



**UNIVERZITA KARLOVA**

**3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**MUDR. ZUZANA JIRÁKOVÁ TRNKOVÁ**

**MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKA A PROGNÓZA U AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE**

Dizertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Milan Jíra, CSc.

Školitel konzultant: Doc. MUDr. Tomáš Kozák, MBA, PhD

Praha, 2009

## Bibliografická identifikace

<b>Jméno a příjmení autora:</b>	MUDr. Zuzana Jiráková Trnková
<b>Název disertační práce:</b>	Molekulární diagnostika a prognóza u akutní myeloidní leukémie
<b>Název disertační práce anglicky:</b>	Molecular Diagnostics and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia
<b>Studijní obor:</b>	imunologie
<b>Školitel:</b>	Doc. MUDr. Milan Jíra, CSc. Doc. MUDr. Tomáš Kozák, MBA, PhD
<b>Rok obhajoby:</b>	2009
<b>Klíčová slova v češtině:</b>	AML, RT-PCR, imunofenotyp, cytogenetika, PPA, mnohočetná léková rezistence
<b>Klíčová slova v angličtině:</b>	AML, RT-PCR, immunophenotype, cytogenetics, PFA, multidrug resistance



## Poděkování

Ráda bych poděkovala především Jiřímu Schwarzovi, vedoucímu PCR laboratoře a zároveň primáři ambulance ÚHKT, Tomáši Kozákovi z hematologické kliniky FNKV Praha a Milanovi Jírovi z katedry imunologie 3. LFUK za trpělivé vedení, cenné rady a pomoc při řešení mé dizertační práce.

Děkuji taktéž kolegyním a kolegům z laboratoří ÚHKT –Cedriku Haškovcovi, Renátě Pechové, Soně Pekové, Janě Markové, Jaroslavu Polákovi, Jaroslavu Jelínkovi a Tomáši Stopkovi za odbornou spolupráci. Zvláštní poděkování patří Kyře Michalové a jejím spolupracovníkům za provádění cytogenetických vyšetření a poskytování dat, Iuri Marinovovi za provádění imunofluorescenčních vyšetření a dále Nielsu Paallisgaardovi z laboratoří molekulární biologie a genetiky, Aarhus, Dánsko za informace týkající se multiplex PCR a za možnost pracovat v jeho laboratoři. Dík patří též A. Dohnalové z Fyziologického ústavu 1. LF UK v Praze, která mi pomáhala se statistickým zpracováním výsledků.

V neposlední řadě děkuji též lékařům a sestřám klinické části ÚHKT a všem níže uvedeným pracovištím za poskytování biologických vzorků a klinických a biochemických údajů o pacientech a také knihovnicím našeho ústavu za trpělivost při vyhledávání literárních zdrojů.

### PROHLÁŠENÍ:

„Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pouze s použitím citovaných literárních odkazů.“

Tato práce byla podpořena grantem Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky číslo M/12-3.

## OBSAH

<b><u>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</u></b>	<b>6</b>
<b><u>SEZNAM OBRÁZKŮ</u></b>	<b>7</b>
<b><u>SEZNAM TABULEK</u></b>	<b>8</b>
<b><u>1 TEORETICKÝ PŘEHLED PROBLEMATIKY</u></b>	<b>9</b>
1.1 ÚVOD	9
1.2 AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE	11
1.3 AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE	16
1.4 CBF AML	32
1.5 MNOHOČETNÁ LÉKOVÁ REZISTENCE	39
<b><u>2 PROJEKT - CÍLE A HYPOTÉZY</u></b>	<b>47</b>
2.1 CÍLE	47
2.2 HYPOTÉZY	48
<b><u>3 PACIENTI, MATERIÁL A METODY</u></b>	<b>49</b>
3.1 PACIENTI	49
3.2 MATERIÁL	49
3.3 METODY	52
<b><u>4 VÝSLEDKY</u></b>	<b>59</b>
4.1 KOMPLETNÍ REMISE A CELKOVÉ PŘEŽÍVÁNÍ PACIENTŮ	61
4.2 PROGNÓZA: VLIV KLINICKÝCH A LABORATORNÍCH DAT	63
4.3 PROGNÓZA: VLIV IMUNOFENOTYPU	68
4.4 PROGNÓZA U APL	69
4.5 PROGNÓZA U CBF-AML	73
4.6 PROGNÓZA A ZVÝŠENÁ EXPRESE MDR1/PGP	75
4.7 KAZUISTIKY	83
4.8 POZNÁMKY K RT-PCR	87
<b><u>5 DISKUSE</u></b>	<b>90</b>
5.1 RT-PCR DIAGNOSTIKA – JEJÍ VYUŽITÍ A MODIFIKACE	90
5.2 ANALÝZY CR, OS A VLIV RŮZNÝCH PROGNOSTICKÝCH FAKTORŮ NA PROGNÓZU A LÉČBU NEMOCNÝCH	92
5.3 VÝSLEDKY ANALÝZ EXPRESE MDR1/PGP	94
5.4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	95
<b><u>6 ZÁVĚR</u></b>	<b>97</b>
<b><u>7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</u></b>	<b>99</b>
<b><u>8 PŘÍLOHY</u></b>	<b>108</b>

## Seznam použitých zkratk

ABC	ATP Binding Cassette
AML	akutní myeloidní leukémie
APL	akutní promyelocytární leukémie
ATP	Adenosintrifosfát
ATRA	kyselina transretinová
CBF	Core Binding Factor
CBP	Cyclic-AMP Response Element Binding Protein (CREB) – Binding Protein
Cdk	cyklin-dependentní kináza
CGH	Comparative Genome Hybridization
CR	Complete Remission
CSF	Colony Stimulating Factor
ETO (CDR, MTG8)	Eight Twenty One Gene
FAB	francouzsko-americko britská (klasifikace)
FISH	Fluorescence in Situ Hybridization
GST	glutathion-S-transferáza
HD	histondeacetyláza
LDH	laktátdehydrogenáza
LRP	Lung Resistance Protein
MDR	Multidrug Resistance
MDR1	Multidrug Resistance Gene 1
MDS	myelodysplastický syndrom
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLL	Mixed Lineage Leukemia
MPO	myeloperoxidáza
MRD	minimální reziduální choroba
mRNA	Messenger RNA
MRP	Multidrug Resistance Associated Protein
MYH11	Myosám Heavy Chain 11
NHL	non-Hodgkinův lymfom
NPM	Nucleophosmin
NuMA	Nuclear Matrix Mitotic Apparatus – Associated Protein
OS	Overall Survival
Pgp	P-glykoprotein
PLZF	Promyelocytic Leukemic Zinc Finger Protein
PML	Promyelocytic Leukemic Protein
PPA	prognosticky příznivá aberace
POD	PML Onkogene Domain
RA	Retinoic Acid (kyselina retinová)
RAR $\alpha$	Retinoic Acid Receptor $\alpha$
RARE	Retinoic Acid Responsive Elements
RHD	Runt Homology Domain
RING	Really Interesting New Gene
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce po reverzní transkripci
SKY	Spectral Caryotyping
SMMHC	Smooth Musile Myosin Heavy Chain
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TNF	Tumor Necrosis Factor
VD	Vitamín D
VDR	Vitamin D Receptor

## Seznam obrázků

Obr. 1 Frekvence cytogenetických a molekulárních podskupin u APL	17
Obr. 2 Schématické znázornění molekulární patogeneze APL [70]	18
Obr. 3 Funkční domény proteinu RAR $\alpha$ [70]	19
Obr. 4 Funkční domény PML proteinu [70]	20
Obr. 5 Struktura PML/RAR $\alpha$ a reciprokého RAR $\alpha$ /PML proteinu [70]	22
Obr. 6 Schématické znázornění PLZF [70]	24
Obr. 7 Schématické znázornění translokace t(11q23;17) [70]	24
Obr. 8 Schématické znázornění nukleofosminu [70]	25
Obr. 9 Schématické znázornění translokace t(5;17) [70]	26
Obr. 10 Schématické znázornění proteinu NuMA [70]	27
Obr. 11 Translokace t(11;17) [70]	27
Obr. 12 Schématické znázornění STAT5b genu	28
Obr. 13 Schématické znázornění fúzního genu PML/RAR $\alpha$ a jeho detekce pomocí RT-PCR	30
Obr. 14 Působení kyseliny trans-retinové	31
Obr. 15 Schématické znázornění fúzního genu CBF $\beta$ /MYH11	38
Obr. 16 Mechanismy vzniku mnohočetné lékové rezistence [21]	39
Obr. 17 PPA celkem a dle metody diagnózy	60
Obr. 18 Přežití všech pacientů s AML	61
Obr. 19 Indukce CR u AML podle prognostické klasifikace cytogenetického nálezu	62
Obr. 20 Přežívání pacientů podle prognostické klasifikace cytogenetického nálezu	63
Obr. 21 Dosažení CR v závislosti na věkové skupině	64
Obr. 22 Křivky přežívání v závislosti na věkové skupině	64
Obr. 23 Výskyt chromozomálních aberací podle prognostické klasifikace a věku	65
Obr. 24 Křivka přežití pacientů s <100 a >100x10 <sup>9</sup> /l leukocyty	66
Obr. 25 FAB klasifikace v době diagnózy	66
Obr. 26 Křivky přežití v závislosti na FAB klasifikaci v době diagnózy	67
Obr. 27 Indukce CR u pacientů dle imunofenotypu	69
Obr. 28 Indukce CR u pacientů podle imunofenotypu.	69
Obr. 29 Srovnání celkového přežívání nemocných s APL a s ostatními typy AML	70
Obr. 30 Indukce CR a celkové přežívání dle počtu leukocytů v době diagnózy u pacientů s APL	71
Obr. 31 Srovnání dosažení CR u APL, hypergranulárního a variantního M3v subtypu	72
Obr. 32 Celkové přežití pacientů s APL v závislosti na typu zlomu v genu PML u t(15;17)	72
Obr. 33 Průměrný věk pacientů APL, kteří dosáhli nebo nedosáhli CR	73
Obr. 34 Indukce CR u AML dle CBF aberace	74
Obr. 35 Přežívání pacientů podle přítomnosti CBF aberací	75
Obr. 36 Elektroforéza BCR/MDR1 genů	76
Obr. 37 Kvantitativní exprese Pgp na povrchu buněk	78
Obr. 38 Dosažení CR podle povrchové exprese Pgp a přítomnosti PPA	79

Obr. 39 Celkové přežívání pacientů bez PPA podle exprese Pgp	80
Obr. 40 Vliv exprese MDR1 na celkové přežití u pacientů bez PPA	81
Obr. 41 Expres MDR1	82
Obr. 42 Srovnání exprese MDR1 (indexu MDR1/BCR) a P-gp	83
Obr. 43 Histologický snímek tumoru po relapsu.	84
Obr. 44 Elektroforéza PCR produktů	85
Obr. 45 Schématické znázornění typu bodu zlomu A a J	86
Obr. 46 Elektroforetická analýza vzorků	86
Obr. 47 Sekvenční analýza vzorku pacientky s typem bodu zlomu J	87
Obr. 48 Multiplex RT-PCR – vzorky pacientů se známými translokacemi	87

## Seznam tabulek

Tabulka 1 Morfologická a cytogenetická klasifikace AML	11
Tabulka 2 Rekurentní chromozomální aberace u AML a některých jiných typů leukémií	13
Tabulka 3 Typy chromozomálních aberací a jejich prognostická klasifikace	14
Tabulka 4 Chromozomální translokace ovlivňující gen RAR $\alpha$	17
Tabulka 5 Srovnání RAR $\alpha$ fúzních partnerů PML, PLZF, NPM a NuMA [70]	28
Tabulka 6 Přístrojové vybavení	49
Tabulka 7 Chemikálie pro izolaci RNA	50
Tabulka 8 Chemikálie a enzymy pro RT-PCR	50
Tabulka 9 Složení roztoků	51
Tabulka 10 Schémata amplifikačních programů	55
Tabulka 11 Sekvence použitých primerů	55
Tabulka 12 Přehled imunofluorescenčních protilátek pro detekci sledovaných antigenů	57
Tabulka 13 Přehled pacientů	59
Tabulka 14 Pacienti s aberací 11q23	68
Tabulka 15 Testované antigeny	68
Tabulka 16 Přehled translokací detekovatelných pomocí kitu Hema Vision®	88



# 1 Teoretický přehled problematiky

## 1.1 Úvod

Akutní myeloidní leukémie jsou stále ještě fatálním onemocněním pro většinu pacientů, přestože poměrně vysoké procento nemocných (dle různých studií 55-85%) se dostane do kompletní remise (CR) a zhruba 25-40% z nich přežívá v CR déle než 2-3 roky a má tak reálnou naději na vyléčení. Hlavní příčinou léčebných neúspěchů bývá nenavození CR a dále pak relapsy onemocnění, které hůře reagují na chemoterapii a mají již výrazně omezenou naději na vyléčení [2].

Různé subtypy AML mají různou prognózu. Zatímco v dobách před 30-40 lety prognóza vystihovala přirozený průběh onemocnění při neexistenci účinné protinádorové terapie, v současnosti je naopak v mnohých případech silně ovlivněna efektivní léčbou. Typickým příkladem je akutní promyelocytární leukémie (APL), která bývala prognosticky nejhorší mezi AML s rychlým a fatálním průběhem [3]. V současnosti má APL při použití specifické terapie v této skupině nejlepší prognózu, s možností vyléčení více než 90% pacientů [4,5].

Prognostických faktorů byla popsána celá řada. V nedávné době se všeobecně přijímaly jako nejdůležitější tři faktory ovlivňující prognózu AML, a to věk, předchozí myelodysplastická fáze, a typ cytogenetické aberace. Nicméně se zdá, že ani tyto tři faktory nemusí být na sobě nezávislé. Zatímco incidence chromozomálních translokací spojených s dobrou prognózou je celkem konstantní v různých věkových skupinách, s věkem roste incidence prognosticky nepříznivých cytogenetických aberací, podobných těm u myelodysplastického syndromu (MDS), tj. především numerických aberací a delecí. Jejich relativní frekvence je pak u starších věkových skupin vyšší [6,7]. Relativně nezávislým prognostickým faktorem může být i typ podané léčby, tj. intenzita chemoterapie. Ta však z pochopitelných důvodů bývá méně intenzivní u vyšších věkových skupin (tudíž je též relativně závislá). Zajímavé je, že intenzita chemoterapie u prognosticky nepříznivých AML může zvýšit procento dosažených CR, ale většinou nevede ke zvýšení celkového přežití (OS). Naopak u prognosticky příznivých AML výrazně nezvyšuje už tak dobré procento dosažení CR, ale prodlužuje OS (tedy snižuje riziko relapsu). To platí především pro AML spojené s přestavbou jednoho z řetězců tzv. „core binding“ faktoru (CBF), tj. u AML s t(8;21) a inv(16) či t(16;16). U nich je potřeba odlišit léčbu, neboť jejich dobrá prognóza je zřejmě pouze při užití vysokodávkové terapie (high-dose Ara-C), v indukci anebo konsolidaci. Naopak není nutno potom indikovat transplantaci progenitorových buněk [8].

Nenáhodné chromozomální abnormality jsou detekovány zhruba v 55% případů dospělých s *de novo* AML a již od počátku 80. let je právě karyotyp považován za důležitý nezávislý prognostický faktor pro klinickou prognózu [9-12]. Zprvu byly studovány jen některé aberace: t(8;21), t(15;17), monosomie 5 a del(5q), monosomie 7 a del(7q), abnormality 11q, trisomie 8, trisomie 21 a odchylky ploidie.

Na typu aberace závisí nejen procento dosažení CR (40% u nepříznivých aberací, 90% u t(8;21)), ale i trvání 1. CR i OS [13]. Pro snadnější orientaci byly jednotlivé typy chromozomálních aberací seříděny do tří prognostických skupin: do té příznivé patří t(15;17), t(8;21) a t(16;16)/inv(16) [11,14-17], do skupiny nepříznivých patří především delece a parciální delece chromozomů č. 5 a 7 a trisomie 8 [11,15-17]. Dále sem patří i některé translokace, jako např. t(3;3), t(6;9), APL s t(11;17) s fúzním genem PLZF/RAR $\alpha$ , ale i změny ploidie buněk a různé komplexní přestavby [6]. Ostatní byly zařazeny do skupiny se standardním rizikem; sem patří i AML s normálním karyotypem [18]. Zvláštní skupinu tvoří chromozomální aberace t(11q23)/MLL, která dle některých studií patří do skupiny se špatnou prognózou a dle jiných zase do skupiny se standardním rizikem [11,15-17]. Třídění do výše zmíněných prognostických skupin je zachycuje Tabulka 3 v následující kapitole.

Zhruba třetina případů AML nemá podle Sandberga [19] zjevnou cytogenetickou odchylku (v jiných laboratořích, včetně naší, to však bývá více, zhruba 50% případů). U těchto pacientů se mohou uplatnit při stanovení prognózy i jiné faktory, které předurčují schopnost pacienta reagovat na léčbu. Mezi ně patří např. mutace FLT3 ITD (podrobněji viz následující kapitola), zkoumá se také vliv imunofenotypu a především tzv. „multidrug resistance (MDR) fenotyp“ [20,21]. Mnohočetná léková rezistence (MDR) je zapříčiněna různými mechanismy, z nichž asi nejzkoumanější je vliv P-glykoproteinu (Pgp), produktu MDR1 genu. Geny způsobující MDR kódují proteiny, ovlivňující čerpání cizorodých látek, mj. cytostatik, ven z buněk přes buněčnou membránu. Pgp je exprimován za normálních okolností různými buňkami, včetně krevních (např. CD34+ buňky, monocyty a CD8+T-lymfocyty), jeho hyperexprese bývá spojena s lékovou rezistencí. Exprese MDR1/Pgp se zdá být silně prediktivní především vzhledem k dosažení CR u nemocných s AML; vliv na OS nebyl dosud jasně prokázán [22-25].

Vysoká exprese MDR1/Pgp bývá častá u hybridních akutních leukémií, u AML s nepříznivou cytogenetikou, s expresí imunofenotypových znaků CD34, CD7, CD14, CD42b a s AML FAB M5 subtypu [26]. Naopak u APL je exprese MDR1/Pgp velmi nízká a pravděpodobně souvisí s mimořádnou účinností některých cytostatik [27]. Bylo také prokázáno, že cytogenetika a hyperexprese MDR1/Pgp jsou nezávislými prognostickými faktory [28]. Zdá se, že většina genů, ovlivňujících MDR, má prognostický dopad u AML, a že je též velmi častá jejich vzájemná ko-exprese [29-34].

Výsledky studií MDR1/Pgp exprese a její interpretace jsou v literatuře velmi rozporuplné [30-35]. Tento stav lze vysvětlit jednak nejrůznějšími technikami průkazu – průtoková cytometrie s různými anti-Pgp protilátkami, imunohistochemie, funkční testy založené na vlastnosti Pgp odstraňovat cizorodé látky z buněk (tzv. efluxní testy), využívající různá barviva pro značení, např. rodamin, a v neposlední řadě různé metody kvantifikace transkriptů MDR1/Pgp. Dále je to též chybějící standardizace hodnocení výsledků, i přes to, že návrh na standardizaci byl již publikován Mariem et al [20]. A také to, že na rozdíl od jasně patologických translokačních fúzních genů je bazální exprese MDR1/Pgp vždy přítomna a rozdíly v expresi jsou tedy pouze kvantitativní. Obecně platí, že při zjišťování exprese MDR1/Pgp je vhodné používat alespoň dvě odlišné metody detekce, a pokud možno objektivně kvantifikovat a hodnotit výsledky [20].

## 1.2 Akutní myeloidní leukémie

AML je choroba, která vzniká maligní transformací kmenové hematopoetické buňky v tzv. leukemické blasty a vede k poruše proliferace, diferenciaci a apoptózy a jejich regulaci. Z molekulárně biologického hlediska je možné leukémie charakterizovat jako klonální hemopatie vzniklé na základě získaných somatických mutací, které zahrnují translokace, delece, inserce, duplikace a bodové mutace [36]. Pokračující akumulace patologických blastických buněk potlačí fyziologickou krvetvorbu a způsobí anémii, granulocytopenii a trombocytopenii, což vytváří typické klinické příznaky nemoci. U některých typů leukémií byly prokázány změny karyotypu, vedoucí ke vzniku různých chromozomálních aberací [10-12]. Tímto způsobem vznikají fúzní geny a jejich proteinové produkty s pozměněnou funkcí, které vytvářejí charakteristický obraz dané leukémie.

### 1.2.1 Klasifikace AML

Stále ještě nejrozšířeněji používanou klasifikací je tzv. francouzsko-americko-britská (FAB) klasifikace (viz Tabulka 1). Je založena na morfologických, cytochemických a imunofenotypových nálezech, nebo na elektronové mikroskopii, ve snaze zařadit leukemické buňky pacienta podle jejich diferenciaci a stupně maturace do určité vývojové řady [37].

**Tabulka 1 Morfologická a cytogenetická klasifikace AML**

FAB subtyp	Morfologie	Cytogenetika
M0 – s minimální diferenciací	nediferencované blasty	t(3;21)(q26;q22)
M1 – bez vyzrávání	nediferencované myeloblasty	
M2 – s vyzráváním	diferencované myeloblasty	t(8;21)(q22;q22)
M3 – APL	hypergranulární promyelocyty	t(15;17)(q22;q11-12)
M3 variant – APL	mikrogranulární promyelocyty	t(5;17)(q22;q11-12)

FAB subtyp	Morfologie	Cytogenetika
M4 – akutní myelomonocytární leukémie	myelomonocyty	
M4 eozinofilní	myelomonocyty s eozinofilií	t(16;16), inv(16)(p13q22)
M5a – akutní monocytární leukémie	monoblasty	
M5b	promonocyty-monocyty	t(9;11)(p21-22;q23)
M6 – erytroleukémie	erytroblasty	
M7 – megakaryocytární leukémie	megakaryoblasty	

Vzhledem k novějším poznatkům a metodám diagnostiky postupně vznikají další klasifikace, které se snaží zohlednit též vztah různých prognostických faktorů, jako je např. věk, karyotyp apod. [6]. Například návrh klasifikace myeloidních neoplázií dle WHO z roku 1999 [38] rozpoznává 4 hlavní kategorie: 1. AML s rekurentními genetickými abnormalitami, 2. AML s multilineární dysplasií, 3. AML vázanou na terapii a 4. AML jinak nekategorizovanou. Toto dělení vychází z podstaty onemocnění a zahrnuje též asociaci jednotlivých chorob se specifickými chromozomálními translokacemi a dále klinické, morfologické a imunologické charakteristiky onemocnění.

Byly popsány tři obecné molekulární mechanismy vedoucí ke vzniku lidských leukémií [36]. První skupina zahrnuje fúzní proteiny s konstitutivní tyrosin-kinázovou aktivitou a onkogenním potenciálem. Patří sem pět různých chromozomálních translokací, vedoucích ke vzniku akutní i chronické myeloidní leukémie a akutní lymfoblastické leukémie. Jsou to translokace t(9;22)(q34;q22) – BCR/ABL, t(9;12)(q34;p13) – TEL/ABL, t(5;12)(q33;p13) – TEL/PDGFβR, t(5;7)(q33;q11.2) – HIP1/PDGFβR a t(9;12)(p24;p13) – TEL/JAK2. Všechny tyto fúzní proteiny jsou schopné indukovat transformaci jak in vitro, tak in vivo. Tato transformace je závislá na oligomerizaci vzniklé působením aminoterminální části fúzního partnera (BCR, TEL nebo HIP1) s následnou aktivací tyrosinkinázové domény (ABL, PDGFβR a JAK2). Tímto mechanismem se aktivuje RAS signální transdukční cesta vedoucí k fosforylaci rodiny latentních cytoplasmatických transkripčních faktorů STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription). JAK/STAT cesta umožňuje rychlý přenos signálu z vnějšku do jádra a pravděpodobně vede k deregulaci (ve smyslu zvýšení) hematopoetických růstových genů a genů diferenciačních faktorů, což přispívá k leukemogenezi. Druhá skupina zahrnuje chromozomální translokace, které vedou k deaktivaci transkripčních faktorů – např. CBF genu (Core Binding Factor), a translokace ovlivňující receptor kyseliny retinové. Tyto mechanismy budou podrobně rozebrány v následujících kapitolách.

Ve třetí skupině jsou zařazeny translokace, jejichž produkty jsou fúzní proteiny modifikující transkripci. Patří sem podskupina translokací postihující molekuly, které indukují nebo reprimují genovou expresi na základě přímé modifikace chromatinové struktury.

Nejznámější z těchto translokací jsou fúzní proteiny zahrnující MLL gen (Mixed-Lineage Leukemia, nazývaný též ALL, HRX nebo HTRX) na chromozomu 11q23 a jeden z jeho několika fúzních partnerů (AF1p, AF4, AF9, AF10, ENL atd.). MLL gen pozitivně reguluje Hox geny (Homeobox), které hrají roli v embryonálním vývoji a hematopoeze. MLL ve své aminoterminální části obsahuje metyltransferázovou homologní doménu, která umožňuje nespecifickou vazbu k DNA. Ačkoliv molekulární mechanismus není ještě plně objasněn, zdá se, že fúzní partneři typu ENL a AF proteinů poškozují schopnost MLL pozitivně regulovat expresi Hox transkripčních faktorů, což přispívá k leukemogennímu fenotypu. Pravděpodobně dochází k vazbě v mělkém žlábků DNA struktury, což podporuje vazbu transkripčních faktorů ve velkém žlábků, případně může docházet též k místním změnám chromatinové struktury a následné regulaci genové exprese. Expresí fúzních proteinů obsahujících MLL je spojována se špatnou prognózou těchto leukémií a pravděpodobně může mít souvislost se zvýšenou expresí genů mnohočetné lékové rezistence.

Druhou podskupinou jsou translace zahrnující transkripční koaktivátory, nebo represory. Patří sem translokace t(11;16) – MLL/CBP, t(11;22) – MLL/p300 a t(8;16) – MOZ/CBP. CBP protein (Cyclic-AMP Response Element Binding Protein (CREB)-Binding Protein) a jemu blízký protein p300 jsou transkripční koaktivátory, které mají spojovací funkci mezi buněčnou transkripční mašinerií a transkripčními faktory. Tyto koaktivátory mají vnitřní histoneacetylázovou aktivitu, která mění strukturu chromatinu a umožňuje tím genovou transkripci. CBP a p300 se neváží přímo k DNA, ale fungují spíše jako aktivátory transkripčních faktorů typu RAR, STAT, nebo CBF. Vzhledem k jejich schopnosti regulovat genovou expresi hrají tyto proteiny důležitou roli v buněčné diferenciaci, kontrole buněčného růstu a v signální transdukci. V současné době již byla alespoň v hrubých rysech molekulárně charakterizována většina nejčastěji se vyskytujících chromozomálních translokací u AML, byly identifikovány geny, přestavěné při translokaci [37].

Přehled rekurentních chromozomálních aberací u AML (podle Bloomfieldové C.D., Edukační program XIII. konference ISH, Singapur 1996), u nichž byl objasněn molekulární podklad, viz Tabulka 2.

**Tabulka 2 Rekurentní chromozomální aberace u AML a některých jiných typů leukémií**

Chromozomální aberace	Přestavěné geny	Morfologie	
t(1;11)(p32;q23)	AF1P	MLL*	
t(1;11)(q21;q23)	AF1Q	MLL*	
inv(3)(q21q26)	RPN1	EVI1	M1 (M7)
t(3;3)(q21;q26)	RPN1	EVI1	M1 (M7)
t(3;5)(q25;q34)	MLF1	NPM	
t(3;21)(q26;q22)	EVI1/EAP/MDS1	AML1++	
t(4;11)(q21;q23)	AF4	ALL1*	bifenotypová AL, pre-B ALL
del(5)(q12-31—q31-35)	IRF1		M1, M2
t(5;17)(q34;q21)	NPM	RAR $\alpha$	M3

Chromozomální aberace	Přestavěné geny		Morfologie
t(6;9)(p23;q34)	DEK	CAN	M2 (M4) s bazofily
t(6;11)(q27;q23)	AF6	ALL1*	
t(7;11)(p15p15)	HOXA9	NUP98	M2 (M4), CML, MDS, dysplázie
t(8;21)(q22;q22)	ETO+	AML1+ +	M2 (M4), eozinofily
t(9;11)(p21-22;q23)	AF9	MLL*	M5a, M4 (M2)
t(9;22)(q34;q11)	ABL	BCR	CML, ALL, M1
t(10;11)(p11-15;q13-23)	AF10	MLL*	
ins(10;11)(p11;q23q24)		MLL*	
+11	MLL*		
t(11;15)(q23;q15)	MLL*		
t(11;17)(q23;q21)	PLZF	RAR $\alpha$	atyp. M3
t(11;17)(q23;q21)	MLL*	AF17	
t(11;17)(q23;q25)	MLL*		
t(11;19)(q23;p13.1)		ELL	smíšené AL, pre-B ALL
t(11;19)(q23;p13.3)	MLL*	ENL	M4, M5
t(12;22)(p12-13;q11-13)	TEL	MN1	
t(15;17)(q22;q11-12)	PML	RAR $\alpha$	M3
inv(16)(p13q22)	MYH11	CBF $\beta$	M4 s eozinofily (M4Eo)
t(16;16)(p13;q22)	MYH11	CBF $\beta$	M4 s eozinofily (M4Eo)
t(16;21)(p11;q22)	FUS $\S$	ERG	M1, M2

\* Synonyma MLL: ALL-1, HRX, Ht2x

+ Synonyma ETO: CDR, MTG8

++ Synonyma AML1: onkogen c-ets, gen CBF $\alpha$

° Synonymum PML: onkogen myl

§ Synonymum FUS: TLS

## 1.2.2 Prognóza u AML

Jak již bylo zmíněno v úvodu, za hlavní prognostické faktory u AML jsou stále považovány věk, předchozí myelodysplastická fáze, a typ cytogenetické aberace [39]. Co se týká věku, nejlepší prognózu mají mladí pacienti, špatnou prognózu mají naopak pacienti starší šedesáti let a pacienti s předchozí myelodysplastickou fází. Z hlediska chromozomálních aberací lze AML rozdělit na základě literárních znalostí do 3 kategorií: příznivé, intermediární (střední), a prognosticky nepříznivé. Tabulka 3 ukazuje hlavní typy aberací a jejich vztah k prognóze.

**Tabulka 3 Typy chromozomálních aberací a jejich prognostická klasifikace**

Prognosticky příznivé	t(15;17) t(8;21) t(16;16) a inv(16)
S intermediární prognózou	trisomie obecně, +4, +11, +21, s vyloučením +8 aberace úseku 11q23, del(11q), t(6;11), t(9;11), t(10;11), t(11;19), t(11;20) delece -Y, -X v nepřítomnosti PPA t(9;20)
Prognosticky nepříznivé	komplexní aberace, vícečetné aberace (2 typy a více) marker chromozomy četné chromozomální zlomy většina delecí: del(7), del(7q), del(5), del(5q), del(9q), del(1p) izochromozom 17, i(17q), i(Xq) trisomie 8 v nepřítomnosti PPA hyperdiploidie, hypoploidie, polyploidie translokace a aberace #3, dup(3q), inv(3), t(3;3) translokace a aberace #1, t(1;14) t(8;16), t(6;9), t(5;17), t(11;17), t(9;22)

Jak bylo zmíněno v úvodu, dalším důležitým ukazatelem pro stanovení prognózy je hyperexprese genů podílejících se na vzniku mnohočetné lékové rezistence. Tato problematika je podrobně rozebrána v kapitole 1.5.

V posledních letech bylo identifikováno několik nových, prognosticky důležitých molekulárních markerů, např. částečná tandemová duplikace mixed lineage leukemia genu (MLL-PTD, přibližně 8% všech případů), asociovaná s horší prognózou u AML s normálním karyotypem [40-42]. Dále interní tandemová duplikace (ITD) ve fms-like tyrosine kinase-3 genu (FLT3), kódujícím receptor pro hematopoetický růstový faktor (přibližně 25-30% případů) [43-45] a mutace KIT genu (mutKIT), který patří do rodiny tyrosine-kinase type III receptorů.

Mutace KIT genu jsou pozorovány především u CBF-AML. FLT3-ITD mutace je obecně spojena se špatnou prognózou, podobně jako elevace exprese transkripčního faktoru EVI1 (8% nemocných) [43-47]. Naopak mutace v genu kódujícím transkripční faktor CEBPA je spojena s dobrou prognózou [48-50].

Ke stanovení prognózy AML pacientů pomáhá též imunofenotypizace. Dle některých studií je imunofenotyp nezávislým prognostickým faktorem při stratifikaci AML [51,52]. Hodnotí se zejména antigeny CD9, CD11b, CD13, CD34, CD41 (pokud jsou tyto znaky negativní, pacienti dosahují lepšího celkového přežití), dále antigeny CD15, CD33, CD38, CD64 a myeloperoxidáza (MPO) – exprese těchto antigenů je naopak prognosticky příznivým faktorem. Antigeny CD9, CD13, CD34 a CD64 jsou považovány za nezávislé prognostické faktory z hlediska hodnocení celkového přežití.

### 1.2.3 Diagnostika AML

Diagnostika AML je komplexní a skládá se jak z nálezů klinických, tak laboratorních (krevní obraz a diferenciál, biochemické hodnoty, imunofenotyp a karyotyp). K imunofenotypizaci se využívá metoda nepřímé imunofluorescence hodnocené průtokovým cytometrem s využitím různých protilátek proti sledovaným antigenům. Základem klasického cytogenetického vyšetření je sestavení karyotypu dělících se buněk a popis aberací dle ISCN nomenklatury. Výsledky klasické cytogenetické analýzy jsou často limitovány např. nízkým mitotickým indexem, horší kvalitou hodnocených mitóz či sníženou in vitro proliferací patologických klonů. Proto se tato analýza rozšiřuje o molekulárně-cytogenetické metody, především fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) a její modifikace - mnohobarevnou FISH (mFISH), mnohobarevné pruhování (mBAND) nebo komparativní genomovou hybridizaci (CGH) a další, které významně zvyšují specifitu a citlivost stanovení chromozomových odchylek [53].

Naopak pro diagnostiku fúzních genů je patrně nepraktičtější detekce mRNA fúzního proteinu s použitím řetězové polymerázové reakce po reverzní transkripci (RT-PCR). RT-PCR výrazně urychlí diagnostiku testovaných fúzních genů, navíc se její pomocí zjistí i nerekiproké translokace, které mohou uniknout při standardním cytogenetickém vyšetření [54,55]. Byla vypracována metodika stanovení velkého množství různých fúzních genů najednou v několika multiplex PCR reakcích [56]. V případě nutnosti verifikace výsledků RT-PCR se používá hybridizace se specifickými próbami. Nejpřesnější metodou je sekvenování vzorku a porovnání výsledné sekvence s genomovou databází, přístupnou např. na <http://www.ncbi.nlm.org>.

Jedním z nejmodernějších přístupů nejen v diagnostice ale též ve výzkumu patogenetických mechanismů uplatňujících se při vzniku AML, je tzv. profilování genové exprese (gene expression profiling) [57]. Tato metoda je založena na použití DNA microarrays, tedy mikročipů umožňujících simultánně monitorovat expresi tisíců genů na základě komplementární hybridizace cDNA vzorku pacienta s odpovídající cDNA, nebo oligonukleotidem, v jednom vyšetření [58-61]. Ukazuje se, že např. morfologické charakteristiky daného typu AML se odrážejí ve specifických variacích genové exprese, což umožňuje predikci určitých FAB subtypů na základě DNA microarray analýzy [62-65]. Výsledkem profilování genové exprese jsou tzv. molekulární podpisy, či podpisy genové exprese, které jsou různě robustní dle typu cytogenetické aberace. Např. u MLL translokací, či RAS mutací jsou tyto molekulární podpisy relativně slabé a nemohou být s jistotou využity pro diagnózu a klasifikaci. V těchto případech se nadále uplatňuje kombinace molekulárně diagnostických metod [57].

Čím dál více se uplatňuje přístup kombinující zkoumání genomu jako celku s dalšími genomickými technologiemi, např. array comparative genome hybridization, CpG Island microarray, microRNA expression microarray, či high-throughput DNA sequencing a mass spectrometry-based proteomics [66-69].

### **1.3 Akutní promyelocytární leukémie**

APL se řadí do skupiny akutních myeloidních leukémií. Označuje se podle FAB klasifikace jako subtyp M3 a představuje 5-20% myeloidních leukémií u dospělých [5]. U APL nedochází k transformaci na úrovni primitivních hematopoetických kmenových buněk, ale až na úrovni zadaných myeloidních progenitorů.

Normální kmenové buňky podstupují zadání, které limituje jejich regeneraci a řídí jejich diferenciační schopnost. Maturace začíná, když buňky vyčerpají svoji schopnost se replikovat. Když je přítomný induktor, prekuzory přikročí k zadání, přestávají se regenerovat a začnou maturovat. U APL jsou tyto diferenciační procesy narušeny.



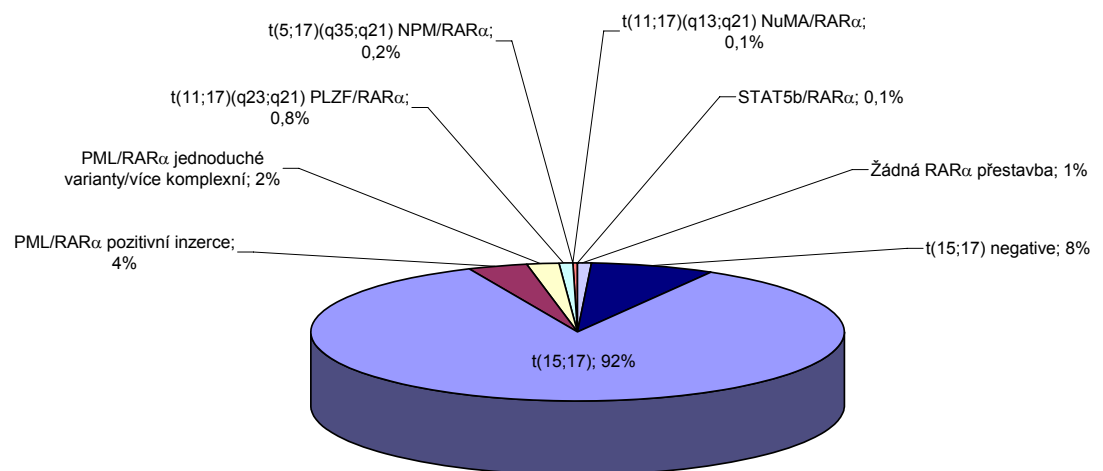
APL je charakteristická expanzí abnormálních promyelocytů v kostní dřeni a v 92% případů je spojena s chromozomální translokací t(15;17) [5]. Tato translokace zahrnuje gen kódující promyelocytární leukemický protein (PML) a gen kódující jaderný receptor  $\alpha$  pro kyselinu retinovou (RAR $\alpha$ ). Výsledným produktem je fúzní protein PML/RAR $\alpha$ , který narušuje normální funkce obou proteinů a hraje tak klíčovou roli v leukemogenezi APL. V ostatních případech přestavba 17q21 vede k fúzi RAR $\alpha$  s alternativními partnerskými geny, a to promyelocytic leukemia zinc finger [PLZF; t(11;17)(q23;q21)], nukleofosmin [NPM, t(5;17)(q35;q12-21)], gen asociovaný s mitotickým aparátem jaderné matrix [nuclear mitotic apparatus; NuMA; t(11;17)(q13;q21)], a signal transducer and activator of transcription 5b [STAT5b; der(17)] [5,70,71]. Zajímavou společnou charakteristikou fúzních partnerů RAR $\alpha$  genu je souvislost s jadernou matrix.

