

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a žádám, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie



**Liniová plasticita fyziologických a maligních lymfocytárních
prekurzorů**

**Lineage plasticity in normal and malignant lymphocyte
precursors**

Leona Rezková Řezníčková

V Praze 2012

Vedoucí práce: MUDr. Eva Froňková, PhD.

Diplomová práce byla vypracována samostatně s použitím citované literatury pod vedením MUDr. Evy Froňkové, PhD.

Dne 27.8.2012

Leona Rezková Řezníčková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce MUDr. Evě Froňkové, PhD. nejen za výborné odborné vedení této diplomové práce, ale také za přátelskou pomoc v průběhu celého studia a dlouholeté spolupráce. Velký dík patří také MUDr. Ester Mejstříkové, PhD. za uvedení do problematiky průtokové cytometrie a odborné vedení celého projektu. Prof. MUDr. Janu Trkovi, PhD. děkuji za umožnění studia a realizaci diplomové práce v laboratořích CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague). V neposlední řadě děkuji všem kolegům z pracovní skupiny CLIP za pomoc, ochotu a trpělivost.

Diplomová práce byla vypracována v Laboratorním centru Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, pracovní skupiny CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague), v období 2010-2012. Finanční prostředky na tuto práci byly využity také z projektu:

GAUK 437911

Obsah

Abstrakt.....	8
Abstract.....	9
1. Úvod	10
2. Přehled literatury	11
2.1 Vývoj hematopoetických buněk	11
2.1.1. Klasický model hematopoézy	11
2.1.2 Alternativní model hematopoézy	13
2.2 Akutní leukémie v dětském věku.....	13
2.2.1 Akutní lymfoblastické leukémie.....	14
2.2.2 Akutní myeloidní leukémie	20
2.2.3 Akutní hybridní leukémie	24
2.2.4 Přestavby imunoreceptorových genů a jejich využití v diagnostice	26
3. Cíle práce	29
4. Materiál a metody	30
4.1 Analyzovaný materiál	30
4.1.1 Charakteristika souboru pacientů	30
4.2 Metody	31
4.2.1 Izolace mononukleárních buněk pomocí hustotního gradientu... 31	
4.2.2 Izolace celkové RNA z mononukleárních leukocytů – modifikace metody dle Chomczynski a Sacchi (1987) – modifikace dle Trizolu .. 32	
4.2.3. Ověření kvality RNA pomocí kapilární elektroforézy na čipu .. 34	
4.2.4 Reverzní transkripce	36
4.2.5 Exprese genu CEBP α (CCAAT/enhancer binding.....	37

protein α) pomocí metody qRT-PCR.....	37
4.2.6 Stanovení exprese kontrolního genu ABL (Abelson gene) metodou qRT-PCR.....	39
4.2.7 Stanovení exprese cytokinových receptorů CSF1R, CSF2RA a MPL metodou qRT-PCR	41
4.2.8. Screening přestaveb genů pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TCR) a stanovení MRN.....	42
4.2.9 Průtoková cytometrie a sortování buněčných populací.....	50
4.3 Statistická analýza.....	50
5. Výsledky	51
5.1. Výsledky I: Určení liniové příslušnosti podle přítomnosti klonálních přestaveb Ig/TCR	51
5.1.1. Liniová příslušnost u leukémií s přesmykem z lymfoidní do myeloidní linie během léčby.....	51
5.1.2. Liniová příslušnost u leukémií z T-lymfocytární řady	55
5.2. Výsledky II: Exprese vybraných genů u hybridních leukémií	57
5.2.1. Exprese genu CEBP α	57
5.2.2. Exprese cytokinových receptorů CSF1R, CSF2RA a MPL.....	58
6. Diskuze	60
7. Závěr	62
8. Seznam použitých zkratk:.....	63
9. Použitá literatura.....	67
10. Přílohy	75

Abstrakt

Klasické schéma vývoje hematopoetických buněk předpokládá časné oddělení lymfoidního a myeloidního prekursoru. V poslední době jsou navrhovány složitější modely, které předpokládají větší flexibilitu hematopoezy a navrhují existenci progenitorů s lymfoidním i myeloidním potenciálem. Akutní hybridní leukémie jsou malignity, které podle různých kritérií nelze jednoznačně zařadit k lymfoidní nebo k myeloidní linii a jejichž chování spíše dává za pravdu novým modelům hematopoezy. Předkládaná práce se zabývala především výzkumem dětských leukémií s přesmykem z lymfoidní do myeloidní linie během indukční léčby. Jedná se o rozsáhlý projekt, v jehož rámci si diplomová práce si kladla za úkol určit liniové zařazení leukemických blastů pomocí detekce přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory (TCR). Potvrdili jsme, že myeloidní buňky derivované v průběhu léčby pochází u všech pacientů z původního lymfoidního klonu. Dále jsme u těchto případů zkoumali expresi vytipovaných genů ve srovnání s běžnými druhy leukémií. Třetí částí práce byl výzkum prognostického významu přítomnosti přestaveb TCR (a tedy příslušnosti k lymfoidní linii) u leukémií z T-lymfoidní řady.

Abstract

The classical scheme of hematopoiesis presumes early separation of lymphoid and myeloid precursors. Recently, more complex models are put forward, suggesting greater flexibility of hematopoiesis with progenitors sharing lymphoid and myeloid potential. Acute hybrid leukemia is a malignancy, in which it is not possible to assess unambiguously myeloid or lymphoid lineage of origin. The behaviour of those malignancies favors new models of hematopoiesis. Our work concentrated mainly on the research of childhood leukemias with lineage switch from lymphoid to myeloid lineage during induction treatment. Our task within this extensive project was to determine lineage assignment of leukemic blasts using detection of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements. We confirmed that myeloid cells derived during the treatment in all patients descend from the original lymphoid clone. We also investigated the expression of selected genes in those cases compared to common leukemia types. Lastly, we explored prognostic impact of TCR rearrangements (and thus lymphoid lineage commitment) in T-lineage leukemia.

1. Úvod

Vývoj krevních buněk je velice dynamický proces, který probíhá v kostní dřeni. Efektorové krevní buňky, vznikající z buněk kmenových, se podílejí na nejrůznějších důležitých procesech v organismu, zejména imunitních reakcích. V případě vzniku genetických změn, které mohou vést k růstové výhodě nebo poruše apoptózy buněk, vzniká nejčastější maligní onemocnění v dětském věku – akutní leukémie. Nejčastějším typem leukémií je akutní lymfoblastická leukémie (ALL), méně častým typem je akutní myeloidní leukémie (AML). Vzácně se vyskytují leukémie, u kterých můžeme současně nalézt znaky jak B, tak T buněčné linie nebo 2 klonů různých buněčných linií, anebo velmi vzácně přesmyk z jedné linie do druhé v průběhu léčby. Tyto typy leukémií jsou definovány jako akutní hybridní leukémie (AHL).

Léčba akutních leukémií patří mezi velice náročný onkologický postup využívající současné moderní metody jako chemoterapie, ozařování či transplantace hematopoetických kmenových buněk (SCT). Díky těmto přístupům a snaze stratifikovat pacienty v počátku léčby podle míry rizika do jednotlivých rizikových skupin bylo dosaženo v průběhu 40 let velkých úspěchů v léčbě. Z nevléčitelné nemoci se stala nemoc, u které je šance na přežití až 80%. Mezi důležité parametry, díky kterým se stratifikují pacienti s ALL na léčebných protokolech, patří stanovení minimální reziduální nemoci (MRN) metodou průtokové cytometrie nebo prostřednictvím klonálních přestaveb genů pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TCR). Důležitou součástí stratifikace je i stanovení genetických změn leukemického klonu jako například mutací či translokací, které vedou ke vzniku fúzních genů, které lze také využít ke sledování MRN, zejména u AML.

V této práci jsme se zaměřili na vzácný typ akutních hybridních leukémií, kde se pokusíme objasnit příslušnost leukemických blastů u pacientů s akutní leukémií s liniovým přesmykem (swALL) z lymfoidní do myeloidní linie v průběhu léčby. Další zkoumanou otázkou je prognostický vliv přítomnosti či nepřítomnosti přestaveb TCR, a tedy neúplná specifikace do lymfoidní linie, u pacientů s ALL vycházející z T-lymfocytů. Rovněž definujeme některé klíčové faktory, které mohou být zodpovědné za liniovou nestabilitu u AHL.

2. Přehled literatury

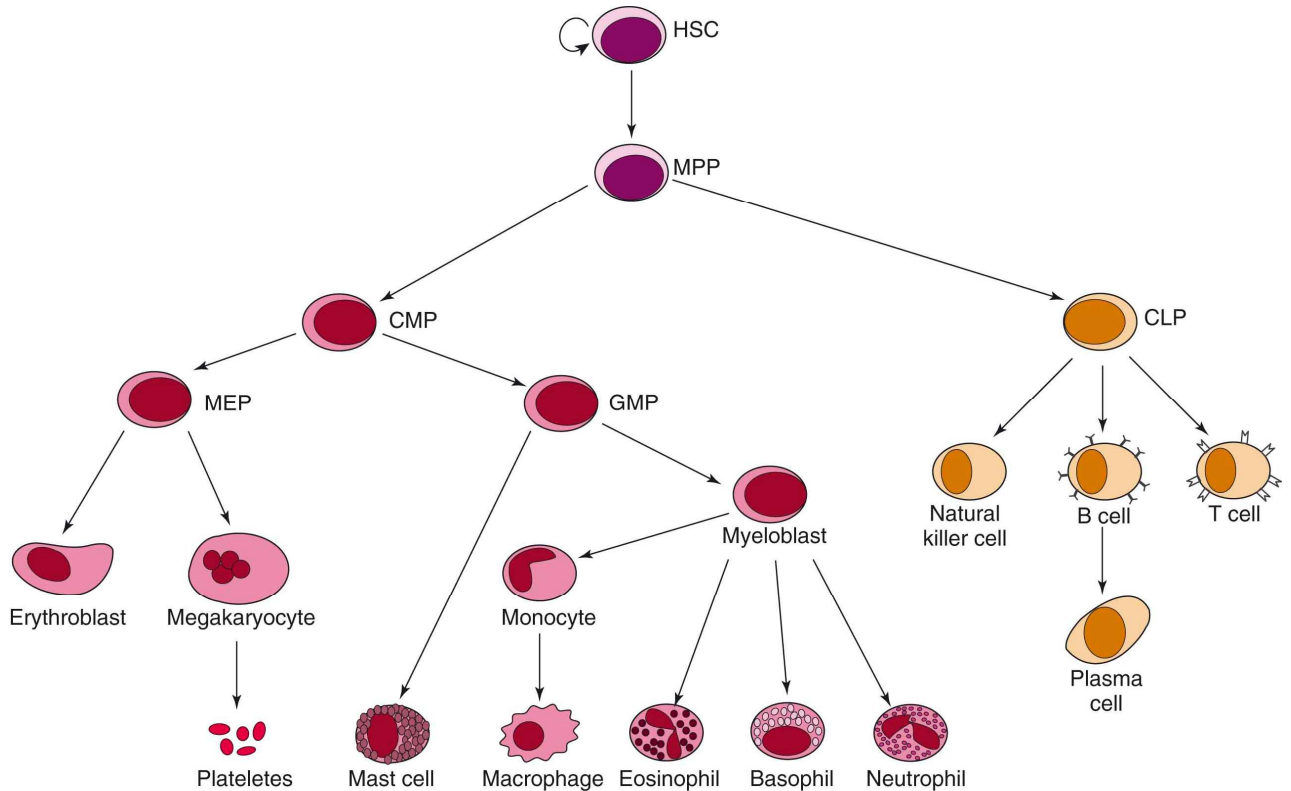
2.1 Vývoj hematopoetických buněk

Vývoj hematopoetických buněk probíhá v kostní dřeni. V kostní dřeni lze nalézt krevní cévy, buňky kostní dřene a extracelulární matrix. Diferenciace hematopoetických buněk z buněk kmenových je vysoce regulovaný proces, který je výsledkem membránových interakcí mezi kmenovými buňkami krvetvorby a stromálními buňkami kostní dřene. Pro optimální vyzrávání hematopoetických buněk je zapotřebí i optimální cytokinové prostředí, na němž se podílejí zejména endotelové buňky prostřednictvím produkovaných cytokinů (CSF- Colony Stimulating Factors, IL6). Proces tvorby buněk je mimořádně dynamický a je ovlivňován momentálními potřebami organismu, především potřebou rozvinutí imunitní reakce (Krejsek J. 2004).

2.1.1. Klasický model hematopoézy

Hematopoetické kmenové buňky (HSCs) jsou definovány jako buňky, které jsou schopny sebeobnovy a diferenciace do různých typů hematopoetických buněk. Charakteristickým znakem HSC je povrchová molekula CD34 (Civin, Trischmann et al. 1996) naopak neexprimují jednotlivé znaky zralých krevních buněk CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD56 a CD66b (Wognum, Eaves et al. 2003). V kostní dřeni můžeme nalézt 1-4% buněk exprimujících glykoprotein CD34, které vykazují schopnost dlouhodobé obnovy hematopoézy. V periferní krvi se vyskytuje méně než 0,1% CD34 pozitivních buněk z celkového počtu jaderných buněk. Ke zvýšení počtu nad 1% může docházet působením cytokinů nebo při cytotoxické léčbě, což může být využito k získání HSC z periferní krve pro klinické transplantace (Hawley, Ramezani et al. 2006). Z HSC se následně diferencují stádia lymfoidního progenitoru CLP (Common Lymphoid Progenitor) a myeloidního progenitoru CMP (Common Myeloid Progenitor). Z CLP se přes stádia unipotentních progenitorů T-lymfocytů, B-lymfocytů a NK buněk (Natural Killer) vyvíjejí zralé buňky (Kondo, Weissman et al. 1997). CML se přes multipotentní progenitory CFU-GEMM (Colony Forming Unit Granulocyte-Erythrocyte-Monocyte-Megakaryocyte) dále diferencují přes stádia multipotentních progenitorů CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage) a CFUMegE (Colony Forming Unit Megakaryocyte/Erythroid)

a unipotentních progenitorů vyvíjejí zralé granulocyty (neutrofilní, eozinofilní, basofilní granulocyty), monocyty, trombocyty, erythrocyty (Akashi, Traver et al. 2000).

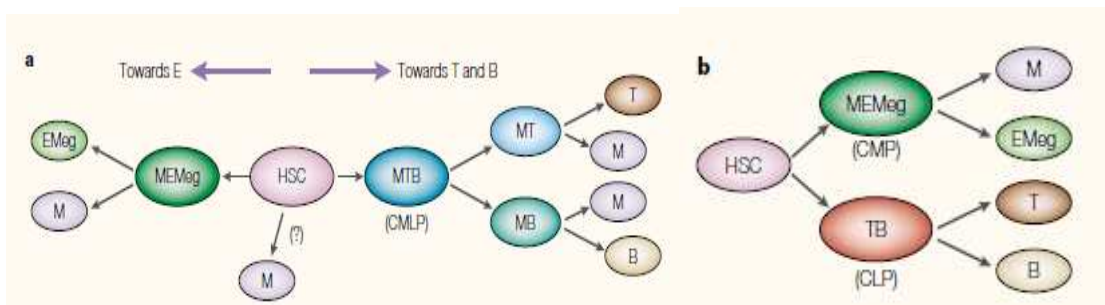


Obrázek 1. Klasický model hematopoezy

Převzato od Schutte, Moignard et al. 2012. Klasický model hematopoezy, kdy z hematopoetické kmenové buňky (HSC) vycházejí smíšený lymfoidní progenitor (CLP) a smíšený myeloidní progenitor (CML), které přes další stadia unipotentních progenitorů dávají vznik všem zralým efektorovým buňkám.

2.1.2 Alternativní model hematopoézy

Všechny krevní buňky jsou odvozeny z hematopoetických kmenových buněk. Vývoj B-lymfocytů, T-lymfocytů, myeloidních či eryteroidních buněk je zkoumán na celé řadě úrovní a experimentálních modelů. B-lymfocyty a T-lymfocyty pocházejí ze společného lymfoidního progenitoru (CLP), který je schopen generovat B-lymfocyty a T-lymfocyty, ale ne eryteroidní a myeloidní buňky či megakaryocyty. Společnou vlastností B a T lymfocytů je rozpoznávat antigeny prostřednictvím svých receptorů (BCR – B cell receptor, TCR – T cell receptor), které vznikají v průběhu vývoje procesem zvaným V(D)J rekombinace. I tato zjištění, že buňky využívají stejný molekulární aparát, posílila myšlenku, že pochází ze stejného lymfoidního progenitoru. (Katsura 2002). Nicméně výzkum, kterým se zabývá Katsura ukazuje, že vývoj B lymfocytů, T lymfocytů a myeloidní linie může vést nejen podle klasického modelu přes CLP a CMP, ale také přes myeloidní/T a myeloidní/B bipotentní stupeň vývoje (Katsura 2002). Tyto nové poznatky umožňují znovu zvážit ontogenezi a fylogenezi T-buněčného, B-buněčného a myeloidního vývoje.



