

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE
A PROGNOSTICKÝ DOPAD INTERNÍCH TANDEMŮVÝCH
DUPLIKACÍ GENU FLT3

Diplomová práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Kateřina Burčková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele MUDr. Jiřího Schwarze, CSc. (a garanta RNDr. Martina Pospíška, Ph.D.), a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze (a pracoviště školitele MUDr. Jiřího Schwarze, CSc.) je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity (a pracoviště školitele MUDr. Jiřího Schwarze, CSc.).

V Praze dne 18. srpna 2009

.....
Podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli MUDr. Jiřímu Schwarzovi, CSc. za možnost pracovat v jeho laboratoři, za odborné vedení a laskavý přístup. Dále bych chtěla také poděkovat všem členům laboratoře PCR diagnostiky leukémií na ÚHKT v Praze za pomoc a podporu při vypracovávání této práce, hlavně Ing. Janě Markové. Rovněž děkuji RNDr. Martinovi Pospíškovi, Ph.D., za ochotu být garantem této práce. V neposlední řadě pak děkuji svým rodičům a přátelům za podporu během celého studia.

Obsah

1	Úvod	8
2	Přehled problematiky	10
2.1	Akutní myeloidní leukémie (AML)	10
2.1.1	Výskyt	11
2.1.2	Etiologie a patogeneze	11
2.1.2.1	Cytogenetické aberace	11
2.1.3	Klasifikace	12
2.1.4	Diagnostika	13
2.1.5	Léčba	14
2.2	Akutní promyelocytární leukémie (APL)	15
2.2.1	Diagnostika a klasifikace	16
2.3	Kináza <i>FLT3</i> (FMS-like tyrosine kinase 3)	18
2.3.1	Interní tandemová duplikace <i>FLT3</i> genu u APL	21
3	Pacienti a metody	22
3.1	Pacienti	22
3.2	Metody	22
3.2.1	Zpracování vzorku periferní krve a/nebo kostní dřeně	22
3.2.1.1	Separace buněk na gradientu Ficoll-Paque	22
3.2.1.2	Lyzace buněk	23
3.2.1.3	Izolace RNA z lyzátu v TriZolu	23
3.2.2	RT-PCR	23
3.2.2.1	Reverzní transkripce (RT)	23
3.2.2.2	RT-PCR-stanovení interní tandemové duplikace <i>FLT3</i> genu	24
3.2.2.3	Gelová elektroforéza	24
3.2.2.4	Purifikace	25
3.2.2.5	Sekvenační reakce	25
3.2.2.6	Srážení sekvenační reakce	26
3.2.2.7	Vyhodnocení sekvenační reakce	26
3.3	Přístroje	27
3.4	Chemikálie, enzymy a roztoky	27
4	Výsledky	31
4.1	Výskyt <i>FLT3</i>/ITD u AML a APL a délka ITD genu <i>FLT3</i>	31
4.2	Vztah mezi přítomností <i>FLT3</i>/ITD a počtem leukocytů (WBC) v době diagnózy	31
4.2.1	Vztah mezi délkou ITD a WBC v době diagnózy	32
4.3	Závislost indukce kompletní remise (CR) na přítomnosti <i>FLT3</i>/ITD	32
4.3.1	Vliv délky ITD na dosažení CR	33
4.4	Vliv <i>FLT3</i>/ITD na výskyt relapsů	35
4.4.1	Vliv délky ITD na výskyt relapsů	35

4.5	Vliv <i>FLT3/ITD</i> na celkové přežití (OS)	35
4.5.1	Vliv délky ITD na OS	36
4.6	Vliv <i>FLT3/ITD</i> u APL pacientů	37
4.6.1	Vztah mezi přítomností <i>FLT3/ITD</i> a WBC v době diagnózy	37
4.6.2	Závislost indukce CR na přítomnosti <i>FLT3/ITD</i>	38
4.6.3	Vliv <i>FLT3/ITD</i> na výskyt relapsů	38
4.6.4	Vliv <i>FLT3/ITD</i> na OS	38
5	Diskuse	40
6	Závěr	44
7	Citace	46
8	Přílohy	51

Seznam zkratek

ALL	Akutní lymfoidní leukémie
AML	Akutní myeloidní leukémie
APL	Akutní promyelocytární leukémie
ATRA	Kyselina trans-retinová
bcr 1, 2, 3	Break cluster region 1, 2, 3
BM	Kostní dřeň
CALGB	Cancer and Leukemia Group B
CD135	Povrchový antigen
cDNA	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
CGH	Komparativní genomová hybridizace
CLL	Chronická lymfoidní leukémie
CML	Chronická myeloidní leukémie
CNS	Centrální nervová soustava
CR	Kompletní remise
CSF	Faktor stimulující růst kolonií
DFS	Přežití bez nemoci
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EC	Extracelulární doména
EFS	Přežití bez události
FAB	Francouzsko-Americko-Britská klasifikace
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FLK-2	Fetal liver tyrosine kinase – 2
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
ITD	Interní tandemová duplikace
ITG	Guanidin thiokyanát
JM	Juxtamembránová kináza
KIT	Receptor stem cell faktoru
mBAND	Mnohobarevné pruhování chromozómů
MDR	Léková rezistence
MDS	Myelodysplastický syndrom
ME	Merkaptoetanol
mFISH	Mnohobarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
MPD	Myeloproliferativní onemocnění
MRO	Minimální reziduální onemocnění
nt	Nukleotidy
NPM	Nukleofosmin (Nucleophosmin)
NuMA	Gen asociovaný s mitotickým aparátem jaderné matrix (Nuclear matrix mitotic apparatus – associated protein)
OS	Celkové přežití
PB	Periferní krev

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PDGFR α,β	Receptor pro růstový faktor produkovaný destičkami
PLZF	Promyelocytární leukemický zinkový prst (Promyelocytic leukemia zinc finger protein)
PML	Promyelocytární leukemický protein (Promyelocytic leukemia protein)
RA	Retinoic acid
RAR α	Gen kódující jaderný receptor α pro kyselinu retinovou (Retinoic acid receptor α)
RNA	Ribonukleová kyselina
RT	Reverzní transkripce
RTK	Receptorová tyrozinová kináza
SKY	Spektrální karyotypování
STK1	Stem cell tyrosine kinase-1
TK	Tyrozinkinázová doména
TM	Transmembránová doména
WHO	Světová zdravotnická organizace

1 Úvod

Leukémie jsou skupinou onemocnění, jejichž podstatou je nádorové zmnožení bílých krvinek v kostní dřeni a většinou i v krvi. Jde o nemoci zhoubné povahy lišící se stupněm malignity (zhoubnost leukémií spočívá v tom, že zmnožené, většinou nezralé, nádorové bílé krvinky nevykonávají svou imunitní funkci a utlačují normální krvetvorné buňky). Podle typu průběhu mohou být leukémie akutní (většinou probíhají rychle a mohou nemocného zahubit během několika dnů až týdnů od svého vzniku) nebo chronické (probíhají pomaleji a v některých případech měsíce, dokonce i roky nevyžadují žádnou léčbu). Dále lze leukémie odlišit podle typů bílých krvinek, z nichž vznikají. Leukémie může být označena jako myeloidní, pokud postihuje krvetvorné buňky granulocytární a monocytové řady, či jako lymfatická, pokud postihuje tvorbu lymfocytů. Můžeme tedy odlišit čtyři typy leukémií: akutní myeloidní leukémii (AML), akutní lymfatickou leukémii (ALL), chronickou myeloidní leukémii (CML) a chronickou lymfatickou leukémii (CLL).¹ Tato diplomová práce se bude zabývat výhradně AML.

AML vzniká maligní transformací myeloidních kmenových buněk v kostní dřeni. Různé subtypy AML mají různou prognózu. Zatímco ještě před 30-40 lety prognóza vystihovala přirozený průběh onemocnění při neexistenci účinné protinádorové terapie, v současnosti je naopak silně ovlivněna poměrně efektivní léčbou. Typickým příkladem je akutní promyelocytární leukémie (APL), původně prognosticky nejhorší AML s rychlým a fatálním průběhem.² Dnes díky použití specifické terapie lze vyléčit více než 70 % pacientů.³ Avšak přes veškeré pokroky ve způsobu léčby jsou AML stále ještě smrtelným onemocněním pro velkou část nemocných. Hlavní příčinou léčebných neúspěchů bývá nenavození kompletní remise (CR), dále pak relapsy onemocnění, které hůře reagují na chemoterapii a mají již výrazně omezenou naději na vyléčení.

Stanovení co nejpřesnější diagnózy a z ní vyplývající prognózy daného subtypu AML je klíčem k volbě racionální terapie, která se v současnosti stále více diferencuje právě ve vztahu k diagnóze a prognóze onemocnění. Prognostických faktorů byla popsána celá řada. Nicméně jako nezávislé prognostické faktory jsou uznávány pouze dva z nich: 1) cytogenetické a molekulární aberace a 2) věk.⁴ Mezi ukazatele prognózy

patří také interní tandemová duplikace genu *FLT3* (*FLT3/ITD*). Mnohé studie ukázaly, že *FLT3/ITD* je jednou z nejčastějších somatických mutací pacientů s AML. *FLT3/ITD* může mít dopad na celkové přežití (OS) nemocných a indukci relapsu. Pravděpodobnost relapsu může být podle některých autorů^{5,6} ovlivněna především délkou ITD genu *FLT3*.⁷

Cílem této práce bude zhodnotit prognostický význam interní tandemové duplikace genu *FLT3* u pacientů s AML, především ve skupině s intermediární cytogenetickou prognózou.

2 Přehled problematiky

2.1 Akutní myeloidní leukémie (AML)

Akutní leukémie představuje heterogenní skupinu maligních hematologických onemocnění, v níž je možné dle dnešních poznatků vyčlenit řadu podskupin různým klinickým i laboratorním nálezem, prognózou a odpovědí na terapii.

Akutní myeloidní leukémie (AML) je onemocnění, které vzniká maligní transformací kmenové hematopoetické buňky myeloidní řady. Ta se za normálních okolností diferencuje na buňky granulocytární, monocytární, erytroidní či megakaryocytární řady. Pro buňky akutní leukémie je typické ukončení diferenciaci na úrovni nezralých buněk. Proliferace, diferenciaci a apoptóza blastů za fyziologických podmínek podléhá autoregulačním mechanismům, naopak v případě akutní leukémie se zcela vymyká fyziologické autoregulaci.⁸ Pokračující akumulace patologických blastických buněk potlačuje fyziologickou krvetvorbu a vede k anémii, neutropenii a trombocytopenii, které podmiňují typické klinické znaky nemoci.⁹

Mezi obecné příznaky AML patří např. horečka, slabost, únava, krvácení (z dásní, do kůže a sliznic...) a zduření lymfatických uzlin. Tyto příznaky jsou dány dysfunkcí kostní dřeně při které dochází ke snížení počtu normálních bílých a červených krvinek a ke snížení počtu krevních destiček.¹⁰

Z molekulárně biologického hlediska je možné leukémie charakterizovat jako klonální hemopatie vzniklé následkem získaných somatických mutací, které zahrnují translokace (genové fúze), delece i inserce.⁹ U většiny případů AML lze prokázat změny karyotypu, tzn. různé chromozomální aberace. Tyto odchylky mohou být bez ztráty chromozómového materiálu (translokace, inverze), se ztrátou chromozómového materiálu (delece určité části chromozomu až úplná ztráta neboli monozómie) nebo se získáním chromozómového materiálu (amplifikací genů a nebo získáním nadpočetných chromozomů).¹¹ Karyotyp jakéhokoliv nádoru není neměnný: v řadě případů dochází k postupným změnám (klonální evoluci).¹² Většina chromozomálních změn, které nacházíme v nádorových buňkách, má klonální charakter (podle mezinárodně uznávané definice považujeme v onkocytogenetice za klonální změnu nález dvou mitóz se stejnou odchylkou ve smyslu přestavby chromozómu nebo stejným nadpočetným chromozómem, nebo tří mitóz ve kterých stejný chromozóm chybí).¹³

2.1.1 Výskyt

Výskyt onemocnění je 2 až 3/100 000 obyvatel za rok. S věkem nad 65 let se incidence zvyšuje a dosahuje hodnot 15 až 17/100 000 obyvatel za rok.⁸

2.1.2 Etiologie a patogeneze

Etiologie AML není zcela objasněna. Menší část případů souvisí s genetickou predispozicí nebo s expozicí účinku kancerogenů.⁸ V menším procentu případů může být vznik AML podmíněn předešlou cytotoxickou terapií jiné malignity.¹⁴ K nejnebezpečnějším kancerogenům patří alkylační cytostatika, inhibitory topoizomerázy II, organická rozpouštědla typu benzenu či toluenu. Podobně i ionizující záření působí chromozomální změny. U AML vzniklých s nebo bez kontaktu s kancerogeny jsou ve většině případů prokazatelné chromozomální změny. Obvyklé jsou vyrovnané translokace úseků obsahujících transkripční geny. S tím je spojena deregulace vývoje kmenové krvetvorné buňky a vznik jednotlivých buněčných typů akutních leukémií.⁸ Část případů AML vzniká *de novo* a nezanedbatelná část vzniká přechodem z myelodysplastického syndromu (MDS) nebo myeloproliferativního onemocnění (MPD). Ve všech těchto případech se jedná o AML označovanou jako sekundární.¹⁴

2.1.2.1 Cytogenetické aberace

Přibližně 60-70 % nemocných s *de novo* AML má klonální, získanou chromozómovou odchylku v leukemických buňkách. Některé z těchto změn jsou charakteristické pro určitý specifický typ AML a mají diagnostickou hodnotu, jiné mohou být jen náhodné u určitého pacienta. Nejčastějšími chromozómovými translokacemi u AML jsou t(8;21), které se vyskytují u některých případů AML M2, t(15;17), která je specifickou odchylkou u AML M3 a t(9;11), objevující se až u 14 % nemocných s AML M5. Z trizomií je nejčastější trizómie 8 u všech subtypů, stejně jako monozómie 7, která se může objevit jako samostatná nebo přídavná změna. Monozómie 7 má velmi nepříznivou prognózu. Trizómie 8 nebo monozómie 7, stejně jako del (7q) a del (5q), jsou u nemocných s AML časté, ale neváží se s určitým subtypem leukémie. Vzhledem k tomu, že tyto změny často nacházíme u pacientů s MDS, považujeme je za změny nenáhodné, ale nikoliv specifické. Cytogenetické vyšetření je u akutních

myeloidních leukémií jednou z nejdůležitějších pomocných metod, které mohou monitorovat účinky léčby a postup choroby.¹⁴

2.1.3 Klasifikace

Léčba AML je v některých případech závislá na přesném podtypu leukémie, resp. určení daného typu AML. Pro rozdělení se dá použít starší, dříve běžná Francouzsko-Americko-Britská (FAB) klasifikace, nebo novější klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO).

