vyhledáme a označíme přechodové V-(D)-J oblasti a navrhujeme specifické primery (allele-specific oligonucleotide, ASO) tak, aby minimálně 4-5 nukleotidů v 3' oblasti zasahovalo do specifického N-segmentu přestavby (obr. 3). Reverzní primery a fluorescenčně značené sondy používáme společně pro daný segment. ASO primery by měly mít teplotu tání (T_m) podobnou jako reverzní primery (cca 55°C) a asi o 10°C nižší než sondy a neměly by tvořit sekundární struktury.



Obrázek 3: Sekvence přestavby Vd2-Dd3 vyhodnocená v programu Vector NTI. N označuje nukleotidy vložené terminální deoxynukleotidyltransferázou (TdT), specifické pro daný leukemický klon. 1838Vd2A, B, C jsou navržené ASO primery.

Ad 5) Při optimalizaci systému pro RQ-PCR se pomocí změn teploty pro tzv. nasednutí primeru (annealing), poměru koncentrace primerů a případně změn koncentrace iontů hořčičku snažíme dosáhnout co největší senzitivity a specifity daného systému. Je výhodné vyzkoušet pro každý systém minimálně dva primery, protože rozdíly dosažené v senzitivě a specifitě RQ-PCR bývají velké. Pokud zkusíme při optimalizaci více primerů, vybereme ten, který poskytuje nejlepší senzitivitu (minimálně 10^{-4}) a specifitu, a dále systém optimalizujeme jen s tímto vybraným primerem.

Velkým problémem v případě genů pro imunoreceptory je pozadí zdravých lymfocytů (viz níže) - až v polovině případů může dojít k nespecifickému nasedání primerů na DNA těchto zdravých lymfocytů. Aby se v co největší míře zabránilo možnosti vzniku falešně pozitivního výsledku, používá se jako negativní kontrola směs DNA z periferní krve od nejméně 6 zdravých dárců (tzv. buffy coat, BC).

Z důvodu variací v kvalitě DNA je třeba stanovit koncentraci DNA diagnostického i všech sledovaných vzorků pomocí kvantifikace kontrolního genu. V naší laboratoři používáme k tomuto účelu gen pro albumin.

Sekvence reverzních primerů a sond byly publikovány skupinou European Study Group on Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia (ESG-MRD-ALL, nově EuroMRD) [137-141].

Ad 6) Přestavby genů pro Ig/TCR nejsou onkogenní, jsou pouze znakem, který může být obsažen i v podobných sekvencích fyziologických lymfocytů ve vzorku. Z toho plyne hlavní úskalí této metody, tedy možnost falešné positivity vyšetření. Interpretace výsledků je komplexní a vyžaduje značnou zkušenost, v nejobtížnějších případech by mohlo dojít k neshodám i mezi zavedenými laboratořemi. Proto byla v roce 2001 založena mezinárodní skupina ESG-MRD-ALL sdružující v současné době 43 laboratoří z 18 zemí světa, která vydala přesná a detailní pravidla pro interpretaci výsledků [25]. ESG-MRD-ALL organizuje pravidelná pracovní setkání svých členů a odpovídá za kontrolu kvality celého procesu, která probíhá 2x ročně. Přesto se v některých případech i při dodržení všech pravidel nelze vyhnout falešné pozitivitě [104]. Definitivním řešením tohoto problému bude zřejmě až převedení metodiky na tzv. sekvenování nové generace.

Stanovení MRN pomocí průtokové cytometrie

Pomocí mnohobarevné průtokové cytometrie vyšetřujeme MRN v kostní dřeni a v periferní krvi v 8. a 15. dni léčby. Od 1.12.2010 se vyšetřování MRN v kostní dřeni v 15. dni léčby stalo mandatorní součástí nového léčebného protokolu AIEOP-BFM ALL 2009.

Naše laboratoř je zapojena do mezinárodní studie EuroFlow, která má za úkol pomocí 8-barevné průtokové cytometrie standardizovat diagnostiku hematologických malignit.

Princip průtokové cytometrie byl ve stručnosti popsán na str. 17.

Příprava vzorku pro průtokovou cytometrii zahrnuje fixaci a permeabilizaci buněk, inkubaci s monoklonálními protilátkami značenými fluorochromy (např. FITC, fluorescein isothiocyánát; PE, fykoerytrin; PerCP, peridinin-chlorofyl-protein komplex; APC, allofykocyanin) a lýzu erytrocytů; intracelulární značení bylo provedeno pomocí Fix & Perm Kitu (An Der Grub Bioresearch, Kaumberg, Rakousko).

Imunofenotypizace je prováděna standardním panelem monoklonálních protilátek - detekujeme následující kombinace monoklonálních protilátek rozvržené do tří zkumavek [142]:

Zkumavka 1: CD58-FITC (klon AICD58)/xxPE/CD10-ECD (klon ALB1; xx=aberrantně exprimovaný antigen)/CD45 PerCP (klon 2D1)/CD19-APC (klon J4.119)/CD34-PC7 (klon LIQ)/CD38-A700 (klon HIT2)/CD20-PB (klon 2H7). Jako znak xxPE používáme CD66c, CD33 nebo NG2 (podle exprese při diagnóze) - tyto aberrantně exprimované antigeny mohou pomoci lépe identifikovat reziduální leukemickou populaci.

Zkumavka 2: CD20-FITC (klon 2H7)/CD10-PE (klon SS2/36)/CD45 PerCP (klon 2D1)/CD34-PC7 (klon LIQ)/CD19-APC (klon J4.119)/ CD38-A700 (klon HIT2)/Syto 41.

Zkumavka 3: Syto16/CD19-PE (klon SJ25C)/CD45 PerCP (klon 2D1)/CD71-A700 (MEM-75)/DAPI.

Měření provádíme na dvou průtokových cytometrech: DAKO CYAN, který je vybaven 3 lasery o vlnové délce 405 nm, 488 nm a 642 nm, a BD LSR II, který je vybaven lasery o vlnové délce 405 nm, 488 nm a 633 nm. Analýzu provádíme v software FlowJo 9.2 (TreeStar, Oregon, USA). Prvním krokem je výběr CD19 pozitivních buněk s nižší hodnotou granularity (parametr side scatter – SSC) než mají granulocyty. V případě nízké exprese antigenu CD19 vybíráme buňky pomocí parametru CD19 a CD10 nebo CD34 nebo CD45. V další fázi vybíráme atypické buňky na jednotlivých dvourozměrných grafech s cílem optimálně oddělit populaci nemaligních B lymfocytů a atypických blastů. Suspektní leukemické buňky by měly tvořit kompaktní populaci v rámci optických parametrů forward scatter (FSC) a SSC. Konečná hodnota MRN je vyjádřena procentem z jaderných buněk definovaných pomocí fluorescenční značky (SYTO-16 nebo SYTO-41 - molekuly schopné vázat DNA i RNA a volně procházet buněčnou membránou). Pro přepočítání na jaderné buňky v rámci dvou zkumavek se použije parametr obsažený v obou zkumavkách, zde antigen CD19.

Přítomnost aneuploidních buněk ve vzorku hodnotíme pomocí tzv. DNA indexu, který je definován jako poměr fluorescence vyšetřovaných buněk a normálních buněk periferní krve v G0/G1 fázi buněčného cyklu [143]. DNA index stanovujeme při diagnóze pomocí CycleTestPlus DNA Reagent Kitu (BD, San José, CA, USA) podle návodu výrobce a za hyperdiploidní považujeme vzorky s DNA indexem v rozmezí 1,16 až 1,6 včetně.

Statistická analýza

Statistické analýzy byly provedeny pomocí software StatView verze 5.0 (StatView® Software, Cary, NC) nebo Statistica (Statsoft, Tulsa, USA). Rozdělení proměnných mezi jednotlivými skupinami bylo analyzováno s využitím Fisherova exaktního testu. Mann-Whitneyův test byl použit k odhadu významnosti rozdílů týkajících se kontinuálních hodnot. Korelace mezi hladinami MRN v párových vzorcích kostní dřeně a periferní krve byla hodnocena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Přežití bez relapsu bylo znázorněno a analyzováno s použitím Kaplan-Meierovy analýzy přežití. Multivariantní analýza byla provedena pomocí Coxovy regrese.

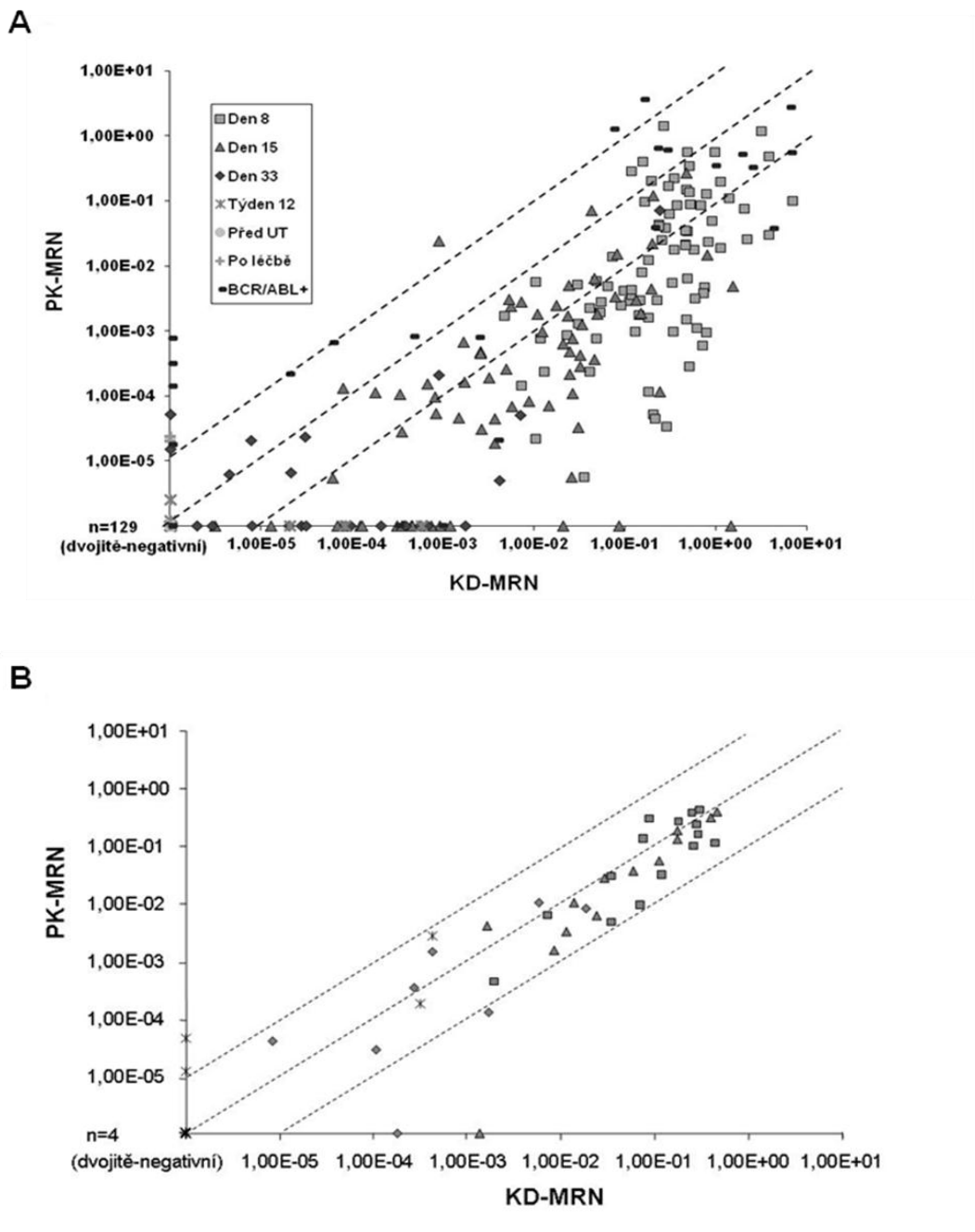
Výsledky I.

Hladiny minimální reziduální nemoci v kostní dřeni a periferní krvi u BCP-ALL spolu (na rozdíl od T-ALL) nekoreluji

Vyšetřili jsme vzorky z průběhu léčby 114 dětí s ALL (95 BCP-ALL a 19 T-ALL) ve věku 1-18 let. Pacienti byli léčeni v letech 2002 - 2007 podle protokolu ALL IC-BFM 2002 v těchto centrech Pracovní skupiny pro dětskou hematologii (PSDH): Praha, Brno, Ostrava, Olomouc, Plzeň, České Budějovice, Ústí nad Labem a Hradec Králové. Ze 114 pacientů bylo 45 zařazeno do skupiny standardního rizika (SRG), 57 do skupiny středního rizika (IRG) a 12 do vysoce rizikové skupiny (HRG). Studijní kohorta určená dostupností alespoň dvou párů vzorků kostní dřene a periferní krve z průběhu léčby se výrazně nelišila od celé kohorty (131 pacientů) diagnostikované ve sledovaném období, pokud jde o pohlaví, věk, počet leukocytů v době diagnózy, imunofenotyp, přítomnost TEL/AML1 fúze, hyperdiploidii nebo přežití bez relapsu. Celkem jsme vyšetřili 461 párů simultánních vzorků kostní dřene a periferní krve (398 vzorků BCP-ALL, 63 vzorků T-ALL) odebraných v následujících časových bodech: diagnóza, den 8, den 15, den 33, týden 12, před udržovací léčbou a při ukončení léčby. Medián doby sledování studované skupiny byl 6,3 roku.

Podobně jako v předchozích studiích uvedených výše [128,129] byla v časných bodech léčby BCP-ALL korelace hladin MRN v krvi s hodnotami v kostní dřeni nedostatečná. Ze 398 vyšetřených párů vzorků byla MRN u 118 párů negativní v obou vyšetřených kompartmentech, u 240 párů pozitivní v obou kompartmentech, u 34 párů detekovatelná pouze v kostní dřeni a u 6 párů pouze v periferní krvi. Hladina MRN v periferní krvi u pacientů s BCP-ALL výrazně kolísala a byla v průměru 5397x nižší než v kostní dřeni (0,04-8293x). U 148 (53%) párů vzorků se hodnota MRN mezi krví a kostní dřeni lišila více než o 1 řád (obr. 4A). U 34 vzorků negativních v periferní krvi byla MRN v kostní dřeni pozitivní s mediánem $2,2E^{-4}$, zatímco hladiny MRN u všech pacientů pozitivních pouze v periferní krvi byly velmi nízké (pod 10^{-4}) a nenalezli jsme žádný jiný znak společný těmto pacientům.