Obrázek 2. Alternativní model hematopoézy

Převzato od Katsura, 2002. Vlevo (a) nový model ukazuje, že myeloidní potenciál je přítomen již v časných vývojových stádiích B, T lymfocytu i v eryteroidně-megakaryocytární linii. Vpravo (b) obecně přijímaný klasický model hematopoézy.

2.2 Akutní leukémie v dětském věku

V průběhu mnohastupňového vývoje hematopoetických buněk může docházet k celé řadě změn, které mohou vést k poruchám normální proliferace a diferenciaci buněk. Tyto změny mohou vést k celé řadě onemocnění benigních, ale i maligních. Jedním z těchto závažných onemocnění jsou akutní leukémie.

Akutní leukémie je nejčastější nádorové onemocnění dětského věku s přibližně 80-90 nově diagnostikovanými pacienty v České republice ročně. Asi 80% leukémií představuje akutní lymfoblastická leukémie (ALL), přibližně 15% akutní myeloidní leukémie (AML) (Zdrahalova 2007). Jedná se o onemocnění s prudkým nástupem a velmi často se vyskytuje u osob bez jakékoliv známé hematologické anamnézy. První příznaky se objevují zpravidla jen několik dnů či týdnů před zjištěním definitivní diagnózy. Termín akutní rovněž odráží průběh nemoci. Neléčené či nedostatečně léčené onemocnění pacienta vede ke smrti během několika týdnů. Dnešní léčba leukémií patří celkově mezi nejnáročnější onkologické postupy, ale právě díky moderním terapeutickým protokolům bylo možno výrazně zvýšit procento vyléčených pacientů (Stary, Jabali et al. 2010). Diagnostika akutních leukémií spočívá v morfoloickém, cytochemickém, cytogenetickém a imunologickém vyšetření kostní dřeně (BM) a periferní krve (PB). To nám umožní správnou diagnostiku a rozlišení mezi ALL a AML.

2.2.1 Akutní lymfoblastické leukémie

V České republice onemocní ALL přibližně 65-70 dětí za rok. ALL je nejčastějším nádorovým onemocněním u dětí a představuje asi čtvrtinu všech nádorových onemocnění v dětském věku (Pui 2000). Můžeme definovat dva vrcholy výskytu: v předškolním věku mezi 2. a 5. rokem a méně výrazný v pubertě. Zatímco v předškolním věku je ALL nejčastější malignitou, u dospívajících předstihují ve výskytu leukémii lymfomy, germinální a mozkové nádory. V dětském věku je ALL maligním onemocněním s relativně dobrou prognózou a s nadějí na trvalé vyléčení 70-80% (Zdrahalova 2007).

2.2.1.1 Diagnostika ALL

Morfologická klasifikace

Morfologická analýza periferní krve (PB) a/nebo kostní dřeně (BM) se využívá k popisu vzhledu, struktury a procentu leukemických buněk. ALL je diagnostikována nálezem alespoň 25% blastů v kostní dřeni. Dle FAB (French–American-British) morfologické klasifikace rozlišujeme typ L1, který se vyskytuje nejčastěji (70-80%) a je definován jako homogenní malé blasty. Typ L2 tvoří 20-25% a je charakterizován blasty různé velikosti. Typ L3 typ se nachází vzácně, spojuje se zralou B-ALL a jsou u něj popisovány velké blasty se silně bazofilní cytoplazmou a častou vakuolizací (Pui, Kane et al. 1995).

Imunofenotypizace

Z hlediska imunofenotypu můžeme ALL rozdělit na ALL vycházející z prekurzorů B-lymfocytů (BCP-ALL tvoří asi 80%) a vzácně se vyskytující zralou ALL (2%) (Starý 2002). Přibližně 10-15% dětských akutních lymfoblastických leukémií jsou T-ALL, tedy leukémie vycházející z prekurzorů T-lymfocytů, které jsou spojeny s horší prognózou než B-ALL (Goldberg, Silverman et al. 2003). Imunofenotypizace leukémií, vycházejících z lymfoidní linie, umožňuje stratifikovat různé klinické a biologické subtypy na základě exprese antigenů, které jsou typické pro určitá vývojová stadia fyziologických protějšků blastů. Imunofenotypizace ALL dle EGIL (The European Group for the Immunological Classification of Leukemias) klasifikace je shrnuta v Tabulce 1.

Kategorie	Kritéria	Podtřída	Kritéria
B prekurzorová	<ul style="list-style-type: none"> • 2 nebo 3 z následujících: CD19^{poz}, (intra)CD79a^{poz} a CD22^{poz} • CD3^{neg} • intraCD3^{neg} • κ^{neg} a λ^{neg} 	proB ALL	CD10 ^{neg} CD20 ^{neg}
		cALL	CD10 ^{poz} intraIgM ^{neg}
		preB ALL	intraIgM ^{poz}
zralá B	<ul style="list-style-type: none"> • 2 nebo 3 z následujících: CD19^{poz}, (intra)CD79a^{poz} a CD22^{poz} • CD3^{neg} • intraCD3^{neg} • κ^{poz} nebo λ^{poz} 	<i>Bez další subklasifikace</i>	
T ALL	<ul style="list-style-type: none"> • (intra)CD3^{poz} • CD7^{poz} 	proT ALL	CD2 ^{neg} CD8 ^{neg} CD5 ^{neg}
		preT ALL	CD2 ^{poz} a/nebo CD5 ^{poz} a/nebo CD8 ^{poz}
		Intermediární T ALL	CD1a ^{poz}
		zralá T ALL	CD3 ^{poz} CD1a ^{neg}
		TCRαβ ^{poz} T ALL	TCRαβ ^{poz}
		TCRγδ ^{poz} T ALL	TCRγδ ^{poz}

Tabulka 1. *Adaptovaná klasifikace EGIL (The European Group for the Immunological Classification of Leukemias) pro hodocení ALL v rámci BFM (Berlin – Frankfurt – Münster) protokolů pro dětskou ALL.*

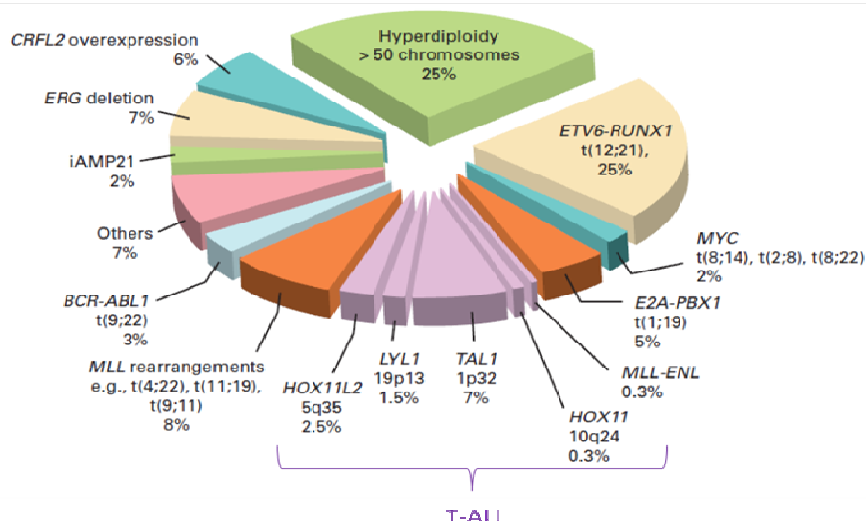
2.2.1.2 Genetické abnormality a prognostické faktory

Molekulární analýza genetických změn u leukemických buněk přispěla k významnému pochopení patogeneze a prognózy ALL (Pui and Evans 1998). K obecným mechanismům, které mohou vést ke vzniku leukémie, patří abnormální exprese proto-onkogenů, chromozomální translokace, které vedou ke vzniku fúzních genů kódujících některé aktivní kinázy, změny transkripčních faktorů a hyperdiploidie zahrnující více než 50 chromozomů. Tyto genetické změny přispívají k leukemické transformaci hematopoetických kmenových buněk nebo jednotlivých prekurzorů a vedou ke změně buněčné funkce. Dochází ke změnám klíčových regulátorů proliferace, blokování diferenciace a rezistence na apoptotické signály (Pui, Relling et al. 2004). Evoluce leukemického klonu pravděpodobně vyžaduje několik genetických „zásahů“ a v pozdních fázích onemocnění jsou nacházeny mnohočetné genetické abnormality (Starý 2002). Mezi nejvýznamnější z nich, které mají dopad na stratifikaci pro léčbu a negativní vliv na prognózu, jsou translokace (9;22) vedoucí ke vzniku fúzního genu BCR/ABL1 (Arico, Valsecchi et al. 2000) a přestavby genu MLL a to zejména translokace (4;11) vedoucí ke vzniku fúzního genu MLL/AF4. Prognóza dalších fúzních partnerů genu MLL může být v budoucnosti také významná, zejména u dětí (Pieters, Schrappe et al. 2007). Nejčastější genetickou změnou u dětských leukémií je přítomnost fúzního genu ETV6/RUNX1, vzniklého translokací (12;22) a hyperdiploidie, která je definována jako >50 chromosomů v leukemické buňce. Tyto dvě genetické změny se vyskytují téměř u 50% dětských BCP-ALL a jsou spojeny s dobrou prognózou (Zuna, Hrusák et al. 1999, Trueworthy, Shuster et al. 1992). Oproti tomu hypodiploidie, která je poměrně vzácná, se vyskytuje pouze u 3-9% pacientů, z nichž 80% má počet chromosomů 45. Téměř haploidní počet chromosomů je vzácný a tyto děti mají extrémně špatnou prognózu (Starý 2002).

Nástup nových technologií v posledním desetiletí (analýza expresních profilů, tzv. single-nucleotide polymorphism (SNP) a comparative genomic hybridization (CGH) arrays, sekvenování nové generace) vedl k odhalení mnoha dalších genetických změn a prognostických faktorů. U velké části (40%) pacientů byly nalezeny změny související s vývojem B-lymfocytů (např. delece genů PAX5, TCF3, EBF1, LEF1, IKZF1, IKZF3). Další geny souvisely s regulací buněčného cyklu (např. CDKN2A,

CDKN1B, RB1 (Kuiper, Schoenmakers et al. 2007, Strefford, Worley et al. 2007) či signalizačními drahami (JAK, CRLF2). Zvýšená exprese CRLF2 (Cytokine Receptor Like Factor 2), způsobená translokacemi P2RY8-CRLF2, IGH-CRLF2 nebo mutací v samotném genu CRLF2, byla nalezena u 6% - 7% BCP-ALL (Mullighan, Collins-Underwood et al. 2009, Cario, Zimmermann et al. 2010). Tyto změny jsou asociovány s mutacemi JAK (Janus Kináz), vedou ke konstitutivní aktivaci JAK-STAT dráhy (Yoda, Yoda et al. 2010) a jsou asociovány se špatnou prognózou (Harvey, Mullighan et al. 2010). Delece v genu IKZF1, který kóduje lymfoidní transkripční faktor Ikaros, byly nalezeny u 80% BCR/ABL1 pozitivních akutních leukémií (Mullighan, Miller et al. 2008). Ovšem delece IKZF1 byly nalezeny i u skupiny leukémií BCR/ABL1 negativních, u nichž byl expresní profil podobný jako u BCR/ABL1 pozitivních leukémií (Mullighan, Su et al. 2009). Tyto leukémie byly označeny jako BCR/ABL1-like ALL. Jejich prognóza je srovnatelná s prognózou BCR/ABL1 pozitivních ALL (Den Boer, van Slegtenhorst et al. 2009).

Podobně jako u BCP-ALL i u T-ALL nalézáme genetické abnormality, které vedou k celé řadě buněčných změn. Ovšem z důvodů vzácnosti výskytu T-ALL je vztah genotypu a prognózy stále objasněn méně, než je tomu u BCP-ALL. U T-ALL nalézáme často chromozomální translokace, kterých se účastní T-buněčný receptor TCR $\alpha/\beta/\delta$. Pravděpodobně se jedná o chybu vzniklou při přestavování genů pro TCR. U TCR γ nejsou dosud známy žádné chromozomální aberace. Těchto přestaveb se účastní např. geny TLX1, TAL1, LMO1, LMO2, LYL1 nebo homeoboxové geny HOX11L2, HOX 11 (De Keersmaecker, Marynen et al. 2005). Časté (až 50%) jsou aktivační mutace transmembránového receptoru Notch1 (Weng, Ferrando et al. 2004). Přítomnost Notch1 mutace predikuje příznivější prognózu a odpověď na léčbu (Breit, Stanulla et al. 2006).



Obrázek 3. Převzato od Pui, Carroll et al., 2011. Grafické znázornění zastoupení genetických abnormalit u ALL.

2.2.1.3 Léčba a stratifikace ALL

V České republice jsou děti s ALL léčeni dle léčebných protokolů pracovních skupin BFM a AIEOP, konkrétně od roku 2010 protokolem AEIOP-BFM 2009. Protokol je založen na stratifikaci pacientů dle prognosticky významných faktorů do skupin nízkého rizika (SR), středního rizika (MR) a vysokého rizika (HR) (Stary, Jabali et al. 2010). V době diagnózy se hodnotí klinické nálezy pacienta, molekulárně-genetické, imunologické a morfologické charakteristiky leukemických buněk. Jedním z dalších významných prognostických faktorů je tzv. odpověď na prednisonovou předfázi. Pacienti, kteří mají v 8. dni léčby v periferní krvi stále více než 1000 blastů/ μ l (asi 10% ze všech pacientů) jsou definováni jako tzv. „prednison poor responders“ (PPR) a jsou řazeni do vysokého rizika. Důležitou součástí stratifikace v moderních léčebných protokolech je stanovení minimální reziduální nemoci (MRN). Provádí se pomocí kvantifikace přestaveb pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TCR).

2.2.2 Akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukémie je heterogenní onemocnění, které vzniká nekontrolovatelnou proliferací myeloidních prekursorů. Leukemickým procesem může být postižena granulocytární, monocytární, erytroidní i magakaryocytární řada. V České republice onemocní AML průměrně 10 dětí za rok. Prognóza pacientů s AML oproti ALL je stále horší, i když se v průběhu 30 let zvýšilo procento celkového přežití (OS) na 50-60%. (Kaspers and Creutzig 2005).

2.2.2.1 Diagnostika AML

Morfologická klasifikace

Světová zdravotnická organizace (WHO) v roce 2004 navrhla nové rozdělení AML do podskupin na základě morfologických, tak i cytogenetických charakteristik (Ross, Mahfouz et al. 2004). V praxi je však stále používané rozdělení z roku 1976, které navrhla „French-American-British (FAB) cooperative group“ vycházející také z morfologických a cytochemických znaků (Bennett, Cassileth et al. 1996). Podle FAB klasifikace rozdělujeme AML na tyto subtypy:

M0 – akutní leukémie s minimálními známkami myeloidní diferenciace (tzv. časná myeloidní leukémie)

M1 – akutní myeloidní leukémie bez vyzrávání

M2 - akutní myeloidní leukémie s vyzráváním

M3 - akutní promyelocytární leukémie, do této skupiny patří podskupina M3v – variantní mikrogranulární leukémie M3

M4 - akutní myelomonocytární leukémie, do této skupiny patří také M4 eo, varianta s eozinofílií

M5 – akutní monocytární leukémie

M6 – erytroleukémie

M7 – akutní magakaryoblastická leukémie

Typ leukémie	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Přibližné zastoupení	3%	15-20%	25-30%	5-10%	25-30%	6%	3-5%	3%

Tabulka 2. Procento zastoupení jednotlivých subtypů AML (Starý 2002).