FAB klasifikace definuje typy M0 až M7 a odlišuje je především na základě morfologie (viz str. 13).¹⁵

WHO klasifikace, na rozdíl od FAB klasifikace zohledňuje především cytogenetické abnormality (které mají prognostický význam, a teprve na dalších místech bere v úvahu morfolonii event. anamnestické parametry). WHO rozděluje AML na čtyři základní skupiny. (1) AML s definovaným chromozomálním nálezem (většinou jde o translokace s relativně dobrou prognózou u kterých lze často dosáhnout CR), (2) AML s multilineární dysplázií (se špatnou prognózou), (3) AML a MDS v důsledku léčby (cytotoxické chemoterapie nebo radioterapie) a (4) jiné formy AML, které se shodují s morfologickým dělením podle FAB klasifikace. První tři skupiny jsou rozdělené z hlediska důležitosti prognostických faktorů. Některé cytogenetické profily korelují s odpovědí na léčbu a s celkovým přežitím. AML s translokacemi $t(8;21)(q22;q22)$ a $inv(16)(p13;q22)$ nebo $t(16;16)(p13;q22)$ jsou obecně doprovázeny příznivou prognózou. Na rozdíl od toho AML s multilineární dysplázií, především u starších jedinců, je většinou spojena s nepříznivým cytogenetickým profilem, např. $-7/del(7)$, $-5/del(5)$ a s vyšší expresí proteinů s rezistencí na cytostatika (tzv. „multidrug resistance“, MDR) a nepříznivou odpovědí na léčbu.¹⁶ MDR patří mezi hlavní problémy při léčbě maligních onemocnění a má za následek nízké hladiny léčebně podávaných cytostatik v buňce, způsobené jejich zvýšeným vylučováním.¹⁷ V poslední, čtvrté skupině, jsou ty případy, které se nepodařilo blíže zařadit do předchozích skupin, a jejich dělení je založeno stále na FAB klasifikaci. Nejvýznamnější změnou oproti FAB klasifikaci je, že pro diagnózu AML stačí nález blastů nad 20 %, na rozdíl od 30 %, požadovaných podle FAB. U FAB klasifikace

případy s 20-30 % blastů byly řazeny k MDS s nadbytkem blastů v transformaci – RAEB-T.¹⁶ Rozdělení AML podle FAB a WHO klasifikace je shrnuto v následující tabulce (Tab. 2.1, Tab 2.2).

Tab. 2.1 Rozdělení AML podle FAB klasifikace

FAB klasifikace AML ¹⁸	
M0	myeloblastická leukémie minimálně diferencovaná
M1	myeloblastická leukémie bez vyzrávání
M2	myeloblastická leukémie s vyzráváním
M3	promyelocytární leukémie
M4	myelomonocytární leukémie
M5a	monoblastická leukémie
M5b	monocytární leukémie
M6	erytroleukémie
M7	megakaryoblastická leukémie

Tab. 2.2 Rozdělení AML podle WHO klasifikace

WHO klasifikace AML ¹⁶
AML s rekurentním chromozomálním nálezem
AML s multilineární dysplazií
AML a MDS v důsledku léčby (sekundární)
AML blíže nezařazená (dělená podle FAB klasifikace)

2.1.4 Diagnostika

Diagnózu akutní leukémie je možné stanovit pomocí morfologického, imunofenotypového, cytogenetického a molekulárně biologického vyšetření periferní krve a především kostní dřeně.

Samotný počet leukocytů v periferní krvi není diagnostický. Obvykle bývá zvýšený, může však být i normální či dokonce snížený. Leukocytóza přesahující $100 \times 10^9/l$ je u akutní leukémie poměrně vzácná, častější bývá u chronických leukémií. Při vyšetření diferenciálního krevního obrazu svědčí pro diagnózu akutní leukémie přítomnost blastů >20 % z celkového počtu jaderných buněk.

K definitivnímu stanovení diagnózy akutní leukémie je nutné vyšetření kostní dřeně. V myelogramu lze diagnózu akutní leukémie potvrdit nálezem >30 % blastů v kostní dřeni podle FAB kritérií.⁸ WHO klasifikace vyžaduje pro diagnózu AML

přítomnost alespoň 20 % blastů v kostní dřeni. Typ leukémie lze upřesnit pomocí speciálních cytochemických reakcí a pro podrobnější klasifikaci a získání prognostických informací jsou nutná další vyšetření.⁸

Cytogenetika se v posledních letech stala významnou součástí klinického hodnocení hematologických nemocných, i když klasické proužkovací metody ke stanovení karyotypu bývají mnohdy neúspěšné, neboť ve vzorku nemusí být dostatek hodnotitelných metafází. Pokroky molekulární cytogenetiky přinesly možnost lokalizace určitých DNA sekvencí na chromozómech nebo v buněčných jádrech v interfázi. Největší význam a využití získala v posledních letech metoda zvaná fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s řadou modifikací, které zvyšují specifitu a citlivost stanovení chromozomálních odchylek.¹⁹ Existuje i řada metod, které umožňují analyzovat celý genom a hledat změny v počtu a struktuře genů a DNA sekvencí. Z technik molekulární cytogenetiky jsou to komparativní genomová hybridizace (CGH), spektrální karyotypování (SKY), mnohobarevné pruhování chromozomů (mBAND) a metoda mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace (mFISH).¹¹ Molekulární techniky přinesly především významný pokrok v záchytu hledaných aberací a jsou proto i přínosem pro prognostické zařazení jednotlivých pacientů.

2.1.5 Léčba

Léčba akutních leukémií má 2 fáze. U první, která se nazývá indukční, se lékaři snaží dosáhnout hematologické remise choroby. Kompletní hematologická remise (CR) je charakterizována normalizací hodnot krevního obrazu, kde se již nenachází populace nezralých leukemických buněk a výskyt blastických elementů v kostní dřeni musí být nižší než 5 %. V této době však v organismu ještě přetrvávají nádorové buňky (odhadem méně než 10^9). Tomuto jevu se říká minimální reziduální onemocnění (MRO). Tu není možné detekovat rutinními hematologickými metodami, ale může zde pomoci imunofenotypizace, cytogenetika či molekulární biologie. Likvidaci MRO si klade za cíl 2. fáze léčby, tzv. postremisní (konzolidační léčba), která by měla pacienta v ideálním případě vyléčit a zabránit relapsu, tj. znovuvzplanutí choroby. Běžně CR dosáhnou 2/3 pacientů a dlouhodobé přežití (nad dva roky) se udává cca u 1/4 případů.²⁰ Po dvou letech trvání CR je pravděpodobnost relapsu již velmi nízká (2 %).

2.2 Akutní promyelocytární leukémie (APL)

Akutní promyelocytární leukémie je subtypem AML, u kterého byla popsána řada diagnostických, prognostických i léčebných specifíků. Proto se o ní zmíním podrobněji v této kapitole.

APL je podtyp AML a podle FAB klasifikace se označuje jako M3 typ a představuje 5-20 % AML. Pro APL je charakteristický zvýšený výskyt abnormálních promyelocytů v kostní dřeni. Do periferní krve se u typických APL vyplavuje minimum nezralých granulocytů (často nemusí jít o promyelocyty a mohou se objevit např. myelocyty a metamyelocyty). Ve většině případů je možné v nátěru z kostní dřene event. i z periferní krve najít tzv. „faggot cells“, tj. buňky s otýpkami či snopci Auerových tyčí. Klinickému obrazu dominuje hemoragická diatéza dána typickou koagulopatií a trombocytopenií s krvácením do kůže, sliznic, ale i vnitřních orgánů (CNS, plíce, trávicí trakt). Může být přítomna krev v moči (hematurie) a gynekologické krvácení (metroragie). Nemocní zpravidla mívají různý stupeň anémie.^{3,21-26}

APL byla původně prognosticky nejhorší AML s rychlým, fatálním průběhem. K smrti pacienta mohlo dojít během několika hodin, nejčastěji v důsledku koagulopatie, projevující se krvácením, v některých případech naopak trombózou. V současnosti je však APL onemocněním s nejlepší prognózou mezi všemi typy AML.²⁶ Nejnebezpečnějším obdobím pro pacienty jsou první dny po diagnóze.

Výskyt APL se odhaduje na přibližně 0,7 případů na 1 milion obyvatel a rok, což představuje asi 5-20 % všech AML. Průměrný věk nemocných se pohybuje kolem 45 let. Přes 90 % nemocných je ve věku od 15 do 60 let. Pravděpodobnost postižení obou pohlaví je stejná.^{3,21-25}

Předpokládá se, že prvotní změnou vedoucí ke vzniku APL je fúze, které se účastní geny *PML* (promyelocytic leukemia) na chromozomu 15 a *RAR α* (retinoic acid receptor α) na chromozómu 17 v rámci translokace t(15;17)(q22;21). Výsledným produktem je fúzní protein PML/RAR α , který narušuje normální funkce obou proteinů a hraje klíčovou roli v leukemogenezi APL. Bylo popsáno dalších pět alternativních translokací, které se však u APL vyskytují velmi vzácně. APL s t(11;17)(q23;q21) s fúzním genem *PLZF/RAR α* (promyelocytic leukemic zinc finger protein) se vyskytuje zhruba u 0,8 % pacientů. U přibližně 0,4 % případů APL lze prokázat t(5;17)(q35;q21)

s transkriptem *NPM/RAR α* . Zbylé tři typy cytogenetických a molekulárních aberací byly popsány pouze v ojedinělých případech. Jedná se o t(11;17)(q13;q21) s fúzním genem *NuMA/RAR α* , o intersticiální delecí, která vede k tvorbě fúzního genu *STAT5b/RAR α* , a o poslední nedávno popsanou fúzi *PRKARIA/RAR α* , vzniklou rovněž intersticiální delecí.²⁶ Jak jsem se zmínila výše, *PML/RAR α* je nejčastější fúzní gen. Při translokaci (15;17) dochází k výměně materiálu mezi chromozómy 15 a 17. Ke zlomu na chromozómu 17 dochází v lokusu obsahujícím gen *RAR α* , a to vždy v intronu 2, zatímco zlom na chromozómu 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 – bcr), nebo v intronu 3 (bcr 3), zbylých 5-10 % může být v exonu 6 (bcr 2). V případě zlomu bcr 1, resp. bcr 3, je 5' konec intronu 6 *PML* (resp. 3) fúzován s 3' koncem intronu 2 *RAR α* . V případě zlomu bcr 2 se část *PML* exonu 6 *PML* spojí s intronem 2 *RAR α* .^{27,28}

2.2.1 Diagnostika a klasifikace

Morfologická klasifikace akutních leukémií FAB zařazuje APL jako podtyp AML M3 a rozeznává standardní (hypergranulární) a variantní (mikrogranulární) formu (M3v).^{3,21-25}

Laboratorně je APL zpravidla charakterizována výskytem leukopenie, resp. pancytopenií. Při variantní formě, která se vyskytuje asi v 10 %, je naopak častá leukocytóza. V koagulačním vyšetření jsou ve většině případů přítomny známky konsumpční koagulopatie (s poklesem hladiny koagulačních faktorů, fibrinogenu a trombocytů, s prodlouženými časy zevního i vnitřního systému a pozitivitou fibrinových štěpů a trombin-antitrombinových komplexů) a aktivace fibrinolýzy (s pozitivitou D-dimerů a fibrin degradačních produktů).^{3,21-25}

Při vyšetření imunofenotypu se u APL buněk zjistí exprese myeloidních antigenů (MPO, CD9, CD13, CD33, CDw65), asi v jedné čtvrtině případů s koexpresí nemyeloidních znaků CD2, CD19 a CD34 se současnou negativitou antigenu HLA-DR. Tento fenotyp však není pro APL zcela specifický. Exprese CD56 zhoršuje prognózu. Pro diagnózu APL je naopak specifický nálezný translokace t(15;17)(q22;q21) prokázány cytogeneticky, pomocí FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) nebo molekulárně

biologicky pomocí RT-PCR (polymerázové řetězové reakce po reverzní transkripci), která identifikuje přítomnost charakteristického fúzního transkriptu *PML/RAR α* .^{3,21-26}

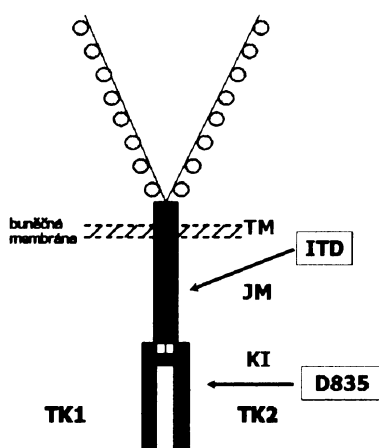
APL je prvním typem akutní leukémie, u které lze docílit CR necytostatickou léčbou. V posledních dvaceti letech si v léčbě APL získala pevné postavení all-trans-retinová kyselina (ATRA). Je prokázáno, že její přidání k chemoterapii jak v indukční, tak v udržovací fázi zlepšuje přežití nemocných. ATRA významně zvyšuje účinnost cytostatické léčby a snižuje riziko relapsů. CR lze navodit ale i monoterapií samotnou ATRA, účinnější je však v kombinaci s chemoterapií. Pod jejím vlivem patologické promyelocyty vyžívají a podstupují terminální diferenciaci spojenou s apoptózou. Buňky obsahující fúzi *PLZF/RAR α* jsou však k působení ATRA rezistentní. Podávání ATRA vede i k úpravě intravaskulární koagulopatie, a snížení rizika časného úmrtí o 5-10 %. Ke komplikacím léčby patří tzv. RA (retinoic acid) syndrom, charakterizovaný řadou příznaků. Tento syndrom se může vyskytnout až u 1/3 nemocných léčených ATRA v monoterapii. Riziko mortality dosahuje až 30 %. Trvalé podávání kapslí ATRA však pravidelně vede po několika měsících k relapsu. Molekulární relaps je ve všech případech do 2-4 měsíců následován relapsem klinickým. Proto moderní léčba APL spočívá v podávání cytostatických kúr v kombinaci s intermitentním podáváním ATRA. Cílem léčby je dosáhnout molekulárně genetickou remisi onemocnění (na úrovni PCR). U rezistentních případů lze použít také oxid arzenitý.^{3,21-26}