Naopak u T-ALL jsme prokázali velmi dobrou korelaci mezi MRN v kostní dřeni a periferní krvi s rozdílem více než 1 řádu pouze u 6 ze 63 pozitivních párů vzorků (9,5%) (obr. 4B).



Obrázek 4: Srovnání hladin MRN v kostní dřeni (KD, osa x) a v periferní krvi (PK, osa y) u pacientů s BCP-ALL (A) a pacientů s T-ALL (B). UT - udržovací terapie

Vztah postižení periferní krve k dalším rizikovým faktorům

U BCP-ALL korelovalo vyšší postižení periferní krve měřené RQ-PCR při diagnóze s počtem leukocytů při diagnóze (arbitrární hranice: 20000 leukocytů/ μ l, $p=0,003$) a s přítomností splenomegalie ($p=0,0004$) a hepatomegalie ($p=0,05$). Děti starší 10 let měly vyšší MRN v krvi

v 8. i 15. dni léčby než mladší děti ($p=0,001$ a $p=0,003$). Nízká hladina MRN v krvi (stejně jako v kostní dřeni) v 15. dni léčby byla prediktivní pro dosažení negativity MRN v kostní dřeni v klíčovém stratifikačním bodě - dni 33 ($p=0,02$). U pacientů s hyperdiploidií jsme pozorovali tendenci k nižší MRN v krvi než u ostatních pacientů s ALL (s výjimkou TEL/AML1 pozitivních; $p=0,06$). Hladiny MRN v krvi u pacientů s cALL a pacientů s preB-ALL byly srovnatelné, zatímco u pacientů s proB-ALL spíše vyšší, avšak statistická analýza byla limitována nízkým počtem pacientů s proB-ALL. V žádném časovém bodě nebyla zjištěna asociace MRN v krvi s pohlavím ani s přítomností delece genu Ikaros (IKZF1). Dynamika hladin MRN v krvi se signifikantně nelišila mezi pacienty zařazenými do skupiny SRG a pacienty zařazenými do skupiny IRG v rámci protokolu ALL IC-BFM 2002.

V průběžné analýze se zdálo, že pacienti, kteří mají vysoké postižení periferní krve v poměru k infiltraci kostní dřene (tj. v 15. dni léčby MRN v krvi vyšší nebo o méně než jeden řád nižší než v kostní dřeni), mají horší prognózu a častěji alterovaný gen Ikaros (IKZF1). Po vyšetření většího počtu pacientů ale tento vztah přestal být signifikantní. Zároveň jsme nenalezli žádný běžně sledovaný znak, který by se v této skupině pacientů vyskytoval častěji (leukocytóza, imunofenotyp, fúzní geny, aberantní exprese antigenů apod.). Pozorovali jsme ale zvláštní chování subtypu leukémie s tzv. liniovým přesmykem ve smyslu vyššího postižení periferní krve (viz 2. část dizertační práce).

Minimální reziduální nemoc v periferní krvi v 15. dni léčby má u dětí s ALL důležitý prognostický význam

Protože počet T-ALL pacientů byl příliš nízký pro samostatnou statistickou analýzu, hodnotili jsme pouze skupinu BCP-ALL. Žádný ze 35 pacientů s MRN v krvi v 15. dni léčby nižší než 10^{-4} (MRN_{PK}^{low}) neprodělal relaps oproti 13 ze 43 pacientů s MRN vyšší než 10^{-4} v tomto časovém bodě (MRN_{PK}^{high}). Pětileté přežití bez relapsu (RFS, relapse-free survival) bylo tedy 100% pro skupinu MRN_{PK}^{low} a $64\pm 7\%$ pro skupinu MRN_{PK}^{high} ($p=0,0003$, viz Příloha 1). Skupina pacientů MRN_{PK}^{low} sestávala z 18 SRG, 16 IRG a 1 HRG pacienta, stratifikovaných pomocí kritérií protokolu ALL IC-BFM 2002. Podobný trend byl pozorován pro kostní dřeň ve dni 15: při použití limitu 5×10^{-3} , definujícího skupiny MRN_{KD}^{low} a MRN_{KD}^{high} , prodělal relaps pouze 1 ze 39 MRN_{KD}^{low} pacientů, zatímco ve skupině MRN_{KD}^{high} 12 ze 39 pacientů. Pětiletý RFS byl $97\pm 3\%$ pro skupinu MRN_{KD}^{low} a $69\pm 3\%$ pro pacienty MRN_{KD}^{high} ($p=0,001$). Hraničně signifikantní pro prognózu byla i hladina MRN v krvi v 8. dni léčby ($p=0,06$ pro kategorie určené limity 10^{-2} a 10^{-3}) a pozitivita versus negativita MRN v krvi ve 33. dni léčby

($p=0,05$). Pacienti s vyšší MRN v krvi ve velmi časných časových bodech léčby (tj. ve dnech 8 a 15) měli vyšší riziko relapsu ($p=0,02$ a $p=0,0006$, viz Příloha 1). Pacienti s velmi vysokou MRN v krvi v 15. dni léčby ($>10^{-2}$) měli pětiletý RFS pouze $51\pm 20\%$ podobně jako pacienti s MRN v kostní dřeni $>10^{-1}$ ($56\pm 17\%$), avšak rozdíl v přežití pouze mezi rameny HRG a IRG nebyl statisticky signifikantní pro kostní dřev ani periferní krev.

Minimální reziduální nemoc v periferní krvi v 15. dni léčby a riziková stratifikace

Většina (34 ze 35) MRN_{PK}^{low} pacientů měla podle očekávání M1 morfolonii kostní dřevě v 15. dni léčby ($p<0,0001$). Důležité je, že naše stratifikace založená na MRN v krvi v 15. dni léčby se překrývá s rizikovými skupinami protokolu ALL-BFM 2000 (založeného na MRN v kostní dřevě ve 33. dni a 12. týdnu léčby) pouze částečně a dokáže v rámci skupiny IRG definované podle kritérií tohoto protokolu identifikovat podskupinu 8 z 27 (30%) pacientů MRN_{PK}^{low} s výbornou prognózou bez jediného relapsu ($p=0,008$). Naopak oba pacienti ze skupiny SRG s negativní MRN v kostní dřevě ve 33. dni a 12. týdnu léčby, kteří prodělali relaps, byli MRN_{PK}^{high} v 15. dni léčby (viz Příloha 1).

Korelace MRN v krvi v 15. dni léčby s rozdělením pacientů do podskupin dle MRN v kostní dřevě v 15. dni léčby byla vysoce signifikantní ($p<0,0001$), ale podskupiny se opět nepřekrývaly úplně. Jediný pacient s relapsem ve skupině s nejnižší MRN v kostní dřevě ($<10^{-3}$) by byl zařazen do HRG ($>10^{-2}$) podle MRN v periferní krvi.

Pomocí bivariantní Coxovy regresní analýzy jsme prokázali, že MRN v krvi v 15. dni léčby přidává další prognostickou informaci ke stávající rizikové stratifikaci. Nízká MRN ($<10^{-4}$) v krvi v tomto časovém bodě byla významným prognostickým faktorem nezávislým na stratifikačních kritériích protokolu ALL IC-BFM 2002 (hazard ratio=0,08; 95% interval spolehlivosti=0,011-0,62; $p=0,02$) i protokolu ALL-BFM 2000 (hazard ratio=0,12; 95% interval spolehlivosti=0,015-0,915; $p=0,04$).

Výsledky této studie jsme publikovali v časopise Haematologica (Příloha 1) a spolu se shrnutím našich zkušeností s monitorováním MRN a jeho úskalími v časopise Transfuzie a hematologie dnes (Příloha 2).

Diskuze a závěry I.

Na základě několika časných studií byla v minulých letech celosvětově opuštěna myšlenka nahrazení vyšetřování kostní dřeně periferní krví u ALL, tyto práce ale postrádaly dostatečný počet vzorků z časné fáze léčby [128,129]. V naší studii jsme vyšetřili relativně velké množství párových vzorků kostní dřeně a periferní krve a v souladu s uvedenými publikacemi jsme prokázali dobrou korelaci hladin MRN mezi těmito kompartmenty u T-ALL a nedostatečnou korelaci u BCP-ALL. Prokázali jsme, že úroveň onemocnění detekovaná v krvi při diagnóze je spojena s vyšším počtem leukocytů při diagnóze a se zvětšením jater a sleziny. Souvislost molekulárně-geneticky detekovaného postižení periferní krve s iniciálním počtem leukocytů je logická a leukocytóza při diagnóze s postižením sleziny korelovala v předchozí studii [144].

Ani naše výsledky tedy nesvědčí pro možnost využití periferního krve jako rozhodujícího materiálu u pacientů s BCP-ALL. Vyšetření MRN v periferní krvi má u BCP-ALL v průměru o řád nižší citlivost, proto k vyšetřování MRN v krvi přistupujeme pouze např. až v období kontrol 3 a více let po transplantaci kostní dřeně, kdy už je pravděpodobnost recidivy velmi malá. Naopak dobrá korelace mezi hladinami MRN v kostní dřeni a periferní krvi u T-ALL v naší i dřívějších studiích teoreticky umožňuje nahrazení některých odběrů kostní dřeně vyšetřením periferní krve, proto u pacientů s T-ALL po transplantaci kostní dřeně a opakovaně negativní MRN v kostní dřeni přistupujeme k odběrům krve již dříve v potransplantačním sledování. Za účelem rozdělení pacientů do rizikových skupin během indukční fáze léčby ALL se ale pro vyšetřování MRN periferní krev dosud nepoužívá.

Hlavním cílem naší práce bylo zjistit, zda má hladina MRN v krvi v některém z vyšetřovaných časových bodů prognostický význam. Ten se nám podařilo prokázat slabě pro 8. den léčby, nejvhodnějším časovým bodem pro rizikovou stratifikaci podle periferní krve je zcela jednoznačně 15. den iniciální léčby. Prognostický význam na retrospektivní kohortě byl ale stanoven pouze pro RQ-PCR, jehož použití je v tomto období problematické, protože procedura vyhledávání cílů, navržení specifických primerů a optimalizace RQ-PCR trvá minimálně 2, běžně ale až 4 týdny. Ideálním nástrojem pro detekci MRN v krvi v tomto časovém bodě by měla být rychlejší a levnější průtoková cytometrie. Předchozí práce naší skupiny zjistila dobrou celkovou korelaci výsledků MRN v 15. dni léčby získanými RQ-PCR a průtokovou cytometrií, ale významné individuální rozdíly u některých párů vzorků [145]. Předpokládáme, že prognostický význam MRN v krvi v 15. dni léčby prokážeme prospektivně i pro průtokovou cytometrii. Tím bude umožněno nahradit vyšetřování kostní dřeně periferní krví v rámci protokolů BFM konsorcia, především v zemích používajících

dosud protokol ALL IC-BFM 2002, který svou rizikovou stratifikaci zakládá pouze na klinických parametrech a průtokové cytometrii.

Vyšetřování MRN v kostní dřeni v 15. dni léčby jak metodou RQ-PCR [121,122], tak průtokovou cytometrií [123,124] má důležitý prognostický význam a bylo už zařazeno do rizikové stratifikace protokolu AIEOP-BFM ALL 2009 - pacienti s vysokou hladinou MRN (nad 10%) v tomto časovém bodě (měřeno pomocí průtokové cytometrie) jsou léčeni ve skupině vysokého rizika. Námi popsané rozdělení pacientů podle MRN v periferní krvi v 15. dni léčby dobře kopíruje skupiny definované hladinou MRN v kostní dřeni a přidává novou prognostickou informaci ke stávající rizikové stratifikaci založené na MRN ve 33. dni a 12. týdnu léčby měřené pomocí RQ-PCR. Identifikovali jsme rozsáhlou podskupinu pacientů s výbornou prognózou a potenciálem snížení intenzity léčby - např. redukce dávky kardiotoxických cytostatik antracyklinů v průběhu indukční chemoterapie. Zda lze podle hladiny MRN v krvi v 15. dni léčby statisticky signifikantně oddělit také skupinu pacientů s vysokým rizikem relapsu, bude třeba určit na základě větší mezinárodní studie.

II. Akutní hybridní leukémie v dětském věku

Subtypy akutní hybridní leukémie a jejich charakteristika

Jak už bylo zmíněno, léčba a prognóza ALL je zásadně odlišná od akutní myeloidní leukémie (AML) [14-17]. Existuje ale poměrně vzácná podskupina leukémií, označovaná jako akutní hybridní leukémie (AHL), bifenotypické leukémie nebo leukémie se smíšeným fenotypem (MPAL), která zahrnuje asi 3-5% akutních leukémií [146]. Léčebný a diagnostický přístup k těmto leukemiím není dosud zcela jasný. MPAL nemusí být vždy zachycena morfologicky, stěžejní role v její diagnostice patří průtokové cytometrii.

Lze identifikovat tři základní podskupiny MPAL:

- 1) s významnou koexpresí znaků za normálních okolností příslušných buňkám jiné hematopoetické linie (bifenotypické leukémie)
- 2) s tzv. přesmykem do odlišné linie (liniový přesmyk, „lineage switch“) před dosažením kompletní remise
- 3) s koexistencí dvou liniově odlišných populací leukemických blastů u téhož pacienta – tzv. bilineální (biklonální) leukémie.

Ad 1) Leukémie se současnou expresí znaků z různých linií

Určitá nižší úroveň koexprese myeloidních antigenů na lymfoidních blastech je poměrně častá, vyskytuje se asi u 20% dětských ALL [147,148]. Její význam zůstává sporný – negativní prognostický vliv nebyl při současném sledování několika znaků současně potvrzen [149,150]. Studie naší skupiny ale prokázala, že samotná exprese myeloidního znaku CD33 u ALL je nezávislým prognostickým faktorem [142].

