

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů.



Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

**Srovnání detekce minimální reziduální nemoci definované průtokovou
cytometrií a kvantitativní PCR u dětských pacientů s akutní
lymfoblastickou leukémií**

Soňa Hubáčková

Praha 2007

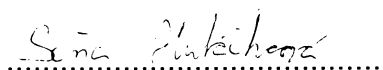
Vedoucí diplomové práce: Prof. MUDr. Jan Trka, Ph.D.

Klinika dětské hematologie a onkologie

2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova

pracovní skupina CLIP – Childhood Leukemia Investigation Prague

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury a pod odborným vedením Prof. MUDr. Jana Trky, Ph.D.



Soňa Hubáčková

V Praze 26.4.2007

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Prof. MUDr. Janu Trkovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a za to, že mi umožnil pracovat ve své laboratoři, MUDr. Evě Froňkové, Ph.D. a MUDr. E. Mejstříkové, Ph.D. za mnoho cenných rad a připomínek, Bc. Kateřině Mužikové a Leoně Řezníčkové za pomoc při zpracovávání vzorků, ostatním spolupracovníkům z pracovní skupiny CLIP za morální podporu a spolupracovníkům z laboratoře průtokové cytometrie za poskytování dat a za pomoc při práci s nimi.

Práce byla hrazena z následujících zdrojů: GAUK43/2005, 62/2004, IGA MZ8269, VZ MSM0021620813.

Comparison of minimal residual disease detection by flow cytometry and quantitative PCR in children with acute lymphoblastic leukemia

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in childhood. Although almost all patients achieve complete remission, 20% of patients suffer from relapse. Patient with risk of relapse can be discerned by slower reduction of minimal residual disease (MRD). Flow cytometry (FC) is often used for MRD detection but still has limited impact on clinical decision. B-cell regeneration presents major challenge for specificity of cytometric MRD evaluation. Multi-colour cytometry-FACS sorting and detection of rearranged immunoglobulin and/or TCR genes using RQ-PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction) were combined for MRD detection in this study. FC is cheaper and easier in comparison with molecular methods; the most complicated phase is the data analysis and interpretation. Data interpretation is based on deep knowledge of immunophenotype of normal bone marrow. High speed cell sorters nowadays enable effective population separation using up to 11 parameters. The populations were sorted and subsequently level of MRD by RQ-PCR was assessed. Combination of these two methods allowed PCR quantification of leukaemic cells with greater sensitivity, and testing the specificity of chosen immunophenotypic characteristic of residual leukaemic cells. Using these combined techniques, four to eight colour panels were tested for MRD monitoring. For proper MRD detection, Ig/TCR RQ PCR needs adequately concentrated DNA. Using sorted cell fractions, samples with lower DNA concentrations are usually obtained, thus it was indispensable to test efficacy of Ig/TCR RQ PCR in samples containing variable cell number. Experiments were performed using defined number of sorted cells (100000, 10000, 1000 and 100) of leukemic cell line REH, which corresponded to usual number of cells in target populations.

Key words: Minimal residual disease (MRD), Acute lymphoblastic leukemia, Flow cytometry, Quantitative PCR, Immunophenotypic characterization, MRD quantification

Klíčová slova: Minimální reziduální nemoc (MRN), Akutní lymfoblastická leukémie, Průtoková cytometrie, Kvantitativní PCR, Imunofenotypizace, Kvantifikace MRN

Obsah

Seznam použitých zkratk	9
Cíl práce	11
Teoretický úvod	12
Leukémie	12
Akutní lymfoblastická leukémie	14
ALL B-řady	16
ALL T řady	18
Minimální reziduální nemoc	19
Přestavby imunoreceptorových genů (IRG)	23
N oblasti	25
Sekundární genové přestavby	25
Liniově nespecifické přestavby IRG	26
Využití klonálních přestaveb Ig/TCR k detekci MRN u ALL	26
Imunofenotypová charakteristika leukemických buněk	27
Metody	29
Kvantitativní PCR (RQ-PCR)	29
Detekce minimální reziduální nemoci (MRN) pomocí RQ-PCR	32
Screening klonálních přestaveb Ig/TCR genů	32
Příprava monoklonálních produktů k sekvenaci	33
Navržení specifických primerů	33
Příprava specifického RQ-PCR	34
Interpretace výsledků RQ-PCR	34
Průtoková cytometrie	37
Názvosloví leukocytárních antigenů, CD klasifikace	38
Přehled kombinací pro sledování MRN u B řady	38
Přehled kombinací pro sledování MRN u T řady	39
Zpracování sortovaných vzorků	41
Izolace DNA	41
Stanovení kontrolního genu	42
Výsledky	44

Testování citlivosti a specifity metody RQ-PCR v malých množstvích buněk	44
Detekce MRN podle RQ PCR Ig/TCR v imunologicky definovaných sortovaných subpopulacích u pacientů s nově diagnostikovanou ALL v iniciační fázi léčby.....	46
Charakteristika pacientů.....	46
Výsledky sortování subpopulací u konsekutivní kohorty pacientů.....	49
Detekce MRN podle RQ PCR Ig/TCR v imunologicky definovaných sortovaných subpopulacích u pacientů s relapsem ALL a u pacientů po transplantaci kostní dřeně (TKD).....	50
Pacienti s ALL s hypodiploidním počtem chromozomů.....	53
Diskuze	56
Metodická příprava cytometrického třídění buněk	56
Měření MRN pomocí PCR a cytometrie.....	56
Měření MRN u pacientů s ALL s hypodiploidním počtem chromozomů.....	58
Závěr	59
Použitá literatura	60
Přílohy	66

Seznam použitých zkratk

ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
BC	buffy coat = DNA z leukocytů zdravých dárců
BCP-ALL	B cell precursor acute lymphoblastic leukemia
CD	cluster of differentiation
CLIP	Childhood Leukaemia Investigation Prague
CML	chronická myeloidní leukémie
Ct	threshold cycle
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EBV	Epstein-Barr Virus
ESG-MRD-ALL	European Study Group on Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia
HIV	human immunodeficiency virus
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation
HTLV1	human T-leukemia virus 1
Ig	immunoglobulin gene
IgH	immunoglobulin heavy chain
Ig κ	lehký řetězec imunoglobulinů κ
IgL	immunoglobulin light chain
Ig λ	lehký řetězec imunoglobulinů λ
IRG	immunoreceptor gene
MRN	minimální reziduální nemoc
NHEJ	nonhomologous DNA end - joining pathway
PC	průtoková cytometrie
Ph chromozom	Philadelphia chromozom
QR	quantitative range
RAG	recombination activating gene
REH	buněčná leukemická linie
RQ-PCR	real-time quantitative-polymerase chain reaction
RSS	recombination signal sequence
TCR	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	terminal deoxynucleotidyl transferase
WBC	White Blood Cell Count

Cíl práce

Detekce minimální reziduální nemoci (MRN) pomocí kvantitativního určení přestaveb imunoreceptorových genů (IRG) je velmi pracná a finančně náročná metodika. Její prediktivnost pro budoucí relaps nemoci je vysoká, část pacientů však pro nedostatek vhodných citlivých cílů zůstává mimo studie. Průtoková cytometrie je naproti tomu levnější, rychlejší a méně pracná, její použití v klinických protokolech je omezené buď na jednu instituci nebo na jednu centrální laboratoř. Nejsložitější fází je analýza a interpretace dat, která je v současné době závislá na expertním hodnocení a je zřejmé, že metoda potřebuje standardizaci v interpretačních postupech. Dosavadní srovnání úspěšnosti detekce MRN metodami průtokové cytometrie (PC) a kvantitativní PCR (RQ-PCR) u pacientů s ALL bylo založeno pouze na nezávislém paralelním hodnocení shody hladin MRN. Žádná práce se dosud nezabývala přímým srovnáním metod a to kombinací sortování jednotlivých subpopulací v kostní dřeni a následným stanovení hladiny MRN podle RQ-PCR.

Cílem této práce bylo:

- a) stanovit dolní limity počtu buněk, v kterém jsme schopni spolehlivě kvantifikovat minimální reziduální nemoc (MRN) na úrovni Ig/TCR RQ-PCR.
- b) u konsektivní kohorty pacientů do dosažení kompletní remise v den 33 v definovaných časových bodech (den 8 a den 15) stanovit celkovou hladinu MRN průtokovou cytometrií, Ig/TCR pomocí RQ-PCR a dále v jednotlivých sortovaných frakcích stanovit množství Ig/TCR pomocí RQ-PCR.
- c) u pacientů s regenerující kostní dřeni a hraniční pozitivitou MRN podle Ig/TCR stanovených pomocí RQ-PCR sortováním dosáhnout zahuštění počtu leukemických buněk ve vzorku.
- d) u pacientů se vzácným podtypem ALL charakterizovaným sníženým počtem chromosomů (hypodiploidii) retrospektivně zavést systémy na sledování MRN podle Ig/TCR. Tato skupina pacientů je charakteristická špatnou prognózou přes poměrně dobrou iniciální odpověď na léčbu podle konvenčních kritérií. Kinetika MRN dosud nebyla u těchto pacientů detailně studována.

Teoretický úvod

Leukémie

Normální hematopoéza představuje hierarchický proces započatý pluripotentní kmenovou buňkou, která je schopna obnovy sama sebe, ale především produkuje prekurzory všech buněčných linií, které postupně dozrávají v jednotlivé buňky hematopoetického systému. (McCulloch 1993). Pokud však dojde k malignímu onemocnění, jsou produkovány abnormální buňky s poruchou diferenciaci a proliferace, neschopné plnit svoji fyziologickou funkci. (Bonnet 2005a)

Leukémie je klonální onemocnění hematopoetického systému. Existuje mnoho typů leukémií v závislosti na tom, které buňky jsou napadeny. Postiženy mohou být všechny krevní řady, nejčastější je postižení lymfoidních a myeloidních prekurzorů. V závislosti na typu leukémie se výrazně liší prognóza a léčebné strategie (Mayer et al. 2002).

Leukémie vzniká hromaděním změn v genomu kmenových buněk nebo různě zralých progenitorů jednotlivých řad hematopoézy (Bonnet 2005b, Soltysova et al. 2005). Je známo více než 200 různých molekulárních abnormalit nalézáných v leukemických buňkách (Greaves 2004), přičemž nejběžnější jsou chromozomální translokace (Olsen et al. 2006, Rabbitts et al. 2001, Taki and Taniwaki 2006).

Transformace normální buňky na buňku leukemickou je několikastupňový proces způsobený akumulací genetických mutací a epigenetických změn (Soltysova et al. 2005). Geny, které jsou odpovědné za vznik leukémie, dělíme zjednodušeně do dvou skupin: onkogeny a nádorové supresory (Mayer et al. 2002). Onkogeny jsou geny zodpovědné za proliferaci buňky, naproti tomu nádorové supresory tlumí proliferaci, stimulují diferenciaci a řídí apoptózu (Kovář 1999).

Důsledkem všech těchto změn je typicky zástava diferenciaci, proliferační aktivita, porucha komunikace buněk s okolím a signalizace, změna povrchových struktur (Mayer et al. 2002).

Všechny tyto mutace se většinou týkají somatických buněk. Závislost mezi leukémií a vrozenou genetickou dispozicí byla prokázána pouze u 5% pacientů (syndromy spojené se zvýšenou lomivostí chromozómů, terminální mutace

nádorových supresorech). Vznik leukémie u pacientů bez dědičné zátěže je závislý na kombinaci zevních a vnitřních faktorů, roli hraje jistě i časový faktor a náhoda (Mayer et al. 2002). Ke zvýšení rizika leukémie zřejmě přispívají polymorfismy v některých genech, jejichž proteinové produkty jsou zahrnuty v odpovědi na poškození buňky, detoxifikaci buňky a také proteiny zahrnuté v imunitní odpovědi na infekci (Pui 1999).

Mezi nejvýznamnější známé zevní rizikové faktory patří ionizující záření, což bylo potvrzeno při studiích na lidech ozářených během války a po havárii Černobylského reaktoru (Jacquet 2004). Riziko představuje také RTG ozáření těhotných žen a pravděpodobně i mužů těsně před početím dítěte, které se projevuje v patogenezi dětských akutních leukémií (McNally and Parker 2006). U neionizujícího záření, jakým je například elektromagnetické vlnění, nebyl prokázán vliv na vznik leukémie. Toto záření totiž nemá dostatečnou energii k poškození DNA (Pui 1999). K dalším faktorům řadíme např. léčbu inhibitory topoizomerázy II, kde byla pozorována souvislost se vznikem přestaveb genu MLL (Alexander et al. 2001). Z chemických faktorů se udávají zejména pesticidy a jiné chemikálie používané v zemědělství, dále pak styren, butadien a především benzen (McNally and Parker 2006, Morgan and Alvares 2005).

S leukémií jsou také spojovány 3 viry: HTLV1, EBV a HIV. HTLV1 způsobuje T-ALL (akutní lymfoblastickou leukémií T-buněk) dospělých, když zralou T-buňku mění v buňku kontinuálně proliferující. EBV je spojován s několika maligními onemocněními, kde brání buněčné smrti a transformuje buněčný fenotyp. Virus HIV způsobuje imunodeficienci, přímá spojitost s leukémií je diskutabilní (Závada 1999).

Souhrně je možno říci, že etiopatogeneza běžných typů leukémie není kompletně prozkoumána a pochopena. Role jednotlivých genetických aberací je podrobně zkoumána ve funkčních studiích a epidemiologický výzkum hledá širší souvislosti vzniku leukémií. U ALL, které je tato práce věnována, existuje tzv. hygienická teorie vzniku (viz níže).

Z hlediska klinického průběhu můžeme leukémií rozdělit na akutní a chronickou. Akutní forma leukémie má krátké nástupní období, rychlou progresi a neléčena vede ke smrti. Diagnóza je obvykle stanovena již pár týdnů po iniciálních projevech. Chronická forma se vyznačuje dlouhým nástupním obdobím, které může trvat až několik let. Protože je takřka bez příznaků, zjišťuje

se někdy i náhodně z krevního obrazu. Pro chronickou leukémii jsou typické zralé buňky, kumulující se díky blokování procesu apoptózy (Henderson 2002).

Podle průběhu a typu napadených buněk tak rozeznáváme čtyři základní typy leukémií:

1. akutní lymfoblastickou leukémii – viz. následující kapitola
2. akutní myeloidní leukémii (AML) – maligní onemocnění charakterizované nekontrolovaným růstem abnormálních, nezralých buněk myeloidní řady. (Pui et al. 2004, Rubnitz et al. 2007)
3. chronickou lymfatickou leukémii – charakterizovaná kumulací lymfoidních buněk, u dětí se nevyskytuje
4. chronickou myeloidní leukémii (CML) – projevuje se kumulací relativně zralých myeloidních buněk, které však i přes svoji zralost neplní normální funkci. Toto onemocnění je z více než 95% spojeno s chromozomální přestavbou, která zahrnuje translokaci distálních částí dlouhých ramen chromozomů 9 a 22 - tzv. Philadelphský chromozom (Ph chromozom). Patogeneza CML je poměrně dobře prozkoumána a existuje cílená léčba blokující efekt patologicky aktivované kinázy BCR/ABL. (Deininger et al. 2000, Huntly et al. 2003) Toto onemocnění se u dětí vyskytuje jen vzácně a má identický obraz jako v dospělém věku.

Akutní lymfoblastická leukémie

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) je progresivní maligní onemocnění, při kterém je v kostní dřeni a v periferní krvi produkováno mnoho nezralých lymfoblastických elementů. Tato nezralost je způsobena genetickým defektem lymfoidního nebo hierarchicky vyššího progenitoru lymfoidní řady v kostní dřeni. Výsledkem je nekontrolovaný růst a akumulace nezralých buněk, které neplní svoji funkci. Když se tyto buňky nahromadí v nadprahovém množství, blokují produkci normálních krvinek, což vede k deficitu červených krvinek, krevních destiček a funkčních bílých krvinek. Leukemické blasty ztrácejí schopnost diferenciaci a zachovávají nebo zvyšují schopnost proliferace (Randolph 2004).

Akutní lymfoblastická leukémie je nejčastějším nádorovým onemocněním u dětí, tvoří 80% leukémií dětského věku (Colby-Graham and Chordas 2003). Ročně v České republice onemocní 65-70 dětí. Dětská ALL představuje heterogenní onemocnění, kde se jednotlivé podtypy liší v buněčné

a molekulární charakteristice stejně jako v odpovědi na léčbu a v následném riziku relapsu (Ross et al. 2003).

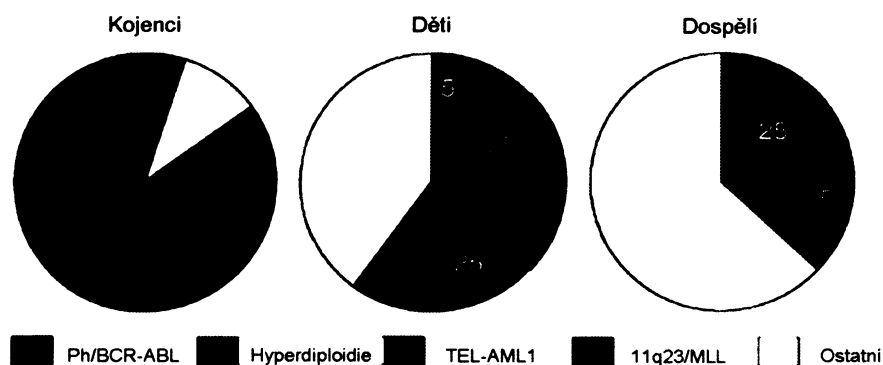
Všeobecně přijímanou teorií vzniku dětské ALL je tzv. hygienická teorie, jejíž podstatou je předpokládaná abnormální odpověď organismu na běžné, např. virové infekce nebo potenciálně i jiné antigenní podněty. Tato teorie vychází z toho, že základy onemocnění jsou položeny již v průběhu prenatálního vývoje, kdy dochází k tzv. prvnímu zásahu vedoucímu ke vzniku první genetické aberace a druhá aberace, která slouží jako proliferační signál, je způsobena druhým zásahem (nepřiměřenou reakcí na infekci) v postnatálním období. Pro tuto teorii existuje řada epidemiologických i experimentálních důkazů (Greaves 1999, Mayer et al. 2002).

Jak bylo řečeno výše, velmi řídké jsou případy lymfoidních malignit spojených s vrozenými genetickými poruchami: u dětí s Downovým syndromem nebyl zaznamenán vyšší výskyt ALL, ale tato diagnóza je spojena s horší léčebnou prognózou a častějšími komplikacemi během léčby (Whitlock et al. 2005, Zeller et al. 2005). U dalších genetických onemocnění spojených s chromozomální nestabilitou byla prokázána souvislost mezi ataxia-teleangiectasia mutovanými geny a zvýšenou pravděpodobností lymfoproliferativního onemocnění (Gumy Pause et al. 2003, Meier et al. 2005). Potenciální vliv na vznik ALL má také Fanconiho anémie (Janik-Moszant et al. 1998).

Mezi geneticky podmíněné rizikové znaky lze zařadit i pohlaví. Sumárně, dívky mají lepší přežití bez události (událost = relaps nemoci nebo smrt v průběhu léčby) ve srovnání s chlapci, ti jsou navíc náchylnější k T-ALL než dívky (Pui et al. 1999).

V buňkách ALL bylo zjištěno mnoho chromozomálních změn a molekulárních abnormalit. Většina aberací spadá do skupiny funkčních dysregulací ovlivňujících buněčný cyklus, apoptózu a diferenciaci. Rozeznáváme dva základní typy chromozomálních transformací, jejichž výsledkem je: 1) přesunutí potenciálního onkogenu pod silný promotor a tím potenciace jeho onkogenního efektu 2) vytvoření chimérických nebo fúzních genů, které generují hybridní protein. Výsledkem může být změna transkripční regulace, inhibice některých kináz nebo naopak jejich nepřetržitá aktivita (Greaves 1999).

Tyto chromozomální aberace se liší v rámci B a T buněčných linií i v rámci fázi dětské ALL: u kojenecké ALL (diagnostikované do 12 měsíců věku) jsou dominantní fúze genu MLL s řadou partnerů (celkem 60 známých chromozomálních lokusů), u dětí starších jednoho roku je to fúze genů TEL/AML1 a hyperploidie. Obecně také platí, že frekvence fúze genů BCR/ABL stoupá s věkem (viz obr. 1) (Greaves 1999).



Obr. 1: Zastoupení jednotlivých skupin leukémií u kojenců, dětí do 18ti let a dospělých (Greaves 1999)

ALL B-řady

ALL B-řady (neboli B prekurzorové ALL: BCP-ALL) je nejběžnější formou akutní leukémie u dětí (85% pacientů; remise je dosažena u 98% pacientů, úplné vyléčení evidujeme u 80% pacientů) a obecně představuje nejčastější dětskou malignitu (Redaelli et al. 2005). Opakující se chromozomální abnormality jsou charakteristickým znakem lymfoidních leukémií a umožňují nám proniknout do molekulárního mechanismu leukemogeneze (Armstrong and Look 2005).

Nejčastější translokací nalézanou u BCP-ALL, je $t(12;21)(p13;q22)$, při které dochází k fúzi genů TEL a AML1 (TEL/AML1), a která se vyskytuje u 25% dětských pacientů (Lee et al. 2005, Pine et al. 2003). U genu TEL je známa i jeho asociace s geny MN1, ABL a EVI1 u akutní myeloidní leukémie a s genem JAK2 u T-ALL. AML1 (nebo také RUNX1 či CBFA2, 21q22), je jedním z nejfrekventovaněji mutovaných genů u lidských akutních leukémií. Byl nalezen v kombinaci s genem ETO, MTG16, TEL a EVI1 (Zelent et al. 2004).

Funkcí AML1 je regulace řady genů potřebných pro vývoj lymfoidní a myeloidní řady (Fischer et al. 2005). Exprese TEL/AML1 je spojena s dobrou prognózou - 90% přežití v kompletní remisi v 5.roce od diagnózy. Tato prognóza není závislá na věku dítěte ani na pohlaví (Alvarez et al. 2005).

Další běžnou chromozomální aberací u ALL je hyperdiploidní počet chromozomů (arbitrárně více než 51 chromozom). Tento subtyp onemocnění tvoří 25% dětských ALL (Mayer et al. 2002).

ALL s hypodiploidním počtem chromozomů je řídce se vyskytující malignita s nepříznivým klinickým průběhem v porovnání s ostatními typy lymfoblastických leukémií (arbitrárním prahem je < 45 chromozomů). Postihuje zhruba 5% dětí s ALL, nejčastěji ve věku <2 roky a >10 let. Skoro všichni pacienti dosahují na konci indukční léčby remise, ovšem u většiny z nich se dříve či později ze zatím neznámých důvodů vyvine relaps (Pui et al. 1987).