2.3 Kináza FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3)

FLT3 je receptorová tyrozinová kináza (RTK) patřící do III. rodiny RTK. Je strukturně příbuzná s receptorem pro růstový faktor produkovaný destičkami (PDGFR α a PDGFR β), faktorem stimulující růst kolonií (CSF) a KIT (receptor stem cell faktoru). FLT3 kináza je také známa pod jmény jako STK1 (stem cell tyrosine kinase-1), FLK-2 (fetal liver tyrosine kinase – 2) nebo jako povrchový antigen CD135.^{7,29-33}

Protein FLT3 je za normálních okolností exprimován na povrchu krvetvorných buněk, především na povrchu progenitorových a prekurzorových buněk myeloidní, ale i lymfoidní řady.⁷ Ze zralých buněk jej lze prokázat na některých populacích monocytů.^{7,34} Ligand FLT3 je cytokin, označovaný jako FL (FLT3 ligand), hraje významnou roli při růstu raných progenitorových buněk.^{7,33,35} FLT3 má důležitou roli v proliferaci, replikaci a diferenciaci buněk.^{7,29-32}

Byly popsány dvě formy FLT3: 158-160 kDa s glykosylovanými místy na extracelulární doméně, který je vázaný na buněčnou membránu, a na membránu nevázaný neglykosylovaný protein 130-143 kDa. FLT3 protein je tvořen 993 aminokyselinami a skládá se z extracelulární (EC), transmembránové (TM) a juxtamembránové (JM) domény, ke které jsou připojeny dvě tyrozinkinázové (TK) domény (viz Obr. 2.3, str. 19). Důležité domény JM a TK jsou kódovány kodóny 572-603, resp. 604-958.³⁶ Bylo zjištěno, že JM doména působí jako autoinhibitor funkce FLT3. Gen *FLT3* se mapuje do chromozomálního pruhu 13q12. V myším i lidském systému byl prvně popsán Rosnetem *et al.* v r. 1991;³⁷ byl jím a spolupracovníky také poprvé klonován. V původním popisu *FLT3* genu se hovořilo o 21 exonech.^{37,38} Na základě strukturní homologie s *c-KIT* se usuzovalo, že EC doména (podobná imunoglobulinu) je kódována 5 exony; pozdější práce ukázaly, že těchto exonů je 8. Exony *FLT3* byly proto přečíslovány - nyní jich je tedy 24.⁷



Obr. 2.3 Schéma struktury FLT3 proteinu a jeho domény. Šipky ukazují na oblasti, kde dochází k mutacím (označovaným *FLT3/ITD* a *FLT3/TKD*). EC – extracelulární doména; TM – transmembránová doména; JM – juxtamembránová doména; KI – kinázová inserce; TK – tyrozinkinázové domény 1 a 2.⁷

FLT3 mutace je jednou z nejčastějších somatických změn u AML. Jsou známy tři typy *FLT3* mutací. Nejčastější je mutace v JM doméně, která je přítomna u 20-25 % AML pacientů. Dále se vyskytují bodové mutace, event. malé delecce, v TK2 doméně nalezené u 7-8 % všech AML pacientů. Nejméně běžná je bodová mutace v JM doméně.³⁹

Nejznámější mutace v JM doméně je interní tandemová duplikace (ITD), která je spojená se změnou délky *FLT3*. Při ITD dojde k tomu, že se zduplikuje různě dlouhý úsek genu, od tří až přes 400 nukleotidů. Výsledkem je ale vždy in-frame mutace (nikdy nedojde k posunu čtecího rámce a výsledný počet nukleotidů je vždy dělitelný třemi). Místo začátku zduplikované sekvence je variabilní, většinou leží v exonu 14. Duplikovaná část genu se řadí za původní v orientaci „hlava k ocasu“. V menšině případů dochází k inzerci a ve zcela výjimečných případech k delecí různého počtu nukleotidů.⁷

Bodové mutace v TK2 doméně jsou v kodonech 835 a 836. V roce 2001 Yamamoto *et al.*³⁹ a Abu-Duhier *et al.*⁴⁰ popsali 6 typů bodových mutací v pozici D835 a jednu v pozici I836. Jde o missence mutace: při mutaci D835 je původní aspartát nejčastěji substituován tyrozinem (D835Y), méně častěji jinými aminokyselinami. Při mutaci I836M jde o substituci izoleucinu methioninem.^{39,40}

Protein kódovaný jakoukoli *FLT3/ITD* má tu vlastnost, že ke své aktivaci nepotřebuje ligand (toto je obecná vlastnost klinicky důležitých mutací tyrozinových kináz). Mutace v JM doméně tedy patrně vede k odblokování její autoinhibiční funkce při aktivaci FLT3 kinázy. Při *FLT3/ITD* dochází k dimerizaci receptoru FLT3, autofosforylaci a konstitutivní aktivaci, jejímž výsledkem je downstream signalizace cestami, účastnicími se regulace proliferace, diferenciaci a apoptózy. Signální dráhy FLT3 i mutovaného proteinu jsou však nesmírně plastické a málo přehledné, navíc mohou být tkáňově specifické. Nelze zcela vyloučit, že se *FLT3/ITD* může podílet i na potlačení proteinů, důležitých pro normální diferenciaci a maturaci v neutrofilní řadě. I bodové mutace v TK a JM doménách mají za následek konstitutivní aktivaci receptoru FLT3. V myším transplantačním modelu indukuje *FLT3/ITD* oligoklonální myeloproliferativní onemocnění, zatímco mutace domény TK indukuje lymfoproliferativní onemocnění, a to s poměrně dlouhou latencí. Fakt, že přenesením *FLT3/ITD* vzniká myeloproliferativní onemocnění, ukazuje na společnou vlastnost konstitutivně aktivovaných tyrozinových kináz: dochází k aktivaci proliferace, aniž by byla výrazně narušena diferenciaci a maturace myeloidních prekurzorových buněk.⁷

Mnoho studií AML ukázalo, že přítomnost ITD je předzvěstí špatné prognózy pro dětské a dospělé pacienty.⁴¹ Je ale nutné se zmínit, že hlavní vliv mají cytogenetické aberace a věk, které se považují za nezávislé prognostické faktory. I když se zdá, že ani tyto faktory nemusí být zcela nezávislé. Zatímco incidence chromozomálních translokací svázaných s dobrou prognózou je celkem konstantní v různých věkových skupinách, roste s věkem incidence prognosticky nepříznivých cytogenetických aberací, takže jejich relativní frekvence je u starších věkových skupin vyšší.⁷ I léčba může být považována za relativně nezávislý prognostický faktor, i když z pochopitelných důvodů je závislý na věku, protože u vyšších věkových skupin je intenzita léčby nižší. Na každý případ typ a intenzita léčby může zcela setřít význam méně robustních prognostických faktorů.⁷

Když jsme se zaměřili na vliv *FLT3/ITD* vzhledem k těmto nezávislým prognostickým faktorům, zjistili jsme, že vysoké procento výskytu *FLT3/ITD* je nalezeno mezi pacienty s intermediárním cytogenetickým rizikem. Naopak vzácný výskyt je u pacientů s nepříznivou cytogenetickou prognózou. U dětských pacientů je

výskyt *FLT3/ITD* nižší (přibližně 15 %) a u dětí do deseti let se nachází jen výjimečně. U pacientů starších 60 let *FLT3/ITD* mutace nemají zvláštní prognostický význam.⁴¹

Pokud se týká vlivu *FLT3/ITD* na celkové přežití (OS), přežití bez nemoci (DFS) nebo bez události (EFS), tato mutace nemá patrně žádný význam u pacientů s APL. U nich je rozhodující přežití období indukční léčby a dosáhnout CR. Zásadně jiný dopad má *FLT3/ITD* na OS, DFS a EFS u non-APL AML (především u pacientů s intermediární cytogenetickou prognózou). U nich *FLT3/ITD* v době diagnózy predikuje vyšší incidenci relapsů a horší prognózu v uvedených parametrech. Negativní prognostický dopad *FLT3/ITD* se uplatňuje až po navození CR, a to především v podobě zvýšené incidence relapsů.⁷ Ne všichni pacienti s *FLT3/ITD* mutacemi mají špatnou prognózu. V případech s nízkou alelickou náloží *FLT3* mají pacienti přežití srovnatelné s AML pacienty bez *FLT3* mutací. Zdá se, že délka ITD má prognostický význam: delší ITD má horší prognostický dopad než kratší ITD.⁴²

FLT3/ITD vždy vymizí při dosažení CR. Často se znovu objeví v relapsu onemocnění. U některých pacientů s AML dochází k tomu, že *FLT3/ITD* v době relapsu může být jiná, než v době diagnózy. Dle metaanalýzy dat se zhruba u 4 % pacientů tato aberace nemusí v relapsu objevit vůbec. Naopak u většiny pacientů zůstává mutační stav *FLT3/ITD* stejný, někdy se původní *FLT3/ITD* může objevit znovu již před klinickým relapsem. Přibližně 10 % relabujících pacientů má v době relapsu zjizitelnou *FLT3/ITD* mutaci, ačkoli ji nemělo v době diagnózy. Tato pozorování jasně ukazují na fakt, že *FLT3/ITD* je druhotnou událostí v patogenezi AML.⁷

2.3.1 Interní tandemová duplikace *FLT3* genu u APL

FLT3/ITD je společně s mutací v kodónu D835 genu *FLT3* nejčastější sekundární genetickou lézí u APL. Morfologicky variantní formy M3v jsou vůbec nejčastějším subtypem AML, u kterého je *FLT3/ITD* zjizitelná. Vyskytuje se až v 65 % těchto případů a ve 23 % případů APL s klasickou morfologií M3.²⁶

3 Pacienti a metody

3.1 Pacienti

V letech 1994-2008 bylo nově diagnostikováno 492 pacientů s AML. Jejich věk byl v rozmezí 18,3-90,1 let, medián 55,0 let, medián počtu bílých krvinek (WBC) byl $15,3 \times 10^9/l$ (rozmezí $0,4-488 \times 10^9/l$). Zastoupení muži/ženy bylo 244/248. Do skupiny s příznivou cytogenetickou prognózou patřilo 87 pacientů, střední cytogenetickou prognózu mělo 238 nemocných a nepříznivou 92 pacientů. 408 pacientů z této skupiny bylo testováno na přítomnost *FLT3/ITD*. Tato skupina měla rozmezí věku 18,3-81,7 let a medián 53,9 let. WBC při diagnóze byl v rozmezí $0,3-488 \times 10^9/l$ (medián $15,3 \times 10^9/l$). Zastoupení mužů a žen bylo 204/204. U 52/408 (12,7 %) pacientů byla diagnostikována APL. Pro diagnostiku byla vyšetřována krev a/nebo kostní dřeň pacientů v době stanovení diagnózy AML na základě informovaného souhlasu pacienta. Všechny vzorky byly od pacientů z Ústavu hematologie a krevní transfúze (ÚHKT) v Praze. Vzorky byly zpracovány standardním postupem viz **kap. 3.2**. Použité přístroje a chemikálie jsou uvedeny v **Tab. 3.1** (str. 27) a **Tab. 3.2** (str. 27).

3.2 Metody

3.2.1 Zpracování vzorku periferní krve a/nebo kostní dřeně

3.2.1.1 Separace buněk na gradientu Ficoll-Paque

Separace mononukleárních buněk kostní dřeně a/nebo periferní krve byla provedena na gradientu Ficoll-Paque o hustotě 1077 g/l za sterilních podmínek v laminárním boxu. Přibližně 3 ml periferní krve (PB) nebo kostní dřeně (BM) smíchané se sterilním PBS bylo přepipetováno do připravených 10 ml zkumavek s 5 ml Ficollu. Po centrifugaci (2100 ot./min., 15 °C, 30 min.) následoval odběr prstence do 15 ml zkumavky a doplnění PBS přibližně 1 cm pod okraj. Směs byla promíchána a poté byly buňky centrifugovány (1600 ot./min., 15 °C, 5 min.). Pokud byl vzorek kontaminovaný erytrocyty bylo přidáno cca 5 ml 1 x koncentrovaného lyzačního roztoku, pak následovala opět centrifugace (1600 ot./min., 15 °C, 5 min.). Sediment byl znovu promyt PBS a byla provedena centrifugace (1600 ot./min., 15 °C, 5 min.). Poté byl k buňkám přidán 1 ml sterilního PBS a stanoven počet buněk ve vzorku

v Neubauerově komůrce (100 μ l tryptanové modři + 90 μ l PBS + 10 μ l buněk do počítací zkumavky) a vypočítán počet buněk na 1 ml buněčné suspenze.

3.2.1.2 Lyzace buněk

Do připravených 1,5 ml umělohmotných zkumavek bylo dáno max. 20 mil. buněk a ihned lyzováno v 1 ml reagentie TriZol a důkladně promícháno. Lyzáty na skladování byly uchovávány v ITG + ME (guanidin thiokyanát + 0,72% merkaptoetanolu) v koncentraci 10^6 buněk na 0,5 ml ITG + ME. Tyto lyzáty byly uchovávány v -70 °C.

3.2.1.3 Izolace RNA z lyzátu v TriZolu

K lyzátu bylo přidáno 200 μ l chloroformu (čistého) a důkladně protřepáno. Po centrifugaci (13 000 ot./min., 4 °C, 10 min.) se v umělohmotné zkumavce ustálily tři fáze. Horní vodná fáze obsahovala RNA, střední mezifáze DNA a spodní organická růžová fáze obsahovala protein. Horní vodná fáze byla opatrně odebrána a předána do nové zkumavky spolu s 500 μ l isopropanolu a převrácením promíchána (fáze s DNA a proteinem byla uchovávána v ledničce pro další použití). Po centrifugaci (13 000 ot./min., 4 °C, 30 min.) a slití supernatantu byl pelet opláchnut v 1 ml 75% etanolu a opět stočen (13 000 ot./min., 4 °C, 5 min.). Po odsátí zbytku etanolu bylo k sedimentu přidáno 5 μ l TE pufru na 1 mil. buněk. RNA byla v TE pufru rozpouštěna 10 minut při 55 °C. Roztok RNA byl dlouhodobě uchováván v -70 °C.