K odlišení významné intenzity koexprese liniově nepřislušných antigenů definující MPAL vznikla v roce 1995 mezinárodní klasifikace skupiny European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL) [151,152], která se pokusila sjednotit přístup k hodnocení jednotlivých antigenů podle příslušnosti k linii. BFM adaptace této klasifikace se používá v centrálním hodnocení imunofenotypu u všech dětí v ČR s nově diagnostikovanou akutní leukémií od roku 1996 dodnes. EGIL klasifikace hodnotí příslušnost leukémie k myeloidní či lymfoidní řadě - jednotlivým antigenům přiřazuje skóre 0,5, 1 nebo 2 a pokud skóre přesáhne hodnotu 2, nález se hodnotí jako MPAL. Průtoková cytometrie musí vždy označit primární linii, součástí klasifikace není hodnocení mezi B a T lymfoidní řadou. Novější a jednodušší klasifikace WHO z roku 2008 definuje 4 subtypy MPAL (Borowitz, WHO Press, 2008) a po transformaci do jednoznačných pravidel by potenciálně mohla klasifikaci EGIL nahradit.

Skóre	B linie	T linie	Myeloidní linie
2	(intra)CD79a, intra IgM, CD22	(intra)CD3, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$	intraMPO
1	CD19, CD10, CD20	CD2, CD5, CD8, CD10	CD13, CD33, CD65, CD117
0,5	intraTdT, CD24	intraTdT, CD7, CD1a	CD14, CD15, CD64

Obrázek 5: Mezinárodní klasifikace EGIL (Béné 1995, aktualizováno)

Prognóza MPAL je podle publikovaných prací významně horší než u „nehybridních“ ALL, respektive AML, většina studií se ale týká dospělých pacientů. Jednou z pravděpodobných příčin může být častější výskyt fúzních genů BCR/ABL a MLL/AF4 a naopak méně častá hyperdiploidie u MPAL [28,30,153]. Léčba MPAL není dosud jednotná. Postup léčit při diagnóze podle cytomorfologie a při rezistenci na léčbu nebo relapsu opačným protokolem je pouze empirický a není podložen žádnou studií. Protokoly Interfant 99 a 06 pro léčbu kojenecké ALL zohledňují unikátní biologii této leukémie, která se částečně překrývá s problematikou MPAL, a obsahují léčebné elementy z ALL i AML protokolů. Sporná je i otázka indikace transplantace kostní dřeně; příliš intenzivní léčba s kombinací cytostatik cílenou na lymfoidní i myeloidní linii zvyšuje riziko toxických komplikací a časnou mortalitu [28].

O regulaci a biologické relevanci exprese aberantních antigenů u akutních leukémií stále víme velmi málo. Rovněž původ blastů u MPAL zatím není dostatečně znám, předpokládá se jejich vznik maligní transformací pluripotentní kmenové buňky v časném stádiu hematopoézy vzhledem k výrazně vyššímu zastoupení CD34 pozitivních buněk oproti ostatním leukémiím [153]. Jako časný indikátor lymfoidní orientace mohou sloužit přestavby genů pro Ig/TCR, protože leukemický klon vzniklý maligní transformací buňky v určitém stádiu hematopoézy nese přestavby Ig/TCR odpovídající tomuto stádiu. Podle typu a počtu přítomných přestaveb (kompletní, nekompletní, těžké řetězce, lehké řetězce) tedy lze usuzovat na zralost buněk podléhajících maligní transformaci. Výjimkou jsou pouze subtypy leukémie protrahovaně exprimující proteiny rekombinázového aparátu – RAG 1, 2 [68].

Předpokládáme, že na expresi znaků z „nepatřičné“ krevní linie u MPAL se může podílet i deficit proteinu IKZF1 (viz 3. část dizertační práce), především u BCP-ALL s koexpresí myeloidních antigenů, a že alterace IKZF1 mohou být podkladem vzniku části MPAL i leukémií s liniovým přesmykem.

Ad 2) Leukémie s liniovým přesmykem

Tento typ akutní leukémie byl doposud považován za vzácný a byl spojován výhradně s přítomností translokace genu MLL (mixed lineage leukemia, viz výše). Vyznačuje se změnou imunofenotypu leukemických buněk mezi lymfoidní a myeloidní linií během časné fáze léčby (tj. do 33. dne léčby, před dosažením kompletní remise). Existují publikace převážně pouze na úrovni jednotlivých kazuistik [154]. Nejnovější práce identifikovala malou skupinu pacientů s liniovou konverzí (incidence 0,6% akutních leukémií), ale téměř všichni tito pacienti byli kojenci s translokací genu MLL [155]. S přítomností fúze BCR/ABL (u pacientů s ALL nebo blastickou krizí CML) se váže spíš přesmyk z myeloidní do lymfoidní linie [156], zatímco obecně častější je opačný směr přesmyku.

Vznik liniového přesmyku není zcela objasněn, roli může hrát selekce subklonu s odlišným repertoárem antigenů podanou chemoterapií, „přeprogramování“ pluripotentní kmenové buňky a transdiferenciace, nebo naopak dediferenciace s následnou rediferenciací do odlišné linie. Také u tohoto subtypu MPAL jsou důležitým znakem klonální identity leukemických buněk přestavby Ig/TCR.

Ad 3) Současná přítomnost dvou morfologicky a imunologicky nezávislých leukemických linií u téhož pacienta je extrémně vzácná a vyskytuje se na úrovni jednotlivých kazuistik. V letech 1996-2011 jsme diagnostikovali pouze 3 pacienty s bilineální leukémií, u nichž byla už při diagnóze vedle lymfoidního klonu přítomna i myeloidní populace blastů.

Cíle II.

- 1. v rámci kohorty všech dětí léčených pro akutní leukémii v České republice s centrálně vyšetřeným imunofenotypem identifikovat pacienty s různými typy MPAL pomocí průtokové cytometrie (bylo provedeno skupinou Laboratoře průtokové cytometrie CLIP)**
- 2. charakterizovat genotypové vlastnosti leukemického klonu u různých kategorií MPAL: vyšetřit spektrum přestaveb imunoreceptorových genů a přítomnost fúzních genů a dalších genetických aberací**
- 3. zhodnotit vztah jednotlivých aberantních antigenů ke skóre EGIL a k prognóze a formulovat doporučení pro eventuální úpravy klinické klasifikace dětských MPAL a výběr adekvátních léčebných postupů; vyjádřit se k diagnostice a léčbě liniového přesmyku**

Metodika II.

Postup při zpracování biologického materiálu, vyšetření průtokovou cytometrií a molekulárně genetickými metodami (screening přestaveb genů pro Ig/TCR, stanovení MRN pomocí jejich kvantifikace a detekci fúzních genů a dalších genetických aberací, zejména alterací IKZF1) a statistické zpracování dat popisujeme v 1. a 3. části dizertační práce, v Příloze 3 a Příloze 4.

Výsledky II.

Poznámka: Na projektu jsem se podílela vyšetřením spektra přestaveb genů pro Ig/TCR, měřením MRN a detekcí aberací transkripčního faktoru IKZF1, v popisu výsledků a diskuzi se tedy zaměřím zejména na tyto oblasti.

Akutní hybridní leukémie s významnou koexpresí znaků různých linií

V letech 1996-2006 jsme v České republice podle EGIL skóre klasifikovali jako MPAL s významnou koexpresí znaků různých linií 28 z 582 nově diagnostikovaných ALL (22 ze 499 BCP-ALL, 6 z 83 T-ALL) a 4 ze 107 nově diagnostikovaných AML (Příloha 3).

Mezi pacienty léčenými jako ALL se bifenotypická MPAL vyskytovala signifikantně častěji u BCR/ABL-pozitivních pacientů (3 z 19 MPAL vs. 13 z 81 non-MPAL, $p=0,04$) a v rámci BCP-ALL rovněž častěji u pacientů s translokací MLL/AF4 ($p=0,007$) a naopak méně často u pacientů s hyperdiploidií ($p=0,04$). Frekvence výskytu u BCP-MPAL nejčastějšího fúzního genu TEL/AML1 nebyla odlišná ($p>0,05$). U žádného pacienta s MPAL jsme nenalezli kteroukoli z méně častých přestaveb genu MLL (MLL/AF6, MLL/AF9, MLL/AF10, MLL/ENL a MLL/ELL) a pouze 2 pacienti s MPAL nesli interní tandemové duplikace genu FLT3.

U všech BCP-MPAL byly nalezeny přestavby Ig/TCR, jejichž frekvence a zralost odpovídala vývojovému stádiu a primární linii leukemických buněk definované průtokovou cytometrií, případně u TEL/AML1-pozitivní MPAL s častějším výskytem přestaveb Ig/TCR ($p=0,003$) deregulaci rekombinace způsobené fúzním genem (viz výše). Naopak u T-MPAL s koexpresí myeloidních znaků byl výskyt přestaveb Ig/TCR nízký (přestavba Ig/TCR byla přítomna pouze u 2 z 5 těchto případů). Také u žádného ze 4 pacientů s AML-MPAL nebyla nalezena přestavba Ig/TCR.

5-letý EFS celé kohorty dětí léčených jako ALL byl $75\pm 2\%$, zatímco u dětí léčených jako AML pouze $47\pm 5\%$. Mezi dětmi léčenými jako ALL měli pacienti s MPAL významně horší prognózu (5-letý EFS $53\pm 10\%$ oproti $76\pm 2\%$, $p=0,008$), údaje přežití pro AML nebyly vyčísleny pro nízký počet pacientů. Prognóza dětí s MPAL je významně horší i v rámci podskupin ALL s translokacemi TEL/AML1 ($p=0,01$) a MLL/AF4 ($p=0,02$), ale nikoli BCR/ABL ($p>0,05$). EGIL skóre bylo potvrzeno multivariantní analýzou jako prognostický znak nezávislý na genotypu a dokonce s významnějším dopadem na prognózu než genotyp ($p=0,002$). U pacientů s MPAL jsme také pozorovali horší odpověď na léčbu v kostní dřeni v 15. dni léčby (více pacientů s morfologií M2 na úkor skupiny M1, $p=0,02$).

Tato práce byla publikována v časopise *Haematologica* (viz Příloha 3).

Akutní hybridní leukémie s liniovým přesmykem

Mezi prospektivně vyšetřenými 179 pacienty léčenými v ČR pro BCP-ALL v letech 2007 – 2010 jsme pomocí 8-barevné průtokové cytometrie identifikovali 7 (tj. 4%) pacientů s liniovým přesmykem, při retrospektivním hodnocení pacientů diagnostikovaných v letech 1996 – 2007 pouze 5 z 526 (1%) pacientů a v rámci validační kohorty (diagnostikována ve Vídni 2010 - 2011) 1 ze 44 pacientů. Tuto podskupinu jsme definovali jako pacienty s významným zvýšením podílu monocytoidních buněk (až na více než 25%) od 1. do 33. dne léčby, s vysokou expresí antigenu CD2, bez přítomnosti translokace genu MLL a s vyloučenou diagnózou akutní bilineální leukémie (tj. bez přítomnosti monocytoidních blastů již při diagnóze).

U žádného pacienta s liniovým přesmykem nebyla nalezena translokace FLT3/ITD, BCR/ABL, E2A/PBX1 ani TEL/AML1 a změn počtu genových kopií jsme detekovali celkově méně, než bylo publikováno pro ALL [33] s výsledkem bližším spíše AML (Příloha 4, Supplementary table 1) [157]. 4 ze 13 pacientů měli delece krátkého raménka 9. chromozómu zahrnující gen CDKN2A. Zjistili jsme, že pacienti s liniovým přesmykem se vyznačují častější přítomností aberací transkripčního faktoru Ikaros (IKZF1) – tyto byly zjištěny u 5 ze 12 pacientů s liniovým přesmykem oproti 17 ze 150 ostatních pacientů ($p=0,01$). IKZF1 spolu s TET3, dalším genem zodpovědným za diferenciaci hematopoetických linií, také patřil k upregulovaným genům detekovaným pomocí expresního profilování. Genová exprese CEBP α , dalšího genu klíčového pro směrování vývoje krvetvorby, byla při diagnóze ALL s liniovým přesmykem vyšší než u ostatních BCP-ALL ($p=0,01$) a nižší než u AML ($p=0,002$). Neidentifikovali jsme žádnou genetickou aberaci společnou všem pacientům s liniovým přesmykem.

Leukemický původ přechodných stádií i monocytoidních buněk byl potvrzen pomocí detekce přestaveb genů pro Ig/TCR u sortovaných populací. Liniový přesmyk byl významně častěji asociován s pozitivitou MRN měřenou pomocí RQ-PCR v kostní dřeni ve 33. dni a 12. týdnu léčby ($p=0,004$ a $p=0,0006$), u 5 z 11 pacientů dokonce s velmi pomalou redukcí MRN značící vysoké riziko ALL [5]. Pouze u 1 z 10 vzorků ALL s liniovým přesmykem však byla pozitivita MRN ve 33. dni léčby detekovatelná i průtokovou cytometrií. Pacienti s liniovým přesmykem měli signifikantně vyšší hladinu MRN v periferní krvi v 8. i 15. dni léčby ($p=0,005$ a $p=0,002$) než ostatní pacienti s ALL, zatímco postižení kostní dřeni v 8. dni léčby se nelišilo.

Liniový přesmyk pravděpodobně nevede k významně horší prognóze, počet hodnocených případů je ale nízký. Jednoho z pacientů po 6 měsících léčby postihl relaps onemocnění morfologicky i imunofenotypicky jednoznačně odpovídající monocytární AML.

Naše výsledky jsou součástí dokončovaného rukopisu v přípravě (Příloha 4).

Diskuze a závěry II.

Naše studie jako první hodnotí vlastnosti a prognózu MPAL diagnostikované i léčené podle jednoznačných a v praxi snadno použitelných kritérií.

Zjistili jsme, že spektrum přestaveb genů pro Ig/TCR u BCP-MPAL je odvozeno od vývojové linie a zralosti leukemických blastů, případně od dysregulace rekombinázového aparátu způsobené fúzním genem TEL/AML1. Rovněž absence přestaveb Ig/TCR u AML-MPAL odráží normální situaci u AML [158]. Naopak námi pozorovaný nízký výskyt přestaveb Ig/TCR u MPAL s kombinací T-lymfoidních a myeloidních znaků odlišný od dat publikovaných o T-ALL [159] by mohl svědčit pro nezralost leukemických buněk T-MPAL, skupina těchto pacientů v naší kohortě je však příliš malá pro statistické hodnocení.