Malé množství případů hypodiploidní leukémie (v ČR cca 2 děti za rok) znemožňuje podrobnější analýzu rizikových faktorů. Pacienty přesto můžeme rozdělit do tří skupin: pacienti s 24-29 chromozomy, pacienti s 30-39 chromozomy a pacienti s 40-45 chromozomy, přičemž poslední skupina tvoří 80% všech hypodiploidních leukémií. Obecně pak platí, že pacienti se 45 chromozomy mají lepší prognózu než ostatní. Pacienti, kteří jsou téměř haploidní (méně než 29 chromozomů) odpovídají na léčbu nejhůře (Heerema et al. 1999).

Filadelfský chromozom (Ph) je výsledkem reciproké translokace protoonkogenu ABL z chromozomu 9 do oblasti genu BCR na 22 chromozomu (BCR/ABL) (Ottmann and Wassmann 2005). Translokace BCR/ABL je u dětí diagnostikována jen vzácně, u dospělých ALL však tvoří 20-30% případů. Narozdíl od chronické myeloidní leukémie, pacienti s Ph pozitivní ALL obvykle exprimují kratší variantu proteinu BCR/ABL, nazývanou p190bcr/abl. Ph pozitivní ALL má velmi špatnou prognózu (Faderl et al. 2002). V ojedinělých případech byl Filadelfský chromozom zaznamenán i u T-ALL (Raani et al. 2005).

Translokace (1;19)(q23;p13) způsobuje vznik chimérického E2a-Pbx1 onkoproteinu, který se vyskytuje u 5-8% dětí a představuje příznivý genetický subtyp dětské ALL s dobrou odpovědí na léčbu (Monica et al. 1994, Uckun et al. 1993).

Chromozomální abnormality týkající se genu MLL (mixed lineage leukemia; 11q23) byly nalezeny jak u akutních lymfoblastických leukémií, tak u akutních myeloidních leukémií. Gen MLL se účastní translokace s přibližně 60 různými geny, nejčastějším fúzním genem je AF4 (Hiwatari et al. 2003), který je lokalizován v jádře, kde kontroluje genovou transkripci (Thomas et al. 2005). Leukémie s přestavbou genu MLL představují majoritní subtyp leukémie u kojenců (až 70%). Pacienti s tímto subtypem leukémie mají velmi nepříznivou prognózu.

ALL T řady

Dětská T-ALL zahrnuje 15% všech akutních lymfoblastických leukémií a má obecně horší prognózu, než BCP-ALL - přežití v kompletní remisi je 60-70% (Cave et al. 2004).

Chromozomální abnormality jsou detekovány u přibližně 50% T-ALL a mohou být rozděleny do dvou hlavních kategorií: delece a translokace (Mauvieux et al. 2002). Většinu T buněčných onkogenů, vzniklých translokací, řadíme mezi transkripční faktory. Mezi nejdůležitější geny účastníci se těchto fúzí patří gen HOX11, HOX11L2, TAL1, LYL1, LMO1/2, LMO2 a MLL (Kees et al. 2003).

HOX 11 kóduje transkripční faktor, k jehož zvýšené aktivaci exprese dochází zejména pomocí translokace t(10;14)(q24;q11), zahrnující TCR α /TCR δ lokus na chromozomu 14. Exprese HOX11 byla prokázána u 5% případů dětské T-ALL a je spojena s příznivou prognózou (Armstrong and Look 2005).

Zvýšená exprese genu HOX11L2 je způsobena například jeho translokací do oblasti TCR δ lokusu t(5;14)(q35;q11). Vysoká exprese genu HOX11L2 byla nalezena u přibližně 20% pacientů. Tito pacienti mají většinou špatnou prognózu (Armstrong and Look 2005, Berger et al. 2003).

Produkt genu TAL1 je homologní s proteiny, které se účastní kontroly buněčného růstu a diferenciace. Nádorově specifická změna může nastat fúzí s lokusem SIL nebo translokací t(1;14)(p33;q11) do oblasti genu pro α/δ řetězec T-buněčného receptoru (Cave et al. 2004).

MLL-ENL je výsledkem translokace t(11;19)(q23;p13). C konec genu ENL vykazuje transkripční regulační aktivitu. Pacienti s translokací MLL-ENL mají dobrou prognózu (Rubnitz et al. 1999).

Gen NOTCH je aktivní během normálního hematopoetického vývoje, kde je mimo jiné důležitý pro regulaci $\alpha\beta$ T-buněčného vývoje. U maligních T buněk ovlivňuje NOTCH signalizace proliferaci, diferenciaci a buněčné přežívání (Zweidler-McKay et al. 2005).

subtyp	přežití bez události (smrt nebo relaps) v %	
	dospělí	děti
zralá B - ALL	50-55 ve 4. roce od dg.	75-80 v 5. roce od dg.
ALL z prekurzorů B řady:		
- <i>hyperploidie</i> > 50 chrom.	30-50 ve 3. roce od dg.	80-90 v 5. roce od dg.
- <i>TEL/AML1</i>	neznámý	85-90 v 5. roce od dg.
- <i>BCR/ABL</i>	< 10 ve 3.roce od dg.	20-40 v 5. roce od dg.
- <i>MLL/AF4</i>	10-20 ve 3. roce od dg.	10-35 v 5. roce od dg.
- <i>hypoploidie</i> < 45 chrom.	10 ve 3. roce od dg.	25-40 ve 3. roce od dg.
T – ALL	50 ve 3. roce od dg.	65-75 v 5. roce od dg.

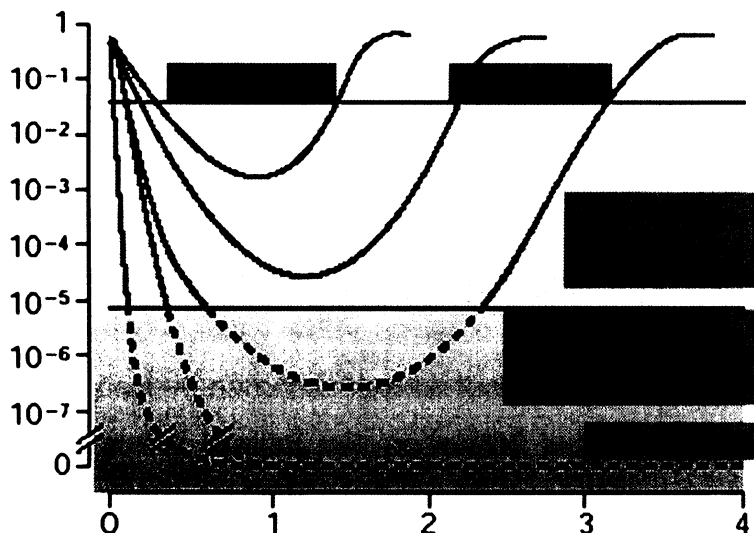
Tab. 1: Srovnání přežití u jednotlivých subtypů ALL u dětí a dospělých (Mayer et al. 2002)

Minimální reziduální nemoc

V poslední dekádách se prognóza dětí s akutní lymfoblastickou leukémií neustále zlepšuje. Největší skok sice nastal v sedmdesátých letech, kdy se v léčbě dětské ALL definitivně prosadila kombinovaná chemoterapie, pokrok v tvorbě léčebných protokolů však stále pokračuje. Důležitý podíl na tom má také správné zařazení do léčebné skupiny, tzn. identifikace pacientů, kteří potřebují agresivnější terapii, aby se předešlo relapsu a těch, pro které je vhodnější méně intenzivní léčba. Současné léčebné strategie řadí pacienty do různých léčebných skupin podle statisticky významných prognostických faktorů jako je věk a hladina bílých krvinek při diagnóze, ale také DNA index (odrážející hyper- nebo hypodiploidii), cytogenetické změny a imunofenotyp (tedy kombinaci antigenů exprimovaných leukemickou buňkou). Kromě těchto klinických a biologických znaků přítomných při diagnóze se v poslední době ukazuje, že silným prediktorem průběhu onemocnění je časná odpověď na

chemoterapii posuzovaná podle rychlosti poklesu množství lymfoblastů v kostní dřeni nebo periferní krvi během iniciační části terapie. V závislosti na rychlosti odpovědi na léčbu můžeme pacienty zařadit do jednotlivých rizikových skupin, což je důležité nejen pro pacienty s vysokým rizikem relapsu, kteří na léčbu odpovídají velmi pomalu a u kterých je třeba intenzivní postindukční terapie, případně doplnění léčby o alternativní formy, mezi které patří cílená léčba nebo alogenní transplantace hemopoetických progenitorů. Významná je však tato stratifikace i pro pacienty s vynikající odpovědí (a tedy vysokou chemosenzitivitou), u kterých bude možno intenzitu léčby snížit a ušetřit je tak nežádoucích následků chemoterapie (Langebrake et al. 2006).

Moderní léčebné protokoly vedou ke kompletní remisi u 95% dětí trpících akutní lymfoblastickou leukémií. Jako hematologická (neboli laboratorní) remise se označuje morfologicky normální obraz kostní dřene při vyšetření klasickým světelným mikroskopem (méně než 5% blastů v nátěru kostní dřene). Přes tuto vysokou úspěšnost dochází přibližně u 20% pacientů k relapsu (znovuobnovení onemocnění). Relaps je způsoben maligními klony, které jsou identické nebo vycházejí z maligních buněk identifikovaných při diagnóze, což ukazuje, že ne všechny leukemické buňky byly při léčbě zničeny. Vezmeme-li v úvahu, že při diagnóze bývá v organizmu nemocného řádově 10^{10-12} maligních buněk, v hematologické remisi zde může být přítomno značné množství buněk. Tyto buňky však již nejsou detekovatelné běžnými morfologickými metodami (Moppett et al. 2003, Szczepanski et al. 2001). Stav, kdy se v kompletní remisi detekuje zbytkové množství maligních buněk, které se nacházejí pod detekční hranicí klasických morfologických metod, se označuje jako minimální reziduální nemoc (MRN nebo také MRD z anglického minimal residual disease) (Neale et al. 2004, Szczepanski et al. 2001). MRN byla ještě v polovině devadesátých let stanovována pouze kvalitativně nebo semikvantitativně. I tyto postupy ukazovaly na značný potenciál MRN a přinášely klinicky relevantní informace. Až kvantitativní metody založené na kvantitativní PCR (viz dále) a rozsáhlé retrospektivní studie však umožnily plně docenit význam znalosti dynamiky MRN pro léčbu.



Obr. 2: Znárodnění možností detekce a dynamiky MRN u jednotlivých modelových případů průběhu ALL (Szczepanski et al. 2001).

Dokud totiž byly jedinou možností detekce odpovědi na léčbu morfologické postupy založené na světelné mikroskopii, bylo možno identifikovat pouze velmi malou skupinu dětí s nejhorší reakcí na léčbu. Postup léčby se tedy u většiny pacientů s různou – neznámou – hladinou MRN dříve nijak nelišil a tudíž pacienti s vyšším rizikem relapsu podstupovali stejnou léčbu jako pacienti s nízkým rizikem. Postupně se sice vydělovaly skupiny charakterizované empiricky známými rizikovými faktory, univerzální kritérium stále neexistovalo. Zde je třeba připomenout, že přestože největší riziko relapsu je u pacientů se známými rizikovými faktory (např. přítomnost $t(9;22)$ a $t(4;11)$, vysoká leukocytóza, nedosažení remise), početně se více relapsů vyskytuje ve skupinách pacientů s klinicky definovaným nízkým nebo středním rizikem – ti totiž tvoří až 80% všech pacientů (van Dongen et al. 1998).

Spolehlivá metoda detekce MRN by měla splňovat tyto parametry: 1) senzitivita detekce alespoň jedné maligní buňky mezi 10^4 normálních buněk kostní dřeně (označovaná jako senzitivita 10^{-4}) 2) schopnost rozeznat mezi maligní a normální buňkou bez falešně pozitivních i negativních výsledků 3) měla by být snadno proveditelná a měla by umožňovat snadný sběr výsledků 4) měla by být proveditelná ve srovnatelné kvalitě ve více laboratořích (Szczepanski et al. 2001). Tyto podmínky dnes splňuje kvantitativní PCR (RQ-PCR) založená na rozpoznávání specifických leukemických sekvencí

(specifické přestavby, např. translokace BCR/ABL nebo přestavby imunoreceptorových genů – podrobněji viz dále). Další metoda, průtoková cytometrie využívající prezentace leukemicko-specifických antigenů na povrchu buňky, musí svůj potenciál ještě potvrdit (van Dongen et al. 1998). Standardem v detekci MRN u dětských ALL se tak stala metodika založená na kvantitativní detekci klonálně specifických přestaveb imunoreceptorových genů, která umožní sledování dynamiky MRN téměř u 100% pacientů. Metodika je však pracná, drahá a časově náročná. Naproti tomu teoreticky se má za to, že PC by mohla být srovnatelně kvalitní, ale podstatně jednodušší a levnější metodou. Přímá srovnání obou metodik jsou zejména z logistických důvodů velmi řídká a představují velmi odlišné výsledky. Povrzení jednoduchých předpokladů, tj. srovnatelné citlivosti a specifiky v identifikaci leukemické populace, by bylo prioritním výsledkem.

Retrospektivní studie využívající kvantitativní detekci klonálně specifických přestaveb imunoreceptorových genů na různých protokolech prokázaly, že absence MRN po indukci remise (tj. po jednom měsíci léčby v nejběžněji v Evropě používaných protokolech) je dobrým prognostickým znakem, polovina dětí s ALL však zůstává v tomto bodě MRN pozitivní (s citlivostí metody 10^{-4}). Míra této positivity má také prediktivní hodnotu - pomalá redukce počtu blastů v periferní krvi nebo kostní dřeni je spojená s vyšším rizikem relapsu (Dibenedetto et al. 1997). Dalším významným pokrokem je kombinace informace o hladině MRN v jednom časovém bodě léčby (na konci indukční léčby) s informací o dalším časovém bodu (typicky po dalších 2 měsících léčby). Tímto způsobem už dostáváme informaci o dynamice reziduálního klonu, jejíž prognostický význam je velmi důležitý.

Počátkem nového tisíciletí začaly některé progresivní skupiny zabývající se léčbou dětských ALL zařazovat kritéria MRN přímo do stratifikačních pravidel léčebných protokolů. Využívají kombinaci „klasických“ rizikových faktorů s měřením dynamiky MRN v iniciální fázi léčby a restratifikují pacienty do skupin určených k intenzifikaci a desintenzifikaci léčby. Přestože výsledky těchto léčebných protokolů nejsou dosud k dispozici, je zřejmé, že sledování MRN u nově léčených pacientů bude v budoucnu důležitým klinickým fenoménem.

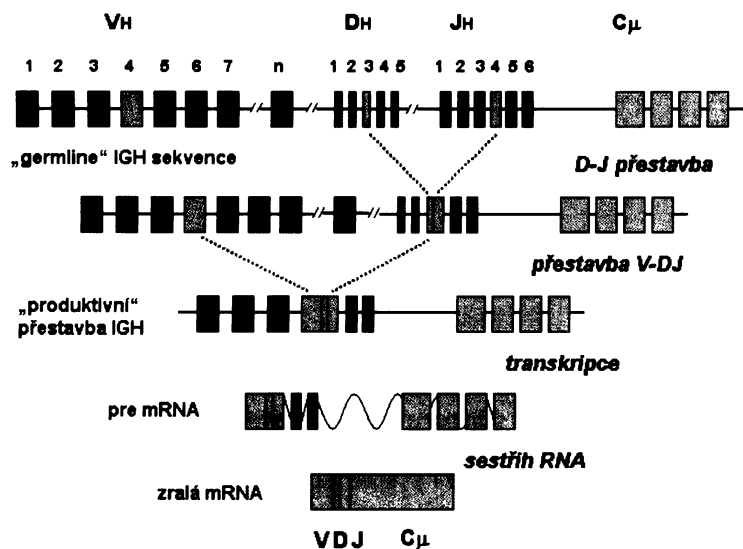
Detekce MRN se však v současnosti využívá i v léčbě pacientů s relapsem nemoci a také pacientů podstupujících transplantaci hematopoetických progenitorů.

Přestavby imunoreceptorových genů (IRG)

Schopnost imunitního systému specificky rozeznat miliony různých antigenů a antigenních epitopů je založena na enormní diverzitě antigen-specifických receptorů, které představují povrchově vázané molekuly imunoglobulinu (Ig) u B lymfocytů a T-buněčné receptory (TCR) u T lymfocytů. Antigenně specifické receptory se liší od lymfocytu k lymfocytu, přičemž každý z nich (nebo každý z jejich klonů) exprimuje přibližně 10^5 receptorů s identickou antigenní specifitou. Rozsáhlá diverzita receptorů je způsobena přestavbami Ig a TCR genů v průběhu vývoje lymfocytu (Janeway 2001).

Geny kódující těžké řetězce imunoglobulinů (IgH) se nacházejí v genovém komplexu na chromosomu 14. Tento komplex obsahuje na 5' konci skupinu sekvenčně podobných úseků V ("variabilita"), dále následuje skupina úseků D ("diversita"), pak skupina krátkých úseků J ("joining") a na 3' konci jsou uspořádány genové segmenty konstantní části těžkého řetězce (C). Struktura genových komplexů kódujících lehké řetězce imunoglobulinů κ a λ (IgL κ a IgL λ) je podobná, ale jednodušší (neobsahuje D segmenty) (Hořejší 2005). Během B a T buněčné diferenciaci dochází u jednotlivých lymfocytů k specifickým přestavbám těchto segmentů a tímto získává každý lymfocyt svoji specifitu. Přestavba je zahajována pomocí dvou specifických rekombináz RAG1 a RAG2, které rozeznávají rekombinační signální sekvence obklopující Ig a TCR geny (Market and Papavasiliou 2003, West et al. 2005) sestávající z palindromických heptamerů a nonamerů, oddělených oblastí 12 nebo 23 párů bazí (Sadofsky 2004, Schatz 2004b), a které k sobě přiblíží cílové úseky DNA a vytvoří jednovláknové zlomy mezi V, D nebo J segmenty. Následně volná 3'OH skupina na konci kódujícího řetězce reaguje s 5'P skupinou protějšího řetězce DNA za vzniku vlásenky na kódujícím konci a tupého 5' konce rekombinační signální sekvence. Vlášenska je otevřena nukleázovou aktivitou proteinu Artemis. Mechanismem NHEJ (nonhomologous DNA end - joining pathway), na kterém se podílí proteiny Ku70/80, DNA proteinkináza, ligáza IV a

protein Artemis, dojde ke spojení otevřených konců kódujících sekvencí (Raghavan and Lieber 2006, Schatz 2004b).



Obr. 3: Schéma přeskupování V, D, J segmentů těžkého řetězce imunoglobulinů

Přestavba Ig a TCR genů je proces, při kterém dochází k nepřesnému spojení dvou genových segmentů. Jelikož existuje tripletový čtecí rámec DNA sekvencí, u dvou ze tří spojů mRNA nelze přepsat do funkčního proteinu. U B buněk dochází nejprve k přestavbě těžkého řetězce imunoglobulinů (IgH) tak, že nejdříve na obou alelách současně probíhá přestavba D a J segmentu. Potom následuje připojení V segmentu. Jestliže VDJ přestavba na jedné alele produkuje funkční protein, dojde k down-regulaci exprese genů rekombinázového aparátu, což umožní umlčení druhé IgH alely (Sadofsky 2004, Spicuglia et al. 2006). Pokud však VDJ přestavba funkční není, dojde k připojení V segmentu na druhé alele (Dyer and Oscier 2002). RAG geny jsou znovu aktivovány v malém množství pro rekombinaci lehkých řetězců (IgL). Jako první se realizuje přestavba lehkého řetězce kappa (IGK) a teprve když je tato přestavba neúspěšná na obou alelách, dochází k přestavbě lehkého řetězce lambda (IGL). Dvě nefunkční přestavby IgH či IgL vedou k apoptóze (Poulsen et al. 2002, Seriu et al. 2000).

Po této rekombinaci vzniká funkční B buněčný receptor a RAG geny jsou znovu down-regulovány a reaktivovány pouze v případě, je-li receptor autoreaktivní.

V non-B lymfoidních buňkách jsou geny pro IgH a IgL umístěny v jaderné periférii, která má na tyto geny represivní účinek. Během diferenciací buněk a procesu přestavování dochází k posunu nejprve D a J genů a následně i V genů do centrální oblasti jádra. Tento přesun je regulován IL7R a usnadňuje transkripci a histonovou modifikaci genů (Corcoran 2005).

N oblasti

Při rekombinaci jednotlivých V, D, J genů dochází k inserci nových, tzv. N nukleotidů mezi spojené genové segmenty. Tuto inserci zprostředkovává terminální deoxynukleotidyl transferáza (TdT), která je exprimována v jádře nezralých B a T lymfocytů. TdT je schopna přidávat nukleotidy na 3'konec DNA zlomu bez použití templátu (Schatz 2004a) (Hořejší 2005).

Inserce nukleotidů mezi přestavěné genové segmenty zvyšuje diverzitu antigenního receptoru. Velikost připojované N oblasti se pohybuje od jednoho či dvou do devíti a více nukleotidů (van Dongen and Wolvers-Tettero 1991).

Sekundární genové přestavby

Sekundární genové přestavby se vyskytují buď tehdy, jestliže B a/nebo T buňky produkují neproduktivní Ig či TCR geny na obou alelách, nebo v případě autoreaktivity receptoru. U B buněk může probíhat tzv. D-J_H výměna, kdy dojde ke spojení D segmentu proximálně a J segmentu distálně od přestavěných D-J segmentů, které jsou vystřiženy. U lehkých řetězců imunoglobulinů dochází k nahrazení přestavby V-J, stejně jako v případě TCR α u T lymfocytů (Janeway 2001).

Dalším typem sekundárních přestaveb je záměna V segmentu u V-D-J přestavby, kde proximální V segment nahradí V segment v kombinaci V-D-J. Spojení u těchto přestaveb je zprostředkováno heptamerovou sekvencí na 3'konci většiny V_H genů. Tato sekvence však chybí u V segmentu IgL a TCR lokusu (kromě TCR γ).

Liniově nespecifické přestavby IRG

Struktura genů kódujících Ig a TCR je do značné míry podobná. Obě skupiny se skládají z V(D)J segmentů, které jsou při vývoji lymfocytů přeskupovány podle shodných pravidel. Donedávna se předpokládalo, že B-lymfocyty přestavují pouze geny pro imunoglobuliny a T-lymfocyty pouze geny pro TCR. U leukemických buněk však můžeme často nalézt přestavby imunoreceptorových genů, které jsou specifické pro opačnou vývojovou větev - TCR přestavby u BCP-ALL či Ig přestavby u T-ALL (Meleshko et al. 2006).