Tabulka 4 uvádí všechny translokace zasahující gen RAR $\alpha$ , jejich četnost, citlivost k léčbě kyselinou transretinovou a zda tvoří reciprokový produkt.

**Tabulka 4 Chromozomální translokace ovlivňující gen RAR $\alpha$**

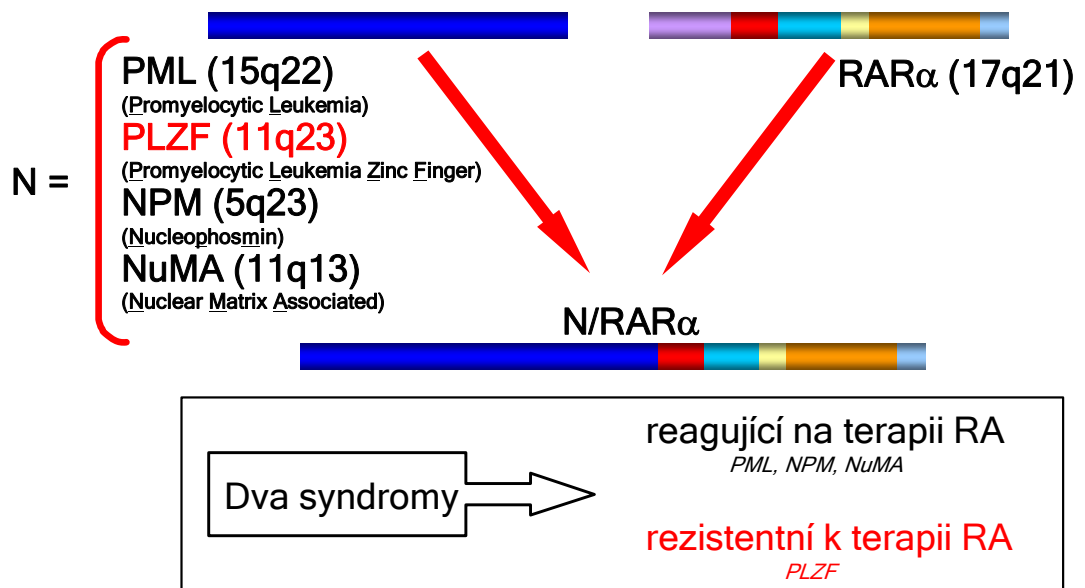
Translokace	Fúzní gen	Četnost	Citlivost k RA	Reciprokový produkt
t(15;17)(q22;q21)	PML/RAR $\alpha$	>99,9%případů	Ano	Ano, v 75%
t(11;17)(q23;q21)	PLZF/RAR $\alpha$	15 případů	Ne	Ano
t(5;17)(q35;q21)	NPM/RAR $\alpha$	4 případy	?	Ano
t(11;17)(q13;q21)	NuMA/RAR $\alpha$	1 případ	?	Ne
der(17)	STAT5b/RAR $\alpha$	1 případ	?	?

Obr. 1 znázorňuje frekvence cytogenetických a molekulárních podskupin u APL dle European Working Party [71].



**Obr. 1 Frekvence cytogenetických a molekulárních podskupin u APL**

V patogenezi APL se uplatňují dva syndromy – v případě, že RAR $\alpha$  fúzuje s PML, NPM nebo NuMA, leukémie reaguje na léčbu kyselinou retinovou a arsenic trioxidem (viz Obr. 2). Pokud je ovšem fúzním partnerem gen PLZF, pak je choroba vůči RA rezistentní. Z nejnovějších poznatků o APL vyplývá, že podíl na patogenezi této choroby má nejen porucha genu RAR $\alpha$ , ale též změna funkce jeho fúzních partnerů [5]. Tyto mechanismy budou vysvětleny v následujících kapitolách.

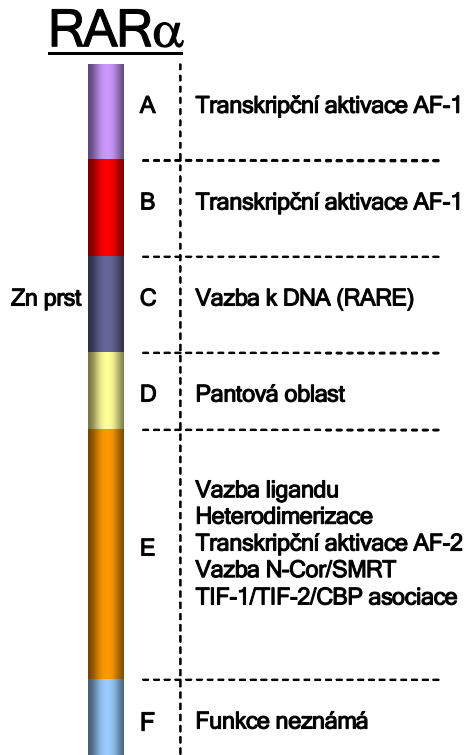


Obr. 2 Schématické znázornění molekulární patogeneze APL [70]

Domény B-F genu RAR $\alpha$ , zahrnující DNA vázající a ligand vázající oblast proteinu, jsou C-terminálně spojeny se 4 různými jadernými proteiny obsahujícími samospojovací oblasti.

### 1.3.1 Protein RAR $\alpha$

Molekula RAR $\alpha$  je rozdělena do šesti funkčních domén (A-F) (viz Obr. 3). Doména C, která je mezi jadernými a retinoidními receptory nejvíce konzervovaná, obsahuje dva zinkové prsty. Přes tuto doménu se RAR $\alpha$  váže do RARE, lokalizovaných v promotorových oblastech



cílových genů RA. RARE obsahují přímé repetice 5'-(A/G)G(G/T)TCA-3', oddělené dvěma nebo pěti nukleotidy. Vazba RAR k RARE se uskutečňuje pouze na základě dimerizace s RXR [73]. RAR $\alpha$  dále obsahuje dvě transkripčně aktivační domény AF-1 (v doménách A/B) – na ligandu nezávislé. Doména E obsahuje na ligandu závislou doménu AF-2 a také dimerizační místo pro RXR. Funkce C-koncové domény F je zatím neznámá [70,74]. RAR $\alpha$  společně s RAR $\beta$  a RAR $\gamma$  (RARs) patří do rodiny jaderných receptorů pro kyselinu retinovou (RA), přičemž RAR $\alpha$  je spojen s myeloidní diferenciací [70]. Další rodinou jaderných receptorů pro RA jsou receptory X (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  a RXR $\gamma$ ), které mají s RAR určitou sekvenční homologii, ale liší se vazbou ligandů. Jedná se o transkripční aktivátory, jejichž společnou úlohou je specifická vazba retinoidů k DNA.

**Obr. 3 Funkční domény proteinu RAR $\alpha$  [70]**

RAR $\alpha$  je ligand-dependentní transkripční faktor stimulovaný all-trans retinovou kyselinou (ATRA), zatímco jeho partner RXR odpovídá na ATRA i 9-cis RA. Mezi RAR $\alpha$  cílové geny patří např. regulátory buněčného cyklu, povrchové adhezni molekuly, různé cytokiny, interleukiny, kolonie-stimulující faktory, regulátory apoptózy, strukturní proteiny, enzymy, chromatinové komponenty a transkripční faktory.

RARs moduluji transkripci přes interakci s kofaktory. AF-2 bez přítomnosti ligandu asociuje s korepresory N-CoR a SMRT, které byly identifikovány jako součást multiproteinového represorového komplexu společně s korepresorem Sin3A a histondeacetylázou (HD). RARs tedy přes lokální deacetylaci a změny v konfiguraci chromatinu působí genovou represí. V přítomnosti ligandu doména AF-2 mění konformaci a umožňuje vazbu a aktivaci koaktivátorů jaderného receptoru, např. přes interakce s bazálními faktory, odvíjení DNA, či aktivitu HD.

Acetylace histonů vede ke změnám v konformaci chromatinu a stimuluje genovou transkripci. Na základě těchto poznatků lze tedy říci, že thyroidní hormony a retinoidy regulují transkripci cílových genů ovlivňováním acetylace histonů [5,70,75-77].

### 1.3.2 Protein PML

PML je tumorsupresorový protein, lokalizovaný na chromozomu 15q22, který reguluje diferenciaci a růst normálních i nádorových krvetvorných buněk. Genový lokus PML má

velikost 35 kb a obsahuje 9 exonů. Alternativním sestřihem exonů v C-koncové oblasti vzniká 20 různých izoform tohoto proteinu [70].

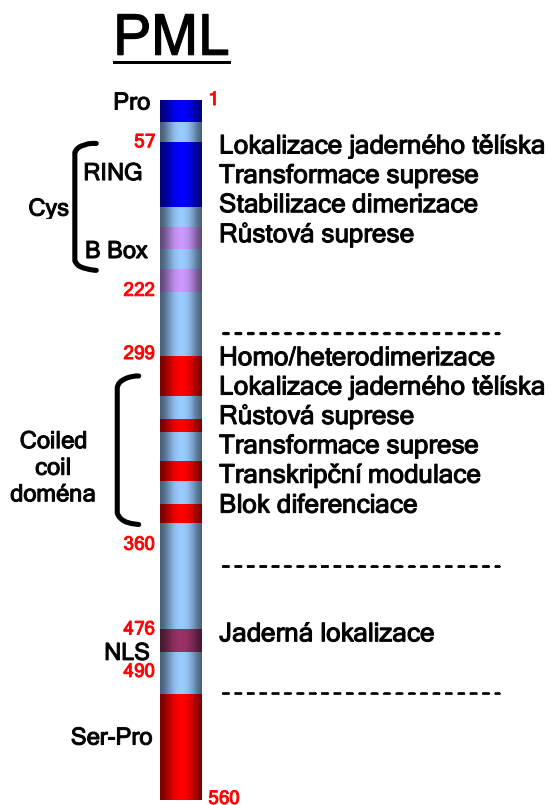
Nejdelší otevřený čtecí rámec cDNA kóduje peptid o 560 aminokyselinách s molekulovou hmotností 70 kDa. Celý peptid je rozdělen do několika oblastí – aminokoncová oblast není pro funkce PML důležitá.

Oblast 57. až 222. aminokyseliny je bohatá na cysteinové a histidinové zbytky a je ve všech PML izoformách, je složena ze tří zinkových prstů (viz **Error! Reference source not found.**). První je RING (Really Interesting New Gene), který má  $Zn^{+}$  vazebný motiv s konfigurací C3HC4 (AK 57-91). Následující dva se nazývají B-boxy

(AK 140-161 a 189-222).

#### Obr. 4 Funkční domény PML proteinu [70]

RING motiv se nachází u více než 80 proteinů zapojených v ontogenezi, regulaci genové exprese, zpracování mRNA a DNA reparaci. Celá tato oblast je vazebnou doménou DNA a je odpovědná za skvrnitě rozložení v jádře. Hned vedle ní se nachází doména obsahující  $\alpha$ -helix (AK 229-360). Část helixu má možnost zaujímat nadšroubovicovou konformaci (leuci-nový zip) a obsahuje čtyři skupiny heptarepetic s hydrofóbními aminokyselinami na první, čtvrté a osmé pozici. Tato část se také nachází ve všech izoformách PML, zatímco helixová část bez repetice je variabilní. Celá  $\alpha$ -helixová oblast je dimerizační doménou (PML může tvořit



homodimery i heterodimery s RAR/RXR), je odpovědná za lokalizaci proteinu v jádře a důležitá pro aktivitu PML ve funkci růstového supresoru.

Další sekvence (AK 476-490) obsahuje signál pro jadernou lokalizaci a je důležitá pro činnost proteinu, stejně jako výše zmíněné domény, zodpovědné za jadernou lokalizaci PML.

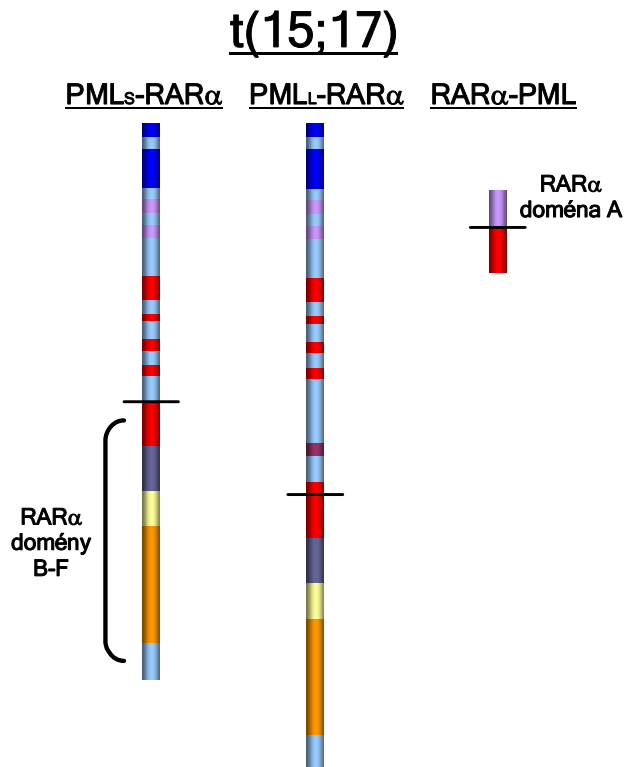
C-koncová doména je variabilní, je bohatá na serin a prolin a obsahuje různé typy X-S-P-X repetice, které jsou rozpoznávací sekvencí Ser/Thr kinázy a fosforylačním místem pro kaseinkinázu II (CKII). Pouze CKII místo je společné pro všechny izoformy. Existují čtyři izoformy PML s různým počtem aminokyselin – PML1(41 AK), PML2(259 AK), PML3 (63 AK) a PML4 (312 AK) [70-74].

PML je jaderný protein, přítomný ve všech tkáních; byl však nalezen též v cytoplazmě [70,73]. V jádře zaujímá skvrnitě rozmístění, které se mění při vystavení různým stimulům (např. virové infekci, tepelnému šoku, zánětu, či nádorové transformaci) [78,80]. Koncentruje se do celků nazývaných jaderná tělíska PML, či PML onkogení domény (POD). Savčí jádro obsahuje 10 až 20 PODs, velikosti od 0,3 do 1 $\mu$ m, podle typu tkáně. Předpokládá se, že PML se účastní stimulace transkripce, vzhledem k tomu, že v PODs byla nalezena nascentní mRNA a transkripční koaktivátor CBP, a také byla zjištěna přítomnost PML v DNA vazebném komplexu AP1. V jaderných tělískách bylo kromě PML objeveno asi 20 dalších přirozených komponent. Jsou to např. proteiny virových inkluzí Sp100 a NDP55, regulátory buněčného cyklu, elongační translační faktor Int-6, stimulator apoptózy BAX, některé virové proteiny atd. Rozdílná povaha těchto proteinů a to, že jsou lokalizovány jak v PODs, tak i v jiných částech jádra ukazuje, že POD je spíše místem uskladnění jaderných proteinů, než aktivního buněčného metabolismu [70].

PML je nezbytný pro působení RA při blokaci růstu normálních i nádorových buněk a pro její schopnost indukovat terminální myeloidní diferenciaci prekurzorových buněk. Účastní se RA-dependentní transaktivace genu p21, který patří mezi regulátory buněčného cyklu a buněčné diferenciace. Vyvolává apoptózu poškozených buněk v aktivní proliferaci, je důležitý pro Fas, tumor necrosis factor (TNF), interferony a ceramidové apoptotické dráhy, které normálně indukují apoptózu. Stimuluje také expresi MHC I antigenů a transportérů zodpovědných za přesun proteinů k buněčnému povrchu, které jsou s nimi asociovány [70]. PML je tedy důležitou složkou drah RA a jeho poškození translokací t(15;17) je taktéž součástí patogeneze APL [80].

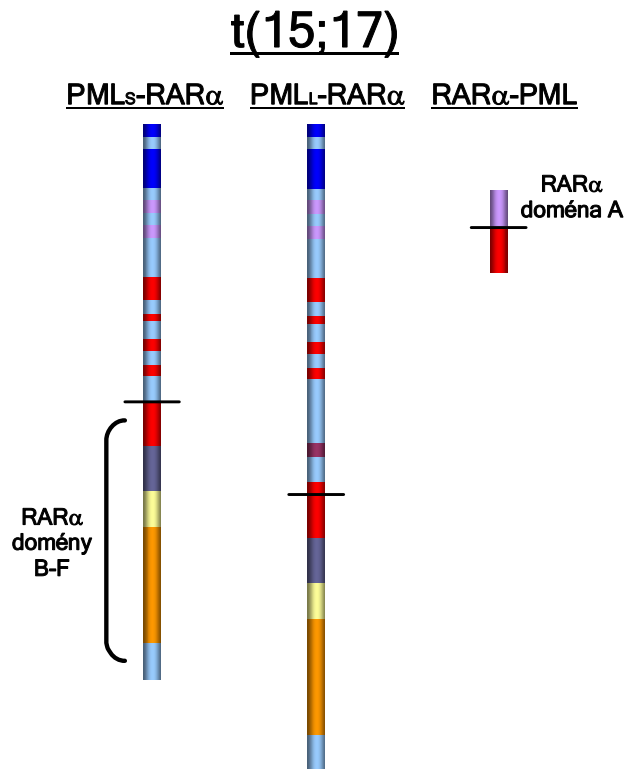
### 1.3.3 Fúzní proteiny PML/RAR $\alpha$ a RAR $\alpha$ /PML

Translokace (15;17) vzniká reciprokou translokací mezi chromozomy 15 a 17. Ke zlomu na chromozomu 17 dochází v lokusu obsahujícím gen RAR $\alpha$ , a to vždy v intronu 2, zatímco zlom na chromozomu 15 je variabilní a je lokalizován ve třech různých oblastech lokusu genu PML. Z 90-95% případů se nachází v intronu 6 (break cluster region 1 – bcr1), nebo v intronu 3 (bcr3), zbylých 5-10% je v exonu 6 (bcr2). V případě zlomu bcr1 a bcr3 je 5' konec PML intronu 6 (nebo 3) fúzován s 3' koncem RAR $\alpha$  intronu 2 (viz



Obr. 5).

V případě zlomu bcr2 se zbylá část PML exonu 6 spojí s RAR $\alpha$  intronem 2. Celý gen je pod transkripční kontrolou PML promotoru. V primárním transkriptu PML/RAR $\alpha$  fúzního genu se chimerní intron vystříhne a spojí se nejdelší čtecí rámce PML a RAR $\alpha$ . Následkem této translokace mohou vzniknout tři proteinové produkty: PML/RAR $\alpha$ , aberantní PML a reciproký RAR $\alpha$ /PML, všechny s onkogenním potenciálem [73,78]. Heterogenita v bodech zlomu v rámci PML genu vede ke vzniku dlouhé a krátké formy PML/RAR $\alpha$  a také střední formy, která se vyskytuje pouze zřídka a není zde vyobrazena. RAR $\alpha$ /PML protein je detekován ve většině případů, ale zdá se, že nemá žádnou evidentní funkci.



**Obr. 5** Struktura PML/RAR $\alpha$  a reciprokého RAR $\alpha$ /PML proteinu [70]

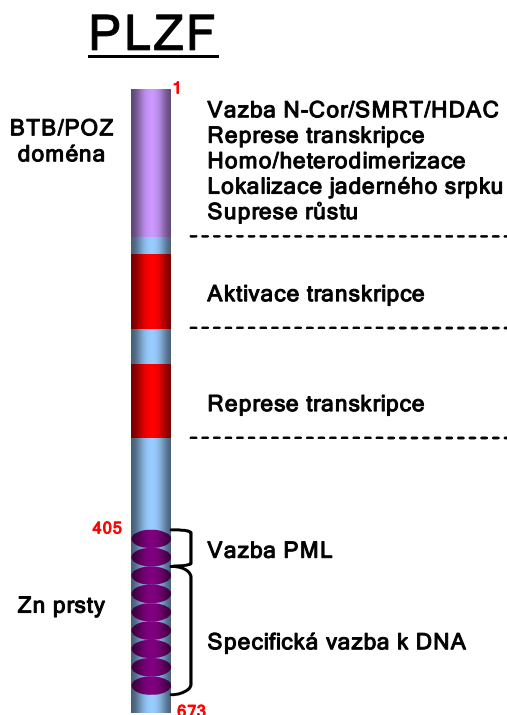
Protein PML/RAR $\alpha$  je produktem exprese fúzního genu PML/RAR $\alpha$ , který se po translokaci nachází na chromozomu 15q+ [73]. Jelikož je zlom na chromozomu 17 vždy na stejném místě, zůstává část RAR $\alpha$  fúzního proteinu ve všech případech stejná a odpovídá regionům B až F. Jsou tedy zachovány vazebné schopnosti jako pro DNA, tak pro ligand (RA), a dále možnost dimerizace s RXR a schopnost jaderné lokalizace. Protože při translokaci dojde k přerušení A/B regionu s transaktivační funkcí, normální RAR $\alpha$  a patologické PML/RAR $\alpha$  mají různé transaktivační schopnosti.

Efekt u obou může být stimulační i inhibiční, závisí např. na promotoru, či na přítomnosti RA, přičemž PML/RAR $\alpha$  je více aktivní, než přirozený RAR $\alpha$  (in vitro). Vazebná afinita RA k PML/RAR $\alpha$  je srovnatelná s přirozeným RAR $\alpha$  proteinem. PML/RAR $\alpha$  dimerizuje s RXR a tyto heterodimery mají schopnost se vázat k RARE. Zlom na chromozomu 15 může vzniknout na různých místech, a proto je část PML ve fúzním proteinu variabilní, pouze oblasti zinkového prstu a leucinového zipu jsou standardní pro všechny typy [73].

PML/RAR $\alpha$  je částí multimerních jaderných komplexů s molekulovou hmotností 600 až 1200 kDa ( $M_{\text{PML/RAR}\alpha} = 110$  kDa). Vytváří dimery s PML, s RXR, ale také sám se sebou. Tyto homodimery se váží k RARE s odlišnou specifitou, než RAR-RXR dimery a také reagují s responzivními elementy dalších jaderných receptorů, jako jsou thyroïdní receptory, nebo receptory vitamínu D (VDR). Heterodimery PML/RAR $\alpha$ -RXR mají vazebnou aktivitu k RARE

obdobnou jako přirozené RAR $\alpha$ -RXR. To je dáno skutečností, že v přítomnosti RXR se PML/RAR $\alpha$  váže k RARE přes jednu RXR a jednu RAR $\alpha$  DNA vazebnou doménu, stejně jako přirozený RAR $\alpha$ -RXR, kdežto heterodimery PML/RAR $\alpha$  se váží přes dvě RAR $\alpha$  domény.

Aberantní PML/RAR $\alpha$ -RXR heterodimer nepřímo ovlivňuje aktivitu jiných jaderných receptorů (RAR $\alpha$ , TR, VDR), které dimerizují s RXR, jelikož u APL buněk se exprimuje PML/RAR $\alpha$  v nadbytečném množství a brání vazbě VDR k VD responzivním elementům in vitro, jak prokázal Grignani v roce 1994 [73]. PML/RAR $\alpha$  hraje roli při RA indukované diferenciaci a maturaci krevních buněk. Při fyziologických koncentracích RA vystupuje PML/RAR $\alpha$  jako transkripční represor mnoha RA-cílových genů. Může také fungovat jako VD signální antagonist a účinkováním přímo na VD-cílové geny, nebo nepřímo odlučováním kofaktoru (RXR) nezbytného pro aktivitu VD receptoru [73]. PML/RAR $\alpha$  dále chrání hematopoetické prekurzory před apoptózou indukovanou interferony, TNF a Fas. Tato antiapoptotická onkogenní funkce může být založena na schopnosti PML/RAR $\alpha$  narušit dráhy PML kontrolující apoptózu pod vystavením výše uvedených stimulátorů. PML/RAR $\alpha$  tedy může narušovat signální dráhy PML i RAR $\alpha$ , tím blokovat terminální diferenciaci hematopoetických prekurzorů a podporovat buněčný růst inhibicí apoptózy [81,82]. Aberantní PML je kódován alternativním sestřihem PML/RAR $\alpha$  transkriptu. Jeho genová předloha se nachází na chromozomu 15q+. V proteinu je zachována DNA vazebná doména a tím schopnost komunikovat s cílovými sekvencemi PML. Protein RAR $\alpha$ /PML je translatován podle reciprokého genu PML/RAR $\alpha$  a obsahuje tedy zbývající domény z přirozených proteinů PML a RAR $\alpha$ , což jsou transaktivační doména A z RAR $\alpha$  a různé části  $\alpha$ -helixu, fosforylační místa a různě dlouhá C-koncová oblast z PML proteinu. RAR $\alpha$ /PML je jaderný protein se zatím neznámou funkcí a vyskytuje se v 70-80% případech APL [73].



### 1.3.4 Fúzní proteiny PLZF/RAR $\alpha$ a RAR $\alpha$ /PLZF

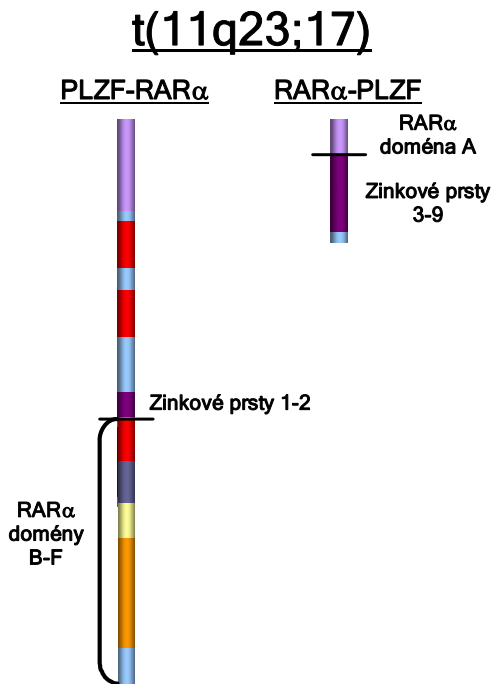
Fúzní protein PLZF/RAR $\alpha$  je produktem chromozomální trans-lokace (11;17) (q23;q21), zahrnující opět protein RAR $\alpha$  a protein PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger) (viz Obr. 6). PLZF je DNA vazebný protein o velikosti 673 aminokyselin a obsahuje devět zinkových prstů. 118 N-terminálních aminokyselin kóduje doménu



POZ, protein-protein interagující doménu, stabilizující vazbu PLZF-SMRT. PLZF/RAR $\alpha$  obsahuje dvě vazebná místa pro korepresor – první je v CoR boxu RAR $\alpha$  a je senzitivní k RA a druhé je k RA rezistentní a nachází se v N-koncovém regionu PLZF (viz Obr. 7). Tento fúzní protein je onkogenní, stejně jako PML/RAR $\alpha$  a také vede ke vzniku APL [76,77].

**Obr. 6 Schématické znázornění PLZF [70]**

PLZF/ RAR $\alpha$  i PML/RAR $\alpha$  inhibují terminální diferenciaci hematopoetických buněk (in vivo) a blokují myeloidní maturaci (in vitro). Blokování diferenciacie je způsobeno asociací korepresorového komplexu a neschopností jeho disociace



působením fyziologických dávek RA. Při nízké koncentraci RA tedy vystupují jako transkripční represory RA cílových genů.

Zvýšením koncentrace RA korepresor od PML/RAR $\alpha$  plně disociuje, zatímco na PLZF/RAR $\alpha$  nemají ani několikanásobné koncentrace RA prakticky žádný vliv. Tímto mechanismem se vysvětluje rezistence tohoto typu APL k léčbě kyselinou all-trans retinovou. Jak již bylo dříve uvedeno, RAR regulují transkripci modifikací chromatinu přes nukleární korepresory (SMRT, N-CoR), které tvoří komplex s histondeacetylázou.

**Obr. 7 Schématické znázornění translokace t(11q23;17) [70]**

Oba fúzní proteiny ovlivňují vznik tohoto komplexu přes CoR box RAR $\alpha$ . PLZF navíc obsahuje druhé, RA rezistentní vazebné místo pro korepresor, zatímco PML korepresor neváže. Výsledkem je, že při zvýšené koncentraci RA se komplex korepresor-HD uvolní pouze z RAR $\alpha$  u obou fúzních proteinů, ale u PLZF/RAR $\alpha$  ještě jeden komplex zůstane a transkripce neprobíhá. Tím se vysvětluje různý efekt RA na stabilitu PML/RAR $\alpha$  a PLZF/RAR $\alpha$  korepresorových komplexů a různou odpověď APL pacientů na léčbu tímto ligandem [76,77].

### 1.3.5 Fúzní proteiny NPM/RAR $\alpha$ a NuMA/RAR $\alpha$

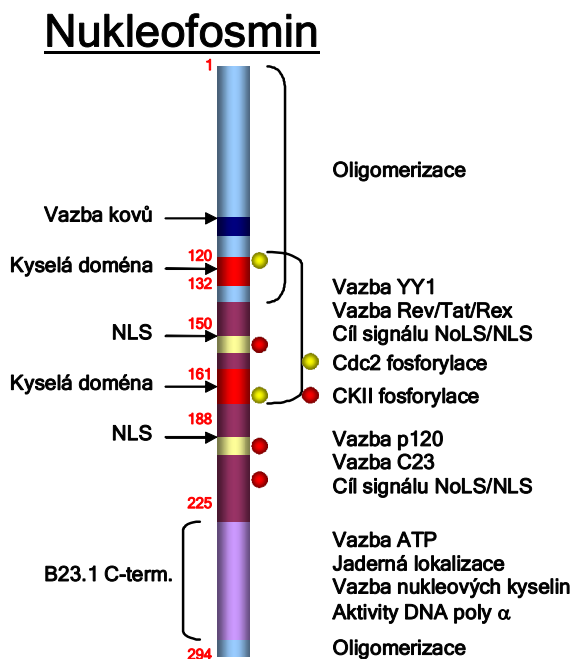
#### 1.3.5.1 Nukleofosmin a t(5;17)

Mutace genu kódujícího nukleofosmin (NPM1) je nejčastější genovou mutací u AML, vedoucí k aberantní cytoplazmatické lokalizaci NPM1 proteinu u přibližně 35% případů AML [57]. Při translokaci t(5;17) u APL je RAR $\alpha$  translokován k oblasti na chromozomu 5q35, kódujícím

ubiquiterně rozšířený evolučně konzervovaný gen pro nukleofosmin. NPM zabírá oblast 25kb a má 12 exonů, promotorová oblast NPM je shodná s housekeeping geny. Alternativním sestřihem vznikají dvě izoformy NPM, lišící se v C-terminální oblasti. Hlavními strukturálními rysy jsou dvě Asp/Glu bohaté kyselé domény, sloužící jako vazebná místa pro zásadité proteiny.

Dále je to oblast NLS – bipartitní jaderně lokalizovaný signál, kovy vázající motiv, ATP-vazebné místo, fosforylační místa pro cdc2 kinázu a kasein kinázu II a vazebné místo pro

proteiny jaderných lokalizačních signálů (viz Obr. 8).

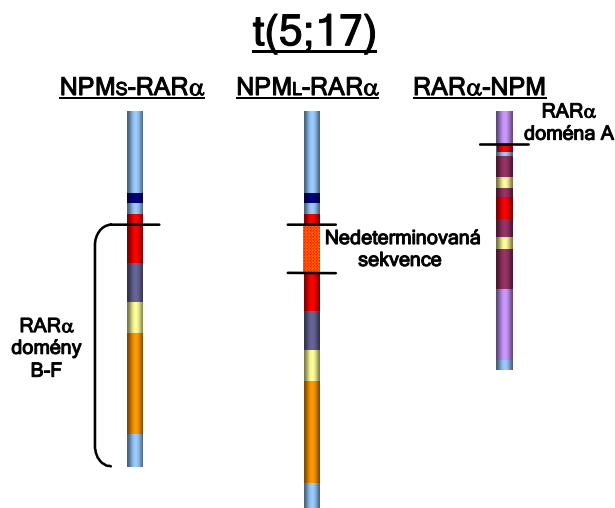


NPM je lokalizován hlavně v oblastech jádru asociovaných se zpracováním ribonukleo-proteinů. Podporuje vazbu ribozomálních proteinů k rRNA, hraje roli v DNA replikaci, účastní se transportu ribozomálních prekurzorů mezi cytoplazmou a jádrem. Zablokování normálních funkcí NPM vede k poruše kontrolních mechanismů buněčného růstu. Tento proces se pravděpodobně uplatňuje též v případě t(5;17).

**Obr. 8** Schématické znázornění nukleofosminu [70]

Tato translokace se projevuje atypickým morfologickým obrazem, odlišným od PLZF-asociované APL, protože ne-mocní jsou citliví k terapii ATRA. Byly identifikovány dva fúzní produkty – NPM<sub>S</sub>/RAR $\alpha$  a NPM<sub>L</sub>/RAR $\alpha$  (viz Obr. 9).

Podobně jako u výše popsaných translokací, NPM/RAR $\alpha$  funguje jako ligand-dependentní



transkripční aktivátor, ačkoliv není známo, zda může působit jako dominantně negativní inhibitor divokého typu RAR $\alpha$  [70]. Při této translokaci dochází k bloku monocytární diferenciaci s odpovědí na vitamín D<sub>3</sub> a TGF $\beta$ . Tím se potvrzuje, že všechny RAR $\alpha$  fúzní proteiny přispívají k APL fenotypu stejným mechanismem – poruchou

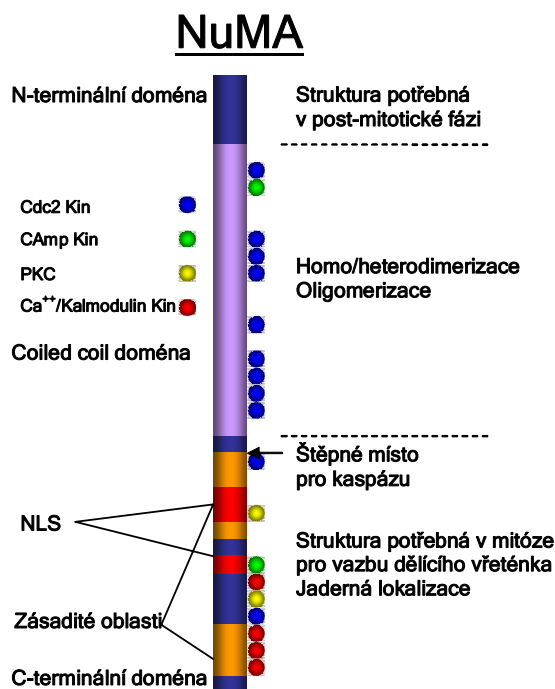
signalizace přes nukleární receptor.

#### Obr. 9 Schématické znázornění translokace t(5;17) [70]

Byla identifikována též reciproká forma RAR $\alpha$ /NPM (viz Obr. 9), není známo, zda interferuje s NPM funkcemi typu jaderného přesunu, či apoptózy. Podobně jako u ostatních reciprokových fúzních proteinů ale může ektopická exprese RAR $\alpha$  aktivační domény interferovat s divokým typem RAR $\alpha$  a kompetovat o AF1 kofaktory [70].

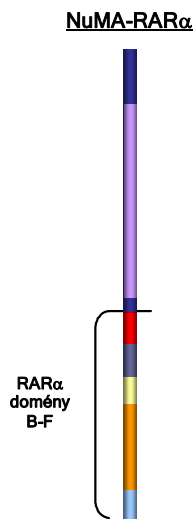
#### 1.3.5.2 Protein mitotického aparátu jaderné matrix a t(11q13;17)

Gen kódující protein mitotického aparátu jaderné matrix (NuMA) se nachází na chromozomu 11q13 a je nejnověji popsaným fúzním partnerem RAR $\alpha$  (viz Obr. 10). Je také prvním proteinem mitotického aparátu, který se účastní translokace u lidského maligního onemocnění. NuMA je ubiquiterně rozšířený nehistonový protein asociovaný s chromatinem, který se úzce účastní mitózy a formování jader v postmitotických dceřinných buňkách [70]. NuMA se účastní jaderných funkcí v průběhu mitózy, apoptózy a interfáze. Podílí se na komplexní regulaci posttranslačních modifikací v průběhu buněčného cyklu. Hraje roli v apoptóze jako časný cíl proteolýzy způsobené kaspázami 3 a 6. Následný proteolytický produkt vede k porušení normální jaderné struktury a k apoptóze. Mutace NuMA vážně poškozují průběh mitózy a pravděpodobně mají vliv na porušení normálního buněčného růstu a proliferace [70].



Při fúzi NuMA a RAR $\alpha$  dochází k C-terminální delecí NuMA, což vede ke kompletnímu porušení mitózy (viz Obr. 11). Je tedy zvláštní, že existence NuMA/RAR $\alpha$  je vůbec slučitelná s buněčným dělením. RAR $\alpha$  pravděpodobně delokalizuje mutovaný NuMA z jader dceřinných buněk, což umožní správnou funkci divokého typu NuMA. V jádře tato fúze asi dominantně negativně interferuje s regulačními ději v průběhu interfáze, nebo G2 fáze. Dochází asi také ke kompetici s divokým typem NuMA o kaspázy a tím k ovlivnění apoptózy.

Obr. 10 Schématické znázornění proteinu NuMA [70]

**t(11q13;17)**

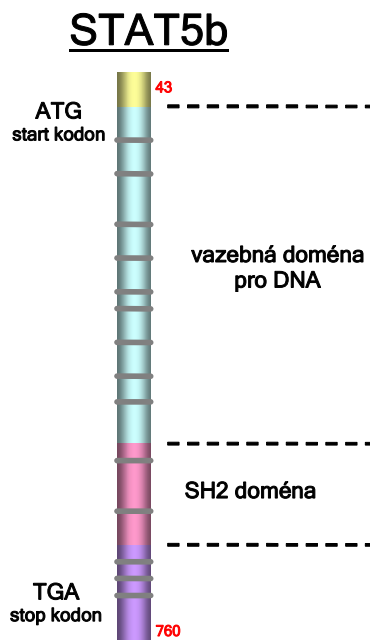
Nejpravděpodobnějším mechanismem působení je ovlivnění funkce jaderného receptoru ve smyslu vzniku dominantně negativního receptoru s vymizelou vnitřní transkripční aktivitou. Podobně jako ostatní APL fúzní partneři může NuMA/RAR $\alpha$  multimerizovat, čímž může vést k rozdělení partnerských proteinů RAR $\alpha$  a měnit afinitu koaktivátorů a korepresorů k jadernému receptoru.

NuMA/RAR $\alpha$  reaguje na léčbu kyselinou all-trans retinovou, která tyto APL buňky indukuje k diferenciaci. To potvrzuje také fakt, že normální neutrofilové neexprimují NuMA. Není známo, zda existuje reciproký transkript RAR $\alpha$ /NuMA, pravděpodobně dochází k selekci tohoto proteinu, vzhledem k jeho schopnosti ukončit mitózu [70].

Obr. 11 Translokace t(11;17) [70]

### 1.3.5.3 Signal transducer and activator of transcription 5b and der(17)

STAT5 (signal transducers and activators of transcription) proteiny jsou součástí rodiny signálních přenašečů a aktivátorů transkripce, které mohou být aktivovány po cytokinové stimulaci [78].