Z námi popsané horší prognózy MPAL v rámci některých genotypově definovaných podskupin ALL vyplývá, že celkově horší přežití pacientů s MPAL nelze připisovat pouze vyšší incidenci prognosticky nepříznivých (MLL/AF4, BCR/ABL) a nižší incidenci prognosticky příznivých genetických změn (TEL/AML1, hyperdiploidie) ve skupině MPAL. U TEL/AML1-pozitivní MPAL má pravděpodobně negativní dopad na přežití asociace s myeloidním antigenem CD 33 [142]. Naši pacienti s BCP-MPAL léčení podle protokolu pro ALL měli stejnou nebo lepší prognózu než nedávno publikovaná kohorta dětí s MPAL z USA, z nichž některé dostávaly léčbu cílenou na AML (EFS 45±11% vs. 36±16%) [146]. Nedoporučujeme tedy pacienty s MPAL, kteří splňují kriteria T-ALL nebo BCP-ALL, léčit jako AML, ale naopak zahájit chemoterapii cílenou na lymfoidní řadu a tuto případně změnit až při nedostatečné odpovědi na indukční léčbu. Intenzivní kombinovaná léčba není pro pacienty s MPAL výhodná, rovněž transplantace kostní dřeně by měla být vyhrazena pouze pro vysoce rizikové pacienty.

Liniový přesmyk z BCP-ALL do myeloidní linie je častější, než se obecně předpokládalo, v minulosti byl poddiagnostikován zejména kvůli přechodnému výskytu, nenápadnému imunofenotypu a obtížné odlišitelnosti buněk od nemaligních monocytů. Oproti předchozím publikacím [154,160] jsme popsali liniový přesmyk i u pacientů bez translokace genu MLL. Je charakterizován pozitivitou antigenu CD2, vysokou expresí transkripčního faktoru CEBP α , který hraje významnou roli v transdiferenciaci do myeloidní linie [161,162], a častějšími alteracemi genu IKZF1, klíčového pro diferenciaci lymfocytů (viz 3. část dizertační práce).

Díky přítomnosti shodných přestaveb genů pro Ig/TCR jako při diagnóze ALL jsme odlišili leukemické blasty v přechodných stádiích i ve fázi monocytoidního fenotypu od zdravých monocytů. U ALL s liniovým přesmykem špatně korelují hladiny MRN měřené pomocí průtokové cytometrie a metodami molekulární genetiky: pomocí sortování buněk a dalších

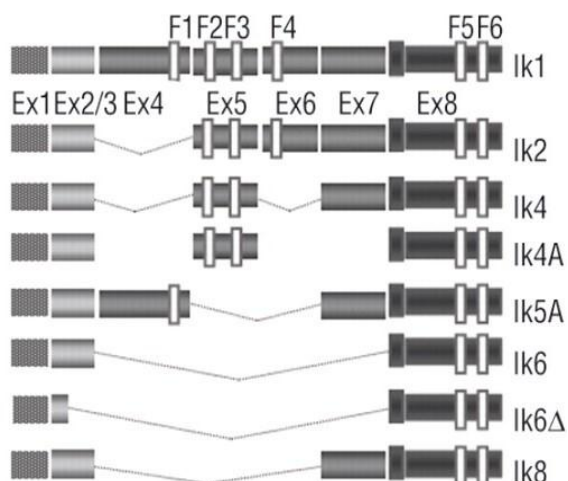
experimentů jsme ukázali, že leukemické blasty mění svůj fenotyp ve směru monocytární linie, což způsobuje podhodnocení MRN při vyšetření průtokovou cytometrií. Maligní monocytoidní buňky si ale zachovávají nádorově-specifické klonální přestavby Ig/TCR, což umožňuje jejich sledování pomocí RQ-PCR; při použití této metody často zjišťujeme prognosticky nepříznivou pomalou odpověď na léčbu u pacientů s liniovým přesmykem. Přestože liniový přesmyk je přechodný fenomén s výskytem v prvním měsíci léčby ALL a může být částečně vyvolán kortikosteroidy používanými během indukční terapie, jedná se o jev významný nejen z hlediska biologie leukemických buněk, ale i pro klinickou praxi – přináší riziko relapsu ALL z myeloidní linie a musí být brán v úvahu při monitoraci MRN pro vysoké riziko falešné negativity.

III. Transkripční faktor Ikaros (IKZF1) a jeho alterace

Struktura a funkce transkripčního faktoru IKZF1 a typy jeho alterací

Přestože moderní léčba ALL u dětí je velmi úspěšná, jedním z jejích zásadních úskalí zůstává relaps onemocnění, který patří mezi nejčastější příčiny dětské úmrtnosti. Většina pacientů, kteří při léčbě současnými protokoly prodělají relaps, pochází ze skupiny středního rizika dle MRN a malá část pacientů dokonce ze skupiny nízkého rizika (nepublikovaná data). Proto je stále nutné hledat nové rizikové faktory, které by ještě přesněji stratifikovaly tyto pacienty k intenzifikaci léčby.

Ikaros (IKZF1), kódovaný genem IKZF1 na 7. chromozómu, je transkripční faktor, který hraje klíčovou roli ve vývoji lymfoidní linie od stádia nejčasnějších prekurzorů v kostní dřeni [163] a působí také jako tumor supresor [164]. Alternativní sestřih spolu s delecemi a insercemi na dvou místech genu dává vznik řadě izoform IKZF1, z nichž pouze izoformy s minimálně třemi zinkovými prsty (z celkových čtyř) v DNA-vazebné doméně mohou plnit fyziologické funkce IKZF1. Naopak tzv. krátké izoformy IKZF1 s chybějící nebo nefunkční N-terminální doménou se nemohou vázat na DNA, ale mají intaktní C-terminální doménu, která slouží k interakci s dalšími transkripčními faktory i s funkčními izoformami IKZF1; způsobují tedy dominantně-negativní efekt a fungují jako inhibitory funkce IKZF1 a dalších transkripčních faktorů [165].



Obrázek 5: Isoformy genu IKZF1 (Iacobucci, Haematologica 2008). Mezi krátké izoformy patří Ik4, Ik4A, Ik4del (Ik5A), Ik6, Ik6 delta a Ik8.

V rámci vývoje krevních řad hraje protein Ikaros klíčovou roli v nastartování lymfoidního transkripčního programu a supresi myeloidních znaků [166]. Myši bez funkčního IKZF1 postrádají celou lymfoidní krevní řadu včetně nejčasnějších prekurzorů [167], zatímco myši exprimující z jedné alely krátkou izoformu Ik6 mají normální distribuci lymfoidních buněk, avšak časně po narození vyvinou agresivní leukémie z T-řady [168]. Zvýšená exprese krátkých izoform IKZF1 byla popsána u různých typů leukémií dětí i dospělých i u blastického zvratu CML a progresu myeloproliferativních chorob [169-172] a dlouho se předpokládalo, že je způsobena deregulací alternativního sestřihu RNA. Zásadní studie americké skupiny ale u většiny těchto pacientů prokázaly, že za změnou exprese ve smyslu převahy krátkých izoform stojí zřejmě především delece uvnitř genu IKZF1, a popsaly spojení těchto delecí se špatnou prognózou u dětí s ALL [33,88]. Kvůli odlišnému léčebnému protokolu a výběru pacientů ale zatím nebylo možné tyto poznatky začlenit do rizikové stratifikace protokolů typu BFM. Navíc použitá metodika celogenomové analýzy DNA pomocí SNP microarray je finančně náročná a vyžaduje složitou analýzu získaných dat. Informace o negativním prognostickém vlivu delecí IKZF1 v poslední době přibývají [34,35,173], musí ale být zmapován v rámci různých typů léčebných protokolů a samostatně pro BCR/ABL-negativní kohorty pacientů z důvodu významně častější asociace alterací IKZF1 s přítomností fúzního genu BCR/ABL a jejich pravděpodobné vzájemné kooperace [71,174,175]. Dále je naším záměrem zejména objasnit souvislost změn IKZF1 na genové úrovni a na úrovni genové a proteinové exprese a vztah IKZF1 a MRN.

Cíle III.

- 1. stanovit vzorec fyziologické genové exprese IKZF1 v kostní dřeni a periferní krvi**
- 2. zavést metodu RT-PCR a čipové elektroforézy pro zjednodušené stanovení genové exprese izoform IKZF1 a provést toto vyšetření retrospektivně u všech dětí s iniciální diagnózou ALL léčených podle protokolu ALL IC-BFM 2002 v letech 2002-2007 s dostupným materiálem**
- 3. zavést metodu MLPA pro detekci delecí genu IKZF1 a provést toto vyšetření u všech pacientů zmíněných v bodě 2**
- 4. vyšetřit metodou čipové elektroforézy validační kohortu pacientů léčených v SRN pro ALL podle protokolu ALL-BFM 2000 (s již dostupným výsledkem MLPA)**
- 5. statisticky zhodnotit vzájemnou souvislost a význam všech odhalených aberací pro prognózu pacienta a jejich vztah k známým prognostickým znakům, především ke stavu MRN v časných bodech léčby**

Metodika III.

Postup při zpracování biologického materiálu, vyšetření průtokovou cytometrií a molekulárně genetickými metodami (screening přestaveb genů pro Ig/TCR, stanovení MRN pomocí jejich kvantifikace a detekci fúzních genů) a statistické zpracování dat popisujeme v 1. části dizertační práce a v Příloze 5.

Vyšetření genové exprese IKZF1

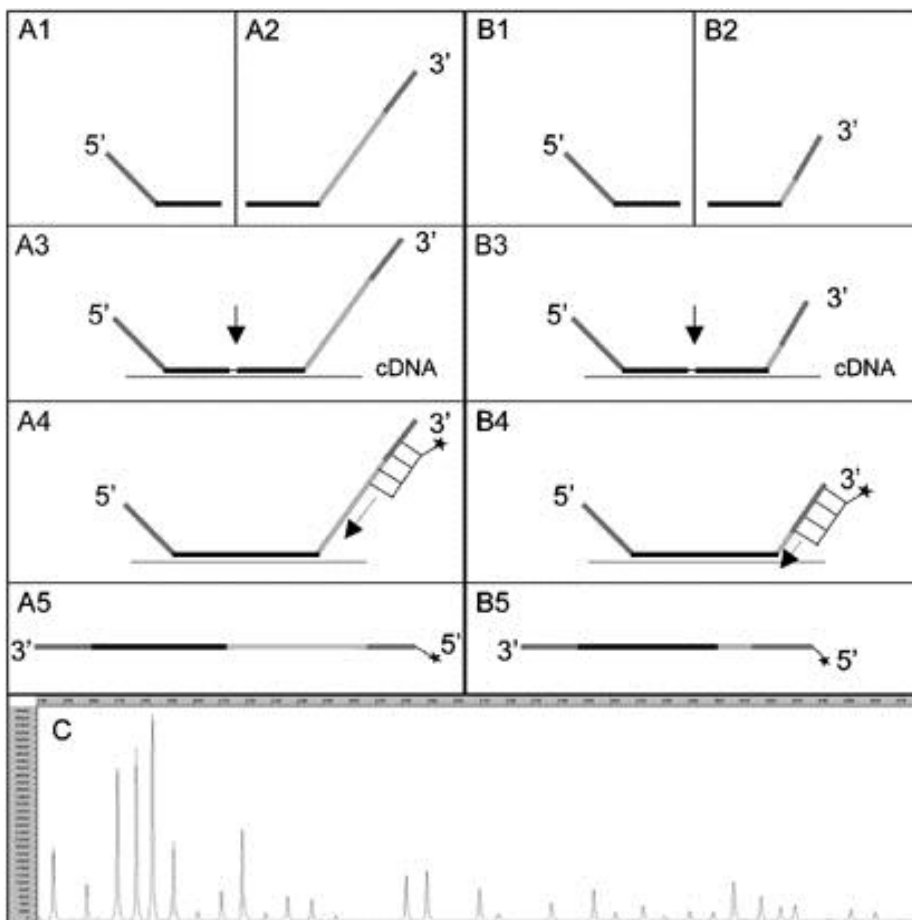
Ze zamražených buněk kostní dřeně z iniciální diagnózy nebo z lymfocytů sortovaných podle jednotlivých vývojových stádií izolujeme RNA modifikovanou metodou dle Chomczynského a Sacchi [113]. Pro reverzní transkripci do cDNA pomocí kitu iScript (BioRad) používáme 1 μ l takto připravené RNA. Kvalitu RNA ověřujeme pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-100.

Vyšetření genové exprese „dlouhých“ funkčních izoforem (Ik1, Ik2) a krátkých dominantně-negativních (Ik6 delta, Ik6, Ik8del, Ik8, Ik4A, Ik4del, Ik4) izoforem IKZF1 je založeno na jejich amplifikaci reverzně-transkriptázovou PCR (RT-PCR) za reakčních podmínek a s primery popsány dříve [176]. Oproti uvedené práci jsme ale nahradili detekci a kvantifikaci izoforem pomocí kapilární elektroforézy nahradili výrazně jednodušší a rychlejší čipovou elektroforézou Lab-on-a-chip (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) [135,136]. Relativní expresi izoforem stanovujeme pomocí poměru ploch peaků jednotlivých izoforem k součtu exprese všech izoforem, absolutní exprese izoforem IKZF1 lze určit pomocí poměru fluorescence ke standardu. K určení spolehlivosti metody v závislosti na proměnlivé kvalitě cDNA a korekci absolutní exprese na tuto kvalitu koreluje tuto absolutní expresi s expresí kontrolního genu ABL stanovenou v daných vzorcích RQ-RT-PCR [110]. Výsledky čipové elektroforézy jsme u části pacientů validovali pomocí RQ-RT-PCR kvantifikace nejdůležitějších izoforem (Ik1/2, Ik6, Ik4/4A, Ik8) pomocí čtyř optimalizovaných systémů (Příloha 5, Supplemental Methods).

Fyziologické rozmezí exprese izoforem IKZF1 jsme stanovili na základě analýzy krve zdravých dárců krvetvorných buněk, vzorků kostní dřeně odebraných při remisi onemocnění s negativní MRN a sortovaných vývojových stádií lymfocytů získaných od dárců s nemaligní krvetvorbou, např. dětí podstupujících resekci thymu při kardiokirurgickém výkonu v Kardiocentru FN Motol (Příloha 5).