Bylo vytvořeno několik teorií, z nichž některé tuto "neadekvátní" regulaci spojovaly s maligním procesem a vysvětlovaly ji buď jako jeho následek (Greaves et al. 1986, Szczepanski et al. 1999b), a nebo dokonce jako jeho přímou příčinu (Greaves et al. 1986, Height et al. 1996, Yancopoulos et al. 1986). Dále se usuzovalo, že přestavby genů pro TCR mohou vznikat již ve velmi časných stádiích vývoje B lymfocytů a že jejich přítomnost může pro buňku znamenat zástavu diferenciaci a maturace. Následkem toho by buňky s těmito tzv. "cross-lineage" přestavbami TCR podlely apoptóze, pokud by se nestaly maligními (Szczepanski et al. 1999a). Další hypotézou byla možnost, že "cross-lineage" přestavby jsou důsledkem přetrvávající aktivity rekombinázového systému po maligní transformaci a zástavě maturace (Greaves 1988).

Studie naší skupiny z roku 2003 ale prokázala, že tyto "cross-lineage" přestavby nejsou specifickou vlastností leukemických buněk, protože nekompletní přestavby TCR δ lze nalézt i v B lymfocytech zdravých dárců (Krejci et al. 2003).

Využití klonálních přestaveb Ig/TCR k detekci MRN u ALL

Buňky ALL jsou odvozeny z lymfoidních prekurzorů, ve kterých probíhá přestavování genových segmentů Ig/TCR. Celý maligní klon vzniklý nádorovou transformací lymfoidního prekurzoru pak nese stejné sekvence přestavěných genů pro Ig/TCR. Toho lze využít k detekci MRN. Tento přístup je v současnosti považován za standard, i přes svou metodickou a finanční náročnost. Na rozdíl od detekce specifických fúzních genů použitelně v max. 35 % případů lze

metodu detekce klonálních přestaveb Ig/TCR u 95% pacientů, další výhodou je práce na úrovni DNA.

Imunofenotypová charakteristika leukemických buněk

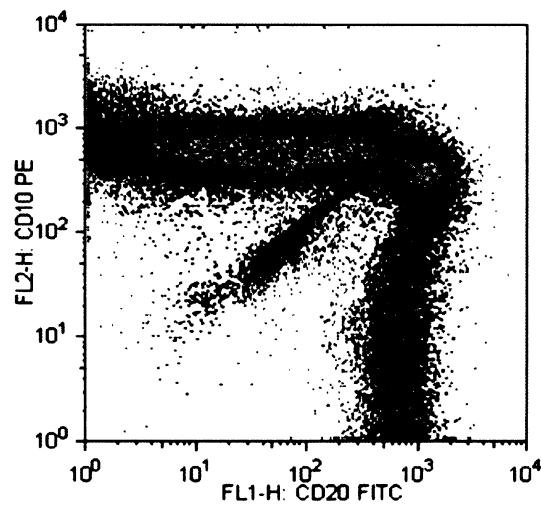
Leukemické buňky (v našem případě buňky ALL) jsou kromě genetických změn definovány také podle svého imunofenotypu – tedy podle kombinace antigenů exprimovaných na povrchu buňky a/nebo intracelulárně (Schabath et al. 2003). Tato kombinace antigenů v zásadě odpovídá buněčné linii (tedy T nebo B v případě ALL) a stupni zralosti buňky, ze které vychází leukemický klon (Gudjonsson and Magnusson 2005). Leukemické buňky se liší v expresi řady antigenů od svých nemaligních protějšků. Typická je asynchronní exprese, kdy na leukemické buňce jsou současně exprimovány antigeny, které u normálního lymfoidního prekursoru v různých stádiích diferenciaci. Aberantní exprese antigenů z jiné linie je rovněž velmi častá odchylka od normálních prekursorů (Hrušák 2003).

Imunofenotyp leukemických buněk tak umožňuje vymezit leukemickou buněčnou populaci proti fyziologickým buňkám kostní dřeně. Na druhou stranu přítomnost fenotypu asociovaného s leukemickými buňkami, který se vyskytuje u malého počtu normálních buněk může snižovat kvalitu detekce leukemických buněk podle imunofenotypu (Wang et al. 1995).

Imunofenotyp se dnes stanovuje pomocí mnohobarevné průtokové cytometrie. Metodika využívající průtokovou cytometrii k detekci MRN je extenzivně testována na řadě světových pracovištích, její klinické využití je však limitováno na několik center (Kroft 2004).

Imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie předpokládá použití monoklonálních protilátek s navázanou fluorescenční značkou, což umožní stanovit intenzitu fluorescenčního signálu, která nám odhalí množství sledovaného epitopu (ů) ve vymezené populaci, čehož můžeme využít např. při detekci MRN. Protože je monitorování MRN pomocí průtokové cytometrie založeno na identifikaci leukemického imunofenotypu, který v krvi či kostní dřeni není normálně exprimován, vyžaduje důkladné zvážení optimálního časového bodu analýzy a zejména vhodnou kombinaci protilátek. Je proto důležité správně charakterizovat kombinaci antigenů, které jsou schopny detekovat reziduální blasty ve směsi normálních hematopoetických buněk během léčby.

Cílem této studie bylo definovat subpopulace, které nejlépe odpovídají MRN v daném časovém bodu léčby.



Obr. 4: Na grafu jsou znázorněny CD19 pozitivní buňky v normální kostní dřeni; B-lymfocyt během svého vývoje nejprve získává znak CD10, později i CD20, zralý B-lymfocyt znak CD10 naopak ztrácí, ale uchovává si znak CD20.

Metody

Kvantitativní PCR (RQ-PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) vychází z malého množství DNA, které je vloženo do reakční směsi spolu s volnými nukleotidy. Amplifikovaný genový úsek (amplikon) je vymezen dvojicí krátkých oligonukleotidových segmentů (primerů) o velikosti 15-30 nukleotidů, z nichž každý je komplementární k sekvenci na protilehlých řetězcích úseku cílového genu. Primery slouží jako startující místa pro amplifikaci DNA, která je katalyzována enzymem DNA polymerázou. Dvouřetězcová DNA (dsDNA) je nejprve teplotně denaturována (kolem 90°C) v přítomnosti nadbytku každého primeru a čtyř deoxynukleotidů (dNTP) a přechází na jednořetězcovou formu (ssDNA). Reakční směs je ve druhém kroku ochlazená na teplotu, při které primery nasedají na své komplementární cílové sekvence (55°C – 65°C), a úsek templátové DNA je dále syntetizován DNA polymerázou (72°C). Denaturace, nasedání primerů a syntéza DNA tvoří jeden amplifikační cyklus. Cykly se mnohokrát opakují za stejných podmínek, které jsou zajištěny nastavením teplotního profilu na termocykleru. U dobrých termocyklerů by mělo docházet ke změnám jednotlivých teplot v krátkém čase a teplo by mělo být koncentrováno na vzorek a neunikat do okolí. Produkty amplifikace z prvního cyklu PCR slouží jako templáty v dalších cyklech. Hlavním produktem PCR je tedy dvouřetězcová DNA, jejíž délka odpovídá vzdálenosti obou primerů (Ausubel et al. 1994, Bustin 2004).

Kvantitativní PCR v reálném čase (RQ-PCR) je v současné době převažující metoda pro kvantitativní detekci cílových genů. Detekce PCR produktu je umožněna fluorescenčními molekulami, které nás na základě zvyšující se fluorescence informují o množství produktu v daném cyklu. Pro tento účel se používají DNA vazebná barviva nebo fluorescenčně značené sekvence. Emitované záření po každém cyklu PCR reakce zaznamenává kamera a signál je vyhodnocen pomocí příslušného softwaru. V současné době se pro RQ-PCR nejčastěji používají: SYBR Green 1, hybridizační a hydrolyzační sondy (McPerson 1995).

Fluorescenční barvivo, označované jako SYBR Green 1, se specificky váže do malého žlábků dsDNA. Míra fluorescence je přímo závislá na množství navázaného barviva. SYBR Green 1 se neváže na ssDNA a pokud není vázaný, nedetekujeme prakticky žádnou fluorescenci. Nevýhodou je, že tímto způsobem nelze rozlišit případnou přítomnost nespecificky amplifikovaného produktu PCR) (Vondrejs 2003).

Na rozdíl od SYBR Green 1 jsou hydrolyzační a hybridizační sondy vysoce specifické, komplementární k detekované sekvenci DNA. Hydrolyzační sondy mají na koncích fluorofor a zhášec, přičemž v základním stavu je fluorescence potlačena, protože zhášec pohlcuje záření produkované fluoroforem. Díky exonukleázové aktivitě DNA polymerázy dojde v průběhu elongační fáze PCR k rozštěpení sondy, oddálení fluoroforu a zhášeče a tím k nárůstu fluorescence. Fluorescence zde odpovídá počtu dokončených kopií amplifikované DNA a měří se na konci syntetické fáze (McPerson 1995).

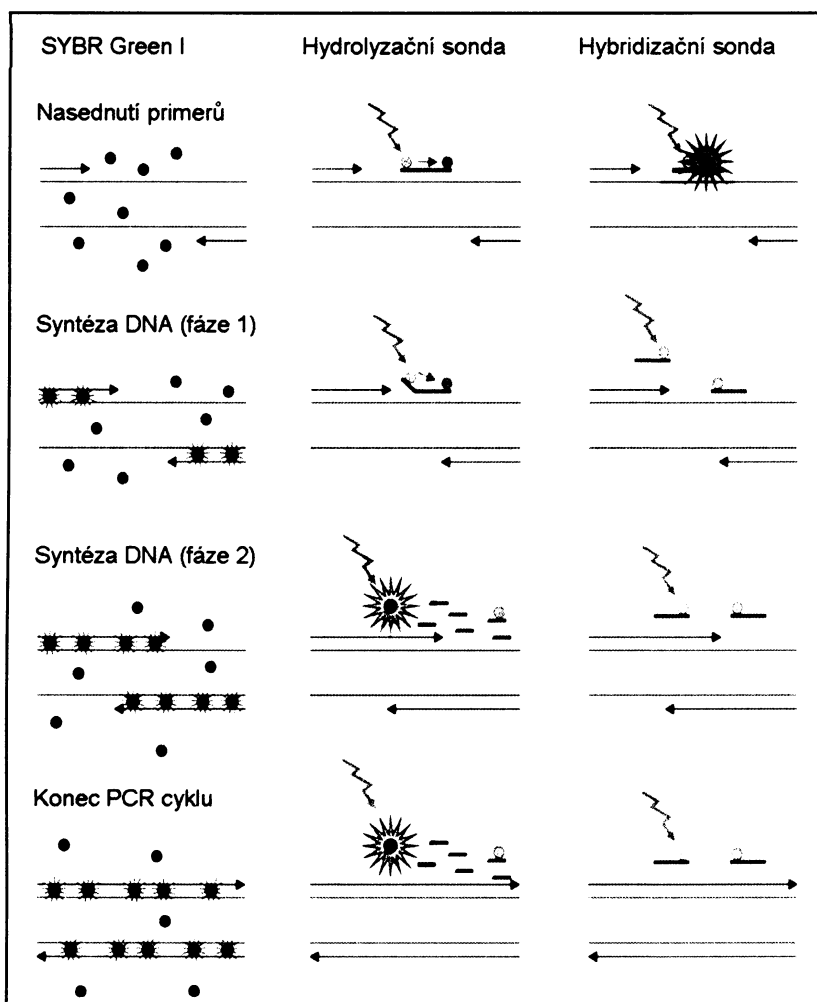
Hybridizační sondy jsou dvojice sond, přičemž každá je značena jiným fluoroforem. Sondy nasedají na specifickou strukturu DNA těsně vedle sebe a po ozáření emituje fluorofor jedné ze sond záření, které excituje fluorofor druhé sondy, jehož fluorescence je měřena (McPerson 1995).

Jestliže průběh reakce vyneseme do grafu, kde na ose X budou jednotlivé cykly a na ose Y bude intenzita fluorescence, dostaneme esovitou křivku, kterou můžeme rozdělit na tři části: neexponenciální „plateau“ fáze, exponenciální fáze a fáze, při níž přestává křivka růst exponenciálně v důsledku vyčerpání některé složky nutné k replikaci DNA. Co se týče intenzity fluorescence, prvních zhruba 18 cyklů nezaznamenáváme žádnou změnu, ačkoli produkt roste exponenciálně. Je to dáno tím, že hladina produktu je stále nízká. Jakmile se však nakumuluje dostatek produktu, začne se zvedat hladina fluorescence nad prahovou hodnotu. Cyklus, ve kterém k tomu dojde, se nazývá prahový cyklus (threshold cycle) a označuje se Ct. Ct je ovlivněn množstvím templátu na začátku reakce (Ausubel et al. 1994).

Řešením, jak zajistit reprodukovatelnost výsledků, je vytvořit sérii ředění o známé koncentraci, nejlépe v rozmezí několika řádů (např. 10^{-1} - 10^{-5}), a z této vytvořit standardní křivku. Standardní křivka je konstruována vnesením logaritmu kvantity templátu proti Ct pozorovanému během amplifikace každého z ředění. Korelační koeficient (R^2) mimo jiné udává, jak moc se kryjí Ct duplikátů

(či multiplikátů) vzorku. Neměl by být menší než 0,980, v ideálním případě $R^2=1$. Dalším znakem charakterizujícím dané RQ-PCR je tzv "slope", tj. směrnice přímky proložené vnesenými body. Pro reprodukovatelné RQ-PCR by hodnota "slope" měla pohybovat mezi 2,6 - 4,0 (Bustin 2004).

Efektivita se většinou udává v procentech, tzn. kolik procent templátu bylo amplifikováno v každém cyklu. Pokud je číslo menší než 100%, znamená to, že neprobíhá amplifikace všech molekul DNA v důsledku například špatného primeru či špatných reakčních podmínek. Číslo větší než 100%, může značit kontaminaci nespecifickým produktem. Tolerance se pohybuje v rozmezí 90 - 105% (Siebert 1993).



Obr. 5: (Van der Velden et al., Leukemia 2004) Srovnání jednotlivých metod RQ-PCR.

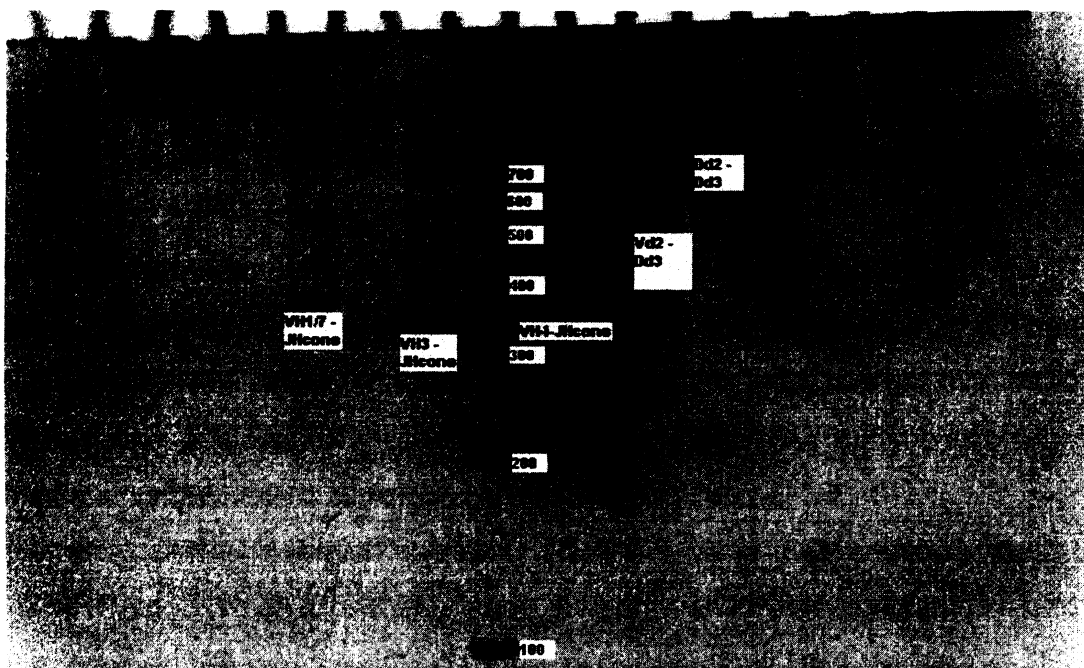
Detekce minimální residuální nemoci (MRN) pomocí RQ-PCR

Pro detekci MRN pomocí RQ-PCR jsme použili metodu kvantifikace klonálně-specifických přestaveb Ig/TCR, která zahrnuje tyto kroky:

- 1) screening klonálních přestaveb Ig/TCR
- 2) analýza klonality produktů PCR a příprava monoklonálních produktů k sekvenaci
- 3) sekvenace
- 4) vyhodnocení přechodových V-(D)-J sekvencí a navržení pacient-specifických primerů
- 5) optimalizace specifického RQ-PCR

Screening klonálních přestaveb Ig/TCR genů

Ve vzorku DNA z diagnostického vzorku kostní dřeně jsme u každého pacienta provedli screening na nejčastější přestavby Ig/TCR u dětských ALL. Screeningový panel zahrnoval 18 systémů pro BCP-ALL (kompletní IGH, IGκ, TCRγ, TCRδ) a 13 systémů pro T-ALL (TCRγ, TCRδ), případně při nenalezení vhodného cíle 7 systémů pro nekompletní přestavby IGH a 3 systémy pro TCRβ). U pacientů s T ALL bylo součástí panelu i hodnocení přítomnosti delece 1p32 vedoucí k fúznímu genu SIL-TAL1, který lze použít pro sledování MRN na DNA úrovni. Následně jsme provedli analýzu heteroduplexů: vzorky jsme pět minut zahřívali při teplotě 94°C, poté zchladili na 4 °C a tuto teplotu udržovali po dobu jedné hodiny. Vzorky jsme pak nanесли na 8% polyakrylamidový gel. Produkty PCR jsme vizualizovali ethidumbromidem, monoklonální proužky o příslušné délce jsme sterilně vyřízli, přidali k nim cca 200μl tkáňové vody a nechali danou eluovat. Počet monoklonálních přestaveb Ig/TCR na jednoho pacienta se pohyboval v rozmezí 1-5 (viz Příloha 2).



Obr. 6: Ukázka polyakrylamidového gelu s přestavbami Ig/TCR u pacienta č. 876

Příprava monoklonálních produktů k sekvenaci

Produkty z eluátu jsme reamplifikovali se stejnou sadou primerů, jako při první amplifikaci (přidali jsme 1 μ l eluátu) a přečistili pomocí QIAquick PCR Purification kitu (QIAGEN, Hilden, Germany).

Navržení specifických primerů

Získané sekvence přechodových V-(D)-J oblastí jsme vyhodnotili v softwaru VECTOR NTI 8 Suite (INFORMAX, Bethesda, MD, USA). Primery jsme navrhovali tak, aby je bylo možno použít v RQ-PCR s hydrolyzační sondou a reverzním primerem umístěnými v konsensus oblasti dané přestavby. Snažili jsme se o to, aby co nejvíce pokrývaly úsek náhodně přidaných nukleotidů mezi V-D nebo D-J segmentem a aby minimálně (3-4 nukleotidy) zasahovaly do J segmentu. Primery jsme navrhovali ve velikostním rozmezí 18-25 nukleotidů a u každého z nich jsme zároveň zkontrolovali případnou tvorbu dimerů či vlásenek. Pro každou sekvenci jsme navrhli minimálně dva primery.

Příprava specifického RQ-PCR

Optimalizaci jednotlivých systémů jsme prováděli na přístroji iCycler IQ™ (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) především pomocí změn anealingové teploty, a dále pomocí změn koncentrace primerů či množství Mg. Z důvodu šetření biologického materiálu jsme pro optimalizaci používali pouze ředění 10^{-2} a 10^{-4} pacientovy diagnostické DNA. Protože podobné sekvence přestaveb Ig/TCR se v malém množství mohou vyskytovat i ve fyziologických lymfocytech, bylo třeba ke každé reakci přidávat DNA z krve zdravých dárců (tzv. "buffy coat", BC). Optimalizace vyžadovala v závislosti na systému 1-10 RQ-PCR.

Pomocí optimalizovaných systémů RQ-PCR jsme pak provedli vlastní měření MRN ve vzorcích z průběhu léčby a v sortovaných subpopulacích. Jako standard jsme použili ředící řadu z pacientovy diagnostické DNA, ředěné do BC, a to od 10^{-1} do 10^{-5} v duplikátu, jako negativní kontrolu jsme použili multiplikát BC (n=6) z důvodu vyloučení falešně pozitivních výsledků. Jednotlivé sortované i nesortované pacientské vzorky jsme pipetovali v triplicátu pro dosažení co nejpřesnějších výsledků a eliminaci chyb při pipetování.

Interpretace výsledků RQ-PCR

Výsledky dosažené pomocí metody kvantitativního PCR jsou v rostoucí míře využívány pro klinická rozhodování. Proto je nutno při jejich vyhodnocování dodržovat pravidla, která omezí riziko falešné positivity či negativity. Evropská společnost pro reziduální nemoc u ALL (ESG-MRD-ALL) proto navrhla podrobná pravidla pro interpretaci výsledků, podle kterých jsme hodnotili MRN i u pacientů prezentovaných v této práci.