Jejich vazba na promotory různých genů ovlivňuje buněčný cyklus, apoptózu a proliferaci různých buněk. STATs jsou konstitutivně exprimovány u různých hematologických nemocí a proto se předpokládá jejich role v leukemogenezi. V souvislosti s APL byl popsán dosud jediný případ tzv. der(17) [71].

Chromozomální analýza prokázala duplikaci 17q21.3-q23, došlo k inzerci genu kódujícího STAT5b do druhého intronu RAR $\alpha$ . Fúzní gen obsahoval STAT5b sekvence pro N-terminální coiled-coil doménu, zodpovědnou za dimerizaci STAT5b, DNA vázající doménu, SH2 doménu a část SH3 domény (viz Obr. 12).

Obr. 12 Schématické znázornění STAT5b genu

Tabulka 5 na závěr kapitoly pojednávající o APL obsahuje srovnání některých charakteristik fúzních partnerů RAR $\alpha$ , mimo STAT5b.

Tabulka 5 Srovnání RAR $\alpha$  fúzních partnerů PML, PLZF, NPM a NuMA [70]

	PML	PLZF	NPM	NuMA
<b>Izoformy</b>	Identifikováno 20 sestřihových variant	1	2 hlavní izoformy, 3. asociovaná s nukleární matrix	3
<b>Nukleární lokalizace</b>	Hlavně v nukleárních tělíscích, dále v cytoplasmě a ostatních jaderných regionech	V jaderných skvrnách, částečně se překrývá s PML	Principiálně v jádru, v nukleoplasmě, zasahuje do cytoplasmy	V interfázi difúzně a ve skvrnách, v mitóze se váže na póly dělicího vřeténka
<b>Asociace s nukleární matrix</b>	Ano	Pravděpodobně – přes jaderná tělíska	1 izoforma asociovaná	Asociovaný v průběhu interfáze
<b>Výskyt</b>	V zánětl. tkáních, v myeloidních prekursorových buňkách, indukován IFNs	CD34+ progenitorové makrofágy,	Ubiquiterní	Ubiquiterní, vyjma terminálně diferencovaných buněk
<b>Buněčný cyklus</b>	↑ na přechodu G0 a G1 fáze a ↓ se s progresí do S fáze	Blokují buňky v G1/S fázi, koreluje se ↓ cyklinu A	Vrcholí na počátku S fáze, ↓ se při přechodu do G2 fáze	Jeho fosforylace v G2/M fázi je esenciální pro M fázi
<b>Transkripce a RNA metabolismus</b>	Transkripční represe a aktivace. RAR signalizace, pp. role v translaci	Transkripční represe	Moduluje transkripční efekty YY1 a IRF-1, biogeneze ribozomů	Kolokalizován a koprecipitován se snRNPs a dělicím komplexem
<b>Apoptóza</b>	Vyřazením zpožďuje apoptózu, je asociován se sentrinem, je cílem pro As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ⇒ apoptóza	Posiluje přežívání buněk faktorem stažení	Během apoptózy je hypofosforylován a degradován	Specifický cíl pro proteolýzu a kaspázy
<b>Funkce</b>	Tumor supresor – suprese růstu, diferenciace a cesty imunitní odpovědi. Pp. role v translaci. Transkripční modulátor.	Růstový supresor, transkripční supresor, kontrola nad vývojem a diferenciací, pp. přes hox geny	Ribonukleoproteinové zraní a transport, přenos proteinů mezi jádrem a cytoplasmou. Transkripční modulátor. Účast při DNA rekombinaci.	Strukturální role v interfázi a v částečně mitotických buňkách. Hlavní cíl pro apoptotický program

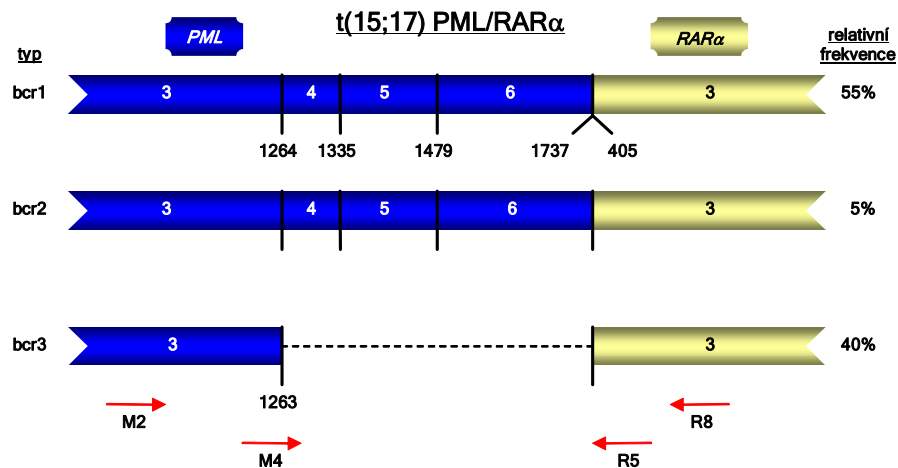
### 1.3.6 Diagnostika a léčba u APL

#### 1.3.6.1 Diagnostika APL a sledování minimální reziduální nemoci

Diagnóza APL se opírá o dva hlavní rozlišovací znaky – hypergranulární morfologii a především průkaz translokace t(15;17), respektive fúzního genu PML/RAR $\alpha$ . Jak již bylo uvedeno, pro detekci této translokace se užívá cytogenetická analýza, molekulárně cytogenetická metoda FISH s příslušnými lokus specifickými sondami, molekulárně-biologická

metoda RT-PCR, případně analýza Southern a Northern blot technikami. V praxi se jednoznačně nejvýhodnější ukázala metoda průkazu pomocí RT-PCR, která umožňuje stanovit výsledek již za 8 hodin po odběru vzorku periferní krve nebo kostní dřeně pacienta. Metoda může být provedena jedno- i dvoukolově (tzv. „seminested“, případně „nested“ reakce) s použitím několika sad primerů (viz Obr. 13).

Při záchytu onemocnění plně dostačuje jednkolová reakce, která umožňuje rozlišit jednu neoplastickou buňku na  $10^4$  normální populace. Dvoukolová metoda má citlivost až  $10^6$  a využívá se především v průkazu minimální reziduální choroby (MRD). Monitorování MRD je velmi důležité pro predikci relapsu onemocnění, protože molekulárně biologické změny předcházejí klinickým projevům. Průkaz znovuobjevení PML/RAR $\alpha$  fúzního proteinu umožňuje zahájit včasnou a účinnou méně razantní terapii. RT-PCR metoda rozezná transkript ve 100% případech a prokáže též heterogenitu zlomu na chromozomu 15, podle použitých primerů rozliší mezi jednotlivými typy bodů zlomu (bcr1,2 nebo 3). Je též spolehlivým ukazatelem úspěšnosti léčby a případně výskytu relapsu onemocnění [73].



Obr. 13 Schématické znázornění fúzního genu PML/RAR $\alpha$  a jeho detekce pomocí RT-PCR

### 1.3.6.2 Retinoidy a léčba APL

Mezi deriváty kyseliny retinové – retinoidy, patří vitamín A, jeho přírodní a syntetické deriváty a jeho metabolity. Retinoidy mají klíčový význam v embryogenezi, buněčné diferenciaci a růstu obratlovců [73]. RA podporuje terminální diferenciaci myeloidních progenitorových buněk, kontroluje hlavní vývojové procesy a brzdí nádorový a buněčný růst [80]. Přes vazbu k RARs ovlivňuje expresi mnoha genů, mezi které patří geny pro regulátory buněčného cyklu (cyklin-dependentní kinázy – Cdk, cykliny a Cdk inhibitory), adhezivní molekuly (CD11b, CD18), faktor stimulační kolonie – CSF, receptory CSF (M-CSFR, G-CSFR), regulátory apoptózy (transglutamináza II, bcl-2), některé strukturální proteiny, enzymy a komponenty chromatinu,

transkripční faktory (RAR, STAT, Hox geny) a další [70]. Jak už bylo zmíněno výše, zatímco dříve byla APL typická rychlým a smrtícím průběhem a nízkým procentem dlouhodobě přežívajících pacientů, v současné době patří k nejlépe léčitelným leukémiím. To je dáno především extrémní citlivostí APL buněk ke kyselině transretinové (ATRA) – diferenciacímu agens schopnému indukovat jejich diferenciaci a maturaci a také normální podstoupení apoptózy (viz Obr. 14). ATRA v terapeutických dávkách je tedy schopna překonat patologii APL a véde k vyléčení a dosažení CR. Jedná se o první případ neoplastické nemoci, která může být léčena specifickou terapií cílenou na defektní protein [73,80,83,84].





### 1.3.6.3 Rezistence u APL

Rezistence APL buněk k ATRA je vyvolána dvěma mechanismy. Primární rezistence v případě translokace t(11q23;17) – PLZF/RAR $\alpha$  byla diskutována výše. Sekundární rezistence může vzniknout u pacientů, u kterých dojde po léčbě k relapsu. In vitro bylo zjištěno, že rezistence k RA u pacientů s APL je většinou asociována s bodovými mutacemi v RAR $\alpha$ /E ligand vazebné doméně. Tyto mutace byly detekovány ve dvou regionech – první je lokalizován ve střední části domény E a jedná se o výměny Arg272 za Gln, Met297 za Leu a Leu290 za Val. Tyto aminokyseliny dohromady tvoří vazebnou kapsu pro RA. Druhý region se nachází na karboxylovém konci E domény a jsou to missense mutace Arg394, Met413, Pro407 a Leu398, což jsou aminokyseliny podílející se na vazbě RA. Dále byla objevena nová mutace u PML/RAR $\alpha$  v kodónu 903. Jde opět o mutaci v doméně E, která vede k delecii 52 C-koncových aminokyselin. PML/RAR $\alpha$  s mutací 903 vykazuje dominantní funkci nad PML, RAR $\alpha$  i nemutovaným PML/RAR $\alpha$ . Je schopen poškodit POD, blokovat RA responzivní geny a pravděpodobně i zprostředkovat zastavení diferenciaci [70,81,85].

### 1.3.6.4 Léčba arsenik trioxidem

Arsenik trioxid vyvolává částečnou diferenciaci a apoptózu u APL buněk. Nedávno bylo publikováno, že arsenik trioxid působí degradaci PML/RAR $\alpha$  přes zvýšenou vazbu proteozomálně cíleného modifikátoru SUMO k PML doménám fúze, což odpovídá i relativní necitlivosti arseniku k PLZF/RAR $\alpha$  buňkám. Nicméně arsenik má mnoho dalších účinků na buňky, včetně indukce apoptózy na základě PML/RAR $\alpha$  nezávislých mechanismů. Citlivost NPM/RAR $\alpha$ , NuMA/RAR $\alpha$  a STAT5b/RAR $\alpha$  k arsenikem indukované degradaci nebyla dosud stanovena [71].

## 1.4 CBF AML

Leukémie nesoucí chromozomální translokace postihující transkripční faktor CBF (Core Binding Factor) jsou projevem deaktivace tohoto heterodimerického transkripčního faktoru, který se podílí na regulaci hematopoezy [86,87]. CBF-asociované chromozomální translokace zahrnují reciproké translokace chromozomů 8 a 21 – t(8;21)(q22;q22) – AML1/ETO (též *RUNX1/CBFA2T1*), inverzi, či translokaci chromozomu 16 – inv(16) (p13q22), či t(16;16)(p13;q22) – CBF $\beta$ /MYH11, které patří do skupiny AML, a translokaci t(12;21)(p13;q22) – AML1/TEL, která patří do skupiny preB-ALL, a dále některé vzácné translokace. Vzhledem k tématu této práce jsou v následujících kapitolách podrobně popsány pouze případy translokací vedoucích ke vzniku AML.

Translokace (8;21)(q22;q22) a inv(16)(p13q22) nebo t(16;16)(p13;q22) patří mezi nejčastější cytogenetické aberace a tvoří 7-8% všech *de novo* AML u dospělých pacientů [11]. Tzv. CBF AML jsou asociovány s relativně dobrou prognózou [16,17,88]. Navzdory dobré prognóze jsou velmi časté relapsy onemocnění u těchto pacientů [89,90].

Pacienti s t(8;21) jsou většinou diagnostikováni jako M2 FAB subtyp a často je u nich detekována též ztráta pohlavního chromozomu (-Y or -X) a/nebo delece dlouhého ramene chromozomu 9 [del(9q)], jako sekundární cytogenetické změny. Pacienti s inv(16) jsou diagnostikováni jako FAB M4Eo subtyp a většinou mají pouze tuto jednu cytogenetickou přestavbu, případně trisomii chromozomů 22, 8 a 21 jako sekundární cytogenetickou změnu [11,12,15,16,90,91].

### 1.4.1 Transkripční faktor CBF

CBF je transkripční faktor, poprvé popsán jako transkripční aktivátor viru Mo-MLV. Také je známý pod názvem PEB2, podle homologie s již dříve popsáným myším transkripčním faktorem PEPB2 $\alpha\beta$  (Polyoma Enhancer Core Binding Protein) [86]. CBF je odpovědný za regulaci exprese více než 20 genů důležitých v diferenciaci hematopoetických buněk (např. geny pro IL-1, GM-CSF, M-CSF receptor, TCR $\beta$  (T-Cell Receptor) a imunoglobulinové geny). CBF je heterodimer složený z podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$  ve stechiometrickém poměru 1:1, přičemž podjednotka  $\alpha$  se přímo váže k DNA. Vazebným místem pro CBF je sekvence TGTGGT, která byla nalezena u řady genů transkribovaných v hematopoetických buňkách. Jsou to např. geny pro tyrozinovou kinázu lck, myeloperoxidázu, IL-3, IL-5, GM-CSF, receptor pro GM-CSF, proteázu granzym B, elastázu, geny pro TCR a dalších faktorů účastnících se normálního vývoje krevních elementů [93-95].

#### 1.4.1.1 Protein CBF $\alpha$

Protein CBF $\alpha$  je lokalizován v jádře a existují tři jeho formy, kódované třemi různými geny: CBFA1 (AML3), ležícím na chromozomu 6, CBFA2 (AML1) na chromozomu 21 a CBFA3 (AML2), lokalizovaném na chromozomu 1 [95]. Dohromady tvoří rodinu transkripčních faktorů vystupujících v mnoha procesech počínaje segmentací hmyzu až po hematopoezu u lidí. Do této rodiny patří i gen *Drosophila melanogaster runt*, s nímž všechny geny CBF $\alpha$  vykazují vysokou sekvenční homologii. Runt je gen párového pravidla, regulující expresi dalších segmentačních genů, jako jsou even-skipped, fushi tarazu a hairy [96]. AML1 (CBFA2) je kódován genem AML1 nacházejícím se na chromozomu 21 v pruhu q22. AML1 cDNA kóduje otevřený čtecí rámec 250 aminokyselin (transkripce od telomery k centroměře).

V N-koncové oblasti vykazuje homologii s genem runt. Tento region se označuje RHD (Runt Homology Domain) a zprostředkuje vazbu k DNA a dimerizaci s podjednotkou  $\beta$ , v C-terminální části se nachází transkripčně aktivační doména. U AML1 byly definovány další velikostní varianty lišící se v oblasti blízké RHD doméně, které jsou pravděpodobně výsledkem alternativního sestřihu [95]. AML1 je detekovatelný v různých tkáních i v hematopoetických buňkách. Jak již bylo uvedeno, tvoří součást heterodimerního transkripčního faktoru CBF. Opakované pokusy na myších embryích s cílenou mutací v genu AML1 ukázaly vliv tohoto genu na hematopoetické buňky.

Heterozygotní embrya měla normální fenotyp, zatímco homozygotně recesivní jedinci zemřeli do dvou týdnů v důsledku neprobíhající jaterní hematopoézy, z čehož vyplývá, že gen AML1 a jeho cílové geny jsou esenciální pro normální embryonální vývoj a hematopoézu [94]. Poškození genu AML1 spojené s translokacemi v oblasti chromozomu 21 vede ke vzniku některého z typů akutní myeloidní, nebo lymfoidní leukémie. Nejčastěji vznikající translokací je  $t(8;21)(q22;q22)$ , která vede ke vzniku fúzního genu AML1/ETO. Dále jsou to  $t(12;21)(p13;q22)$  s fúzním genem TEL/AML1,  $t(3;21)$  postihující EVI1, EAP a MDS1 na chromozomu 3 a vzácné translokace  $t(1;21)(p36;q22)$ ,  $t(5;21)(q13;q22)$ , nebo  $t(17;21)(q11;q22)$  [95,96].

#### 1.4.1.2 Protein CBF $\beta$

CBF $\beta$  (PEBP2 $\beta$ ) představuje druhou podjednotku transkripčního faktoru CBF. Je kódován genem CBF $\beta$ , ležícím na chromozomu 16 a bylo prokázáno, že zvyšuje vazebnou afinitu CBF $\alpha$  k DNA. Modely CBF $\beta$ -knockout myši vedly k embryonální letalitě a defektní hematopoéze, což potvrzuje, že CBF $\beta$  podjednotka je esenciální pro *in vivo* funkci CBF $\alpha$ . CBF $\beta$  neobsahuje žádné známé strukturní motivy, pouze vykazuje určitou homologii s proteiny *Drosophila melanogaster*, nazvanými brother (Bro) a big-brother (Bgb). *In vitro* pokusy ukázaly, že protein CBF $\beta$  je schopen samostatné vazby k DNA pouze prostřednictvím podjednotky  $\alpha$ . Jeho hlavní funkcí je tedy zvýšení vazebné afinity transkripčního faktoru CBF k DNA. Poškození genu CBF $\beta$  translokací, nebo inverzí chromozomu 16, stejně jako u AML1, vyvolá AML [93].

#### 1.4.2 Protein ETO

Protein ETO je kódován genem ETO, též nazývaným CDR, nebo MTG8, ležícím na chromozomu 8. Jeho exprese byla detekována ve vysokých hladinách v mozku a nízkých hladinách v plicích, varlatech a vaječnicích. Gen nebyl naopak vůbec detekován ve slezině, thymu a hematopoetických buňkách.

ETO je transkripční faktor, v jehož struktuře jsou obsaženy dva zinkové prsty, jeden typu Cys-Cys/Cys-Cys, jako v receptorech pro glukokortikoidy, a druhý typu Cys-Cys/His-Cys, jako u retrovirových DNA-vazebných proteinů. Dále obsahuje v C-koncové oblasti region PEST, který zajišťuje rychlou intracelulární degradaci a tři oblasti bohaté na prolin, typické pro transkripčně aktivační domény [96].

### 1.4.3 Fúzní protein AML1/ETO

Translokace t(8;21)(q22;q22) vzniká fúzí genu AML1 (CBF $\alpha$ ) na chromozomu 21 s genem ETO (Eight Twenty One) na chromozomu 8 a patří mezi časté chromozomální aberace u AML a je přítomna zhruba u 6-8% případů AML. Je asociována především s FAB M2 morfologickým typem leukémie, ale byla popsána též u FAB M1 a M4 subtypů AML a vzácně též u myelodysplastického a myeloproliferačního syndromu [94].

Zlom genu AML1 na chromozomu 21 je lokalizován v intronu mezi RHD a transaktivační doménou. Je transkribován od telomery k centromere a celý fúzní gen je pod kontrolou jeho promotoru. Gen ETO je na chromozomu 8 přerušen hned na začátku, takže ve fúzním produktu AML1/ETO je zachován skoro celý a tvoří jeho 3' koncovou část. V chimerním proteinu jsou pak obsaženy N-koncová doména a RHD doména proteinu AML1 a 575 C-koncových aminokyselin proteinu ETO (z celkového počtu 604 aminokyselin). Jelikož tento produkt postrádá regiony proteinu AML1, důležité pro transaktivaci, má zachované pouze schopnosti vazby k DNA a dimerizaci s podjednotkou CBF $\beta$ , nikoli však možnost aktivovat cílové geny. Reciproký translační produkt nebyl zatím zaznamenán [93,96].

Protein AML1/ETO nemůže tedy aktivovat promotory, které má za fyziologických podmínek pod kontrolou, avšak má schopnost dimerizovat, což mu umožňuje inhibovat diferenciaci myeloidních buněk. Protein AML1/ETO pravděpodobně působí též jako kompetitor normálního proteinu AML1 na jeho vazebných místech na DNA, protože k nim má zřejmě vyšší afinitu [96]. Další výsledky na knock-in myších ukázaly, že jde o dominantně negativní inhibici normálních funkcí proteinu AML1. Tyto heterozygotní myši měly jednu alelu s AML1/ETO a druhou s normálním genem AML1 a vykazovaly stejný fenotyp, jako homozygotně recesivní jedinci, čímž se prokázala schopnost AML1/ETO proteinu dominantně narušit funkci AML1 alely při řízení vývoje krevních buněk. Bylo také zjištěno, že protein AML1/ETO má schopnost vázat se k protoonkogenu Bcl-2 a aktivovat jeho transkripci, zatímco normální proteiny AML1 a ETO tuto schopnost nemají. Tento fúzní protein tedy může prodloužit životnost leukemických buněk, které pak mají lepší možnost pro transformaci [93].

#### 1.4.4 Protein MYH11

Protein MYH11 je kódován genem MYH11 (Myosin Heavy Chain 11) na ramenu p chromozomu 16, který kóduje koncový (ocasní) region proteinu SMMHC (Smooth Muscle Myosin Heavy Chain). Protein MYH11 tvoří koncovou (ocasní) doménu myozinového těžkého řetězce hladkého svalu. Tato doména má dimerizační schopnosti, opakují se v ní  $\alpha$ -helikální motivy, jejichž funkcí je vytvářet s dalšími molekulami nadšroubovicové struktury. Protein tak multimerizuje do silných myozinových filament [97].

#### 1.4.5 Fúzní protein CBF $\beta$ /MYH11

Translokace t(16;16)(p13;q22), nebo inverze inv(16)(p13q22) je nejčastěji asociována s FAB M4 subtypu AML s eozinofilií, ale byla též popsána u FAB M1 (bez eozinofilie) a patří mezi časté chromozomální aberace u pacientů s AML. Obě tyto aberace vedou k fúzi genu CBF $\beta$  na ramenu q, kódujícím  $\beta$  podjednotku transkripčního faktoru CBF, a genu MYH11. Fúzní gen je pak exprimován jako aberantní protein CBF $\beta$ /MYH11 [93]. Tento fúzní protein má v současné době deset známých izoforem podle různých typů bodu zlomu, nazvaných v nomenklatuře BIOMED1-Standard studie A-J [98]. Bylo prokázáno, že tento onkogenní protein dramaticky redukuje vazbu normálního CBF na DNA a tím inhibuje přechod do S-fáze buněčného cyklu.

Gen CBF $\beta$  je ve většině případů porušen na konci pátého, zřídka na konci čtvrtého exonu, zatímco zlomy genu MYH11 se nachází v sedmi různých intronech. Ve všech typech produktů je zachována dimerizační doména [93,94]. U majoritního chimerního proteinu, který obsahuje aminokyseliny 1-165 z proteinu CBF $\beta$  a C-koncovou  $\alpha$ -helikální doménu MYH11, je zachována schopnost interagovat s proteinem AML1, zatímco kratší verze, obsahující pouze 133 aminokyselin proteinu CBF $\beta$ , váží AML1 s mnohem menší afinitou. Teoreticky může vznikat i reciproký produkt 5'-MYH11/CBF $\beta$ -3', ale ve většině případů by obsahoval pouze 17 aminokyselin proteinu CBF $\beta$  a je nepravděpodobné, že by mohl mít vliv na transformaci. Navíc u řady případů této translokace vůbec nebyl detekován a v případě inverze inv(16) je tato 5' koncová část obvykle deletována [86]. Pokusy na knock-in myších ukázaly, že heterozygotní embrya s chimerní alelou měla stejný fenotyp, jako jedinci s CBF $\beta$ (-/-), nebo s AML1(-/-), a že tedy aberantní protein CBF $\beta$ /MYH11 působí jako dominantně negativní inhibitor funkcí transkripčního faktoru CBF. Příčinou může být vazba podjednotky CBF $\alpha$  tímto fúzním proteinem a vytváření nefunkčních komplexů, nebo neschopnost složení podjednotek do funkčního CBF na cílových sekvencích DNA, či neschopnost CBF vytvářet komplexy s dalšími proteiny nezbytnými pro zahájení transkripce [93,99].

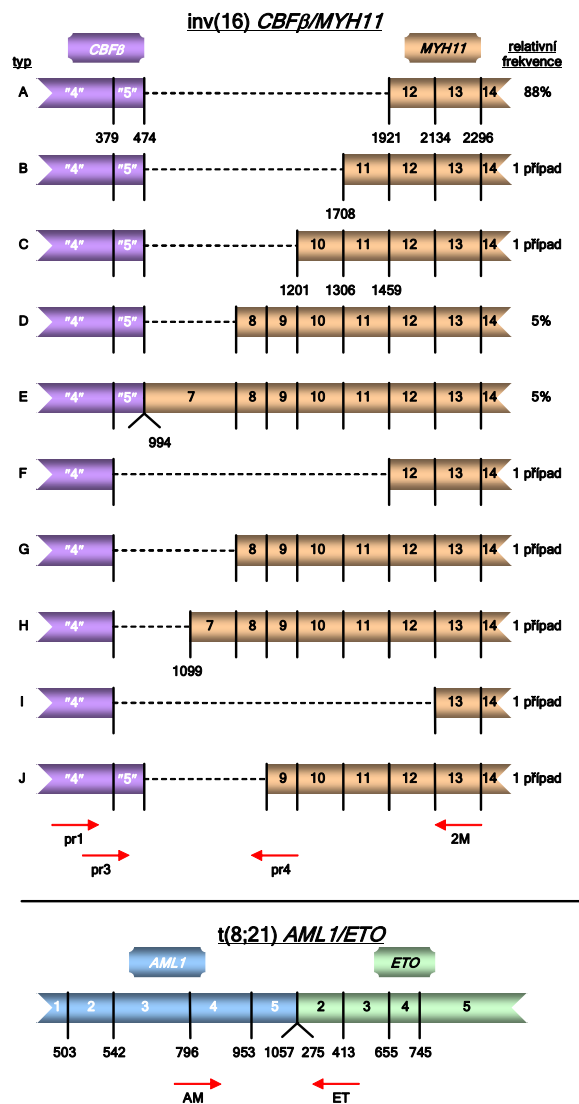
Dále byl zjištěn vliv CBF $\beta$ /MYH11 na expresi p53, proteinu, jehož hladina se zvýší při poškození DNA, což dále vede k zastavení buněčného cyklu, případně k řízené buněčné smrti – apoptóze. Buněčná linie Ba/F3, exprimující CBF $\beta$ /MYH11 a vystavená vlivu ionizujícího záření, vykazovala čtyřnásobné snížení exprese p53 a tím i zpomalenou apoptózu. To však neplatí pro typ CBF $\beta$ /MYH11, který neváže AML1, což vede k závěru, že CBF $\beta$ /MYH11 snižuje expresi genů regulovaných faktorem CBF, majících vliv na hladinu p53. Normální protein CBF expresi p53 nereguluje, protože nemá vazebná místa v jeho promotoru [100].

Na chromozomu 16 jsou též lokalizovány dva geny úzce spjaté se vznikem mnohočetné lékové rezistence, a to geny pro MRP (Multidrug Resistance Associated Protein) a LRP (Lung Resistance Protein). Bylo prokázáno, že při vzniku určitých forem CBF $\beta$ /MYH11 transkriptu, kdy ke zlomu dochází právě v MRP genu, se MRP nemůže řádně exprimovat. V této souvislosti byl prokázán snížený výskyt MDR u těchto pacientů a s tím pravděpodobně související lepší výsledky léčby a CR [101,102].

#### **1.4.6 Diagnostika a léčba u leukémií s translokacemi zahrnujícími transkripční faktor CBF**

V diagnostice leukémií nesoucích fúzní geny CBF $\beta$ /MYH11 a AML1/ETO se kromě klinických a klasických laboratorních markerů výrazně uplatňuje RT-PCR detekce mRNA těchto fúzních genů. Klasická cytogenetická analýza v těchto případech poněkud selhává vzhledem k častým kryptickým translokacím, které nejsou touto metodou odhalitelné [12,101]. K detekci se proto využívá metoda FISH s příslušnými lokus specifickými sondami. Co se týká detekce CBF $\beta$ /MYH11 transkripce v průběhu sledování MRD v remisi, závěry jsou poněkud rozporuplné vzhledem k faktu, že u některých pacientů bez klinických příznaků transkript přetrvává a je nutný kvantitativní přístup. Jak je ale podrobně diskutováno v kapitole 4. Výsledky, v naší laboratoři bylo všech 11 pacientů pozitivních při záchytu onemocnění v remisi trvale negativních. Od roku 1982, kdy byl Bloomfieldovou a Arthurem publikován první případ AML s inv(16)(p13q22), bylo popsáno více než 10 různých izoform této aberace. V CBF $\beta$  genu mohou nastat pouze 2 typy bodů zlomu: v nt 474 a nt 378 (GeneBank Accession Number L20298). Tudíž heterogenita transkriptů je způsobena především zlomy v různých intronech genu MYH11. BIOMED-1 standardy [98] aktualizovaly nomenklaturu CBF $\beta$ /MYH11 fúzních transkriptů a pojmenovaly je A až J. Typ A je detekován nejčastěji (více jak 85% případů) - CBF $\beta$  gene fúzuje v nt 474 s MYH11 genem v nt 1921 (GeneBank Accession Number D10667). Fúzní transkripty D and E představují kolem 5%, typ J byl popsán ve dvou případech, všechny ostatní typy (B, C, F, G, H, I, J) jsou známy jako unikátní případy.

Vzhledem k více izoformám a taktéž díky alternativnímu sestřihu bývá někdy problematická interpretace výsledků RT-PCR diagnostiky. V tomto případě je nutno vzorky podrobit sekvenční analýze. Obr. 15 schématicky znázorňuje jednotlivé body zlomu vznikající u fúzního proteinu CBF $\beta$ /MYH11 včetně frekvence jejich výskytu a nasedání primerů, užívaných k jejich detekci, a dále fúzní gen AML1/ETO a nasedání primerů používaných při jeho detekci pomocí RT-PCR. Co se týká léčby těchto typů leukémií, v poslední době se vzhledem k zařazení těchto AML do skupiny prognosticky příznivých, modifikovala léčba ve smyslu razantnější vysokodávkované terapie, která vede k vyššímu procentu CR. Nedávno bylo prokázáno, že zvýšený počet relapsů u t(16;16) / inv(16) a t(8;21) souvisí s mutací extracelulární domény tyrosin-kinázového receptoru c-KIT, která je exkluzivně detekována pouze u těchto dvou aberací [103]. Tyto relapsy nicméně dobře reagují na terapii cytostatiky.



Obr. 15 Schématické znázornění fúzního genu CBF $\beta$ /MYH11

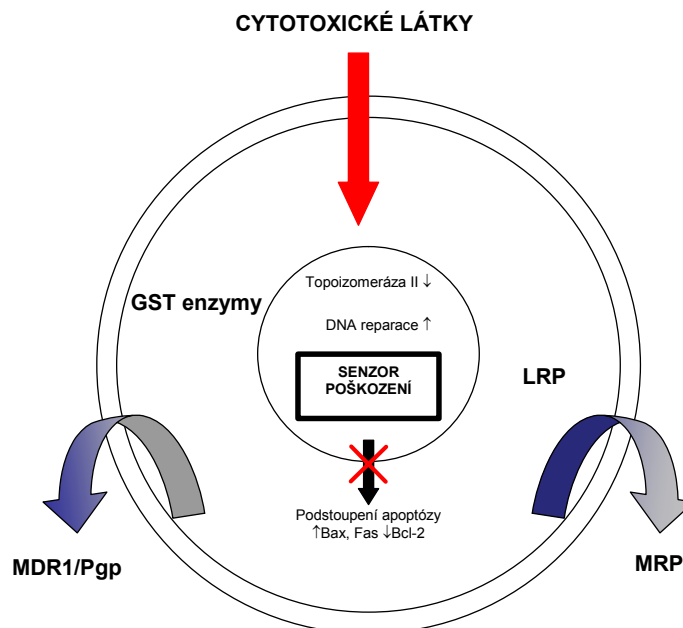
Nahoře: Schématické znázornění fúzního genu CBF $\beta$ /MYH11 a 10 známých typů bodu zlomu A-J  
Dole: schématické znázornění fúzního genu AML1/ETO. Červené šipky ve spodních částech obrázků naznačují pozice primerů používaných při PCR detekci mRNA u těchto translokací [98]

## 1.5 Mnohočetná léková rezistence

Mnohočetná rezistence nádorové tkáně k různým chemoterapeutickým agens patří mezi hlavní problémy při léčbě maligních onemocnění [21,23,104]. MDR je výsledkem nízké hladiny léčiv v buňce, způsobené jejich zvýšeným vylučováním. Hematologické malignity většinou dobře reagují na iniciační terapii, ale velmi často u nich dochází k relapsu onemocnění [102]. Fenotyp mnohočetné lékové rezistence je tedy častěji pozorován po selhání chemoterapie (u rezistentních případů a u relapsů). Jsou známy různé mechanismy, které jsou schopny chránit rakovinné buňky před různými chemoterapeutiky [21]. Jedná se např. o snížení funkční aktivity topoizomerázy II, způsobené buď somatickými mutacemi, či její sníženou expresí, nebo zvýšenou inaktivací léků vlivem glutathion-S-transferázové aktivity (GST), změnami v drahách apoptózy, které ovlivňují buněčnou smrt, případně zvýšeným efluxem cytotoxických složek ven z buňky, daným zvýšenou expresí transportních proteinů typu Pgp (produkt MDR1 genu), multidrug resistance associated proteinu (MRP), či lung resistance proteinu (LRP) [21,103]. V následujících kapitolách je podrobně popsána především MDR1/Pgp vyvolaná rezistence a pouze stručně jsou zmíněny ostatní mechanismy.

### 1.5.1 Mechanismy ovlivňující MDR

Mnohočetná léková rezistence může vzniknout změnami v kterémkoliv kroku, který buňka podstupuje na cestě k apoptóze. Ke změnám může dojít na úrovni transportu léčiv, jejich metabolismu, změně cíle léčiv, při DNA reparaci a u mechanismů rozpoznávajících poškození a vedoucích k apoptóze (viz Obr. 16).



Obr. 16 Mechanismy vzniku mnohočetné lékové rezistence [21]



Pgp a MRP aktivně odčerpávají cytotoxické látky z buňky. GST enzymy detoxifikují buňku v cytoplasmě a LRP pravděpodobně hraje roli v redistribuci léčiv z jádra buňky. Změny topoizomerázy II zvyšují DNA reparaci, snižují možnost podstoupení apoptózy a mohou též přispívat k fenotypu lékové rezistence.

### 1.5.1.1 Vznik MDR na úrovni transportu léčiv

Mechanismus vzniku mnohočetné lékové rezistence na podkladě hyperexprese MDR1/Pgp bude podrobně popsán dále. MRP (Multidrug Resistance Associated Protein) je, podobně jako Pgp, členem rodiny ABC membránových transportérů, využívajících k přenosu ligandu energii ATP, a jeho gen je lokalizován na chromozomu 16. MRP způsobuje vylučování léčiv přes membránu buňky proti koncentračnímu gradientu. Hyperexprese MRP mRNA, případně 190kDa glykoproteinu, vede k rezistenci k antracyklinům a často bývá přítomna společně s hyperexpresí Pgp, avšak lze najít určité rozdíly ve spektru vylučovaných léčiv. MDR způsobená Pgp je ovlivnitelná verapamilem a cyklosporinem, avšak MRP způsobená rezistence nikoliv. MRP byl detekován u řady hematologických malignit, včetně AML a chronických leukémií, ale také např. u malobuněčného plicního karcinomu [21]. Někteří pacienti s inverzí 16 chromozomu mají delecii v genu MRP a mají velmi dobré léčebné výsledky, patrně v souvislosti s dobrou odpovědí na léčbu cytostatiky [101]. Nedávno byl u jedné linie s mnohočetnou lékovou rezistencí detekován protein ARA, jehož zvýšená exprese je asociována s rezistencí k antracyklinům. Patří do rodiny ABC transportérů, má velikost 49,5 kDa, obsahuje jedno potenciální glykosylační místo a jedno ATP vazebné místo. Svou strukturou se velmi podobá C-koncové polovině proteinu MRP.

Dalším transportním proteinem, který byl objeven u buněčné linie rezistentní k daunorubicinu je LRP (Lung Resistance Protein). LRP funguje na principu energeticky závislé redukce akumulace léčiv v buňce a způsobuje zkříženou rezistenci k vinkristinu, gramicidinu D a etoposidu. LRP gen byl lokalizován na chromozomu 16p11.2, poblíž genu MRP (16p13.1), nicméně v buněčných lékově rezistentních liniích jsou tyto dva geny pouze zřídka koexprimovány. Byla zjištěna homologie mezi LRP a tzv. „Major Vault“ proteiny, což jsou cytoplazmatické ribonukleoproteinové částice, které pravděpodobně ovlivňují obousměrný transport různých substrátů mezi jádrem a cytoplasmou. Exprese LRP byla pozorována v blastech AML pacientů a byla prokázána signifikantní asociace mezi horší odpovědí na indukční terapii a trváním OS u pacientů s jeho hyperexpresí [21]. Flippits et al v roce 2000 uveřejnil práci, podle níž je LRP jediný nezávislý prognostický faktor u MDR [29].

### 1.5.1.2 MDR vzniklá změnami v metabolismu léčiv

GSTs (Glutathion-S-transferázy) patří do rodiny enzymů účastnících se detoxifikačních procesů v buňce. Cytosolické GST izoenzymy konjugují elektrofilní léčiva, toxiny a karcinogeny za redukce glutathionu (GSH) před jejich eliminací z buňky GSH S-konjugačním exportním nosičem (GS-X pumpa). GSTs byly klasifikovány jako  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$  a  $\tau$ . Zvýšené hladiny GSP $\pi$  byly v některých pracích asociovány s horšími klinickými výsledky u pacientů s AML i jinými malignitami a byly detekovány u buněčných linií rezistenčních k alkylačním činidlům [21].

### 1.5.1.3 MDR a DNA topoizomeráza

Topoizomerázy I, II $\alpha$  a II $\beta$  patří do rodiny faktorů ovlivňujících replikaci DNA a změny její konformace. Tyto enzymy přerušují DNA vlákno a mění tím uspořádání šroubovice DNA. Topoizomeráza I může být specificky inhibována pouze kamptotecinem a jeho analogy, avšak komplex topoizomerázy II s přerušenu DNA je cílem pro řadu cytostatik, jako např. fylotoxiny, nebo antracykliny. Kvantitativní i kvalitativní změny těchto enzymů mohou dramaticky změnit účinnost těchto léčiv. Pozorování in vitro ukázala jejich nízkou expresi (zvláště pak izofomy II $\alpha$ ) v souvislosti s rezistencí k cytostatikům [105]. Topoizomeráza se též uplatňuje při reparacích DNA a je součástí mechanismů rozpoznávajících poškození, její změny proto mohou negativně ovlivnit tyto reparační mechanismy a následně tak vést ke vzniku mnohočetné lékové rezistence [21,31].

### 1.5.1.4 Buněčná smrt a MDR

Při léčbě hematologických malignit jsou používány různé látky, které vyvolávají apoptózu, jako např. inhibitory dihydrofolát-reduktázy, cytosin arabinosid, fludarabin, vinblastin a vinkristin, alkylační látky a cisplatina. Procesu apoptózy se účastní řada genů, pozitivně či negativně ovlivňujících její průběh. Mezi pozitivní regulátory apoptózy patří např. geny c-MYC, p53, BAX, BCL-Xs, ICE a Fas/APO1, zatímco BCR-ABL, BCL-2 a BCL-Xi ji ovlivňují negativně. Modifikace těchto genů prokázala vliv na chemosenzitivitu buněk k cytostatickým agens. Vysoké hladiny produktů těchto genů mají též nepříznivý vliv na výsledky léčby pacientů s AML [21,31,105].