3.2.2 RT-PCR

3.2.2.1 Reverzní transkripce (RT)

V 0,6 ml zkumavce byly smíchány 2 μ l vodného roztoku RNA spolu s 2 μ l náhodných hexamerů deoxynukleotidů (25 pmol/ μ l), denaturovány 10 min. při 65 °C a rychle zchlazeny. Po zchlazení bylo přidáno 6 μ l master mixu. Složení master mixu pro jeden vzorek bylo 1,75 μ l vody, 2 μ l 5 x FS pufr, 1 μ l DTT (0,1 M), 0,5 μ l dNTP, 0,25 μ l RNasin (40 U/ μ l) a 0,5 μ l SuperScript II (200 U/ μ l). Reakční směs v celkovém objemu 10 μ l byla inkubována 60 min. při 42 °C a následně denaturována 2 min. při

95 °C, poté chlazená při 4 °C. Komplementární DNA (cDNA) byla skladována při -20 °C.

3.2.2.2 RT-PCR-stanovení interní tandemové duplikace genu *FLT3*

cDNA připravená v předchozím kroku (RT) byla amplifikována užitím polymerázové řetězové reakce (PCR). Na jeden vzorek bylo zapotřebí 1 µl cDNA, 2,5 µl 10 x pufru, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 0,125 µl Ampli.Taq (5 U/µl) dále 0,5 µl primeru R5 (192 nmol), primeru R6 (38,9 nmol) a dNTP. Celá směs byla doplněna H₂O na 24 µl (17,875 µl H₂O). Pomocí jednoho páru primerů byl amplifikován jak divoký typ, tak ITD genu *FLT3*. V ÚHKT byly použity následující primery: přední R5 (5'-TGTCGAGCAGTACTCTAAACA-3') a reverzní R6 (5'-ATCCTAGTACCTTCCCAA ACTC-3'). Vlastní polymerázová řetězová reakce probíhala ve třech krocích. První (denaturace) sloužil k rozvolnění řetězců dsDNA při teplotách 92-96 °C. V druhém kroku byly k jedno řetězovým DNA-matricím připojeny primery (annealing) při teplotách 45-72 °C. Syntéza, tedy prodlužování vlákna DNA začínala, tak jako v normální buňce, na 3'-OH konci primeru (extenze). Sekvence denaturace, annealingu a extenze představovala jeden cyklus a opakování takových cyklů pak vedlo k amplifikaci DNA. V ÚHKT byl použit následující program pro RT-PCR, po 5 minutách denaturace při 94 °C následovalo 10 cyklů s profilem: denaturace 94 °C/15 s, annealing 56 °C/30 s, polymerace 72 °C/45 s a dále 30 cyklů s profilem: denaturace 94 °C/15 s, annealing 52 °C/30 s a polymerace 72 °C/45 s. Produkt PCR byl hodnocen pomocí gelové elektroforézy v 2% agaróze, viz Obr 3.1 (str. 25).

3.2.2.3 Gelová elektroforéza

Jak už bylo zmíněno výše, pro hodnocení PCR produktů byla použita 2% agaróza. Gel byl připraven uvařením 200 ml 0,5 x koncentrovaného TBE se 4 g agarózy. Po uvaření bylo k roztoku přidáno 12 µl ethidium bromidu. Produkt PCR byl smíchán se 7 µl Orange G a do jednotlivých jamek gelu bylo napipetováno 20 µl vzorku s Orange G. Jako žebříček bylo použito 7 µl 50 Bp DNA O'RangeRuler. Elektroforéza probíhala při napětí 6 V/cm⁻¹ (přibližně 120 V). Rozdělení wt genu a ITD genu *FLT3* bylo kontrolováno pomocí UV transluminátoru. Po dostatečném rozdělení byl horní

proužek (s ITD mutací *FLT3* genu) vyříznut, předán do označené zkumavky a zmražen na - 20 °C.

3.2.2.4 Purifikace

Zmražený proužek gelu byl zvážen, byl k němu přidán přibližně 4 násobek QG pufru a inkubován 10 min. při 50 °C. Vzorek byl průběžně promícháván. Po inkubaci byl přidán isopropanol (také vyhřátého na 50 °C) v objemu odpovídajícím objemu gelu. Směs byla předána na kolonku a dána do centrifugy (1 min. při 13 000 ot./min.). Supernatant byl vylit, bylo přidáno 0,5 ml QG pufru, a poté centrifugován (1 min. při 13 000 ot./min.). Supernatant byl vylit a bylo přidáno 0,7 ml PE pufru a inkubován 2-5 minut při pokojové teplotě a následně centrifugován (1 min., 13 000 ot./min.). Supernatant byl opět vylit a byla provedena centrifugace (1 min., 13 000 ot./min.). Kolonka byla přendána na 1,5 mililitrovou umělohmotnou zkumavku, bylo přidáno 30 µl EB pufru a pak následovala centrifugace (2 min., 13 000 ot./min.). Vzorek byl uchováván v mrazáku při - 20 °C.



Obr. 3.1 RT-PCR produkt *FLT3* na gelové elektroforéze.

Šipky označují vzorky kostní dřeně s *FLT3/ITD*, u kterých je navíc kromě produktu wt (divoké alely) genu i produkt ITD. Je vždy delší a proto se hůře pohybuje na gelu v elektrickém poli. Silnou šipkou je označen případ se ztrátou wt alely.⁷

3.2.2.5 Sekvenační reakce

3 µl vzorku z purifikace byly smíchány s 1 µl 10 x naředěného primeru R5, 2 µl Big Dye 3.1 a 4 µl vody. Reakční směs v celkovém objemu 10 µl byla vložena do termálního cyklieru vyhřátého na 95 °C a byla spuštěna sekvenační reakce. Reakce probíhala v 30 cyklech s následujícím profilem: 94 °C/2 min., 94 °C/15 s, 50 °C/45 s a

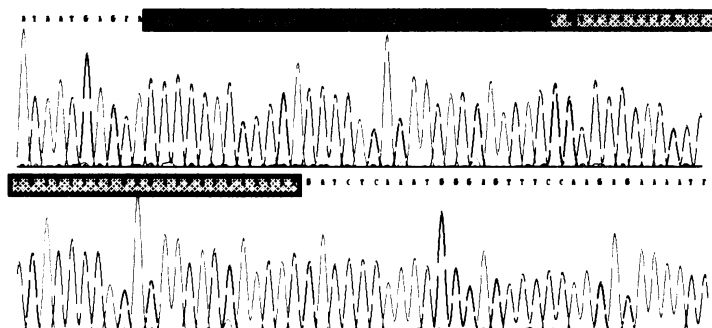
60 °C/4 min. Pokud sekvenace byla příliš krátká, byl v RT-PCR místo předního primeru R5 použit primer Q FLT (5'-ACCCTGCTAATTTGTCACAAG-3'), který nasedá na DNA-matrici později.

3.2.2.6 Srážení sekvenační reakce

Nejdříve byla připravena směs 80 µl vody, 10 µl NH₄Ac (7 M) a 0,25 µl glykogenu na jeden vzorek. Do 1,5 ml zkumavek bylo napipetováno 250 µl 96% etanol (z mrazáku), 90 µl směsi (viz. výše) a 10 µl sekvenační reakce. Směs byla promíchána a dána na 10 minut do mrazáku. Poté byly zkumavky se vzorky předány do stolní chlazené centrifugy (20 min. při 14 000 ot./min.). Po stočení byla směs odsáta až na pelet. Bylo přidáno 300 µl 70% etanolu, zkumavky byly promíchány a centrifugovány (5 min. při 14 000 ot./min.). Etanol byl odsát na pelet a znovu bylo přidáno 300 µl 70% etanolu a opět následovala centrifugace (5 min. při 14 000 ot./min.). Etanol byl odsát na sucho. Pelet byl nechán vyschnout a bylo k němu přidáno 30 µl formamidu a rozpuštěn 30 minut při pokojové teplotě. Po rozpuštění byl roztok denaturován 2 minuty při 100 °C a přepipetován do destičky na sekvenaci, která byla dána do sekvenátoru.

3.2.2.7 Vyhodnocení sekvenační reakce

Vyhodnocení sekvenací bylo prováděno pomocí internetových stránek www.ncbi.nlm.nih.gov, porovnáním produktu PCR amplifikace mutovaného genu *FLT3* na úrovni cDNA (tj. primery R5 x R6, příloha str. 51) se sekvenací jednotlivých ITD *FLT3*/ITD pozitivních pacientů. Na **Obr. 3.2** je znázorněna vyhodnocená sekvenace pacienta J828. V červeném rámečku je ITD mutace genu *FLT3*, v modrém inserce a černý rámeček znázorňuje část sekvenace, která byla zdvojená.



Obr. 3.2 Vyhodnocení sekvenace. černý rámeček – část sekvenace, která byla zdvojená; modrý rámeček – inserce; červený rámeček - ITD

3.3 Přístroje

Tab. 3.1 Přístroje.

Typ přístroje	Název	Výrobce
Boxy s laminárním prouděním	Laminární box tř. I Class 100	Gelarie
	Bezpečnostní box tř. II. S laminárním prouděním, biohazard dle EN 12469, MSC.9	Jouan
Centrifugy	Stolní laboratorní centrifuga Heraeus Labofuge 400R	Heraeus Instrument
	Odstředivka EPP Minispin plus	Eppendorf
	Stolní laboratorní centrifuga A14	Jouan
	Chlazená stolní laboratorní centrifuga BR4i	Jouan
Elektroforetická aparatura	Elektroforetická aparatura Minnie The Gel-Cycle	Hofer Pharmacia Biotech
Elektronické váhy	Elektronická váha KERN 440	Kern
	Elektronická váha KERN 470	Kern
Fotoaparát	Digitální kamera Alph Digi Doc	Alpha Innotech
Míchačka	Míchačka RCT	IKA-works
Mikroskop	Mikroskop AMPLIVAL	Carl-Zeiss
pH metr	pH metr 526	WTW
Software	Alpha	
	Graph Pad Prism 4	
	Chromas	
Termocykler	Termocykler Biometra TRIO	Biometra
	Termocykler Biometra T3000	Biometra
	Termocykler PTC 200	MJ Research
UV transluminátor	UV Mini-transluminátor	Biorad
Vortex	Vortex Techno Kartell	Kartell
	Třepačka MS2	IKA-works

3.4 Chemikálie, enzymy a roztoky

V Tab. 3.2 je uvedený seznam všech chemikálií použitých u jednotlivých metod při zpracování vzorků včetně jejich výrobce. V Tab. 3.3 jsou rozpisy pro přípravu zásobních roztoků.

Tab. 3.2 Chemikálie a enzymy u jednotlivých metod.

Metoda	Název chemikálie	Výrobce
SEPARACE	NaCl	Penta
	KCl	Penta
	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	Sigma-Aldrich
	KH ₂ PO ₄	Penta
	Histopague	Sigma-Aldrich
	NH ₄ Cl	Penta
	NH ₄ HCO ₃	Lachema
	EDTA	Fluka
	Tryptanová modř	Merck

Metoda	Název chemikálie	Výrobce
LYZACE BUNĚK	TriZol	Invitrogen
	Na ₃ citrát	Penta
	HCl	Sigma-Aldrich
	Guanidin thiokyanát	Sigma-Aldrich
	N-Lauroylsarcosin-sodná sůl	Serva
	2-merkaptoetanol	Merck
IZOLACE RNA Z LYZÁTU V TRIZOLU	Chloroform	Sigma-Aldrich
	Isopropanol	Sigma-Aldrich
	Etanol	Merck/Kulich
	EDTA	Fluka
	HCl	Sigma-Aldrich
	REVERZNÍ TRANSKRIPCE (cDNA)	Hexamery
dNTP		Invitrogen
5 x FS pufr		Invitrogen
RNasin		Promega
Super Script II		Invitrogen
PCR STANOVENÍ <i>FLT3</i> GENU		10 x pufr
	MgCl ₂	Invitrogen
	primer R5-FLT	Invitrogen
	primer R6	Invitrogen
	dNTP	Invitrogen
	AmpliTaq Gold Polymerase	Applera
	ELEKTROFORÉZA	Agaróza I
Tris Base		Sigma-Aldrich
Kyselina boritá		Sigma-Aldrich
EDTA sol.		Fluka
Ethidium bromid		Fluka
Orange G		Sigma-Aldrich
50 Bp DNA O'RangeRuler		Fermentas
PURIFIKACE	Pufr QG	Qiagen
	Pufr PE	Qiagen
	Pufr EB	Qiagen
	Isopropanol	Sigma-Aldrich
SEKVENAČNÍ REAKCE	Big Dye 3.1 Terminator Kit	Applied Biosystems
	primer R5-FLT SONA	Invitrogen
	QFLT for SONA	Invitrogen
SRÁŽENÍ SEKVENAČNÍ REAKCE	NH ₄ Ac	Sigma-Aldrich
	glykogen	Roche
	Etanol	Merck/Kulich
	Formamid	Applied Biosystems

Tab. 3.3 Příprava zásobních roztoků.