Pro interpretaci výsledků byl kromě pojmu senzitivita nově zaveden pojem kvantifikovatelnost RQ-PCR:

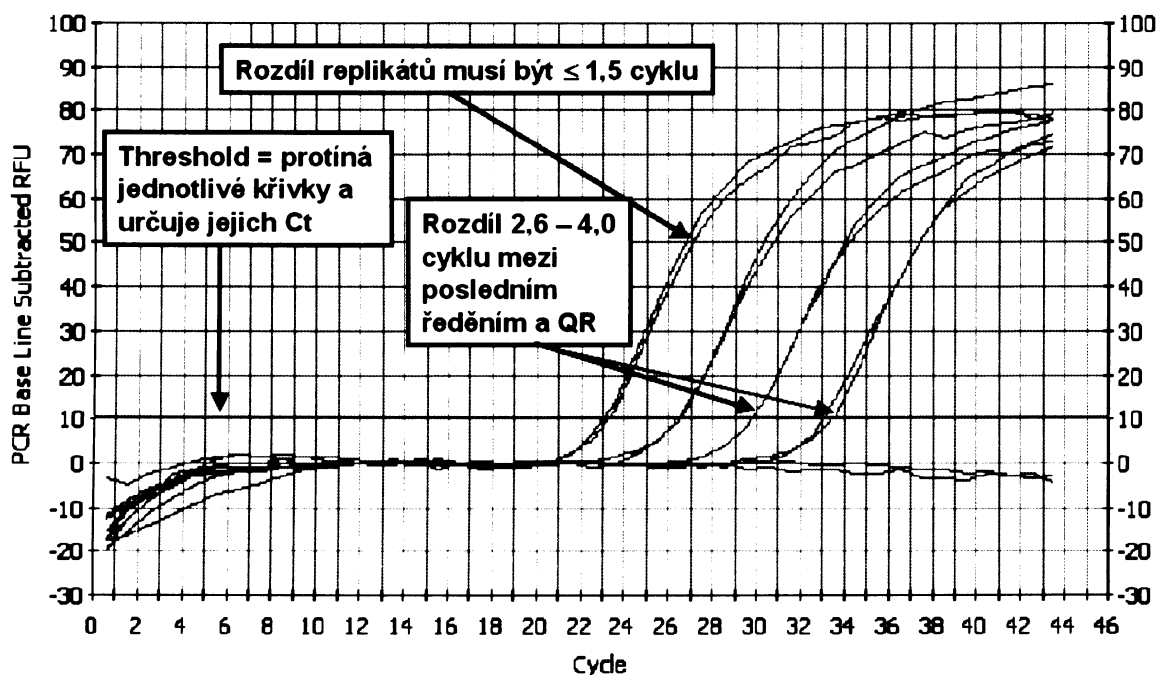
Senzitivita RQ-PCR je nejvyšší hodnota ředění, která:

- se specificky amplifikuje
- má nejméně jeden vzorek z replikátu pozitivní
- má Ct replikátů v rozmezí 20 cyklů od Ct neředěného vzorku (diagnostického vzorku)

- má Ct replikátů v rozmezí 20 cyklů od interceptu standardní křivky; interceptem rozumíme vypočítanou hodnotu Ct, ve které by standardní křivka protнула graf u neřaděného diagnostického vzorku 10^0

Kvantifikovatelnost RQ-PCR je nejnižší ředění, které:

- se specificky amplifikuje
- rozdíl Ct replikátů ≤ 1.5
- průměrná hodnota Ct je o 2.6–4.0 cykly větší než předchozí 10x nižší ředění (nebo o 0.5–1.5 cyklu vyšší než předchozí 5x nižší ředění)
- standardní křivka se zahrnutím tohoto ředění má sklon („slope“) mezi - 2,6 a 4,0 a korelační koeficient ≥ 0.98 (podrobněji vysvětleno v kapitole Kvantitativní PCR)

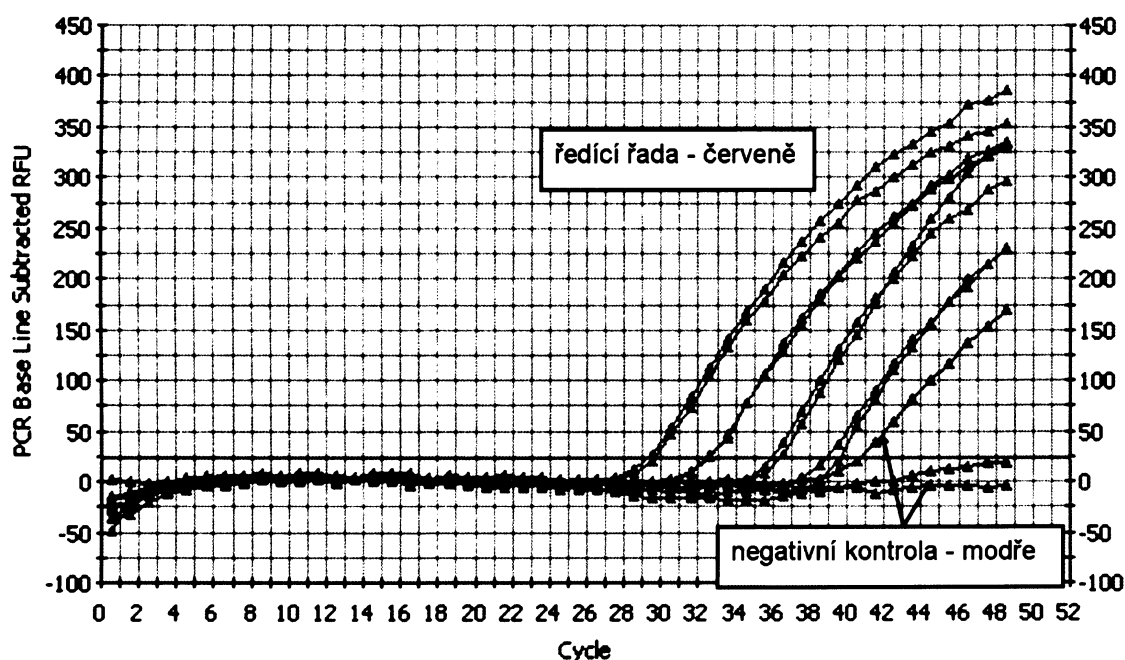


Obr. 7: Graf standardní křivky, ředění 10^{-01} - 10^{-04} červeně, zeleně voda jako negativní kontrola

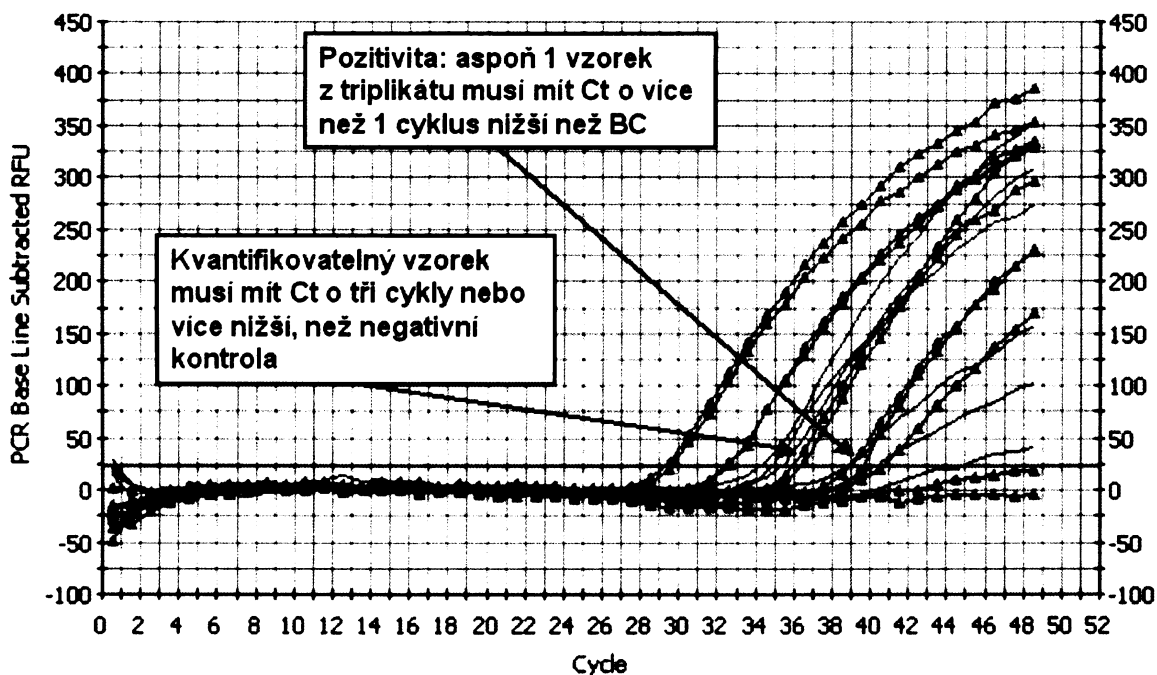
Metoda kvantifikace klonálně-specifických přestaveb Ig/TCR má navíc již zmíněné úskalí v podobě falešně pozitivních výsledků, které by mohly vzniknout nasednutím specifického primeru na "zdravou" DNA. Pro větší přesnost se negativní kontrola (BC) používá v šesti replikátech. Přes všechnu snahu

dochází k amplifikaci DNA z BC v přibližně 50% optimalizovaných systémů RQ-PCR. Další pravidla, kterými se proto musíme řídit, jsou tato:

- při hodnocení kvantifikovatelnosti průměrná hodnota Ct negativní kontroly (BC) musí být nejméně o 3 cykly vyšší než nejnižší Ct hodnota vzorku (to platí i pro standardní křivku): jestliže je hodnota ≥ 3 , vzorek je kvantifikovatelný; v rozmezí 3 - 1 cyklu říkáme, že je vzorek pozitivní bez udání hodnoty
- při hodnocení senzitivity musí být aspoň jedna hodnota Ct vzorku o nejméně jeden cyklus nižší než nejnižší Ct hodnota negativní kontroly (to platí i pro standardní křivku), jinak se vzorek hodnotí jako negativní.



Obr. 8: Graf standardní křivky v rozmezí 10^{-01} - 10^{-04} (vyznačeno červeně) s negativní kontrolou v triplikátu (DNA zdravých dárců, vyznačeno modře)



Obr. 9: Graf s dvěma vzorky pacientů; červeně je vyznačena ředící řada v rozmezí 10^{-01} - 10^{-04} , modře negativní kontrola (DNA zdravých dárců), zeleně a černě jsou označeny dva patientské vzorky v triplikátu, z nichž zelený můžeme podle výše zmíněných pravidel kvantifikovat, černý vzorek hodnotíme jako "pozitivní", protože jeden vzorek z triplikátu vyšel o více než 1 Ct dříve než negativní kontrola.

Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie používá jako zkoumaný materiál buněčnou suspenzi (např. kostní dřeň, periferní krev či likvor). K detekci jednotlivých povrchových nebo cytoplazmatických molekul se používají monoklonální protilátky konjugované s fluorescenčními značkami. Suspenze buněk je po navázání fluorescenčně značených protilátek nasáta do průtokového cytometru, kde jsou buňky seřazeny do úzkého proudu kapaliny a vysokou rychlostí proudí komorou a jsou ozářeny laserovým paprskem. Laserové světlo excituje na buňkách navázané konjugáty protilátka-fluorescenční značka, které emitují světlo o vlnové délce určené typem fluorescenční značky. Současné průtokové cytometry umožňují zapojením jednoho až tří laserů excitovat 3 až 9 různých fluorescenčních značek zároveň. Pro každou buňku je zapsána kvantita každého fluorescenčního znaku a dva nefluorescenční parametry popisující

velikost (tzv. Forward Scatter - Fsc) a granularitu buňky (tzv. Side scatter - Ssc) (Kalina et al. 2006). Takto získaná digitální data se následně analyzují ve speciálních softwarech. Ohraničení a výběr definované populace buněk se nazývá gatování (např. analýza lymfocytárních subpopulací se provádí z gatů lymfocytů) (Shapiro 2003).

Názvosloví leukocytárních antigenů, CD klasifikace

Určité kombinace antigenů jsou typické pro leukocyty v jednotlivých vývojových stádiích, např. pro B-lymfocytární řadu to jsou CD19, CD20, CD22, T-lymfocytární řada obsahuje CD2, CD3, CD7 a myeloidní řada CD13 a CD33. CD klasifikace (cluster of differentiation) je protokol používaný pro identifikaci a výzkum povrchových molekul na leukocytech. Klasifikace vznikla v roce 1982 na 1. mezinárodní konferenci H/LDA (Human Leukocytes Differentiation Antigens) v Paříži. Smyslem této klasifikace byla především snaha sjednotit klasifikaci velkého množství monoklonálních protilátek vzniklých v mnoha laboratořích na celém světě. Od té doby klasifikace již nezahrnuje pouze antigeny na leukocytech a v současnosti zahrnuje více než 320 CD znaků. Klasifikace dnešním rozsahem ztrácí na přehlednosti a v některých případech se dává přednost originálnímu názvu molekuly před jejím CD ekvivalentem (Hrusak and Porwit-MacDonald 2002).

V rámci protokolu ALL IC BFM2002, který se v současnosti používá pro léčbu dětské ALL v ČR a v řadě dalších zemí, je detekce MRN řešena v rámci studie Mini-Mini. Součástí je standardní panel protilátek a jednotná analýza dat, tento postup byl použit i v rámci této studie.

Přehled kombinací pro sledování MRN u B řady

(ve všech kombinacích je tzv. „back bone“ antigen pro B řadu CD19)

SYTO16/CD19/CD45 (základní kombinace protilátek pro hodnocení procenta CD19^{pos} buněk v rámci jaderných buněk – SYTO16^{pos}, nižší exprese až negativita antigenu CD45 je typickou známkou malignity u BCP ALL)

CD20/CD10/CD19/CD45 (v rámci vývoje nemaligní B řady touto kombinací definujeme sekvenci exprese antigenu CD10 a CD20, kdy postupně buňka

ztrácí antigen CD10 a získává antigen CD20, rovněž touto kombinací definujeme nezralé CD19^{pos}CD34^{pos} prekurzory. Asynchronní exprese antigenů CD10, CD20 a CD34 jsou nejčastějšími typickými aberacemi u BCP ALL)

CD58/CD10/CD19/CD34 (hyperexprese CD58 v porovnání s nemaligní B řadou byla nejprve identifikována v rámci mikročipových studií)

CD10/CD66c/CD19/CD45 (aberantní exprese CD66c je nejčastější aberantní myeloidní znak u BCP ALL) (Mason et al. 2002)

Přehled kombinací pro sledování MRN u T řady

(ve všech kombinacích je tzv. „back bone“ antigen pro T řadu CD7)

SYTO16/CD7/CD45 (základní kombinace protilátek pro hodnocení procenta CD7^{pos} buněk v rámci jaderných buněk – SYTO16^{pos}) je na rozdíl od CD99/CD7/CD5/CD3 (negativita CD3 a/nebo hyperexprese CD99 v kontextu CD7^{pos}CD5^{pos} buněk) častou imunofenotypovou odchylkou v rámci intra-TdT/CD7/CD3/intra-CD3 (intracelulární pozitivita TdT v prekurzorech T lymfocytů se vyskytuje fyziologicky pouze v thymu, je to tedy velmi specifický marker malignity v periferní krvi a kostní dřeni v rámci T řady) (Mason et al. 2002).

V rámci hodnocení MRN jsme hodnotili standardně definované subpopulace u všech pacientů stejně bez ohledu na iniciální imunofenotyp (u BCP ALL 29 subpopulací, u T ALL 5 subpopulací). Pro hodnocení positivity a negativity daných subpopulací v daný časový bod jsme museli definovat pozadí v kostní dřeni. Pozadí jsme definovali jako trojnásobek 98. percentilu u tzv. cross lineage kontrol a náhodné poloviny pacientů s negativní MRN podle RQ PCR Ig/TCR v daný časový bod. Pokud hodnota přesáhla takto definovanou prahovou hodnotu, hodnotili jsme ji jako pozitivní, pokud více hodnot bylo nad tímto prahem, brali jsme jako MRN nejvyšší hodnotu.

Přehled hodnocených MRN subpopulací:

B řada: SYTO16^{pos}CD19^{pos}CD45^{dim/neg}, CD10⁺⁺CD19^{pos}, CD10^{pos}CD19^{pos}, CD10^{neg}CD20^{neg}CD19^{pos}, CD10⁺⁺CD19^{pos}CD34^{pos}, CD10^{pos}CD19^{pos}CD34^{pos}, CD10^{neg}CD20^{neg}CD19^{pos}CD34^{pos}, CD10⁺⁺CD58⁺⁺CD19^{pos}, CD10^{pos}CD58⁺⁺

CD19^{pos}, CD10^{neg}CD58⁺⁺CD19^{pos}, CD10⁺⁺ CD58⁺⁺CD19^{pos}CD34^{pos}, CD10^{pos}CD58⁺⁺CD19^{pos}CD34^{pos}, CD10^{neg} CD58⁺⁺CD19^{pos}CD34^{pos}, CD10^{pos}CD66c^{pos}CD19^{pos}, CD10⁺⁺CD66c^{pos}CD19^{pos}, CD10^{pos}CD66c^{pos}CD19^{pos}, CD10^{neg}CD66c^{pos}CD19^{pos} (v rámci subpopulací u kombinace CD10/CD66c/CD19/CD45 jsme ještě navíc hodnotili u jednotlivých vyjmenovaných subpopulací 3 subpopulace podle exprese CD45 – CD45⁺⁺, CD45^{dim}, CD45^{neg})

T řada: CD99⁺⁺CD7^{pos}CD5^{pos}, CD3^{neg}CD7^{pos}CD5^{pos}, CD7^{pos}intra-TdT^{pos}, CD7^{pos}intra-TdT^{pos} a CD7^{pos}intra-TdT^{pos}CD3^{pos}intra-CD3^{pos}

Tabulka 2: Přehled některých používaných antigenů:

Molekula	Popis molekuly	Fyziologická exprese	Význam pro diagnostiku leukémií
CD1a		kortikální tymocyty	určuje intermediální T-ALL
CD2	receptor E rozet	exprese u T a NK buněk	T-ALL, aberantně u AML
CD3	součást komplexu TCR	exprese u T buněk	cytopl. či memb. u všech T-ALL
CD4	součást komplexu TCR	T-helpery a monocyty	u části T ALL, bývá u AML M4
CD5		T buňky, část B buněk	CLL, T-ALL, MCL
CD7		T-buňky, My-prekurzory	T-ALL, aberantně u AML
CD8	součást komplexu TCR	T-supresory, NK buňky	u části T-ALL, T-CLL, T-NHL
CD10	neutrální endopeptidáza	prekurzory B, granulocyty	BCP-ALL, část T-ALL
CD13	amiopeptidáza N	monocyty, granulocyty	AML, aberantně u BCP-ALL
CD15	Lewis X, X hapten	granulocyty, slabě monoc.	typické u B ALL, AML
CD16	Fc gama receptor III	granulocyty, NK buňky	NK ALL, NK LGL
CD19		B buňky	všechny BCP i B ALL, aberantně u AML
CD20		zralé B-lymfocyty	část BCP-ALL, zralá B-ALL, CLL
CD22		B buňky	ALL B-řady
CD23	Fc eta receptor II	část B buněk, eozinofily	CLL
CD24		B buňky, granulocyty	ALL B-řady
CD25	interleukin2, receptor alfa	aktivované T buňky, Monocyty	část T-ALL
CD33		monocyty, myeloblasty	typicky AML, aberantně u BCP ALL
CD34		všechny prekurzory	méně zralé formy AML i ALL
CD38		části B, T buněk a myeloidních buněk	T-ALL, BCP ALL, AML, CLL

CD45	leukocyte common antigen	všechny leukocyty	CLL, T-ALL a AML , slabá exprese u BCP ALL
CD65		zralejší myeloidní bb.	AML, méně u BCP-ALL
CD66c	KOR-SA3544	Granulocyty	BCP ALL, korelace s negativitou TEL/AML1, hyperploidií a pozitivitou BCR/ABL
CD79a	komponenta B-buněčného receptoru	povrchově: zralé B lymfocyty, intracelulárně: B-prekurzory	ALL B-řady
HLADR	součást MHC II. třídy	B buňky, myeloidní buňky prekurzory T, aktivované T-Lymfocyty	AML (chybí u M3) , ALL B-řady, vzácněji u T-ALL
kapa řetězec Ig	jeden z lehkých řetězců Ig	zralé B-lymfocyty	zralá B-ALL
lambda řetězec Ig	jeden z lehkých řetězců Ig	zralé B-lymfocyty	zralá B-ALL
IgM	jeden z těžkých řetězců Ig	zralé B-lymfocyty	zralá B-ALL
TCR αβ		zralé T-lymfocyty	zralá T-ALL
TCR γδ		zralé T-lymfocyty, do 10%	zralá T -ALL, NK-LGL

Vysvětlivky: BCP ALL = ALL z prekurzorů B buněk

NHL = ne Hodgkinův lymfom

LGL = large granular lymphocyte

Zpracování sortovaných vzorků

Po sortování buněk, které bylo popsáno v kapitole o průtokové cytometrii, jsme ze vzorku izolovali DNA a stanovili její množství a amplifikovatelnost pomocí kvantifikace kontrolního genu

Izolace DNA

- Počty do 1 milionu buněk jsme izolovali QIAamp® DNA Blood Micro Kitem (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), nad 1 milion QIAamp® DNA Blood Mini Kitem (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany).
- K buňkám jsme přidali PBS pufr do objemu cca 700 µl, snažili jsme se co nejvíce omývat stěny s naschlými kapkami. Důkladně jsme je protřepali

a stočili 10 min. při 2000 rpm. Odsáli jsme špičkou PBS a na dně nechali 100 μ l nad peletou.

3) Při izolaci Micro Kitem jsme postupovali takto:

- a. k peletě se 100 μ l PBS jsme přidali 10 μ l proteinázy K, 100 μ l pufru AL (k rozrušení jaderné membrány) a řádně protřepali
- b. vzorky jsme nechali 10 min. inkubovat ve vodní lázni o teplotě 56 °C
- c. po inkubaci jsme přidali 50 μ l 96% etanolu, opět protřepali a nechali inkubovat 3 min. při pokojové teplotě
- d. vzorek jsme přenesli na kolonu a centrifugovali 1 min. při 6000 rpm
- e. kolonu jsme přenesli do čisté zkumavky (tu se supernatantem jsme vyhodili), přidali 500 μ l pufru AW1 (promývací pufr) a stočili 1 min. při 6000 rpm
- f. kolonu jsme přenesli do čisté zkumavky (tu se supernatantem jsme vyhodili), přidali 500 μ l pufru AW2 (promývací pufr) a stočili 3 min. při 13 400 rpm
- g. kolonu jsme opět přenesli do čisté zkumavky (tu se supernatantem jsme vyhodili), přidali 40 μ l pufru AE (dojde k uvolnění DNA z kolony), inkubovali 3 min. při pokojové teplotě a stočili 3 min. při 13 400 rpm
- h. při izolaci Mini Kitem je rozdíl pouze v množství přidávaných látek a v proteináze

4) Všechnu DNA jsme přepipetovali do šroubovacích 1,5 ml zkumavek, aby nedošlo ke ztrátám vzorku v důsledku vypařování.

Ze sortovaných buněk jsme ve většině případů izolovali DNA do 24 hodin po sortování, ovšem ani při izolaci po delším časovém úseku (max. 4 dny) nebyla kvalita izolované DNA ovlivněna.