## 1.5.2 Mnohočetná léková rezistence způsobená hyperexpresí

### MDR1/Pgp

Jak již bylo zmíněno, Pgp, produkt MDR1 genu, patří mezi nejčastěji zkoumané příčiny vzniku mnohočetné lékové rezistence lidských nádorových buněk včetně hematologických malignit. Ve své práci jsem zabývala právě vztahem MDR1/Pgp hyperexprese k prognóze pacientů s AML, proto je větší pozornost věnována právě tomuto genu, způsobujícímu MDR.

#### 1.5.2.1 MDR1 gen a jeho produkt P-glykoprotein

Gen kódující Pgp, patří do rodiny multidrug resistance genů (MDR) [21]. Existují 2 lidské MDR geny (u hlodavců byly identifikovány 3 rodiny těchto genů – MDR1, 2 a 3), rozdělené na základě funkční a sekvenční homologie [23]. Oba tyto geny se nachází na chromozomu 7 a pouze gen MDR1 ovlivňuje lékovou rezistenci, gen MDR2 (dříve MDR3) kóduje fosfatidylcholin flipázu. Savčí MDR proteiny jsou homologní s dalšími prokaryotickými i eukaryotickými transportéry, mezi které patří např. bakteriální permeázy, hemolysinový transportér, kvasinkový ste6, MDR homology Drozofily, transportní proteiny u MHC (Major Histocompatibility Complex), proteiny cystické fibrózy aj. [106]. Pgp je exprimován především ve specializovaných epiteliálních buňkách se sekreční nebo exkretční funkcí, jako jsou žlučové kanálky, proximální tubuly ledvin, epitel pankreatu, jejunu a žlázový epitel dělohy.

Ve vysokých hladinách se dále nachází v placentě, mozku, varlatech a také v lymfocytech, nejvíce u CD56+ (NK buňky), CD8+ (T<sub>C</sub> buňky), CD20+ (B buňky) a CD34+ prekurzorových kmenových buňkách. Změny jeho exprese byly sledovány u řady typů krevních malignit (AML, ALL a NHL) i solidních nádorů (např. karcinomy tlustého střeva, jater, ledvin, pankreatu) [105]. Pgp patří do skupiny ATP-binding cassette (ABC) transportních proteinů, které pro přenos ligandu využívají energie ATP [21]. Jedná se o transmembránový glykoprotein o molekulové hmotnosti 170 kDa, složený ze dvou strukturně homologních částí. První polovina polypeptidu je složena ze šesti transmembránových domén následovaných velkou cytoplazmatickou doménou, která obsahuje vazebné místo pro ATP. Tato nukleotid vázící doména je složena ze dvou motivů, které lze nalézt u široké skupiny ATPáz – jedná se o vysoce konzervované motivy „Walker A“ a „Walker B“. Spojovací sekce těchto motivů, tvořená přibližně 100 aminokyselinami, je shodná se sekvencemi přítomnými v různých protienkinázách. Dále obsahuje četná fosforylační místa, která pravděpodobně ale nemají vliv na účinnost transportu, jak prokázaly studie mutací těchto fosforylačních míst. Ve vnější, extracelulární části se nachází glykosylační místa, které protein stabilizují v membráně [105].

Pgp se podílí na transportu širokého spektra strukturně odlišných substrátů. Jejich společnou charakteristikou je pouze to, že se jedná o hydrofobní amfipatické molekuly, které jsou schopny interkalovat se do membrány a vstoupit do cytosolu pasivní difúzí. Mezi tyto sloučeniny patří např. antracykliny (doxorubicin, daunomycin), alkaloidy (vinkristin, vinblastin), aktinomycin D, valinomycin, gramicidin D a další, které většinou nemají k jiným membránovým proteinům žádnou afinitu (verapamil, puromycin, cyklosporin A) [30,35]. Tyto hydrofobní molekuly, které jsou substrátem pro Pgp, se nedostávají do cytoplasmy, ale jsou přímo vylučovány membránou do vnějšího prostředí. Přesný mechanismus, jakým protein přenáší léčiva, není zatím objasněn. Pgp může mít v membráně funkci flipázy [107], může také aktivně (za využití energie ATP) translokovat léčiva z vnitřní lipidové vrstvy plazmatické membrány k vnější a tu jsou léčiva schopna již opustit prostou difúzí. Jeho funkcí je tedy udržovat nízkou intracelulární hladinu cytotoxických látek. Vzhledem k jeho expresi v epiteliálních buňkách je možné, že hraje roli v sekreci metabolitů do exkretčních drah žluči, moči a trávicího traktu. Prokázala se též jeho funkce jako napětově řízeného chloridového kanálu [105,106].

#### 1.5.2.2 Metody modifikace funkce Pgp

Existuje řada necytotoxických látek, které jsou schopné modifikovat vylučování léčiv přes Pgp. Jsou to např. verapamil, cyklosporin A, reserpin, FK506, rapamycin, tamoxifen a další. Tyto sloučeniny fungují jako kompetitory, jsou schopny přímé vazby na Pgp, čímž jej zablokují pro vazbu dalších cytotoxických látek. Od objevení MDR byly činěny pokusy ovlivnit expresi nebo funkci Pgp, ať už užitím inhibitorů proteinkinázy C (např. staurosporin, který snižuje expresi MDR1 genu), nebo MDR1 antisense oligonukleotidů [105]. Zcela jiným přístupem, zkušebním i klinicky, je užití modulátorů Pgp, založené na inhibici jeho interakce s léčivem. Mnoho necytotoxických látek totiž může obnovit akumulaci cytostatik v buňce tím, že s nimi kompetuje o Pgp-vazebná místa. Jsou to např. blokátory kalciových kanálů, inhibitory kalmodulinu, chinoliny, indolové alkaloidy, detergenty, steroidy atd. Mnohé z nich mají podobné strukturní vlastnosti, např. planární aromatickou doménu, dvě aminoskupiny a vysokou lipofilitu. V současnosti se nejvíce používají modulátory cyklosporin A a PSC833 (analog cyklosporinu D). Tyto látky mohou být v dostatečném a zároveň netoxickém množství kombinovány s cytostatiky. Ale ani tento způsob není bez rizika, neboť může zvýšit toxicitu cytostatik. Některé buňky produkující Pgp přirozeně, např. CD34+ progenitorové kmenové buňky, mohou být společným účinkem cytostatik s modulátory poškozeny. Navíc blokováním Pgp modulátory narušují kinetiku cytostatik v ledvinových tubulech a žlučových kanálcích, čímž nedochází k jejich vylučování [105,108].

Stále však probíhají pokusy vyladit dávku cytostatika v kombinaci se správným množstvím některého z modulátorů, jako např. verapamil s VAD (vinkristin / doxorubicin / dexametazon) [109], biperdil a vimblastin, cyklosporin a etoposid, použití chininu [105], různé kombinace s PSC833 [110,111] atd.

### 1.5.2.3 Diagnostika exprese MDR1/Pgp

Pro zjištění exprese MDR1/Pgp jsou k dispozici různé techniky. Existují metody funkční, které se zaměřují na zjišťování Pgp modulovaného efluxu cizorodých látek z buňky, dále metody zjišťující expresi Pgp na povrchu buněk a metody zaměřující se na detekci exprese genu MDR1. Všechny jmenované přístupy vyžadují alespoň semikvantitativní přístup, neboť MDR je závislá na výši exprese MDR1/Pgp. Problémem je také výskyt přirozené exprese MDR1/Pgp, kdy je nutno buď rozlišit mezi jednotlivými subpopulacemi buněk s určitou morfologií (např. podle CD znaků), nebo stanovit tzv. „cut off level“, který určí přirozenou míru exprese MDR1/Pgp [20]. Funkční metody detekce jsou založeny na monitorování vylučování cytostatik přes buněčnou membránu. Tyto metody vyžadují pěstování zkoumané buněčné populace ve tkáňové kultuře a využívají měření koncentrace fluorescenčně značeného radioaktivního markeru (např. rhodamin 123) navázaného na cytostatikum vně buňky. Tímto způsobem se nejčastěji hodnotí vliv modulátorů na činnost Pgp [21,105]. Metody detekce exprese Pgp na povrchu buněk jsou založeny na imunocytochemických postupech, nejčastěji metodou nepřímé imunofluorescence se značenou monoklonální protilátkou (např. UIC2, MRK16 apod.) [103].

Existují protilátky, které vyžadují hodnocení na fixovaném cytospinovém preparátu (např. JSB1), v porovnání s hodnocením na průtokovém cytometru jsou dnes již obsolentní. Též jednotlivé monoklonální protilátky se vzájemně liší – především v citlivosti a místě vazby na Pgp (některé vyžadují např. částečnou permeabilizaci membrány). Metody detekce exprese genu MDR1 pomocí (semi)kvantitativní RT-PCR, případně real-time PCR se ukazují jako nejpřesnější [20]. Způsoby detekce MDR1/Pgp se v literatuře značně liší a taktéž výsledky jsou rozporuplné [25,30,33-112]. To vyplývá z již výše zmíněných problémů jak s detekcí tak s interpretací výsledků. Metody je nutno standardizovat, stanovit „cut off level“ a měřit expresi alespoň semikvantitativně. Dle doporučení J.P. Marrieho et al. [20] je vhodné vždy kombinovat alespoň dvě metody způsobu detekce MDR1/Pgp.

### 1.5.2.4 Hyperexprese MDR1/Pgp jako prognostický faktor u AML

Jak je uvedeno v úvodu této kapitoly, MDR fenotyp bývá častěji pozorován u pacientů v relapsu onemocnění, tedy po podání cytostatik. Avšak u AML je často již při prvotní diagnóze onemocnění zjištěna zvýšená exprese MDR1 genu, zodpovědného za vznik MDR.

Pravděpodobnou příčinou jeho zvýšené exprese je přítomnost Pgp – produktu genu MDR1, již na ranných hematopoetických progenitorech (CD34+) – jeho úkolem je asi chránit skupinu kmenových buněk před poškozením xenobioty [21]. Exprese MDR1 genu klesá u většiny diferencovaných krevních buněk, přetrvává pouze u normálních T-buněk (zvláště CD8+), NK buněk a o něco méně je přítomna u B buněk [23]. Na základě těchto znalostí můžeme tedy říci, že MDR fenotyp vzniklý vlivem zvýšené exprese MDR1 genu může být buď „závislý na nemoci“ (typicky u AML a u T-buněčného lymfomu dospělých), nebo „závislý na terapii“ (ALL, non-Hodgkinské lymfomy a mnohočetný myelom).

Mnohé studie kvantifikující MDR1/Pgp jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinové, ukazují korelaci mezi jeho zvýšenou expresí a horší reakcí na indukční terapii, sníženou pravděpodobností dosažení CR [24,105]. V dalších studiích bylo zjištěno, že exprese MDR1 při diagnóze má negativní vliv nejen na rychlost dosažení CR, ale i na její trvání, na vyšší procento relapsů a na délku přežívání [106,112]. V jiných studiích se ale vliv na celkové přežívání neprokázal [23,25]. Dále bylo pozorováno, že starší pacienti s AML více exprimují MDR1/Pgp, což je spojeno se zvýšeným vylučováním léčiv z buněk. Exprese MDR1 u nich výrazně snižuje pravděpodobnost dosažení CR a snižuje i délku přežívání [114,115]. Věk podle jiné studie ale není prognosticky nezávislým faktorem [106]. Jsou známy též studie prokazující korelaci mezi expresí MDR1/Pgp a antigenem CD34 [108,116].

Bylo prokázáno, že MDR1 exprese je variabilně závislá na FAB subtypu AML. Pacienti s prognosticky příznivými aberacemi (PPA), jako jsou PML/RAR $\alpha$ , AML1/ETO nebo CBF $\beta$ /MYH11, mají relativně nižší expresi MDR1/Pgp v porovnání s ostatními skupinami AML [23]. Nicméně pouze v případě promyelocytární leukémie se kromě nízkých hladin exprese Pgp prokázala také nízká aktivita tohoto proteinu. Tento fakt může být biologickým základem pro vysokou senzitivitu promyelocytů k antracyklinům [27]. AML s rearanžmentem podjednotek  $\alpha$  nebo  $\beta$  core binding factoru (CBF) (AML s AML1/ETO nebo CBF $\beta$ /MYH11 fúzními geny) má příznivou prognózu, nicméně se u ní častěji vyskytují relapsy onemocnění [89,90]. Mechanismus vzniku těchto relapsů souvisí s mutací tyrosin-kinázového receptoru c-KIT, jak bylo popsáno výše. Suvannasankha et al. [117], prokázal, že Pgp/MDR1 hyperexprese a hyperfunkce je často pozorována u obou subtypů tzv. CBF-AML, a že selhání terapie u CBF  $\alpha$ -AML je asociováno s CD56 expresí, ale nelze ho přičítat Pgp/MDR1 koexpresi.

Obecně lze říci, že u pacientů s nízkými hladinami MDR1 exprese při diagnóze je jednodušší indukovat CR a že jejich buňky lépe reagují na chemoterapii. Při zkoumání MDR a jejího vzniku je nutné vždy zvažovat více mechanismů, které k ní vedou; jedná se o multifaktoriální proces.

Další geny, které se účastní MDR, jako je LRP, MRP1, breast cancer resistance protein (BCRP), Wilms' tumour gene (WT), fungují jako nezávislé prediktory prognózy u pacientů s AML. Byla publikována koexprese těchto genů a MDR1 [21,30,32,33]. Obecné závěry se shodují v tom, že zvýšená exprese těchto genů, ať již samostatně, či společně, je spojena s poruchami mechanismů apoptózy, vede ke vzniku mnohočetné lékové rezistence a negativně ovlivňuje odpověď na cytostatickou terapii a CR.

## 2 Projekt - cíle a hypotézy

Práce na projektu „Prognóza a molekulární diagnostika u akutních myeloidních leukémií“ byla prováděna v laboratoři PCR diagnostiky leukémií na Ústavu hematologie a krevní transfúze, která vznikla v roce 1998. Pod vedením MUDr. Jiřího Schwarze, CSc., jsou zde zpracovány krevní vzorky pacientů s různými typy leukémií a lymfomů (především AML, ale též CML, ALL apod.) nejen z ÚHKT, ale i z ostatních českých hematologických pracovišť. Detekují se různé chromozomální translokace na úrovni RNA i DNA molekulárně biologickými metodami, především PCR a jejími modifikacemi (klasická PCR, RT-PCR, real-time-PCR, semikvantitativní PCR apod.). Zároveň spolupracujeme s cytogenetickou laboratoří prof. ing. Kyrý Michalové, DrSc., v níž jsou diagnostikovány i další aberace kromě výše uvedených, a dále s laboratoří průtokové cytometrie MUDr. Iuri Marinova.

### 2.1 Cíle

1. Zavést rutinní diagnostiku fúzních genů AML1/ETO a CBF $\beta$ /MYH11 pomocí RT-PCR, porovnat single versus multiplex metodu (diagnostika třetího fúzního genu, který patří mezi prognosticky příznivé aberace, PML/RAR $\alpha$ , již byla zavedena dříve).
2. Zavést (semi)kvantitativní diagnostiku MDR1 genu.
3. Vyhodnotit prognostický význam těchto nově zavedených vyšetření a porovnat je s rutinně sbíranými klinickými a laboratorními daty – klinickým stavem pacienta v době diagnózy („performance status“), počty leukocytů, míry anemie, trombocytopenie, fibrinogenemie, hladiny LDH, imunofenotypem (např. expresí CD34 antigenu).
4. Vyhodnotit prognózu nemocných s AML ve vztahu k nálezům molekulárních aberací a k expresi MDR1/Pgp. Pacienti budou stratifikováni podle přítomnosti PPA a dále podle exprese MDR1/Pgp do 4 skupin: 1. PPA<sup>+</sup> MDR1/Pgp<sup>-</sup>, 2. PPA<sup>+</sup> MDR1/Pgp<sup>+</sup>, 3. PPA<sup>-</sup> MDR1/Pgp<sup>-</sup> a 4. PPA<sup>-</sup> MDR1/Pgp<sup>+</sup>.



## **2.2 Hypotézy**

1. Nemocní akutní myeloidní leukémií s prognosticky příznivou aberací budou mít lepší prognózu (hodnocenou z hlediska dosažení kompletní remise a celkového přežití) nezávisle na dalších faktorech. Průkaz PPA je tedy příznivým nezávislým prognostickým faktorem u AML.
2. Nemocní akutní myeloidní leukémií se zvýšenou expresí MDR1/Pgp budou mít horší prognózu nezávisle na dalších faktorech. Zvýšená exprese MDR1/Pgp je nepříznivým nezávislým prognostickým faktorem u AML.
3. Nemocní akutní myeloidní leukémií bez prognosticky příznivé aberace a se zvýšenou expresí MDR1/Pgp budou mít horší prognózu, než pacienti bez PPA a bez MDR1/Pgp hyperexprese. Zvýšená exprese MDR1/Pgp je nepříznivým nezávislým prognostickým faktorem u AML bez PPA.

## 3 Pacienti, materiál a metody

### 3.1 Pacienti

Byla vyšetřována krev a/nebo kostní dřeň pacientů v době stanovení diagnózy AML a myelodysplastického syndromu v transformaci do AML (MDS RAEB-T). Jednalo se o nemocné léčené na lůžkovém oddělení ÚHKT, anebo vyšetřované na ambulanci ÚHKT od roku 1998. Dále byly testovány vzorky pacientů, léčených v 15 dalších hematologických centrech (Klinika hematologie Banská Bystrica, II. hematologická klinika FN Brno-Bohunice /20 pacientů/, Dětská interní a onkologická klinika FN Brno /8 pac./, OKH České Budějovice, Dětská klinika České Budějovice, FTN Praha-Krč, OKH FN Hradec Králové /3 pac./, OKH Nemocnice Na Homolce Praha, OKH Kladno, II. dětská klinika FN Motol /24 pac./, Dětská klinika FN Olomouc /3 pac./, Hematoonkologická klinika FN Olomouc /5 pac./, Dětská klinika FN Ostrava /6 pac./, I. interní klinika /3 pac./ a IV. interní klinika VFN Praha, a konečně OKH FN Král. Vinohrady Praha /7 pac./). Byli vyšetřeni také dětské pacienty s AML, léčení podle mezinárodního protokolu BFM, v ČR koordinovaného doc. Starým (II. dětská klinika FN Motol, Praha). Dále byly pomocí RT-PCR k detekci leukemických fúzních genů vyšetřeny zmražené vzorky RNA z dřívějších let a použity cytogenetické výsledky od pacientů vyšetřených v ÚHKT od roku 1991.

Studování pacienti byli zařazeni do databáze a data byla doplněna klinickými údaji (za některé z nich vděčíme výše uvedeným pracovištím). V některých případech bohužel nebylo možno získat kompletní údaje. V kapitole 1 Výsledky, kde je podrobně rozebrána statisticky hodnocená skupina pacientů, je proto uveden přehled dat, která byla pro hodnocení k dispozici (viz Tabulka 6).

### 3.2 Materiál

#### 3.2.1 Přístrojové vybavení

Tabulka 6 shrnuje všechny typy přístrojů včetně jejich názvů a výrobce, které jsou používány v naší laboratoři při zpracování vzorků.

**Tabulka 6 Přístrojové vybavení**

Typ přístroje	Název
Boxy s laminárním prouděním vzduchu	MSC9, Youan Laminair Air Flow Class 100, Gelaire
Centrifugy	Labofuge 400R, Heraeus (chlazená, výměnný motor) Pikofuga, Biotech

Typ přístroje	Název
Digitální kamera	Kodak Digital Science™ Electrophoresis Documentation and Analysis System 120
Fotoaparát	Polaroid DS – 34, Direct Screen Instant Camera
Elektroforetická aparatura	Minnie The Gel-Cycle, Hoefer Pharmacia Biotech
Elektroforetický zdroj	Power PAC 300, Biorad
Elektronické váhy	Kern 440
PCR Cycler	Trio Thermoblock, Biometra
Vortex	TK3S, Techno Kartell
UV transluminátor	Mini-Transilluminator, Biorad
Mikroskop	Carl Zeiss JENA
Software	Kodak Digital Science™ 1D Image Analysis Software Graph Pad Prism 3

### 3.2.2 Chemikálie, enzymy a roztoky

V této části jsou souhrnně vyjmenovány všechny chemikálie, enzymy a roztoky včetně jejich složení a výrobce, používané při zpracování vzorků.

**Tabulka 7 Chemikálie pro izolaci RNA**

Název	Výrobce	Název	Výrobce
Acetát sodný	Sigma	Izopropanol	Merck
Agarosa	Gibco	Kyselina boritá	Lachema
Ethanol	Merck	Merkaptoethanol	Merck
Fenol	Merck	Minerální olej	Sigma
Ficoll Paque	Sigma	Orange G	Sigma
Guanidin isothiokyanát	Roche	Phosphate Buffered Saline	Sigma
Chloroform	Merck	Tris-base	Roche
Izoamylalkohol	Merck	Tripanová modř	Sigma

**Tabulka 8 Chemikálie a enzymy pro RT-PCR**

Název	Výrobce	Konečná koncentrace
DNA marker, 100bp DNA Ladder	Promega	
dNTP	Promega	10mM
Dithiotreitol	Promega	100mM
Ethidium Bromid	Sigma	
MgCl <sub>2</sub> 25mM	Perkin Elmer Kit	
PCR Buffer 10x	Perkin Elmer Kit	
Primery	Perkin Elmer	
Random hexamers	Sigma	25pmol/μl
RT Super Script II	Gibco	200U/μl
Rnasin	Promega	
TaqGold Polymerase	Perkin Elmer Kit	5U/μl

#### MgCl<sub>2</sub> pufr (PCR Buffer, MgCl<sub>2</sub>)

1mM detekce PML/RAR $\alpha$

1,5 mM detekce ABL, AML1/ETO, CBF $\beta$ /MYH11

Tabulka 9 Složení roztoků

Složky	Vlastnosti	Konečná konc.složek	Množství	
<b>sol. EDTA (0,5 M, pH 8,0, 500ml)</b>				
Na <sub>2</sub> EDTA-2H <sub>2</sub> O	Mr = 372,2	0,5 M	93 g	
H <sub>2</sub> O	deionizovaná		cca 350 ml	
NaOH (titr.)	10 M		cca 25 ml	
H <sub>2</sub> O doplnit na 500 ml				
<b>sol. Na Acetát (2 M, pH 4,0, 100 ml)</b>				
Na Acetát	Mr = 82,0	2 M	16,4 g	
H <sub>2</sub> O	deionizovaná		cca 25 ml	
kyselina octová (titr.)	100 %		<b>cca 60 ml</b>	
H <sub>2</sub> O doplnit na 100 ml				
<b>sol. Na3citrát (1 M, pH 7,0, 100 ml)</b>				
Na <sub>3</sub> citrát	Mr = 294,1	1 M	29,4 g	
H <sub>2</sub> O	deionizovaná		cca 80 ml	
HCl	1 M		cca 10 ml	
H <sub>2</sub> O doplnit na 100 ml				
<b>sol. HCl (1 M, 100 ml)</b>				
HCl	35%, ρ= 1,18, Mr =36,47	1 M	8,83 ml	
H <sub>2</sub> O	deionizovaná		91,17 ml	
<b>50x TAE (pH 8,4, 500 ml)</b>				
Tris base	Mr = 121,1	2 M	121 g	
Kyselina octová	99 %	1 M	24,5 ml	
EDTA sol.	0,5 M, pH 8,0	0,05 M	50 ml	
H <sub>2</sub> O doplnit na 500 ml				
<b>10x TBE (pH 8,2, 1000 ml)</b>				
Tris base	Mr = 121,1	0,9 M	109 g	
Kyselina boritá	Mr = 61,8	0,9 M	55,6 g	
EDTA sol.	0,5 M, pH 8,0	0,2 M	40 ml	
H <sub>2</sub> O doplnit 1000 ml				
<b>sol. Ethidium bromid (10 mg/ml)</b>				
Ethidium bromid		10 mg/ml	1 g	
H <sub>2</sub> O doplnit na 100 ml				
<b>sol. ITG (4 M ITG, 0,025 M Na<sub>3</sub> citrát pH 7, 0,5 % Sarcosin, 300 ml)</b>				
Guanidin thiokyanát	Mr = 118,2	4 M	141,84	283,68 g
RNA H <sub>2</sub> O			150 ml	cca 300 ml
sol. Na <sub>3</sub> citrát	1 M sol., pH 7	0,025 M	7,5 ml	15 ml
N-Lauroylsarcosin-sodium-salt	30 %, Mr 293,4	0,5 %	5 ml	10 ml
<b>Chloroform pro RNA izolaci (CHCl<sub>3</sub>: Isoamylalkohol, 49 : 1)</b>				
CHCl <sub>3</sub> ultra pure	Mr = 119,38	100%	98%	25 ml
IAA ultra pure	100%		2%	0,5 ml
<b>Lyzační roztok 1 ml ITG + 7,2 μl merkptoethanolu</b>				
<b>Lyzační roztok na erytrocyty 10x</b>				
NH <sub>4</sub> Cl			41,45 g	
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>			3,95 g	
EDTA	0,5M, pH 8,0		0,186 g	
H <sub>2</sub> O doplnit na 500 ml				
<b>PBS (Phosphate buffered saline), pH 7,4, 5l</b>				
NaCl	137mM		40 g	
KCl.12H <sub>2</sub> O	2,7mM		1 g	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,3mM		7,7 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM		1 g	
HCl (titr.)	1M			
H <sub>2</sub> O doplnit na 5 l				

Složky	Vlastnosti	Konečná konc.složek	Množství
<b>Orange G</b>			
TAE	0,5x	0,5x	50ml
Orange G		1mg/ml	50mg
Ficoll		20%	10g

### 3.3 Metody

Při práci bylo dbáno všech bezpečnostních i etických opatření vztahujících se k práci s humánním biologickým materiálem – vzorky byly chronologicky označovány písmenným a číselným kódem, iniciálami pacienta, zkratkou PB (periferní krev), či BM (kostní dřeň) a datem odběru. U lyzátů byl též uveden počet izolovaných buněk ( $\times 10^6$ ). Všechna data byla uchovávána v písemné i elektronické formě (Excel dokument) a průběžně doplňována dalšími klinickými a laboratorními údaji. Takto vytvořená databáze byla následně statisticky zpracována.

Vzhledem ke specifické „laboratorní čistotě“ nutné pro práci s RNA a nebezpečí vzájemné kontaminace vzorků byly veškeré pracovní postupy prováděny v boxech s laminárním prouděním, v gumových rukavicích a byly používány pouze autoklávované pomůcky (špičky, eppendorfký i roztoky). Kvalita RNA byla ověřována elektroforeticky. Kontrola kvality cDNA každého vzorku byla testována průkazem kontrolního genu ABL (v případě semikvantitativního stanovení exprese MDR1 genu to byl kontrolní gen BCR), který je konstitutivně exprimován ve všech lidských buňkách a je o něm známo, že nemá žádný pseudogen (na rozdíl např. od často používaného kontrolního genu  $\beta$ -actin), který by mohl zkreslovat výsledek. Pro PCR byl používán systém pozitivních kontrol – zpočátku se jednalo o cDNA dříve verifikovaných pozitivních vzorků, v současné době je používán plazmid nesoucí část příslušného fúzního genu – za účelem kontroly reakční směsi PCR, a dále systém negativních kontrol, kdy v příslušné PCR reakční směsi je amplifikována místo vzorku cDNA pouze TK H<sub>2</sub>O (kontrola případné kontaminace a falešně pozitivních výsledků). Práce s post-PCR produkty probíhala vždy v oddělené místnosti za použití k tomu vyhrazených pomůcek, aby nedošlo ke kontaminaci a případným falešně pozitivním výsledkům. Dále popsané metody jsou výsledkem modifikace standardně publikovaných postupů, tak aby nejlépe splňovaly požadavky specifity, senzitivity i rychlosti stanovení diagnózy.

Metoda semikvantitativní detekce exprese MDR1 genu je zde zmíněna pouze okrajově a je podrobně rozebrána v kapitole 1 Výsledky, vzhledem k tomu, že se jednalo o stěžejní projekt této dizertační práce. V případě multiplex reakce pro detekci fúzních genů AML1/ETO a CBF $\beta$ /MYH11 byly pozitivní výsledky ověřovány v tzv. split-out (oddělených) reakcích za použití primerů specifických pouze pro daný fúzní gen.

### 3.3.1 Zpracování vzorků krve a/nebo kostní dřeně

Mononukleární buňky kostní dřeně nebo periferní krve byly separovány na gradientu Ficoll-Paq (1,077 g/ml) za sterilních podmínek v laminárním boxu Galaire a ihned zlyzovány v ITG (guanidin-isothiokyanát s 0,72% merkaptoethanolem) v koncentraci  $10^6$  buněk na 0,5 ml lyzačního roztoku.

### 3.3.2 RT-PCR

#### 3.3.2.1 Izolace RNA

Izolace RNA byla prováděna guanidinthiokyanát-fenol-chloroformovým postupem [117]. k lyzátu bylo přidáno 50  $\mu$ l 2 M acetátu sodného pH = 4, 450  $\mu$ l kyselého fenolu (fenol sycený sterilní vodou s 0,1% hydroxychinolinu) a 125  $\mu$ l chloroformu s 2% isoamylalkoholu, důkladně roztřepáno a inkubováno 10 min. V ledové lázni. Po stočení (13 000 g, 4°C, 10 min.) byl supernatant přemístěn do nové zkumavky a inkubován 20 min. při -20°C se stejným množstvím isopropanolu. Po vysrážení, centrifugaci (13 000 g, 4°C, 15 min.) a slití supernatantu byla peleta 2x přečištěna ledovým 75% ethanolem a rozpuštěna ve sterilní vodě. Roztok RNA ve vodě byl skladován v -70°C. Kvalita RNA byla analyzována elektroforeticky.

#### 3.3.2.2 Reverzní transkripce (RT)

2  $\mu$ l roztoku RNA byly smíchány s roztokem náhodných hexamerů (50 pmol), inkubovány 10 min. při 65°C a po zchlazení byla přidána reakční směs s konečnými koncentracemi 50 mM tris-HCl o pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitolu, 0,5 mM deoxyoligonukleotidů (dNTP), 10 jednotek RNasinu (Promega) a 100 j. reverzní transkriptázy RT Super Script II (Gibco). Reakční směs (v celkovém objemu 10  $\mu$ l) byla inkubována 1 hod. při 37°C a následně denaturována 2 min. při 95°C. Komplementární DNA (cDNA) byla skladována v -20°C.

#### 3.3.2.3 PCR - stanovení hybridního genu PML/RAR $\alpha$

Byla použita metoda jednokolové PCR za využití kombinace primerů R8 a M2 [119] pro případy s bodem zlomu bcr1 a bcr2, a primerů R8 a M4 pro případy s bodem zlomu bcr3. Do reakční směsi PCR již překryté 2 kapkami minerálního oleje byl napipetován 1  $\mu$ l cDNA a byl spuštěn amplifikační program na termocykleru Trio Thermoblock firmy Biometra (viz

Tabulka 10). Reakce probíhala v celkovém objemu 25  $\mu$ l. Reakční směs obsahovala složky v konečné koncentraci 10 mM tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM každého dNTP, 4 pmol každého primeru a 0,625 jednotek polymerázy AmpliTaq Gold (Perkin Elmer).

#### **3.3.2.4 PCR - stanovení kontrolního genu *ABL***

Do reakční směsi PCR byl napipetován 1  $\mu$ l cDNA a byl spuštěn amplifikační program (viz

Tabulka 10). Reakce probíhala v celkovém objemu 25  $\mu$ l. Reakční směs obsahovala složky v konečné koncentraci 10 mM tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM každého dNTP, 10 pmol každého primeru ABL-S, ABL-AS a 0,625 jednotek polymerázy AmpliTaq Gold.

### **3.3.2.5 Multiplex PCR - stanovení hybridních genů AML1/ETO a CBF $\beta$ /MYH11**

Byla zavedena multiplex PCR fúzních genů AML1/ETO [120] a CBF $\beta$ /MYH11 [121] – v jedné zkumavce jsou amplifikovány oba tyto geny současně. Postup izolace RNA a RT byl stejný, jako u rutinně prováděných vyšetření fúzního genu PML/RAR $\alpha$ . Nejprve byly vytvořeny jednoduché reakce s použitím buněčné linie KASUMI-1 [122], která je AML1/ETO pozitivní a dále vzorek naší pacientky s AML FAB M4eo variantou, která byla CBF $\beta$ /MYH11 pozitivní. V následujícím kroku byla vyladěna multiplex reakce s amplifikací obou genů zároveň. V případě pozitivního záchytu jedné z testovaných translokací byl výsledek verifikován v tzv. „split-out“ – jednoduché reakci. Do reakční směsi PCR byl napipetován 1  $\mu$ l cDNA a byl spuštěn amplifikační program (viz



Tabulka 10). Reakce probíhala v celkovém objemu 25  $\mu$ l. Reakční směs obsahovala složky v konečné koncentraci 10 mM tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM každého dNTP, 10 pmol každého primeru AM, ET a 12,5 pmol každého primeru pr1, 2M a 0,81 jednotek polymerázy AmpliTaq Gold.

### **3.3.2.6 Komparativní PCR - stanovení genu MDR1 a kontrolního genu BCR**

V případě komparativního stanovení genů MDR1 [123] a BCR [124] byla použita cDNA, případně RNA archivovaných vzorků od pacientů s diagnózou záchyty AML. Postup izolace RNA a RT byl stejný, jako u rutinně prováděných vyšetření fúzních genů. Byla použita metoda semikvantitativní komparativní PCR, kdy kontrolní gen BCR byl zároveň interním standardem. Do reakční směsi PCR byl napipetován 1  $\mu$ l cDNA a byl spuštěn amplifikační program (viz

Tabulka 10). Reakce probíhala v celkovém objemu 25  $\mu$ l. Reakční směs obsahovala složky v konečné koncentraci 10 mM tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM každého dNTP, 5 pmol každého primeru MDR-S, MDR-AS, BCR-S, BCR-AS a 0,625 jednotek polymerázy AmpliTaq Gold.

**Tabulka 10 Schémata amplifikačních programů**

Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů				
		PML/RAR $\alpha$	ABL	CBF $\beta$ /MYH11 AML1/ETO	MDR1/BCR	
95	9 min			Iniciace		
95	45 s					
57	45 s	Elongace	40	33	40	28
72	1 min					
72	9 min			Terminální extenze		
4				Chlazení		

**3.3.2.7 Hybridizace a sekvenování**

V případě nejasného výsledku, či jakýchkoliv pochybností s interpretací a dále v případě výzkumně-diagnostických případů (viz dále) byly vzorky podrobeny hybridizaci se specifickými sondami, či – častěji – sekvenovány. Hybridizace byla prováděna ve spolupráci s laboratoří RNDr. Cedrika Haškovce, CSc. Sekvenční analýza byla prováděna na přístroji Perkin Elmer ABI Prism 310 Genetic Analyzer ve spolupráci s laboratoří MUDr. Jelínka.

**3.3.2.8 Analýza produktů PCR**

Produkty byly analyzovány elektroforeticky (2% agarózový gel obarvený ethidium bromidem) a vizualizovány na UV transluminátoru Biorad. Gely byly fotografovány buď systémem Polaroid DS-34 Direct Screen Instant Camera, nebo v případě detekce exprese mRNA MDR1 genu pomocí Kodak Digital Science EDAS 120 Systému.

**Tabulka 11 Sekvence použitých primerů**

Název primeru	5'	3'
M2 (20 bp)	AgT	gTA CgC CTT CTC CAT CA
M4 (30 bp)	AgC	TgC Tgg Agg CTg Tgg ACg CgC ggT ACC
R5 (23 bp)	CCA	CTA gTg gTA gCC TgA ggA CT
R8 (25 bp)	CAG	AAC TgC TgC TCT ggg TCT CAA T
pr1 (21bp)	CAG	gCA Agg TAT ATT TgA Agg
2M (23 bp)	CTC	CTC TTC TCC TCA TTC TgC TC
AM (19 bp)	ACC	TCA ggT TTg TCg gTC g
ET (24 bp)	gAA	CTg gTT CTT ggA gCT CCT
ABL-S (23 bp)	ggA	CAG gCC CAT ggT ACC Agg Ag
ABL-AS (20 bp)	CTC	AgC CAG TAg CAT CTg AC
MDR-S (21 bp)	TAC	AgTggA ATT ggT gCT ggg
MDR-AS (20 bp)	CCC	AgT gAA AAA TgT TgC CA
BCR-S (18bp)	gAg	Aag Agg gCg AAC AAg
BCR-AS (20bp)	CTC	TgC TTA AAT CCA gTg gC

### 3.3.3 Cytogenetika

#### 3.3.3.1 Klasická cytogenetika

U všech pacientů byly vyšetřeny buňky kostní dřeně získané sternální punkcí, kultivované 24 hod v mediu RPMI 1640 s 10% fetálního telecího séra a dále zpracované standardní technikou. Pro cytogenetickou analýzu byla použita metoda G – pruhování chromozomů Wrightovým barvivem. Vyhodnocování karyotypů bylo prováděno ve světelném mikroskopu pomocí počítačové analýzy obrazu IKAROS od firmy MetaSystems™, chromozomové aberace byly popisovány dle mezinárodní nomenklatury ISCN (1995). U každého nemocného bylo v případě dostatečného množství dělicích se buněk vyhodnoceno 20 mitóz.

#### 3.3.3.2 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Při FISH analýze byly použity komerčně dodávané sondy s postupem dle protokolů, doporučených jejich výrobcí. Pro analýzu chromozomových odchylek v mitózách nebo interfázních jádrech byly použity lokus specifické sondy od firmy Abbott Vysis™ a Q BIOgene™, pro analýzu komplexních přestaveb byla použita metoda mFISH se sondami od firmy MetaSystems™.

Pro průkaz translokací byly použity dvoubarevné lokus specifické translokační sondy pro detekci fúzních genů PML/RARA (LSI PML/RARA Dual Color Translocation Probe) a AML1/ETO (LSI AML1/ETO Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe), k průkazu inverze chromozomu 16 byla použita sonda LSI CFBF Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe.

Pro průkaz delecí byly použity dvoubarevné lokus specifické sondy pro oblasti 5p15/5q31 [LSI EGR1 (5q31) SpectrumOrange/D5S23, D5S721 SpectrumGreen Probe], a 7q31 [LSI D786 (7q31) SpectrumOrange/ CEP 7 SpectrumGreen Probe], přestavby a delece chromozomové oblasti 11q23 a MLL genu byly vyšetřeny pomocí sondy LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe.

Komplexní přestavby karyotypu byly analyzovány metodou mFISH. Ta umožňuje rozlišit všech 22 párů autosomů i pohlavní chromozomy X a Y v jednom hybridizačním pokusu. Celochromozomové sondy jsou v tomto případě kombinatoriálně značeny pěti různými fluorochromy, jejichž kombinace stačí pro obarvení celého karyotypu. Výsledek hybridizace byl vyhodnocen ve fluorescenčním mikroskopu za pomoci počítačového programu ISIS od firmy MetaSystems™.