Vyšetření delecí genu *IKZF1*

DNA z diagnostických vzorků kostní dřeně byla vyšetřena na přítomnost delecí jednotlivých exonů genu *IKZF1* metodou MLPA® (multiplex ligation-dependent probe amplification, MRC Holland), která podstatně zjednodušuje detekci mono- a bialelických delecí a amplifikací oproti celogenomovým metodám, jako je SNP microarray použitá americkou skupinou [33]. MLPA zahrnuje denaturaci DNA, navázání sond pro jednotlivé exony, ligaci sond, multiplexní PCR a analýzu produktů PCR pomocí kapilární elektroforózy. Výsledky analyzujeme pomocí software Coffalyser v9.4.



Obrázek 6: Princip metody MLPA: A, B1,2 – páry sond s „mezerníkovou“ sekvencí přesně definované délky ohraničené univerzálními primery; A,B3 – hybridizace sond s cílovou DNA a ligace párů sond; A,B4 – PCR s univerzálními primery, amplifikace ligovaných sond; A,B5 – fluorescenčně značené amplifikační produkty specifické délky; C – analýza fragmentů (Hess, Leukemia 2004)

Sekvenování vybraných oblastí IKZF1

U všech pacientů s diskrepancí mezi nálezem aberací IKZF1 na genové úrovni a úrovni genové exprese jsme sekvenovali všechny kódující exony IKZF1 a přilehlé intronické sekvence a vyhodnotili potenciální dopad nalezených odchylek na sestřih genu [34,172,177].

Výsledky III.

Incidence alterací IKZF1 na úrovni genové exprese a jejich vliv na prognózu dětské ALL

Vyšetřili jsme 206 dětí s BCR/ABL-negativní BCP- i T-ALL léčených v ČR protokolem ALL IC-BFM 2002 a validační kohortu 189 dětí léčených v SRN protokolem BFM-ALL 2000.

Nejvýznamnější rozdíl mezi relativní expresí jednotlivých izoform IKZF1 v periferní krvi zdravých dárců a nemaligní kostní dřeni a u pacientů s ALL se týkal izoformy Ik6, což je nejkratší a zároveň nejčastěji aberantně exprimovaná izoforma (viz Příloha 5, Supplemental Table II) - exprese Ik6 byla výrazně vyšší u pacientů s ALL ($p < 0,0001$). Podíl exprese krátkých nefunkčních izoform (Ik6 delta, Ik6, Ik8del, Ik8, Ik4A, Ik4del, Ik4) z celkové exprese všech izoform IKZF1 (včetně funkčních Ik1, Ik2) byl významně zvýšen (tj. na $>80\%$) u 14 z 206 (7%) pacientů. Tito pacienti měli o něco horší prognózu (5-letý RFS $69 \pm 13\%$ oproti $90 \pm 2\%$; $p = 0,02$), ale tato byla způsobena převážně zvýšenou expresí samotné izoformy Ik6, jednoznačně nejdůležitějším prognostickým faktorem v rámci genové exprese IKZF1: pacienti s expresí Ik6 $>50\%$ celkové exprese IKZF1 měli 5-letý RFS pouze $50 \pm 16\%$ a 5 z 10 těchto pacientů prodělalo relaps. Variace v expresi ostatních krátkých izoform byly víceméně odvozeny od exprese Ik6 a dopad exprese žádné jiné izoformy na prognózu hodnocený samostatně nebyl statisticky významný.

Ve validační kohortě byla frekvence zvýšené exprese izoformy Ik6 obdobná – vyskytla se u 9 ze 189 (5%) pacientů.

Incidence alterací IKZF1 na genové úrovni a jejich vliv na prognózu dětské ALL

Metodou MLPA jsme detekovali delece alespoň jednoho exonu IKZF1 u 14 z 206 (7%) dětí z české kohorty léčené protokolem ALL IC-BFM 2002. U 6 pacientů se jednalo o delece celého genu, u 6 pacientů o delece exonů 4-7; delece exonů 2-8 a exonů 5 a 6 se vyskytly po jednom případě. Všechny zjištěné delece byly monoalelické.

Delece IKZF1 byly přítomny také u 23 ze 189 (12%) německých pacientů a byly jednoznačně spojeny se špatnou prognózou v obou kohortách. Jejich vliv na přežití bez relapsu byl silněji vyjádřen v protokolu ALL IC-BFM 2002 ($44 \pm 16\%$ vs. $91 \pm 2\%$, $p < 0,0001$) než v protokolu ALL-BFM 2000 ($70 \pm 10\%$ vs. $89 \pm 3\%$, $p = 0,004$).

Diskrepance mezi aberacemi IKZF1 na genové úrovni a na úrovni genové exprese

Přítomnost genových delecí překvapivě u části pacientů nekorelovala s aberantní expresí IKZF1: pouze u 5 ze 14 pacientů s delecí IKZF1 jsme detekovali změněnou expresi IKZF1 a naopak, 5 z 10 pacientů se zvýšenou expresí Ik6 nemělo žádnou delecí IKZF1. Obdobné výsledky jsme získali pro validační kohortu – u 16 z 23 pacientů s delecí byla exprese IKZF1 normální a 2 ze 7 pacientů s vysokou Ik6 postrádali jakoukoli delecí IKZF1 (Příloha 5). Poměr pacientů s vysokou expresí Ik6 bez delecce se mezi oběma kohortami signifikantně nelišil (2 ze 189 vs. 5 z 206, $p=0,45$). Také tato malá skupina pacientů (7 z 395 pro ČR a SRN) měla špatnou prognózu: relaps prodělali 3 ze 7 pacientů.

Spojené kritérium delecce a/nebo zvýšená exprese Ik6 odhalilo oproti samotné MLPA další 3 pacienty, kteří následně prodělali relaps (tj. celkem 20 ze všech 49 relapsů).

Sekvenování genu IKZF1 všech českých pacientů s diskrepancí mezi genovou úrovní a genovou expresí identifikovalo pouze u 1 z 5 pacientů již dříve popsany SNP v intronové sekvenci přilehlé k exonu 4 s potenciálním dopadem na sestřih genu [172].

Po normalizaci celkové koncentrace izoform IKZF1 změřené čipovou elektroforézou vzhledem ke koncentraci kontrolního genu ABL u 189 z 206 českých pacientů jsme u pacientů s monoalelickou delecí IKZF1 nenalezli nižší hladinu celkové exprese tohoto genu než u pacientů bez delecce. Dále, exprese jednotlivých izoform kvantifikovaná RQ-RT-PCR kolísala i mezi vzorky zdravých kontrol v rozmezí 1-2 řádů (viz Příloha 5, Supplemental Figure 5). Domníváme se tedy, že rozhodující pro fungování transkripčního faktoru IKZF1 a prognózu pacientů je rozhodující nikoli absolutní, ale relativní exprese jeho jednotlivých izoform.

Asociace alterací IKZF1 s dalšími rizikovými faktory (včetně MRN)

Delece IKZF1 (avšak nikoli jeho změněná exprese) byla častěji spojena s věkem nad 6 let ($p=0,04$) a M2 nebo M3 morfologií kostní dřeně v 15. dni léčby ($p=0,0009$). Naopak jsme pozorovali trend k nižšímu výskytu delecí IKZF1 u T-ALL a TEL/AML1-pozitivní ALL ($p=0,08$ a $p=0,07$).

U pacientů léčených protokolem ALL IC-BFM 2002 byly delece IKZF1 i zvýšená exprese Ik6 spojeny s vyšší MRN v kostní dřeni v 15. ($p=0,02$ a $p=0,004$) a 33. dni ($p=0,01$ a $p=0,003$) a 12. týdnu (pouze Ik6; $p=0,02$) léčby. Delece IKZF1 a vysoká MRN v 15. dni léčby měřená průtokovou cytometrií byly multivariantní analýzou potvrzeny jako prognostické

faktory nezávislé na stratifikačních kritériích protokolu ALL IC-BFM 2002 ($p=0,02$ a $p=0,0003$) a identifikovaly 13 z 23 (57%) pacientů s relapsem ALL.

Naše výsledky jsme publikovali v časopise *Pediatric Blood and Cancer* (Příloha 5).

Diskuze a závěry III.

Genové delece byly obecně považovány za hlavní příčinu změněné genové exprese transkripčního faktoru IKZF1 u pacientů s hematologickými malignitami a jejich negativní prognostický vliv byl jednoznačně prokázán několika studiemi [33-35,88,173]. Proto bylo jedním z cílů naší práce zjistit, zda celogenomová analýza DNA může být pro případné použití v klinické praxi nahrazena podstatně jednodušším a dostupnějším vyšetřením genové exprese izoform IKZF1. Oproti uvedeným studiím [71] jsme ale překvapivě prokázali, že delece IKZF1 nemusí nutně vést ke změněné genové expresi a naopak, aberantní exprese nemusí být vždy způsobena delecí v genu. Tato diskrepance svědčí pro zapojení dalších mechanismů do řízení exprese IKZF1, pravděpodobně cestou regulace alternativního sestřihu: jedním z příkladů může být RNA-vazebný protein HuD, jehož konstitutivní aktivace způsobuje zvýšenou expresi dominantně-negativních izoform IKZF1 [178].

Dosud není zcela jasné, jakým způsobem ovlivňuje genovou a proteinovou expresi IKZF1 monoalelická delece tohoto genu. V tomto případě je sice umožněna exprese IKZF1 z druhé alely (a jak dokumentuje naše práce, často i ve významně vyšší míře), protein byl ale namísto v buněčném jádře pozorován v cytoplazmě, kde nemůže plnit svou funkci [179]. Příčinou dislokace IKZF1 mimo buněčné jádro mohou být i posttranslační úpravy, např. defosforylace pomocí protein fosfatázy 1 [180]. Naše pilotní proteomická data získaná vyšetřením leukemických buněčných linií ukazují, že diskrepance mezi alteracemi na DNA a RNA úrovni se dále prohlubuje na úrovni proteinu a že i u některých buněčných linií s genetickými aberacemi IKZF1 je oproti očekávání značná část proteinu lokalizována v buněčném jádře.

Vyšetřením dvou početných kohort dětí s BCR/ABL-negativní ALL jsme prokázali, že nejen přítomnost delecí v genu IKZF1, jak se dříve předpokládalo, ale i jeho změněná exprese je spojena se špatnou prognózou. Oba uvedené typy alterací IKZF1 definují zčásti odlišné skupiny pacientů a jejich vyšetření může pomoci včas odhalit pacienty s vysokým rizikem relapsu, především ve skupině IRG definované podle poklesu MRN. Nejvíce pacientů ohrožených relapsem ALL lze detekovat kombinací screeningu delecí genu IKZF1 metodou MLPA s vyšetřením genové exprese jeho jednotlivých izoform pomocí RT-PCR. Pokud není současné použití obou metod možné, analýza DNA pomocí MLPA zřejmě identifikuje více rizikových pacientů než vyšetření genové exprese.

Slabší prognostický vliv obou typů alterací IKZF1 u německé kohorty pacientů je pravděpodobně způsoben asociací alterací IKZF1 s vyšší MRN a následným zařazením těchto pacientů do skupiny vyššího rizika při stratifikaci dle hladin MRN – pro pacienty s aberacemi IKZF1 je evidentně výhodné podání intenzivnější léčby. Z vyšetření aberací IKZF1

v kombinaci s průtokovou cytometrií by tedy významně profitovali zejména pacienti s ALL v četných centrech, která zatím nepoužívají pro rizikovou stratifikaci náročnou metodiku stanovení MRN pomocí RQ-PCR kvantifikace klonálních přestaveb Ig/TCR.

Závěr

Jako centrální laboratoř pro dětskou ALL pro Českou republiku provádíme kompletní diagnostiku všech pacientů v republice včetně prospektivního sledování MRN nejen v kostní dřeni, ale i v dalších extramedulárních kompartmentech – zejména v periferní krvi a mozkomíšním moku – nyní už jako členové nejmodernějšího, plně na MRN založeného, protokolu AIEOP-BFM ALL 2009 skupiny BFM, tedy jedné z vedoucích skupin v oblasti dětské ALL v celosvětovém měřítku. Monitorování MRN pomocí technicky, časově i finančně náročné metody kvantifikace přestaveb genů pro Ig/TCR je v současné době na mezinárodní úrovni velmi dobře standardizováno, to bohužel platí o něco méně pro průtokovou cytometrii. Důležitým úkolem do budoucna zůstává zavádění těchto moderních metod v co nejširším okruhu zemí, a tedy ideálně jejich zpřístupnění všem dětským pacientům s ALL ve světě, samozřejmě za přísné kontroly kvality.

V naší práci se zabýváme aktuálními aspekty diagnostiky, prognostikace a léčby ALL u dětí: podáváme důkaz o prognostickém významu MRN v periferní krvi v 15. dni léčby a navrhuje jeho začlenění do stávající rizikové stratifikace léčebných protokolů, které by mělo přispět k lepší identifikaci pacientů ohrožených relapsem ALL; upozorňujeme na vzácné a dosud nedostatečně poznané leukémie se smíšeným fenotypem a s liniovým přesmykem a uvádíme doporučení pro jejich správný klinický management; naše poznatky přinášejí nový pohled na složitou biologii transkripčního faktoru Ikaros (IKZF1) a jednoznačně podporují zavedení testování IKZF1 do klinické praxe, z něhož by měla profitovat zejména četná centra používající léčebné protokoly typu BFM bez rizikové stratifikace založené na monitorování MRN.

Získané poznatky a zkušenosti bychom rádi využili v mezinárodní spolupráci s cílem identifikovat pacienty, u kterých bude možné snížit terapeutickou zátěž a tím i riziko pozdních následků léčby, a naopak včas odhalit co nejvíce dětí s vysoce rizikovou ALL, které mají pomocí stávajících metod malou šanci na vyléčení a mohou profitovat z transplantace kmenových buněk krvetvorby nebo z nasazení experimentální léčby, např. novými chemoterapeutiky nebo bispecifickými protilátkami [181]. Budoucnost léčby dětské ALL tedy spočívá v její postupné individualizaci a přizpůsobení „na míru“ jednotlivým pacientům spolu s dalším zdokonalováním podpůrné terapie, což jistě pomůže k dalšímu zlepšení přežití a kvality života dětí s tímto onemocněním.