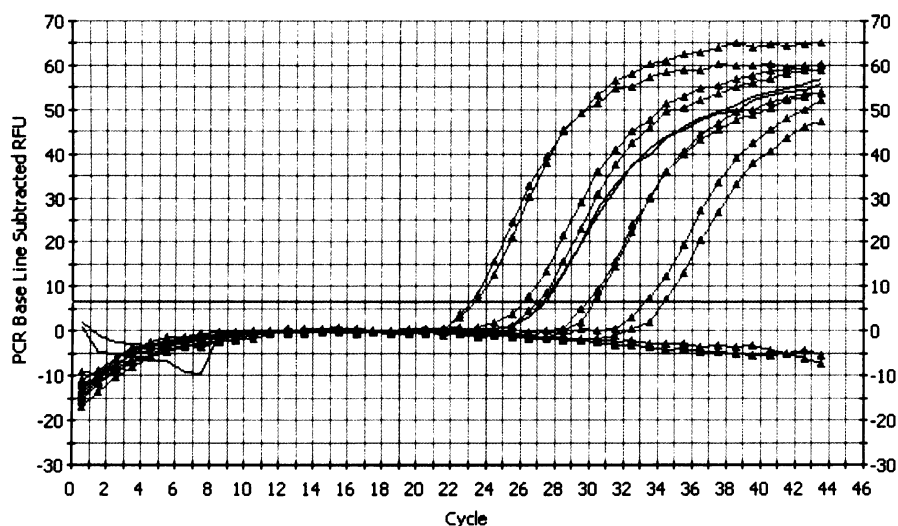
Stanovení kontrolního genu

U izolované DNA jsme pomocí RQ-PCR změřili koncentraci a amplifikovatelnost pomocí kontrolního genu pro albumin:

1. Směs (pufr, MgCl₂, dNTP, primery, polymeráza, sonda značená fluoroforem YAKIMA, BSA) - 22,5 μ l
2. Standardní ředící řadu, vzorky a negat. kontrolu (vodu) jsme pipetovali v duplikátech (2,5 μ l DNA) do připravené směsi (celkový objem 25 μ l). Pro

standardní křivku jsme použili DNA o známé koncentraci, $10^0=100\text{ng}/\mu\text{l}$.
Ředící řadu (do 10^{-5}) DNA do vody jsme připravovali vždy čerstvou.

3. RQ-PCR probíhalo na přístroji iCycler IQ™ (BIO-RAD, Hercules, CA, USA),
annealing 62°C , fluorophor Yakima

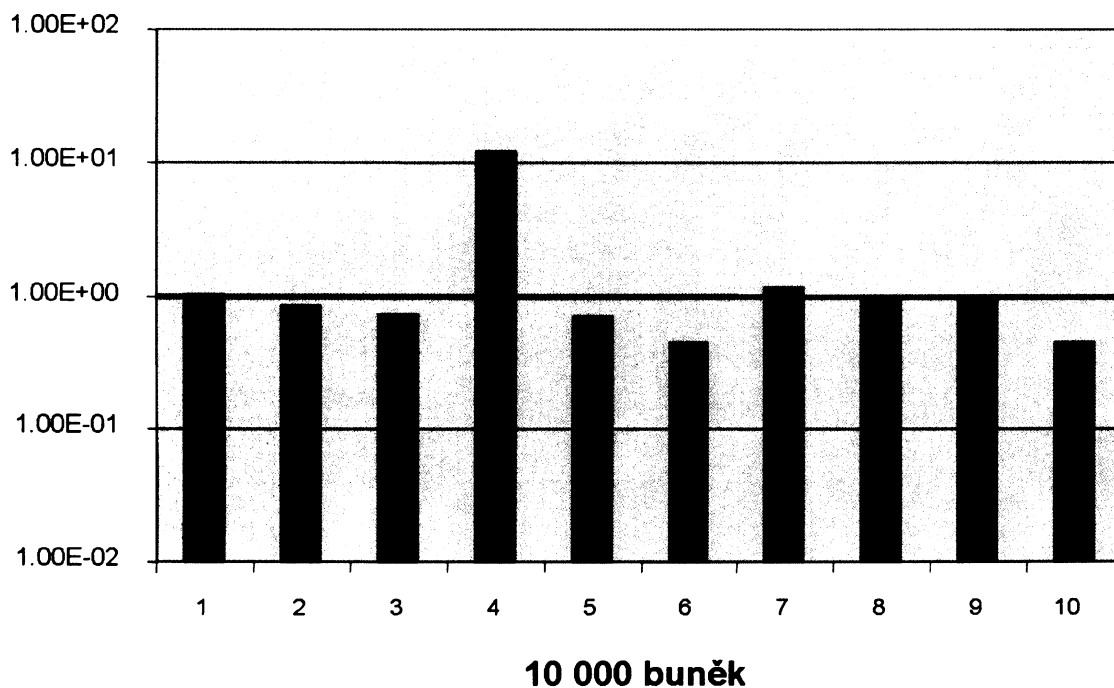


Obr. 10: Ukázka amplifikace kontrolního genu u sortovaného vzorku pacienta č. 587. Červeně je označena standardní křivka ($10^{-1} - 10^{-4}$), černě vzorek pacienta v duplikátu a modře negativní kontrola- voda.

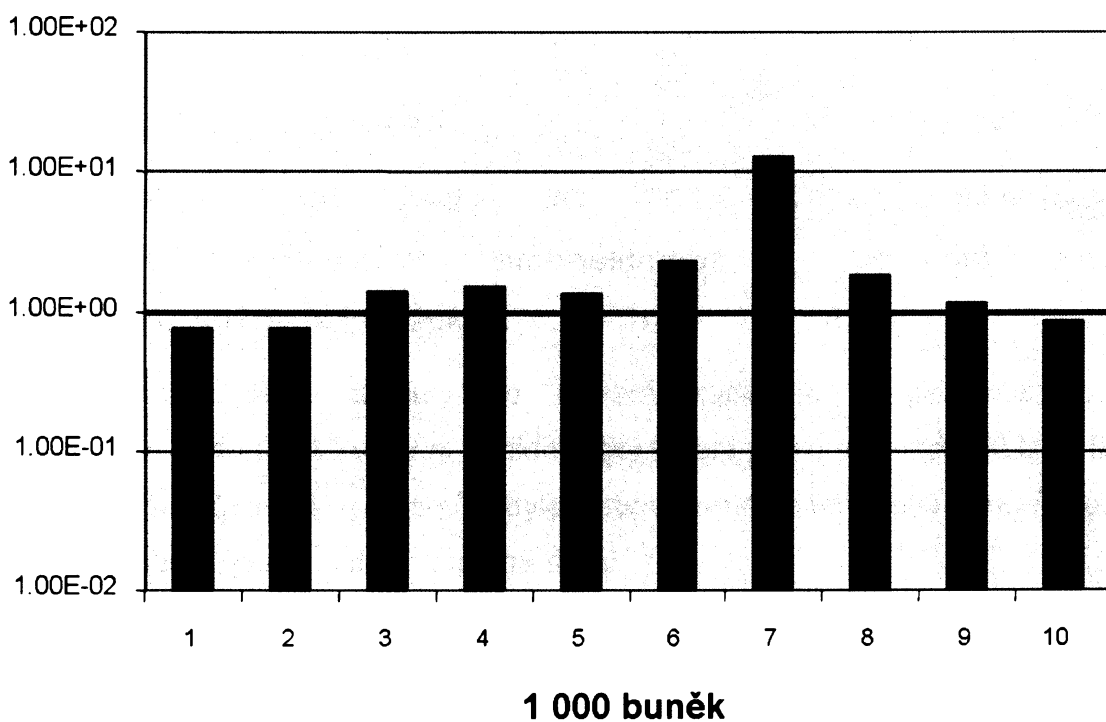
Výsledky

Testování citlivosti a specifity metody RQ-PCR v malých množstvích buněk

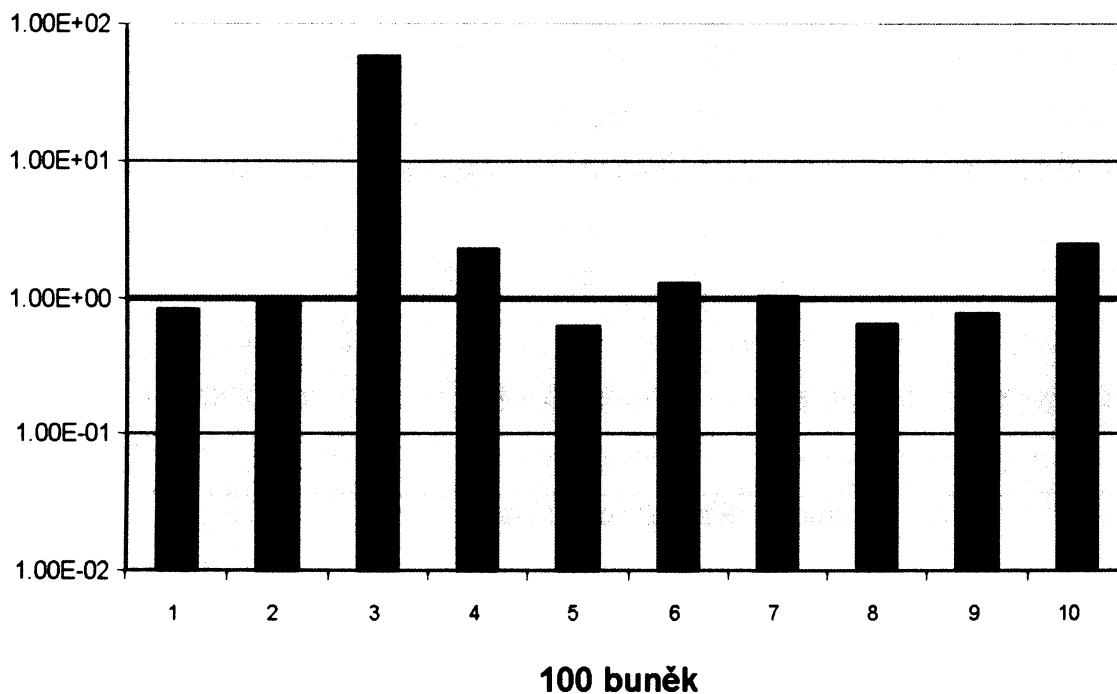
Pro pozdější potřebu optimalizace RQ-PCR jsme chtěli zjistit, do jakého množství buněk jsme schopni kvantifikovat MRN na úrovni DNA. Pro tento pokus jsme zvolili buněčné populace o velikosti 10000, 1000 a 100 buněk sortované z buněčné leukemické linie REH (leukemická buněčná linie s přestavbou TEL/AML1). Velikosti jsme zvolili záměrně vzhledem k předpokládaným velikostem patientských vzorků, které by se měly pohybovat okolo 1000 až 10000 buněk. K testování jsme použili klonálně specifickou přestavbu IgH – VH3-JH. Každou populaci jsme měřili v multiplikátu (n=10). Výslednou koncentraci DNA jednotlivých vzorků jsme poměřovali s příslušnou hodnotou genu pro Albumin. Teoretickým předpokladem byla dobrá kvantifikace u populace 10000 buněk, relativně dobrá kvantifikace u populace 1000 buněk a špatná kvantifikace (neschopnost spolehlivé interpretace) u populace 100 buněk. Naše hledaná hodnota byla 1. Přehled výsledných hodnot tohoto pokusu je připojen v příloze č. 1.



Obr. 11 (přestavba VH3-JH detekovaná pomocí RQ-PCR/kontrolní gen pro albumin) Sortovaná populace 10 000 buněk v multiplikátu (n = 10)



Obr. 12 (přestavba VH3-JH detekovaná pomocí RQ-PCR/kontrolní gen pro albumin) Sortovaná populace 1 000 buněk v multiplikátu (n = 10)



Obr. 13 (přestavba VH3-JH detekovaná pomocí RQ-PCR/kontrolní gen pro albumin) Sortovaná populace 100 buněk v multiplikátu (n = 10)

Detekce MRN podle RQ PCR Ig/TCR v imunologicky definovaných sortovaných subpopulacích u pacientů s nově diagnostikovanou ALL v iniciační fázi léčby

Do této části studie bylo celkem zařazeno 8 pacientů s nově diagnostikovanou ALL. Všichni pacienti byly léčeni podle protokolu ALL IC BFM 2002. Diagnóza u pacientů byla standardně stanovena morfologicky a imunologicky podle nálezu v kostní dřeni.

Charakteristika pacientů

Do studie byly zařazeni konsektivně všichni pacienti s diagnózou ALL v rozmezí březen 2005 až květen 2006, pacient číslo 968 se zralou T ALL byl diagnostikován v prosinci 2006 a byl do studie zařazen, abychom ověřili

sortování u tohoto typického podtypu T ALL. U všech pacientů byl při diagnóze stanoven centrálně imunofenotyp, včetně stanovení DNA indexu (DI). ALL pacienta byla označena jako hyperdiploidní pokud jeho DNA index byl větší nebo roven 1,16 a menší než 1,6. Dále bylo provedeno u všech vyšetření na přítomnost fúzních genů TEL/AML1, BCR/ABL, MLL/AF4. U pacientů s aberantní expresí NG2 a/nebo CD10 negativních (pro B) bylo provedeno screeningové vyšetření na přítomnost dalších MLL fúzních genů MLL/AF9, MLL/AF10, MLL/AF6, MLL/ELL a MLL/ENL(zde u pacienta číslo 896).

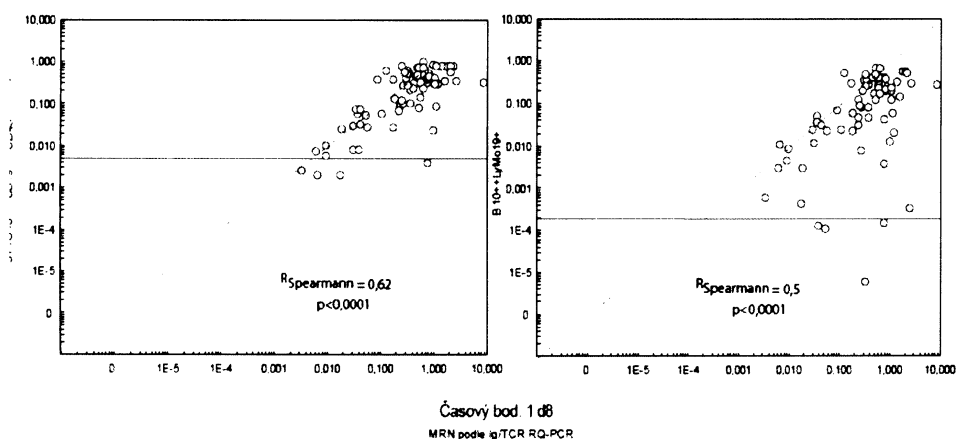
Pacient	Imunologická klasifikace	Imunogenotypová klasifikace	Riziková skupina	Věk při diagnóze
876	cALL	Hyperdiploidie	standardní	6 let
877	pre B-ALL	Bez hyperdiploidie a bez fúzních genů	střední	7 let
881	intermediární T-ALL	Bez hyperdiploidie a bez fúzních genů	střední	7 let
885	cALL	TEL/AML1	střední	11 let
890	cALL	Hyperdiploidie	střední	6 let
891	pre B-ALL	Hyperdiploidie	standardní	5 let
893	cALL	TEL/AML1	standardní	3 roky
896	pro B-ALL	MLL/ENL	střední	2 roky
968	zralá T-ALL	SIL-TAL1	střední	10 let

Tab. 3: Pacienti s nově diagnostikovanou ALL v iniciální fázi léčby

Nalezené klonální přestavby Ig/TCR spolu s použitými systémy jsou shrnuty v Příloze 2. Celkem u 7 pacientů z 8 se podařilo zavést systém pro sledování MRN podle Ig/TCR. RQ PCR systém s dostatečnou citlivostí (10^{-4}) se nepodařilo zavést pro pacienta číslo 893. Hladina MRN byla u pacientů sledována v následujících časových bodech: v den 8 v kostní dřeni a periferní krvi, v den 15, den 33 a týden 12 v kostní dřeni. MRN byla standardně detekována jak navrženými systémy pro přestavby imunoreceptorových genů tak i standardní 4 barevnou průtokovou cytometrií. Pacienti jsou do dne 8 léčeni

pouze kortikoterapií (prednisonem) a 1 dávkou intrathekálního metotrexátu. Většina pacientů odpoví na tuto léčbu poklesem blastů v periferní krvi pod 1000/uL (označujeme jako dobrou odpověď na prednison, všichni pacienti v naší studii byli dobří odpovídači). Tuto fázi někdy označujeme jako cytoreduktivní, protože bez použití agresivní chemoterapie se u většiny pacientů sníží významně nádorová nálož. Den 15 v kostní dřeni se standardně v protokolu hodnotí morfologicky v kategoriích M1 (<5% blastů), M2 (5 – 25%) a M3 (>25% blastů). M3 dřeň je stratifikačním kritériem, pacient je v případě M3 dřeně v den 15 stratifikován do vyššího rizika (standardní do středního, střední do vysokého). Stále je v tento časný časový bod naprostá většina pacientů MRN pozitivní jak cytometricky tak i molekulárně geneticky. Den 33 představuje konec 1. fáze intenzivní léčby a pacienti by měli již být v kompletní remisi (morfologicky v KD je méně než 5% blastů a jsou přítomny známky normální regenerace jak v kostní dřeni, tak i podle krevního obrazu). V den 33 a v týden 12 již významná část pacientů je MRN negativní.

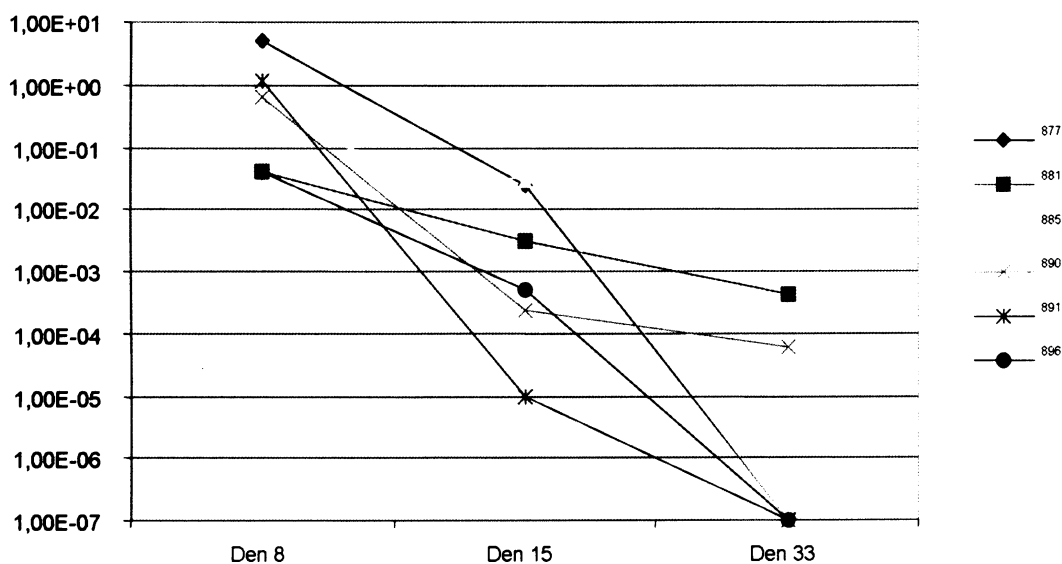
Jak je uvedeno v metodické části průtokové cytometrie, MRN byla hodnocena standardně pomocí porovnávání subpopulací se stanovenými prahovými hodnotami. Ve většině případů není celá populace blastů definovatelná pouze jednou subpopulací (např. blasty jsou jen částečně CD34^{pos}, hyperexprese CD58 je přítomná rovněž jen na subpopulaci blastů). Před vlastním sortováním jsme provedli srovnání jednotlivých subpopulací v jednotlivých časových bodech podle RQ PCR Ig/TCR. Srovnání míry korelace jednotlivých subpopulací jsme provedli jednak vizuálním hodnocením jednotlivých bodových grafů, tak i srovnáním Spearmanových korelačních koeficientů. V den 8 nejvyšší hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu dosáhla subpopulace SYTO16^{pos}CD19^{pos}CD45^{dim/neg} (viz obr. 14). Pro srovnání na obrázku je i ukázána subpopulace CD10⁺⁺. SYTO16^{pos}CD19^{pos}CD45^{dim/neg} subpopulaci jsme se rozhodli použít pro následné sortování vzorků od pacientů.



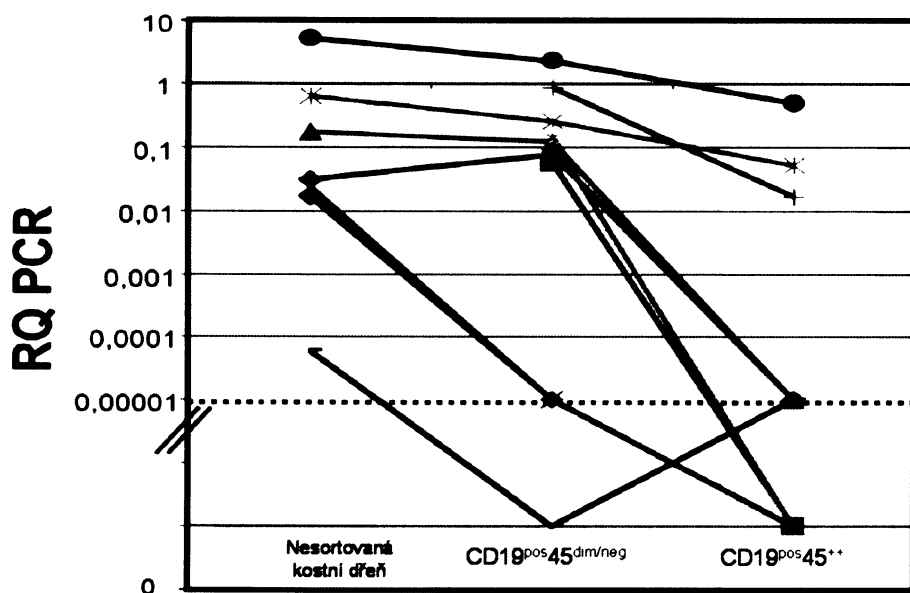
Obr. 14: Korelace subpopulací s MRN podle RQ-PCR Ig TCR, červenou čarou je znázorněna prahová hodnota použitá pro hodnocení pozitivity a negativity. (Mejstříková et al., manuscript v přípravě)

Výsledky sortování subpopulací u konsektivní kohorty pacientů

Sortování subpopulací bylo možné jen u těch pacientů, kde jsme měli v daném časovém bodu dostatečné množství materiálu. V den 8 jsme prováděli sortování u 7 pacientů, v den 15 u 7 pacientů, v den 33 u 6 pacientů a v týden 12 u 2 pacientů. Celkem jsme analyzovali MRN podle RQ PCR Ig/TCR v 73 vysortovaných subpopulacích.



Obr. 15: MRN podle RQ-PCR Ig-TCR v jednotlivých časových bodech. Z grafu je zřejmé, že většina pacientů dosáhla negativní MRN v den 33 a v týden 12. 4 pacienti dosáhli již v den 15 velmi nízké hladiny MRN.



Obr. 16: Graf sortovaných subpopulací (srovnání CD45⁺⁺ subpopulace, SYTO16^{pos}CD45^{dim/neg} a celkové kostní dřeně).