### 3.3.4 Imunofluorescenční vyšetření

#### 3.3.4.1 Imunofenotypizace

Expres jednotlivých antigenů byla testována na průtokovém cytometru (Coulter-EpicsXL) metodou přímé imunofluorescence. Seznam imunofluorescenčních protilátek použitých pro detekci sledovaných antigenů je uveden níže (viz Tabulka 12).

**Tabulka 12 Přehled imunofluorescenčních protilátek pro detekci sledovaných antigenů**

Antigeny	Protilátka / klon
HLA-DR	Tü 149 (Caltag)
CD34	581 (class III) (Caltag)
CD33	CD33-4D3 (Caltag)
CD13	Tü K1 (Caltag)
CD15	VIMC6 (Caltag)
CD11b	VIM12 (Caltag)
CD11c	BU15 (Caltag)
CD14	TüK4 (Caltag)
CD117	104D2
T znaky (CD1-8)	VIT6b, S5.5, UCHT1, S3.5, CD5-5D7, CD7-6B7, 3B5 (Caltag)
B znaky (CD10,19-22)	SJ5-1B4, SJ25-C1, HI47, BU32, RFB4 (Caltag)
NK znaky (CD16,56)	3G8, MEM188 (Caltag)
glykoforin A/CD235a	CLB-ery-1 (Caltag)
CD41	VIPL3

#### 3.3.4.2 Imunofluorescenční detekce Pgp

Pro toto stanovení byla zakoupena protilátka C219 od firmy Medista. Expres Pgp byla testována na průtokovém cytometru (Coulter-EpicsXL) metodou přímé imunofluorescence. Po otestování několika pacientů (z nichž ani jeden neměl příznivé prognostické znaky, takže se určitá exprese Pgp dala předpokládat), vesměs s negativním výsledkem, bylo rozhodnuto zakoupit jinou protilátku, a sice UIC2 [125] od firmy Immunotech. Tato protilátka byla testována na buňkách linie K562 transfekované cDNA genu MDR1 (linii byla získána s laskavým svolením od dr. Jelínka z ÚHK). Byla zjištěna vysoká exprese u buněk transfekovaných, a naopak negativní exprese v „divokých“ netransfekovaných buňkách K562, reaktivita protilátky byla silnější, než u C219. Další hodnocení tedy probíhalo již s protilátkou UIC2.

### 3.3.5 Statistické metody

Hodnocení výsledků dosažení % pozitivitu zkoumané veličiny (např. % dosažení či nedosažení kompletní remise) bylo provedeno pomocí  $\chi^2$  testu v kontingenčních tabulkách. Hodnocení různých kvantitativních ukazatelů v definovaných skupinách (např. % Pgp exprimujících buněk ve skupině s dosažením, resp. nedosažením CR) bylo hodnoceno neparametrickými testy, a to buď nepárovým t testem (kde nulová hypotéza se týkala průměru), nebo Mann-Whitneyho testem (v případech, kdy nulová hypotéza se týkala mediánu), anebo Fisherovým exaktním testem. Křivky přežívání byly zhotoveny podle metody Kaplana a Meiera [126], k testu odlišnosti křivek jsme použili logrank testu v úpravě podle Mantela a Haenszela, event. V úpravě podle Mantela a Coxe [127].

Všechny testy byly prováděny na 95% hladině významnosti. Údaje o přežívání se vztahují k datu 30.11.2000. Jsou udána též očekávaná procenta přežití a 95% interval spolehlivosti, označený CI95%. V každém z testů je uvedeno číslo P, vyjadřující možnost, že náhodným výběrem budou získána data, jejichž rozdílnost by byla stejná nebo větší, než u mých výsledků, za předpokladu, že by platila nulová hypotéza. V práci byl použit software GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), některé testy byly kontrolovány ing. A. Dohnalovou z Fyziologického ústavu 1. LF UK v Praze.

## 4 Výsledky

V době od února 1991 do listopadu 2000 bylo zaregistrováno celkem 289 pacientů (dospělých i dětí) ať již z ÚHKT, nebo z extramurálních pracovišť. Přibližně jednu polovinu tvořili muži a druhou ženy; průměrný věk nemocných byl 44 let, nejmladšímu pacientovi bylo 9 měsíců, nejstaršímu 90 let. Pacienti byli léčeni dle platných protokolů pro léčbu AML a APL na ÚHKT.

V době stanovení diagnózy byla u 233 pacientů známa též FAB klasifikace, u 224 pacientů byl znám počet leukocytů, u 117 pacientů byl určen imunofenotyp. Pomocí cytogenetiky bylo vyšetřeno 228 nemocných, pomocí RT-PCR 160 nemocných, celkem bylo hodnoceno 256 pacientů vyšetřených na přítomnost všech tří prognosticky příznivých aberací. Expresí genu MDR1 byla stanovena u 86 nemocných, exprese Pgp u 57 z nich. Z hlediska dosažení kompletní remise jsme hodnotili celkem 256 pacientů, z hlediska celkového přežívání 285 nemocných.

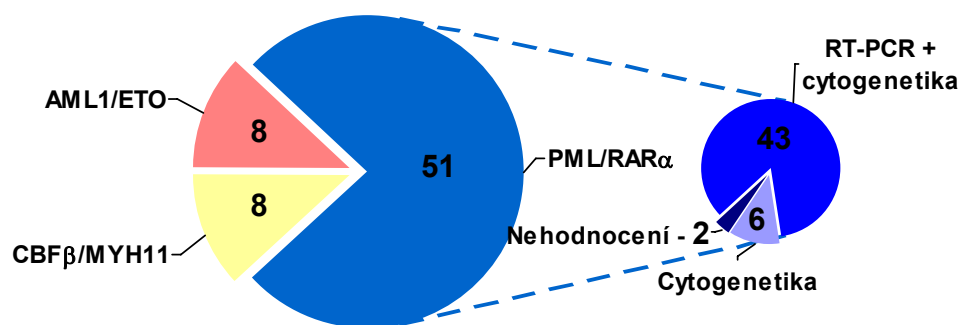
Následující tabulka uvádí souhrnný přehled získaných statisticky hodnotitelných údajů.

**Tabulka 13 Přehled pacientů**

Charakteristika		
Pacienti zaregistrovaní v průběhu II/1991-XI/2000	celkem	292
Pohlaví:	muži	143
	ženy	149
Věk (roky)	průměr	44,26
	medián	47,50
	rozptyl	0,45 -90,04
Počet pacientů se známou FAB klasifikací v době diagnózy	celkem	233
Počet pacientů se známým počtem leukocytů v době diagnózy		224
Počet pacientů se známým imunofenotypem		117
Počet pacientů vyšetřených cytogeneticky	celkem	228
	nezískány mitózy	7
Počet pacientů vyšetřených RT-PCR na přítomnost fúzních genů	celkem	160
	PML/RAR $\alpha$	160
	AML1/ETO	147
	CBF $\beta$ /MYH11	146
Počet pacientů hodnotitelných z hlediska přítomnosti PPA (cytogeneticky, a/nebo RT-PCR)	256	
Počet pacientů vyšetřených komparativní RT-PCR na expresi MDR1	celkem	86
	v periferní krvi	52
	v kostní dřeni	58
Počet pacientů s provedeným stanovením exprese povrchového Pgp	celkem	57
	z toho v ÚHKT	29
Počet pacientů s hodnotitelným údajem o dosažení CR		256
Nehodnotitelní z hlediska CR (krátká doba sledování)		1
Počet pacientů s hodnotitelným údajem o celkovém přežití v měsících (k 30.11.2000)	264	
Počet pacientů s hodnotitelným údajem o celkovém přežití (ano/ne k 30.11.2000)	285	

Jak je zmíněno výše, v mé sestavě bylo vyšetřeno celkem 256 pacientů na přítomnost prognosticky příznivých aberací, přičemž jeden pacient nebyl zahrnut do statistického hodnocení. V době, kdy se na ÚHKKT ještě neprovádělo rutinní vyšetření pomocí RT-PCR, byli pacienti vyšetřováni pouze pomocí klasické cytogenetiky; z mého souboru se jednalo o 95 nemocných. U zbývajících 160 nemocných byl proveden screening pomocí RT-PCR a u některých z nich též cytogenetiky. Metoda RT-PCR odhalila celkem 59 pacientů s PPA, dalších 8 pacientů s PPA bylo diagnostikováno dříve – pouze cytogenetiky. Bylo identifikováno osm pacientů s fúzním genem AML1/ETO, svědčícím pro přítomnost translokace t(8;21) a osm pacientů s fúzním genem CBF $\beta$ /MYH11, svědčícím pro přítomnost inverze, nebo translokace 16. chromozomu - inv(16), či t(16;16). Dále bylo diagnostikováno 51 pacientů s fúzním genem PML/RAR $\alpha$ , svědčícím pro přítomnost translokace t(15;17). Dva pacienty ze skupiny 67 nemocných s PPA nelze hodnotit co do indukce kompletní remise a celkového přežívání. Do celkového statistického hodnocení byly nakonec zahrnuty údaje 65 pacientů s PPA.

Na následujícím obrázku je znázorněn počet pacientů s jednotlivými typy aberací, v případě PML/RAR $\alpha$  pozitivních je ukázán též počet pacientů vyšetřených pomocí RT-PCR (45) a cytogenetiky (6), z nichž 2 pacienty nelze zahrnout do statistického hodnocení.



**Obr. 17 PPA celkem a dle metody diagnózy**

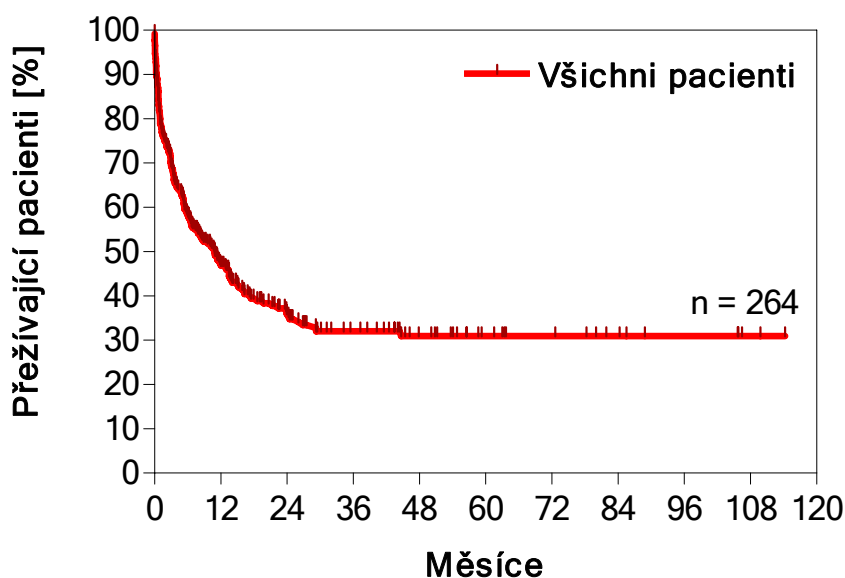
Co se týká pacientů s diagnózou APL, kteří byli po vyšetření pomocí RT-PCR PML/RAR $\alpha$  pozitivní, 27 jich bylo současně vyšetřeno též pomocí klasické cytogenetiky. Z této skupiny se pouze u 18 pacientů jasně prokázala přítomnost translokace t(15;17) (tj. u 2/3 případů). Všichni PML/RAR $\alpha$ -pozitivní pacienti byly dále sledováni na výskyt minimální reziduální choroby pomocí dvoukolové seminested RT-PCR. Výsledky tohoto sledování již přesahují rámec a téma této práce a proto zde dále nejsou podrobněji diskutovány.



Z osmi pacientů s RT-PCR detekcí fúzního genu AML1/ETO jich bylo sedm testováno také cytogeneticky. Pomocí této metody se fúzní gen AML1/ETO prokázal pouze u čtyř z nich. Ve skupině zbývajících nemocných byl u dvou prokázán kryptický typ translokace t(8;21), u dalšího diagnostikovaného se jednalo o detekci myelosarkomu se současnou přítomností translokace t(8;21) s minimálním postižením kostní dřeně (tento případ byl též publikován a je rozebrán dále – viz kapitola 4.7.1). Všech šest CBF $\beta$ /MYH11 RT-PCR-pozitivních pacientů bylo testováno též cytogeneticky, přičemž inverze 16. chromozomu se prokázala u pěti z nich. Relativně menší úspěšnost standardních cytogenetických vyšetřovacích metod oproti využití RT-PCR je podrobně popsána v kapitole 1 Diskuse.

#### 4.1 Kompletní remise a celkové přežívání pacientů

Všichni pacienti, jejichž data bylo možno statisticky zpracovat, byli hodnoceni z hlediska dosažení kompletní remise a celkového přežívání.



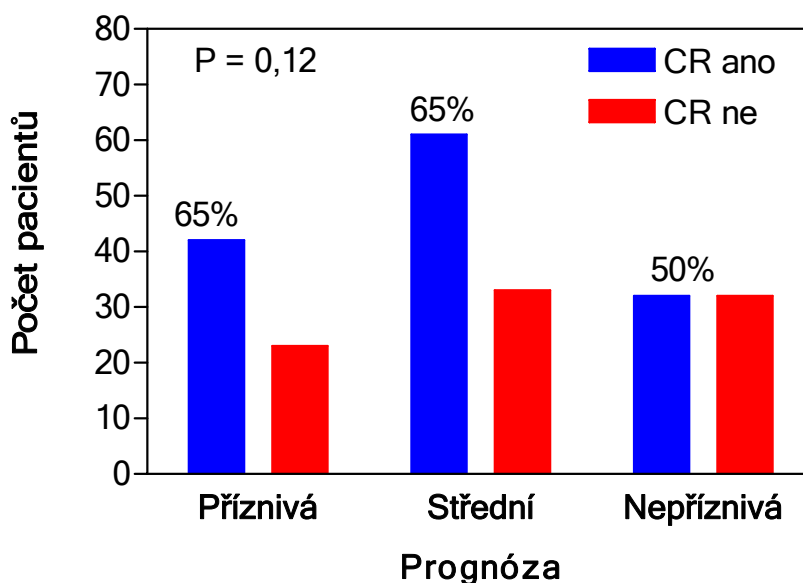
**Obr. 18** Přežití všech pacientů s AML  
Křivka podle Kaplana a Meiera

Doba sledování byla k 30.11.2000 114 měsíců. Ze souboru 256 pacientů hodnotitelných z hlediska dosažení kompletní remise, jich CR dosáhlo 149, tj. 58,2%. Celkové přežívání bylo hodnoceno ve skupině 264 pacientů, u nichž byl k dispozici údaj o celkovém přežití v měsících (k 30.11.2000) (viz Obr. 18). Dále byla hodnocena skupina 285 nemocných s hodnotitelným údajem o celkovém přežití – ano/ne (u 21 pacientů nebylo možné zjistit časový údaj – měsíce přežití). Ke dni 30.11.00 žije 104 pacientů z 285 nemocných, tedy 39,2%, kdy medián přežití je 10,9 měsíců. Očekávané přežití po 114 měsících sledování je 31% (CI95%  $\pm$ 3,3).

#### 4.1.1 Kompletní remise a celkové přežívání v závislosti na typu AML a PPA

Jak již bylo uvedeno výše, dle primární hypotézy pro potřeby statistického hodnocení byli pacienti rozděleni do skupin s dobrou, střední a nepříznivou prognózou na základě přítomnosti PPA [tedy  $t(15;17)$ ,  $t(8;21)$  nebo  $inv(16)/t(16;16)$ ], či dalších zjištěných chromozomálních aberací]. Pacienti, kteří nebyli PPA pozitivní, byli přiřazeni do skupin se střední nebo nepříznivou prognózou na základě cytogeneticky prokázané aberace dle zásad uvedených výše (viz Tabulka 1 v kapitole 1.2.3 Klasifikace a diagnostika AML).

Obr. 19 ukazuje, že kompletní remise dosáhlo stejné procento pacientů zařazených do prognosticky dobré a střední kategorie, tedy 64,6%, resp. 64,8% z celkového počtu hodnocených. Horší výsledek byl u pacientů zařazených ve skupině s nepříznivou prognózou, kdy kompletní remise dosáhlo pouze 50% sledovaných nemocných.

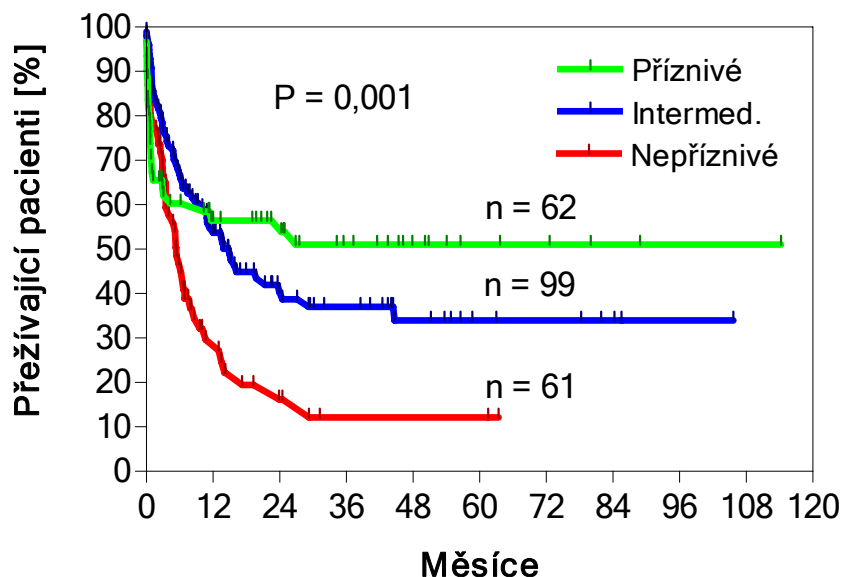


Obr. 19 Indukce CR u AML podle prognostické klasifikace cytogenetického nálezu

P je hodnota  $\chi^2$  testu v kontingenční tabulce. Ani hodnota P pro trend v kontingenční tabulce nebyla statisticky signifikantní (P = 0.09)

Naopak na dalším obrázku je vidět, že pacienti s PPA dosahovali významně lepšího celkového přežití, oproti nemocným ve skupině se střední a naposledy se špatnou prognózou (viz Obr. 20). Pravděpodobnosti přežití 60 měsíců v uvedených skupinách pacientů byly 51,1% ve skupině s dobrou prognózou (CI95%  $\pm$  13,5), 33,9% ve skupině se střední prognózou ( $\pm$ 11,3) a 12,2% ve skupině se špatnou prognózou ( $\pm$ 10,9).

Ačkoli jsme hodnotili všechny pacienty ve skupině s přítomností PPA v této analýze společně, zasluhují samostatnou pozornost. Některé aspekty kolem APL budou dále hodnoceny v kapitole 4.4.



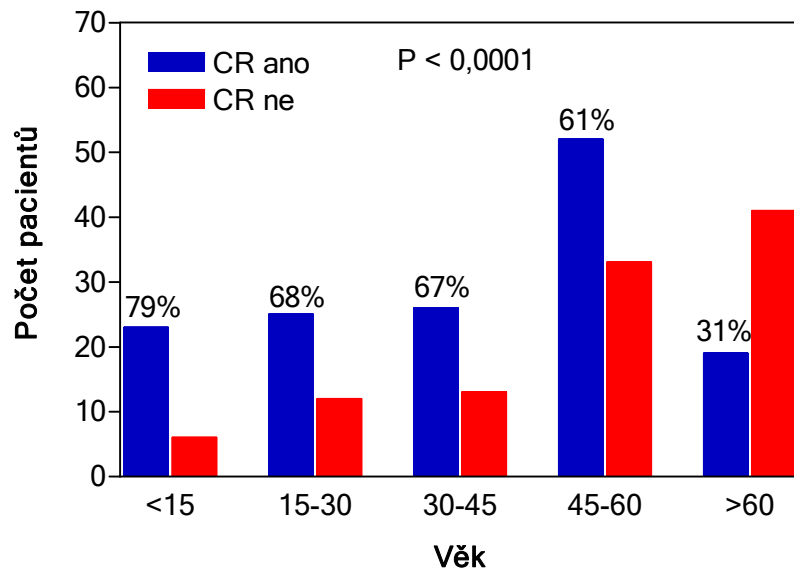
Obr. 20 Přežívání pacientů podle prognostické klasifikace cytogenetického nálezu  
Hodnota P je výsledkem Mantelova-Haenszelova testu s jednostrannou alternativou

## 4.2 Prognóza: vliv klinických a laboratorních dat

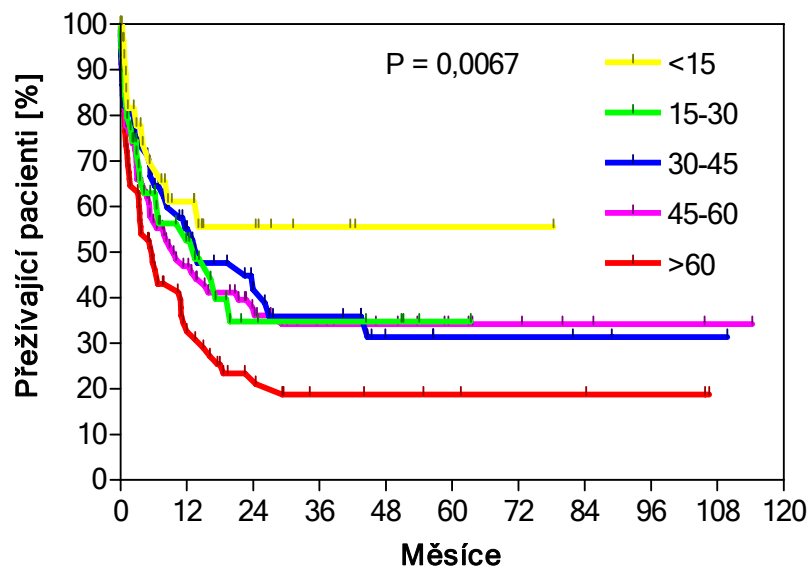
### 4.2.1 Věk a PPA u různých věkových skupin

Věk se v hodnocené sestavě pacientů významně uplatnil jak pokud se týká dosažení kompletní remise (viz Obr. 21), tak i při stanovení celkového přežití (viz Obr. 22). Pacienti byli rozděleni do pěti věkových skupin. Nejlepší prognózu jak vzhledem k procentuálnímu dosažení kompletní remise, tak k celkovému přežití, měli pacienti mladší 15 let, nejhorší nemocní nad 60 let.

Celkem překvapivě však nebyly nalezeny významné rozdíly v dosažení kompletní remise ( $P = 0,0001$ ) i v celkovém přežití ( $P = 0,0067$ ) u pacientů mezi 15 a 60 lety, i přes to, že byli stratifikováni do tří skupin (viz Obr. 21 a Obr. 22).

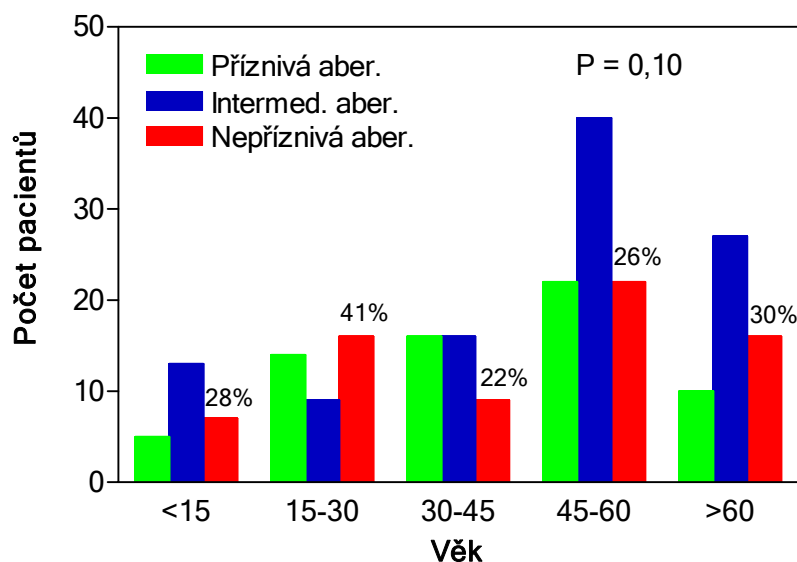


Obr. 21 Dosažení CR v závislosti na věkové skupině  
Hodnota P je výsledek z  $\chi^2$  testu pro trend



Obr. 22 Křivky přežívání v závislosti na věkové skupině  
Hodnota P je výsledkem z Mantelova-Haenszelova logrank testu

Dalším překvapivým nálezem byly výsledky analýzy výskytu prognosticky příznivých, středních a nepříznivých aberací v rámci jednotlivých věkových skupin pacientů (viz Obr. 23). Nenalezli jsme žádný statistický rozdíl v zastoupení jednotlivých aberací ( $P = 0,10$ ); např. ve věkové skupině pod 15 let bylo 28% prognosticky nepříznivých aberací a ve věkové skupině nad 60 let pouze 30%.

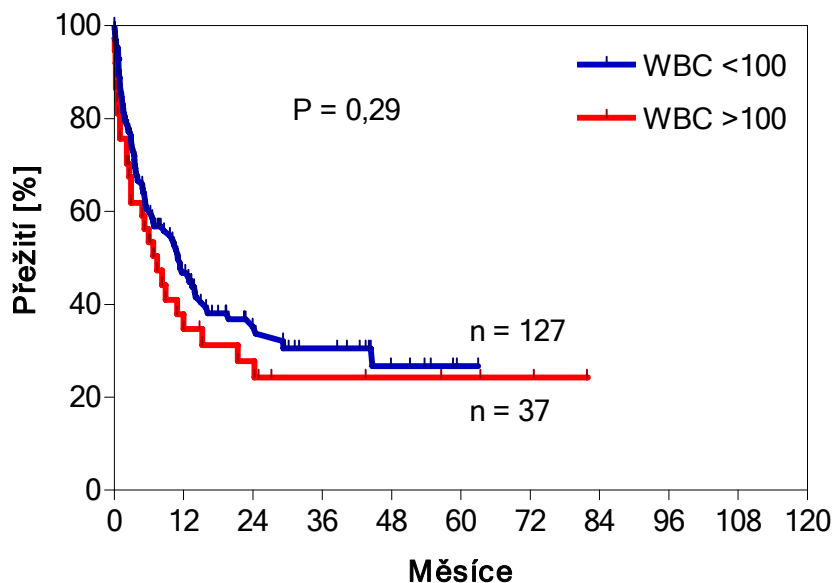


Obr. 23 Výskyt chromozomálních aberací podle prognostické klasifikace a věku  
Hodnota  $P$  je výsledek  $\chi^2$  testu pro trend

#### 4.2.2 Leukocyty a FAB diagnóza

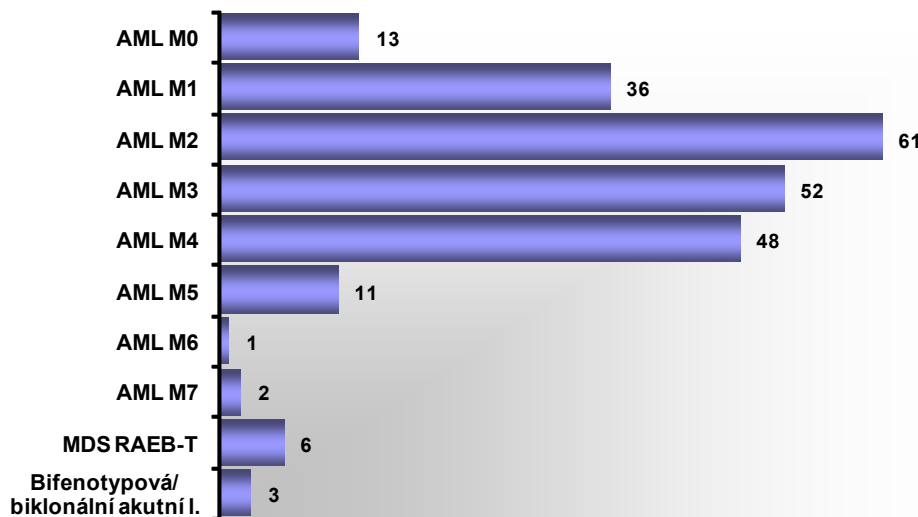
Ve statistickém hodnocení byly sledovány nejen laboratorní výsledky, ale též některá klinická data v době diagnózy – mezi ně patřila výše zmíněná FAB klasifikace a také počet leukocytů v době diagnózy. Z celkového počtu 233 pacientů se známou FAB klasifikací v době diagnózy bylo možné hodnotit pouze 219 pacientů a celkem 224 pacientů se známým počtem leukocytů v době diagnózy. Vzhledem k údajům uváděným v literatuře jsme předpokládali, že počet leukocytů se statisticky významně uplatní především ve skupině pacientů s APL, u nichž leukocytóza patří pravděpodobně mezi rizikové faktory. Skupina pacientů s APL je hodnocena v samostatné kapitole níže.

Analýza přežívání pacientů dle počtu leukocytů byla prováděna na základě rozdělení všech analyzovaných do dvou skupin: první skupina s počtem leukocytů nižším jak  $100 \times 10^9/l$  (skupina 127 pacientů) a druhá s vyšším počtem jak  $100 \times 10^9/l$  (skupina 37 nemocných) (viz Obr. 24). V této analýze, do které byli zahrnuti všichni nemocní, rozdělení pouze na základě počtu leukocytů, nebyl zjištěn žádný podstatný rozdíl v přežívání obou skupin pacientů ( $P = 0,29$ ).



**Obr. 24** Křivka přežití pacientů s  $<100$  a  $>100 \times 10^9/l$  leukocyty  
Hodnota P je výsledkem z Mantelova-Haenszelova logrank testu.

Součástí stanovení diagnózy pacienta byla též snaha jej zařadit dle FAB klasifikace, která je i přes některé nové poznatky stále nejvíce používaná (můžeme hovořit o určitém standardu). Ve skupině všech vyšetřených pacientů jich bylo celkem 233 se známou FAB klasifikací v době diagnózy. Obr. 25 ukazuje zastoupení výskytu jednotlivých typů dle FAB u těchto pacientů.

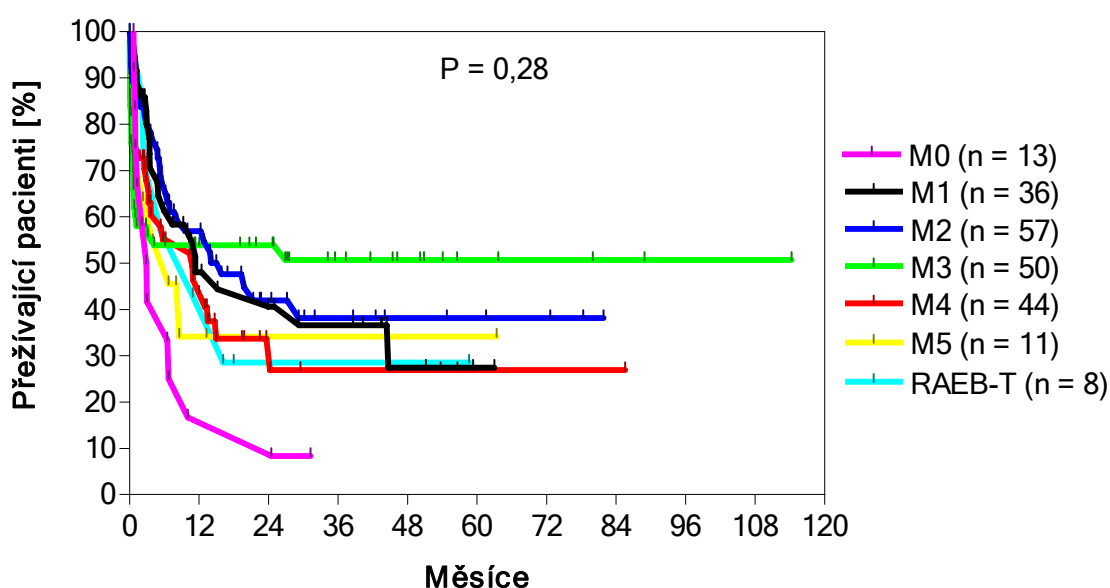


**Obr. 25** FAB klasifikace v době diagnózy

Jak je z grafu patrné, nejčastěji byla diagnostikována FAB AML M2 (61 případů), dále AML M3 (52 případů), AML M4 (48 případů) a AML M1 (36 případů). Tyto počty samozřejmě nevypovídají o četnosti výskytu jednotlivých subtypů ve skupině AML obecně. Tento stav je dán zaměřením naší laboratoře na vyšetřování výše zmíněných typů PPA, které se nejčastěji vyskytují právě u AML subtypů M1, M2 (AML1/ETO), M3 (PML/RAR $\alpha$ ) a M4, případně M1 (CBF $\beta$ /MYH11).

Jak je již zmíněno výše, bylo hodnoceno pouze 219 z 233 nemocných se známou FAB klasifikací v době diagnózy. Do celkového hodnocení nebyli zahrnuti 4 pacienti s AML M2, 2 pacienti s AML M3 a 4 pacienti s AML M4. Dále nebyly hodnoceny skupiny s velmi malým počtem pacientů (kvůli velké chybě při statistickém zpracování dat) – jednalo se o jednoho pacienta s AML M6, 2 pacienty s AML M7 a 3 pacienty s bifenotypovou/biklonální akutní leukémií.

Ze statistické analýzy tohoto souboru vyplynulo, že výrazně lépe přežívali pacienti s FAB M3 (tj. APL) – skupina 50 nemocných, nejhůře pak pacienti s nezralou AML M0 (viz Obr. 26). Přežívání ostatních FAB typů se navzájem příliš nelišilo.



**Obr. 26** Křivky přežití v závislosti na FAB klasifikaci v době diagnózy  
Výsledek P je výsledkem z Mantelova-Haenszelova logrank testu

Mantelův-Haenszelův test pro všechny podtřídy však byl pochopitelně insignifikantní ( $P = 0,28$ ). Proto byla skupina FAB M0 analyzována ještě samostatně, ačkoli tuto klasifikaci mělo jen málo pacientů. Přesto při použití  $\chi^2$  testu (o jednostranné alternativě) ke zhodnocení přežívání pacientů s FAB M0 AML ke stanovenému datu (30.11.00), byl výsledek signifikantně jiný, než u ostatních skupin dohromady ( $P = 0,42$ ). Rovněž u FAB M3 skupiny (výsledky jsou v samostatné kapitole 4.4) byl rozdíl signifikantní.

#### 4.2.3 Poznámky k pacientům s aberacemi segmentu 11q23

V mé sestavě bylo cytogeneticky zachyceno celkem deset nemocných s aberacemi 11q23. U čtyř z nich šlo o součást komplexnějších změn, u šesti šlo o samostatnou odchylku. Tabulka 14 ukazuje mimořádně dobré výsledky vzhledem k indukci kompletní remise, která byla dosažena u devíti z deseti nemocných, včetně čtyř pacientů s komplexnější změnou karyotypu.

U pěti z devíti pacientů, kteří dosáhli kompletní remise, došlo k relapsu, k 30.11.2000 bylo naživu pět pacientů, jeden z nich (dítě) ve druhé kompletní remisi.

**Tabulka 14 Pacienti s aberací 11q23**

Typ aberace	CR	Typ aberace	CR
t(11;20)	CR-	t(11;20)	CR+
t(6;11)	CR+	t(6;11),del(11)(q)	CR+
t(9;11)	CR+	t(9;11;13)	CR+
del(11)(q)	CR+	del(11)(q),+M	CR+
t(10;11)	CR+	+11,rozsáhlé změny karyotypu	CR+

### 4.3 Prognóza: vliv imunofenotypu

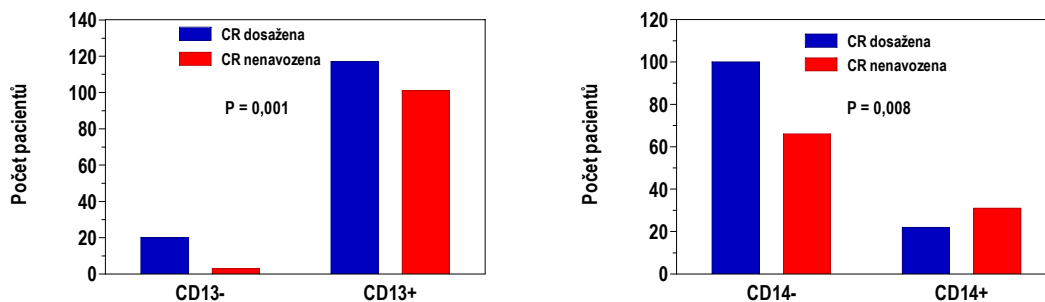
Byl zkoumán vliv exprese různých antigenů na dosažení kompletní remise, v této kapitole jsou uvedena data získaná do roku 2003. Jejich přehled včetně počtů testovaných pacientů a výsledků uvádí Tabulka 15.

**Tabulka 15 Testované antigeny**

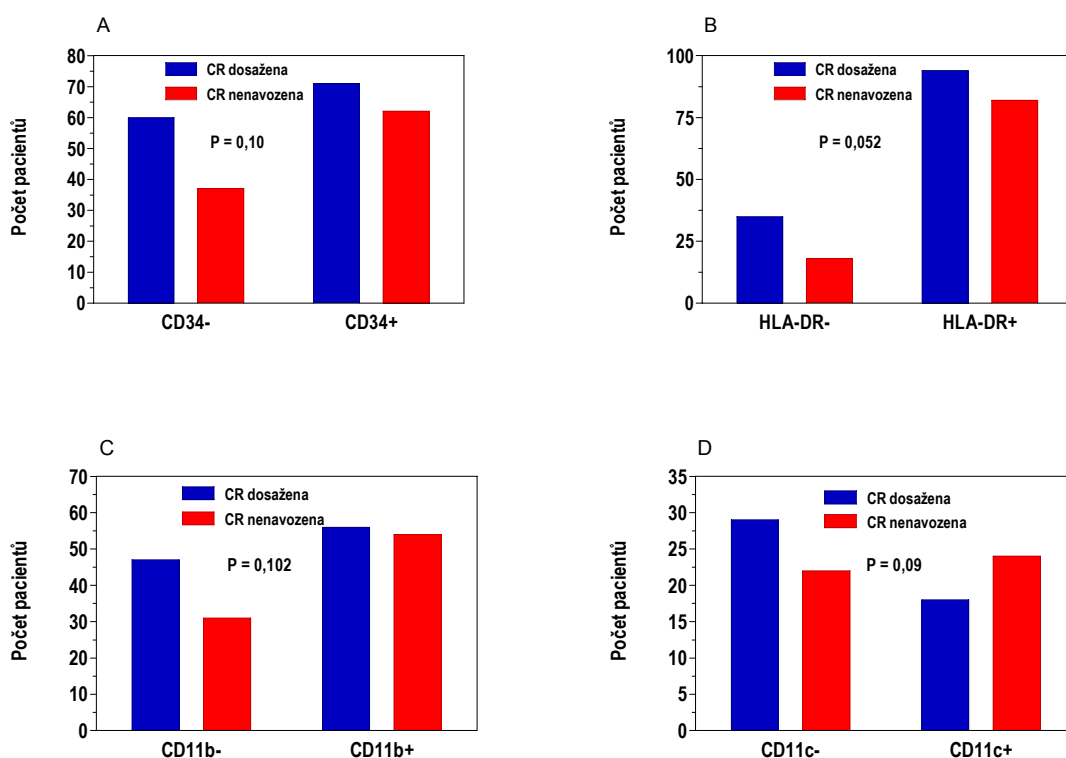
Antigeny	Počet testovaných	Pozitivní	Negativní
HLA-DR	239	184	55
CD34	240	140	100
CD33	249	236	13
CD13	251	226	25
CD15	220	98	122
CD11b	196	115	81
CD11c	99	45	54
CD14	228	57	171
CD117	40	32	8
T znaky (CD1-8)	195	36	159
B znaky (CD10,19-22)	179	10	169
NK znaky (CD16,56)	73	2	71
glykoforin A	97	3	94
CD41	22	0	22

Byla zjištěna statisticky významná korelace mezi expresí antigenu CD13 a také CD14 – pacienti s CD13+, respektive s CD14+ dosahovali nižší procento indukce CR, než pacienti bez exprese těchto antigenů (viz ). Určitý trend k nižšímu procentu dosažení indukce byl pozorován u pacientů s CD34+ AML, dále HLA-DR+, CD11b a CD11c (viz Obr. 28).