Složky	Vlastnosti	Množství
Lyzační roztok na erythrocyty 10x koncentrovaný		
NH ₄ Cl		82,9 g
NH ₄ HCO ₃		7,9 g
EDTA	0,5 M, pH 8,0	0,372 g
<i>Rozpustit a doplnit TK H₂O do objemu 1000 ml. Sterilizace 1x přes filtr Stericup; 0,22 µm, 1000 ml (Fisher Scientific).</i>		
PBS (Phosphate buffered saline), pH 7,4		
NaCl	137 mM	32 g
KCl.12H ₂ O	2,7 mM	0,8 g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	4,3 mM	4,6 g
KH ₂ PO ₄	1,4 mM	0,8 g
<i>Rozpustit, doplnit TK H₂O do objemu 4000 ml a titrací NaOH nastavit pH 7,45. Roztok se klávuje v autoklávu 20 min. při 100 °C.</i>		
ITG v ME		
ITG		40 ml
2-merkaptoetanol		280 µl
10x TBE		
Tris Base	Mr=121,1	232 g
Kyselina octová	99 %	24,5 ml
EDTA sol.	0,5 M, pH 8,0	50 ml
<i>Smíchat a doplnit H₂O na 700 ml, po rozpuštění doplnit H₂O na celkový objem 1000 ml.</i>		
sol. EDTA (0,5 M, pH 8,0)		
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	Mr=372,2	93 g
H ₂ O	deionised	cca 350 ml
NaOH (titr)	10 M	cca 25 ml
<i>Doplnit H₂O na objem 500 ml.</i>		
sol. Na₃citrát		
Na ₃ citrát	Mr=294,1	29,4 g
H ₂ O	deionised	cca 80 ml
HCl	1 M	cca 10 ml
<i>H₂O doplnit na 100 ml.</i>		
sol. ITG (4 M)		
Guanidin thiokynát	Mr=118,2	141,84 g
H ₂ O		150 ml
sol. Na ₃ citrát	1 M sol., pH 7	7,5 ml
N-Lauroylsarcosin sodná sůl	30 %, Mr=293,4	5 ml
<i>Rozpustit Guanidin thiokynát ve 150 ml H₂O a zahřívát. Přidáme sol. Na₃citrát a N-lauroylsarcosin a vychladíme. Doplníme H₂O na 300 ml.</i>		
TE pufr		
Sol. EDTA	0,5 M, pH=8	100 ul
HCl	1 M	1 ml
<i>Doplnit do 100 ml sterilní H₂O.</i>		

Statistické analýzy. Vztahy mezi naměřenými parametry v kontingenční tabulce byly analyzovány pomocí χ^2 testu. Pro hodnocení kvantitativních dat ve 2 skupinách byly zjištěny mediány naměřených hodnot a statistická analýza byla provedena pomocí neparametrického dvoustranného Mann-Whitneyho testu. Pro hodnocení celkového přežití bylo užito Kaplanovy-Mayerovy regresní metody hodnocení křivek přežití, odlišnost křivek byla hodnocena pomocí log-rank testu Mantela-Haenschelové. Všechny statistické testy byly provedeny na úrovni 95% intervalu spolehlivosti a příslušné hodnoty P (odpovídající možnosti chybného odmítnutí nulové hypotézy) byly nalezeny pomocí softwaru GraphPad Prism verze 3.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4 Výsledky

4.1 Výskyt *FLT3/ITD* u AML a APL a délka ITD genu *FLT3*

V letech 1994-2008 bylo v ÚHKT v Praze nově diagnostikováno 408 pacientů s AML. Zjistili jsme, že 96 (23,5 %) mělo ITD genu *FLT3*. U non-APL AML to bylo 80/352 nemocných (22,7 %) a u APL hodnocených zvlášť 16/52 (30,8 %) (čtyři pacienti nebyli zařazeni do skupin podle FAB klasifikace). U pacientů se střední cytogenetickou prognózou byl *FLT3/ITD* zachycen v 59 případech z 202 (29,2 %), u pacientů s příznivou prognózou u 19/82 (23,2 %) a u pacientů s nepříznivou prognózou pouze u 2/65 (3,1 %). Podle FAB klasifikace byly nejčastěji zastoupeny subtypy M4 (35,2 %), M3 (30,8 %) a M1 (28,4 %), u M0, M6 a M7 byl výskyt ITD genu *FLT3* minimální. U variantní formy APL (FAB M3v) bylo ITD přítomno u 75,0 % případů. 45/204 žen (22,6 %) a 51/204 (25,0 %) mužů bylo pozitivních na *FLT3/ITD* mutaci.

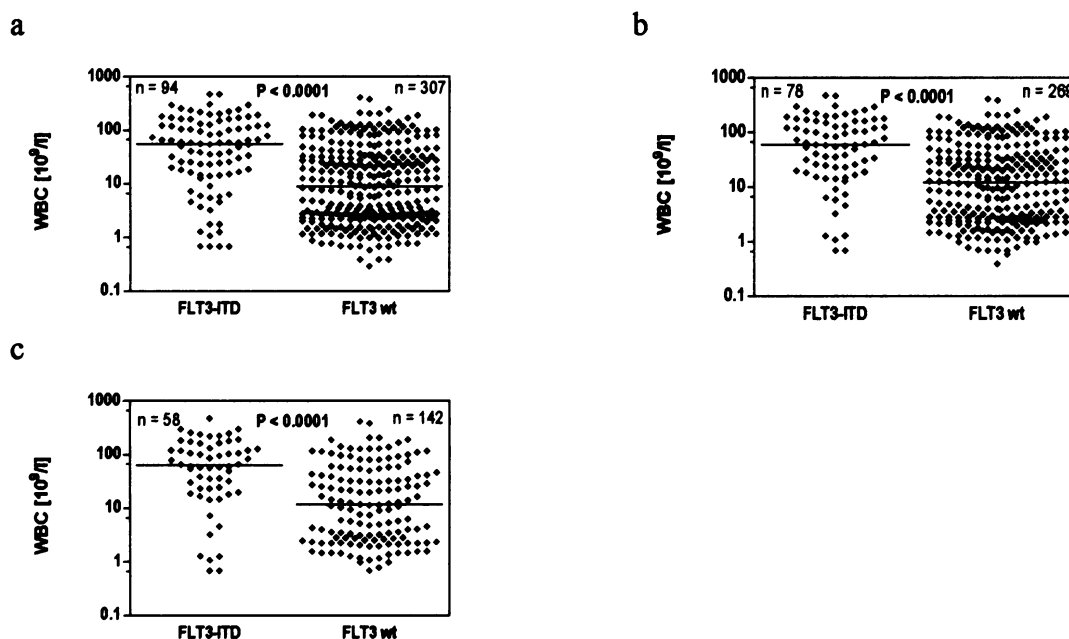
Délka ITD byla hodnocena u 93 pacientů, u zbývajících 3 pacientů byla exprese ITD slabá, a nebo se PCR produkt nezdařilo osekvenovat. Velikost ITD byla v rozmezí od 12 do 120 nukleotidů (nt; medián 48 nt). 11/96 (11,5 %) pacientů mělo dvě různé ITD a jeden (1,0 %) tři. Při hodnocení vlivu délky byla použita vždy nejdelší ITD (včetně její inzerce) a pro hodnocení dosažení CR a incidenci relapsu byla zvolena délková rozhraní do 33; 36; 39; 42, resp. 54 nt (viz Tab. 4.3 a 4.4, str. 34). U ostatních analýz byla použita pouze délka 39 nt, protože při hodnocení CR a výskytu relapsu byla statisticky nejvýznamnější (viz níže).

4.2 Vztah mezi přítomností *FLT3/ITD* a počtem leukocytů (WBC) v době diagnózy

Na Obr. 4.2 je zachycena závislost počtu leukocytů při diagnóze u všech AML pacientů, u non-APL AML a u pacientů se střední cytogenetickou prognózou na přítomnosti *FLT3/ITD*. Rozdíly WBC ve všech případech byly statisticky významné ($P < 0,0001$). Hodnoty mediánů WBC u mutovaných a nemutovaných pacientů v uvedených skupinách byly 56,7 a 9,1 x 10⁹/l; 60,9 a 12,3 x 10⁹/l, resp. 63,7 a 12,1 x 10⁹/l.

4.2.1 Vztah mezi délkou ITD a WBC v době diagnózy

Pro hodnocení vztahu mezi délkou ITD a WBC při diagnóze byla použita jako mez délka 39 nt. U všech AML, u non-APL AML i u AML se střední cytogenetickou prognózou neměla délka ITD vliv na WBC ($P=0,4065$; $P = 0,4097$ resp. $0,5198$). U druhé a třetí skupiny byly hodnoty mediánu u délky >39 nt nepatrně vyšší oproti hodnotám pro ITD ≤ 39 nt. Hodnoty mediánů WBC pro délku ≤ 39 a >39 nt v uvedených 3 skupinách byly $57,5$ a $55,8 \times 10^9/l$; $58,7$ a $79,5 \times 10^9/l$; resp. $58,7$ a $85,0 \times 10^9/l$.



Obr. 4.2 Vliv přítomnosti *FLT3/ITD* na WBC. a – všech pacientů; b – non-APL AML pacientů; c – pacientů se střední cytogenetickou prognózou.

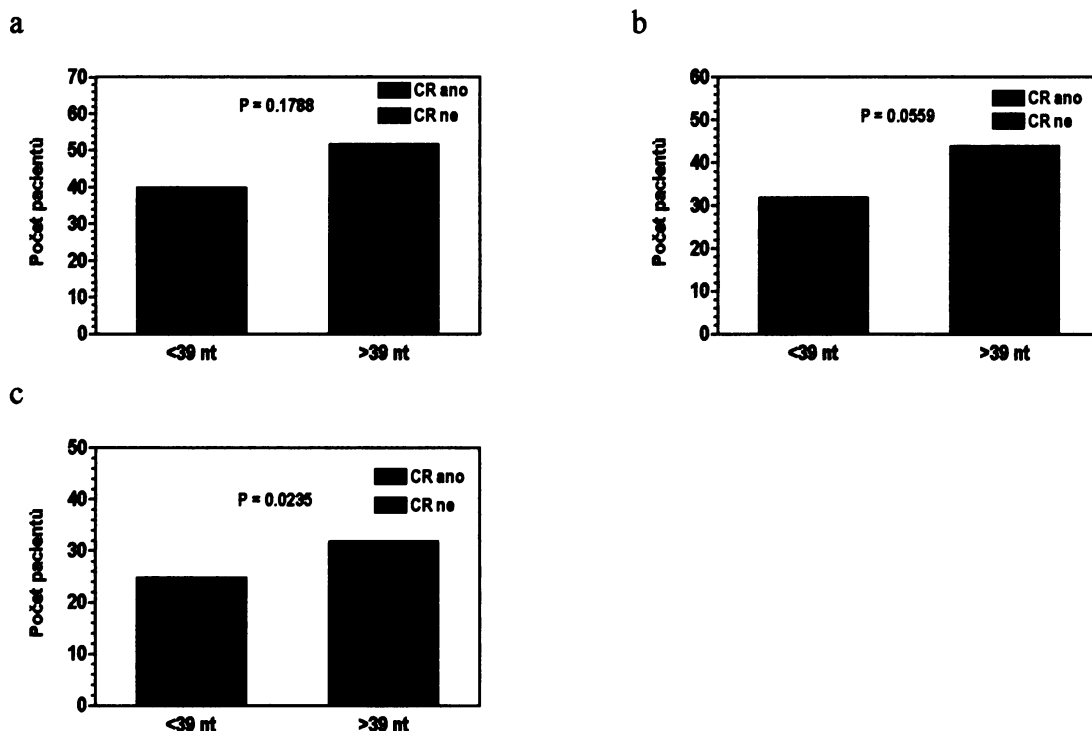
4.3 Závislost indukce kompletní remise (CR) na přítomnosti *FLT3/ITD*

CR se podařilo dosáhnout u 60,3 % nemocných s nemutovaným genem *FLT3* a u 54,3 % pacientů s *FLT3/ITD* ($P=0,1026$) všech pacientů s AML (tj. včetně APL). U non-APL AML bylo dosaženo CR u 57,2 %, resp. 50,0 % nemocných ($P=0,1305$). Těsně pod hranici statistického trendu byl výsledek ve skupině se střední cytogenetickou prognózou ($P=0,1151$), kde CR dosáhlo 59,3 % pacientů s nemutovaným genem a 50,0 % pacientů s *FLT3/ITD* mutací. Při hodnocení závislosti indukce CR na přítomnosti *FLT3/ITD* pouze u pacientů, u kterých byla zahájena kurativní (cytostatická) léčba, výsledné hodnoty již vykazovaly statistický trend. CR se podařilo dosáhnout u 66,4 % nemocných s nemutovaným genem *FLT3* a u 58,2 %

pacientů s *FLT3/ITD* ($P=0,0939$) ve smíšené skupině všech AML. U non-APL AML dosáhlo CR 63,6 % resp. 54,0 % nemocných ($P=0,0849$) a u pacientů se střední cytogenetickou prognózou dosáhlo CR 63,4 % pacientů s nemutovaným genem a 52,1 % pacientů s *FLT3/ITD* ($P=0,0868$).

4.3.1 Vliv délky ITD na dosažení CR

V Tab. 4.3 (str. 34) jsou uvedena procenta pacientů s určitou délkou ITD, kteří v dané skupině dosáhli, resp. nedosáhli CR a statistická významnost daných hodnot (P). Nejvyšší statistickou významnost měly délky 36 a 39 nt. Na Obr. 4.3 je znázorněn rozdíl v dosažení CR jednotlivých skupin pro délku ITD ≤ 39 a >39 nt. Ve všech třech skupinách pacientů (všech AML, non-APL AML, resp. AML se střední prognózou), pacienti s ITD >39 nt dosahují častěji CR. U všech AML pacientů dosáhlo CR 50,0 % s ITD ≤ 39 nt a 50,0 % s ITD >39 nt ($P=0,1788$), u non-APL AML 40,9 %, resp. 59,1 % ($P=0,0558$) a u AML se střední cytogenetickou prognózou 36,0 %, resp. 64,0 % ($P=0,0235$). Při hodnocení vlivu délky ITD na dosažení CR u pacientů, kteří byli kurativně léčeni, dosáhlo CR u všech AML 60,9 %, u non-APL AML 60,5 % a u AML se střední cytogenetickou prognózou 60,0 %.