Část pacientů během léčby upreguluje na leukemických buňkách molekulu CD45, tedy i v této subpopulaci, jsme zachytili u části pacientů významnou příměs leukemických buněk. Výsledky všech pacientů jsou shrnuty v příloze č. 3.

Detekce MRN podle RQ PCR Ig/TCR v imunologicky definovaných sortovaných subpopulacích u pacientů s relapsem ALL a u pacientů po transplantaci kostní dřeně (TKD)

Vyšetřili jsme 8 pacientů (přehled monoklonálních přestaveb Ig/TCR viz Příloha 2). Pro všechny pacienty se podařilo zavést cíl pro sledování MRN s minimální senzitivitou 10^{-4} .

Pacient	Diagnóza	Fúzní gen	Bod léčby	Věk
658	pre B-ALL	BCR/ABL	testikulární relaps	16 let
587	pro B-ALL	MLL/AF4	odběr před transplantací	5 let
611	cALL	-	relapsový odběr	11 let
769	cALL	BCR/ABL	den 180 po transplantaci	18 let
825	cALL	BCR/ABL	10 měsíců po transplantaci	5 let
206	cALL	MLL/ENL	odběr 140 dní po transplantaci	14 let

401	cALL	TEL/AML1	relapsový odběr	10 let
719	cALL	TEL/AML1	CNS relaps	7 let

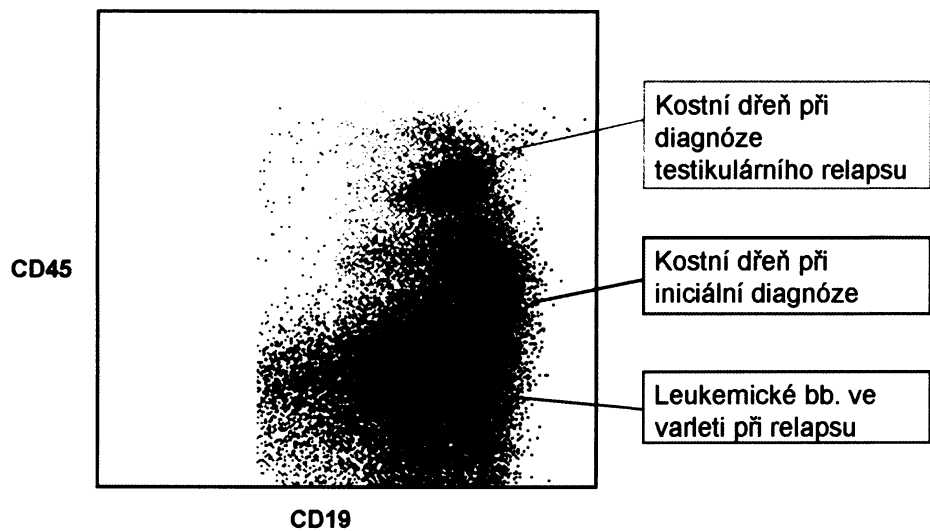
Tab. 4: Pacienti s relapsem nebo po transplantaci

U pacienta číslo 658 jsme sortovali kostní dřeň v okamžiku, kdy u něj byl diagnostikován izolovaný testikulární relaps (relaps byl omezen pouze na tkáň varlat, tedy pacient byl v hematologické remisi onemocnění). Průtoková cytometrie zde pozorovala výraznou regeneraci B řady (standardní 4-barevnou průtokovou cytometrií neidentifikovali atypické buňky ani na hladině MRN). RQ-PCR nesortované kostní dřeně odhalila hraniční pozitivitu $<10^{-4}$. Podle kombinace SYTO16/CD19/CD45 jsme definovali dvě základní subpopulace pro sortování (viz výše). Podle obrázku 17a je zřejmé, že jak při diagnóze v KD, tak i při relapsu v testes jsou leukemické buňky převážně CD45 negativní. Oblast obsahující CD45 negativní buňky, by tedy měl obsahovat více leukemických blastů, než oblast s CD45++ B lymfocyty (viz tab. 5).

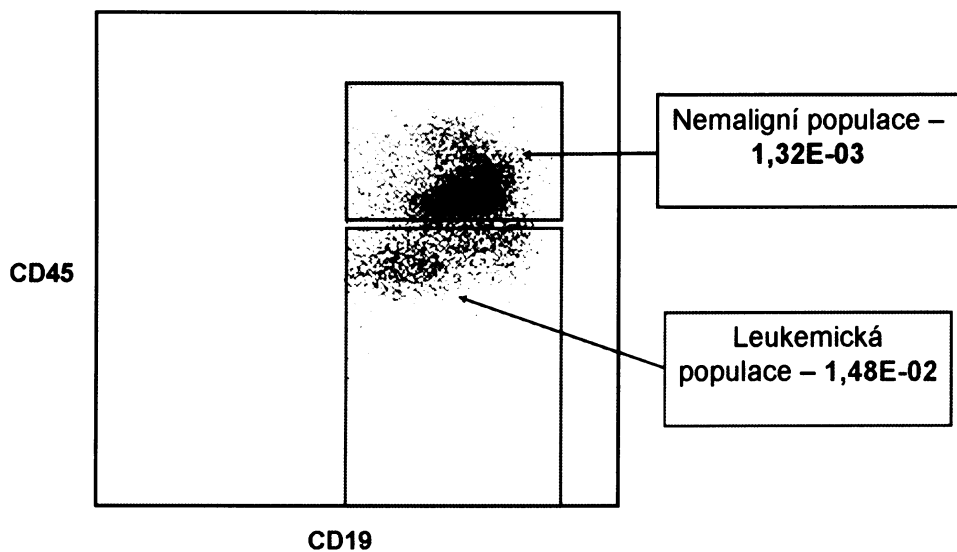
pacient	sortovaná populace	počet buněk	albumin	přestavba Vd2-Dd3	RQ-PCR MRN přest./alb.
658	CD19+CD45dim až neg	250000	8,70E-02	1,29E-03	1,48E-02
	CD19+CD45++	1100000	2,77E-01	3,67E-04	1,32E-03

Tab. 5: Výsledky RQ-PCR v sortovaných populacích pacienta č. 658

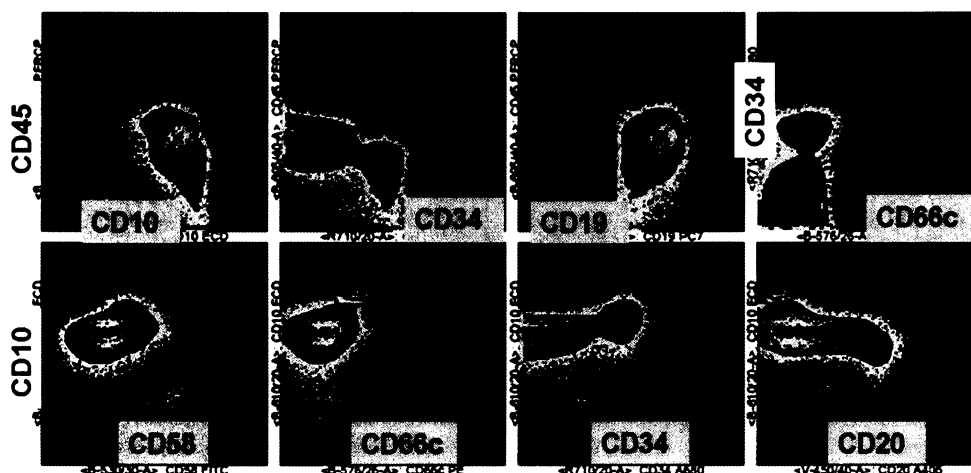
V obou sortovaných subpopulacích jsme dosáhli zahuštění leukemické populace o více než 1 řád a výsledek byl v obou subpopulacích podle RQ-PCR kvantifikovatelný. Výsledky všech pacientů jsou shrnuty v příloze č. 4.



Obr. 17a: Srovnání CD19^{pos} buněk při diagnóze v KD, při testikulárním relapsu v testes a v kostní dřeni při relapsu, kde leukemické buňky byly detekovány jen hraničně podle RQ-PCR Ig-TCR.



Obr. 17b: Srovnání nemaligní (označena modře) a leukemické (označena červeně) populace sortované podle znaků CD19 a CD45 vzorku kostní dřeni pacienta č. 658.



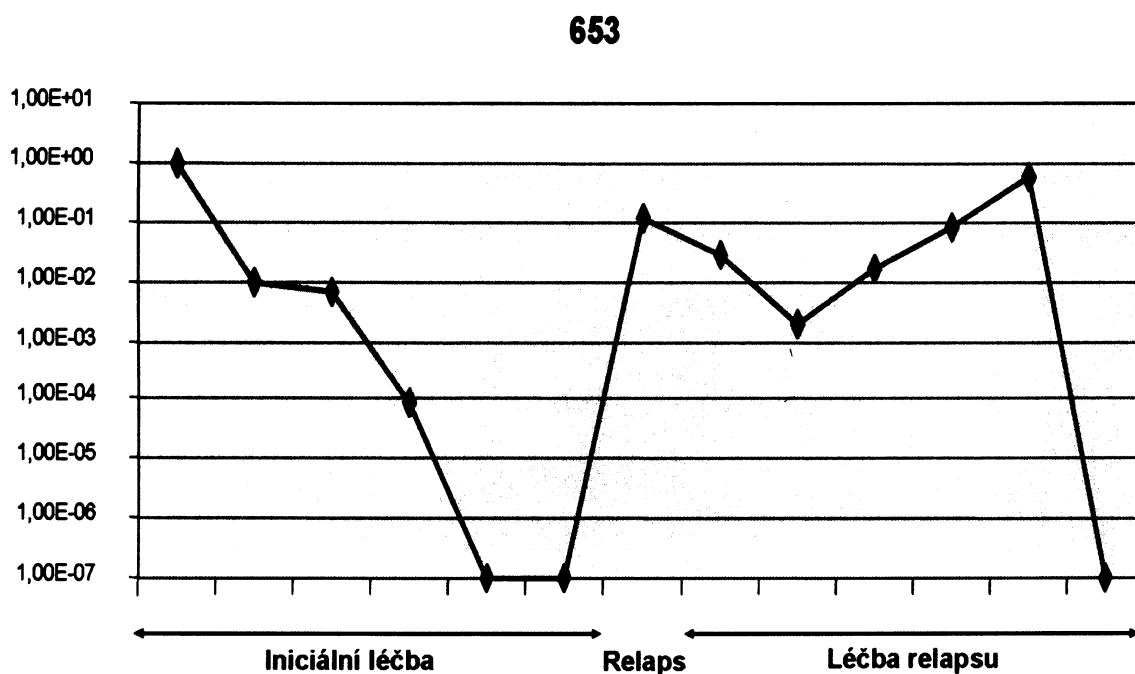
Obr. 18: Na obrázku je znázorněna analýza experimentální 8 barevné kombinace protilátek (CD58/CD66c/CD19/CD45/CD34/CD38/CD3/DAPI). Komplexní analýzou dat se nám podařilo identifikovat suspektní leukemické buňky na hladině $2,6 \cdot 10^{-2}$ z gatu $CD19^{pos} CD45^{dim/neg}$, což je podobná hodnota jako u sortované subpopulace podle stejného parametru.

Pacienti s ALL s hypodiploidním počtem chromozomů

Hypodiploidní počet chromozomů v leukemických blastech byl diagnostikován na základě DNA indexu. Touto metodou je možno (na rozdíl od vyšetření karyotypu) vyšetřit naprostou většinu pacientů. Od započetí léčby podle protokolu ALL-IC BFM 2002 (XI/02) do března roku 2007 bylo v České republice diagnostikováno 256 dětí s ALL, z toho pouze u 4 pacientů DI prokázal hypodiploidní počet chromozomů v leukemických blastech. Vyšetření klonality přestaveb prokázalo u dvou ze čtyř případů přítomnost pouze nezralých nekompletních přestaveb IGH. V jednom z těchto případů se nám nepodařilo optimalizovat RQ-PCR s dostatečnou citlivostí. Hladiny MRN v průběhu léčby u zbylých třech pacientů jsou znázorněny na obr. 19-21 (výsledné hodnoty viz. příloha 5).

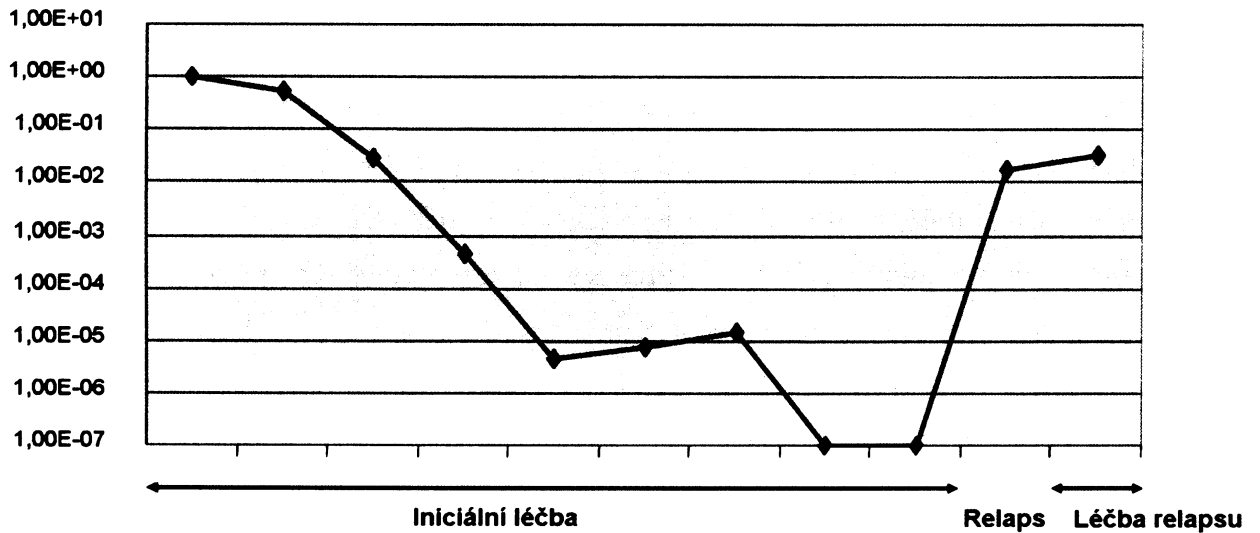
Pacient	Diagnóza	DNA index	Věk
926	cALL	0.47	2 roky
993	cALL	0.57	15 let
783	cALL	0.5	17 let
653	prae-B	0.8	9 let

Tab. 6: Seznam pacientů s hypodiploidní leukémií



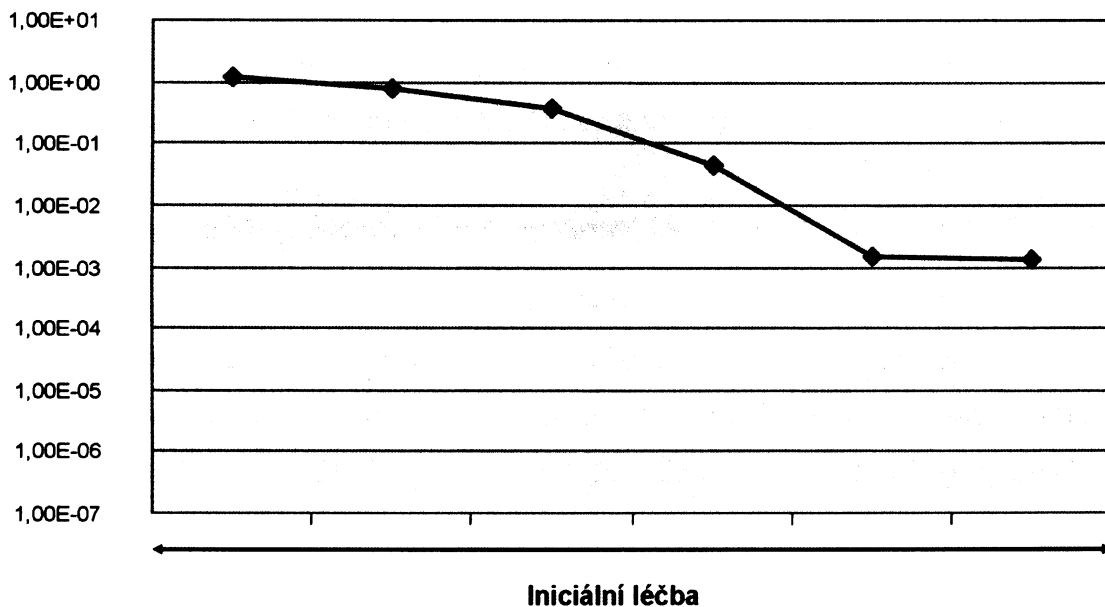
Obr. 19: Vývoj onemocnění u pacienta č. 653 s hypodiploidní ALL; na ose Y je vynesena hladina MRN, na ose X je znázorněn průběh léčby. Pacient zemřel na komplikace po transplantaci kostní dřeně, která byla indikována po časném relapsu onemocnění.

783



Obr. 20: Vývoj onemocnění u pacientky č. 783 s hypodiploidní ALL; na ose Y je vynesena hladina MRN v průběhu léčby. Pacientka zemřela na časný relaps onemocnění.

926



Obr. 21: Vývoj onemocnění u pacienta č. 926 s hypodiploidní ALL; na ose Y je vynesena hladina MRN. Pacient velmi špatně odpovídal na léčbu a zemřel na infekci v její časně fázi.

Diskuze

Metodická příprava cytometrického třídění buněk

Testovacím modelovým pokusem se nám podařilo potvrdit naše předpoklady dosažení velmi dobrých výsledků pro populace 10000 a 1000 buněk – obr. 11 a 12. Obr. 13 ukazuje, že oproti našemu očekávání dosahujeme relativně uspokojivých výsledků i pro populace 100 buněk. Odchytky od ideálního poměru 1 byly nepochybně z části způsobeny kolísajícím počtem nasortovaných buněk - proud vstříkující buňky do zkumavky kolísá a ty jsou pak rozmístěny po stěnách zkumavky, kde zasychají a nepodaří se je smýt ani důkladným vortexováním s PBS puřrem, proto výsledné absolutní hodnoty kolísaly s negativním dopadem na přesnost kvantifikace. Malé množství buněk (a tedy i templátu pro PCR) pak vede k horší kvantifikaci pomocí RQ-PCR způsobené celkově nižšími absolutními naměřenými hodnotami.

Vzhledem k tomu, jak velké jsou a budou předpokládané sortované subpopulace skutečných pacientů (většinou desetitisíce, v horším případě tisíce, jen výjimečně menší množství buněk), byly naše testovací experimenty úspěšné. Rozptyl naměřených hodnot se vzhledem k množství templátu pohybuje na hranici technických možností RQ-PCR. Pro průkaz negativity nebo positivity v subpopulacích pacientů bude naprosto postačující a dá nám i dobrý kvantitativní odhad kontaminace MRN negativní populace.

Měření MRN pomocí PCR a cytometrie

Existuje několik metod měření MRN ALL, z nichž nejpoužívanější dva (průtoková cytometrie a molekulární detekce přestaveb imunoreceptorových genů) jsou předmětem této diplomové práce. Průtoková cytometrie detekuje MRN pomocí abnormálního imunofenotypu - detekuje kombinaci markerů bílých krvinek, které se na fyziologických lymfoidních buňkách sice vyskytují, ale nenacházejí se ve stejné kombinaci jako je měřena u leukemických buněk. Tento leukemický fenotyp se pak používá pro identifikaci 1 maligní buňky v až 10 000 buňkách zdravých. Tato senzitivita je udávána až u 90% případů ALL, ale dosud není objasněn vliv nemaligních buněk na interpretaci výsledků. Průtoková cytometrie je ve srovnání s ostatními přístupy velmi rychlá a dobře

kvantifikovatelná, ale je ji potřeba pro praktické užití lépe standardizovat. Detekce MRN pomocí klonálně-specifických přestaveb Ig/TCR využívá unikátních přechodových V-(D)-J sekvencí leukemického klonu. Tato metoda je zlatým standardem určování MRN, je dobře mezinárodně standardizovaná i pro klinické užití, je však velmi pracná. Navíc ani ona není použitelná u všech pacientů, neboť ne vždy jsme schopni detekovat genové přestavby či fúze genů. Proto jsme se rozhodli použít tyto metody v tandemu a ověřit tak specifitu jednotlivých subpopulací maligních buněk pacientů.

Ve vzorcích čerstvě odebraných pacientům jsme se snažili oddělit maligní a nemaligní populaci na základě jednoduché kombinace antigenů CD19 a CD45. Využíváme toho, že maligní B prekurzory exprimují snížené až nedetekovatelné množství molekul CD45, čímž se dají odlišit od zralých B buněk. U vzorků skupiny nově diagnostikovaných pacientů ze dne 8 vidíme mezi dvěma populacemi (s vysokou versus střední až žádnou expresí CD45) rozdíl v rozmezí 3-5 řádů (data neukázána), pouze u dvou pacientů je tento rozdíl pouhý jeden řád. V den 15 se tyto rozdíly u této skupiny pohybují v rozmezí 2-4 řádů (data neukázána), takže můžeme říct, že jsme v časné fázi iniciální léčby (den 8, den 15, den 33) schopni na základě kombinace CD19/CD45 oddělit maligní buňky od nemaligních, neboť se nám u většiny vzorků podařilo koncentrovat leukemické buňky do námi vymezené maligní populace.

Při srovnání s nesortovanou kostní dření v časových bodech den 8 a den 15 od diagnózy u nově diagnostikovaných pacientů, ani v jednom případě se nám nepodařilo stoprocentně prokázat naši hypotézu, že by tato dřeň měla mít nižší hodnotu, než sortovaná leukemická subpopulace. Hodnoty nesortované dřeně byly ve většině případů vyšší než u příslušných sortovaných vzorků. Jedno z možných vysvětlení tohoto výsledku jsou ztráty při manipulaci se vzorkem v průběhu sortování buněk a izolace DNA, kdy buňky zůstávají přilepené na stěně zkumavky i přes důkladné protřepání.

U pacientů s relapsem nebo po transplantaci jsme se snažili prokázat vyšší klinickou výpovědní hodnotu sortovaných vzorků. Stejně jako u nově diagnostikovaných pacientů jsme neměli problém odlišit maligní a nemaligní subpopulaci. Narozdíl od nově diagnostikovaných pacientů jsme ale u této skupiny zaznamenali vyšší hodnoty sortovaných vzorků oproti hodnotám

příslušné nesortované dřeně. Odpovídá to tak naší výše zmíněné teorii, kde jsme předpokládali, že vyčleněním ryze leukemických buněk dosáhneme přesnějších hodnot MRN, které by podávaly realističtější obraz stavu pacienta a v případě sporných pacientů, jako byl pacient 658, by mohly napomoci jejich diagnóze a zvolit tak pro ně příslušnou léčbu. Dále by to také znamenalo lepší odhad, jak se bude nemoc v nejbližší době vyvíjet.