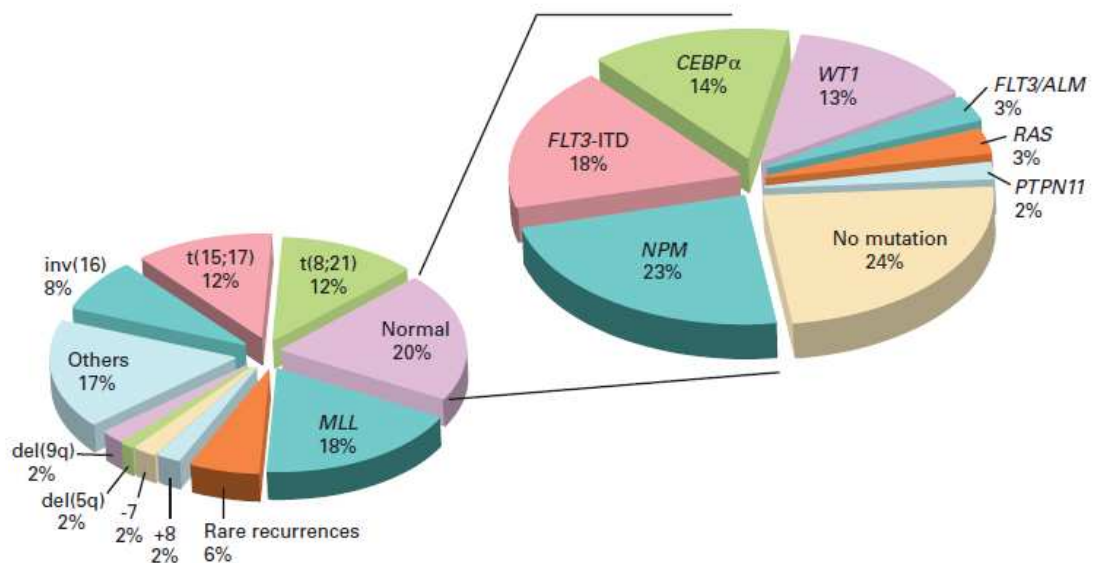
Imunofenotypizace

Na rozdíl od ALL se diagnostika AML opírá zejména o morfolonii. Nicméně můžeme také zde definovat antigeny, které jsou důležitými charakteristickými znaky myeloidní diferenciacce a rovněž jsou důležité pro identifikaci morfologicky nediferencovaných AML. Na časných progenitorech se exprimují znaky CD34, HLA-DR a intracelulární myeloperoxidáza, v dalších časných stádiích znaky CD13, CD33, CD117 a dále antigeny charakteristické pro vývojovou linii např. CD15 a CD65 jako znaky neutrofilních granulocytů, CD14 jako znak monocytů, CD36 a glykoforin jako znak erytroidních buněk a CD41, CD42 a CD61 jako znaky megakaryocytů (Casasnovas, Slimane et al. 2003). Metoda průtokové cytometrie je nezbytná k diagnóze M0 a M7 a v situaci, kdy je obtížné odlišit ALL od AML (L2 versus M1). K diagnóze podtypu M0 je nutná pozitivita jednoho nebo více myeloidních antigenů CD13, CD33 a CD65. U podtypu M7 jsou myeloidní znaky často negativní, ale je nacházena pozitivita megakaryocytárních znaků CD41, CD42 a CD61. U dalších podtypů AML je prokazována pozitivita alespoň jednoho myeloidního znaku (Starý 2002).

2.2.2.2. Genetické abnormality a prognostické faktory

I přes značnou heterogenitu onemocnění AML se ukazuje, že na leukemogenezi se podílejí mutace související s regulací sebeobnovy a diferenciacce buněk. V současné době je u více než 90% dětských AML identifikována alespoň jedna známá genetická změna (Pui, Carroll et al. 2011). K častým genetickým změnám u AML patří

translokace t(8;21), vedoucí ke vzniku fúzního genu AML1/ETO a často související s podtypem M2, dále translokace t(15;17) a fúzní gen PML/RAR α korelující s podtypem M3, inv16(p13;q22) MYH11/CBF β korelující s podtypem M4eo a translokace genu MLL (Pui, Carroll et al. 2011). Mutace, které se podílejí na leukemogenezi, můžeme rozdělit do tří skupin. Jednak mutace genů, které vedou k indukci buněčné proliferace (např. FLT3/ITD, mutace FLT3, c-KIT, RAS, PTPN11), dále mutace v genech, které blokují myeloidní diferenciaci (např. RUNX1, CEBP α , WT1) a geny zapojené do regulace buněčného cyklu a apoptózy (např. P53, NPM1) (Renneville, Roumier et al. 2008).



Obrázek 4. Převzato od Pui et al., 2011. Grafické znázornění zastoupení genetických abnormalit u AML.

CEBP α (CCAAT / enhancer-binding protein α)

Gen CEBP α je lokalizován na 19. chromozomu v oblasti 19q13.1 a obsahuje CG bohatou oblast (až 70%) obsaženou v 1 exonu (Antonson and Xanthopoulos 1995). Kóduje protein patřící do rodiny CCAAT / enhancer-binding proteinů, které se podílejí na regulaci buněčné proliferace a terminální diferenciace. Gen CEBP α kóduje transkripční faktor, který hraje klíčovou roli v diferenciaci do různých buněčných typů, včetně hematopoetických. V hematopoéze hraje CEBP α klíčovou úlohu v časné fázi myeloidní diferenciace, zejména v diferenciaci do myelomonocytárních buněk. (Nerlov 2004). U myeloidních buněk CEBP α transkripčně aktivuje promotory myeloidně-specifických receptorů pro růstové faktory M-CSF, G-CSF a GM-CSF (Zhang, Hetherington et al. 1996, Smith, Hohaus et al. 1996). Strukturně je CEBP α protein veliký 42 kDa se čtyřmi hlavními doménami. V C-terminální oblasti se nachází doména motivu leucinového zipu, podílející se na homo nebo heterodimerizaci, a DNA vazebná doména, která se váže na DNA specifickou sekvenci. V N-terminální oblasti se nachází 2 domény, transaktivační a regulační (TAD1, TAD2). CEBP α je exprimován v počátečních myeloidních prekurzorech a je přítomen v nejvyšším množství v průběhu granulocytární diferenciace. U CEBP α deficientních myší nebyly nalezeny žádné zralé granulocyty, přičemž buňky ostatních linií nebyly postiženy (Zhang, Zhang et al. 1997).

U AML často nalézáme mutace v genu CEBP α . Funkce CEBP α bývá narušena nejen mutacemi, ale i posttranskripční nebo posttranslační inhibicí v důsledku poruchy regulace onkogenů AML1/ETO, MYH11/CBF β nebo FLT3/ITD (Cilloni, Carturan et al. 2003, Pabst, Mueller et al. 2001). V poslední době jsou popisovány také epigenetické modifikace jako hypermethylace promotoru CEBP α , což má za následek umlčení genu CEBP α (Chim, Wong et al. 2002).

2.2.2.3 Léčba a stratifikace AML

V současné době se dětské AML léčí dle nového protokolu AML-BFM 2012. Dle cytogenetického a molekulárně-genetického vyšetření jsou pacienti stratifikováni v den 21 od zahájení léčby do skupin nízkého rizika SR (přítomnost např. AML1/ETO, PML/RAR α , MYH11/CBF β , mutace NPM1, „double mutant“ CEBP α , normální karyotyp), vysokého rizika HR (např. přestavby genu MLL, monosomie 7, mutace WT1, FLT3/ITD, BCR/ABL) a středního rizika IR, kam jsou řazeni všichni pacienti, kteří nebyli stratifikováni do SR nebo HR.

2.2.3 Akutní hybridní leukémie

Ve většině případů je možné díky imunofenotypizaci jednoznačně identifikovat hlavní buněčnou linii leukemických buněk (B-linie, T-linie, myeloidní linie). Nicméně existují případy, kdy není možné jednoznačně určit příslušnost leukemického klonu k jedné buněčné linii a tito pacienti jsou diagnostikováni jako akutní hybridní leukémie (AHL, též nazývané MPAL Mixed Phenotype Acute Leukemia). Pokud u buněk nalzáme expresi antigenů z jiné linie, než z které vycházejí leukemické buňky, označujeme tuto expresi jako aberantní. Přesná příčina je zatím nejasná, podle různých hypotéz je aberantní exprese buď důsledkem deregulované exprese genů v důsledku leukemogeneze (Grimwade, Outram et al. 2002) nebo důsledkem nezralosti leukemických buněk. Podle další teorie odpovídá fenotyp leukemických blastů stádiu fyziologického prekursoru, který má potenciál diferencovat se do různých linií (Greaves, Chan et al. 1986).

AHL představují 3-5 % výskytu všech leukémií (Rubnitz, Onciu et al. 2009). AHL můžeme rozdělit do tří skupin. AHL, kde u primárně definované linie nalzáme aberantní expresi antigenů fyziologicky exprimovaných v jiné linii (Matutes, Morilla et al. 1997), dále leukémie se dvěma různými populacemi definovanými jak imunologicky tak i morfologicky (Weir, Ali Ansari-Lari et al. 2007) a nakonec leukémie, které změní svůj fenotyp do jiné linie před dosažením remise (Bierings, Szczepanski et al. 2001, Krawczuk-Rybak, Zak et al. 2003). Nejčastějším typem AHL jsou leukémie s primárně

definovanou linií a koexpresí antigenů z jiné linie. Jedná se jednak o leukémie primárně vycházející z B-lymfocytární řady s aberantní expresí myeloidních znaků (B/My+), méně často o T-lymfocytární leukémie s koexpresí myeloidních znaků (T/My+) a nejméně častým případem jsou AML s aberantní expresí lymfoidních znaků (My+/Ly+). Leukémie, kdy nalézáme dvě oddělené populace (tzv. bilineární leukémie), jsou velmi vzácné. Rozlišujeme Ly+AML a My+ALL (Matutes, Morilla et al. 1997). Vzácnou situací je také přesmyk z jedné buněčné linie do druhé (tzv. „lineage switch“ ALL, swAL). V literatuře jsou popisovány jednotlivé kazuistiky, jako přesmyk z ALL do AML, a to převážně u pacientů s přestavbou genu MLL (Krawczuk-Rybak, Zak et al. 2003, Stasik, Ganguly et al. 2006) nebo u pacientů s fúzním genem BCR/ABL (Reardon, Hanson et al. 1994). Plasticita fenotypu leukemických buněk v počáteční fázi léčby by mohla ovlivnit spolehlivost imunologické diagnostiky leukémií. Leukemické buňky mohou měnit v průběhu léčby transkripci celé řady genů, což lze pozorovat jednak na základě výsledků expresního profilování (Rhein, Scheid et al. 2007), tak i na úrovni změn imunofenotypových vlastností. Určitou nestabilitu markerů v počáteční fázi léčby lze pozorovat u molekul CD10, CD34, a to ve smyslu poklesu až úplného vymizení, naopak u molekul CD19, CD20, CD45 se může objevit vzestup exprese (Gaipa, Basso et al. 2005). Tyto změny většinou nevedou ke změně klasifikace leukémie, jsou však důležité pro správnou detekci a interpretaci minimální reziduální nemoci (MRN).

Studie naší skupiny zkoumala incidenci jednotlivých typů AHL a primární linii leukemických blastů určenou na základě přítomnosti/nepřítomnosti klonálních přestaveb Ig/TCR (Mejstrikova, Volejnikova et al. 2010). Incidence fenotypu B/My+ byla 28/582 (2%) u leukémií primárně klasifikovaných jako ALL a incidence leukémií s koexpresí myeloidních a lymfoidních znaků u dětí léčených primárně podle schémat AML byla 4/107 (4%). Analýza přestaveb Ig/TCR potvrdila příslušnost k primární linii u všech leukémií primárně z B- a myeloidní řady (přítomnost přestaveb u 20/20 B/My+, chybění u 4/4 My+/Ly+). Naopak, u 3 z 5 AHL uzavřených jako primárně T-ALL (T/My+) jsme nenalezli přestavby TCR; pacienti přesto dobře odpověděli na lymfoidně orientovanou léčbu. Léčebná schémata ALL a AML se značně liší, proto je správně zvolený typ léčby u AHL klíčový pro prognózu pacienta. V této diplomové práci jsme se výzkumně zaměřili na dva vzácné podtypy AHL: swAL a T/My+ AL, především

z hlediska liniové stability (přestavby Ig/TCR) a dále z hlediska genové exprese vybraných genů.

Imunofenotypizace AHL

Při imunologické definici AHL pomocí průtokové cytometrie lze použít již zmíněnou klasifikaci EGIL (Bene, Castoldi et al. 1995). BCP-ALL je definovaná dle adaptované EGIL klasifikace pozitivitou alespoň dvou ze tří antigenů CD19, CD22, CD79a a zároveň musí být negativní na molekuly (intra)CD3, lehké řetězce imunoglobulinu kappa a lambda. U T-ALL musí být pozitivní na (intra)CD3 a CD7. AML je definována pozitivitou alespoň dvou z následujících antigenů CD13, CD33, CD65, CD117, myeloperoxidáza (MPO) se současnou úplnou negativitou (intracelulární, příp. i povrchovou) CD3, CD79a a CD22. AHL jsou definované pomocí klasifikace EGIL, kde jednotlivým antigenům je přiřazeno skóre podle jejich příslušnosti k lymfoidní nebo myeloidní linii. V případě překročení skóre nad 2 je leukémie definovaná jako AHL.

2.2.4 Přestavby imunoreceptorových genů a jejich využití v diagnostice

Antigenně-specifické receptory imunoglobulinů (Ig) u B lymfocytů a T-buněčných receptorů (TCR) u T lymfocytů umožňují specifickou reakci imunitního systému proti celé řadě antigenů a antigenních epitopů. V průběhu diferenciaci B a T lymfocytů dochází k náhodnému přeskupování genů kódujících B-buněčný receptor (BCR) a T-buněčný receptor.

Molekuly imunoglobulinu, sekretované nebo povrchově vázané na B-lymfocytech, se skládají ze dvou těžkých (IgH) a dvou lehkých (IgL) řetězců. Geny kódující těžké řetězce imunoglobulinů (IgH) se nacházejí na 14. chromozomu. V první fázi dochází k přeskupování mezi genovými segmenty D ("diversita"), obsahují 27 úseků, a J ("joining") segmenty, které obsahují 6 úseků. Poté dochází k přeskupování mezi V segmentem, který obsahuje několik desítek úseků, a již vzniklým DJ segmentem. Po přeskupení těžkého řetězce dochází k přeskupování lehkých řetězců, které jsou kódovány buď komplexem kappa (IgK) na 2. chromosomu nebo komplexem

lambda (IgL) na chromosomu 22. Struktura těchto genových komplexů má podobné uspořádání jako IgH, ale neobsahuje D segmenty a skládá se z menšího množství V a J úseků. Takto vzniklé přestavby kódují variabilní oblast imunoglobulinů. Na 3' konci jsou uspořádány genové segmenty kódující konstantní části těžkého řetězce (C), které definují jednotlivé třídy imunoglobulinů. (Matsuda, Ishii et al. 1998, van Dongen and Wolvers Tettero 1991). Pokud dojde k produktivní přestavbě a expresi povrchového imunoglobulinu (IgM), buňka se diferencuje do nezralého B-lymfocyту. V opačném případě hyne apoptózou. Molekula TCR se skládá ze dvou řetězců spojených disulfidickým můstkem. Jsou popsány 2 typy TCR. Receptor TCR $\alpha\beta$, který je složen z řetězců α (TCRA) a β (TCRB), je přítomen na většině zralých lymfocytů v periferní krvi a lymfoidních orgánech (85% až 98%). Oproti tomu receptor TCR $\gamma\delta$ je složen z řetězců γ (TCRG) a δ (TCRD) a představuje jen malé procento zralých T-lymfocytů (van Dongen, Comans Bitter et al. 1990). K přestavbám TCRB a TCRD dochází podobným způsobem jako u IgH, kdy variabilní řetězec je kódován libovolnou kombinací dostupných V, D a J segmentů. TCRA a TCRG stejně jako lehké řetězce imunoglobulinů nemají D segmenty (Davis and Bjorkman 1988). Opět v případě neproduktivní přestavby TCR T-lymfocyt hyne apoptózou. Celý proces rekombinace V-(D)-J genů je zajišťován koordinovanou aktivitou enzymů, které se nacházejí pouze ve vyvíjejících se lymfocytech (recombination activating genes, RAG1, RAG2). Působením dalšího enzymu terminální deoxynukleotidyl transferázy (TdT) jsou mezi jednotlivé úseky navíc vkládány náhodné tzv. N-nukleotidy, což ještě zvyšuje vysokou variabilitu těchto sekvencí (Szczepanski, Orfao et al. 2001).

Pokud dojde u buňky k maligní transformaci, vzniká klon nesoucí identické přestavby Ig nebo TCR. Toho lze využít ke sledování leukemického klonu v průběhu léčby pacienta, tzv. minimální reziduální nemoci (MRN). Proces stanovení MRN pomocí klonálních přestaveb Ig/TCR je poměrně metodicky, časově i finančně náročný, zahrnuje analýzu klonality, sekvenaci nalezených klonálních přestaveb, navržení specifických oligonukleotidů na přechodové hypervariabilní oblasti (ASO), optimalizaci kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) a následné měření MRN v reziduálních vzorcích (viz. Metody). Přes tuto náročnost je v současnosti tento přístup metodou volby u nejmodernějších protokolů pro léčbu ALL (van Dongen, Seriu et al. 1998, Flohr, Schrauder et al. 2008) a v současnosti i dalších malignit lymfoidní řady,

především lymfomu pláštěvé zóny (Pott, Hoster et al. 2010). Naše skupina se podílela od samého počátku na standardizaci této metody a její zavádění do klinické práce. Prokázali jsme, že sledování MRN v rizikové stratifikaci dětské ALL není možné nahradit jinými prognostickými znaky, protože sledování rychlosti odpovědi na léčbu určená pomocí MRN jako jediná spolehlivě identifikuje pacienty s nízkým rizikem relapsu (Fronkova, Mejstrikova et al. 2008). Dále jsme analyzovali MRN pomocí Ig/TCR ve studii zabývající se korelací MRN v periferní krvi (PK) a kostní dřeni (KD) u dětí s ALL. V souladu s předchozími studiemi jsme prokázali, že hladina MRN v PK je ve srovnání s KD velmi variabilní u BCP-ALL a naopak velmi dobře koreluje u T-ALL. Nejdůležitějším zjištěním práce bylo, že u BCP-ALL má přes tuto špatnou korelaci hladina MRN v PK prognostický význam a v 15. dni indukční terapie definuje pacienty s excelentní prognózou (Volejnikova, Mejstrikova et al. 2011)(Příloha II).