Obr. 4.3 Vliv délky *FLT3/ITD* na CR při rozhraní délky 39 nt. a – všech pacientů; b – non – APL AML pacientů; c – pacientů se střední cytogenetickou prognózou

Tab. 4.3 Vliv délky FLT3/ITD na dosažení CR u AML pacientů.

délka ITD (nt)	AML+APL CR ne/ano (%)		P	non-APL AML CR ne/ano (%)		P	AML se střední prognózou CR ne/ano (%)		P
	AML+APL CR ne/ano (%)	non-APL AML CR ne/ano (%)		AML se střední prognózou CR ne/ano (%)					
≤33	50,0; 50,0	59,3; 40,7	0,2110	0,0855	65,0; 35,0	0,0390			
>33	41,4; 58,6	42,9; 57,1		0,0855	40,5; 59,5				
≤36	50,0; 50,0	60,0; 40,0	0,1895	0,0555	65,2; 34,8	0,0228			
>36	40,7; 59,3	41,3; 58,7		0,0555	38,2; 61,8				
≤39	50,0; 50,0	59,4; 40,6	0,1788	0,0558	64,0; 36,0	0,0235			
>39	40,4; 59,6	40,9; 59,1		0,0558	37,5; 62,5				
≤42	48,8; 51,2	57,6; 42,4	0,2329	0,0871	61,5; 38,5	0,0430			
>42	41,2; 58,8	41,9; 58,1		0,0871	38,7; 61,3				
≤54	47,4; 52,6	53,4; 45,6	0,2450	0,1106	55,9; 44,1	0,1073			
>54	40,0; 60,0	40,0; 60,0		0,1106	39,1; 60,9				

CR ne – pacienti nedosáhli CR; CR ano – pacienti dosáhli CR.

Tab. 4.4 Vliv délky FLT3/ITD na výskyt relapsů u AML pacientů.

délka ITD (nt)	AML+APL relaps ano/ne (%)		P	non-APL AML relaps ano/ne (%)		P	AML se střední prognózou relaps ano/ne (%)		P
	AML+APL relaps ano/ne (%)	non-APL AML relaps ano/ne (%)		AML se střední prognózou relaps ano/ne (%)					
≤33	47,1; 52,9	41,7; 58,3	0,3242	0,3979	66,7; 33,3	0,3881			
>33	50,0; 50,0	61,1; 38,9		0,3979	60,0; 40,0				
≤36	50,0; 50,0	45,5; 54,5	0,4469	0,2552	57,1; 42,9	0,3753			
>36	47,8; 52,2	57,9; 42,1		0,2552	64,3; 35,7				
≤39	47,1; 52,9	41,7; 58,3	0,4277	0,1478	50,0; 50,0	0,1891			
>39	50,0; 50,0	61,1; 38,9		0,1478	69,2; 30,8				
≤42	50,0; 50,0	46,2; 53,8	0,4411	0,2453	55,6; 44,4	0,3019			
>42	47,6; 52,4	58,8; 41,2		0,2453	66,7; 33,3				
≤54	45,8; 54,2	47,1; 52,9	0,3242	0,2154	61,5; 38,5	0,4029			
>54	53,3; 46,7	61,5; 38,5		0,2154	66,7; 33,3				

ano – u pacientů se po dosažení CR vyskytl relaps; ne – pacienti po dosažení CR nezařabovali.

4.4 Vliv FLT3/ITD na výskyt relapsů

Alespoň k jednomu relapsu došlo celkem u 70/143 (49,0 %) pacientů bez FLT3/ITD a 19/39 (48,7 %) s FLT3/ITD ve skupině všech AML (včetně APL) pacientů ($P=0,4897$), kteří předtím dosáhli CR. Při hodnocení non-APL AML pacientů nebyl rozdíl mezi pacienty s nemutovaným genem a s FLT3/ITD a k relapsu došlo u 66/119 (55,5 %) a 13/30 (53,3 %) případů, ($P=0,4170$). U pacientů se střední cytogenetickou prognózou byla hodnota $P = 0,0680$ (což lze hodnotit jako statistický trend): relaps mělo 29/67 (43,3 %) nemocných s wt genem a 13/21 (61,9 %) pacientů s FLT3/ITD.

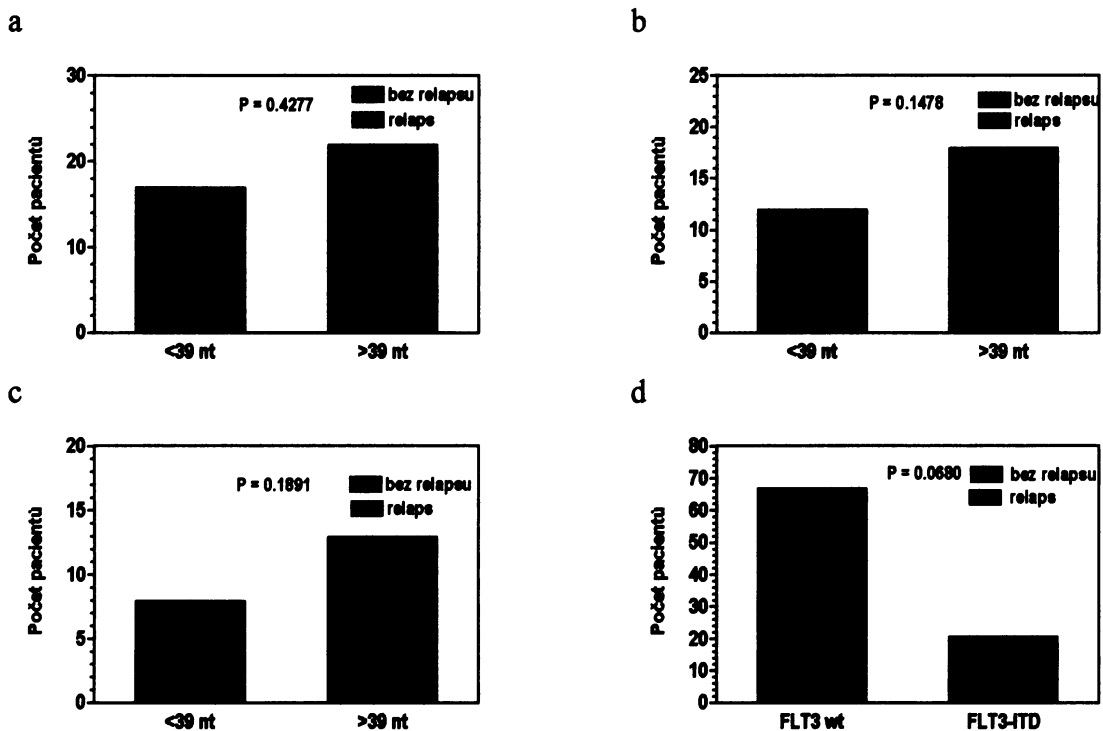
4.4.1 Vliv délky ITD na výskyt relapsů

Při hodnocení vlivu délky ITD na výskyt relapsů byly hodnocena rozhraní délek ITD 33; 36; 39; 42 a 54 nt. V Tab 4.4 (str. 34) jsou uvedena procenta případů s určitou délkou ITD, u kterých se po navození CR vyskytl nebo nevyskytl relaps. Stejně jako u CR byla vybrána jako statisticky nejvýznamnější hodnota 39 nukleotidů. U všech AML (včetně APL) pacientů s délkou ITD ≤ 39 , resp. >39 nt se vyskytl relaps u 47,1 %, resp. 50 % ($P=0,4277$), u non – APL AML pacientů 41,7 %, resp. 61,1 % ($P=0,1478$) a u AML se střední prognózou podle cytogenetiky u 50 %, resp. 69,2 % ($P=0,1891$). Přestože pacienti s ITD >39 dosahují snáze CR, mají také častější výskyt relapsu jak je znázorněno na Obr. 4.4 (str. 36).

4.5 Vliv FLT3/ITD na celkové přežití (OS)

Z 398 hodnotitelných pacientů s AML (včetně APL) byl medián OS 9,7 měsíce u pacientů s FLT3/ITD oproti 15,0 měsícům u pacientů bez FLT3/ITD ($P=0,0538$; Obr. 4.5a, str. 37). U non-APL AML pacientů bylo OS 8,1 měsíce u FLT3/ITD pozitivních oproti 20,3 měsícům u negativních pacientů ($P=0,0155$; Obr. 4.5b, str. 37). Pacienti se střední cytogenetickou prognózou a FLT3/ITD mají výrazně kratší OS: medián byl 8,1 měsíce oproti 20,3 měsícům u pacientů bez této mutace ($P<0,0007$; Obr. 4.5c, str. 37). Přežití po 6 letech od doby diagnózy bylo při hodnocení všech AML pacientů společně 22,6 % u nemocných s FLT3/ITD a 26,4 % u pacientů bez FLT3/ITD. Při hodnocení skupiny non-APL AML bylo přežití po 6 letech 16,0 %, resp. 20,7 %. Ve skupině AML se střední cytogenetickou prognózou přežívá do 6 let od diagnózy 12,6 %, resp. 21,8 %

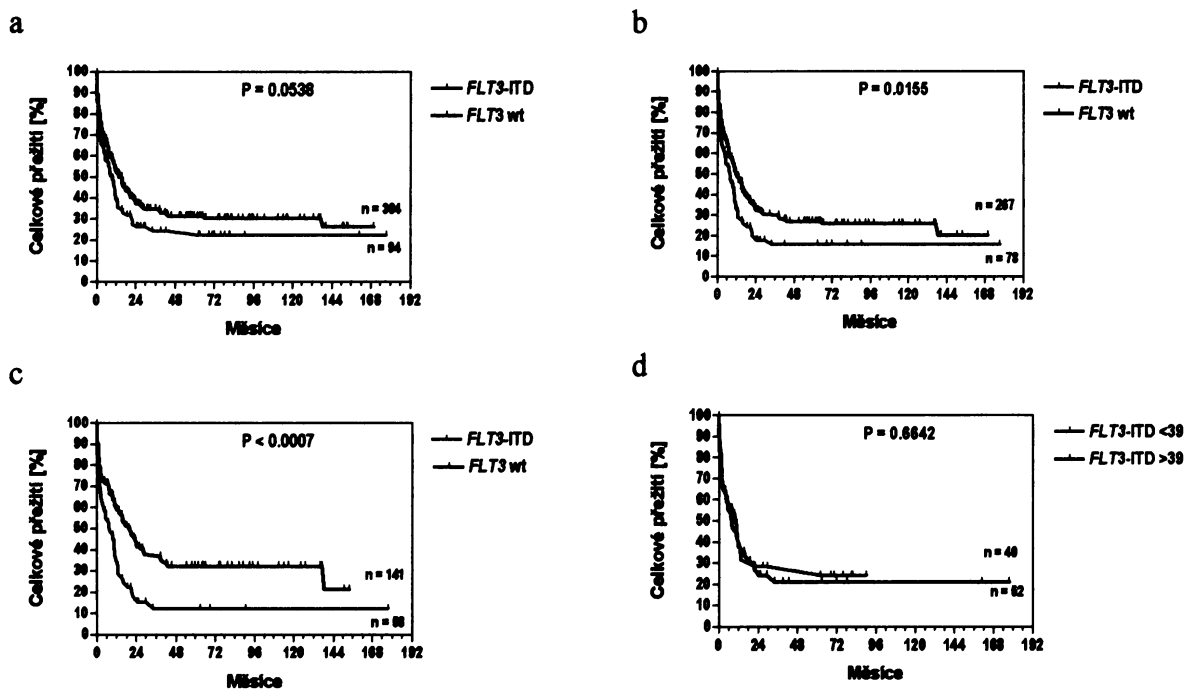
pacientů. Rozdíly v OS v závislosti na *FLT3*/ITD u různých skupin hodnocených pacientů jsou patrné na Obr. 4.5 (str. 37).



Obr. 4.4 Vliv *FLT3*/ITD na výskyt relapsů. a – vliv délky ITD u všech pacientů; b – vliv délky ITD u non – APL AML pacientů; c – vliv délky ITD u pacientů se střední cytogenetickou prognózou; d – vliv *FLT3*/ITD u pacientů se střední cytogenetickou prognózou

4.5.1 Vliv délky ITD na OS

Při hodnocení vlivu délky ITD na OS u všech pacientů s AML (včetně APL) měli pacienti s ITD ≤ 39 nt a s ITD > 39 nt téměř identické OS ($P=0,6642$). Po 6 letech přeživalo 24,5 % ze všech pacientů s AML s ITD ≤ 39 nt a 21,3 % s ITD > 39 nt, u non-APL AML 18,0 %, resp. 14,3 % ($P=0,9875$) a u pacientů se střední cytogenetickou prognózou 14,7 %, resp 10,0 % nemocných ($P=0,9473$). Délka ITD genu *FLT3* tedy neměla na OS statistický význam u žádné z analyzovaných skupin nemocných (Obr. 4.5d, str. 37).

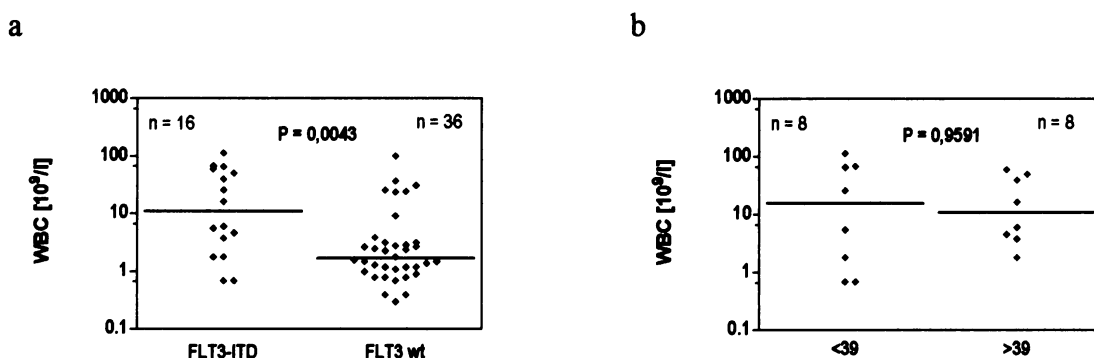


Obr. 4.5 Vliv *FLT3/ITD* na OS. a – všech pacientů; b – non-APL AML pacientů; c – pacientů se střední cytogenetickou prognózou.; d – vliv délky ITD na OS u všech AML pacientů

4.6 Vliv *FLT3/ITD* u APL pacientů

4.6.1 Vztah mezi přítomností *FLT3/ITD* a WBC v době diagnózy

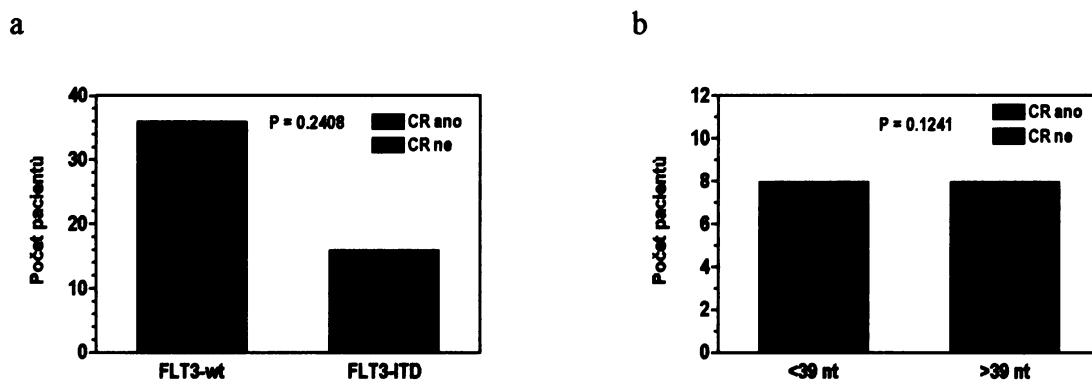
Vztah mezi přítomností *FLT3/ITD* a WBC u APL pacientů jsme hodnotili u 52 nemocných. Jak je patrné z Obr. 4.6.1a, byl u pacientů s *FLT3/ITD* mutací vyšší počet leukocytů a hodnota mediánu byla $11,3 \times 10^9/l$ oproti $1,7 \times 10^9/l$ u nemutovaných pacientů s APL ($P=0,0043$). Při hodnocení vlivu délky ITD (při zvoleném rozhraní délky 39 nt) nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi kratší a delší ITD ($P=0,9591$), viz Obr. 4.6.1b.