Obr. 27 Indukce CR u pacientů dle imunofenotypu CD13+ a CD13- (vpravo) a CD14+ a CD14- (vlevo). Hodnota P je výsledkem jednostranného  $\chi^2$  testu

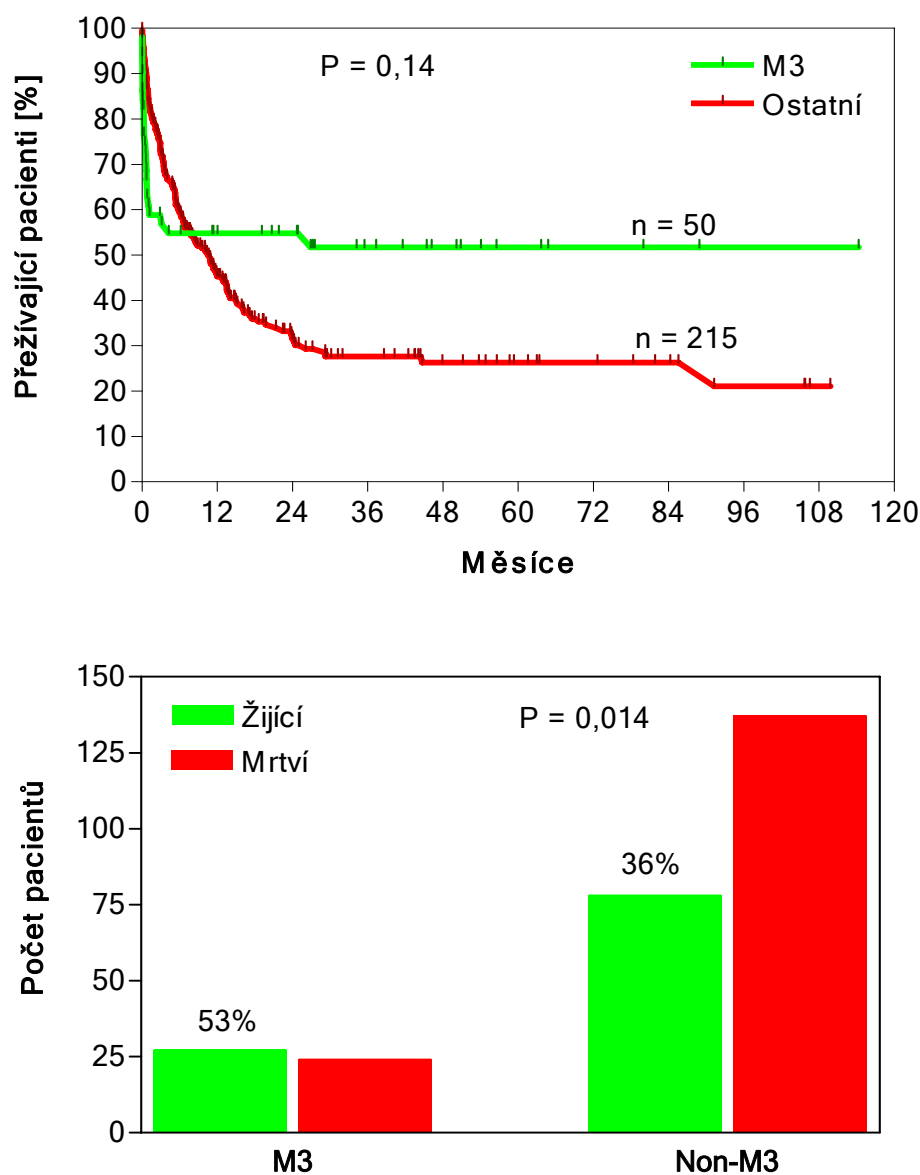


Obr. 28 Indukce CR u pacientů podle imunofenotypu. Hodnota P je výsledkem jednostranného  $\chi^2$  testu  
A: CD34, B: HLA-DR, C: CD11b, D: CD11c

#### 4.4 Prognóza u APL

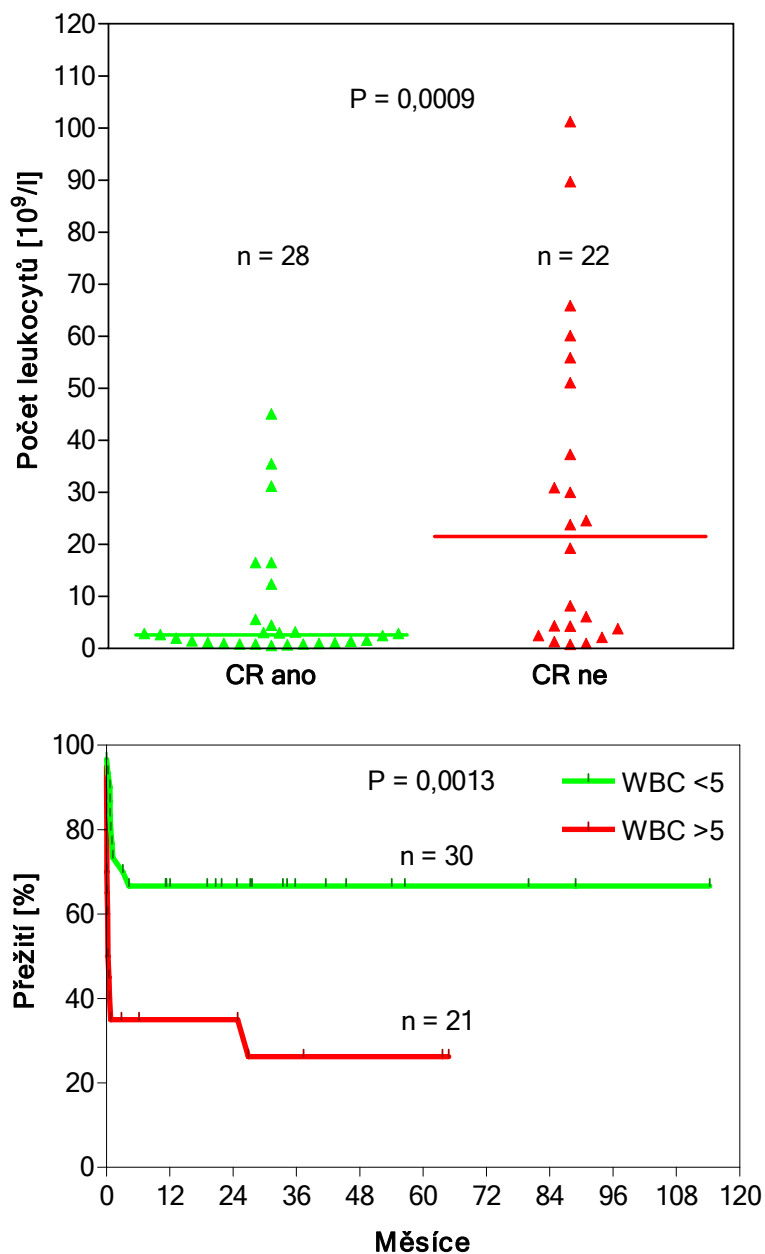
APL jsou klinicky i biologicky odlišnou skupinou AML, proto byly některé prognostické parametry analyzovány u této skupiny zvlášť. Již Obr. 26 ukázal, že pacienti s APL mají nejlepší přežití v rámci skupiny AML. Logrank test celkového přežití neukazuje signifikantní odlišnost, ačkoli je na první pohled patrný jasný rozdíl mezi oběma skupinami: pravděpodobnost přežití 9 let byla 51,7% u APL, ale jen 21,1% u ostatních typů AML. To bude předmětem diskuse.

Proto je na dalším obrázku (Obr. 29 dole) vyneseno pouze srovnání v proporcí žijících a mrtvých pacientů s APL a non-M3 AML, kde výsledek  $\chi^2$  testu je statisticky signifikantní.



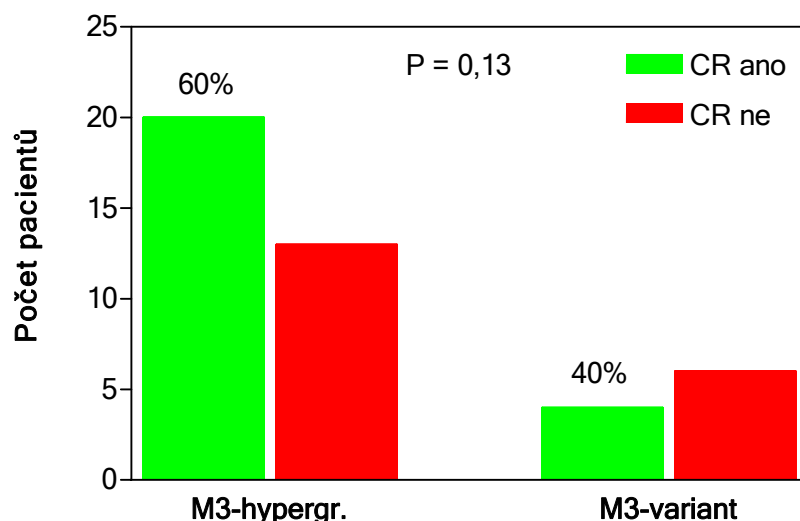
**Obr. 29** Srovnání celkového přežívání nemocných s APL a s ostatními typy AML  
 Nahore: křivky přežívání, P hodnota získána z Mantelova-Haenszelova logrank testu  
 Dole: srovnání poměru živých mrtvých pacientů k datu 30.11.00. Hodnota P je z  $\chi^2$  testu.

Dále byl analyzován vliv počtů leukocytů v době diagnózy jednak na dosažení kompletní remise, a jednak na celkové přežívání (viz Obr. 30). Počet leukocytů  $>5 \times 10^9/l$  je silným negativním prognostickým prognostickým faktorem z obou hledisek ( $P = 0,0009$ , resp.  $P = 0,0013$ ).



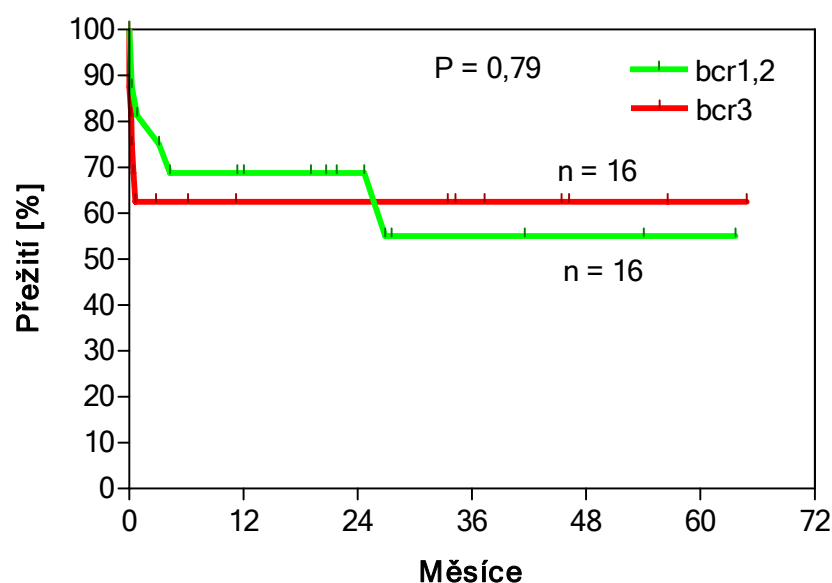
**Obr. 30** Indukce CR a celkové přežívání dle počtu leukocytů v době diagnózy u pacientů s APL  
 Nahoře: vyznačeny mediány počtu leukocytů, a hodnota P je výsledkem Mannova-Whitneyho testu o jednostranné alternativě srovnávajícího významnost počtu leukocytů na indukci CR  
 Dole: vyneseny křivky přežívání, a hodnota P je výsledkem analýzy Mantelovým-Haenszelovým testem.

Bylo také hodnoceno, zda variantní forma APL (FAB M3v) má horší prognózu, než standardní hypergranulární M3, alespoň pokud se týká navození kompletní remise (viz Obr. 31). Ačkoli procentuální dosažení kompletní remise se lišilo (40% proti 60%), výsledek nebyl při malých počtech hodnocených pacientů statisticky významný ( $P = 0,29$ ).



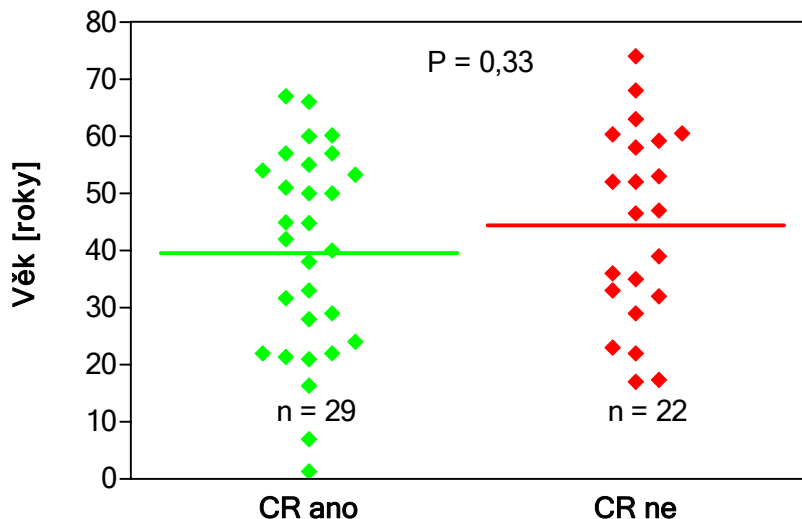
**Obr. 31 Srovnání dosažení CR u APL, hypergranulárního a variantního M3v subtypu**  
 Hodnota P je výsledkem jednostranného  $\chi^2$  testu

Další z analýz se týkala toho, zda typ zlomu na chromozomu 15 v genu PML u t(15;17) má prognostický dopad. Primery používané v naší laboratoři pro RT-PCR umožňují odlišení typu zlomu bcr3 od ostatních dvou – bcr1 a bcr2. Z literatury je známo, že pacienti s APL s typem zlomu bcr3 mají horší prognózu, než pacienti s bcr1 a 2. Obr. 32 sice naznačuje potvrzení této hypotézy, kdy průběh APL s bcr3 je v době těsně po stanovení diagnózy dramatičtější – je více časných úmrtí, avšak křivky přežívání se rychle vyrovnávají, a výsledné přežívání se neliší ( $P = 0,79$ ).



**Obr. 32 Celkové přežití pacientů s APL v závislosti na typu zlomu v genu PML u t(15;17)**  
 Hodnota P je výsledkem z Mantelova-Haenszelova testu

Možnost dosažení kompletní remise není u APL závislá na věku nemocných, což je patrné z následujícího obrázku (viz Obr. 33). Průměrný věk pacientů, kteří dosáhli kompletní remise byl 39,6 let, u těch, kteří kompletní remise nedosáhli, byl 44,4 let ( $P = 0,33$ ).



Obr. 33 Průměrný věk pacientů APL, kteří dosáhli nebo nedosáhli CR  
Přímkami vyznačují průměry. Hodnota P je výsledek nepárového t-testu o dvoustranné alternativě

## 4.5 Prognóza u CBF-AML

### 4.5.1 Poznámky k pacientům s fúzním genem AML1/ETO

Pacientů s  $t(8;21)$  bylo pouze osm a tvořili málo homogenní skupinu, včetně případu aleukemického myelosarkomu, který je podrobně rozebrán v kapitole 4.7.1. Morfologicky se jednalo o pět pacientů s AML FAB M2, jeden byl hodnocen jako FAB M4, a další jako FAB M1. Pozoruhodné je, že z osmi zachycených pacientů s touto aberací jsou živí pouze tři, z toho dva dlouhodobě – 4 a 6 let, z nich jeden byl alotransplantován a je v molekulární remisi, druhý žije, s tím, že je u něj občas detekována MRD. Ze dvou dětských pacientů žije jen jeden. Další pacientka ze Slovenska vypadla ze sledování, nemáme údaje o přežívání.

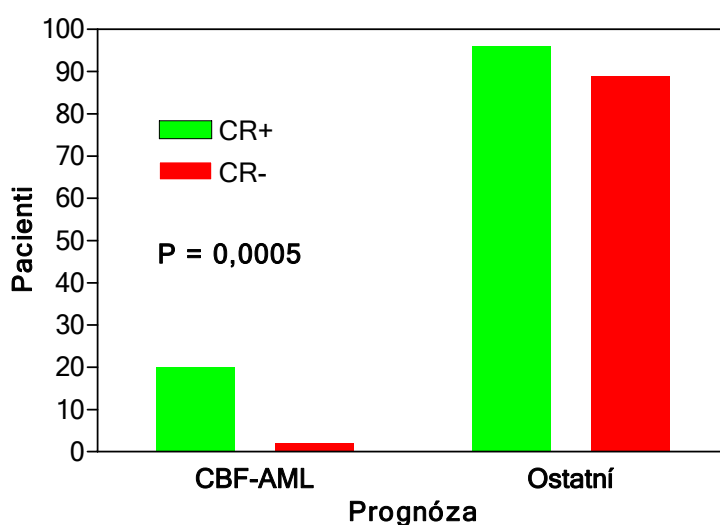
### 4.5.2 Poznámky k pacientům s fúzním genem CBF $\beta$ //MYH11

Zvláštní zmínku zaslouží pacienti se záchytem CBF $\beta$ /MYH11 genu. Z osmi pacientů zahrnutých do statistického hodnocení šlo v sedmi případech o AML FAB M4EO, jeden pacient byl klasifikován jako FAB M1. U dvou pacientů jde o nedávné záchyty, jednoho nelze posoudit ani co do dosažení CR. Ze sedmi nemocných šest dosáhlo kompletní remise (tj. 85,7%), u poslední pacientky šlo o parciální remisi. Ze sedmi pacientů byli čtyři transplantováni, z toho tři alogenně, jeden autologně.

Nicméně došlo k relapsům u pěti ze sedmi pacientů, z toho šlo ve dvou případech o pacienty s alotransplantací kostní dřeně. Z pěti relapsů byly dva zachyceny zároveň v CNS, u třetího po alotransplantaci byla diagnostikována "meningitis", ačkoli CNS relaps byl suspektní. k 30.11.00 žilo z osmi pacientů šest, z toho jeden ve 2. kompletní remisi a jeden v relapsu. Z molekulárně biologického hlediska byl u sedmi pacientů potvrzen nejčastější typ bodu zlomu A (dle literatury se vyskytuje v 85% případů [98]), u poslední pacientky jsme detekovali typ bodu zlomu J, dosud známého pouze jako jediný výskyt [128]. Tento případ je podrobně diskutován v kapitole 4.7.2.

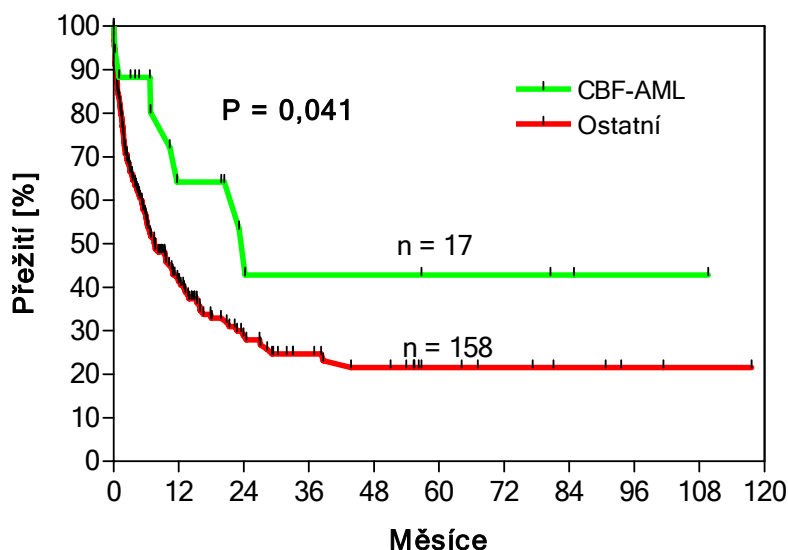
#### 4.5.3 Kompletní remise a celkové přežití u CBF-AML

V této kapitole jsou prezentovány výsledky analýzy skupiny pacientů s tzv. CBF-AML, tedy nesoucích jednu z následujících translokací, respektive inverzí: t(8;21), t(16;16) či inv(16). Tyto výsledky jsou součástí publikace podané do časopisu Folia Biologica v srpnu roku 2006 (viz **Error! Reference source not found.**) a jsou použita data dostupná v roce 2003, narozdíl od ostatních analýz s daty do roku 2000 včetně, uváděných v této práci. Byla hodnocena skupina pacientů s CBF-AML oproti pacientům bez prognosticky příznivé aberace (pacienti s APL v této analýze nejsou zahrnuti). Celkem bylo molekulárně biologicky vyšetřeno 431 dospělých pacientů, 215 z nich byli muži, 216 byly ženy. Věkový medián byl 48,2 roku (od 15 do 85 let). 19 pacientů bylo *AML1/ETO* pozitivních a 15 *CBFβ/MYH11* pozitivních. V hodnocené skupině bylo 208 pacientů s dostupnými klinickými údaji, z nichž 119 dosáhlo kompletní remise. Z grafu (Obr. 34) je patrné, že pacienti s jednou z CBF aberací dosahovali signifikantně častěji kompletní remise oproti pacientům bez této aberace ( $P = 0.0005$ , Obr. 34).



**Obr. 34** Indukce CR u AML dle CBF aberace  
Hodnota P je výsledkem  $\chi^2$  testu v kontingenční tabulce

Bylo také hodnoceno celkové přežívání pacientů a to k 31. prosinci 2003. K tomuto datu byly dostupné údaje pro 175 pacientů, z nichž 64 bylo naživo. Logrank test celkového přežití prokázal signifikantně lepší celkové přežívání pacientů s jednou z CBF aberací oproti pacientům bez této aberace ( $P = 0.041$ , Obr. 35).

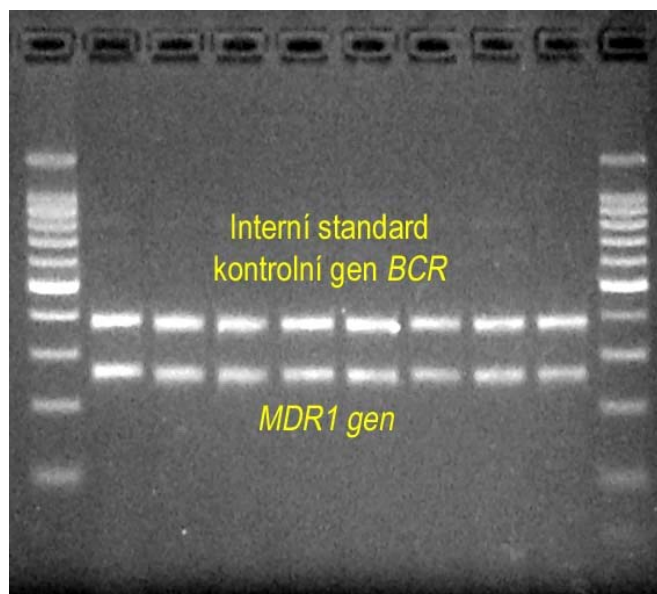


Obr. 35 Přežívání pacientů podle přítomnosti CBF aberací  
Hodnota P je výsledkem Mantelova-Haenszelova testu s jednostrannou alternativou

## 4.6 Prognóza a zvýšená exprese MDR1/Pgp

### 4.6.1 Metodika

Původní plán pro stanovení exprese MDR1 genu počítal s využitím přístroje pro real-time PCR, který měl být zakoupen na ÚHKKT již v době přípravy tohoto projektu. Vzhledem k tomu, že tento přístroj byl skutečně zakoupen až na konci roku 2001, jsem byla nucena použít alternativní metodu komparativního semikvantitativního stanovení a modifikovat ji pro mé potřeby stanovení exprese MDR1 genu s použitím interního standardu a zároveň kontrolního genu BCR (viz Obr. 36). Pro zpracování jsem zvolila přístroj Kodak Digital Science™ Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (dále jen EDAS) a program Kodak Digital Science™ 1D Image Analysis Software (dále jen DIAS).



**Obr. 36 Elektroforéza BCR/MDR1 genů**

Fotografie gelu se vzorky DNA testovaných zdravých dárců na expresi genu MDR1 a interního standardu BCR. Fotografie byla pořízena systémem Kodak EDAS (viz Metody)

Jak již bylo zmíněno v kapitole 0 Pacienti, materiál a metody, pro komparativní stanovení exprese genů MDR1 [123] a BCR [124] byla použita cDNA, případně RNA archivovaných vzorků od pacientů s diagnózou záchytu AML. Postup izolace RNA a RT byl stejný, jako u rutinně prováděných vyšetření fúzních genů. Metoda semikvantitativní komparativní PCR je založena na principu současné amplifikace sledovaného genu i genu kontrolního v jedné zkumavce. Kontrolní gen zároveň funguje jako tzv. interní standard, tedy gen s přibližně stejně velkou expresí ve všech buňkách organismu i druhu.

V mém případě jsem zvolila gen BCR, který je konstitutivně exprimován v lidských buňkách i v buňkách buněčných linií a jeho exprese při daném počtu cyklů PCR je řádově srovnatelná s expresí genu MDR1 (na rozdíl např. u kontrolního genu ABL). Reakce byla laděna na vzorcích transfekované linie K562M (dr. Jelínek, ÚHK), která zvýšeně exprimuje gen MDR1. Dále byly testovány vzorky periferní krve a kostní dřeně zdravých dárců, které byly připraveny stejným postupem, jako ostatní vzorky, z těchto dat byla na základě průměrné výše exprese MDR1/Pgp stanovena cut-off hladina, která se lišila pro oba typy vzorků (viz kapitola 1). Počet cyklů programu byl vyladěn tak, aby výsledný produkt byl odebírán ještě v exponenciální fázi reakce. Složení reakční směsi PCR a amplifikační program je podrobně popsán v kapitole 0 Pacienti, materiál a metody.



Pro detekci a konečné stanovení exprese MDR1 genu byl použit EDAS, který umožňuje vytvořit digitální fotografii gelu vizualizovaného UV světlem a přímo ji zpracovat pomocí programu DIAS. Tento program vyhodnocuje intenzitu proužků (bandů) vůči intenzitě proužků standardního markeru (žebříku), u nějž známe z firemních údajů množství DNA (bp/ng) obsažené v každém proužku. Pro tuto analýzu bylo použito standardní množství 100bp DNA Ladder (Promega).

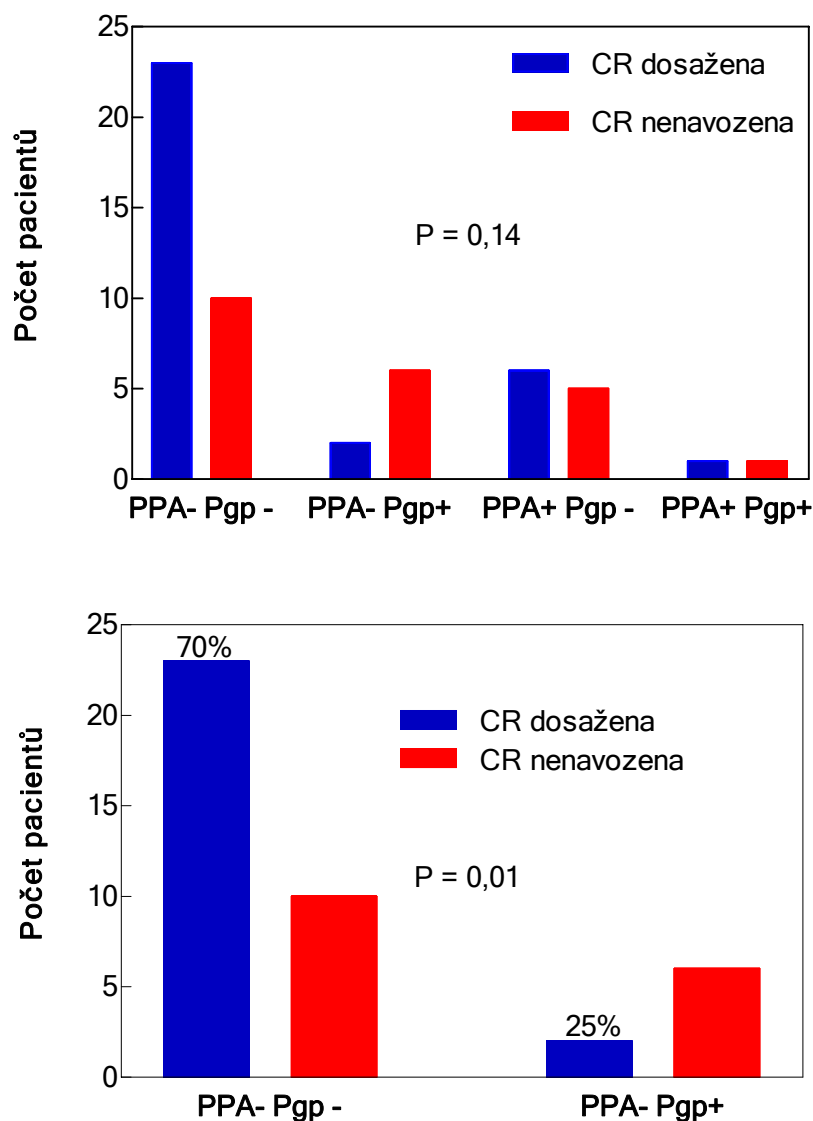
Hodnoty získané ze softwarové analýzy gelu udávají množství DNA v ng a velikost pruhu (bandu) v počtu bp jak pro MDR1, tak pro BCR. Intenzita exprese genu MDR1 byla vyjádřena jako poměr množství DNA (v ng) MDR1 ku BCR a ve statistických analýzách byl dále hodnocen tento relativní poměr.

Jak již bylo uvedeno v kapitole 0, problematika metod používaných k detekci exprese MDR1/Pgp je i přes řadu prací zabývajících se mnohočetnou lékovou rezistencí stále ještě nedořešená. I přes fakt, že jsme se snažili dodržet všechna pravidla pro objektivitu a statistickou zhodnotitelnost dat získaných výše zmíněnými postupy, jsem si vědomi některých nedostatků v námi použité metodice. Tyto nedostatky a s nimi spojené otázky jsou podrobně probrány v kapitole 1.

#### **4.6.2 Pgp a indukce CR**

Pomocí průtokové fluorocytometrie byla zjišťována povrchová exprese Pgp u celkem 57 pacientů, ale pouze u 29 z nich šlo o vyšetření v ÚHKT citlivější protilátkou UIC2. Povrchová exprese Pgp vyjádřená jako kvantitativní množství Pgp+ buněk neovlivnila indukci CR ani v souboru všech vyšetřených pacientů (viz Obr. 37 nahoře), ani u pacientů vyšetřených pouze v ÚHKT (viz Obr. 37 dole).





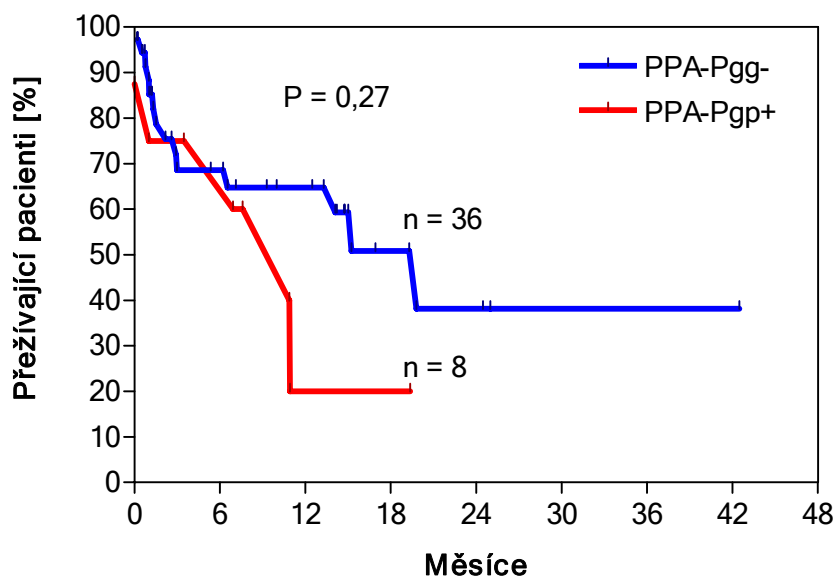
**Obr. 38 Dosažení CR podle povrchové exprese Pgp a přítomnosti PPA**

Expresse Pgp hodnocena pouze jako pozitivní nebo negativní. Hodnoty P byly získány v  $\chi^2$  testu

Nahore: Srovnání 4 skupin pacientů: PPA<sup>-</sup>Pgp<sup>-</sup>, PPA<sup>-</sup>Pgp<sup>+</sup>, PPA<sup>+</sup>Pgp<sup>-</sup> a PPA<sup>+</sup>Pgp<sup>+</sup>, dole: srovnání pouze PPA<sup>-</sup> pacientů podle exprese Pgp

Nicméně nápadný rozdíl byl mezi skupinou PPA<sup>-</sup>Pgp<sup>-</sup> a PPA<sup>-</sup>Pgp<sup>+</sup> pacientů, proto byly porovnány zvlášť (viz Obr. 38 dole). Mezi těmito skupinami byl skutečně statisticky významný rozdíl v indukci kompletní remise ( $P = 0,01$ ).

Byla sestrojena křivka přežití u pacientů bez PPA podle přítomnosti Pgp na povrchu buněk (viz Obr. 39). Z ní je zřejmé, že nebyl signifikantní rozdíl mezi skupinou exprimující a neexprimující Pgp. Je však třeba konstatovat, že počty hodnocených pacientů byly malé a medián sledování krátký.



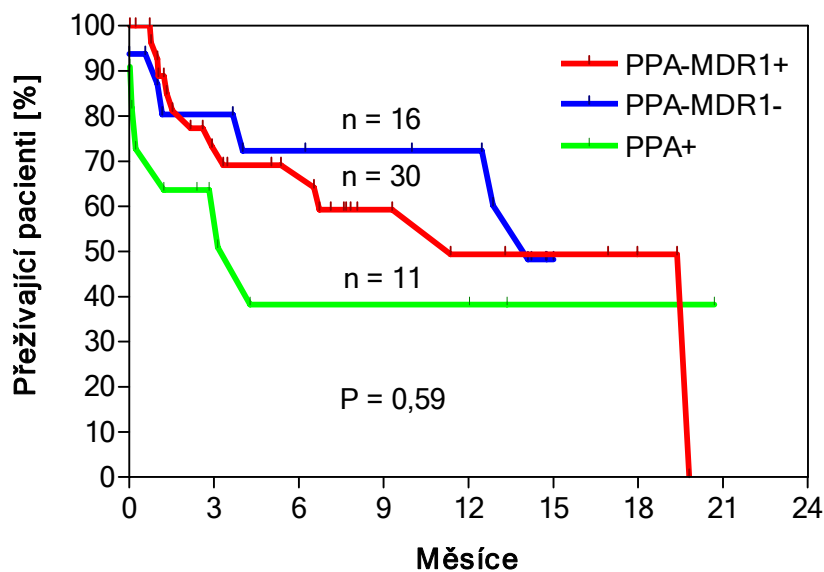
**Obr. 39 Celkové přežívání pacientů bez PPA podle exprese Pgp**  
 Hodnota P je výsledkem z Mantelova-Haenszelova testu

#### 4.6.4 MDR1: vliv na navození CR a OS

Expresí genu MDR1, stanovovaná jako její poměr ku kontrolnímu genu (internímu standardu, genu BCR, v RT-PCR s interním standardem, viz Obr. 36), měla dle očekávání jiný průměr v periferní krvi a jiný v kostní dřeni (0,64 oproti 0,49). Tento rozdíl byl zřejmý především u pacientů, od nichž jsme získali vzorky z periferie a dřeně současně. Z tohoto důvodu byla exprese MDR1 pro navození kompletní remise stanovována pro oba typy vzorků zvlášť. Hranice mezi pozitivní a negativní expresí (tzv. „cut-off level“) byla stanovena zvlášť pro vzorky z periferní krve a z kostní dřeně. U vzorků z periferní krve byla pozitivní výsledky s poměrem exprese MDR1/BCR větším jak 0,5, u vzorků z kostní dřeně byl za pozitivní brán poměr větší jak 0,5.

Expresí MDR1 v periferní krvi (viz Obr. 41 A) byla prakticky stejná u nemocných, kteří dosáhli a kteří nedosáhli kompletní remise ( $P = 0,35$ ). Naopak exprese MDR1 v kostní dřeni byla významně vyšší u pacientů, u kterých se kompletní remisi nezdařilo navodit.

Tento rozdíl byl patrný při použití Mann-Whitneyho testu (viz Obr. 41 B), kde nulová hypotéza se týká mediánů ( $P = 0,041$ ). Naopak při nulové hypotéze o průměru výsledek nebyl v nepárovém t-testu (viz Obr. 41 C) signifikantní ( $P = 0,065$ ). Medián totiž podstatně lépe vystihoval distribuci získaných hodnot, tj. skutečnost, že hodnoty poměru exprese MDR1/BCR byly buďto nulové, anebo až kolem hodnoty 0,4 a vyšší.