Studie používající celogenomové mapování změn DNA na kohortě dětských pacientů s T-ALL ukázala, že absence delecí v gamma lokusu podjednotky TCR, ukazující na nádorovou transformaci lymfocytu ještě před započítím V-(D)-J rekombinace, je spojena s výrazně horší prognózou (Gutierrez, Dahlberg et al. 2010). Ze studie nebylo zcela jasné, jak absence „lymfoidních“ přestaveb souvisela s koexpresí myeloidních znaků (případným T/My+ fenotypem). Není také jasné, zda tento prognostický znak bude mít stejnou výpovědní hodnotu i u pacientů léčených podle jiných protokolů. Otázkám liniové příslušnosti a jejího prognostického významu u leukémií z T řady jsme se věnovali v části Ib.

3. Cíle práce

Dlouhodobým výzkumným záměrem naší laboratoře je výzkum původu, patogeneze, odpovědi na léčbu a prognózy dětských hybridních leukémií. V rámci diplomové práce jsem měla v tomto rozsáhlém projektu následující úkoly:

- I. Pomocí detekce klonálních přestaveb Ig/TCR zjistit liniovou příslušnost
 - a) leukémií s přesmykem z lymfoidní do myeloidní řady (swAL), včetně stanovení přítomnosti těchto lymfoidních markerů v sortovaných blastických i fyziologických populacích buněk v průběhu léčby
 - b) leukémií z T-lymfocytární řady, včetně pacientů s koexpresí T-lymfoidních a myeloidních znaků (T/My+), primárně pro určení prognostického významu přítomnosti/nepřítomnosti lymfoidních přestaveb
- II. Stanovit genovou expresi regulátorů hematopoezy vytipovaných na základě paralelních projektů (expresní profilování, myší model) u swALL leukémií a porovnat ji s úrovní exprese u dalších subtypů akutní leukémie.

4. Materiál a metody

4.1 Analyzovaný materiál

Do této práce byly zahrnuty vzorky kostní dřeně a/nebo periferní krve dětských pacientů s akutní leukémií diagnostikovaných v České republice. Všechny děti byly léčeny dle daného léčebného protokolu v jednotlivých léčebných centrech PSDH ČR (Pracovní skupiny dětské hematologie České republiky). Součástí každého diagnostického vyšetření je odběr vzorku kostní dřeně a periferní krve. Všechny tyto vzorky byly transportovány z jednotlivých center a zpracovány nejpozději do 30 hodin po aspiraci. U všech těchto pacientů byl podepsán zákonnými zástupci informovaný souhlas o poskytnutí vzorků k výzkumným účelům.

4.1.1 Charakteristika souboru pacientů

Celkově bylo v letech 1999-2010 nalezeno 12 pacientů s přesmykem z lymfoidní do myeloidní linie (swAL) z celkově 708 vyšetřených pacientů s BCP-ALL. Klinické charakteristiky pacientů se swAL jsou shrnuty v Tabulce 3. Studie pacientů s T-ALL zahrnovala 111 dětských pacientů s T-ALL diagnostikovanou v letech 1997-2009. Pacienti byli léčeni podle protokolů skupiny BFM.

číslo pacienta	pohlaví	věk	WBC ($\times 10^9/L$)	imunofenotyp	riziková skupina	MRN den 33	MRN týden 12	přežití
swALL01	chlapec	13	15,2	proB	HR	1,50E-03	<10-4	žije v CR1 po SCT
swALL02	chlapec	16	5,9	cALL	HR	2,00E-02	<10-4	žije v CR1 po SCT
swALL03	chlapec	5	35,2	cALL	IR	4,00E-03	<10-4	žije v CR1
swALL04	chlapec	13	14	proB	HR	7,20E-03	nd	žije v CR1 zemřela v
swALL05	dívka	16	97,2	cALL	HR	1,40E-03	nd	relapsu
swALL06	chlapec	9	0,9	cALL	SR	neg	neg	žije v CR1
swALL07	dívka	8	1,26	cALL	IR	4,20E-02	5,20E-04	žije v CR1
swALL08	chlapec	9	2,05	praeB	IR	<10-4	neg	žije v CR1
swALL09	dívka	2	10,75	cALL	IR	<10-4	neg	žije v CR1
swALL10	chlapec	16	1,3	cALL	HR	3,70E-03	<10-4	žije v CR1
swALL11	chlapec	5	46	cALL	HR	5,30E-03	<10-4	žije v CR1
swALL12	dívka	3	3,73	cALL	SR	neg	neg	žije v CR1

Tabulka 3. Klinická charakteristika pacientů s přesmykem z lymfoidní do myeloidní linie během léčby. WBC, white blood cell count, tj. leukocytóza při diagnóze; MRN, minimální reziduální nemoc; HR, vysoké riziko; IR, střední riziko; SR, nízké riziko; CR1, 1. kompletní remise; SCT, transplantace hemopoetických progenitorů

4.2 Metody

4.2.1 Izolace mononukleárních buněk pomocí hustotního gradientu

Mononukleární buňky (lymfocyty, monocyty) jsme separovali centrifugací pomocí hustotního gradientu (Ficoll-Paque).

Použité chemikálie

Ficoll-Paque Research Grade (PharmaTech)

PBS pufr (lékárna FN Motol, ČR), složení PBS pufru:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM Na₂HPO₄·12H₂O

1,4 mM KH₂PO₄

pH 7,4

Použité přístroje

Centrifuga Heraeus Multifuge 3 S-R , 4 místný rotor, vícenásobný nosič 20 x 10/15 ml (DJB Labcare, Velká Británie)

Coulter[®] AcT5[™]diff (Beckman Coulter, USA)

Pracovní postup

- Vzorek kostní dřeně a/nebo periferní krve (odebrané do protisrážlivého roztoku) jsme naředili v poměru 1:1 PBS pufrem.
- Do 14 ml zkumavek jsme odměřili Ficoll Paque (maximálně 7 ml) a opatrně převrstvili stejným množstvím naředěného vzorku (poměr Ficoll Paque a ředěného vzorku je 1:1).
- Poté jsme stáčeli zkumavky na centrifuze 35 minut při 2200 rpm a 4 °C.
- Prstenec mononukleárních buněk, který se vytvořil na rozhraní Ficollu a roztoku, jsme přenesli do zkumavky, do které jsme si předem připravili 5 ml pufru PBS.
- Dále jsme stáčeli zkumavky na centrifuze 10 minut při 2200 rpm a 4 °C, odsáli supernatant a peletu buněk rozpustili v 2 ml pufru PBS.
- Množství buněk jsme počítali na přístroji Coulter[®] AcT 5[™] diff .

- Do malých zkumavek (Eppendorf) jsme odměřili takové množství suspenze buněk, aby obsahovalo ideálně 10^7 buněk (pokud bylo k dispozici menší množství buněk, dávali jsme méně), stáčeli jsme na centrifuze 10 minut při 2200 rpm a 4 °C a poté odsáli pipetou supernatant.
- Peletu buněk jsme uchovávali při teplotě – 80°C.

4.2.2 Izolace celkové RNA z mononukleárních leukocytů – modifikace metody dle Chomczynski a Sacchi (1987) – modifikace dle Trizolu

Pomocí homogenizačního a stabilizačního roztoku jsme získali RNA z leukocytů. Úpravou pH ve vzorku, přidáním fenolu a chloroform-isoamylalkoholu a následným stočením na centrifuze jsme převedli RNA do vodné fáze vzorku (při kyselém pH je RNA ve vodné fázi a DNA ve fenolové fázi, při zásaditém pH je tomu naopak). Odebrali jsme vodnou fázi vzorku a vysráželi RNA pomocí isopropanolu. Následnou centrifugací jsme získali peletu RNA, kterou jsme purifikovali etanolem.

Použité chemikálie

Roztok ITG: 4M Guanidine isothiocyanát (Serva, Německo)

25mM citrát sodný, pH 7 (Serva)

0,5% N-Laurylsarcosine sodium salt (Serva)

2-Merkaptoetanol (Sigma – Aldrich, USA)

2M Acetát sodný, pH4 (lékárna FN Motol)

Fenol (Sigma – Aldrich, USA)

Chloroform-isoamylalkohol (98% chloroformu + 2% isoamylalkoholu – Merk, ČR)

Isopropanol (Merk, ČR)

75% etanol (Merk, ČR)

Použité přístroje

Centrifuga Heraeus Multifuge 3 S-R, rotor AL 24x1.5/2ml (DJB Labcare, Velká Británie)

Vortex Yellow line TTS 2 (IKA, Německo)

Minicentrifuga Labnet-Spectrafuge Mini - stolní centrifuga (Sigma – Aldrich, USA)

Termoblok Labnet – AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet International, Inc., Velká Británie)

Pracovní postup

- Vychladili jsme si centrifugu na 4 °C. Vzorky určené k izolaci jsme ponechávali do poslední chvíle v mrazáku při -20 °C, nesmí rozmrznout.
- Ke zmrzlé peletě buněk jsme přidali 500 µl roztoku ITG s 2-Merkaptoetanol (připraveno předem k 1ml ITG jsme přidávali 7,2 µl 2-Merkaptoetanolu) a dostatečně promíchali na vortexu.
- Roztok jsme inkubovali na ledové lázni 5 minut.
- Přidali jsme 50 µl acetátu sodného pH 4 a opět promíchali na vortexu.
- Dále jsme přidali 455 µl fenolu a 130 µl chloform-isoamylalkoholu a promíchávali do mléčného zakalení.
- Inkubovali jsme 2-3 minuty na ledové lázni.
- Stočili jsme na centrifuze 15 minut při 12 741 rpm a 4 °C.
- Poté jsme odebrali opatrně po 100 µl vodné fáze do sterilních zkumavek a přidali stejný díl isopropanolu (ideálně 500 µl vodné fáze + 500 µl isopropanolu).
- Následně jsme inkubovali 30 minut v mrazáku při -20 °C.
- Poté jsme stočili na centrifuze 15 minut při 12 741 rpm a 4 °C.
- Opatrně jsme slili supernatant a osušili o sterilní filtrační papír a přidali 1 ml 75% etanolu a otočením zkumavky jsme odlepili peletu ode dna zkumavky.
- Stočili jsme na centrifuze 5 minut 10 146 rpm a 4 °C.
- Opět jsme slili supernatant, osušili o sterilní filtrační papír, stočili na stolní centrifuze a pipetou odsáli zbytek etanolu. Zkumavky jsme nechali otevřené 10-15 minut, aby se odpařil zbytek etanolu.
- Peletu jsme rozpouštěli přidáním sterilní vody a postupovali následovně:
 - 10 miliónu buněk – 50 µl vody
 - 4-2 milióny buněk – 25 µl vody
 - méně než 2 milióny buněk – 12 µl vody.

- Jemně jsme promíchali na vortexu a rozpouštěli 10 minut při 55 °C v suchém termobloku.
- RNA jsme skladovali při -80 °C.

4.2.3. Ověření kvality RNA pomocí kapilární elektroforézy na čipu

Přístroj Agilent 2100 Bioanalyzer umožňuje rychlou a kvalitní detekci a kvantifikaci RNA i DNA. Jedná se o kapilární elektroforézu na čipu.

Použité chemikálie

6000 nano marker (Agilent Technologies, USA)

6000 nano dye koncentrát (Agilent Technologies, USA)

RNA 6000 nano gel matrix (Agilent Technologies, USA)

RNA 6000 Nano Ladder – velikostní marker (Agilent Technologies, USA)

Použité přístroje

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA)

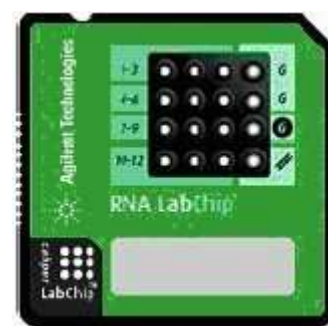
Priming station (HPST)

RNA LabChip (Agilent Technologies, USA)

2100 expert software (Agilent Technologies, USA)

Eppendorf Mini Spin, poloměr rotoru 4,9cm (Eppendorf, Německo)

IKA MS3 Vortexer (Agilent Technologies, USA)

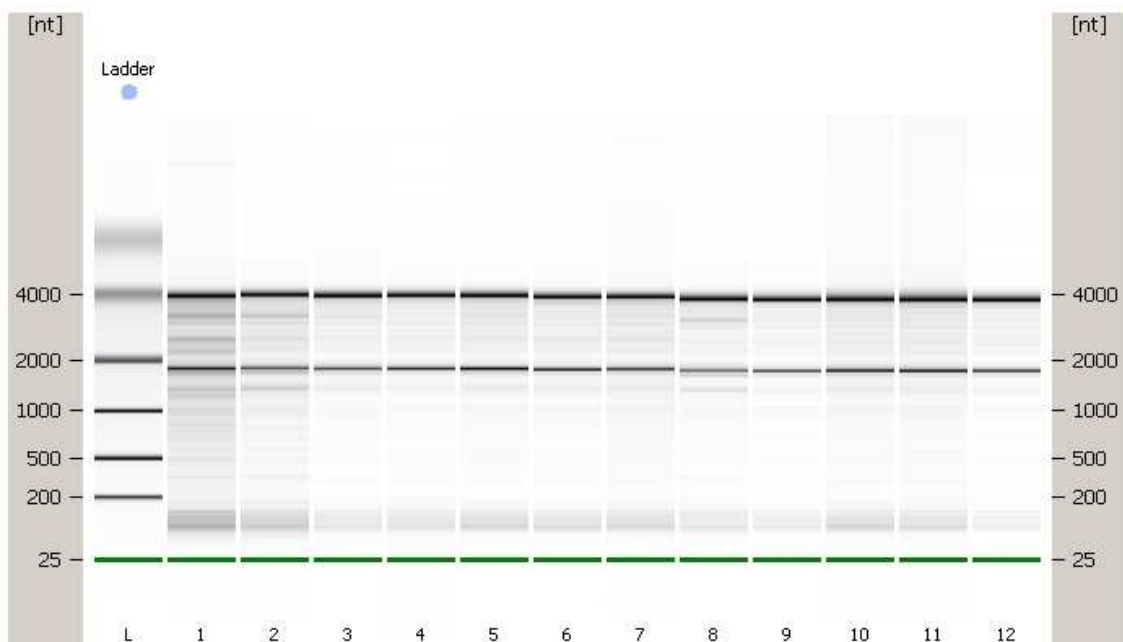


Obrázek 5. RNA čip
(Agilent Technologies).

Pracovní postup

- Vytemperovali jsme všechny reagenty na pokojovou teplotu (minimálně 30 minut).
- Připravili jsme si gel: 550 µl RNA nano gel matrix jsme nanесли na kolonu a stočili na Mini Spinu 10 minut při 4000 rpm (Eppendorf Mini Spin).
- Poté jsme přidali 1 µl RNA 6000 Nano dye koncentrátu do 65 µl připraveného gelu, promíchali a opět stočili na Mini Spinu 10 minut při 14000 rpm.
- Napipetovali jsme 9 µl Gel-Dye mixu do pozice G na RNA čip (viz. obrázek 5).

- Pomocí priming station jsme rozprostřeli gel podtlakem do vnitřní struktury čipu a ponechali 1 minutu a poté uvolnili.
- Do dalších 2 pozic G napipetovali také 9 μ l Gel-Dye mixu.
- Do všech jamek (kromě G) napipetovali 5 μ l 6000 Nano markeru.
- Do všech jamek (kromě G) jsme přidali 1 μ l RNA.
- Do pozice označené žebříčkem jsme přidali velikostní marker (L - Ladder), který jsme před tím denaturovali 2 minuty při 70 °C na suchém bloku.
- Takto připravený čip jsme promíchali na vortexu 1 minutu při 2400 rpm a poté vložili do přístroje Agilent a spustili příslušný program.



Obrázek 6: *Elektroforetické dělení celkové RNA na přístroji Agilent pro kontrolu integrity RNA. Dva jasné „bandy“ představují 18S a 28S části ribozomální RNA, „smear“ představuje ostatní RNA, včetně mRNA. Na pozici „L“ je velikostní marker.*

4.2.4 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces, při němž se podle RNA předlohy syntetizujeme komplementární dvouřetězcová DNA (cDNA). Tento proces je katalyzován RNA-dependentní DNA polymerázou.