Souhrn

V diagnostice a léčbě dětské akutní lymfoblastické leukémie (ALL) bylo během několika uplynulých desetiletí dosaženo vynikajících úspěchů a procento trvale vyléčených dětí a dospívajících vzrostlo téměř na 90%. Základním principem léčby dětské ALL je rozdělení pacientů do skupin s různou intenzitou léčby na základě přesně definovaných prognostických znaků s cílem snížit riziko relapsu onemocnění i toxických komplikací léčby.

Rozvoj nových diagnostických metod, především v oblasti molekulární genetiky a průtokové cytometrie, umožnil další zlepšení rizikové stratifikace - klíčovým prognostickým faktorem se v moderních protokolech pro léčbu dětské ALL stala tzv. minimální reziduální nemoc (MRN) jako citlivý ukazatel odpovědi na léčbu a subklinického leukemického postižení různých kompartmentů v organismu. Stále se ale intenzivně hledají nové znaky umožňující co nejpřesnější charakterizaci leukemického klonu a optimalizují léčebné postupy zohledňující jeho biologii.

V první části naší práce popisujeme výsledky studie sledování a prognostického významu MRN v periferní krvi u dětí s ALL měřené pomocí kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a receptory T-buněk (Ig/TCR) se zaměřením na velmi časná časová body indukční léčby.

Ve druhé části práce jsme se zabývali vlastnostmi, prognózou a léčbou dětské akutní hybridní leukémie neboli leukémie s tzv. smíšeným fenotypem (AHL, MPAL), a to jednak leukémie s významnou koexpresí znaků za normálních okolností příslušných buňkám jiné hematopoetické linie, jednak leukémie s tzv. přesmykem do odlišné linie („lineage switch“) během časně fáze indukční léčby. Tyto vzácné subtypy akutní leukémie byly dosud málo poznány a přístup k jejich léčbě zůstával nejednotný.

Třetí část dizertační práce je věnována transkripčnímu faktoru Ikaros (IKZF1), což je jeden z nových významných rizikových faktorů s potenciálem zařazení do klinické praxe v rámci mezinárodních léčebných protokolů. Mapujeme souvislost alterací IKZF1 na genomické a expresní úrovni a vliv obou typů těchto alterací na prognózu dětské ALL.

V naší práci tedy používáme výše zmíněné moderní metody za účelem identifikace nových prognostických znaků, poznání jejich vzájemných souvislostí i vztahů s již existujícími rizikovými faktory. Na základě našich výsledků uvádíme doporučení pro optimalizaci postupů pro diagnostiku i léčbu dětské ALL.

Summary

Great progress has been achieved in the diagnostics and therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) during the last few decades and the permanent cure rate for children and adolescents has risen to nearly 90%. The basic principle of ALL treatment is to split patients into several groups receiving treatment of different intensity according to exactly defined prognostic features. This is aimed at reducing both the risk of relapse and toxic complications of treatment.

The development of new diagnostic methods, especially in the field of molecular genetics and flow cytometry, allowed further improvements in the risk stratification - the minimal residual disease (MRD) has become a crucial prognostic factor in modern treatment protocols for pediatric ALL as a sensitive marker of both response to therapy and subclinical leukemic involvement of various tissues of the organism. Nevertheless, there is still an intensive search for new markers that would enable even more precise characterization of the leukemic clone, and treatment strategies reflecting the biology of leukemic cells are being optimized.

The first part of our study describes the monitoring and prognostic impact of MRD in peripheral blood of children with ALL with emphasis on very early time points of treatment. MRD was examined by the quantification of immunoglobulin and T-cell receptor (Ig/TCR) gene rearrangements.

In the second part of our study, we focused on the characteristics, prognosis and therapy of childhood acute hybrid leukemia, or mixed phenotype acute leukemia (AHL, MPAL). We studied both acute leukemias with significant expression of molecules that are physiologically expressed in a different lineage, and acute leukemias with a switch from one lineage to another during an early treatment induction phase. These rare subtypes of acute leukemia have been insufficiently explored and their treatment has remained elusive.

The third part of the dissertation is devoted to a transcription factor Ikaros (IKZF1), which is one of the important novel risk factors with great potential for clinical practice. We mapped the connection between IKZF1 alterations on genomic vs. gene expression level and the impact of both types of these alterations on prognosis of childhood ALL.

Thus, in our work we use the aforementioned modern methods to identify novel prognostic markers, explore their mutual relations and connection with known risk factors. Based on this knowledge, we make proposals for the improvement of both diagnostics and treatment of childhood ALL.

Seznam použitých zkratek

ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AHL	akutní hybridní leukémie
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AIEOP	Associazione Italiana di Ematologia Oncologia Pediatrica
AML	akutní myeloidní leukémie
ASH	American Society of Hematology
ASO	allele-specific oligonucleotide
BCP-ALL	B cell precursor acute lymphoblastic leukemia
BCR	breakpoint cluster region
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
CD	cluster of differentiation
CEBP α	CCAAT/enhancer binding protein α
CLIP	Childhood Leukaemia Investigation Prague
CML	chronická myeloidní leukémie
CNA	copy number alteration
CRLF2	cytokine receptor-like factor 2
EFS	event-free survival
EGIL	European Group for the Immunological Classification of Leukemias
ESG-MRD-ALL	European Study Group on Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
FSC	forward scatter
GSTM1	glutathione S-transferase Mu 1
HRG	high risk group
Ig	imunoglobulin
IgH	těžký řetězec imunoglobulinu (immunoglobulin heavy chain)
Ig κ	lehký řetězec imunoglobulinu κ
IgL	lehký řetězec imunoglobulinu (immunoglobulin light chain)
IKZF1	Ikaros family zinc finger 1
IRG	intermediate risk group

JAK	Janus kinase
KDE	kappa deleting element
LAIP	leukemia-associated immunophenotype
MLL	mixed-lineage leukemia
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MPAL	mixed-phenotype acute leukemia
MRN	minimální reziduální nemoc
MRN _{KD} ^{high}	podskupina pacientů s MRN v kostní dřeni v 15. dni léčby vyšší než 10^{-4}
MRN _{KD} ^{low}	podskupina pacientů s MRN v kostní dřeni v 15. dni léčby nižší než 10^{-4}
MRN _{PK} ^{high}	podskupina pacientů s MRN v krvi v 15. dni léčby vyšší než 10^{-4}
MRN _{PK} ^{low}	podskupina pacientů s MRN v krvi v 15. dni léčby nižší než 10^{-4}
mRNA	mediátorová RNA
PCA	principal component analysis
PCR	polymerase chain reaction
PGR	prednisone good response
PPR	prednisone poor response
PSDH	pracovní skupina dětské hematologie
RAG	recombination activating gene
RFS	relapse-free survival
RQ-PCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SNP	single-nucleotide polymorphism
SRG	standard risk group
SSC	side scatter
T-ALL	akutní lymfoblastická leukémie z T-řady
TCR	T-buněčný receptor (T-cell receptor)
TCR α	α podjednotka T-buněčného receptoru
TCR β	β podjednotka T-buněčného receptoru
TCR γ	γ podjednotka T-buněčného receptoru
TCR δ	δ podjednotka T-buněčného receptoru
TdT	terminální deoxynukleotidyltransferáza

T _m	melting temperature
TPMT	thiopurin metyltransferáza
TS	thymidylátsyntetáza
WHO	World Health Organisation

Použitá literatura

1. Pinkel D, et al. Nine years' experience with "total therapy" of childhood acute lymphocytic leukemia. *Pediatrics* 1972;50(2):246-251.
2. Riehm H, et al. Results and significance of six randomized trials in four consecutive ALL-BFM studies. *Haematol Blood Transfus* 1990;33:439-450.
3. Schrappe M. Evolution of BFM trials for childhood ALL. *Ann Hematol* 2004;83 Suppl 1:S121-123.
4. Moricke A, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 2010;24(2):265-284.
5. Conter V, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 2010;115(16):3206-3214.
6. Gaynon PS, et al. Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983-2002: a Children's Oncology Group Report. *Leukemia* 2010;24(2):285-297.
7. Stary J, et al. Long-term results of treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in the Czech Republic. *Leukemia* 2010;24(2):425-428.
8. Silverman LB, et al. Long-term results of Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1985-2000). *Leukemia* 2010;24(2):320-334.
9. Schmiegelow K, et al. Long-term results of NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2010;24(2):345-354.
10. Pui CH, et al. Long-term results of St Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2010;24(2):371-382.
11. Mitchell C, et al. Long-term follow-up of the United Kingdom medical research council protocols for childhood acute lymphoblastic leukaemia, 1980-2001. *Leukemia* 2010;24(2):406-418.
12. Kamps WA, et al. Long-term results of Dutch Childhood Oncology Group studies for children with acute lymphoblastic leukemia from 1984 to 2004. *Leukemia* 2010;24(2):309-319.
13. Bally C, et al. Outcome of acute promyelocytic leukemia (APL) in children and adolescents: an analysis in two consecutive trials of the European APL Group. *J Clin Oncol* 2012;30(14):1641-1646.
14. Creutzig U, et al. Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 2005;19(12):2030-2042.
15. Lie SO, et al. Long-term results in children with AML: NOPHO-AML Study Group--report of three consecutive trials. *Leukemia* 2005;19(12):2090-2100.
16. Ravindranath Y, et al. Pediatric Oncology Group (POG) studies of acute myeloid leukemia (AML): a review of four consecutive childhood AML trials conducted between 1981 and 2000. *Leukemia* 2005;19(12):2101-2116.
17. Rubnitz JE, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol* 2010;11(6):543-552.
18. Moricke A, et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric

- and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* 2008;111(9):4477-4489.
19. Coustan-Smith E, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998;351(9102):550-554.
 20. van Dongen JJ, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998;352(9142):1731-1738.
 21. Hunger SP, et al. Improving outcomes for high-risk ALL: translating new discoveries into clinical care. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56(6):984-993.
 22. Pui CH, et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2012;29(5):551-565.
 23. Pongers-Willemse MJ, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13(1):110-118.
 24. van Dongen JJ, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17(12):2257-2317.
 25. van der Velden VH, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007;21(4):604-611.
 26. Fronkova E, et al. Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing? *Leukemia* 2008;22(5):989-997.
 27. Gerr H, et al. Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations. *Br J Haematol* 2010;149(1):84-92.
 28. Killick S, et al. Outcome of biphenotypic acute leukemia. *Haematologica* 1999;84(8):699-706.
 29. Matutes E, et al. Definition of acute biphenotypic leukemia. *Haematologica* 1997;82(1):64-66.
 30. Owaidah TM, et al. Cytogenetics, molecular and ultrastructural characteristics of biphenotypic acute leukemia identified by the EGIL scoring system. *Leukemia* 2006;20(4):620-626.
 31. Krawczuk-Rybak M, et al. A lineage switch from AML to ALL with persistent translocation t(4;11) in congenital leukemia. *Med Pediatr Oncol* 2003;41(1):95-96.
 32. Bierings M, et al. Two consecutive immunophenotypic switches in a child with immunogenotypically stable acute leukaemia. *Br J Haematol* 2001;113(3):757-762.
 33. Mullighan CG, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2009;360(5):470-480.
 34. Kuiper RP, et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia* 2010;24(7):1258-1264.
 35. Waanders E, et al. Integrated use of minimal residual disease classification and IKZF1 alteration status accurately predicts 79% of relapses in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2011;25(2):254-258.
 36. Crist W, et al. Clinical and biologic features predict poor prognosis in acute lymphoid leukemias in children and adolescents: a Pediatric Oncology Group review. *Med Pediatr Oncol* 1986;14(3):135-139.
 37. Sather HN. Age at diagnosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1986;14(3):166-172.

38. Pieters R, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet* 2007;370(9583):240-250.
39. Van der Velden VH, et al. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia* 2009;23(6):1073-1079.
40. Ram R, et al. Adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia have a better outcome when treated with pediatric-inspired regimens: systematic review and meta-analysis. *Am J Hematol* 2012;87(5):472-478.
41. Schrappe M, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 2000;95(11):3310-3322.
42. Zeidler L, et al. Low platelet counts after induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia are strongly associated with poor early response to treatment as measured by minimal residual disease and are prognostic for treatment outcome. *Haematologica* 2012;97(3):402-409.
43. Riehm H, et al. [Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83)]. *Klin Padiatr* 1987;199(3):151-160.
44. Lauten M, et al. Prediction of outcome by early bone marrow response in childhood acute lymphoblastic leukemia treated in the trial ALL-BFM 95. Differential effects in precursor B-cell and T-cell leukemia. *Haematologica* 2012; 97(7):1048-56.
45. Pui CH, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med* 2009;360(26):2730-2741.
46. Pollock BH, et al. Racial differences in the survival of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2000;18(4):813-823.
47. Bhatia S, et al. Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(6):1957-1964.
48. Kadan-Lottick NS, et al. Survival variability by race and ethnicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Jama* 2003;290(15):2008-2014.
49. Linabery AM, Ross JA. Childhood and adolescent cancer survival in the US by race and ethnicity for the diagnostic period 1975-1999. *Cancer* 2008;113(9):2575-2596.
50. Chen B, et al. Newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in China (I): abnormal genetic patterns in 1346 childhood and adult cases and their comparison with the reports from Western countries. *Leukemia* 2012;26(7):1608-16.
51. Harvey RC, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010;115(26):5312-5321.
52. Harvey RC, et al. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* 2010;116(23):4874-84.
53. Bhatia S, et al. Nonadherence to Oral Mercaptopurine and Risk of Relapse in Hispanic and Non-Hispanic White Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2012;30(17):2094-2101.
54. Trueworthy R, et al. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1992;10(4):606-613.