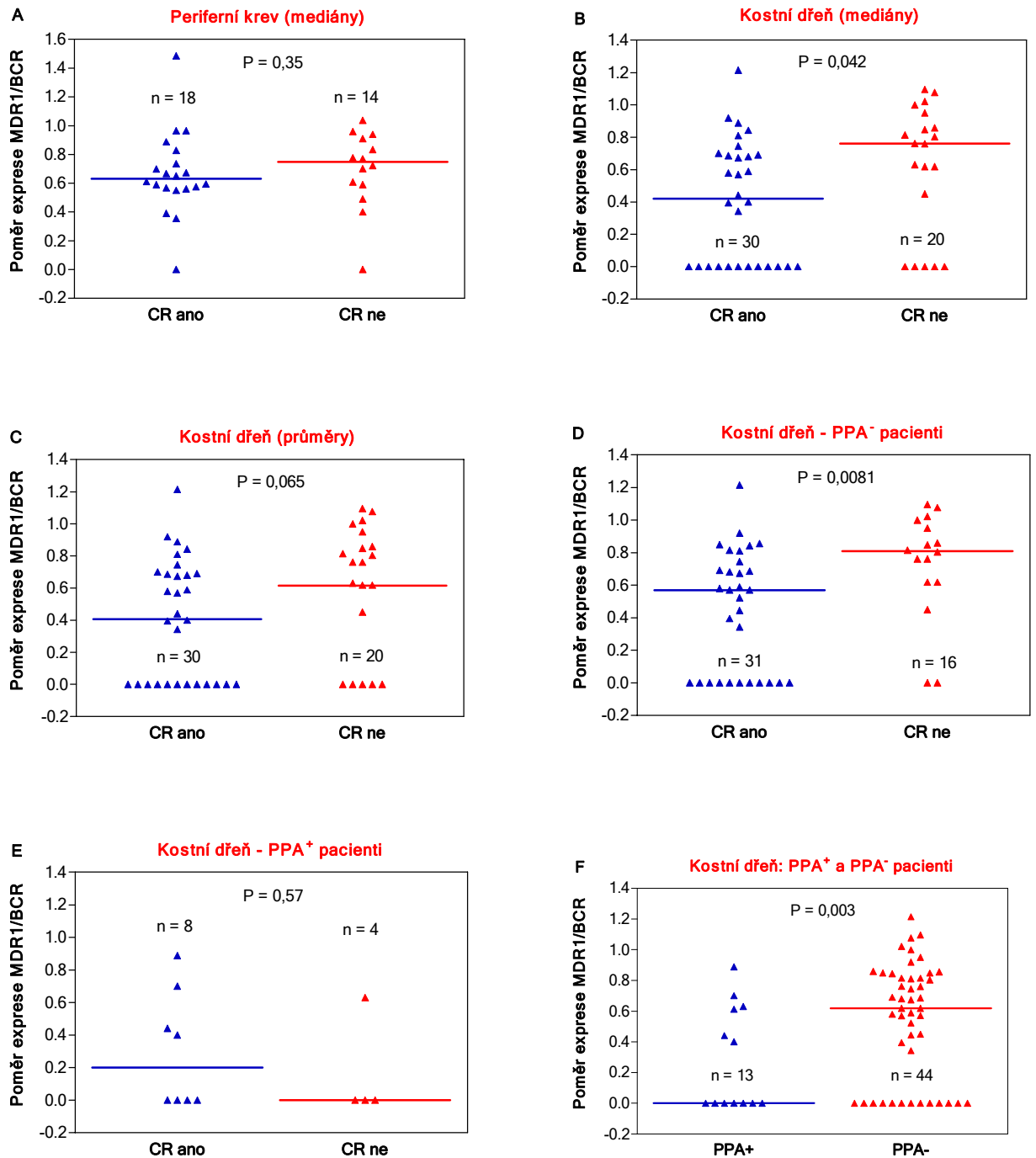


**Obr. 40** Vliv exprese MDR1 na celkové přežití u pacientů bez PPA

Vyneseny i hodnoty pacientů s PPA. Hodnota P je výsledkem z Mantelova-Haenszelova logrank testu

Velmi důležité zjištění pro nás je zachyceno na dalším obrázku (viz Obr. 41 D), srovnávajícím indukci kompletní remise u nemocných bez záchytu PPA. Pacienti, kteří dosáhli kompletní remise, měli podstatně nižší expresí MDR1 (tj. poměr exprese MDR1/BCR), než pacienti, kteří se do kompletní remise nedostali ( $P = 0,008$ ). Pozitivní vliv nižší exprese genu MDR1 na dosažení kompletní remise se ale již neprojevil na výsledcích analýzy celkového přežití ve skupinách nemocných s nízkým indexem exprese MDR1/BCR  $<0,5$  a s vysokým indexem  $>0,5$  (viz Obr. 40;  $P = 0,59$ ).

Obr. 41 E srovnává hodnoty poměru MDR1/BCR u pacientů s pozitivním záchytem PPA, kteří dosáhli či nedosáhli kompletní remise. Hodnoty se nijak neliší ( $P = 0,57$ ), avšak počty pacientů jsou velmi nízké. Obr. 41 F zachycuje srovnání indexů MDR1/BCR u pacientů s PPA a bez PPA. Není překvapením, že tento index (exprese MDR1) je vyšší u pacientů bez PPA ( $P = 0,003$ ).



Obr. 41 Exprese MDR1

A – hodnoty indexu MDR1/BCR v periferní krvi u pacientů kteří dosáhli, resp. nedosáhli CR.

Zobrazeny mediány. Hodnota P v dvoustranném Mannově-Whitneyho testu

B – hodnoty indexu MDR1/BCR v kostní dřeni u pacientů kteří dosáhli CR, se

zobrazením mediánu. P je výsledek v dvoustranném Mannově-Whitneyho testu

C – totéž se zobrazením průměru. P je výsledek z dvoustranného nepárového t-testu

D – hodnoty indexu MDR1/BCR v kostní dřeni u pacientů kteří dosáhli CR u

pacientů bez PPA. Zobrazeny mediány. Hodnota P je z dvoustranného Mannova-Whitneyho testu

E – hodnoty indexu MDR1/BCR v kostní dřeni u pacientů kteří dosáhli CR u

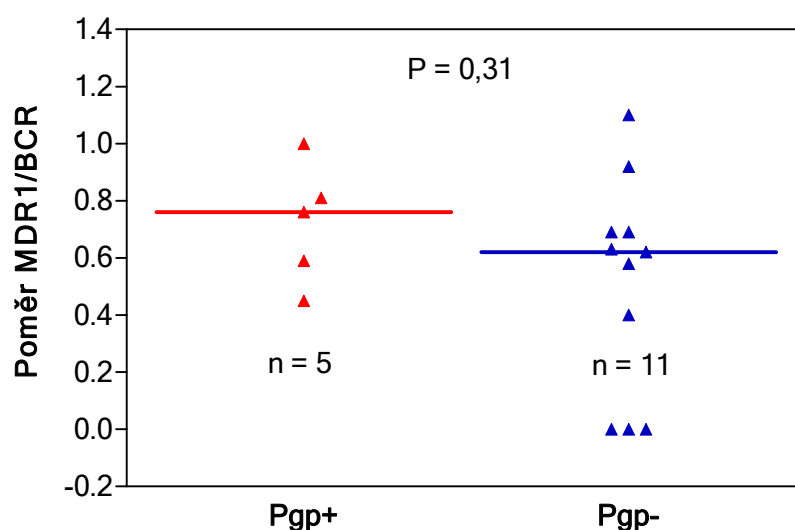
pacientů s PPA. Zobrazeny mediány. Hodnota P je z dvoustranného Mannova-Whitneyho testu

F – srovnání hodnot indexu MDR1/BCR u pacientů s PPA a bez PPA. Hodnota P je z

dvoustranného Mannova-Whitneyho testu.

#### 4.6.5 Vztah mezi expresí Pgp a expresí genu MDR1

Byl zkoumán též vztah mezi výsledky povrchové analýzy Pgp v průtokové cytometrii a hodnotami, získanými při komparativním RT-PCR stanovením exprese MDR1. Obr. 42 ukazuje, že není jednoznačně jasný vztah mezi oběma veličinami ( $P = 0,31$  v Mannově Whitneyho testu), i když např. průměry se liší (přesto však insignifikantně i v párovém t-testu; pro Pgp<sup>+</sup> hodnota průměru  $0,72 \pm 0,09$ , pro Pgp<sup>-</sup>  $0,51 \pm 0,11$ ,  $P = 0,26$ ). Počet pacientů vyšetřených oběma metodami zároveň je však velmi nízký.



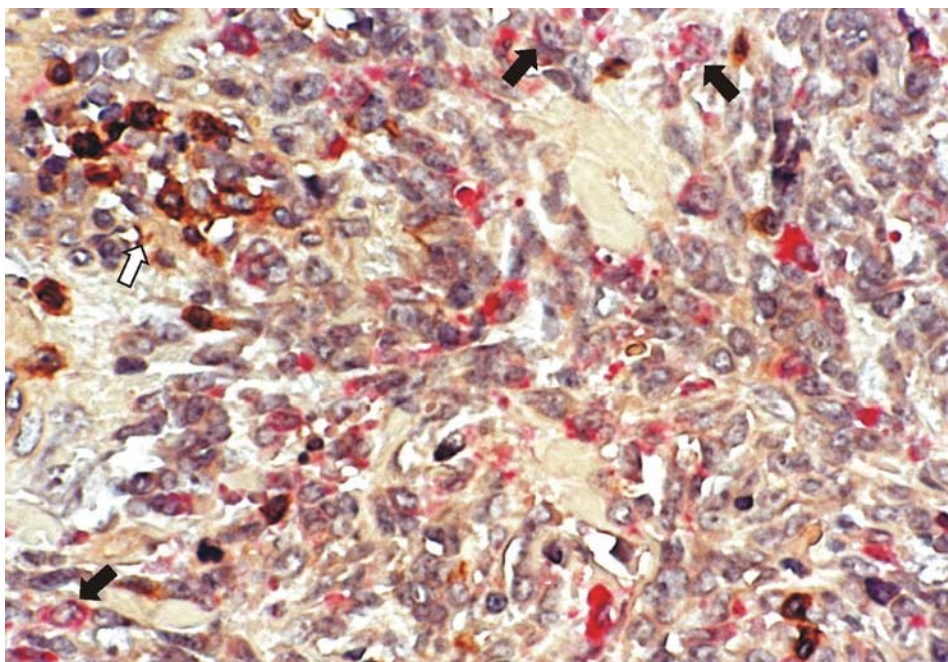
Obr. 42 Srovnání exprese MDR1 (indexu MDR1/BCR) a P-gp  
Vyznačeny mediány hodnot. Hodnota P je výsledek v Mannově-Whitneyho testu o dvoustranné alternativě

### 4.7 Kazuistiky

#### 4.7.1 Popis případu myelosarkomu s t(8;21) a klonálními T lymfocyty

V rámci screeningu PPA byla potvrzena přítomnost fúzního genu AML1/ETO u 33letého pacienta, u kterého byl předtím, patrně mylně, diagnostikován non-Hodgkinský lymfom (NHL) oblasti krku. Ačkoli byl nádor zpočátku považován za suspektní chlorom při zelenavé makroskopii a histochemickém průkazu chlóracetátsterázy (CAE), byla učiněna diagnóza NHL vzhledem k extenzivní lymfocytární infiltraci v nádoru.

Chemoterapií byla navozena krátká remise. Při relapsu na stejném místě již nádor nebyl nazelenalý a při dvojitém barvení na CAE a zároveň na pan-T znak CD45RO byly zjištěny četné T lymfocyty rozptýlené mezi myeloidními prekurzory (viz Obr. 43).

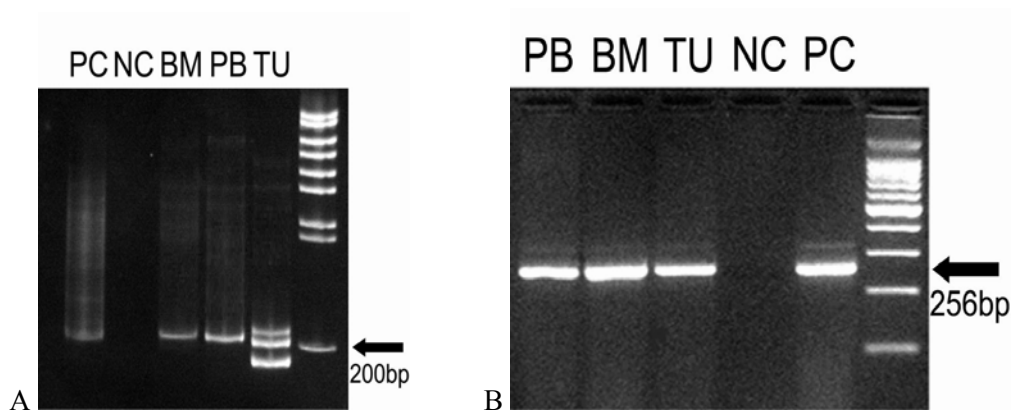


**Obr. 43** Histologický snímek tumoru po relapsu. Dvojitě barvení s imunoperoxidázou pro detekci CD45RO a CAE. Prázdná šipka označuje skupinu CD45RO+ T lymfocytů, obarvených hnědě. Červeně obarvené granulocytární buňky jsou CAE +. Černé šipky ukazují ostatní méně vyztřelé buňky s lehce obarvenou cytoplasmou a s dobře patrnou strukturou chromatinu. Více vyztřelé buňky z granulocytární řady jsou obarveny výrazně červeně. 1285 x zvětšeno

Průkaz bíaleické přestavby  $\gamma$ -řetězce receptoru T buněk (TcR $\gamma$ ) zdánlivě potvrzoval uvažovanou diagnózu NHL T řady (viz Obr. 44). Pacient dostal další cykly chemoterapie. V následné remisi byla provedena autologní transplantace periferních progenitorových buněk, pacient však podlehl pneumonii, a to bez jakýchkoli známek původního onemocnění. Teprve post mortem byl pomocí RT-PCR prokázán fúzní gen AML1/ETO (výsledek translokace 8;21 typické pro některé AML) ve zmrazeném vzorku tumoru z doby relapsu. Navíc byl transkript tohoto genu detekován i ve vzorcích jinak zcela normální kostní dřeně i periferní krve nabraných týden před klinickým relapsem nádoru (viz Obr. 44).

Sekvenční analýza PCR produktů následně odhalila, že přestavby TcR $\gamma$  v nádoru na jedné straně a ve dřeni, resp. V periferní krvi na straně druhé byly sice podobné, nikoli však identické. Tento případ byl naší skupinou publikován roce 2001 v časopisu Leukemia Research.





**Obr. 44 Elektroforéza PCR produktů**

(A) Vzorky periferní krve, kostní dřeně a tumorózní tkáň popisovaného pacienta po PCR detekci rearrangementu TCR $\gamma$  řetězce. PC – pozitivní kontrola, NC – negativní kontrola, BM – kostní dřeň, PB – periferní krev, TU – tumor. 3 proužky z tumorózní tkáňe a proužky z kostní dřeně a z periferní krve byly testovány za použití specifických primerů a dále sekvenovány a bylo prokázáno, že se liší.

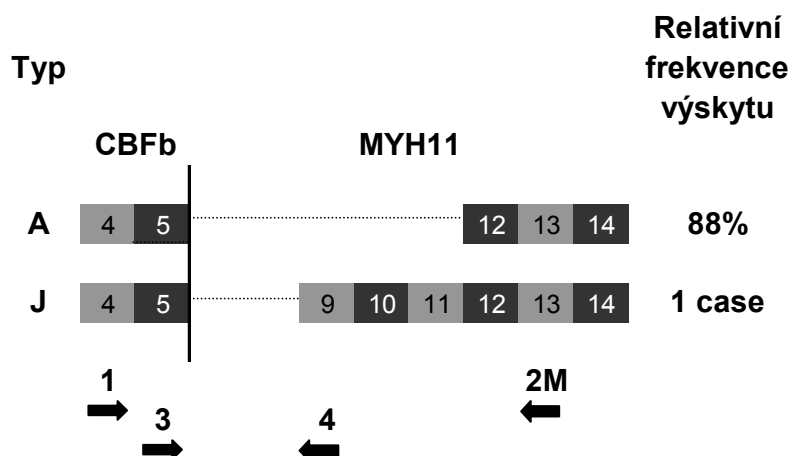
(B) Elektroforetická analýza PCR produktů ze vzorků periferní krve, kostní dřeně a tumorózní tkáňe popisovaného pacienta po RT-PCR detekci AML1/ETO fúzního genu. Marker – 100bp Ladder, Promega. Šipka ukazuje délku produktů v párech bází vzhledem k markeru.

#### 4.7.2 Zjištění druhého popsaného výskytu typu J bodu zlomu u pacientky s inv(16)

V tomto případě se jednalo o 71letou pacientku, hospitalizovanou na ÚHKT v listopadu 1997 pro kašel, dechovou nedostatečnost a gastroenteritidu. Vyšetření krevních elementů prokázalo následující údaje: leukocyty 9,4 ( $10^9/l$ ), 73% buněk v diferenciálu byly atypické monocyty, myelomonocyty a monoblasty a pouze 1% tvořily eozinofily. Hladina hemoglobinu byla 6g/dl, počet destiček byl 18( $10^9/l$ ). Nicméně vyšetření kostní dřeně prokázalo eozinofilii (16,4%) a přítomnost 67,4% myelomonocytárních blastů. Pacientka měla celkem standardní imunofenotyp CD34,11b,14,15+. Standardní cytogenetika (G-proužkování) prokázala pericentrickou inverzi 16 chromozomu, potvrzenou následně též RT-PCR. Na základě těchto výsledků byla stanovena diagnóza AML M4Eo. Vzhledem k celkovému špatnému stavu byla pacientka залéčena nízkodávkovanou indukční terapií idarubicinem, cytosin-arabinosidem (AraC) a etoposidem (tzv. „mini ICE“ protokol). Pacientka dosáhla kompletní remise a byla konsolidována dvěma cykly střednědávkované terapie cytarabinem kombinovaným idarubicinem (tzv. IDIA protokol). V srpnu roku 1998 pacientka zrelabovala v kostní dřeni a v CNS a zemřela v prosinci 1998 na následky sepse a kardiálních komplikací po reindukční terapii, 10,4 měsíce od data diagnózy.

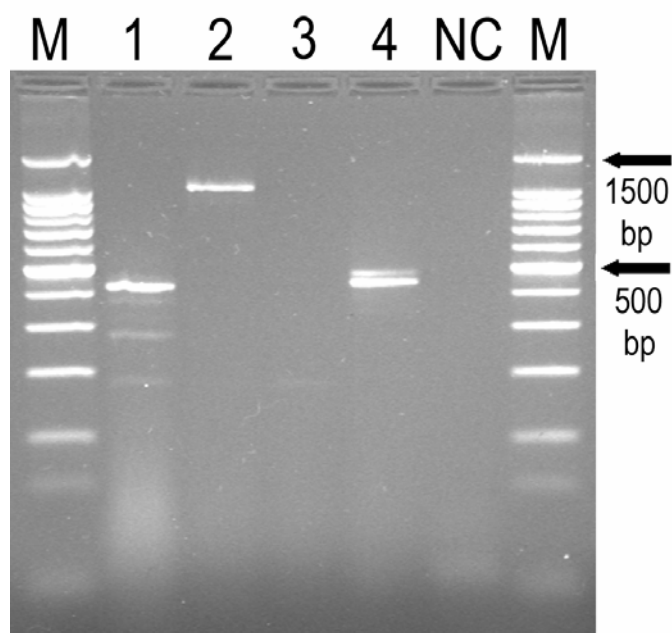
Po provedení RT-PCR (podrobnější popis viz kapitola 3.3.2.5) pro detekci CBF $\beta$ /MYH11 fúzního genu se standardní sadou primerů (pr1 a 2M) elektroforetická detekce prokázala PCR produkt jiné délky (počtu bp), než je obvyklé.

Při použití tzv. „nested“ sady primerů (pr3 a pr4) byly detekovány dva blízko sebe ležící pruhy (horní slabší, dolní silnější), z čehož jsem usoudila na možný alternativní sestřih [128] některého z netypických bodů zlomu CBF $\beta$ /MYH11 fúzního genu (viz Obr. 45 a Obr. 46).



Obr. 45 Schématické znázornění typu bodu zlomu A a J

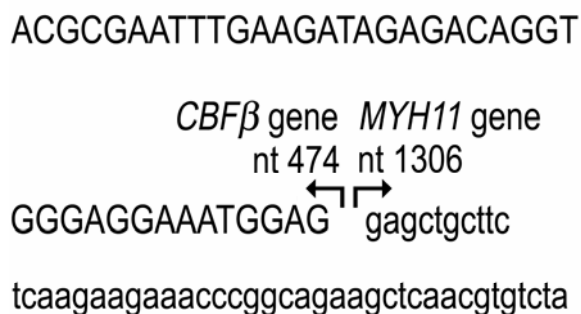
Šipky znázorňují místa nasedání primerů (1 a 2M, nested primery 3 a 4) používaných pro detekci CBF $\beta$ /MYH11 fúzního proteinu



Obr. 46 Elektroforetická analýza vzorků

1 – pacient s typem bodu zlomu A při použití standardních primerů pr1 a 2M, 2 – pacientka s typem bodu zlomu J s týmiž primery, 3 – 1 za použití nested primerů pr3 a pr4, 4 – 2 za použití nested primerů, NC – negativní kontrola, M – marker – 100bp ladder, Promega. Šipky označují polohu proužků markeru o délce 1500 a 500 bp. U proužku ze 4. jamky je možné rozlišit horní tenčí a dolní silnější pruh – po sekvenování bylo zjištěno, že horní pruh je produktem alternativního sestřihu

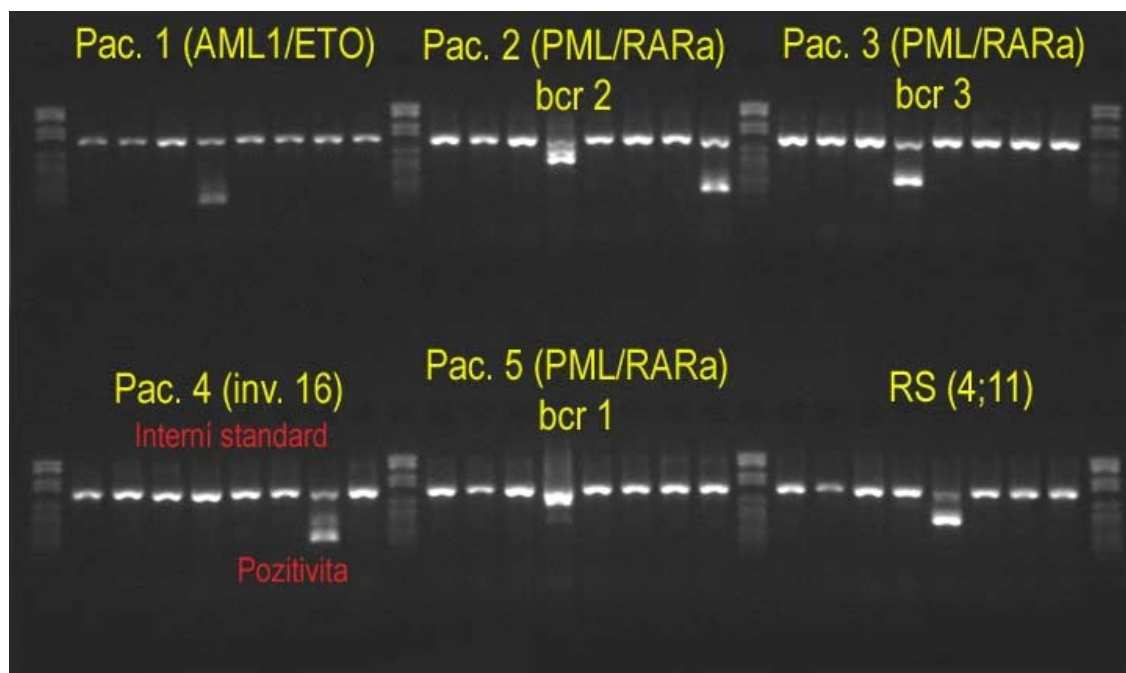
Následná sekvenční analýza prokázala, že záchyt druhého typu J zlomového místa v genu MYH11 (podle nomenklatury BIOMED 1) [98]. Obr. 47 ukazuje sekvenci detekovaného typu bodu zlomu J. Tento typ bodu zlomu byl zatím publikován pouze jednou Illandem a spol. [129]. Tento případ ukazuje, že se nejedná o náhodný zlom ve vztahu k fúznímu genu CBF $\beta$ /MYH11.



Obr. 47 Sekvenční analýza vzorku pacientky s typem bodu zlomu J

#### 4.8 Poznámky k RT-PCR

V rámci postgraduálního studia jsem byla na stáži na dánském pracovišti u dr. Paalisgaarda, které jako první ve světě publikovalo užití systému 8 multiplex reakcí k detekci 29 nejčastějších známých chromozomálních aberací u akutních leukémií (AML i ALL), kterými detekují některou ze strukturálních chromozomálních aberací u 44% všech testovaných AML [56].



Obr. 48 Multiplex RT-PCR – vzorky pacientů se známými translokacemi

Tabulka 16 uvádí přehled všech translokací detekovatelných pomocí kitu Hema Vision® od firmy Bio-Rad a genů tvořících tyto translokace. Touto metodou byly verifikovány pozitivní záchyty genů PML/RAR $\alpha$  (jak s bcr1,2, tak s bcr3 zlomem), AML1/ETO a CBF $\beta$ /MYH11 pacientů diagnostikovaných na našem pracovišti. Obr. 48 ukazuje výsledek druhého kola multiplex reakce s těmito vzorky.

**Tabulka 16 Přehled translokací detekovatelných pomocí kitu Hema Vision®**

Translokace	Geny
TAL1 <sup>d</sup> (40 kb delece)	SIL1(1p34), TAL1 (1p34)
t(1;11)(q21;q23)	MLL1(11q23), AF1q(1q21)
t(1;19)(q23;p13)	E2A(19p13), PBX1(1q23)
t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22), EVI1(3q26)
t(3;5)(q25.1;q34)	NPM(5q35), MLF1(3q25.1)
t(4;11)(q21;q23)	MLL1(11q23), AF4(4q21)
t(5;12)(q33;p13)	TEL(12p13), PDGFR $\beta$ (5q23)
t(5;17)(q35;q21)	NPM(5q35),RAR $\alpha$ (17q21)
t(6;9)(p23;q24)	DEK(6p23), CAN(9q34)
t(8;21)(q22;q22)	AML1(21q22), MTG8(8q22)
t(9;12)(q34;p13)	TEL(12p13), ABL(9q34)
t(9;22)(q34;q11)	BCR(22q11), ABL(9q34)
t(10;11)(p12;q23)	MLL1(11q23), AF10(10p12)
t(6;11)(q27;q23)	MLL1(11q23), AF6(6q27)
t(1;11)(p32;q23)	MLL1(11q23), AF-1p(1p32)
t(11;17)(q23;q21)	PLZF(11q23), RAR $\alpha$ (17q21)
t(11;19)(q23;p13.1)	MLL1(11q23), ELL(19p13.1)
t(11;19)(q23;p13.3)	MLL1(11q23), ENL(19p13.3)
t(X;11)(q13;23)	MLL1(11q23), AFX1(Xq13)
t(9;9)	SET(9q34), CAN(9q34)
t(9;11)(q22;q23)	MLL1(11q23), AF9(9q22)
t(12;21)(p13;q22)	TEL(12p13), AML1(21q22)
t(12;22)(p13q11)	TEL(12p13), MN1(22q11)
t(15;17)(q21;q22)	PML(15q22), RAR $\alpha$ (17q21)
t(16;21)(q11;q22)	TLS(16p11), ERG(21q22)
inv(16)(p13q22)	CBF $\beta$ (16q22), MYH11(16p13)
t(17;19)(q22;p13)	E2A(19p13), HLF(17q22)

Jak již bylo uvedeno, metoda probíhá v osmi oddělených reakcích a to dvoukolově, kdy ve druhém kole jsou původní primery nahrazeny nested primery, čímž se reakce stává citlivější. Reakci předchází reverzní transkripce s použitím specifických primerů, aby se zamezilo amplifikaci nespecifických produktů a snížil se tak celkový výskyt nespecificit.

V případě pozitivního výsledku v některé z multiplex reakcí jsou vzorky testovány ve split-out reakcích, kdy všechny testované geny z dané multiplex reakce se otestují znovu zvlášť za použití specifických primerů, opět dvoukolově. Metoda je podstatně časově náročnější (doba trvání od zpracování vzorku do konečné diagnózy se pohybuje v rozmezí 4 – 5 dnů, oproti námi zavedené metodě, kdy je výsledek znám již za 8 hodin od odběru vzorku), avšak umožňuje detekci až 28 různých fúzních genů přítomných u různých akutních myeloidních i lymfoidních leukémií dospělého i dětského věku.

Její další nevýhodou je též velká náročnost na přesnost a přísné dodržování dat expirace jednotlivých primer-mixů tak, aby nedošlo k falešně negativním vyhodnocením z důvodu nefunkční reakční směsi. Systém též postrádá zpětnou kontrolu pomocí pozitivních kontrol. Metodu je možné provádět pomocí standardizovaného kitu od firmy Bio-Rad, nicméně pro rutinní použití se v našich podmínkách ukázala příliš finančně nákladnou.

Vzhledem k současným možnostem se zdá zajímavější spíše použití tzv. biočipů, neboli DNA-microarrays kitů, nicméně i tato metoda je velmi finančně náročná. Navíc se nelze na výsledky plně spoléhat a v případě pozitivního výsledku je třeba jej vždy ověřit klasickou PCR reakcí s primery specifickými pro danou translokaci.

## 5 Diskuse

### 5.1 RT-PCR diagnostika – její využití a modifikace

Do rutinní praxe byla zavedena rychlá diagnostika PPA, tj. RT-PCR detekce PML/RAR $\alpha$ , AML1/ETO, resp. CBF $\beta$ /MYH11. Pomocí RT-PCR bylo zachyceno 65 pacientů s PPA, což obnášelo 27,8% všech vyšetřených pacientů. Toto číslo samozřejmě nevyjadřuje správně relativní zastoupení AML s PPA, neboť jde o selekci, přinejmenším proto, že do ÚHKT byly přednostně odesílány vzorky se suspekci na jednu z PPA. Podle zkušeností z ÚHKT je relativní incidence AML s t(15;17), t(8;21) a inv(16) / t(16;16) odhadem 8, 5, resp. 6%, tj. dohromady asi 19%.

V případě diagnózy APL je díky RT-PCR diagnostice možné ihned nasadit specifickou léčbu ATRA a antracyklinem (výsledek do 8 hodin po odebrání vzorku periferní krve a/nebo kostní dřeně pacienta). RT-PCR diagnostika pomohla v celé 1/3 případů, kde se v rutinním cytogenetickém vyšetření nenalezla t(15;17), ať již z důvodů technických, protože translokované úseky malých chromozomů 15 a 17 jsou drobné, anebo proto, že se jednalo o tzv. kryptickou translokaci t(15;17), kdy může jít o nreciprokou translokaci a poměrně krátkou inzerci, na chromozomu 15 či 17 [54,71].

Morfologická heterogenita AML s t(15;17) [130] opravňuje požadavek, aby každý pacient byl vyšetřen na PML/RAR $\alpha$ . FISH analýza je v dobrých rukou stejně přínosná, jako RT-PCR, obě metody však vyžadují značnou zkušenost.

Znalost výsledku RT-PCR vyšetření na fúzní geny AML1/ETO a CBF $\beta$ /MYH11 bude mít rostoucí význam, neboť pacienti s těmito aberacemi mívají dobrou prognózu pouze, jsou-li léčeni vysokodávkovou terapií [8,94], kterou je třeba podávat buďto hned jako indukční léčbu, nebo jako konsolidaci. Ve studii EORTC AML10, podle jejíhož protokolu byli pacienti v posledních letech léčeni v ÚHKT, tato skutečnost nebyla dostatečně zohledněna, což se mohlo projevit v tom, že u některých pacientů (především těch s inv(16)) by nemuselo dojít k relapsům, a naopak někteří pacienti byli možná zbytečně transplantováni na základě randomizace v rámci protokolu.

Vyšetření fúzních genů AML1/ETO a CBF $\beta$ /MYH11 má dále význam proto, že i tyto aberace mohou zůstat nepoznány běžným cytogenetickým vyšetřením. U AML1/ETO je to proto, že existují kryptické nreciproké translokace [55], podobně jako u t(15;17).

Z hlediska použité metodiky (RT-PCR) je důležité zmínit, že primery navržené Claxtonem et al [121] a doporučené BIOMED-1 standardy [98], se i v našem případě osvědčily jako vhodné pro detekci všech dosud známých CBF $\beta$ /MYH11 fúzních transkriptů. Je však velmi důležité správně interpretovat výsledky v souvislosti s možnou detekcí alternativně sestřižených variant nebo málo frekventovaných typů transkriptů. V těchto případech se jednoznačně uplatní použití dvoukolové PCR reakce s různými typy primerů a následné sekvenování PCR produktu tak, aby se jednoznačně potvrdila, či vyloučila přítomnost CBF $\beta$ /MYH11 aberace. I přesto, že se stále více uplatňuje využití RQ-PCR, umožňující kvantifikaci PCR produktů, což je důležité především v detekci MRD, klasická RT-PCR má své místo jako rychlá, levná a spolehlivá diagnostická metoda.

V hodnocené sestavě byli 2 pacienti s kryptickou translokací, třetí pacient měl dosud aleukemické postižení kostní dřeně i periferní krve při AML1/ETO pozitivním myelosarkomu. Vyhledávání myelosarkomů a jejich diferenciální diagnóza proti NHL je tudíž další vhodnou aplikací molekulárního vyšetření na fúzní gen AML1/ETO.

Sledování MRD je jednoznačně oprávněné v případě fúzního genu PML/RAR $\alpha$ . Citlivost detekce jedné leukemické buňky na 10<sup>6</sup> normální buněčné populace, čehož je dosaženo dvoukolovou PCR, plně dostačuje pro predikci znovuobjevení choroby a nasazení včasné a účinné konsolidační terapie.

Co se týká detekce minimální residuální nemoci u inv(16), či t(16;16), u žádného z deseti pacientů, pozitivních při záchytu, se transkript CBF $\beta$ /MYH11 v remisi neobjevil. Vzhledem k rozporupným závěrům publikovaným různými skupinami [131-133] se domnívám, že v tomto případě by bylo vhodné alespoň k semikvantitativní hodnocení exprese CBF $\beta$ /MYH11 v čase. Podobné závěry lze uplatnit i u sledování výskytu transkriptu AML1/ETO v remisi, kdy opět byly publikovány rozporupné výsledky [134,135].

Testování všech tří PPA pomocí multiplex PCR – tzv. v jedné zkumavce – je beze sporu zajímavou variantou využití PCR, nicméně pro denní rutinní laboratorní diagnostiku se příliš nehodí. Hlavním důvodem je nespolehlivost vyšetření, daná příliš vysokým rizikem možného chybného zpracování vzorků (záměna jednotlivých zkumavek a vzorků) a také příliš dlouhá doba do konečného výsledku. V okamžiku pozitivního výsledku v multiplex reakci je totiž nutno jej ověřit v již zmiňované split-out reakci, aby se vyloučil případný falešně pozitivní výsledek a jednoznačně se určil typ translokace. Tento problém byl již nastíněn v kapitole 4.8 Zvládnutí techniky multiplex PCR, kdy největší obava plyne právě z určení falešně pozitivního, či negativního výsledku, což může vést k fatálním důsledkům pro nemocného.

Bylo by zajímavé využít DNA-microarrays kity, které umožňují současné monitorování exprese tisíců fyziologicky i patologicky se vyskytujících genů. Nicméně tato metoda je stále velmi drahá a její použití limitované zatím pouze na oblast výzkumu; i v tomto případě je nutno nejprve metodu dostatečně otestovat z hlediska bezpečnosti a validity výsledků.

V současné době se v naší laboratoři samozřejmě používá i real-time PCR, která umožňuje jednoznačnou kvantifikaci exprese sledovaných fúzních genů, což se uplatňuje především při monitorování MRD, a to nejen u pacientů s APL, ale též u pacientů s CBF-AML a taktéž při monitoraci FLT3-ITD mutace. I tato metoda je v porovnání s klasickou RT-PCR dražší a proto v případech, kdy není nutno kvantifikovat, stále využíváme právě klasickou RT-PCR.

## **5.2 Analýzy CR, OS a vliv různých prognostických faktorů na prognózu a léčbu nemocných**

Analýzy indukce kompletní remise a celkového přežívání podle prognosticky klasifikovaných cytogenetických aberací ověřily již známé údaje, které se příliš neliší např. od poslední publikované velké studie 1612 nemocných s AML britského MRC [136]. De facto potvrzují, že nemocní v ÚHKT jsou správně diagnostikováni a správně zařazení do prognosticky významných skupin. Přesto lze učinit pro tyto pacienty některé závěry:

- 1) Pacienti s APL dosahují v ČR velmi nízkého procenta CR (dohromady 58%), ve světě to bývá podstatně více, v současnosti až 95% (srov. např. [3]). To může mít několik příčin: za prvé na rozdíl od románské populace je u nás podstatně více případů s leukocytózou, což byl v mé analýze nejsilnější prognostický faktor u APL, jak bylo již dříve publikováno [137], a nyní se totéž potvrdilo opět v britské studii MRC AML 10 [138]. Za druhé v hodnocené sestavě je řada pacientů, kteří zemřeli za několik hodin, či do 3 dnů po přijetí do nemocnice. Jsou zařazení naprosto všichni pacienti, kteří byli diagnostikováni, i ti, jejichž diagnóza APL byla učiněna až post mortem. To nemusí platit u velkých multicentrických studiích, kde lze v některých případech předpokládat malou vůli zařadit do hodnocení v té chvíli již zemřelého pacienta, takže může docházet k selekci. A za třetí tyto závěry také mohou vypovídat o nedostatečných zkušenostech v léčbě, o pozdní diagnostice a nedostatečném uvědomění jak praktických lékařů, tak pacientů [139]. Navíc, APL je poměrně vzácné onemocnění, které vidí průměrný hematolog jen několikrát za život, a léčba tohoto dramatického stavu patří jistě pouze na špičková pracoviště na úrovni fakultních.



- 2) Je zajímavé, jak dobrou prognózu mělo v této sestavě 10 pacientů s aberacemi segmentu 11q23 (90% CR). Obecně jsou tyto aberace považovány za málo příznivé [140], ačkoli právě v již několikrát citované britské MRC studii [136] byly přiřazeny mezi aberace se střední prognózou. Deset pacientů v tomto souboru tvoří pouze malou statisticky hodnotitelnou skupinu, nicméně pacientů s aberací 11q23 bude podstatně více v případě systematického vyšetřování tandemové duplikace tohoto úseku [140].
- 3) Výsledky potvrzují, že AML s inv(16) mají poměrně dobrou prognózu co do indukce CR, ale často relabují (včetně CNS relapsů), je tudíž zcela nutné tyto pacienty léčit intenzivně a napříště se vyhnout léčebným protokolům, které toto nerespektují. Jistě stojí za úvahu i CNS profylaxe, možná především u těch nemocných, u kterých není možné podání vysokodávkovaného cytosin-arabinosidu.
- 4) V nedávno publikovaných studiích [57,63,141] s výsledky analýz CBF AML bylo poprvé prokázáno, že pacienti s t(8;21) mají signifikantně horší prognózu v porovnání s pacienty s inv(16), navzdory stejné léčbě. Proč tomu tak je, zatím dosud nebylo objasněno, nicméně byla pozorována rozdílná odpověď na konsolidační terapii v případě relapsu. Všechny dosud zveřejněné výsledky se však potýkají s problémem standardizace léčebných protokolů [142,143,144]. Na základě těchto výsledků je nutné se do budoucna zamyslet nad rozdílným terapeutickým přístupem k pacientům s jednotlivými typy CBF AML, protože se tyto skupiny liší na základě četných prognostických parametrů v odpovědi na indukční a konsolidační terapii. Navíc dlouhodobé přežití je stále kritické pro obě skupiny pacientů, a je tedy nezbytně nutné pokusit se identifikovat a cíleně ovlivnit leukemogenní mechanismy zodpovědné za molekulární a klinické rozdíly mezi oběma cytogenetickými skupinami CBF AML.

Velmi zajímavé a překvapivé výsledky přinesla analýza výskytu jednotlivých prognosticky důležitých aberací v různých věkových skupinách. Např. takřka stejné zastoupení prognosticky nepříznivých aberací ve věku pod 15 let a nad 60 let (28 versus 30%). Jelikož výsledky ukazují, že věk je důležitým prognostickým faktorem pro celkové přežívání, vyplývá z toho, že typ chromozomální aberace a věk jsou nezávislými prognostickými faktory.