Použité chemikálie

iScrip kit (BioRad, USA): 5x iScript Reaction Mix
iScript Reverse Transcriptase
Nuclease-free water

Použité přístroje

Vortex Yellow line TTS 2 (IKA, Německo)

Termobloky Labnet-Accublock TM Digital Dry Bath (Labnet International, Inc., Velká Británie)

Minicentrifuga Labnet-Spectrafuge Mini (Sigma-Aldrich, USA)

- Reagencie 5x iScript Reaction Mix a Nuclease free water jsme nechali rozmraznout na ledové lázni a mezitím jsme si připravili reakční směs pro reverzní transkripci.

Na jednu reakci:

5x iScript Reaction Mix	4 μ l
Nuclease - free water	4 μ l
iScript Reverse Transcriptase	1 μ l

- K 9 μ l připravené reakční směsi jsme přidali 11 μ l RNA a poté inkubovali:
5 minut při 25 °C
30 minut při 42 °C
5 minut při 85 °C
- Takto připravenou komplementární DNA (cDNA) jsme uchovávali při -20°C.

4.2.5 Exprese genu CEBP α (CCAAT/enhancer binding protein α) pomocí metody qRT-PCR

K detekci exprese genu CEBP α jsme využili metodu kvantitativní reverzně-transkriptázovou polymerázovou řetězovou reakci qRT-PCR. Navrhli jsme a optimalizovali systém využívající k detekci PCR produktu SYBR green I. SYBR green I je látka, která se interkaluje do dvouřetězcové DNA (ds DNA), což výrazně zvyšuje fluorescenci této molekuly. Dalšími PCR cykly dochází k exponenciálnímu zvyšování množství ds DNA a tím také roste exponenciálně signál SYBR green I. Nevýhodou této metody je fakt, že se tato barva váže k DNA nespecificky a tak mohou být detekovány i nespecificky amplifikované sekvence a dimery primerů. Z tohoto důvodu jsme u všech vyšetřovaných vzorků provedli analýzu křivky tání, která podle teploty tání T^m amplifikovaného produktu odliší specifický produkt od nespecificky amplifikovaných produktů. K přípravě ředící řady v rozmezí $10^{-1} - 10^{-5}$ jsme využili buněčnou linii KASUMI-1, u které jsme zjistili zvýšenou expresi genu CEBP α . Každý vzorek byl vyšetřen v triplikátu. V rámci optimalizace této metody jsme dosáhli citlivosti 10^{-4} .

Použité chemikálie

Quantitect® SYBR Green PCR Mix 2x (Qiagen, Německo)

BSA Albumin solution from bovine serum (Sigma-Aldrich, USA)

Primery:

CEBP α fw (c=10 μ M) ggAgCTgAgATCCCgACA

CEBP α rev (c= 10 μ M) TTCTAAggACAggCgTggAg

Použité přístroje

Vortex Yellow line TTS 2 (IKA, Německo)

Minicentrifuga Labnet-Spectrafuge Mini (Sigma-Aldrich, USA)

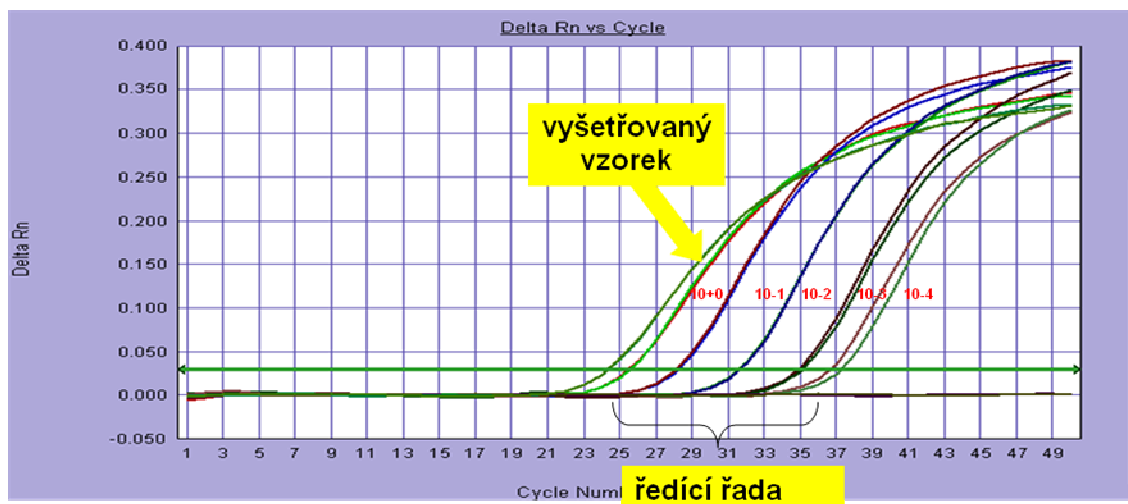
ABI PRISM® 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)

Reakční směs

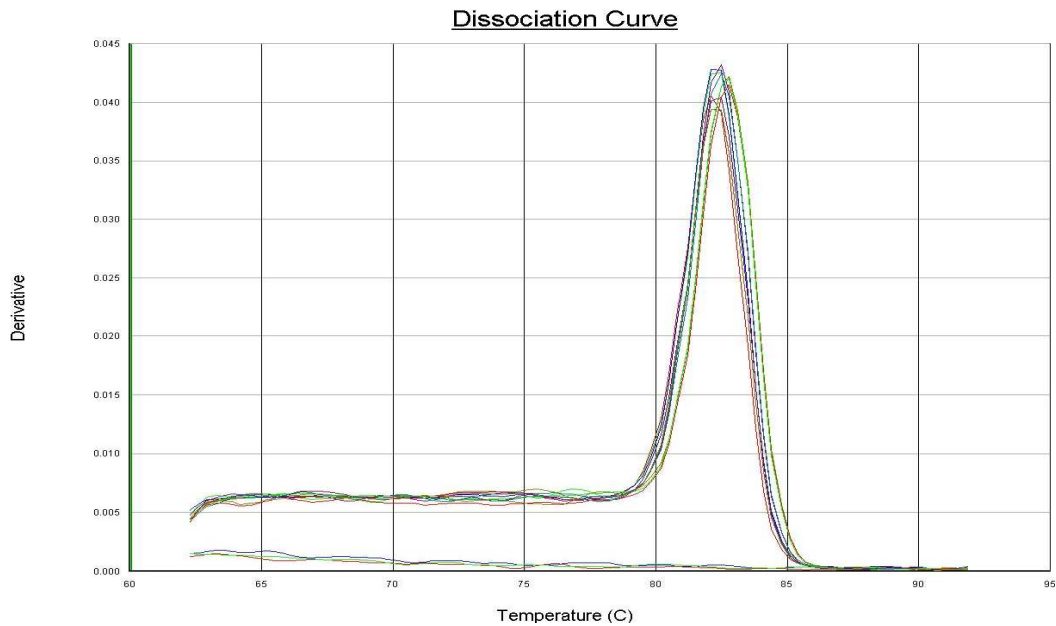
cDNA	1 µl
Quantitect SYBR Green PCR Mix 2x	10 µl
CEBPa fw (10µM)	3 µl
CEBPa rev (10µM)	3 µl
BSA	0,5 µl
voda pro injekce	2,5 µl
<hr/>	
celkem	20 µl

Teplotní režim

1 cyklus	95 °C	15 minut
50 cyklů	94 °C	15 sekund
	63 °C	1 minuta
	15 °C	nekonečno



Obrázek 7: Ředící řada RQ-RT-PCR systému CEBPa ředění 10^{-1} až 10^{-4}



Obrázek 8: Analýza křivky tání k ověření specifické amplifikace. V případě amplifikace genu *CEBP α* je teplota tání T^m amplifikovaného produktu 82 °C.

4.2.6 Stanovení exprese kontrolního genu ABL (Abelson gene) metodou qRT-PCR

Expresi *CEBP α* musí být normalizována k expresi kontrolního genu („housekeeping“ gen). Využily jsme gen ABL, který se nachází na 9. chromozomu v oblasti 9q34.13. Kóduje tyrozinovou kinázu. Normální forma tohoto proteinu se podílí na regulaci buněčného dělení, buněčné adheze a na stresové odpovědi buňky. Gen ABL je přepisován ve všech buňkách a jeho exprese je stabilní. Normalizace ke kontrolnímu genu minimalizuje také rozdílnou kvalitu a kvantitu biologického materiálu, což je dáno jednak izolačními metodami, tak rozdílnou účinností reverzní transkripce. K přípravě ředící řady v rozmezí $10^{-1} - 10^{-4}$ jsme využili opět buněčnou linii KASUMI-1. V této metodě jsme využili hydrolyzační „Taqman“ sondu, která je značena jak fluoroforem tak zhášečem. Pokud je zhášeč v blízkosti sondy, je fluorescence potlačena. Dojde-li však v průběhu elongační fáze k rozštěpení sondy, díky exonukleázové aktivitě DNA polymerázy, dojde k oddálení fluoroforu a zhášeče a fluorofoer může emitovat detekovatelné záření.

Použité chemikálie

TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)

Primery:

ABL F new (c= 10µM)	ctctaagcataactaaaggtgaaaagc
ABL R (c= 10 µM)	gatgtagttgcttgggacca
ABL proba (c= 4 µM)	ccatttttggttgggcttcacaccatt

Použité přístroje

Vortex Yellow line TTS 2 (IKA, Německo)

Minicentrifuga Labnet-Spectrafuge Mini (Sigma-Aldrich, USA)

ABI Prism 7500 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems, USA)

Reakční směs

cDNA	2,00µl
ABL F new (10µM)	1,75 µl
ABL R (10µM)	1,75 µl
ABL proba (4µM)	1,25 µl
2x Taq Man Universal Master Mix	12,5 µl
Voda pro injekce	5,75µl
<hr/>	
Celkem	25,0 µl

Teplotní profil

1 cyklus	95 °C	10 minut
50 cyklů	95 °C	15 sekund
	60 °C	1 minuta
	15 °C	nekonečno

4.2.7 Stanovení exprese cytokinových receptorů CSF1R, CSF2RA a MPL metodou qRT-PCR

Ke stanovení exprese cytokinových receptorů jsme využili předem připravené a zoptimalizované systémy od firmy Applied Biosystems (USA). Expres těchto genů byla opět normalizována na kontrolní gen ABL. K přípravě ředící řady jsme využili cDNA pacienta, u které jsme změřili nejvyšší expresi těchto genů. U systémů CSF1R, CSF2RA jsme dosáhli citlivosti 10^{-5} , v případě systému MPL citlivosti 10^{-4} .

Použité chemikálie

TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)

TaqMan® Gene Expression Assays CSF1R, CSF2RA, MPL (Applied Biosystems, USA)

Použité přístroje

Vortex Yellow line TTS 2 (IKA, Německo)

Minicentrifuga Labnet-Spectrafuge Mini (Sigma-Aldrich, USA)

ABI PRISM® 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)

Reakční směs

cDNA	2,00 µl
TaqMan® Gene Expression Assays	1,00 µl
2x TaqMan® Universal Master Mix	10,0 µl
Voda pro injekce	7,0 µl
<hr/>	
Celkem	25,0 µl

Teplotní profil

1 cyklus	50 °C	2 minuty
1 cyklus	95 °C	10 minut
50 cyklů	95 °C	15 sekund
	60 °C	1 minuta
	15 °C	nekonečno

4.2.8. Screening přestaveb genů pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TCR) a stanovení MRN

Tato komplexní metodika využívá toho, že leukemické buňky vzniklé transformací z jednoho lymfocytárního prekurzoru nesou identické přestavby Ig/TCR, které lze využít ke sledování leukemického klonu v průběhu léčby. Celá metodika zahrnuje následující kroky:

Izolace mononukleárních buněk

Izolace DNA

Screening a stanovení klonality přestaveb Ig/TCR

Navržení ASO primerů na základě přechodové sekvence

Optimalizace pacient-specifické qPCR

Stanovení MRN a interpretace výsledků

Izolace mononukleárních buněk

Metoda popsána v 4.2.1.

Izolace DNA

K izolaci DNA jsme využili QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Německo). Tento kit využíváme, pokud máme dostatečný počet buněk (2-10 miliónů (M) v aliquotu). Pokud máme buněk méně, využijeme QIAamp DNA Blood Micro Kit. Tyto kity slouží k izolaci z DNA pomocí kolon s křemičitou membránou. Vzorek je lyzován lyzačním roztokem, v dalším kroku dojde k navázání DNA z lyzátu na membránu kolony, promytí membrány s následnou elucí DNA z membrány.

Použité přístroje

Vortex Yellow line TTS 2 (IKA, Německo)

Eppendorf Mini Spin, poloměr rotoru 4,9cm (Eppendorf, Německo)

Minicentrifuga Labnet-Spectrafuge Mini (Sigma-Aldrich, USA)

Termoblok Labnet-Accublock TM Digital Dry Bath (Labnet International, Inc., VB)

Použité chemikálie

QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Německo)

AL – lyzační roztok (součást kitu)

Proteáza (součást kitu)

AW1, AW2 – promývací pufry (součást kitu)

AE – eluční pufr (součást kitu)

PBS pufr, 96% etanol

- K rozmrzlé peletě buněk (10M-2M) jsme přidali 200 µl PBS pufru vytemperovaného na pokojovou teplotu a promíchávali na vortexu.
- Přidali jsme 200 µl AL pufru a 20 µl proteasy a přerušovaně vortexovali 15 sekund.
- Poté jsme inkubovali 10 minut při 56 °C v suchém termobloku.
- Přidali jsme 200 µl etanolu a přerušovaně vortexovali 15 sekund.
- Suspenzi jsme přenesli na křemičitou kolonu (součásti kitu) a stáčeli na Mini Spinu 1 minutu při 6000 rpm.
- Proteklou část jsme vylili do odpadu a na kolonu přidali 500 µl pufru AW1 a opět stáčeli na Mini Spinu 1 minutu 6000 rpm.
- Proteklou část vylejeme a přidali 500 µl pufru AW2 a stáčeli na Mini Spinu 3 minuty při 13400 rpm.
- Kolonu jsme přenesli do čisté zkumavky a přidali 100 AE (elučního) pufru a inkubovali 1 minutu při pokojové teplotě.
- Poté jsme stáčeli kolonu 1 minutu při 13400 rpm a eluovanou DNA jsme uchovávali při -20 °C.

Screening a stanovení klonality přestaveb Ig/TCR

Kombinace primerů používaných pro vyhledávání přestaveb Ig/TCR genů v diagnostických vzorcích pacientů s ALL:

pro BCP-ALL jsme vyšetřili: ne/kompletní V-(D)-J přestavby těžkých řetězců imunoglobulinů (IgH), delece lehkého řetězce kappa (IGK), nekompletní přestavby T-buněčného receptoru delta (TCR δ), přestavby T-buněčného receptoru gama (TCR γ).

Kompletní IGH: VH1/7-JHcons, VH2-JHcons, VH3-JHcons, VH4-JHcons, VH5-JHcons;

nekompletní IGH: DH1- JHcons, DH2- JHcons, DH3- JHcons, DH4- JHcons, DH5- JHcons, DH6- JHcons (v multiplexu DH1-6-JHcons), DH7- JHcons;

nekompletní TCR δ : V δ 2-D δ 3, D δ 2-D δ 3;

TCR γ : V γ I-J γ 1.1, V γ I-J γ 1.3, V γ II-J γ 1.1, V γ II-J γ 1.3, V γ IV-J γ 1.1, V γ IV-J γ 1.3

pro T-ALL jsme vyšetřili: kompletní i nekompletní přestavby T-buněčného receptoru delta (TCR δ), přestavby T-buněčného receptoru gama (TCR γ), přestavby T-buněčného receptoru beta (TCR β). U T-ALL je součástí panelu i hodnocení přítomnosti delece 1p32 ([del(1p)] vedoucí k fúznímu genu SIL-TAL1.

TCR δ : Vd1-Jd1.3, Vd2-Jd1.3, Vd2-Dd3, Vd3-Jd1.3, Dd2-Jd1.3, Dd2-Dd3;

TCR γ : VgI-Jg1.1, VgI-Jg1.3, VgII-Jg1.2, VgII-Jg1.3, VgIII-Jg1.3, VgIV-Jg1.1, VgIV-Jg1.3;

TCR β : 3x multiplexní směs dle BIOMED II

SIL/TAL1: Sild5-Tal1db1-3', Sild5-Tal1db2-3'

Všechny primery byly publikovány skupinou BIOMED-I (Pongers-Willemse, Seriu et al. 1999) nebo BIOMED-II (van Dongen, Langerak et al. 2003).