55. Moorman AV, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol* 2010;11(5):429-438.
56. Sutcliffe MJ, et al. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia* 2005;19(5):734-740.
57. Sharathkumar A, et al. Children with hyperdiploid but not triple trisomy (+4,+10,+17) acute lymphoblastic leukemia have an increased incidence of extramedullary relapse on current therapies: a single institution experience. *Am J Hematol* 2008;83(1):34-40.
58. Harrison CJ, et al. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2004;125(5):552-559.
59. Nachman JB, et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007;110(4):1112-1115.
60. Guidez F, et al. Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood* 2000;96(7):2557-2561.
61. Forestier E, et al. Outcome of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol: frequent late relapses but good overall survival. *Br J Haematol* 2008;140(6):665-672.
62. Bhojwani D, et al. ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia* 2012;26(2):265-270.
63. Ramakers-van Woerden NL, et al. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(3):1094-1099.
64. Gandemer V, et al. Excellent prognosis of late relapses of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: lessons from the FRALLE 93 protocol. *Haematologica* 2012 May 11. [Epub ahead of print].
65. Ford AM, et al. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(8):4584-4588.
66. Zuna J, et al. TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2004;10(16):5355-5360.
67. van Delft FW, et al. Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011;117(23):6247-6254.
68. Zuna J, et al. TEL/AML1 and immunoreceptor gene rearrangements-which comes first? *Leuk Res* 2005;29(6):633-639.
69. Arico M, et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2000;342(14):998-1006.
70. Schultz KR, et al. Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5175-5181.
71. Mullighan CG, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008;453(7191):110-114.
72. Den Boer ML, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 2009;10(2):125-134.
73. Roberts KG, et al. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2012;22(2):153-166.

74. Jeha S, et al. Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. *Leukemia* 2009;23(8):1406-1409.
75. Meyer C, et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2009;23(8):1490-1499.
76. Bardini M, et al. DNA copy-number abnormalities do not occur in infant ALL with t(4;11)/MLL-AF4. *Leukemia* 2010;24(1):169-176.
77. Pui CH, et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002;359(9321):1909-1915.
78. Pieters R, et al. Relation between age, immunophenotype and in vitro drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia--implications for treatment of infants. *Leukemia* 1998;12(9):1344-1348.
79. Brown P, et al. Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner. *Leukemia* 2006;20(8):1368-1376.
80. Armstrong SA, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002;30(1):41-47.
81. Stumpel DJ, et al. Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options. *Blood* 2009;114(27):5490-5498.
82. Schafer E, et al. Promoter hypermethylation in MLL-r infant acute lymphoblastic leukemia: biology and therapeutic targeting. *Blood* 2010;115(23):4798-4809.
83. Kang H, et al. Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2012;119(8):1872-1881.
84. Harewood L, et al. Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. *Leukemia* 2003;17(3):547-553.
85. Soulier J, et al. Amplification of band q22 of chromosome 21, including AML1, in older children with acute lymphoblastic leukemia: an emerging molecular cytogenetic subgroup. *Leukemia* 2003;17(8):1679-1682.
86. Moorman AV, et al. Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). *Blood* 2007;109(6):2327-2330.
87. Attarbaschi A, et al. Minimal residual disease values discriminate between low and high relapse risk in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and an intrachromosomal amplification of chromosome 21: the Austrian and German acute lymphoblastic leukemia Berlin-Frankfurt-Munster (ALL-BFM) trials. *J Clin Oncol* 2008;26(18):3046-3050.
88. Mullighan CG, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007;446(7137):758-764.
89. Kuiper RP, et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* 2007;21(6):1258-1266.
90. Kawamata N, et al. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood* 2008;111(2):776-784.
91. Ferrando AA, Look AT. Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2003;40(4):274-280.
92. Meijerink JP, et al. New genetic abnormalities and treatment response in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2009;46(1):16-23.

93. Weng AP, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004;306(5694):269-271.
94. Jarosova M, et al. Complex karyotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: cytogenetic and molecular cytogenetic study of 21 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;145(2):161-168.
95. Trevino LR, et al. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2009;41(9):1001-1005.
96. Papaemmanuil E, et al. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2009;41(9):1006-1010.
97. Xu H, et al. ARID5B genetic polymorphisms contribute to racial disparities in the incidence and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2012;30(7):751-757.
98. Relling MV, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89(3):387-391.
99. Borst L, et al. Gene dose effects of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms on outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2012;34(1):38-42.
100. Lauten M, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism and its association with relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003;88(3):353-354.
101. Dulucq S, et al. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood* 2008;111(7):3692-3700.
102. de Jonge R, et al. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009;113(10):2284-2289.
103. Lightfoot TJ, et al. Genetic variation in the folate metabolic pathway and risk of childhood leukemia. *Blood* 2010;115(19):3923-3929.
104. Fronkova E, et al. B-cell reconstitution after allogeneic SCT impairs minimal residual disease monitoring in children with ALL. *Bone Marrow Transplant* 2008;42(3):187-196.
105. Lucio P, et al. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. *Leukemia* 2001;15(8):1185-1192.
106. Campana D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23(5):1083-1098, vii.
107. Coustan-Smith E, et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011;117(23):6267-6276.
108. Kalina T, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012;26(9):1986-2010.
109. van Dongen JJ, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13(12):1901-1928.
110. Gabert J, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17(12):2318-2357.

111. Bruggemann M, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia* 2010;24(3):521-535.
112. Fronkova E, et al. TEL/AML 1 real-time quantitative reverse transcriptase PCR can complement minimal residual disease assessment in childhood ALL. *Leukemia* 2005;19(7):1296-1297.
113. Zaliova M, et al. Quantification of fusion transcript reveals a subgroup with distinct biological properties and predicts relapse in BCR/ABL-positive ALL: implications for residual disease monitoring. *Leukemia* 2009;23(5):944-951.
114. Gaipa G, et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and RQ-PCR in minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2012;97(10):1582-93.
115. Gameiro P, et al. Polymerase chain reaction (PCR)- and reverse transcription PCR-based minimal residual disease detection in long-term follow-up of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2002;119(3):685-696.
116. Pui CH, et al. Rationale and design of Total Therapy Study XV for newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 2004;83 Suppl 1:S124-126.
117. Schultz KR, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* 2007;109(3):926-935.
118. Zhou J, et al. Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCI ALL Consortium Protocol 95-01. *Blood* 2007;110(5):1607-1611.
119. Borowitz MJ, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111(12):5477-5485.
120. Yamaji K, et al. Minimal residual disease-based augmented therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Japanese Childhood Cancer and Leukemia Study Group. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55(7):1287-95.
121. Panzer Grumayer ER, et al. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;95(3):790-794.
122. Sutton R, et al. Clinical significance of minimal residual disease at day 15 and at the end of therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2009;146(3):292-299.
123. Basso G, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5168-5174.
124. Ratei R, et al. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia* 2009;23(3):528-534.
125. Mejstrikova E, et al. Detection of residual B precursor lymphoblastic leukemia by uniform gating flow cytometry. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54(1):62-70.
126. Bader P, et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol* 2009;27(3):377-384.

127. Leung W, et al. Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia. *Blood* 2012;120(2):468-472.
128. Coustan-Smith E, et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(7):2399-2402.
129. van der Velden VH, et al. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL. *Leukemia* 2002;16(8):1432-1436.
130. Brisco MJ, et al. Molecular relapse can be detected in blood in a sensitive and timely fashion in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001;15(11):1801-1802.
131. 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(1-2):1-91.
132. Alt FW, et al. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J* 1984;3(6):1209-1219.
133. Schatz DG. Antigen receptor genes and the evolution of a recombinase. *Semin Immunol* 2004;16(4):245-256.
134. Langerak AW, et al. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 1997;11(12):2192-2199.
135. Panaro NJ, et al. Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the agilent 2100 bioanalyzer. *Clin Chem* 2000;46(11):1851-1853.
136. Mueller O, et al. A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* 2000;21(1):128-134.
137. Verhagen OJ, 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):1426-1435.
138. Szczepanski T, et al. Precursor-B-ALL with D(H)-J(H) gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14. *Leukemia* 2001;15(9):1415-1423.
139. van der Velden VH, 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):928-936.
140. van der Velden VH, 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(7):1372-1380.
141. van der Velden VH, 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):1971-1980.
142. Mejstrikova E, et al. Correlation of CD33 with poorer prognosis in childhood ALL implicates a potential of anti-CD33 frontline therapy. *Leukemia* 2005;19(6):1092-1094.
143. Hiddemann W, et al. Frequency and clinical significance of DNA aneuploidy in acute leukemia. *Ann N Y Acad Sci* 1986;468:227-240.
144. Ojala AE, et al. Abdominal ultrasound findings during and after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1997;29(4):266-271.
145. Mejstrikova E, et al. Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria. *Haematologica* 2010;95(6):928-935.

146. Rubnitz JE, et al. Acute mixed lineage leukemia in children: the experience of St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 2009;113(21):5083-5089.
147. Lo Coco F. Hybrid phenotypes and lineage promiscuity in acute leukemia. *Haematologica* 1991;76(3):215-225.
148. Hrusak O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002;16(7):1233-1258.
149. Uckun FM, et al. Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen positive acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* 1997;90(1):28-35.
150. Pui CH, et al. Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid-associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1998;16(12):3768-3773.
151. Bene MC, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9(10):1783-1786.
152. Bene MC, et al. The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Blood* 1998;92(2):596-599.
153. Legrand O, et al. Adult biphenotypic acute leukaemia: an entity with poor prognosis which is related to unfavourable cytogenetics and P-glycoprotein over-expression. *Br J Haematol* 1998;100(1):147-155.
154. Stasik C, et al. Infant acute lymphoblastic leukemia with t(11;16)(q23;p13.3) and lineage switch into acute monoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;168(2):146-149.
155. Rossi JG, et al. Lineage switch in childhood acute leukemia: An unusual event with poor outcome. *Am J Hematol* 2012;87(9):890-897.
156. Oh SH, et al. Chronic myelogenous leukemia showing biphenotypic blast crisis followed by lineage switch to B lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2009;33(11):e195-198.
157. Radtke I, et al. Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(31):12944-12949.
158. Boeckx N, et al. Fusion gene transcripts and Ig/TCR gene rearrangements are complementary but infrequent targets for PCR-based detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002;16(3):368-375.
159. 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):2149-2156.
160. Ridge SA, et al. Rapid intraclonal switch of lineage dominance in congenital leukaemia with a MLL gene rearrangement. *Leukemia* 1995;9(12):2023-2026.
161. Xie H, et al. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 2004;117(5):663-676.
162. Di Tullio A, et al. CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP(alpha))-induced transdifferentiation of pre-B cells into macrophages involves no overt retrodifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(41):17016-17021.
163. Tonnelle C, et al. Stage specific over-expression of the dominant negative Ikaros 6 reveals distinct role of Ikaros throughout human B-cell differentiation. *Mol Immunol* 2009;46(8-9):1736-1743.
164. Payne KJ, Dovat S. Ikaros and tumor suppression in acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncog* 2011;16(1-2):3-12.

165. Molnar A, Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1994;14(12):8292-8303.
166. Yoshida T, et al. Awakening lineage potential by Ikaros-mediated transcriptional priming. *Curr Opin Immunol* 2010;22(2):154-160.
167. Georgopoulos K, et al. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 1994;79(1):143-156.
168. Winandy S, et al. A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* 1995;83(2):289-299.
169. Nakase K, et al. Dominant negative isoform of the Ikaros gene in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2000;60(15):4062-4065.
170. Takanashi M, et al. Expression of the Ikaros gene family in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2002;117(3):525-530.
171. Klein F, et al. BCR-ABL1 induces aberrant splicing of IKAROS and lineage infidelity in pre-B lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene* 2006;25(7):1118-1124.
172. Iacobucci I, et al. Expression of spliced oncogenic Ikaros isoforms in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: implications for a new mechanism of resistance. *Blood* 2008;112(9):3847-3855.
173. Zhou F, et al. Expression of Ikaros isoform 6 in chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011;33(6):429-432.
174. Virely C, et al. Haploinsufficiency of the IKZF1 (IKAROS) tumor suppressor gene cooperates with BCR-ABL in a transgenic model of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2010;24(6):1200-1204.
175. Suzuki K, et al. IKAROS isoform 6 enhances BCR-ABL1-mediated proliferation of human CD34+ hematopoietic cells on stromal cells. *Int J Oncol* 2012;40(1):53-62.
176. Iacobucci I, et al. Identification of different Ikaros cDNA transcripts in Philadelphia-positive adult acute lymphoblastic leukemia by a high-throughput capillary electrophoresis sizing method. *Haematologica* 2008;93(12):1814-1821.
177. Fairbrother WG, et al. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 2002;297(5583):1007-1013.
178. Bellavia D, et al. Notch3 and the Notch3-upregulated RNA-binding protein HuD regulate Ikaros alternative splicing. *EMBO J* 2007;26(6):1670-1680.
179. Marcais A, et al. Genetic inactivation of Ikaros is a rare event in human T-ALL. *Leuk Res* 2010;34(4):426-429.
180. Popescu M, et al. Ikaros stability and pericentromeric localization are regulated by protein phosphatase 1. *J Biol Chem* 2009;284(20):13869-13880.
181. Topp MS, et al. Long-term follow-up of hematological relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with minimal residual disease (MRD) of B-precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2012; Sep 28. [Epub ahead of print].