Obr. 4.6.1 Vliv přítomnosti *FLT3/ITD* a její délky na WBC u pacientů s APL. a – vliv *FLT3/ITD* na WBC; b – vliv délky ITD na WBC

4.6.2 Závislost indukce CR na přítomnosti *FLT3*/ITD

Z 52 pacientů s APL dosáhlo CR 80,1 %. U všech pacientů s APL byla zahájena kurativní léčba a CR dosáhlo 75,0 % s *FLT3*/ITD a 83,3 % s nemutovaným *FLT3* genem ($P=0,2408$, Obr. 4.6.2a). Signifikance vlivu délky ITD vzhledem k dosažení CR byla těsně pod hranicí statistického trendu. Při ITD ≤ 39 nt dosáhlo CR 88,0 % pacientů a při ITD >39 nt 62,5 %, $P=0,1241$ (Obr. 4.6.2b).



Obr. 4.6.2 Závislost indukce CR u pacientů s APL na přítomnosti *FLT3*/ITD a její délce. a – závislost indukce CR na přítomnosti *FLT3*/ITD, b – vliv délky ITD na dosažení CR

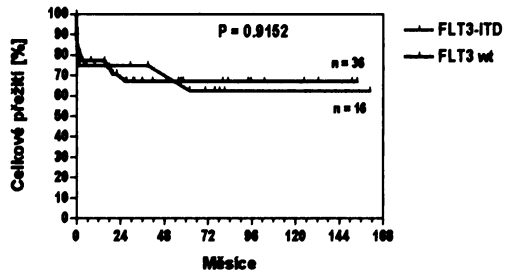
4.6.3 Vliv *FLT3*/ITD na výskyt relapsů

Při hodnocení vlivu *FLT3*/ITD na výskyt relapsů u pacientů s APL nebyl rozdíl mezi pacienty s nemutovaným genem a s *FLT3*/ITD statisticky významný ($P=0,1489$). K alespoň jednomu relapsu u pacientů, kteří předtím dosáhli CR, došlo u 4/24 (16,6 %) jedinců bez *FLT3*/ITD a u 3/9 (33,3 %) případů s *FLT3*/ITD. Pro hodnocení vlivu délky *FLT3*/ITD na výskyt relapsu u pacientů s APL nebyl dostatek hodnotitelných pacientů.

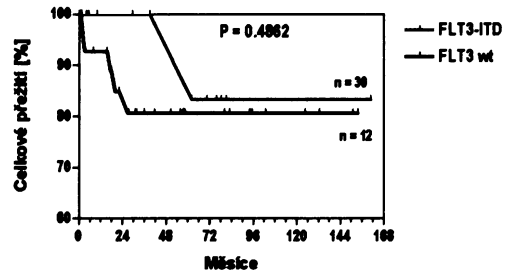
4.6.4 Vliv *FLT3*/ITD na OS

Hodnocení ITD genu *FLT3* z hlediska OS u pacientů s APL neprokázalo žádný rozdíl mezi pacienty s *FLT3*/ITD mutací a s wt genem ($P=0,9152$, Obr. 4.6.3a, str. 39) a to i při hodnocení OS pouze u pacientů, kteří dosáhli CR ($P=0,4862$, Obr. 4.6.3b, str. 39). OS po 6 letech bylo 62,5 % pro pacienty s *FLT3*/ITD a 67,3 % s wt konfigurací *FLT3* genu. U pacientů po dosažení CR byly hodnoty OS vyšší a po 6 letech přeživalo 83,3 % s *FLT3*/ITD a 80,7 % s wt *FLT3*. Při hodnocení délky ITD na OS nebyl nalezen rozdíl ($P=0,5037$): po 6 letech přeživalo 65,6 % pacientů s ITD ≤ 39 nt a 62,5 % nemocných s ITD >39 nt.

a



b



Obr. 4.6.3 Vliv FLT3/ITD a její délky na OS. a – vliv FLT3/ITD na OS, b – vliv FLT3/ITD na OS po dosažení CR

5 Diskuse

V této diplomové práci byl studován prognostický význam *FLT3/ITD* u pacientů s AML. Pro analýzu jsme měli k dispozici rozsáhlou skupinu dospělých pacientů s nově diagnostikovanou AML na ÚHKT v Praze. Nejdříve byl hodnocen výskyt *FLT3/ITD* u pacientů s AML, výskyt *FLT3/ITD* napříč skupinami FAB klasifikace a výskyt u jednotlivých cytogenetických prognostických skupin. *FLT3/ITD* je považována za jednu z nejčastějších somatických mutací u pacientů s AML, zvláště pak u nemocných se středním cytogenetickým rizikem.^{43-46,49} Naše studie ukazuje podobnou prevalenci *FLT3/ITD* jako v citovaných studiích. Na výskyt *FLT3/ITD* u jednotlivých skupin FAB klasifikace jsou názory nejednotné. Víceméně se ale všichni autoři shodují, že *FLT3/ITD* je nejčastěji přítomna u APL, zvláště u její variantní formy AML FAB M3v. Poměrně často se vyskytuje i u FAB M5 a to především u M5b.^{44,45,47} V našem souboru pacientů byly nejčastějšími morfologickými subtypy AML podle FAB klasifikace, u kterých byla nalezena *FLT3/ITD*, subtypy FAB M4, M3 a M1. Pokud jsme hodnotili variantní formu APL zvlášť, našli jsme *FLT3/ITD* u 75,0 % případů. Naopak u FAB M0, M6 a M7 se tato mutace vyskytovala zanedbatelně. Na rozdíl od citovaných publikací,^{44,45,47} které tvrdí, že *FLT3/ITD* se nikdy nevyskytuje u FAB M7, v našem souboru nemocných byl jeden pacient s FAB M7 na výskyt *FLT3/ITD* pozitivní.

FLT3/ITD je podle literatury i podle našich vlastních výsledků jednoznačně spojena se zvýšeným počtem leukocytů v době diagnózy, ať již se jedná o pacienty s AML (včetně APL)^{45,48}, non-APL AML^{46,48}, nebo pouze o pacienty s APL.^{32,48,49} Míra leukocytózy však v našich rukou nebyla ovlivněna délkou ITD. Dopad *FLT3/ITD* na počet leukocytů je pochopitelný: FLT3 je tyrozinová kináza, jejíž konstitutivní aktivace (působená ITD) znamená proliferální stimulus pro leukemické buňky.⁷ Přestože *FLT3/ITD* vede v době diagnózy k leukocytóze, ovlivnila v naší studii procenta indukce CR jen mírně: pacienti s *FLT3/ITD* obecně dosahovali nevýznamně nižšího procenta CR, ve skupině pacientů s non-APL AML a AML se střední cytogenetickou prognózou byl rozdíl alespoň blízký statistickému trendu. Naše výsledky jsou tedy celkem ve shodě s publikovanými závěry řady prací, že pacienti s AML dosáhnou nesignifikantně snáze CR, mají-li nemutovaný (wt) *FLT3* gen – pouze v jediné z větších studií (s >100 pacienty) byl tento vztah na hranici statistické signifikance.^{7,43} Co je však nejdůležitější:

v naší sestavě měla *FLT3/ITD* nesporný vliv na vyšší incidenci relapsů (a to především u střední prognostické skupiny podle cytogenetické analýzy) a především (vysoce signifikantně) na zhoršení celkového přežití – nejmarkantněji opět u pacientů se středním cytogenetickým rizikem; statistická významnost zhoršení OS však byla prokázána i při hodnocení non-APL AML jako celku. I předchozí studie celkem shodně uzavíraly, že *FLT3/ITD* vede k vyšší incidenci relapsů a zhoršení OS,^{7,43,44,46} pouze jediná z větších studií⁴⁵ prokázala dopad pouze na přežití bez události, nikoli na OS. Z uvedeného tedy lze uzavřít, že *FLT3/ITD* pouze okrajově snižuje naději pacientů na dosažení CR, ale zřetelně se podílí na incidenci relapsů a celkově zhoršeném OS, především u skupiny se střední cytogenetickou prognózou.

Výsledky naší analýzy skupiny APL ukázaly pouze nesignifikantní zhoršení možnosti navodit CR u pacientů s *FLT3/ITD*, a to navzdory tomu, že ITD byla vysoce signifikantně spojena s leukocytózou, která je shodně všemi autory považována za nejvýznamější negativní prognostický faktor u APL.^{23,24,48,49} Z toho vyplývá, že *FLT3/ITD* může být pouze jedním z možných faktorů, vedoucím k leukocytóze u APL.^{48,49} Zároveň naše výsledky ukázaly, že přítomnost *FLT3/ITD* u pacientů s APL neovlivnila OS, a to ani při samostatné analýze pacientů, kteří již dosáhli CR. To je situace zásadně jiná, než u non-APL AML, u nichž došlo k vyšší incidenci relapsů a snížení OS – viz předchozí odstavec.

Dále jsme hodnotili, zda také délka ITD může mít vliv na uvedené klinické parametry. Dopad *FLT3/ITD* jako takové je u AML pacientů již delší dobu známý, ale prognostickým významem délky ITD u pacientů s AML se zabývaly jen ojedinělé studie,^{5,6} navíc jen s relativně malým počtem hodnocených pacientů. Délku ITD jsme analyzovali (pomocí sekvenace ITD) u 93 pacientů, jako rozhraní délky jsme vybrali hodnoty 33; 36; 39; 42 a 54 nt. Z hlediska indukce CR vyšly statisticky nejvýznamnější hodnoty 36 a 39 nt. K dalším analýzám jsme si vybrali hodnotu 39 nt, abychom mohli naše výsledky porovnávat se studii Stirewalta *et al.*⁵ a Ponzianiho *et al.*,⁶ používajícími stejné rozhraní. Porovnávali jsme stejné parametry jako při hodnocení vlivu *FLT3/ITD* u pacientů s mutovaným a nemutovaným genem. Pacienti s *FLT3/ITD* v našem souboru měli vyšší WBC a na délce ITD již příliš nezáleželo: stejně jako pacienti v citovaných studiích^{5,6} jsme našli nesignifikantně vyšší WBC u pacientů s delší ITD (>39 nt) – to se týká všech analyzovaných skupin nemocných. Přesto však u

všech skupin pacientů (všech AML s APL, u non-APL AML, u AML s prognosticky střední cytogenetikou) s výjimkou APL dosahovali nemocní s dlouhou ITD snáze CR. U pacientů se středním rizikem podle cytogenetiky byl již tento rozdíl statisticky významný. Toto je velmi překvapivé zjištění, dosud v literatuře nepublikované. Naopak ve studiích Stirewalta *et al.*⁵ a Ponzianiho *et al.*⁶ byla tato situace opačná: pacienti s krátkou ITD (ITD ≤ 39 nt) dosahovali CR snáze, ačkoli tento jejich výsledek neměl statistickou významnost. Náš výsledek by mohl být interpretován tak, že u pacientů s AML s delší ITD (která může být biologicky aktivnější) by se ITD mohla projevit zvýšenou proliferační aktivitou buněk, které pak lépe odpovídaly na chemoterapii, zasahující přednostně leukemické buňky, které jsou v buněčném cyklu. Naopak u pacientů s APL by se mohla delší ITD a následná zvýšená proliferační aktivita projevit nepříznivě, neboť může vést k leukocytóze, což je u APL nejvýznamnější prognostický faktor. Nicméně tento pokus o interpretaci je problematický v tom, že sami jsme neprokázali vliv délky na počet leukocytů (ani u non-APL AML, ani u APL), takže je těžké hovořit o zvýšené proliferační aktivitě. Při hodnocení výskytu relapsů u pacientů s krátkou a dlouhou ITD se relaps vyskytoval častěji u pacientů s dlouhou ITD. Posledním hodnoceným parametrem bylo OS. Stejně jako ve cizích studiích,^{5,6} tak i v našem souboru pacientů měli nemocní s dlouhou ITD kratší OS. V obecné rovině se tedy zdá, že především delší ITD mají výraznější biologický dopad.