Použité chemikálie

10x PCR buffer II (Applied Biosystems, USA)

MgCl₂ 25mM (Applied Biosystems, USA)

AmpliTaq Gold DNA polymeráza, 5 U/ μ l (Applied Biosystems, USA)

dNTP mix 10 mM (Applied Biosystems, USA)

Použité přístroje

iCycler IQTM (Applied Biosystems, USA)

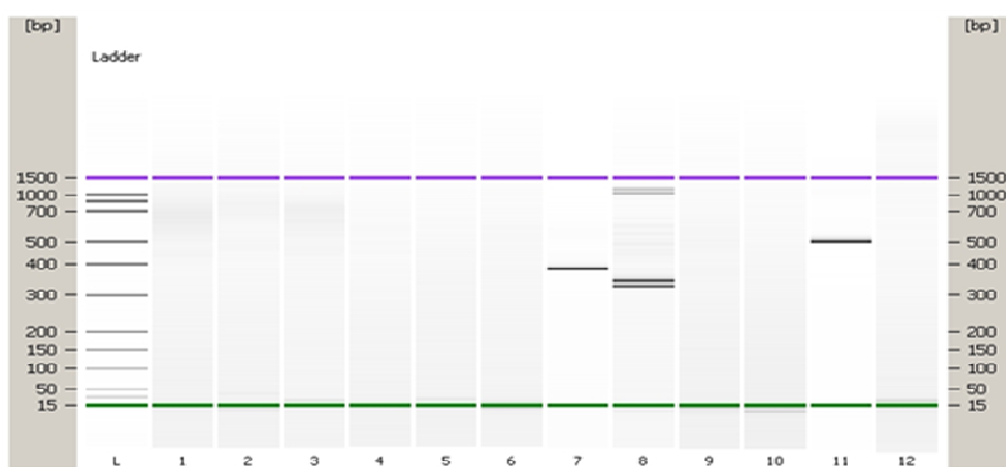
Teplotní profil

1 cyklus	50 °C	2 minuty
1 cyklus	95 °C	10 minut
50 cyklů	95 °C	15 sekund
	60 °C	1 minuta
	15 °C	nekonečno

Reakční směs

gDNA	0,5 µl
10x PCR buffer II	2,5 µl
MgCl ₂ 25mM	1,5 µl
dNTP mix	2,0 µl
AmpliTaq Gold® DNA polymeráza (5 U/µl)	0,2 µl
Primery (každého 0,625 µl)	1,25 µl
Voda pro injekce	17,05µl
<hr/>	
Celkem	25,0 µl

Analýzou produktů PCR na přístroji Agilent (metoda popsána v 4.2.3. s využitím Agilent DNA 1000 kit) jsme zjistili, ve kterém systému je daný vzorek mono-, bi-, oligo-, případně polyklonální (Obrázek 9).



Obrázek 9: Výsledek screeningu přestaveb Ig/TCR detekovaných na přístroji Agilent. Na pozici „7“ je vidět monoklonální přestavba VH2-JHcons (délka amplikonu 380 bp), na pozici „8“ biklonální přestavby VH3-JHcons a na pozici „11“ Vδ2-Dδ (délka amplikonu 501 bp).

Vybrané monoklonální přestavby jsme přečistili pomocí kitu MinElute PCR Purification kit (Qiagen, Německo) podle návodu výrobce a následně ve spolupráci s Ústavem lékařské biologie a genetiky ve Fakultní nemocnici v Motole jsme sekvenovali na přístroji ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Navržení ASO primerů na základě přechodové sekvence

Vyhodnocování sekvencí Ig/TCR jsme prováděli pomocí programu VECTOR NTI 8 Suite Software (INFORMAX, Bethesda, MD, USA). Sekvence jsme porovnávali s databázemi dostupnými na internetu:

IMGT (<http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>)

NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)

Ig-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>).

Označili jsme přechodové V-(D)-J oblasti a navrhli ASO primery tak, aby minimálně 4-5 nukleotidů v 3' oblasti zasahovalo do specifického N-segmentu přestavby. Reverzní primery a fluorescenčně značené sondy jsme používali společně pro daný segment. ASO primery by měly mít podobnou teplotu tání (T^m) jako reverzní primery (cca 55°C) o cca 10°C nižší T^m než sondy. Primery jsme navrhovali o délce 18-25 nukleotidů a u každého z nich jsme zkontrolovali tvorbu dimerů nebo vlásenek.

Optimalizace pacient-specifické qPCR

Při optimalizaci qPCR jsme se snažili dosáhnout co největší sensitivity a specifity systému. Využívali jsme k tomu různé koncentrace primerů či různé změny annealingové teploty. Určitou komplikací u kvantifikace genu pro imunoglobuliny a T- buněčné receptory je fakt, že tyto geny se mohou vyskytovat také u fyziologických lymfocytů. Z tohoto důvodu bylo nezbytnou součástí optimalizací a následného vyšetření i negativní kontrola. Využívali jsme DNA izolovanou z periferních krví dárců (nejméně 6 dárců, tzv. "buffy coat", BC), která nám pomohla eliminovat případný falešně pozitivní výsledek.

Použité přístroje

iCycler IQ™ Real-Time PCR Detection System (Biorad, USA)

ABI PRISM® 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)

Použité reagensie

TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)

Forward primer (10pmol/μl)

Reverse primer (10pmol/μl)

TaqMan probe (4pmol/μl)

BSA (10mg/ml)

Sekvence reverzních primerů a sond byly publikovány Evropskou pracovní skupinou pro ALL ESG-MRD-ALL (Szczepanski, Willemse et al. 2001; van der Velden, Wijkhuijs et al. 2002; van der Velden, Willemse et al. 2002; van der Velden, Bruggemann et al. 2004)

Reverzní primery:

IgH:R-JH1-intron, R-JH2-intron, R-JH3-intron, R-JH4-intron, R-JH5-intron, R-JH6-intron

TCRγ:R-JG1.1/2.1-cons1, R-JG1.3/2.3-cons2

TCRδ:R-DD3-cons4, R-JD1-cons1, R-JD1-cons2

IGK-Kde:R-KDE-cons2

Sondy (hydrolyzační):

IGH: T-JH1.2.4.5-cons1, T-JH3-cons1, T-JH6-cons2

TCRγ:T-JG1.3/2.3-cons3, Tr-JG1.1/2.1-cons1

TCRδ:T-DD3-cons2, T-JD1-cons1

IGK-Kde:T-KDE-cons1

V případě SIL/TAL1 používáme primery: F-sil1db1-cons1, sTal1db1-3' a sondu Tr-TAL-cons1.

Při optimalizaci systému jsme vytvořili ředící řadu z patientské diagnostické DNA, ředili jsme do DNA z BC („Buffy Coatu“). Z důvodů variability kvality DNA diagnostických a reziduálních vzorků jsme nejprve stanovili množství kontrolního genu. V naší laboratoři využíváme pro kontrolu kvality DNA gen albumin. Součástí optimalizační reakce byl pacient-specifický ASO primer, příslušný reverzní primer pro danou přestavbu a sonda. Pro každou přestavbu jsme optimalizovali minimálně 2 primery a vybrali si ten, který dosahoval nejlepší sensitivity a specifity. Kritéria **pro senzitivitu qPCR** (van der Velden, Cazzaniga et al. 2007): Ct (Ct - crossing point, threshold cycles) = cyklus ve kterém fluorescence překročí hodnotu pozadí, jeho hodnota stoupá s klesající koncentrací templátu ve vzorku.

Senzitivitou PCR je nejnižší ředění, které se

- specificky amplifikuje (má dobré amplifikační křivky)
- má nejméně jeden vzorek z replikátu pozitivní, rozdíl Ct („threshold cycle“) replikátů nerozhoduje
- má nejnižší hodnotu Ct $\geq 1,0$ nižší než nejnižší hodnota pozadí
- má nejnižší Ct < 20 cyklů od Ct neřaděného vzorku nebo od interceptu standardní křivky

Kritéria pro rozmezí kvantifikovatelnosti qPCR (quantitative range, QR):

Nejnižší ředění QR:

- se specificky amplifikuje (dobré amplifikační křivky)
- rozdíl Ct replikátů $\leq 1,5$
- musí mít všechny Ct $\geq 3,0$ nižší než nejnižší hodnota pozadí
- má průměrnou hodnotu Ct v určitém rozmezí od průměrné hodnoty Ct předchozího ředění: 2,6 - 4,0 Ct mezi desetinásobným ředěním (př. 10^{-3} - 10^{-4}) a 0,5 - 1,5 Ct mezi dvounásobným ředěním (př. 10^{-3} - 5×10^{-4})

Teoreticky by se Ct hodnoty neřaděného a dvakrát zředěného vzorku měly lišit o jeden, zatímco rozdíl mezi neřaděným a 10 - násobně zředěným vzorkem by měl být 3,3. V

důsledku toho, sklon (slope) kalibrační křivky (pomocí 10log stupnice pro ředění) by se měl blížit k 3,3. Vynesením Ct hodnoty neznámého vzorku na kalibrační křivku lze vypočítat množství cílové sekvence ve vzorku (Van Der Velden, Hochhaus et al. 2003). Sklon („slope“) křivky požadovaný pravidly ESG-MRD-ALL je 3,1-3,9.

Stanovení MRN a interpretace výsledků

Vzorek mohl být kvantifikován, pokud

- Průměrná Ct hodnota replikátů je \leq nejvyšší Ct rozmezí kvantifikovatelnosti a Δ Ct replikátů vzorku je ≤ 1.5 .
- Pokud je průměrná Ct hodnota replikátů \geq nejvyšší Ct rozmezí kvantifikovatelnosti, hodnotí se vzorek pouze jako "pozitivní".

Vzorek je stanoven za pozitivní, pokud:

- Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je v rozmezí 4 cyklů od senzitivity systému

Současně, vzhledem k možnosti vzniku falešné positivity, platí jedno ze dvou následujících pravidel s ohledem na to, pro jaké klinické aplikace bude výsledek použit:

- a) Při použití pro aplikace, kde je třeba se vyhnout falešné negativitě, například z důvodů redukce léčby MRN negativních pacientů, je vzorek pokládán za pozitivní, pokud Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je ≥ 1.0 nižší než nejnižší Ct pozadí.
- b) Při použití pro aplikace, kde je třeba se vyhnout falešné pozitivitě, například z důvodu nasazení infúze dárcovských T-lymfocytů (DLI) po transplantaci kostní dřeně, je vzorek pokládán za pozitivní, pokud Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je ≥ 3.0 nižší než nejnižší Ct pozadí (Froňková and Trka 2005).

Hodnoty MRN mimo QR, které jsou v klinické praxi vyjádřeny jako "pozitivní, nekvantifikovatelné", byly za účelem statistické analýzy vyjádřeny číselně.

4.2.9 Průtoková cytometrie a sortování buněčných populací

Průtoková cytometrie je jednou ze základních metod využívajících se k diagnostice leukémii. Všechna cytometrická vyšetření a sortovací experimenty prezentované v této práci byly provedeny kolektivem pracovníků v laboratoři CLIP-cytometrie (2.lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Fakultní nemocnice Motol) na přístrojích Flow cytometer-sorter BD FACS Aria III (BD Biosciences, San Jose CA, USA), Cyan ADP flow cytometer (Dako, Glostrup, Dánsko) a BD LSR 2 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose CA, USA) pod odborným dohledem MUDr. Ester Mejstříkové, PhD.

4.3 Statistická analýza

Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí softwaru StatView® verze 5.0 (StatView® Software, Cary, NC) nebo Statistica (Statsoft, Tulsa, USA). Rozdíly mezi skupinami s kontinuálními proměnnými byly analyzovány pomocí testu Mann-Whitney, rozdíly v četnosti jednotlivých proměnných byly analyzovány pomocí Fisherova exaktního testu. Analýza přežití bez události („event-free survival“, EFS) byla ilustrována pomocí Kaplan-Meyerových křivek přežití a rozdíl v přežití jednotlivých skupin analyzován pomocí log-rank testu.

5. Výsledky

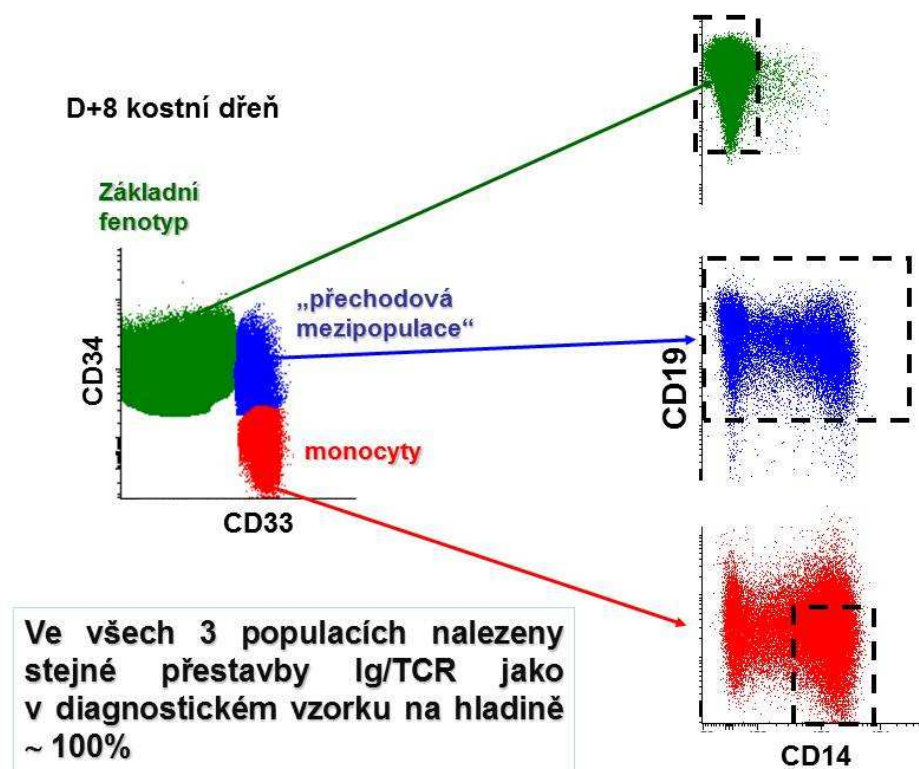
5.1. Výsledky I: Určení liniové příslušnosti podle přítomnosti klonálních přestaveb Ig/TCR

5.1.1. Liniová příslušnost u leukémií s přesmykem z lymfoidní do myeloidní linie během léčby

Podrobný algoritmus, který sloužil k odhalení pacientů se swALL pomocí průtokové cytometrie, je popsán v připravovaném rukopisu (Příloha I); imunofenotypizace nebyla součástí této diplomové práce. Ve stručnosti se při diagnóze se jednalo o případy „klasické“ ALL bez výrazné koexprese myeloidních znaků. V průběhu léčby došlo mezi prvním a 33. dnem léčby (konec indukční terapie) k výraznému vzestupu atypických monocytoidních buněk. Tito pacienti se lišili od tzv. bilineární leukémie, která má přítomnou myeloidní blastickou populaci již při diagnóze. Analyzovali jsme materiál 11 pacientů, kteří prodělali přesmyk z lymfoidní do myeloidní linie během prvního měsíce indukční léčby ALL, a dále materiál pacientky, která prodělala časný relaps ALL ve formě „sekundární AML“ 6 měsíců od diagnózy ALL (swALL05). U všech případů swAL jsme objevili alespoň jednu klonální přestavbu Ig/TCR, která umožňovala zavedení pacient-specifické qPCR pro sledování původního leukemického klonu (Tabulka 4). Z 11 pacientů mělo v 33. dni indukční terapie velmi vysokou reziduální nemoc ($\geq 10^{-3}$) a 4 pacienti nízkou (pod 10^{-4}) nebo negativní MRN (Tabulka 3). Nápadná byla výrazná diskrepance mezi vysokou MRN pomocí qPCR a nízkým procentem původních „lymfoidních“ buněk zjištěných pomocí PC. Celkově bylo pro sortování buněk k dispozici 36 vzorků z diagnózy, dnů 8, 15 a 33. Obrázek 10 ukazuje příklad sortu buněk z 8. dne léčby u vzorku s přítomností původního „lymfoidního“ klonu, „přechodové“ populace a populace monocytoidních buněk. Ve všech třech subpopulacích jsme našli přestavbu IGH identickou s diagnostickým klonem ve zhruba 100% buněk dané subpopulace (po vztažení na kvalitu izolované DNA) Celkově byly klonálně-specifické přestavby Ig/TCR identické s diagnostickým klonem ALL detekovány v 16/21 (76%) vzorků sortovaných monocytoidních buněk (Tabulka 4).

Tabulka 4: Nalezené klonální přestavby genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory v diagnostických vzorcích swALL a v sortovaných „monocytoidních“ buňkách. N/A, nebylo analyzováno; MRN, minimální reziduální nemoc; KD, kostní dřeň, PK, periferní krev

Oproti tomu, sortované monocytoidní buňky CD2-negativních BCP-ALL obsahovaly identické klonální přestavby pouze v jednom z 15 vzorků (7%).