To je v rozporu s nedávnými tendencemi chápat i věk jako faktor, který je závislý na prognostickém typu aberace – totiž že úměrně s věkem roste i výskyt prognosticky nepříznivých aberací. Na tom je téměř založena prognostická klasifikace Headova [6]. Jiní autoři však stále považují věk a karyotyp za nezávislé prognostické faktory v multivariantní analýze [29].

Mé vlastní výsledky ukazují, že ačkoli je věk důležitým prognostickým faktorem, neplatí to pro pacienty s APL – u nich jsou patrně přítomnost t(15;17) a přítomnost či absence leukocytózy tak silnými prognostickými faktory, že "zastíní" vliv věku.

### **5.3 Výsledky analýz exprese MDR1/Pgp**

Výsledky analýz Pgp, resp. jeho genu MDR1, ukazují na prognostický význam těchto vyšetření, alespoň pokud se týká možnosti navození kompletní remise. Obzvláště cenný je fakt, že tento prognostický faktor se uplatňuje u AML bez PPA, které je nutno stratifikovat podle míry jejich rizika, což koreluje s mou původní hypotézou. Ačkoli nebyla nalezena jasná závislost mezi povrchovou expresí Pgp a expresí MDR1 genu, tak pozitivní výsledek v jedné i druhé metodě měl negativní prognostický dopad na indukci kompletní remise ve skupině pacientů s AML bez PPA.

Při stanovení exprese MDR1 měla tento prognostický dopad pouze stanovení ve vzorcích z kostní dřeně, nikoli z periferní krve. Tento rozpor lze vysvětlit rozdílnou výší bazální exprese MDR1/Pgp v periférii (nižší) a kostní dřeni (vyšší – pp. na základě vyšší exprese u CD34<sup>+</sup> buněk) – je nutné stanovit pro tyto skupiny buněk odlišnou cut-off hladinu.

Některé dosud uveřejněné práce týkající se detekce exprese MDR1/Pgp poukazují právě na nutnost odstranění těchto „přirozeně pozitivních“ buněk z testovaných vzorků. V tomto případě bych ale odstraněním CD34<sup>+</sup> buněk přišla prakticky o většinu leukemické populace buněk. Tento problém jsem korigovala právě vztažením absolutní hodnoty exprese MDR1 vůči absolutní hodnotě exprese interního standardu – genu BCR, a statisticky bylo tedy hodnoceno relativní číslo získané podílem těchto dvou hodnot.

Vzhledem k dosud publikovaným poznatkům o mnohočetné lékové rezistenci jsem potvrdila, že u pacientů s nízkou hladinou exprese MDR1/Pgp v době diagnózy onemocnění je snažší navodit kompletní remisi. Jejich buňky pravděpodobně reagují lépe na chemoterapii, která je tedy účinnější, než u pacientů s hyperexpresí MDR1/Pgp, kdy už napočátku léčby se buňky „brání“ cytostatikům. V hodnocené sestavě pacientů nebyla zjištěna výhoda MDR1/Pgp negativních pacientů, pokud se týká celkového přežití, což je v rozporu se závěry skupiny, která jako první použila metodu softwarového komparativního stanovení exprese MDR1, shodnou s mojí [136].

Zajímavou otázkou v tomto případě je sledování vývoje exprese MDR1/Pgp v čase u pacientů po primární chemoterapii a dále. U některých jedinců v době hodnocení negativních, může docházet po opakovaném vystavení cytostatikům ke vzniku mnohočetné lékové rezistence – zvýšené expresi MDR1/Pgp a následně snížené šanci na vyléčení.

To by mohl být pravděpodobný důvod, proč jsme v hodnocené skupině pacientů nepotvrdili statisticky významný vliv hyperexprese MDR1/Pg na celkové přežívání pacientů, ale pouze na dosažení kompletní remise.

Pro záchyt rizikových pacientů lze použít jak průtokovou cytometrii, tak i komparativní RT-PCR, respektive ideálně obě metody najednou. Bohužel nebyla nalezena významná vazba mezi pozitivními výsledky v obou použitých metodách. To lze vysvětlit např. malým počtem pacientů analyzovaných oběma metodami zároveň, ale také typem použité monoklonální protilátky.

Vzhledem k již diskutované problematice metod používaných pro analýzu mnohočetné lékové rezistence se plně potvrdilo Marieho doporučení [20] sledovat expresi MDR1/Pgp alespoň dvěma způsoby. Co se týká zavedené semikvantitativní detekce exprese mRNA MDR1 genu, vzhledem k současným možnostem je jednoznačně přesnější metodou hodnocení real-time PCR, avšak i zde je nutno stanovit hladinu přiřazené MDR1 exprese.

Při neshodě výsledku dvěma metodami by bylo z vědeckého hlediska na místě se pokusit zavést nějakou další metodu, nejlépe snad funkční test, např. eflux fluorescenčně či radioizotopem značených substrátů pro Pgp leukemickými blasty in vitro (prstože všechny metody stanovení exprese i funkce MDR1/Pgp jsou zatíženy chybami [20,21]). Druhou možností je stanovení jednoho nebo více dalších genů ovlivňujících vznik mnohočetné lékové rezistence. Přes zmíněné rozdílné výsledky se nicméně v praxi obě metody stanovení Pgp a MDR1 exprese mohou doplňovat při screeningu rizikových PPA negativních pacientů.

Při hodnocení výsledků je také nutno nezapomínat na fakt, že při vzniku mnohočetné lékové rezistence se uplatňuje mnoho faktorů. Otázkou zůstává, jak naložit s poznatkem, že pacient nese rizikový faktor ve formě hyperexprese MDR1/Pgp. Jak bylo uvedeno v teoretické části této práce, klinické pokusy s modulátory funkce Pgp (např. verapamilem, nebo cyklosporinem A) jsou stále ve fázi zkoušení nejvhodnější kombinace těchto modulátorů [21,105,109-111].

#### **5.4 Statistické zpracování výsledků**

Při použití logrank testu některé výsledky analýzy přežívání prokázaly vysoké hodnoty P (tedy statisticky nesignifikantní) u křivek přežití, které se při grafickém znázornění výrazně lišily, a to i v souborech s relativně velkými počty studovaných pacientů.

Tak tomu bylo např. při hodnocení křivky přežití pacientů s APL ve srovnání s ostatními pacienty s AML, kdy v Mantelově-Haenszelově testu byla hodnota P rovna 0,14 (viz Obr. 29).

Naprostou stejnou hodnotu P vyšla i při hodnocení stejných křivek podle Mantela-Coxe. Logrank test, i když je v podobných analýzách obecně užíván, má nevýhodu v tom, že kalkuluje rozdíly v přežívání nezávisle na tom, jak daleko na časové ose je zobrazen zemřelý pacient (tzv. škrtnutý).

Proto v případě, kdy mnoho pacientů s APL zemře již časně po stanovení diagnózy (v této době přežívají non-APL pacienti lépe, křivky se později překříží), test paradoxně hodnotí pacienty non-APL jako lépe přežívající, tím spíše, že subjektů hodnocených na začátku sledování je hodně. Výsledek se nezmění i přes to, že v další době přežívají pacienti s APL mnohem lépe, po 27 měsících sledování nezemřel již žádný; 95% pacientů s APL, kteří zemřou – zemřou během indukce, malá část připadá na konto relapsů. Logrank test navíc také počítá s mediánem přežívání, který nelze stanovit ve skupině, kde žádný další subjekt neumírá.

Tato podivnost logrank testu byla zaznamenána poté, kdy ke zmíněné hotové analýze byly přidány údaje o dalším dlouho žijícím pacientovi s APL. Hodnota P se tak zvýšila z 0,009 na 0,014! Je tedy nutná velká opatrnost při hodnocení těmito testy – zdá se, že ztrácejí význam za situace, kdy se průběhy křivek kříží. Podobný problém v provedených analýzách činí APL pacienti ve všech logrank testech, kde jsou ve studovaném souboru hojněji zastoupeni. Proto bylo u některých analýz jako dodatek použito prosté srovnání počtů živých a mrtvých k určitému datu  $\chi^2$  testem, který měl nakonec mnohem vyšší výpovědní hodnotu. Potíže hodnocení logrank testem mohou být vyřešeny tím, že přežívání pacientů bude kalkulováno zvlášť, až po dosažení CR.

## 6 Závěr

Tento projekt měl dva hlavní cíle. Prvním bylo zavést do praxe rychlou molekulárně biologickou diagnostiku prognosticky příznivých chromozomálních aberací (PPA) u AML, tj. t(8;21) a inv(16) / t(16;16), společně s již zavedeným stanovením translokace t(15;17). Obě nové metody byly zavedeny a jsou nyní používány jako RT-PCR screening těchto aberací u záchytů AML. AML s PPA, zachycené klasickou cytogenetikou a FISH, anebo zavedenou metodou RT-PCR, měly v sestavě 221 hodnotitelných pacientů lepší odpověď na léčbu, než ostatní typy AML. U PPA bylo dosaženo vyššího % kompletních remisí (CR), i lepšího celkového přežívání.

Druhý cíl se týkal větší skupiny AML bez PPA: snahou bylo nalézt v době diagnózy rychle použitelný ukazatel prognózy v rámci této skupiny. Byla zavedena imunofluorescenční metoda stanovení P-glykoproteinu (Pgp) pomocí značené monoklonální protilátky, a dále zavedena komparativní (semikvantitativní) metoda stanovení exprese mRNA genu MDR1 pomocí semikvantitativní komparativní RT-PCR, vyhodnocované pomocí Kodak Edas Digital Science Systému. Exprese mRNA genu MDR1 byla vztažena k expresi interního standardu, genu BCR.

Ačkoli nebyla nalezena jasná korelace mezi povrchovou expresí Pgp a expresí MDR1 genu, tak pozitivní výsledek v jedné i druhé metodě měl negativní prognostický dopad na indukci CR ve skupině pacientů s AML bez PPA. Při stanovení exprese MDR1 měla tento prognostický dopad pouze stanovení ve vzorcích z kostní dřeně, nikoli z periferní krve. Dosažení CR ve skupině pacientů bez PPA a s negativitou Pgp nebo slabou expresí MDR1 se však neodrazilo v lepším celkovém přežití těchto pacientů. Další analýzy v hodnocené sestavě pacientů ukázaly, že celkové přežití závisí nejen na přítomnosti PPA, ale také na přítomnosti prognosticky nepříznivé cytogenetické aberace. Pokud se týká vlivu FAB klasifikace na celkové přežívání, prognosticky dobrou skupinou byl subtyp AML M3 (APL), prognosticky nejhorší skupinou byly AML M0, mezi ostatními typy AML nebyly významné rozdíly. V rámci APL, velmi silným prognostickým faktorem byl počet leukocytů v době diagnózy.

Pokud se týká věku, nejlepší přežívání bylo pozorováno u nejmladších pacientů s AML pod 16 let, nejhorší ve skupině nad 60 let. Poněkud překvapivě nebyly prokázány významné změny v celkovém přežívání při stratifikaci podle věku ve skupině mezi 16 a 60 lety. Rovněž nebyla prokázána různost zastoupení prognosticky příznivých, středních a nepříznivých cytogenetických a molekulárních nálezů v různých věkových skupinách, a to ani v těch s výrazně lepší či horší prognózou (tj. <16 a >60 let), takže věk je v této sestavě nezávislým prognostickým faktorem.

Jak bylo diskutováno výše, věk neměl tento prognostický vliv mezi 50 hodnotitelnými pacienty s APL. Podobně ani typ zlomového místa při vzniku fúzního genu PML/RAR $\alpha$  u t(15;17).

Dále je součástí této práce patrně prioritně popsán případ aleukemického myelosarkomu pozitivního na fúzní gen AML1/ETO, který byl spojen s průkazem oligoklonálních T lymfocytů, které zpočátku "potvrzovaly" mylnou diagnózu NHL. A také popis pravděpodobně druhého výskytu bodu zlomu typu J u aberace CBF $\beta$ /MYH11.

Závěry z hodnocené sestavy 221 pacientů lze shrnout do následujících bodů:

- Bylo zachyceno 65 pacientů pozitivních na jednu ze sledovaných PPA.
- Zavedená RT-PCR detekce AML s PPA rychle odlišuje tyto prognosticky příznivé subtypy AML od ostatních. To má praktický význam, neboť nemocným s AML s PPA je nutno podávat jinou indukční či konsolidační léčbu.
- Expres MDR1/Pgp je významným prognostickým faktorem u AML bez PPA, pokud se týká pravděpodobnosti navození CR. Prognostický dopad měla pouze data získaná ze vzorků kostní dřeně, nikoliv z periferní krve.
- Pacienti s poruchami v pruhu 11q23 vykazovali dobré výsledky v dosažení CR.
- Typ cytogenetické aberace a věk jsou v této sestavě nezávislými prognostickými faktory, s výjimkou APL, kde již přítomnost samotné t(15;17) a absence leukocytózy určují jejich dobrou prognózu.
- Typ zlomového místa na PML u t(15;17) neměl u skupiny pacientů s APL prognostický dopad.

## 7 Seznam použité literatury

1. Schwarz J et al. Molekulární diagnostika a prognóza u akutní myeloidní leukémie. Závěrečná zpráva IGA MZ ČR 2001.
2. Bishop JF. The treatment of adult acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 1997;24:57.
3. Bernard J, Lasneret J, Chome J, Levy JP, Boiron M. A cytological and histological study of acute premyelocytic leukaemia. *J Clin Pathol* 1963;16:319.
4. Mandelli F, Diverio D, Avvisati G, Luciano A, Barbui T, Bernasconi C, Broccia G, Cerri R, Falda M, Fioritoni G, Leoni F, Liso V, Petti MC, Rodeghiero F, Saglio G, Vegna ML, Visani G, Jehn U, Willemze R, Muus P, Pelicci PG, Biondi A, Lo Coco F. Molecular remission in PML/RAR $\alpha$ -positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. *Blood* 1997;90:1014.
5. Grimwade D, LoCoco F. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002;16:1959-1973.
6. Head DR. Revised classification of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1826.
7. Buchner T, Heinecke A. The role of prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10 Suppl 1:S28.
8. Mandelli F, Petti MC, Lo Coco F. Therapy of acute myeloid leukemia: towards a patient-oriented, risk-adapted approach. *Haematologica* 1998;83:1015.
9. Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1984;11:332.
10. Bloomfield, C.D., Lawrence, D., Byrd, J.C., et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res.* 1998;58, 4173–4179.
11. Byrd, J.C., Mrózek, K., Dodge, R.K., et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: Results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood.* 2002;100, 4325–4336.
12. Mrózek, K., Heinonen, K., Bloomfield, C.D. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2001;14, 19–47.
13. Swansbury GJ, Lawler SD, Alimena G, Arthur D, Berger R, Van den Berghe H, Bloomfield CD, de la Chappelle A, Dewald G, Garson OM, et al. Long-term survival in acute myelogenous leukemia: a second follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;73:1.
14. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A: Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341:1051-1062, 1999
15. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al: Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: A Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96:4075-4083, 2000
16. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial: The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92:2322-2333, 1998
17. Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al: The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): Analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 98:1312- 1320, 2001

18. Arthur DC, Berger R, Golomb HM, Swansbury GJ, Reeves BR, Alimena G, Van Den Berghe H, Bloomfield CD, de la Chapelle A, Dewald GW, et al. The clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1989;40:203.
19. Sandberg AA, Chen Z. Cytogenetics of acute leukemia. In: Wiernik PH, Canellos GP, Dutcher JP, Kyle RA, editors. *Neoplastic Diseases of the Blood*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1996. p. 249.
20. Marie J-P, Legrand O, Perrot J-Y, Chevillard S, Huet S, Robert J. Measuring multidrug resistance expression in human malignancies: elaboration of consensus recommendations. *Semin Hematol* 1997;34:63.
21. McKenna SL, Padua RA. Multidrug resistance in leukaemia. *Br J Haematol* 1997; 96: 659-674.
22. Wood P, Burgess R, MacGregor A, Yin JA. P-glycoprotein expression on acute myeloid leukaemia blast cells at diagnosis predicts response to chemotherapy and survival. *Br J Haematol* 1994;87:509.
23. Marie J-P, Zhou D-C, Gurbuxani S, Legrnad O, Zittoun R. MDR1/P-glycoprotein in Haematological Neoplasms. *Eur J Cancer* 1996; 32A:1034-1038.
24. van den Heuvel-Eibrink MM, van der Holt B, te Boekhorst PA, Pieters R, Schoester M, Lowenberg B, Sonneveld P. MDR 1 expression is an independent prognostic factor for response and survival in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1997; 99: 76-83.
25. Wuchter C, Leonid K, Ruppert V, Schrappe M, Buchner T, Schoch C, et al. Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia. *Haematologica* 2000; 85: 711-21.
26. Li J, Xia X, Hua D, Wang W, Chen Z, Ruan C. Clinical and biological relevance of flow cytometric determination of P- glycoprotein expression in acute non-lymphocytic leukemia. *Chin Med J (Engl)* 1997;110:919.
27. Paietta E, Andersen J, Racevskis J, Gallagher R, Bennett J, Yunis J, Cassileth P, Wiernik PH. Significantly lower P-glycoprotein expression in acute promyelocytic leukemia than in other types of acute myeloid leukemia: immunological, molecular and functional analyses. *Leukemia* 1994;8:968.
28. Samdani A, Vijapurkar U, Grimm MA, Spier CS, Grogan TM, Glinsmann-Gibson BJ, List AF. Cytogenetics and P-glycoprotein (PGP) are independent predictors of treatment outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Leuk Res* 1996;20:175.
29. Filipits M, Stranzl T, Pohl G, Heinzl H, Jager U, Geissler K, Fonatsch C, Haas OA, Lechner K, Pirker R. Drug resistance factors in acute myeloid leukemia: a comparative analysis. *Leukemia* 2000;14:68.
30. Galimberti S, Guerrini F, Palumbo GA, Consoli U, Fazzi R, Morabito F, Santini V, Petrini M. Evaluation of BCRP and MDR-1 co-expression by quantitative molecular assessment in AML patients. *Leuk Res* 2004; 28: 367-72.
31. Galimberti S, Guerrini F, Carulli G, Fazzi R, Palumbo GA, Morabito F, Petrini M. Significant co-expression of WT1 and MDR1 genes in acute myeloid leukemia patients at diagnosis. *Eur J Haematol* 2004; 72: 45-51.
32. Schaich M, Soucek S, Thiede C, Ehninger G, Illmer T; SHG AML96 Study Group. MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2005; 128: 324-32.
33. Lohri A, van Hille B, Bacchi M, Fopp M, Joncourt F, Reuter J, Cerny T, Fey MF, Herrmann R. Five putative drug resistance parameters (MDR1/P-glycoprotein, MDR-associated protein, glutathione-S-transferase, bcl-2 and topoisomerase IIalpha) in 57 newly diagnosed acute myeloid leukaemias. Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Eur J Haematol* 1997; 59: 206-15.



34. Leith CP, Chen IM, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Head DR, Godwin JE, Weick JK, Willman CL. Correlation of multidrug resistance (MDR1) protein expression with functional dye/drug efflux in acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: identification of discordant MDR-/efflux+ and MDR1+/efflux- cases. *Blood* 1995; 86: 2329-42.
35. Homolya L, Hollo M, Muller M, Mechetner EB, Sarkadi B. A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells. *Br J Cancer* 1996; 73: 849-55.
36. Gilliland DG. Molecular Genetics of Human Leukemia. *Leukemia* 1998; 12: S7-S12.
37. Adam Z, Vorlíček J a kol. Hematologie II Přehled maligních hematologických onemocnění. Grada Publishing 2001; 41.1999
38. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al: World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17:3835-3849, 1999
39. Mrózek K, Heinonen K, de la Chapelle A, Bloomfield CD. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 1997;24:17.
40. Caligiuri MA, Strout MP, Lawrence D, et al: Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Cancer Res* 58:55-59, 1998
41. Dohner K, Tobis K, Ulrich R, et al: Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: A study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* 20: 3254-3261, 2002
42. Shiah HS, Kuo YY, Tang JL, et al: Clinical and biological implications of partial tandem duplication of the MLL gene in acute myeloid leukemia without chromosomal abnormalities at 11q23. *Leukemia* 16:196-202, 2002
43. Gilliland DG, Griffin JD: The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100:1532- 1542, 2002
44. Levis M, Small D: FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia* 17:1738-1752, 2003
45. Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al: Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10:1911- 1918, 1996
46. Frohling S, Schlenk RF, Breitnick J, et al: Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: A study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 100:4372-4380, 2002
47. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, et al: High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: A study of 319 de novo AML patients. *Blood* 101:837-45, 2003
48. van Waalwijk van Doorn-Khosrovani SB, Erpelinck C, Meijer J, et al: Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J* 4:31-40, 2003
49. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, et al: Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: A study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 100:2717-2723, 2002
50. Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, et al: CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 22:624-633, 2004
51. Repp R, Schaekel U, Helm G, Thiede C, Soucek S, Pascheberg U, Wandt H, Aulitzky W, Bodenstein H, Sonnen R, Link H, Ehninger G, Gramatzko M and the AML-SHG Study Group. Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML. *Clin Cytom* 53B:11-19, 2003

52. Casanovas RO, Slimane FK, Garand R, FAure GC, Campos L, Deneys V, Bernier M, Falkenrodt A, Lecalvez G. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia* 17: 515-527, 2003
53. Michalová K, Zemanová Z, Březinová J. Diagnostický a prognostický význam kryptických přestaveb chromosomů u akutních leukemií. In: Kongres MEFA, 5. den o akutních leukemiích; 2000; Brno; 2000. p. Abstr.
54. Grimwade D, Gorman P, Duprez E, Howe K, Langabeer S, Oliver F, Walker H, Culligan D, Waters J, Pomfret M, Goldstone A, Burnett A, Freemont P, Sheer D, Solomon E. Characterization of cryptic rearrangements and variant translocations in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1997;90:4876.
55. Nucifora G, Dickstein JI, Torbenson V, Roulston D, Rowley JD, Vardiman JW. Correlation between cell morphology and expression of the AML1/ETO chimeric transcript in patients with acute myeloid leukemia without the t(8;21). *Leukemia* 1994;8:1533.
56. Pallisgaard N, Hokland P, Riishoj DC, Pedersen B, Jorgensen P. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* 1998;92:574.
57. Bullinger L, Valk PJM. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6296-6304.
58. Liotta L, Petricoin E: Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev Genet* 1:48-56, 2000 23.
59. Ramaswamy S, Golub TR: DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol* 20:1932-1941, 2002
60. Staudt LM: Molecular diagnosis of the hematologic cancers. *N Engl J Med* 348:1777-1785, 2003
61. Ebert BL, Golub TR: Genomic approaches to hematologic malignancies. *Blood* 104:923-932, 2004
62. Haferlach T, Kohlmann A, Kern W, et al: Gene expression profiling as a tool for the diagnosis of acute leukemias. *Semin Hematol* 40:281-295, 2003
63. Bullinger L, Dohner H, Pollack JR: Genomics in myeloid leukemias: An array of possibilities. *Rev Clin Exp Hemato*, 2005, in press
64. Valk PJ, Delwel R, Lowenberg B: Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 12:76-81, 2005
65. Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, et al: AML M3 and AML M3 variant each have a distinct gene expression signature but also share patterns different from other genetically defined AML subtypes. *Genes Chromosomes Cancer* 43:113-127, 2005
66. Albertson DG, Pinkel D: Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 12:R145-R152, 2003
67. Pollack JR, Iyer VR: Characterizing the physical genome. *Nat Genet* 32:515-521, 2002 (suppl)
68. Thomson JM, Parker J, Perou CM, et al: A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Methods* 1:47- 53, 2004
69. Espina V, Woodhouse EC, Wulfkuhle J, et al: Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies. *J Immunol Methods* 290:121-133, 2004
70. Melnick BA, Licht D. Deconstruction a disease: RAR $\alpha$ , its fusion partners and their roles in the pathogenesis of APL. *Blood* 1999; 93: 3167-3215.
71. Redner RL. Variations on a theme: the alternate translocations in APL. *Leukemia*. 2002;16:1927-1932.
72. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci M-J, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, Howe K, Dastugue N, Jansen J, Radford-Weiss I, Lo Coco F, Lessard M, Hernandez J-M,

- Delabesse E, Head D, Liso V, Sainty D, Flandrin G, Solomon E, Birg F, Lafage-Pochitaloff M. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. *Blood* 2000; 96: 1297–1308.
73. Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP, Donti E, Biondi A, Coco FL, Grignani FA, Pelicci PG. APL: From genetics to fragment. *Blood* 1994; 83: 10-25.
  74. Grignani F, Fagioli M, Ferrucci PF, Alcalay M, Pelicci PG. The molecular genetics of APL. *Blood Revs* 1993; 87-93.
  75. Chen DJ, Evans M. A transcriptional co-repressor that interact with nuclear hormone receptors. *Nature* 1995; 377: 454-457.
  76. Grignani F, Matteis SD, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Cioce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrari FF, Zamir I, Seiser C, Grignani F, Lazar MA, Minucci S, Pelicci PG. Vision protein of the retinoic acid receptor- $\alpha$  recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998; 391: 815-818.
  77. Lin RJ, Nagy L. Role of the histone deacetylase complex in APL. *Nature* 1998; 391: 811-814.
  78. Baskiewicz-Masiuk M, Machalinski B. The role of the STAT5 proteins in the proliferation and apoptosis of the CML and AML cells. *Eur J Haematol.* 2004 Jun;72(6):420-9.
  79. Gandini D, Burchenal KN, Botto M, Allopenna J, Seale JRC, Gross NCP, Goldman JM, Dmitrovsky E, Pandolfi PP. Interferon augments PML and PML/RAR $\alpha$  expression in normal myeloid and acute promyelocytic cells and cooperates with all-trans retinoic acid to induce maturation of a retinoid-resistant promyelocytic cell line. *Blood* 1996; 88: 3926-3936.
  80. Wang ZG, Delva L, Gaboli M, Rivi R, Giorgio M, Cordon-Cardo C, Grosveld F, Pandolfi PP. Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science* 1998; 279: 1547-1551.
  81. Shao W, Benedetti L, Lamph WW, Nervi C, Miller WH. A retinoid-resistant APL subclone expresses a dominant negative PML-RAR $\alpha$  mutation. *Blood* 1997; 89: 4282-4288.
  82. Wang ZG, Ruggero D, Ronchetti S, Zhong S, Gaboli M, Rivi R, Pandolfi PP. PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nature Genet* 1998; 20: 266-272.
  83. Schwarz J a kol. Přestavby nukleárního receptoru  $\alpha$  pro kyselinu transretinovou při retinoidy indukované diferenciaci leukemických buněk. Závěrečná zpráva grantu IGA MZ ČR 1997.
  84. Slack JL. Biology and treatment of acute progranulocytic leukemia. *Curr Opin Hemat* 1999: 236-240.
  85. Duprez E, Bendit G, Flexor M, Lillehaug JR, Lanotte M. A mutated PML/RARA found in the retinoid maturation resistant NB4 subclone, NB4-R2, blocks RARA and wild-type PML/RARA transcriptional activities. *Leukemia* 2000; 14: 255-261.
  86. Downing, J.R. The core-binding factor leukemias: Lessons learned from murine models. *Curr Opin. Genet. Dev.* 2003;13, 48–54.
  87. Speck, N.A. Core binding factor and its role in normal hematopoietic development. *Curr Opin. Hematol.* 2001;8, 192–196.
  88. Kolitz, J.E., George, S.L., Dodge, R.K., et al. Dose escalation studies of cytarabine, daunorubicin, and etoposide with and without multidrug resistance modulation with PSC-833 in untreated adults with acute myeloid leukemia younger than 60 years: Final induction results of Cancer and Leukemia Group B study 9621. *J. Clin. Oncol.* 2004;22,4290–4301.
  89. Delaunay, J., Vey, N., Leblanc, T., Fenaux, P., Rigal-Huguet, F., Witz, F., et al. Prognosis of inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *French Acute Myeloid Leukemia Intergroup; Groupe Ouest-*

- Est des Leucemies Aigues Myeloblastiques; Leucemies Aigues Myeloblastiques de l'Enfant; Acute Leukemia French Association; Bordeaux-Grenoble-Marseille-Toulouse cooperative groups. *Blood*. 2003;102, 462-9.
90. Nguyen, S., Leblanc, T., Fenaux, P., Witz, F., Blaise, D., Pigneux, A., et al. A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood*. 2002;99, 3517-23.
  91. Schlenk, R.F., Benner, A., Krauter, J., et al. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: A survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J. Clin. Oncol.* 2004;22, 3741-3750.
  92. Shurtleff SA, Meyers S, Hiebert SW, Raimondi SC, Head DR, Willman CL, Wolman S, Slovak ML, Carroll AJ, Behm F, Hulshof MG, Motroni TA, Okuda T, Liu P, Collins FS, Downing JR. Heterogeneity in CBF $\beta$ /MYH11 fusion messages encoded by the inv(16)(p13q22) and the t(16;16)(p13q22) in AML. *Blood* 1995; 85: 3695-3703.
  93. Elefanty AG, Lorraine R, Begley CG. Factors involved in leukaemogenesis and hematopoiesis. *Baillieres Clinical Hematology* 1997; 10: 589-605.
  94. Appelbaum FR, Gilliland DG, Tallman MS. The biology and treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology* 1998.
  95. Lo Coco FL, Pisegna S, Diverio D. The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias. *Haematologica* 1997; 82: 364-370.
  96. Nucifora G, Rowley JD. AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995; 86: 1-14.
  97. Liu P, Tarlé A, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Siciliano MJ, Collins FS. Fusion between transcription factor CBF $\beta$ /PEBP2 $\beta$  and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 1993; 261: 1041-1044.
  98. van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, González Díaz M, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13: 1901-1928.
  99. Kanto S, Chiba A, Tahala Y, Fujita S, Endo M, Kamada A, Yosihakawa K, Fukuzaki A, Orikasa S, Watnabe T, Satane M. The PEBP2 $\beta$ /CBF $\beta$ -SMMHC chimeric protein is localized both in the cell membráně and nuclear subfractions of leukemic cells carrying chromosomal inversion 16. *Leukemia* 2000; 14: 1253-9.
  100. Britos-Bray M, Ramirez M, Cao W, Wang X, Liu PP, Civin CI, Friedman AD. CBF $\beta$ -SMMHC, expressed in M4Eo acute myeloid leukemias, reduces p53 induction and slows apoptosis in hematopoietic cells exposed to DNA-damaging agents. *Blood* 1998; 92: 4344-4352.
  101. Liu, P.P., Hajra, A., Wijmenga, C., Collins, F.S. Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. *Blood* 1995; 85: 2289-2302.
  102. Zuberová O, Babušíková O. The multidrug resistance in human leukemias. *Neoplasma* 1998; 45: 53-59.
  103. Care RS, Valk PJ, Goodeve AC, et al: Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 121:775- 777, 2003
  104. Bosch I, Croop J. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1288: F37-F54.
  105. Vosseveld PJM, Sonneveld P. Reversal of multidrug resistance in hematological malignancies. *Blood rev.* 1999; 13: 67-77.
  106. Arceci R. Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistance malignancies. *Blood* 1993; 81: 2215-2222.

107. Higgins CF, Gottesman M. Is the multidrug transporter a flippase? *TIBS* 1992; 17:18-22.
108. Drach D, Zhao S, Drach J, Makadevia R, Gattringer C, Huber H, Andreeff M. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. *Blood* 1992; 80: 2729-2734.
109. Dalton WS, Grogan T, Rybami JA, Scheper RJ, Richter L, Kailey J, Broxterman HJ, Pinedo HM, Salmon SE. Immunohistochemical detection and Quantitation of P-glycoprotein in drug-resistant human multiple myeloma cells: association with level of drug resistance and drug accumulation. *Blood* 1989; 73: 747-752.
110. Advani R, Saba HI, Galoman M. Treatment of poor prognosis AML with PSC833 plus mitoxantrone, etoposide, cytarabine. *Blood* 1997; 90: 356a (abstr.).
111. Visani G, Milligan D, Leoni F et al. A phase I dose – finding study of PSC833, a novel MDR reversing agent, with mitoxantrone, etoposide, cytarabine in poor prognosis acute leukemia. *Blood* 1997; 90: 356b (abstr.).
112. Marie JP, Huet S, Faussat AM, Perrot JY, Chevillard S, Barbu V, Bayle C, Boutonnat J, Calvo F, Campos-Guyotat L, Colosetti P, Cazin JL, de Cremoux P, Delvincourt C, Demur C, Drenou B, Fenneteau O, Feuillard J, Garnier-Suillerot A, Genne P, Gorisse MC, Gosselin P, Jouault H, Lacave R, Robert J, et al. Multicentric evaluation of the MDR phenotype in leukemia. French Network of the Drug Resistance Intergroup, and Drug Resistance Network of Assistance Publique-Hopitaux de Paris. *Leukemia* 1997; 11: 1086-94.
113. Pirker R, Wallner J, Geissler K, Linkesch W, Haas OA, Bettelheim P, Hopfner M, Scherrer R, Valent P, Havelec L, Ludwig PH. MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *JNCI* 1991; 83: 708-712.
114. Leht CP, Kopecky KJ, Godwin J et al. Acute myeloid leukemias in the elderly: assesment of multidrug resistance (MDR) and cytogenetics distinguishes biological subgroups with remarkably distinct response to standard chemotherapy. A southwest oncology group study. *Blood* 1997; 89:3323-3329.
115. Leht CP, Kopecky KJ, Chen IM, Godwin J, Connell T, Slovak ML, Head DR, Appelbaum FR, Wilman CL. MDR1 expression is highly predictive for achievement of complete remission (CR) in acute myeloid leukemias (AML) in the elderly. A southwest oncology group study. *Blood* 1995; 86: 286a (abstr.).
116. List AF. The role of multidrug resistance and its pharmacological modulation in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10: S56-S51.
117. Suvannasankha A, Minderman H, O'Loughlin KL, Sait SN, Stewart CC, Greco WR, Baer MR. Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is not associated with P-glycoprotein overexpression in core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2004; 28: 449-55.
118. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
119. Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi PP, Rossi V, Giudici G, Alcalay M, Lo Coco F, Diverio D, Pogliani EM, Lanzi EM, et al. Molecular monitoring of the myl/retinoic acid receptor-a fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polymerase chain reaction. *Blood* 1992;80:492.
120. Smetsers TFCM, Stevens EHP, van de Locht LTF, Mensink EJBM. Freezing of PCR master mixture retains full amplification activity and facilitates PCR standardisation for molecular diagnostics and real-time quantitative PCR. *Leukemia* 1998;12:1324.
121. Claxton DF, Liu P, Hsu HB, Marlton P, Hester J, Collins F, Deisseroth AB, Rowley JD, Siciliano MJ. Detection of fusion transcripts generated by the inversion 16 chromosome in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1994;83:1750.

122. Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N. Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood* 1991;77:2031.
123. Lohri A, van Hille B, Reuter J, Tichelli A, Herrmann R. mRNA expression, measured by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction, of five putative drug resistance parameters, in normal and leukaemic peripheral blood and bone marrow. *Acta Haematol* 1997;98:1.
124. Watzinger F, Lion T. Multiplex PCR for quality control of template RNA/cDNA in RT-PCR assays. *Leukemia* 1998;12:1984.
125. Mechetner EB, Roninson IB. Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5824.
126. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation of incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457.
127. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*: Chapman and Hall; 1991.
128. van der Reijden BA, Lombardo M, Dauwense HG, Giles RH, Muhlematter D, Bellomo MJ, Wessels HW, Beverstock GC, van Ommen GJ, Hagemeijer A, Breuning MH. RT-PCR diagnosis of patients with acute nonlymphocytic leukemia and inv(16)(p13q22) and identification of new alternative splicing in CBF $\beta$ /MYH11 transcripts. *Blood* 1995; 86: 277-282.
129. Springall, F.H., Lukeis, R.L., Tyrrell, V., Joshua, D.E., Iland, H.J. (1998) "Identification of a novel CBF $\beta$ -MYH11 fusion transcript in a patient with AML and inversion of chromosome 16", *Leukemia*, 12, 2034-2039.
130. Schwarz J, Pechová R, Haškovec C. Místo PCR vyšetření hybridního genu PML/RARa v komplexní diagnostice AML. *Scripta Med* 1997;70:291.
131. Tobal K, Johnson PR, Saunders MJ, Harrison CJ, Liu Yin JA. Detection of CBF $\beta$ /MYH11 transcripts in patients with inversion and other abnormalities of chromosome 16 at presentation and remission. *Br J Haematol* 1995; 91: 104-108.
132. Costello R, Sainty D, Blaise D, Gastaut JA, Gabert J, Poirel H, BuzynVeil A, Macintyre E. Prognosis value of residual disease monitoring by polymerase chain reaction in patients with CBF $\beta$ /MYH11-positive acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1997; 89: 2222-2223.
133. Evans PAS, Short MA, Jack AS, Norfolk DR, Child JA, Shiach CR, Davies F, Tobal K, Yin JAL, Morgan GJ. Detection and quantitation of the CBF $\beta$ /MYH11 transcripts associated with the inv(16) in presentation and follow-up samples from patients with AML. *Leukemia* 1997; 11: 364-369.
134. Jurlander J, Caligiuri MA, Ruutu T, Baer MR, Strout MP, Oberkircher AR, Hoffmann L, Ball ED, Frei-Lahr DA, Christiansen NP, Block AM, Knuutila S, Herzig GP, Bloomfield CD. Persistence of the AML1/ETO fusion transcript in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia. *Blood* 1996; 88: 2183-2191.
135. Elmaagacli AH, Beelen DW, Stöckova J, Trzensky S, Kroll M, Schaefer UW, Stein C, Opalka B. Detection of AML1/ETO fusion transcripts in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia after bone marrow transplantation or peripheral blood progenitor cell transplantation. *Blood* 1997; 90: 3230-3231.
136. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998;92:2322.
137. Schwarz J, Lemež P, Vorlová Z, Lukášová M, Vítek A, Čermák J, Šponerová D, Salaj P, Michalová K, Haškovec C, Jirásek A. Leukocytosis in APL: a major risk factor for

- thromboembolism. In: 2nd International Symposium on Acute Promyelocytic Leukemia - A Curable Disease; 1997; Rome; 1997. Abstr. 70.
138. Burnett AK, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K, Goldstone AH. Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the Randomized MRC Trial. *Blood* 1999;93:4131.
  139. Lemež P, Schwarz J, Jelínek J, Michalová K, Vítek A, Vorlová Z, Penka M, Neuwirt J. Pozdní a pomalá diagnostika akutních promyelocytárních leukemií - hlavní příčina časných smrtí. *Vnitř Lék* 1994;40:654.
  140. Caligiuri MA, Strout MP, Gilliland DG. Molecular biology of acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 1997;24:32.
  141. Marcucci G, Mrózek K, Ruppert A.S., Maharry K., et al. Prognostic factors and outcome of Core Binding Factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): A Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* 2005;23, 5705-5715.
  142. Nguyen S, Leblanc T, Fenaux P, Witz F, Blaise D, Pigneux A, et al. A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood*. 2002;99, 3517-23.
  143. Schlenk R.F., Benner A., Krauter J., et al. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: A survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22, 3741–3750.
  144. Valk P.J.M., Verhaak R.G.W., Beijnen M.A., et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004;350, 1617–1628.
  145. Zhao S, Consoli U, Arceci R, Pfeifer J, Dalton WS, Andreeff M. Semi-automated PCR method for quantitating MDR1 expression. *Biotechniques* 1996;21:726.

## **8 Přílohy**