FLT3/ITD si určitě zaslouží pevné místo v hierarchii prognostických faktorů. Americká skupina CALGB (Cancer and Leukemia Group B) se pokusila některé z prognostických faktorů u pacientů s AML zařadit do hierarchického prognostického systému.⁵⁰ Hlavním parametrem je cytogenetická prognóza, dalším pak právě *FLT3/ITD*, na dalších místech jsou pak některé novější prognostické znaky – mutace genu nukleofosminu (*NPM1*) a další. Podobně Baldusová⁵¹ z Berlína ve spolupráci s CALGB publikovala mírně pozměněný návrh, zdůrazňující pozitivní prognostický dopad mutací genu *CEBPA* u *FLT3/ITD*-negativních pacientů s AML. Nicméně oba návrhy shodně doporučují, aby pacienti s horší prognózou (v rámci skupiny s intermediární prognózou), tzn. jedinci s *FLT3/ITD*, byli po dosažení CR transplantováni anebo léčeni v klinických studiích s inhibitory FLT3, na rozdíl od případů s relativně lepší prognózou (v rámci téže skupiny se středním rizikem), u kterých by mohlo stačit podávání konsolidační chemoterapie - jde především o případy

bez *FLT3/ITD*, které mají navíc prognosticky relativně příznivou mutaci *NPM1* a/nebo *CEBPA*.^{50,51} Prognostický dopad mutací genu *FLT3* již byl prověřen v mnoha studiích, a proto je možné již tento marker považovat za dostatečně robustní, s dostatečnou výpovědní hodnotou i pro reálnou praxi v Česku mimo klinické studie.⁷ Pro hodnocení prognostického významu délky ITD budou zapotřebí ještě další studie s ještě větším počtem pacientů. Lze si však představit, že pomocí tohoto parametru bude v budoucnu možné prognosticky rozlišovat *FLT3/ITD*-pozitivní pacienty se střední cytogenetickou prognózou. Podobný význam by také mohlo mít i kvantitativní hodnocení alelické nálože *FLT3/ITD*.⁴³

6 Závěr

FLT3/ITD je jednou z nejčastějších sekundárních molekulárně-genetických aberací u pacientů s AML. Vyskytuje se u 20-30 % případů a bývá spojena s leukocytózou a nepříznivou prognózou, zejména u pacientů se středním cytogenetickým rizikem.⁷ Vlivem délky ITD na prognózu *FLT3/ITD*-pozitivních pacientů se však zabývalo zatím jen málo prací.^{5,6,32}

Cílem naší práce bylo zhodnotit incidenci *FLT3/ITD* detekovanou metodou RT-PCR a její dopad na počet WBC v době diagnózy, indukci CR, výskyt relapsů a OS pacientů s AML u naší skupiny pacientů. Dále jsme se zabývali vlivem délky ITD na tytéž parametry. Výsledky byly hodnoceny jednak sumárně u všech pacientů s AML, tak i u jednotlivých podskupin – u AML (bez APL), u AML se střední cytogenetickou prognózou, a u APL.

Celkem bylo hodnoceno 408 nově diagnostikovaných pacientů s AML. Z nich bylo 96 pacientů (23,5 %) *FLT3/ITD* pozitivních, což je v souladu s dosud publikovanými výsledky.³² Počet WBC byl vyšší u pozitivních pacientů, a to ve všech samostatně hodnocených skupinách. Pacienti bez této aberace o něco snáze (ale nikdy ne signifikantně) dosahovali CR, nejvýrazněji ve skupině pacientů se střední cytogenetickou prognózou. U *FLT3/ITD* pozitivních pacientů jsme pozorovali zvýšenou incidenci relapsů, opět nejvíce patrnou u pacientů se středním cytogenetickým rizikem. OS bylo vysoce signifikantně kratší u pacientů s duplikací ve všech sledovaných skupinách non-APL AML, tzn. u všech skupin s výjimkou APL, kde *FLT3/ITD* již neměla na OS vliv.

Délka ITD byla hodnocena u 93 pacientů. Nejlepší výpovědní hodnotu mělo použití rozhraní délek ITD 39 nukleotidů. Délka ITD sice neměla vliv na počet WBC v době diagnózy v žádné ze sledovaných skupin, ale velmi překvapivě jsme zjistili, že pacienti se střední cytogenetickou prognózou s ITD >39 nt snáze dosahovali CR, ale na druhou stranu zase snáze relabovali. Naproti tomu ve skupině pacientů s APL délka ITD neměla podstatný dopad na dosažení CR a neuplatnila se v předpovědi OS. Délka ITD by se v budoucnu mohla uplatnit v předpovědi OS u *FLT3/ITD*-pozitivních pacientů s AML, avšak je zapotřebí tento parametr validovat dalšími studiemi na ještě větších souborech pacientů, podobně jako je třeba ještě dále validovat význam mutací genů

NPM1 a *CEBPA* u pacientů *FLT3/ITD*-negativních se středním cytogenetickým rizikem. Naopak prognostický význam *FLT3/ITD* u pacientů s AML je nutno v současnosti považovat již za robustní prognostický faktor vhodný pro klinickou praxi – na základě její přítomnosti u pacientů se středním cytogenetickým rizikem je již možné dělat rozhodnutí dalšího léčebného postupu.

7 Citace

1. Doubek, M.; Vorlíček, J.: Leukémie [on-line]: <<http://www.linkos.cz/pacienti>> [cit. 27.2.2009].
2. Bernard, J.; Lasneret, J.; Chome, J.; Levy, J. P.; Borion, M.: A cytological and histological study of acute promyelocytic leukemia. *J. Clin Pathol* 16, 316(1963).
3. Mandelli, F.; Diverio, D.; Avvisati, G.; Luciano, A.; Barbui, T. et al.: Molecular remission in *PML/RAR α* -positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. *Blood* 90:1014-1021 (1997).
4. Buchner, T.; Heinecken, A.: The role of prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10 (Suppl):1, s. 28 (1996).
5. Stirewalt, D. L.; Kopecky, K. J.; Meshinchi, S. et al.: Size of *FLT3* internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 107, 3724-3726 (2006).
6. Ponziani, V.; Gianfaldoni, G.; Mannelli, F. et al.: The size of duplication does not add to the prognostic significance of *FLT3* internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 20, 2074-2076 (2006).
7. Schwarz, J.; Marková, J.; Fuchs, O.; Polák, J.; Haškovec, C.; Cetkovský, P.: Význam mutací genu *FLT3* a dalších molekulárních markerů pro prognózu a léčebný přístup u akutní myeloidní leukémie. *Trans. Hemat. dnes* 14, 116-122 (2008).
8. Adam, Z.; Vorlíček, J. a kolektiv: *Hematologie II, přehled maligních hematologických nemocí*. vyd. Praha, Grada Publishing (2001), s. 37.
9. Gilliland, D. G.: Molecular genetics of human leukemia. *Leukemia* 12, 7-12 (1998).
10. Medicine World Org [on-line]: < <http://medicineworld.org/cancer/hematological/leukemias/acute-myeloid-leukemia-aml.html>> [cit. 3.2.2009].
11. Beránková, K. Možnosti mnohobarevné fluorescenční in situ hybridizace při detekci chromozomových změn u dětských nádorových onemocnění. *Bakalářská práce*, Brno (2007).

12. Gilbert, F.: Chromosomes, genes and cancer: A classification of chromosome abnormalities in cancer. *JNCI* 71, 1107-1114 (1983).
13. Heim, S.; Mitelman, F.: Cancer cytogenetics. A. Liss, New York (1987).
14. Michalová, K. *Úvod do lidské cytogenetiky*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví (1999).
15. Koutecký, J.; Kabíčková, E.; Starý, J.: *Dětská onkologie pro praxi*. Praha, Triton (2002).
16. Brunning, R.D.; Matutes, E.; Harris, N.L. et al.: Acute myeloid leukaemias. *In: Pathology and genetics tumorous of haematopoietic and lymphoid tissues*. Jaffe E. S.; Harris, N. L.; Stein, H.; Vardiman, J. W.(ed.). IARC Press, Lyon, 2001, s. 75-80.
17. Zuberová, O.; Babušíková, O.: The multidrug resistance in human leukemias. *Neoplasma* 45, 53-59 (1998).
18. Seiter, K. et al.: Acute myelogenous leukemia: Differential diagnoses and workup. [on-line], 2006: < <http://emedicine.medscape.com/article/197802-print> > [cit. 14.5.2009].
19. Michalová, K.; Zemanová, Z.; Březinová, J.: Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) v diagnostice hematologických malignit. *Scripta medica*, Brno, 279-285 (1996).
20. Indrák, K.: Léčba akutních leukemií. *Scripta medica*, Brno, 305-308 (1996).
21. Barbui, T.; Finazzi, G.; Falanga, A.: The impact of all-trans-retinoic acid on the coagulopathy of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 99, 3093-3102 (1998).
22. Fenaux, P.; Chastang, C.; Chevret, S. et al.: A randomized comparison of alltransretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. *Blood* 94, 1192-1200 (1999).
23. Lo Coco, F.; Diverio, D.; Falini, B. et al.: Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 94, 12-22 (1999).

24. Lo Coco, F.; Nervi, C.; Avvisati G.; Mandelli F.: Acute promyelocytic leukemia: a curable disease. *Leukemia* 12, 1866-1880 (1998).
25. Slack, J. L.; Gallagher, R. E.: The molecular biology of acute promyelocytic leukemia. *Cabc Treat Res* 99:75-124 (1999).
26. Schwarz, J.; Kačirková, P.; Marková, P.; Mikulenková, D.; Marinov, I.; Ballingová, I.; Michalová, K.: Urgentní stav v hematologii: akutní promyelocytární leukémie – princip diagnostiky. *Vnitřní lékařství* 54, 728-744 (2008).
27. Grignani, F.; Fagioli, M.; Alcalay, M.; Longo, L. et al.: Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* 83, 10-25 (1994).
28. Grandini, D.; Burchenal, K. N.; Botto, M.; Alloppenna, J.; Seale, J. R.; Cross, N. C.; Goldman, J. M.; Dmitrovsky, E.; Pandolfi, P. P.: Interferon augments *PML* and *PML/RAR α* expression in normal myeloid and acute promyelocytic cells and cooperates with all-trans retinoic acid to induce maturation of retinoid-resistant promyelocytic cell line. *Blood* 88, 3926-3936 (1996).
29. Lyman, S. D.; Jacobsen, S. E. W.: c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 91, 1101–1134 (1999).
30. Gilliland, D. G.; Griffin, J. D.: The roles of *FLT3* in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100: 1532–1542 (2002).
31. Levis, M.; Small, D.: FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia* 17, 1738–1752 (2003).
32. Stirewalt, D. L.; Radich, J. P.: The role of *FLT3* in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 3: 650–665 (2003).
33. Mackarehtschian, K.; Hardin, J. D.; Moore, K. A.; Boast, S.; Goff, S. P.; Lemischka, I. R.: Targeted disruption of the *flk2/flt3* gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 3, 147–161 (1995).
34. McKenna, H. J.; Stocking, K. L.; Miller, R. E. et al.: Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95, 3489–3497 (2000).

35. Chaudhry, U. I.; Katz, S. C.; Kingham, T. P. et al.: *In vivo* overexpression of Flt3 ligand expands and activates murine spleen natural killer dendritic cells. *FASEB journal* (2006).
36. Rosnet, O.; Schiff C.; Pebusque M. J. et al.: Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 82, 1110-1119 (1993).
37. Rosnet, O.; Mattei, M. G.; Marchetto, S.; Birnbaum, D.: Isolation and chromosomal localization of a novel FMS – like tyrosine kinase gene. *Genomics* 9, 380-385 (1991).
38. Rosnet, O.; Marchetto, S.; deLapeyriere, O.; Birnbaum, D.: Murine FLT3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene* 6, 16410–1650 (1991).
39. Yamamoto, Y.; Kiyoi, H.; Nakano, Y. et al.: Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97, 2434–2439 (2001).
40. Abu-Duhier, F. M.; Goodeve, A. C.; Wilson, G. A. et al.: Identification of novel *FLT3* Asp835 mutations in adult acute myeloid leukemia. *Br J. Haematol* 113, 983-988 (2001).
41. Armstrong, S. A.; Mabon, M. E.; Silverman, L. B. et al.: FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103, 3544–3546 (2004).
42. Small, D.: FLT3 Mutations: Biology and Treatment.
43. Kottaridis, P. D.; Gale, R. E.; Frew, M. E.; Harrison, G. et al.: The presence of a *FLT3* internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 98, 1752–1759 (2001).
44. Thiede, Ch.; Steudel, Ch.; Mohr, B.; Schaich, M. et al.: Analysis of *FLT3*-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 99, 4326–4335 (2002).

45. Schnittger, S.; Schoch, C.; Dugas, M.; Kern, W.; Staib, P.; Wuchter, Ch. et al.: Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 100, 59–66 (2002).
46. Fröhling, S.; Schlenk, R. F.; Breitruck 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. Haferlach, T.; Schoch, C.; Schnittger, S.; Kern, W.; Löffler, H.; Hiddemann, W.: Distinct genetic patterns can be identified in acute monoblastic and acute monocytic leukaemia (FAB AML M5a and M5b): a study of 124 patients. *Br J Haematol* 118, 426–431 (2002).
48. Schwarz, J.; Peková, S.; Čermák, J. et al.: Prognosis in AML and APL: the role of FLT3 gene internal tandem duplications (ITDs) and outcome prognostic markers. (Abstr. 1.8) *Leuk Lymphoma* 44, (Suppl): s. 64 (2003).
49. Schwarz, J.; Kořístek, Z.; Starý, J. et al.: Léčba akutní promyelocytární leukemie v Česku: výsledky a analýza prognostických faktorů. *Vnitř. lék.* 54, 757-770 (2008).
50. Mrózek, K.; Marcucci, G.; Paschka, P. et al.: Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 23, 1121-1129 (2007).
51. Baldus, C. D.; Mrózek, K.; Marcucci, G.; Bloomfield, C. D.: Clinical outcome of *de novo* acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol* 137, 387-400 (2007).

8 Příloha

Produkt PCR amplifikace mutovaného genu *FLT3* na úrovni cDNA (t.j. primery R5xR6).

tgtc gagcagtact

1501 ctaaacaatga gtgaagccat aaaaggggtc ctggtaagt gctgtgcata caattccctt

1561 ggcacatctt gtgagacgat ccttttaaac tctccaggcc ccttccctt catccaagac

1621 aacatctcat tctatgcaac aattgggtgtt tgtctcctct tcattgtcgt ttaaccctg

1681 ctaattgtc acaagtacaa aaagcaattt aggtatgaaa gccagctaca gatggtacag

1741 gtgaccggct cctcagataa tgagtacttc tacgttgatt tcagagaata tgaatatgat

1801 ctcaaatggg agttccaag agaaaattta gagtttgga aggtactagg at