Obrázek 10: Schéma sortování tří buněčných subpopulací ve vzorku swALL z 8. dne léčby. Zeleně: základní fenotyp shodný s diagnostickým; modře: přechodová populace; červeně: monocytoidní buňky. Ve všech subpopulacích jsme po izolaci DNA detekovali klonální přestavbu IGH shodnou s přestavbou diagnostického klonu ALL.

U pacientky se „sekundární“ AML 6 měsíců po diagnóze ALL nebyly k dispozici vzorky z průběhu léčby ALL pro sortování buněk. Ve vzorku AML jsme ale našli přestavby imunoreceptorových genů identické s diagnostickými, jednalo se tedy o

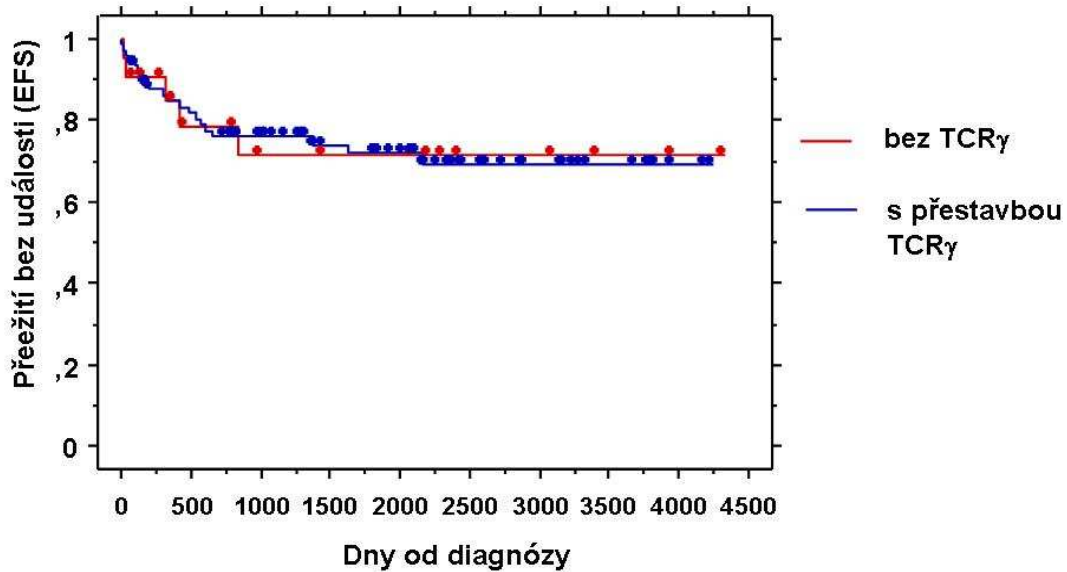
klonální vývoj těžé leukémie z ALL do AML. Celkově jsme u všech 12 pacientů pomocí přestaveb Ig/TCR potvrdili, že monocytoidní buňky jsou derivovány z původního lymfoidního klonu, a to buď přímo (přítomnost lymfoidních přestaveb v sortovaných monocytech) nebo nepřímo (MRN v nesortovaném vzorku stanovená pomocí kvantifikace Ig/TCR byla minimálně o řád vyšší než frekvence B-lymfoblastů stanovená pomocí PC).

Paralelně probíhající studie (cytogenetika, celogenomové mapování změn DNA, expresní profilování dosud nenalezly společný znak těchto leukémií, který by vysvětlil fenomén změny linie leukémie během léčby. Jediným znakem, který se signifikantně častěji vyskytoval u swALL, byla alterace genu Ikaros (IKZF1) u 5 z 12 pacientů (oproti 17 ze 150 běžným BCP-ALL, $p=0.01$). Pilotní studie genové exprese klíčových regulátorů hematopoiezy naznačila rozdíly v expresi genu CEBPa. Stanovení exprese tohoto genu je věnována poslední část diplomové práce.

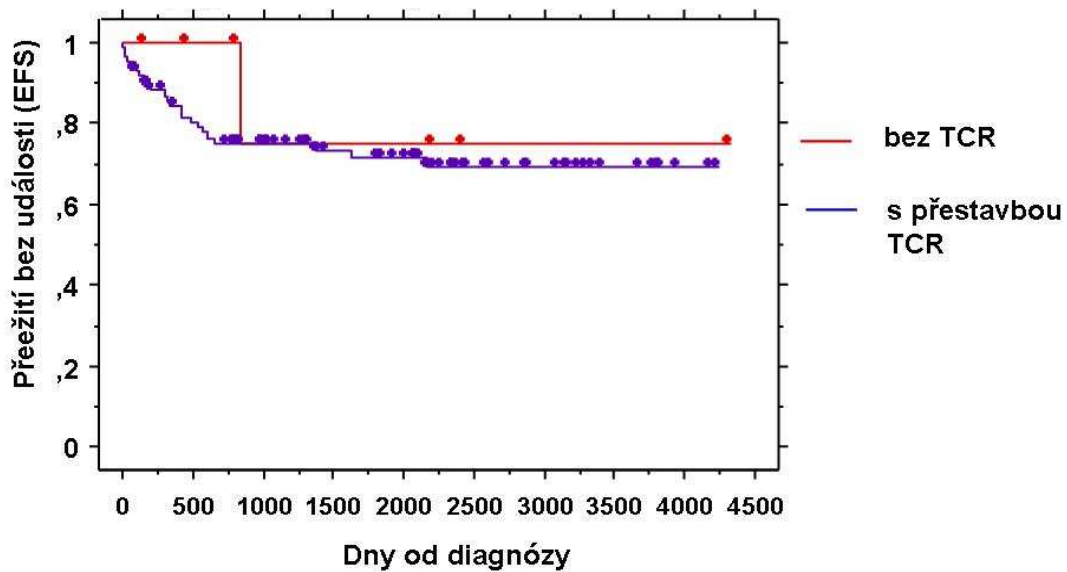
5.1.2. Liniová příslušnost u leukémií z T-lymfocytární řady

V letech 1997-2009 bylo v laboratořích CLIP diagnostikováno celkem 111 dětských pacientů s T-ALL. U 96 pacientů byla k dispozici DNA z diagnostického vzorku KD. U nich jsme vyšetřili přítomnost klonálních přestaveb TCR γ (VgI-Jg1.1, VgI-Jg1.3, VgII-Jg1.2, VgII-Jg1.3, VgIII-Jg1.3, VgIV-Jg1.1, VgIV-Jg1.3). Toto spektrum pokrývá cca 99% přestaveb TCR γ vyskytujících se u ALL. Naše metoda by tedy při podstatně nižších nákladech měla zachytit velmi podobné spektrum pacientů jako detekce delecí v lokusu TCR γ pomocí celogenomového mapování změn DNA pomocí „array CGH“, která byla popsána ve výše zmíněné studii (Gutierrez, Dahlberg et al. 2010).

Absenci přestaveb TCR γ jsme prokázali u 21 z 96 pacientů (22%), což byl podobný výsledek jako u americké studie (8/47, 17%). U 17/22 pacientů bez přestaveb TCR γ jsme navíc vyšetřili přestavby dalších segmentů TCR (TCR β a TCR δ). 10 ze 17 těchto pacientů mělo alespoň jednu z těchto přestaveb. Ani chybění přestaveb TCR γ , ani celkové chybění přestaveb TCR nemělo u naší kohorty prognostický význam. Pro pacienty s chybějícími přestavbami TCR γ bylo 5-leté přežití bez události (EFS) $72\pm 11\%$ vs. $72\pm 6\%$ pro ostatní pacienty (obrázek 11). Pro skupinu bez jakékoli přestavby TCR bylo 5-leté EFS $75\pm 22\%$ vs. $71\pm 5\%$ pro ostatní pacienty s T-ALL (Obrázek 12). Deset pacientů bylo dle klasifikace EGIL označeno jako hybridní (T/My+) ALL. Z nich podle očekávání větší část (7 z 9) neměla přestavby TCR γ ; jejich prognóza byla ale opět srovnatelná s celkovou kohortou T-ALL.



Obrázek 11: Přežití bez události (EFS) v závislosti na přítomnosti klonálních přestaveb TCR γ . TCR γ , T-buněčný receptor gamma.

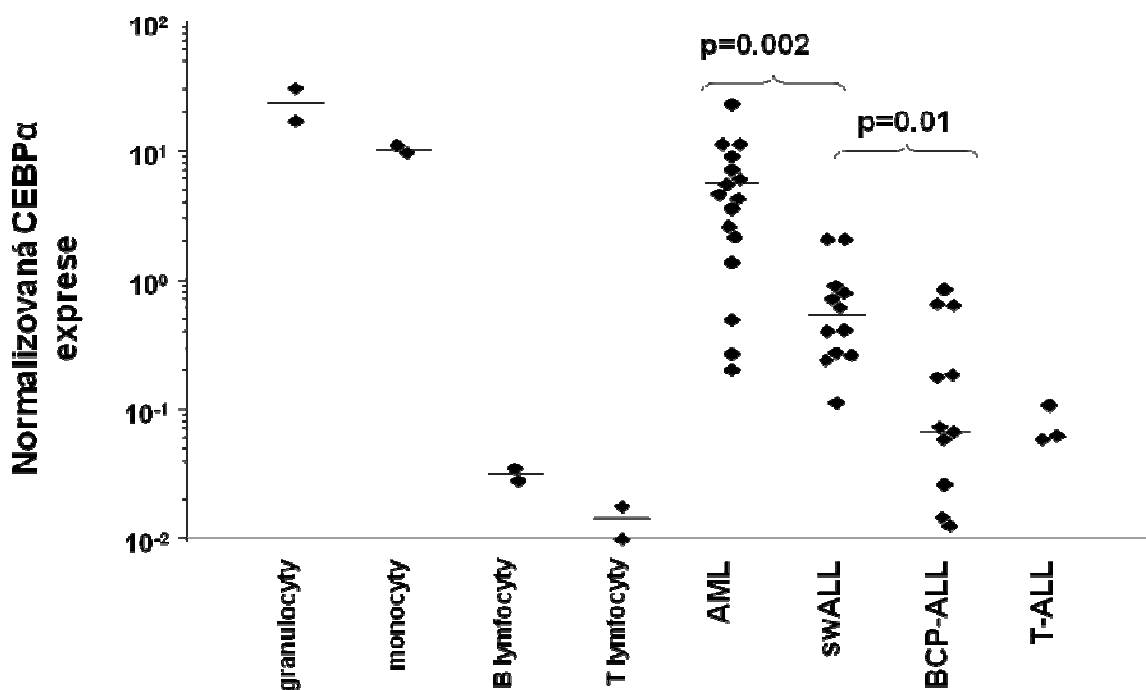


Obrázek 12: Přežití bez události (EFS) v závislosti na přítomnosti klonálních přestaveb TCR. TCR, T-buněčný receptor.

5.2. Výsledky II: Expresse vybraných genů u hybridních leukémií

5.2.1. Expresse genu CEBP α

Expresi genu CEBP α jsme vyšetřili u 12 pacientů s liniovým přesmykem (swALL). Jako kontrolní skupiny jsme vyšetřili skupinu 16 pacientů s AML, 11 pacientů s BCP-ALL a 3 pacienty s T-ALL. Fyziologické buněčné populace byly sortovány z kontrolních remisních vzorků periferní krve (PB) pomocí následující charakteristiky: monocyty (CD14), granulocyty (CD45), B lymfocyty (CD19) a T lymfocyty (CD3). Expresse CEBP α byla poměrně velmi nízká ve skupině BCP-ALL a na podobné úrovni exprese jsou i sortované B a T lymfocyty. Expresse CEBP α byla výrazně vyšší ve skupině swALL oproti BCP-ALL ($p=0,01$) a nižší než u AML ($p=0,002$, Obrázek 13).

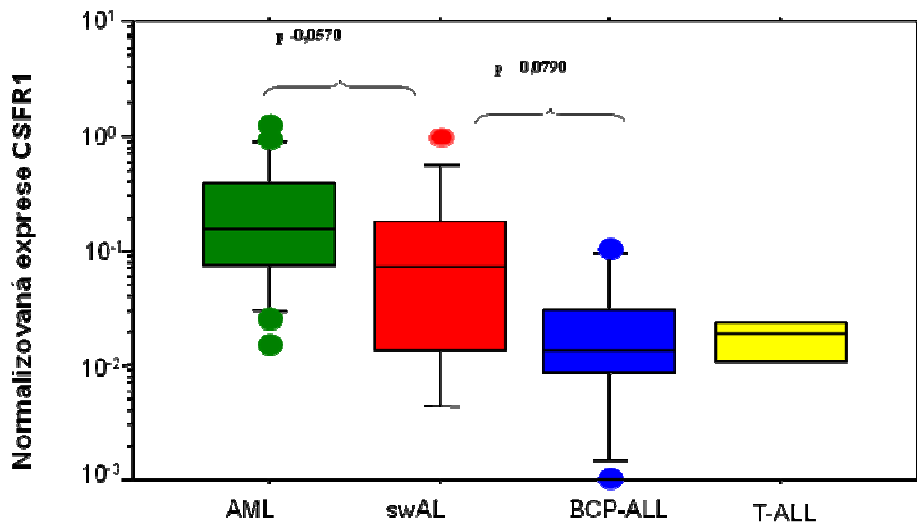


Obrázek 13: Expresse genu CEBP α ve skupinách pacientů s liniovým přesmykem (swALL), BCP-ALL, T-ALL, AML a fyziologických populacích granulocytů, monocytů, B-lymfocytů a T-lymfocytů.

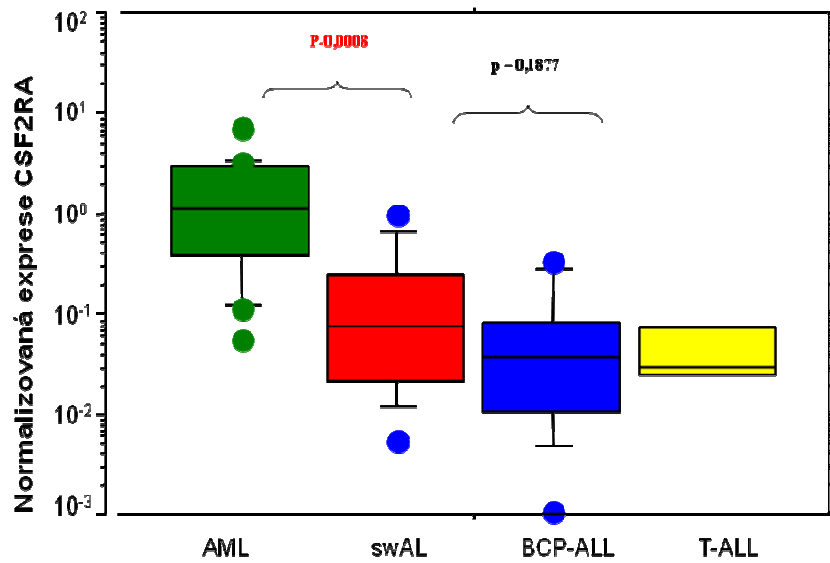
Probíhající paralelní metylační studie u swALL naznačují, že zvýšená exprese genu je pravděpodobně způsobena demethylací promotoru CEBP α , což je znak odlišující swALL v době diagnózy od většiny leukémií z B řady a řadící ji podle této charakteristiky spíše k AML.

5.2.2. Exprese cytokinových receptorů CSF1R, CSF2RA a MPL

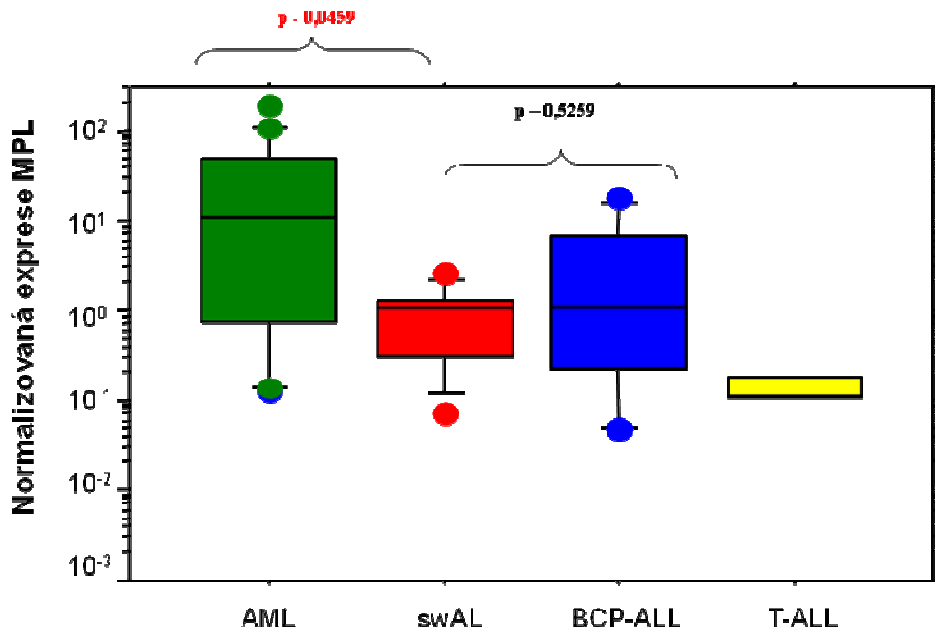
V průběhu *in vivo* experimentů, kdy se kolegyně MUDr. Lucie Slámová snažila v laboratoři Prof. Bourquina v Curychu o rekapitulaci liniového přesmyku a amplifikaci vzácného materiálu swALL v NOD-SCID IL2Rgamma^{null} (NSG) myších, bylo zjištěno, že buňky transplantované do myší exprimují odlišně cytokinové receptory CSF1R (CD115 – cytokinový receptor pro CSF1) CSF2RA (CD116 – receptor pro CSF2) a MPL (CD110 – receptor pro trombopoetin). Zajímalo nás, zda bude exprese těchto cytokinových receptorů odlišná v různých typech leukémií oproti swALL. Na stejném souboru pacientů swALL, T-ALL, BCP-ALL a AML (s výjimkou sortovaných populací) jsme vyšetřili expresi těchto genů (obrázek 14, 15, 16). Exprese genu CSFR1 u swALL byla nižší než u AML, ale vyšší než u BCP-ALL (statisticky pouze trend, obrázek 14). Exprese genů CSF2RA a MPL byla u swALL podobná jako u BCP-ALL, významně nižší než u AML (obrázek 15, 16).