Měření MRN u pacientů s ALL s hypodiploidním počtem chromozomů

U pacientů s ALL s hypodiploidním počtem chromozomů jsme chtěli jednak zjistit spektrum přestaveb Ig/TCR, jednak zjistit kinetiku MRN. U dvou ze čtyř pacientů jsme našli pouze velmi nezralé přestavby těžkého řetězce imunoglobulinů naznačující možné stádium maligního zásahu již ve velmi časném prekursoru, další dva pacienti měli spektrum přestaveb zralejší. Dva ze tří pacientů s dostupným cílem pro sledování MRN se velmi záhy dostali do remise onemocnění a dokonce k nedekovatelným hladinám MRN, přesto však u obou z nich došlo k časnému relapsu. Naproti tomu, třetí pacient odpovídal na léčbu velmi pomalu a zemřel na její komplikace. Díky malému počtu pacientů nejsme samozřejmě schopni učinit žádné závěry, charakteristika tohoto vzácného typu leukémie bude proto vyžadovat mezinárodní spolupráci.

Závěr

Nejmodernější protokoly pro léčbu dětské ALL používají ke stratifikaci do léčebných rizikových skupin minimální reziduální nemoc. V současné době je standardem detekce MRN pomocí klonálních přestaveb Ig/TCR. Nevýhodou této metody je její jak metodická a časová, tak finanční náročnost. Průtoková cytometrie se nabízí pro rychlejší a jednodušší detekci MRN, dosud se však potýká s řadou problémů daných především podobností fenotypu regenerujících buněk kostní dřeně s fenotypem leukemických blastů. V naší studii jsme se pokusili pomocí sortování subpopulací kostní dřeně pacientů s ALL definovaných pomocí průtokové cytometrie a následného měření MRN pomocí molekulárně-genetických metod oddělit maligní a nemaligní populace. Pro tento účel jsme optimalizovali metodu sortování a izolace DNA z malých množství buněk. Protože se nám cíle oddělit leukemickou populaci buněk od neleukemické nepodařilo dosáhnout ve všech případech, získali jsme pilotní data, na kterých lze stavět další studie vedené pomocí mnohobarevné průtokové cytometrie. Doufáme, že tyto výsledky mohou přispět k zavedení optimálního způsobu detekce minimální reziduální nemoci u dětské ALL.

Použitá literatura

- Alexander, F. E., S. L. Patheal, A. Biondi, S. Brandalise, M. E. Cabrera, L. C. Chan, Z. Chen, G. Cimino, J. C. Cordoba, L. J. Gu, H. Hussein, E. Ishii, A. M. Kamel, S. Labra, I. Q. Magalhaes, S. Mizutani, E. Petridou, M. P. de Oliveira, P. Yuen, J. L. Wiemels, and M. F. Greaves. 2001. Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer Res* 61: 2542-6.
- Alvarez, Y., M. D. Coll, J. J. Ortega, P. Bastida, N. Dastugue, A. Robert, J. Cervera, A. Verdeguer, M. Tasso, A. Aventin, M. Guitart, and M. R. Caballin. 2005. Genetic abnormalities associated with the t(12;21) and their impact in the outcome of 56 patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 162: 21-9.
- Armstrong, S. A., and A. T. Look. 2005. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 23: 6306-15.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, and e. al. 1994. *Current protocol in molecular biology, volume 3*. John Wiley and sons, Inc., Canada.
- Berger, R., N. Dastugue, M. Busson, J. Van Den Akker, C. Perot, P. Ballerini, A. Hagemeyer, L. Michaux, C. Charrin, M. P. Pages, F. Mugneret, J. Andrieux, P. Talmant, C. Helias, L. Mauvieux, M. Lafage-Pochitaloff, M. J. Mozziconacci, P. Cornillet-Lefebvre, I. Radford, V. Asnafi, C. Bilhou-Nabera, F. Nguyen Khac, C. Leonard, F. Speleman, B. Poppe, C. Bastard, S. Taviaux, B. Quilichini, C. Herens, M. J. Gregoire, H. Cave, and O. A. Bernard. 2003. t(5;14)/HOX11L2-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia. A collaborative study of the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique (GFCH). *Leukemia* 17: 1851-7.
- Bonnet, D. 2005a. Leukemic stem cells show the way. *Folia Histochem Cytobiol* 43: 183-6.
- . 2005b. Normal and leukaemic stem cells. *Br J Haematol* 130: 469-79.
- Bustin, S. A. 2004. *A-Z of quantitative PCR*. International University Line, California.
- Cave, H., S. Suci, C. Preudhomme, B. Poppe, A. Robert, A. Uyttebroeck, M. Malet, P. Boutard, Y. Benoit, L. Mauvieux, P. Lutz, F. Mechinaud, N. Grardel, F. Mazingue, M. Dupont, G. Margueritte, M. P. Pages, Y. Bertrand, E. Plouvier, G. Brunie, C. Bastard, D. Plantaz, I. Vande Velde, A. Hagemeyer, F. Speleman, M. Lessard, J. Otten, E. Vilmer, and N. Dastugue. 2004. Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood* 103: 442-50.
- Colby-Graham, M. F., and C. Chordas. 2003. The childhood leukemias. *J Pediatr Nurs* 18: 87-95.
- Corcoran, A. E. 2005. Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin Immunol* 17: 141-54.
- Deininger, M. W., J. M. Goldman, and J. V. Melo. 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96: 3343-56.
- Dibenedetto, S. P., L. Lo Nigro, S. P. Mayer, G. Rovera, and G. Schiliro. 1997. Detectable molecular residual disease at the beginning of maintenance therapy indicates poor outcome in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 90: 1226-32.
- Dyer, M. J., and D. G. Oscier. 2002. The configuration of the immunoglobulin genes in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 16: 973-84.

- Faderl, S., G. Garcia-Manero, D. A. Thomas, and H. M. Kantarjian. 2002. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia- current concepts and future perspectives. *Rev Clin Exp Hematol* 6: 142-60; discussion 200-2.
- Fischer, M., M. Schwieger, S. Horn, B. Niebuhr, A. Ford, S. Roscher, U. Bergholz, M. Greaves, J. Lohler, and C. Stocking. 2005. Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene* 24: 7579-91.
- Greaves, M. 1999. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer* 35: 1941-53.
- Greaves, M. F. 1988. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2: 120-5.
- . 2004. Biological models for leukaemia and lymphoma. *IARC Sci Publ*: 351-72.
- Greaves, M. F., L. C. Chan, A. J. Furley, S. M. Watt, and H. V. Molgaard. 1986. Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia. *Blood* 67: 1-11.
- Gudjonsson, T., and M. K. Magnusson. 2005. Stem cell biology and the cellular pathways of carcinogenesis. *Apmis* 113: 922-9.
- Gumy Pause, F., P. Wacker, P. Maillet, D. Betts, and A. P. Sappino. 2003. ATM gene alterations in childhood acute lymphoblastic leukemias. *Hum Mutat* 21: 554.
- Heerema, N. A., J. B. Nachman, H. N. Sather, M. G. Sensel, M. K. Lee, R. Hutchinson, B. J. Lange, P. G. Steinherz, B. Bostrom, P. S. Gaynon, and F. Uckun. 1999. Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's cancer group. *Blood* 94: 4036-45.
- Height, S. E., G. J. Swansbury, E. Matutes, J. G. Treleaven, D. Catovsky, and M. J. Dyer. 1996. Analysis of clonal rearrangements of the Ig heavy chain locus in acute leukemia. *Blood* 87: 5242-50.
- Henderson, E. S. 2002. *Leukemia*. Elsevier Science.
- Hiwatari, M., T. Taki, T. Taketani, M. Taniwaki, K. Sugita, M. Okuya, M. Eguchi, K. Ida, and Y. Hayashi. 2003. Fusion of an AF4-related gene, LAF4, to MLL in childhood acute lymphoblastic leukemia with t(2;11)(q11;q23). *Oncogene* 22: 2851-5.
- Hořejší. 2005. *Základy imunologie*. TRITON, Praha.
- Hrusak, O., and A. Porwit-MacDonald. 2002. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 16: 1233-58.
- Hrušák, O. 2003. *Imunologická diagnostika dětských akutních leukémií*. Ústav imunologie, Praha.
- Huntly, B. J., A. Bench, and A. R. Green. 2003. Double jeopardy from a single translocation: deletions of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. *Blood* 102: 1160-8.
- Jacquet, P. 2004. Sensitivity of germ cells and embryos to ionizing radiation. *J Biol Regul Homeost Agents* 18: 106-14.
- Janeway. 2001. *Immunobiology*. Garland Publishing, New York.
- Janik-Moszant, A., H. Bubala, M. Stojewska, and D. Sonta-Jakimczyk. 1998. [Acute lymphoblastic leukemia in children with Fanconi anemia]. *Wiad Lek* 51 Suppl 4: 285-8.
- Kalina, T., E. Mejstrikova, M. Vaskova, and O. Hrusak. 2006. Imunofenotypizace dětských leukémií. *Transfuze a hematologie dnes* 12: 20.

- Kees, U. R., N. A. Heerema, R. Kumar, P. M. Watt, D. L. Baker, M. K. La, F. M. Uckun, and H. N. Sather. 2003. Expression of HOX11 in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukaemia can occur in the absence of cytogenetic aberration at 10q24: a study from the Children's Cancer Group (CCG). *Leukemia* 17: 887-93.
- Kovář. 1999. *Buněčná proliferace a mechanismy její regulace II*. Karolinum, Praha.
- Krejci, O., Z. Prouzova, O. Horvath, J. Trka, and O. Hrusak. 2003. Cutting edge: TCR delta gene is frequently rearranged in adult B lymphocytes. *J Immunol* 171: 524-7.
- Kroft, S. H. 2004. Role of flow cytometry in pediatric hematopathology. *Am J Clin Pathol* 122 Suppl: S19-32.
- Langebrake, C., U. Creutzig, M. Dworzak, O. Hrusak, E. Mejstrikova, F. Griesinger, M. Zimmermann, and D. Reinhardt. 2006. Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: the MRD-AML-BFM Study Group. *J Clin Oncol* 24: 3686-92.
- Lee, D. S., Y. R. Kim, H. K. Cho, C. K. Lee, J. H. Lee, and H. I. Cho. 2005. The presence of TEL/AML1 rearrangement and cryptic deletion of the TEL gene in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Genet Cytogenet* 162: 176-8.
- Market, E., and F. N. Papavasiliou. 2003. V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLoS Biol* 1: E16.
- Mason, D., P. André, A. Bensussan, C. Buckley, C. Civin, and e. al. 2002. *Leukocyte typing VII*. Oxford University Press, New York.
- Mauvieux, L., V. Leymarie, C. Helias, N. Perrusson, A. Falkenrodt, B. Lioure, P. Lutz, and M. Lessard. 2002. High incidence of Hox11L2 expression in children with T-ALL. *Leukemia* 16: 2417-22.
- Mayer, J., J. Starý, and e. al. 2002. *Leukemie*. GRADA Publishing, spol. s r.o., Praha.
- McCulloch, E. A. 1993. Stem cell renewal and determination during clonal expansion in normal and leukaemic haemopoiesis. *Cell Prolif* 26: 399-425.
- McNally, R. J., and L. Parker. 2006. Environmental factors and childhood acute leukemias and lymphomas. *Leuk Lymphoma* 47: 583-98.
- McPerson, M. J. 1995. *PCR2 - A practical approach*. Oxford University Press, New York.
- Meier, M., M. L. den Boer, A. G. Hall, J. A. Irving, M. Passier, L. Minto, E. R. van Wering, G. E. Janka-Schaub, and R. Pieters. 2005. Relation between genetic variants of the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) gene, drug resistance, clinical outcome and predisposition to childhood T-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 19: 1887-95.
- Meleshko, A. N., M. V. Belevtsev, T. V. Savitskaja, and M. P. Potapnev. 2006. The incidence of T-cell receptor gene rearrangements in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia is related to immunophenotype and fusion oncogene expression. *Leuk Res* 30: 795-800.
- Monica, K., D. P. LeBrun, D. A. Dederá, R. Brown, and M. L. Cleary. 1994. Transformation properties of the E2a-Pbx1 chimeric oncoprotein: fusion with E2a is essential, but the Pbx1 homeodomain is dispensable. *Mol Cell Biol* 14: 8304-14.
- Moppett, J., G. A. Burke, C. G. Steward, A. Oakhill, and N. J. Goulden. 2003. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol* 56: 249-53.

- Morgan, G. J., and C. L. Alvares. 2005. Benzene and the hemopoietic stem cell. *Chem Biol Interact* 153-154: 217-22.
- Neale, G. A., E. Coustan-Smith, P. Stow, Q. Pan, X. Chen, C. H. Pui, and D. Campana. 2004. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18: 934-8.
- Olsen, M., L. L. Hjalgrim, H. O. Madsen, H. Hjalgrim, and K. Schmiegelow. 2006. [Chromosome changes associated with childhood leukaemia occur prenatally]. *Ugeskr Laeger* 168: 2152-7.
- Ottmann, O. G., and B. Wassmann. 2005. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 118-22.
- Pine, S. R., J. L. Wiemels, S. Jayabose, and C. Sandoval. 2003. TEL-AML1 fusion precedes differentiation to pre-B cells in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 27: 155-64.
- Poulsen, T. S., A. N. Silahatoglu, C. G. Gisselo, N. Tommerup, and H. E. Johnsen. 2002. Detection of illegitimate rearrangements within the immunoglobulin light chain loci in B cell malignancies using end sequenced probes. *Leukemia* 16: 2148-55.
- Pui, C.-H. 1999. *Childhood leukemias*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Pui, C. H., J. M. Boyett, M. V. Relling, P. L. Harrison, G. K. Rivera, F. G. Behm, J. T. Sandlund, R. C. Ribeiro, J. E. Rubnitz, A. Gajjar, and W. E. Evans. 1999. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 17: 818-24.
- Pui, C. H., M. Schrappe, R. C. Ribeiro, and C. M. Niemeyer. 2004. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 118-45.
- Pui, C. H., D. L. Williams, S. C. Raimondi, G. K. Rivera, A. T. Look, R. K. Dodge, S. L. George, F. G. Behm, W. M. Crist, and S. B. Murphy. 1987. Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 70: 247-53.
- Raanani, P., L. Trakhtenbrot, G. Rechavi, E. Rosenthal, A. Avigdor, F. Brok-Simoni, M. Leiba, N. Amariglio, A. Nagler, and I. Ben-Bassat. 2005. Philadelphia-chromosome-positive T-lymphoblastic leukemia: acute leukemia or chronic myelogenous leukemia blastic crisis. *Acta Haematol* 113: 181-9.
- Rabbitts, T. H., A. Appert, G. Chung, E. C. Collins, L. Drynan, A. Forster, M. N. Lobato, M. P. McCormack, R. Pannell, A. Spandidos, M. R. Stocks, T. Tanaka, and E. Tse. 2001. Mouse models of human chromosomal translocations and approaches to cancer therapy. *Blood Cells Mol Dis* 27: 249-59.
- Raghavan, S. C., and M. R. Lieber. 2006. DNA structures at chromosomal translocation sites. *Bioessays* 28: 480-94.
- Randolph, T. R. 2004. Advances in acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lab Sci* 17: 235-45.
- Redaelli, A., B. L. Laskin, J. M. Stephens, M. F. Botteman, and C. L. Pashos. 2005. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Eur J Cancer Care (Engl)* 14: 53-62.
- Ross, M. E., X. Zhou, G. Song, S. A. Shurtleff, K. Girtman, W. K. Williams, H. C. Liu, R. Mahfouz, S. C. Raimondi, N. Lenny, A. Patel, and J. R. Downing. 2003. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 102: 2951-9.

- Rubnitz, J. E., B. M. Camitta, H. Mahmoud, S. C. Raimondi, A. J. Carroll, M. J. Borowitz, J. J. Shuster, M. P. Link, D. J. Pullen, J. R. Downing, F. G. Behm, and C. H. Pui. 1999. Childhood acute lymphoblastic leukemia with the MLL-ENL fusion and t(11;19)(q23;p13.3) translocation. *J Clin Oncol* 17: 191-6.
- Rubnitz, J. E., B. I. Razzouk, S. Lensing, S. Pounds, C. H. Pui, and R. C. Ribeiro. 2007. Prognostic factors and outcome of recurrence in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer* 109: 157-63.
- Sadofsky, M. J. 2004. Recombination-activating gene proteins: more regulation, please. *Immunol Rev* 200: 83-9.
- Seriu, T., T. E. Hansen-Hagge, Y. Stark, and C. R. Bartram. 2000. Immunoglobulin kappa gene rearrangements between the kappa deleting element and Jkappa recombination signal sequences in acute lymphoblastic leukemia and normal hematopoiesis. *Leukemia* 14: 671-4.
- Shapiro, H. M. 2003. *Practical flow cytometry*. A John Wiley and sons, Inc., New Jersey.
- Schabath, R., R. Ratei, and W. D. Ludwig. 2003. The prognostic significance of antigen expression in leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 16: 613-28.
- Schatz, D. G. 2004a. Antigen receptor genes and the evolution of a recombinase. *Semin Immunol* 16: 245-56.
- . 2004b. V(D)J recombination. *Immunol Rev* 200: 5-11.
- Siebert, P. D. 1993. *Quantitative RT-PCR*. Clontech Laboratories, Inc.
- Soltysova, A., V. Altanerova, and C. Altaner. 2005. Cancer stem cells. *Neoplasma* 52: 435-40.
- Spicuglia, S., D. M. Franchini, and P. Ferrier. 2006. Regulation of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol* 18: 158-63.
- Szczepanski, T., A. Beishuizen, M. J. Pongers-Willemse, K. Hahlen, E. R. Van Wering, A. J. Wijkhuijs, G. J. Tibbe, M. A. De Bruijn, and J. J. Van Dongen. 1999a. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 13: 196-205.
- Szczepanski, T., A. Beishuizen, M. J. Pongers Willemse, K. Hahlen, E. R. Van Wering, A. J. Wijkhuijs, G. J. Tibbe, M. A. De Bruijn, and J. J. Van Dongen. 1999b. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 13: 196-205.
- Szczepanski, T., A. Orfao, V. H. van der Velden, J. F. San Miguel, and J. J. van Dongen. 2001. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol* 2: 409-17.
- Taki, T., and M. Taniwaki. 2006. Chromosomal translocations in cancer and their relevance for therapy. *Curr Opin Oncol* 18: 62-8.
- Thomas, M., A. Gessner, H. P. Vornlocher, P. Hadwiger, J. Greil, and O. Heidenreich. 2005. Targeting MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11)-positive human leukemic cells. *Blood* 106: 3559-66.
- Uckun, F. M., J. R. Downing, R. Gunther, L. M. Chelstrom, D. Finnegan, V. J. Land, M. J. Borowitz, A. J. Carroll, and W. M. Crist. 1993. Human t(1;19)(q23;p13) pre-B acute lymphoblastic leukemia in mice with severe combined immunodeficiency. *Blood* 81: 3052-62.

- van Dongen, J. J., T. Seriu, E. R. Panzer-Grumayer, A. Biondi, M. J. Pongers-Willemse, L. Corral, F. Stolz, M. Schrappe, G. Masera, W. A. Kamps, H. Gadner, E. R. van Wering, W. D. Ludwig, G. Basso, M. A. de Bruijn, G. Cazzaniga, K. Hettinger, A. van der Does-van den Berg, W. C. Hop, H. Riehm, and C. R. Bartram. 1998. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 352: 1731-8.
- van Dongen, J. J., and I. L. Wolvers-Tettero. 1991. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* 198: 1-91.
- Vondrejs. 2003. *Genové inženýrství II*. Karolinum, Praha.
- Wang, J. C., P. Beauregard, P. Soamboonsrup, and P. B. Neame. 1995. Monoclonal antibodies in the management of acute leukemia. *Am J Hematol* 50: 188-99.
- West, K. L., N. C. Singha, P. De Ioannes, L. Lacomis, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and P. Cortes. 2005. A direct interaction between the RAG2 C terminus and the core histones is required for efficient V(D)J recombination. *Immunity* 23: 203-12.
- Whitlock, J. A., H. N. Sather, P. Gaynon, L. L. Robison, R. J. Wells, M. Trigg, N. A. Heerema, and S. Bhatia. 2005. Clinical characteristics and outcome of children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood* 106: 4043-9.
- Yancopoulos, G. D., T. K. Blackwell, H. Suh, L. Hood, and F. W. Alt. 1986. Introduced T cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cells: evidence that B and T cells use a common recombinase. *Cell* 44: 251-9.
- Závada. 1999. *Molekulární virologie I. RNA viry, viroidy a viry replikující se reversní transkripcí*. Nakladatelství Peres, Praha.
- Zelent, A., M. Greaves, and T. Enver. 2004. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene* 23: 4275-83.
- Zeller, B., G. Gustafsson, E. Forestier, J. Abrahamsson, N. Clausen, J. Heldrup, L. Hovi, G. Jonmundsson, S. O. Lie, A. Glomstein, and H. Hasle. 2005. Acute leukaemia in children with Down syndrome: a population-based Nordic study. *Br J Haematol* 128: 797-804.
- Zweidler-McKay, P. A., Y. He, L. Xu, C. G. Rodriguez, F. G. Karnell, A. C. Carpenter, J. C. Aster, D. Allman, and W. S. Pear. 2005. Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Blood* 106: 3898-906.