Přílohy

Příloha 1. Jana Volejnikova, Ester Mejstrikova, Tatana Valova, Leona Reznickova, Ladislava Hodonska, Vladimir Mihal, Jaroslav Sterba, Yahia Jabali, Daniela Prochazkova, Bohumir Blazek, Jiri Hak, Zdenka Cerna, Ondrej Hrusak, Jan Sary, Jan Trka and Eva Fronkova: Minimal residual disease in peripheral blood at day 15 identifies a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with superior prognosis. *Haematologica* 2011; 96(12):1815-21

Příloha 2. Volejníková J., Mejstříková E., Slámová L., Mihál V., Štěrba J., Jabali Y., Procházková D., Blažek B., Hak J., Černá Z., Hrušák O., Starý J., Trka J., Froňková E.: Stanovení mimodřeňové leukemické infiltrace u dětské akutní lymfoblastické leukémie a jeho klinické využití. *Transfuze a hematologie dnes* 2012; 3(18):125-129

Příloha 3. Ester Mejstrikova, Jana Volejnikova, Eva Fronkova, Katerina Zdrahalova, Tomas Kalina, Jaroslav Sterba, Yahia Jabali, Vladimir Mihal, Bohumir Blazek, Zdena Cerna, Daniela Prochazkova, Jiri Hak, Zuzana Zemanova, Marie Jarosova, Alexandra Oltova, Petr Sedlacek, Jiri Schwarz, Jan Zuna, Jan Trka, Jan Stary and Ondrej Hrusak: Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria. *Haematologica* 2010; 95(6):928-35

Příloha 4. Ester Mejstrikova, Lucie Slamova, Eva Fronkova, Elena Vodickova, Jana Volejnikova, Marketa Zaliova, Leona Reznickova, Frederik W. van Delft, Zuzana Zemanova, Gunnar Cario, Tomas Kalina, Karel Fiser, Jean Pierre Bourquin, Michael Dworzak, Jan Zuna, Jan Trka, Jan Sary and Ondrej Hrusak: Subset of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia with an early switch to monocytic lineage. *Rukopis v přípravě*

Příloha 5. J. Volejnikova, E. Mejstrikova, P. Dörge, B. Meissner, K. Svojgr, M. Stanulla, G. Cario, M. Schrappe, J. Stary, O. Hrusak, J. Trka and E. Fronkova: Ikaros (IKZF1) alterations and minimal residual disease at day 15 assessed by flow cytometry predict prognosis of childhood BCR/ABL-negative acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer* 2012; Sep 19. doi: 10.1002/pbc.24299. [Epub ahead of print]

Příloha 6. Seznam publikací, abstrakt a přednášek

Publikace:

1. publikace, které jsou podkladem dizertace:

a) s IF

Ester Mejstrikova, Jana Volejnikova, Eva Fronkova, Katerina Zdrahalova, Tomas Kalina, Jaroslav Sterba, Yahia Jabali, Vladimir Mihal, Bohumir Blazek, Zdena Cerna, Daniela Prochazkova, Jiri Hak, Zuzana Zemanova, Marie Jarosova, Alexandra Oltova, Petr Sedlacek, Jiri Schwarz, Jan Zuna, Jan Trka, Jan Stary and Ondrej Hrusak: Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria. *Haematologica* 2010; 95(6):928-35 (IF=6,532)

Jana Volejnikova, Ester Mejstrikova, Tatana Valova, Leona Reznickova, Ladislava Hodonska, Vladimir Mihal, Jaroslav Sterba, Yahia Jabali, Daniela Prochazkova, Bohumir Blazek, Jiri Hak, Zdenka Cerna, Ondrej Hrusak, Jan Stary, Jan Trka and Eva Fronkova: Minimal residual disease in peripheral blood at day 15 identifies a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with superior prognosis. *Haematologica* 2011; 96(12):1815-21 (IF=6,532)

J. Volejnikova, E. Mejstrikova, P. Dörge, B. Meissner, K. Svojgr, M. Stanulla, G. Cario, M. Schrappe, J. Stary, O. Hrusak, J. Trka and E. Fronkova: Ikaros (IKZF1) alterations and minimal residual disease at day 15 assessed by flow cytometry predict prognosis of childhood BCR/ABL-negative acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood and Cancer* 2012; Přijato k tisku (IF=1,891)

Ester Mejstrikova, Lucie Slamova, Eva Fronkova, Elena Vodickova, Jana Volejnikova, Marketa Zaliova, Leona Reznickova, Frederik W. van Delft, Zuzana Zemanova, Gunnar Cario, Tomas Kalina, Karel Fiser, Jean Pierre Bourquin, Michael Dworzak, Jan Zuna, Jan Trka, Jan Stary and Ondrej Hrusak: Subset of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia with an early switch to monocytic lineage. *Rukopis v recenzním řízení.* (IF=)

b) bez IF

Volejníková J., Mejstříková E., Slámová L., Mihál V., Štěrba J., Jabali Y., Procházková D., Blažek B., Hak J., Černá Z., Hrušák O., Starý J., Trka J., Froňková E.: Stanovení mimodřeňové leukemické infiltrace u dětské akutní lymfoblastické leukémie a jeho klinické využití. *Transfuze a hematologie dnes* 2012; 18(3):

2. publikace bez vztahu k tématu dizertace:

a) s IF

Jan Verner, Jitka Kabathova, Alexandra Tomancova, Sarka Pavlova, Boris Tichy, Marek Mraz, Yvona Brychtova, Marta Krejci, Zbynek Zdrahal, Martin Trbusek, Jana Volejnikova, Petr Sedlacek, Michael Doubek, Jiri Mayer, Sarka Pospisilova: Gene expression profiling of acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental Hematology*, 2012; 40(): (IF=3,198)

Abstrakta v časopisech s IF:

Ester Mejstrikova, Jana Volejnikova, Eva Fronkova, Tomas Kalina, Katerina Zdrahalova, Andrea Polouckova, Elena Vodickova, Zuzana Zemanova, Leona Reznickova, Martina Vaskova, Martin Kovac, Jan Zuna, Jan Trka, Jan Sary, Ondrej Hrusak: Biology of childhood acute hybrid leukemias in a population-based study (Czech Pediatric Hematology Working Group)

49th ASH Annual Meeting, Atlanta, 2007. *Blood*, Nov 2007; 110(11): Abstract 4247

Jana Volejnikova, Eva Fronkova, Ester Mejstrikova, Katerina Muzikova, Leona Reznickova, Dagmar Pospisilova, Jaroslav Sterba, Yahia Jabali, Daniela Prochazkova, Bohumir Blazek, Jiri Hak, Zdenka Cerna, Jan Sary, Jan Trka: Prognostic Impact of Peripheral Blood Involvement during Early Time Points of Childhood ALL Treatment

50th ASH Annual Meeting, San Francisco, 2008. *Blood*, Nov 2008; 112(11): Abstract 1489

Jana Volejnikova, Ester Mejstrikova, Jan Sary, Jan Trka, Eva Fronkova: Relative Expression of Ikaros Isoforms Has a Prognostic Impact in Philadelphia-Negative Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia

51st ASH Annual Meeting, New Orleans, 2009. *Blood*, Nov 2009; 114(22): Abstract 1282

Karel Svojgr, Tomas Kalina, Tomas Brdicka, Tereza Kacerova, Jana Volejnikova, Jan Sary, Jan Zuna: Selected Adaptor Proteins NTAL, LAT, PAG, LIME Function in Proximal Signaling, Corticosteroid Driven Apoptosis and Expression of IKAROS Isoforms in the T-leukemic Cells

51st ASH Annual Meeting, New Orleans, 2009. *Blood*, Nov 2009; 114(22): Abstract 5034

Jana Volejnikova, Ester Mejstrikova, Karel Svojgr, Jan Sary, Jan Trka, Eva Fronkova: Prognostic Impact of Ikaros (IKZF1) Gene Alterations In Childhood ALL Treated with ALL IC-BFM 2002 Protocol: A Comparison of Gene Expression and Genomic-Based Methods

52nd ASH Annual Meeting, Orlando, 2010. *Blood*, Nov 2010; 116(21): Abstract 1656

Ester Mejstrikova, Lucie Slamova, Eva Fronkova, Jana Volejnikova, Katerina Muzikova, Jiri Domansky, Jaroslav Sterba, Ondrej Zapletal, Zuzana Zemanova, Libuse Lizcova, Elena Vodickova, Jan Zuna, Jan Trka, Jan Sary, Ondrej Hrusak: Acute Bilineal Leukemia Is a Very Rare Entity in Childhood

53rd ASH Annual Meeting, San Diego, 2011. *Blood*, Nov 2011; 118(21): Abstract 4871

Přednášky:

Longauerová L., Volejníková J., Mihál V., Zapletalová J.: Kvalita života pacientů po léčbě ALL – tělesný vývoj a endokrinologické aspekty
XV. konference dětských hematologů a onkologů ČR a SR, České Budějovice, 2005

Volejníková J., Longauerová L., Mihál V., Zapletalová J., Obereignerů R.: Kvalita života pacientů po léčbě ALL - osobnost, výskyt depresivity a vztahy v rodině
Celostátní konference studentských vědeckých prací ČR a SR, Olomouc, 2005

Volejníková J., Froňková E., Mejstříková E., Řezníčková L., Skočovská T.: Spektrum Ig/TCR přestaveb u akutních hybridních leukémií
Výjezdni zasedání Poruchy krvetvorby v dětském věku, 2007

Volejníková J., Froňková E., Mejstříková E., Mužíková K., Řezníčková L., Pospíšilová D., Štěrba J., Jabali Y., Procházková D., Blažek B., Hak J., Černá Z., Starý J., Trka J.:
Prognostický význam vyšetření periferní krve v průběhu léčby dětské akutní lymfoblastické leukémie (ALL)

18. konference dětských hematologů a onkologů ČR a SR, Plzeň, 2008

Volejníková J., Froňková E., Mejstříková E., Mužíková K., Řezníčková L., Pospíšilová D., Mihál V., Štěrba J., Jabali Y., Procházková D., Blažek B., Hak J., Černá Z., Starý J., Trka J.:
Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) u dětí: proč vyšetřovat periferní krev během léčby
Vědecká konference 2. LF UK 2009, Praha, 2009

MRD in PB at Early Treatment Time Points Predicts Prognosis of Childhood ALL

Jana Volejnikova, Ester Mejstrikova, Tatana Valova, Leona Reznickova, Vladimir Mihal, Jaroslav Sterba, Yahia Jabali, Daniela Prochazkova, Bohumir Blazek, Jiri Hak, Zdenka Cerna, Ondrej Hrusak, Jan Stary, Jan Trka and Eva Fronkova

20th Annual Meeting of the International BFM Study Group, Bergamo, 2009

Volejníková J., Froňková E., Mejstříková E., Mužíková K., Řezníčková L., Pospíšilová D., Mihál V., Štěrba J., Jabali Y., Procházková D., Blažek B., Hak J., Černá Z., Starý J., Trka J.:
Prognostický význam vyšetření periferní krve v průběhu léčby dětské ALL
XXIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 2009

J. Volejnikova, E. Mejstrikova, T. Valova, L. Reznickova, J. Stary, J. Trka, E. Fronkova:
Minimal Residual Disease in Peripheral Blood Predicts Prognosis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia

6th International Medical Postgraduate Conference, Hradec Králové, 2009

Volejnikova J., Valova T, Muzikova K, Stary J, Zuna J, Fronkova E, Trka J: Minimal Residual Disease and its Prognostic Impact on Pediatric ALL

Current Trends and Standards in Paediatric and Adult Acute Leukaemia, Budapest, 2010

J. Volejníková, E. Mejstříková, K. Švojgr, J. Starý, J. Trka, E. Froňková: Alterace genu Ikaros (IKZF1) a jejich vliv na prognózu dětí s ALL léčených podle protokolu ALL IC-BFM 2002
XX. konference dětských hematologů a onkologů ČR a SR, Praha, 2010

J. Volejníková, E. Mejstříková, T. Valová, L. Řezníčková, L. Hodonská, V. Mihál, J. Štěrba, Y. Jabali, D. Procházková, B. Blažek, J. Hak, Z. Černá, O. Hrušák, J. Starý, J. Trka, E. Froňková: Minimální reziduální nemoc v periferní krvi v časně fázi léčby je důležitým ukazatelem prognózy u dětí s B-prekurzorovou akutní lymfoblastickou leukémií
Diagnosa a výzkum dětských akutních leukemií v 21. století, Měřín, 2010

Volejníková J., Mejstříková E., Švojgr K., Starý J., Trka J. a Froňková E.: Alterace genu Ikaros (IKZF1) a jejich vliv na prognózu dětí s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL)
Vědecká konference 2. LF UK, Praha, 2011 – *cena proděkana pro vědu a výzkum*

Jana Volejnikova, Ester Mejstrikova, Karel Svojgr, Jan Stary, Jan Trka, Eva Fronkova:
Genomic vs. gene expression-based methods in the detection of Ikaros (IKZF1) alterations and evaluation of their prognostic impact in childhood ALL

16th Congress of the European Hematology Association, London, 2011

Volejníková J., Mejstříková E., Švojgr K., Starý J., Trka J., Froňková E.: Alterace genu Ikaros (IKZF1) a jejich vliv na prognózu dětí s akutní lymfoblastickou leukémií
XXV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 2011

Volejníková J., Mejstříková E., Švojgr K., Starý J., Trka J., Froňková E.: Alterace genu Ikaros (IKZF1) a jejich vliv na prognózu dětí s akutní lymfoblastickou leukémií
XXI. konference dětských hematologů a onkologů ČR a SR, Ústí nad Labem, 2011 – *cena za nejlepší přednášku účastníka do 35 let věku*

J. Volejnikova, E. Mejsstrikova, P. Dörge, K. Svojgr, B. Meissner, M. Stanulla, G. Cario, M. Schrappe, O. Hrusak, J. Sary, J. Trka, E. Fronkova: Ikaros (*IKZF1*) alterations and minimal residual disease at day 15 assessed by flow cytometry predict prognosis of childhood *BCR/ABL*-negative acute lymphoblastic leukemia
8th International Conference of Postgraduate Medical Students, Hradec Králové, 2011

Ikaros (IKZF1) alterations and minimal residual disease at day 15 assessed by flow cytometry predict prognosis of childhood BCR/ABL-negative ALL
Jana Volejnikova, Ester Mejsstrikova, Petra Dörge, Barbara Meissner, Karel Svojgr, Martin Stanulla, Gunnar Cario, Martin Schrappe, Jan Sary, Ondrej Hrusak, Jan Trka and Eva Fronkova
8th Biennial Childhood Leukemia Symposium, Santiago de Chile, 2012

Vliv různých typů alterací genu Ikaros (IKZF1) na prognózu dětí s akutní lymfoblastickou leukémií
J. Volejníková, E. Mejstříková, P. Dörge, D. Černá, V. Kanderová, V. Budínský, M. Stanulla, O. Hrušák, J. Trka, T. Kalina, E. Froňková
XVI. Česko-slovenský hematologický a transfuziologický sjezd, Brno, 2012

Aberace transkripčního faktoru Ikaros (IKZF1) mají významný negativní vliv na prognózu akutní lymfoblastické leukémie u dětí
Volejníková J., Mejstříková E., Dörge P., Černá D., Kanderová V., Budínský V., Stanulla M., Hrušák O., Starý J., Trka J., Kalina T. a Froňková E.
X. český pediatrický kongres s mezinárodní účastí, Liberec, 2012