Přílohy

Příloha č. 1:

Výsledky testování specifity RQ-PCR v malých množstvích buněk

počet buněk	albumin 1	albumin 2	albumin průměr	VH3A 1	VH3A 2	VH3A prům.	VH3A/albumin
100	3.19E-05	3.17E-05	3.18E-05	4.95E-05	1.17E-04	8.35E-05	8.26E-01
100	4.23E-05	4.52E-05	4.37E-05	1.32E-04	1.86E-04	1.59E-04	9.81E-01
100	9.39E-07	1.55E-06	1.24E-06	6.40E-05	2.75E-04	1.70E-04	5.81E+01
100	2.28E-05	1.55E-05	1.92E-05	7.22E-05	1.75E-04	1.24E-04	2.22E+00
100	8.71E-05	9.80E-05	9.25E-05	1.90E-04	2.33E-04	2.12E-04	6.04E-01
100	6.09E-05	3.92E-05	5.01E-05	2.51E-04	1.66E-04	2.08E-04	1.27E+00
100	5.92E-05	3.96E-05	4.94E-05	1.54E-04	1.92E-04	1.73E-04	1.01E+00
100	5.96E-05	4.91E-05	5.43E-05	1.23E-04	1.38E-04	1.30E-04	6.38E-01
100	6.50E-05	8.35E-05	7.42E-05	1.03E-04	2.48E-04	1.76E-04	7.76E-01
100	3.80E-05	6.59E-06	2.23E-05	6.29E-05	7.21E-05	6.75E-05	2.46E+00
1000	3.25E-04	2.86E-04	3.05E-04	1.03E-03	5.85E-04	8.09E-04	7.63E-01
1000	4.77E-04	6.20E-04	5.49E-04	1.39E-03	1.67E-03	1.53E-03	7.60E-01
1000	4.88E-04	1.06E-03	7.74E-04	3.19E-03	2.70E-03	2.94E-03	1.36E+00
1000	7.48E-04	3.67E-04	5.57E-04	1.50E-03	2.90E-03	2.20E-03	1.50E+00
1000	6.02E-04	4.73E-04	5.38E-04	2.98E-03	2.24E-03	2.61E-03	1.34E+00
1000	9.71E-04	3.61E-04	6.66E-04	2.61E-03	4.30E-03	3.46E-03	2.30E+00
1000	3.58E-05	6.23E-05	4.90E-05	5.38E-04	2.29E-03	1.41E-03	1.26E+01
1000	7.66E-05	5.76E-05	6.71E-05	5.11E-04	1.53E-04	3.32E-04	1.82E+00
1000	1.72E-04	4.44E-04	3.08E-04	8.73E-04	8.96E-04	8.85E-04	1.16E+00
1000	6.23E-04	5.72E-04	5.98E-04	2.06E-03	1.77E-03	1.91E-03	8.38E-01
10000	7.69E-03	8.69E-03	8.19E-03	3.02E-02	3.43E-02	3.22E-02	1.03E+00
10000	1.02E-02	7.68E-03	8.95E-03	2.16E-02	3.20E-02	2.68E-02	8.56E-01
10000	6.68E-03	1.18E-02	9.25E-03	2.56E-02	1.38E-02	1.97E-02	7.35E-01
10000	2.07E-03	6.62E-04	1.37E-03	3.18E-02	3.86E-02	3.52E-02	1.23E+01
10000	7.53E-03	5.95E-03	6.74E-03	2.00E-02	1.37E-02	1.68E-02	7.01E-01
10000	8.64E-03	9.20E-03	8.92E-03	1.41E-02	1.58E-02	1.50E-02	4.36E-01
10000	5.96E-03	9.19E-03	7.58E-03	1.81E-02	3.49E-02	2.65E-02	1.14E+00
10000	1.02E-02	9.04E-03	9.60E-03	1.78E-02	3.32E-02	2.55E-02	7.79E-01
10000	3.23E-03	6.00E-03	4.61E-03	8.11E-03	1.66E-02	1.23E-02	9.78E-01
10000	7.97E-03	9.33E-03	8.65E-03	1.68E-02	1.06E-02	1.37E-02	4.46E-01

Příloha č. 2:**Přehled nalezených přestaveb Ig/TCR a navržených a použitých primerů**

pacient	monoklonální přestavby	sekvence s navrženým primerem	primery použité pro specifické RQ-PCR
876	VH1/7-JH; VH3-JH; VD2-DD3	VH1/7-JH; VH3-JH VD2-DD3	VH3-JH
877	Vk1-Kde3; intron-Kde3; VH3-JH; VH5-JH	VH5-JH; VH3-JH	VH5-JH
881	Vd1-Jd1.3; Vd3-Jd1.3; Vg2-Jg 1.3 Vg3-Jg 1.3; TCRB VB-JB	Vg2-Jg 1.3; Vg3-Jg 1.3; TCRB VB-JB	Vg2-Jg 1.3; Vg3-Jg 1.3; TCRB VB-JB
885	Vk1-Kde3; Vk2-Kde3; Vd2-Dd3; Vg1-Jg 1.3; Vg2-Jg 1.3	Vd2-Dd3; Vg1-Jg 1.3; Vg2-Jg 1.3	Vd2-Dd3
890	VH1/7-JH; VH2-JH; Vd2-Dd3; Dd2-Dd3	VH1/7-JH; VH2-JH Vd2-Dd3; Dd2-Dd3	Dd2-Dd3; VH1/7-JH
891	VH2-JH; VH3-JH	VH2-JH; VH3-JH	VH2-JH; VH3-JH
893	VH4-JH	VH4-JH	nelze optimalizovat
896	Vk3-Kde3; VH4-JH; Vg4-Jg1.1	VH4-JH; Vg4-Jg1.1	VH4-JH
968	Sil-Tal; Vd2-Dd3; Vg1-Jg 1.3	Sil-Tal	Sil-Tal
926	DH2-JH; VH1/7-JH; VH3-JH; Vd2-Dd3; Vg2-Jg1.3	VH3-JH; Vd2-Dd3	VH3-JH
993	DH2-JH; DH5-JH	DH5-JH	DH5-JH
783	VH4-JH; VH3-JH Vg1-Jg1.3	VH4-JH; VH3-JH Vg1-Jg1.3	VH4-JH; VH3-JH
653	DH3-JH	DH3-JH	DH3-JH
658	VH3-JH; Vd2-Dd3	VH3-JH; Vd2-Dd3	VH3-JH; Vd2-Dd3
587	Vk3-Kde; VH3-JH; VH4-JH	VH3-JH; VH4-JH	VH3-JH; VH4-JH
611	Vk3-Kde; VH1/7-JH; Vd2-Dd3 VH3-JH; Vg1-Jg1.1; Vg4-Jg1.1	VH3-JH; Vd2-Dd3	VH3-JH
769	Vk2-Kde; Vk3-Kde; VH4-JH Vg1-Jg1.3	VH4-JH	VH4-JH
825	Vk3-Kde; VH2-JH; VH3-JH Vg1-Jg1.3; Vg2-Jg1.3	Vk3-Kde; VH3-JH VH2-JH	VH3-JH
206	Vk3-Kde; VH4-JH	VH4-JH	VH4-JH
401	Vk1-Kde; Vk2-Kde; Vk3-Kde; VH1- JH; VH3-JH; Dd2-Dd3	Vk3-Kde; VH1-JH	Vk3-Kde; VH1-JH
719	VH3-JH; VH4-JH	VH3-JH; VH4-JH	VH3-JH; VH4-JH

Výsledky měření u nově diagnostikovaných pacientů

pacient	přestavba	tkáň	bod léčby	co bylo sortováno	počet buněk.	albumin	cíl 1	korelace	ESG	populace		
877	VH5-JH	kostní dřeň	den 8	nesortováno	6 000 000	2,96E-01	1,53E+00	5,17E+00	5,17E+00	celková kostní dřeň		
		periferní krev	den 8	nesortováno	3 000 000	2,52E-01	1,19E-03	4,72E-03	4,72E-03	celková periferní krev		
		kostní dřeň	den 8	CD19+CD45dim až neg	100 000	4,10E-01	9,31E-01	2,27E+00	2,27E+00	maligní		
		kostní dřeň	den 8	CD19+CD45++	109 000	2,10E-01	1,01E-01	4,81E-01	4,81E-01	nemaligní		
		periferní krev	den 8	CD19+CD45dim až neg	8 000	1,59E-02	1,34E-02	8,45E-01	8,45E-01	maligní		
		periferní krev	den 8	CD19+CD45++	50 000	9,96E-02	1,61E-03	1,62E-02	1,62E-02	nemaligní		
		kostní dřeň	den 15	nesortováno	3 000 000	3,33E-01	7,82E-03	2,35E-02	2,35E-02	celková kostní dřeň		
		kostní dřeň	den 15	CD19+CD45++	1 942	2,82E-03	1,21E-04	0	0	1,00E-07	nemaligní	
		kostní dřeň	den 15	CD19+CD45dim až neg	1 558	4,46E-03	4,14E-04	9,28E-02	9,28E-02	1,00E-05	maligní	
		kostní dřeň	den 33	nesortováno	3 000 000	3,48E-01	1,44E-04	0	0	1,00E-07	celková kostní dřeň	
876	VH4-JH	kostní dřeň	den 33	CD19+	66 000	2,38E-01	2,45E-05	0	0	1,00E-07	maligní	
		kostní dřeň	den 33	CD19neg	480 000	1,45E+00	4,55E-05	0	0	1,00E-07	nemaligní	
		kostní dřeň	preM	nesortováno	5 000 000	5,59E-01	4,46E-05	0	0	1,00E-07	celková kostní dřeň	
		kostní dřeň	preM	CD19+34+10+	100 000	1,73E-03	4,06E-05	0	0	1,00E-07	maligní	
		kostní dřeň	preM	CD19+34neg	49 000	1,95E-03	3,30E-04	1,69E-01	1,69E-01	1,00E-05	nemaligní	
		kostní dřeň	preM	CD19-	800 000	3,68E-02	6,12E-06	0	0	1,00E-07	nemaligní	
		kostní dřeň	den 15	nesortováno	4 000 000	4,83E-01	2,64E-03	1,68E-02	1,68E-02	1,68E-02	celková kostní dřeň	
		kostní dřeň	den 15	CD19+CD45++	30 542	6,60E-02	0	0	0	0	1,00E-07	nemaligní
		kostní dřeň	den 15	CD19+CD45dim až neg	7 758	1,58E-02	4,72E-04	2,98E-02	2,98E-02	1,00E-05	maligní	
		kostní dřeň	den 8	nesortováno	2 000 000	2,37E-01	9,39E-03	3,96E-02	3,96E-02	3,96E-02	celková kostní dřeň	
881	V beta	kostní dřeň	den 8	7+5+3+	67 000	1,84E-02	9,26E-04	5,03E-02	5,03E-02	1,00E-05	nemaligní	
		kostní dřeň	den 8	7+5+3-	1 900	2,62E-03	3,68E-04	1,40E-01	1,40E-01	1,40E-01	maligní	
		kostní dřeň	den 15	nesortováno	6 000 000	3,20E-01	9,89E-04	3,09E-03	3,09E-03	3,09E-03	celková kostní dřeň	
		kostní dřeň	den 15	7+5+3+	61 000	4,44E-01	2,67E-04	6,01E-04	6,01E-04	6,01E-04	nemaligní	

	kostní dřeň	den 33	CD19+CD45dim	1 700	7,26E-05	0	0	1,00E-07	maligní
	kostní dřeň	den 33	CD19+CD45++	106 000	1,01E-01	2,47E-06	2,45E-05	1,00E-05	nemaligní
	kostní dřeň	den 33	CD19-	800 000	6,70E-01	0	0	1,00E-07	nemaligní
891	VH3-JH								
	kostní dřeň	den 8	nesortováno	6 000 000	5,38E-01	4,94E-01	9,18E-01	1,17E+00	celková kostní dřeň
	periferní krev	den 8	CD20+10neg19+45++	110 000	9,90E-02	0	0	1,00E-07	nemaligní
	kostní dřeň	den 8	CD20+10neg19+45++	65 000	1,28E-01	2,65E-04	2,07E-03	1,00E-05	nemaligní
	kostní dřeň	den 8	CD19+45neg	900	2,98E-03	3,67E-03	1,23E+00	1,23E+00	maligní
	kostní dřeň	den 15	nesortováno	4 000 000	6,38E-01	0	0	1,00E-05	celková kostní dřeň
	kostní dřeň	den 15	CD10+	21 000	2,24E-02	0	0	1,00E-07	maligní
	kostní dřeň	den 15	granulocyty	500 000	5,10E-01	0	0	1,00E-07	nemaligní
	kostní dřeň	den 15	CD20+CD10-	421 000	5,14E-01	0	0	1,00E-07	nemaligní
	kostní dřeň	den 33	nesortováno	10 000 000	4,99E-01	0	0	1,00E-07	celková kostní dřeň
	kostní dřeň	den 33	CD19+10+	4 000	1,64E-04	0	0	1,00E-07	maligní
	kostní dřeň	den 33	CD19+34+	920	1,39E-03	0	0	1,00E-07	maligní
	kostní dřeň	den 33	CD20+10neg	30 000	1,90E-02	0	0	1,00E-07	nemaligní
896	VH4-JH								
	kostní dřeň	den 8	nesortováno	5 000 000	5,60E-01	2,24E-02	4,00E-02	4,00E-02	celková kostní dřeň
	kostní dřeň	den 8	dřeň CD19+20+10neg	320 000	2,24E-01	1,16E-05	5,18E-05	7,19E-05	nemaligní
	kostní dřeň	den 8	dřeň	6 000	6,40E-03	1,73E-03	2,70E-01	2,70E-01	maligní
	kostní dřeň	den 8	dřeň granulocyty	650 000	9,46E-01	6,42E-05	6,79E-05	6,79E-05	nemaligní
	periferní krev	den 8	krev CD19+20+10neg	340 000	3,14E-01	1,53E-05	4,87E-05	1,00E-05	nemaligní
	periferní krev	den 8	krev CD19+20neg10neg	1 100	1,02E-03	0	0	1,00E-07	maligní
	periferní krev	den 8	krev CD19neg	500 000	4,24E-01	0	0	1,00E-07	nemaligní
	kostní dřeň	den15	nesortováno	9 500 000	5,28E-01	2,75E-04	5,21E-04	5,21E-04	celková kostní dřeň
	kostní dřeň	den15	granulocyty	500 000	2,56E-02	0	0	1,00E-07	nemaligní
	kostní dřeň	den15	19+	260 000	8,08E-04	4,89E-06	6,05E-03	1,00E-05	maligní
	kostní dřeň	den 33	nesortováno	10 000 000	3,83E-01	7,88E-07	0	1,00E-07	celková kostní dřeň
	kostní dřeň	den 33	CD19+45+++10neg az+	60 000	1,45E-02	0	0	1,00E-07	nemaligní
	kostní dřeň	den 33	granulocyty	105 000	7,88E-03	0	0	1,00E-07	nemaligní
	kostní dřeň	preM	nesortováno	10 000 000	3,28E-01	3,69E-07	0	1,00E-07	celková kostní dřeň
	kostní dřeň	preM	CD19+CD10+	27 000	8,86E-04	0	0	1,00E-07	nemaligní

968	Sii/Tai	kostní dřeň	preM	CD19+CD10+CD34+	249 000	5,52E-02	0	0	1,00E-07	nemaligní
		kostní dřeň	preM	CD10-CD20-	9 000	1,94E-04	0	0	1,00E-07	maligní
		kostní dřeň	den 8	CD7+dapi+	26 000	8,67E-06	9,11E-05	1,05E+01	1,00E-05	nemaligní
		kostní dřeň	den 8	CD7+CD5-	11 000	1,59E-05	0	0	1,00E-07	nemaligní
		kostní dřeň	den 8	CD3-/+CD99++	1 200	6,91E-06	9,71E-05	1,41E+01	7,04E+00	maligní
		kostní dřeň	den 8	CD3+CD99-	122 000	1,45E-02	4,62E-04	3,19E-02	1,59E-02	nemaligní

Pozn: Den 8, 15, 33 = dny od diagnózy

preM = před léčebným protokolem M

Výsledky měření u pacientů po relapsu či transplantaci

pacient	přestavba	bod léčby	tkáň	co bylo sortováno	počet bb.	albumin	cíl	korelace	ESG	populace	
658	testikulární relaps		kostní dřev	nesortováno	1000000	2,75E-01	3,06E-04	1,11E-03	1,00E-05	nesortovaná tkáň	
				CD19+CD45dim až neg	250000	8,70E-02	1,29E-03	1,48E-02	1,48E-02	1,48E-02	maligní
				CD19+CD45++	1100000	2,77E-01	1,28E-04	4,62E-04	3,67E-04	3,67E-04	nemaligní
				nesortováno	10000000	2,29E+00	2,56E-05	1,12E-05	1,12E-05	1,12E-05	celková kostní dřev
				CD19+CD10+CD45-	35 000	9,94E-03	0	0	1,00E-07	1,00E-07	maligní
				granulocyty	800 000	1,15E-01	0	0	1,00E-07	1,00E-07	nemaligní
587	před TKD		kostní dřev	nesortováno	10000000	7,59E-01	2,60E-03	3,42E-03	3,42E-03	celková kostní dřev	
				CD19+CD45dim až neg	19000	2,94E-02	7,55E-04	2,57E-02	4,76E-02	4,76E-02	maligní
				CD19neg45++	153000	5,56E-02	1,13E-05	2,03E-04	1,00E-05	1,00E-05	nemaligní
				CD19+CD45++	500	3,18E-03	1,98E-05	6,23E-03	1,00E-05	1,00E-05	nemaligní
611	blok R1		kostní dřev	nesortováno	10000000					celková kostní dřev	
				CD19neg	352000	5,00E-01	0	0	1,00E-07	1,00E-07	nemaligní
				CD19+	6700	2,00E-02	0	0	1,00E-07	1,00E-07	maligní
769	TKD+10m.		kostní dřev	nesortováno	10000000	1,47E+00	1,09E-01	7,40E-02	7,40E-02	celková kostní dřev	
				19+34++10- az +	160 000	6,26E-02	1,32E-01	2,10E+00	2,10E+00	2,10E+00	maligní
				19+34-10+20neg az +	73 000	3,90E-03	9,42E-05	2,41E-02	1,00E-05	1,00E-05	nemaligní
				19+34++10-20-	26 000	2,16E-03	5,02E-03	2,32E+00	2,32E+00	2,32E+00	maligní
				19+34-10-20+	60 000	6,58E-03	3,62E-05	5,50E-03	1,00E-05	1,00E-05	nemaligní
				nesortováno	4500000	2,63E-01	1,31E-02	4,97E-02	4,97E-02	4,97E-02	celková kostní dřev
825	TKD + 180		kostní dřev	10+až- korsa-	4 000	4,10E-03	6,90E-05	1,68E-02	1,00E-05	nemaligní	
				10+++ korsa+	22 000	2,10E-02	1,52E-02	7,24E-01	7,24E-01	7,24E-01	maligní
				19-	800 000	5,42E-01	1,06E-03	1,96E-03	1,96E-03	1,96E-03	nemaligní

TKD + 10m.	kostní dřeň	nic	10 000 000	1,96E+00	1,39E-05	7,11E-06	1,00E-05	celková kostní dřeň
	kostní dřeň	CD10+45-	16 000	4,77E-03	0	0	1,00E-07	maligní
	kostní dřeň	granulocyty	800 000	2,57E-01	0	0	1,00E-07	nemaligní
	kostní dřeň	CD10+45+/-	106 000	1,32E-02	0	0	1,00E-07	maligní
	kostní dřeň	CD10+45+	5 000	4,26E-03	0	0	1,00E-07	nemaligní
206	TKD + 140	nic	10 000 000	8,95E-01	9,74E-04	1,09E-03	1,09E-03	celková kostní dřeň
	kostní dřeň	CD19+CD45+/-	17 190	6,57E-03	1,50E-04	2,28E-02	1,00E-05	maligní
	kostní dřeň	CD19-	113 000	2,06E-02	8,05E-05	3,91E-03	1,00E-05	nemaligní
	kostní dřeň	granulocyty	87 000	2,90E-02	0	0	1,00E-07	nemaligní
	kostní dřeň	CD19+CD34+	1 600	1,05E-05	4,93E-05	4,70E+00	1,00E-05	maligní
	kostní dřeň	CD19+CD34-CD10+CD20-	6 200	1,96E-03	0	0	1,00E-07	nemaligní
401	relaps	CD19+CD34-CD10+CD20+	2 900	3,59E-04	0	0	1,00E-07	nemaligní
	kostní dřeň	nic	10 000 000	4,76E-01	3,28E-02	6,89E-02	6,89E-02	celková kostní dřeň
	kostní dřeň	*CD10+	2 700	1,03E-05	0	0	1,00E-07	maligní
719	CNS relaps	CD19-	800 000	2,08E-02	3,72E-06	1,79E-04	1,00E-05	nemaligní
	kostní dřeň	nic	10000000	5,78E-01	5,74E-04	9,93E-04	9,93E-04	celková kostní dřeň
	kostní dřeň					1,01E-04	1,00E-05	nemaligní
	kostní dřeň				4,46E-02	4,46E-02	4,46E-02	maligní
	Po F1	nic	10000000	4,88E-01	0	0	1,00E-07	celková kostní dřeň
	kostní dřeň	CD19+	940	3,04E-05	0	0	1,00E-07	maligní
	kostní dřeň	CD19neg	550 000	1,42E-04	0	0	1,00E-07	nemaligní

Vysvětlivky: TKD=transplantace kostní dřeně; TDK+180=180 dní po transplantaci
R1, F1=léčebné bloky

Příloha č. 5:

Výsledky měření MRN u pacientů s hypodiploidní ALL

pacient	přestavba	bod léčby	tkáň	albumin	cíl Ig/TCR	MRN
926	VH3-JH	den 8	kostní dřeň	6,11E-01	4,53E-01	7,41E-01
		den 15	kostní dřeň	8,40E-01	3,22E-01	3,83E-01
		den 33	kostní dřeň	6,12E-01	2,55E-02	4,17E-02
		T12	kostní dřeň	2,47E-01	3,74E-04	1,51E-03
		D+103	kostní dřeň	1,03E-01	1,35E-04	1,31E-03
783	VH4-JH	den 8	kostní dřeň	1,95E+00	1,10E+00	5,65E-01
		den 15	kostní dřeň	4,41E-01	1,30E-02	2,95E-02
		den 33	kostní dřeň	4,28E-01	1,77E-04	4,14E-04
		den 43	kostní dřeň	2,29E+00	1,03E-05	4,51E-06
		T12	kostní dřeň	1,38E+00	1,00E-05	7,27E-06
		před prot. III	kostní dřeň	6,65E-01	1,00E-05	1,50E-05
		před 2 prot. III	kostní dřeň	2,03E+00	2,03E-06	negativní
		před 3 prot. III	kostní dřeň	1,04E+00	1,04E-06	negativní
		před F2	kostní dřeň	1,52E+00	2,56E-02	1,69E-02
		po F2	kostní dřeň	5,16E+00	1,68E-01	3,26E-02
653	DH3-JH	den 8	kostní dřeň	5,45E-01	5,16E-03	9,47E-03
		den 15	kostní dřeň	5,64E-01	3,41E-03	6,05E-03
		den 33	kostní dřeň	5,32E-01	4,99E-05	9,38E-05
		T12	kostní dřeň	7,30E-01	0	negativní
		pre III	kostní dřeň	9,50E-01	0	negativní
		před 3. protokolem III	kostní dřeň	3,37E-01	4,09E-02	1,21E-01
		zahájení F2	kostní dřeň	5,77E-01	1,06E-03	1,84E-03
		před IDA	kostní dřeň	8,84E-01	1,44E-02	1,63E-02
		FLAG	kostní dřeň	9,92E-01	8,63E-02	8,70E-02
		d+13 po FLAG	kostní dřeň	3,95E-03	2,37E-03	6,00E-01
		D+28	kostní dřeň	7,60E-01	0	negativní