Obrázek 14: Exprese genu *CSFR1* ve skupinách pacientů s liniovým přesmykem (swALL), BCP-ALL, T-ALL, AML.



Obrázek 15: *Expresa genu CSF2RA ve skupinách pacientů s lioiovým přesmykem (swALL), BCP-ALL, T-ALL, AML. Zde je statisticky významný rozdíl exprese mezi skupinou swALL a AML ($p=0,0008$).*



Obrázek 16: *Expresa genu MPL ve skupinách pacientů s lioiovým přesmykem (swALL), BCP-ALL, T-ALL, AML.*

6. Diskuze

Díky podrobnému sledování imunofenotypu leukémie během prvních týdnů léčby naše skupina popsala skupinu pacientů, jejichž leukémie prodělala přesmyk z lymfoidní do myeloidní linie během léčby. V literatuře jsou popisovány jednotlivé kazuistiky, jako přesmyk z ALL do AML, a to převážně u pacientů s přestavbou genu MLL (Krawczuk-Rybak, Zak et al. 2003, Stasik, Ganguly et al. 2006) nebo u pacientů s fúzním genem BCR/ABL (Reardon, Hanson et al. 1994).

Leukémie v naší studii neměly žádnou společnou aberaci, jediným konstantně přítomným znakem byla exprese molekuly CD2 na leukemických blastech. Tento znak se ale vyskytuje i u dalších leukémií z B řady a není tedy postačující pro vznik liniového přesmyku. Molekula CD2 je u člověka exprimována především na T- a NK buňkách a umožňuje správnou signalizaci přes TCR. Asi třetina monocytů, která je pokládána za cirkulující prekurzory dendritických buněk, exprimuje CD2, zatímco CD2-negativní monocyty jsou pokládány za prekurzory makrofágů (Crawford, Gabuzda et al. 1999).

Pomocí vyšetřování klonálních přestaveb Ig/TCR jsme ukázali, že monocytoidní buňky jsou u všech pacientů derivovány z původního lymfoidního klonu. Podobný případ swALL bez známé genetické aberace popsali (Bierings, Szczepanski et al. 2001), kdy pacientka s přesmykem z BCP-ALL do AML (M4 myelomonocytární AML) v průběhu indukční fáze léčby prodělala následně relaps onemocnění zpět do BCP-ALL. Ve všech blastech (AML, BCP-ALL) byly prokázány identické klonální přestavby pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TCR) (Bierings, Szczepanski et al. 2001). V této kazuistice nebyla vyšetřována molekula CD2.

U pacientů se swALL se signifikantně častěji vyskytovaly alterace v genu Ikaros (IKZF1), který je jedním z klíčových regulátorů vzniku lymfoidní linie. Ikaros-negativní progenitorové buňky nediferencují do zralých lymfocytů, spouštějí expresi myeloidních znaků a mohou in vitro diferencovat do makrofágů (Reynaud, Demarco et al. 2008). Tyto alterace se však opět vyskytují i u „běžných“ ALL, nemohou tedy být samy o sobě postačující pro vznik swALL. Ukázali jsme dále, že swALL mají při diagnóze vyšší expresi genu CEBP α než ALL a nižší než AML. Tento transkripční faktor se zdá být klíčovým pro „reprogramování“ B lymfocytů do makrofágů in vitro (Di Tullio, Vu Manh et al. 2011) a podle paralelní studie naší skupiny je jeho promotor

u swALL na rozdíl od „běžných“ ALL demetylován. Podobný trend genové exprese jako u CEBP α jsme prokázali pro cytokinový receptor CSFR1, zatímco geny CSF2RA a MPL mají u swALL expresi podobnou jako ALL.

Celkově jsme kromě těchto dílčích zjištění zatím nenašli genetickou aberaci, která by byla společná všem swALL a která by vysvětlovala fenomén přesmyku z lymfoidní do myeloidní linie. Zřejmě se bude jednat o souhru několika faktorů na genové a zřejmě i epigenetické úrovni. V současnosti probíhají celogenomové metylační studie a nejpodrobnější obraz zřejmě v blízké budoucnosti přinese celogenomové sekvenování nové generace.

Druhou částí práce byl výzkum liniové specifity u ALL z T-řady. Studie americké skupiny ukázala extrémně nepříznivý dopad chybění přestaveb T-buněčného receptoru gama na prognózu (přežití bez události 25% vs. 58% u ostatních pacientů). Nepříznivá prognóza byla vysvětlována tím, že se jedná o extrémně nezralé leukémie, které ještě nejsou plně směřovány do lymfoidní linie. Naše studie prováděná odlišnou metodou ukázala podobné zastoupení pacientů bez přestaveb TCR γ , ale stejné přežití v obou kohortách (~72%). Studie americké skupiny neuváděla bias v podobě výběru pacientů; podrobným porovnáním obou kohort se ale ukázalo, že naše kohorta měla stejný medián věku pacientů (10 let), ale značně nižší leukocytózu při diagnóze (medián $45 \times 10^9/L$ vs. 216 a $161 \times 10^9/L$ ve dvou skupinách z americké kohorty). Jednalo se tedy zřejmě o výběr pacientů vysokého rizika, zatímco naše skupina se skládala z neselektovaných případů T-ALL, čemuž by odpovídalo i horší přežití pacientů v americké studii. Ukázali jsme dále, že ani úplná absence přestaveb TCR neměla v kohortě našich pacientů prognostický význam.

7. Závěr

Diplomová práce se zabývala výzkumem vzácných podtypů dětské akutní leukémie a to především leukémiemi s přesmykem z lymfoidní do myeloidní linie. Jedná se o rozsáhlý projekt naší skupiny, který zahrnuje imunofenotypová, morfologická, molekulárně-genetická a cytogenetická vyšetření, studie v myším modelu a in vitro studie. Studie provedené v rámci diplomové práce přidaly další důležitá data významná pro pochopení fenoménu změny linie během léčby, především důkaz, že monocytoidní buňky, které se u pacientů objevují v průběhu léčby, jsou derivovány z původního lymfoidního klonu. Dalším významným zjištěním byla odlišná exprese genu $CEBP\alpha$ u tohoto typu leukémií, která může hrát roli v liniové nestabilitě. Budoucí celogenomové studie by měly definitivně určit příčinu tohoto jevu, ať už se bude jednat o jedinou aberaci nebo o spolupráci několika faktorů.

Typy liniové nestability, které pozorujeme u dětských hybridních leukémií, spíše podporují nová schémata vývoje krevních buněk, která nezahrnují časné oddělení lymfoidního a myeloidního prekurzoru.

8. Seznam použitých zkratk:

ABL	gen Abelson, lokalizace
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AIEOP	Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica
AML	akutní myeloidní leukémie
BCP-ALL	B-prekurzorová akutní lymfoblastická leukemie
BCR	Breakpoint cluster region (součást fúzního genu BCR/ABL)
BM	bone marrow
BFM	Berlín - Frankfurt – Münster (pracovní skupina)
CD	Cluster of Differentiation
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CEBP α	CCAAT/enhancer binding protein alpha
CFU-GEMM	Colony Forming Unit Granulocyte-Erythrocy -Monocyte- Megakaryocyte)
CFU-GM	Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage
CFUMegE	Colony Forming Unit Megakaryocyte-Erythroid
CGH	comparative genomic hybridization
c-KIT	gen receptoru pro stem cell faktor
CLP	common lymphoid progenitor
CLIP	Childhood Leukaemia Investigation Prague
CMP	common myeloid progenitor
CRLF2	cytokine receptor like factor 2
CSF	colony stimulating factors
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor

CSF2RA	colony stimulating factor 2 receptor alpha
C _T	threshold cycle
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBF1	early B-cell factor 1
EGIL	European Group for Immunological characterization of Leukemia (pracovní skupina)
ESG-MRD-ALL	European Study Group on Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia (pracovní skupina)
FAB	French-American-British
FLT3	FMS - related tyrosine kinase 3
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HOX11	rodina genů Homeobox 11 (TLX1,2,3)
HSC	hematopoietic stem cells
HR	high risk (group)
Ig	imunoglobulin
IgH	immunoglobulin heavy chain
IgK	lehký řetězec imunoglobulinů κ
IgL	immunoglobulin light chain
IgM	imunoglobulin M
IKZF	Ikaros family zinc finger
IR	intermediate risk (group)
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
JAK	Janus kinase
LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1
LMO1	LIM domain only 1 (rhombotin 1)

LYL1	lymphoblastic leukemia derived sequence 1
MPL	myeloproliferative leukemia virus oncogene
MRN	minimální reziduální nemoc
NK	Natural Killer
NOTCH1	gen NOTCH homolog 1
NPM1	nucleophosmin
OS	overall survival
PAX5	paired box gene 5
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PPR	prednison poor respons
PTPN11	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
P53	tumor suppressor
QR	quantitative range
RAG	recombination activating gene
RAS	RAS protein
RB1	retinoblastoma 1
RQ-RT-PCR	real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
RNA	ribonukleová kyselina
RUNX1	runt-related transcription factor 1
SNP	single-nucleotide polymorphism
SR	standard risk (group)
WHO	World Health Organization
WT1	Wilms tumor 1
T-ALL	T-buněčná akutní lymfoblastická leukémie
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1

TCF3	transcription factor 3
TCR	T-lymfocytární receptor (T-cell receptor)
TCRA	α podjednotka T-buněčného receptoru
TCRB	β podjednotka T-buněčného receptoru
TCRG	γ podjednotka T-buněčného receptoru
TCRD	δ podjednotka T-buněčného receptoru
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TLX1	T-cell leukemia homeobox 1
Tm	Temperature melting

9. Použitá literatura

- Akashi, K., D. Traver, et al. (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." Nature **404**(6774): 193-7.
- Antonson, P. and K. G. Xanthopoulos (1995). "Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha)." Biochem Biophys Res Commun **215**(1): 106-13.
- Arico, M., M. G. Valsecchi, et al. (2000). "Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **342**(14): 998-1006.
- Bene, M. C., G. Castoldi, et al. (1995). "Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)." Leukemia **9**(10): 1783-6.
- Bennett, J. M., P. A. Cassileth, et al. (1996). "Morphologic classification of acute myeloid leukemia: concordance among Eastern Cooperative Oncology Group investigators: a comment." Leukemia **10**(8): 1365.
- Bierings, M., T. Szczepanski, et al. (2001). "Two consecutive immunophenotypic switches in a child with immunogenotypically stable acute leukaemia." Br J Haematol **113**(3): 757-62.
- Breit, S., M. Stanulla, et al. (2006). "Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia." Blood **108**(4): 1151-7.
- Cario, G., M. Zimmermann, et al. (2010). "Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol." Blood **115**(26): 5393-7.
- Casasnovas, R. O., F. K. Slimane, et al. (2003). "Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome." Leukemia **17**(3): 515-27.
- Cilloni, D., S. Carturan, et al. (2003). "Down-modulation of the C/EBPalpha transcription factor in core binding factor acute myeloid leukemias." Blood **102**(7): 2705-6.

- Civin, C. I., T. Trischmann, et al. (1996). "Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis." J Clin Oncol **14**(8): 2224-33.
- Crawford, K., D. Gabuzda, et al. (1999). "Circulating CD2+ monocytes are dendritic cells." J Immunol **163**(11): 5920-8.
- Davis, M. M. and P. J. Bjorkman (1988). "T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition." Nature **334**(6181): 395-402.
- De Keersmaecker, K., P. Marynen, et al. (2005). "Genetic insights in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia." Haematologica **90**(8): 1116-27.
- Den Boer, M. L., M. van Slegtenhorst, et al. (2009). "A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study." Lancet Oncol **10**(2): 125-34.
- Di Tullio, A., T. P. Vu Manh, et al. (2011). "CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP(alpha))-induced transdifferentiation of pre-B cells into macrophages involves no overt retrodifferentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(41): 17016-21.
- Flohr, T., A. Schrauder, et al. (2008). "Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia." Leukemia **22**(4): 771-82.
- Fronkova, E., E. Mejstrikova, et al. (2008). "Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing?" Leukemia **22**(5): 989-97.
- Froňková, E. and J. Trka (2005). "Detekce minimální reziduální nemoci u akutních lymfoblastických leukémií pomocí kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory: jak se vyhnout špatné interpretaci výsledků." Transfuze a hematologie dnes **11**(3): 110-115.
- Gaipa, G., G. Basso, et al. (2005). "Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection." Leukemia **19**(1): 49-56.

- Goldberg, J. M., L. B. Silverman, et al. (2003). "Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience." J Clin Oncol **21**(19): 3616-22.
- Greaves, M. F., L. C. Chan, et al. (1986). "Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia." Blood **67**(1): 1-11.
- Grimwade, D., S. V. Outram, et al. (2002). "The T-lineage-affiliated CD2 gene lies within an open chromatin environment in acute promyelocytic leukemia cells." Cancer Res **62**(16): 4730-5.
- Gutierrez, A., S. E. Dahlberg, et al. (2010). "Absence of biallelic TCRgamma deletion predicts early treatment failure in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia." J Clin Oncol **28**(24): 3816-23.
- Harvey, R. C., C. G. Mullighan, et al. (2010). "Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia." Blood **115**(26): 5312-21.
- Hawley, R. G., A. Ramezani, et al. (2006). "Hematopoietic stem cells." Methods Enzymol **419**: 149-79.
- Chim, C. S., A. S. Wong, et al. (2002). "Infrequent hypermethylation of CEBPA promotor in acute myeloid leukaemia." Br J Haematol **119**(4): 988-90.
- Kaspers, G. J. and U. Creutzig (2005). "Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions." Leukemia **19**(12): 2025-9.
- Katsura, Y. (2002). "Redefinition of lymphoid progenitors." Nat Rev Immunol **2**(2): 127-32.
- Kondo, M., I. L. Weissman, et al. (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." Cell **91**(5): 661-72.
- Krawczuk-Rybak, M., J. Zak, et al. (2003). "A lineage switch from AML to ALL with persistent translocation t(4;11) in congenital leukemia." Med Pediatr Oncol **41**(1): 95-6.
- Krejsek J., K. O. (2004). "Klinická imunologie." Nukleus HK: 61.

- Kuiper, R. P., E. F. Schoenmakers, et al. (2007). "High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression." Leukemia **21**(6): 1258-66.
- Matsuda, F., K. Ishii, et al. (1998). "The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus." J Exp Med **188**(11): 2151-62.
- Matutes, E., R. Morilla, et al. (1997). "Definition of acute biphenotypic leukemia." Haematologica **82**(1): 64-6.
- Mejstrikova, E., J. Volejnikova, et al. (2010). "Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria." Haematologica **95**(6): 928-35.
- Mullighan, C. G., J. R. Collins-Underwood, et al. (2009). "Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia." Nat Genet **41**(11): 1243-6.
- Mullighan, C. G., C. B. Miller, et al. (2008). "BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros." Nature **453**(7191): 110-4.
- Mullighan, C. G., X. Su, et al. (2009). "Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **360**(5): 470-80.
- Nerlov, C. (2004). "C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias." Nat Rev Cancer **4**(5): 394-400.
- Pabst, T., B. U. Mueller, et al. (2001). "Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia." Nat Genet **27**(3): 263-70.
- Pieters, R., M. Schrappe, et al. (2007). "A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial." Lancet **370**(9583): 240-50.
- Pongers-Willemsse, M. J., T. Seriu, et al. (1999). "Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia." Leukemia **13**(1): 110-8.

- Pott, C., E. Hoster, et al. (2010). "Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study." Blood **115**(16): 3215-23.
- Pui, C. H. (2000). "Acute lymphoblastic leukemia in children." Curr Opin Oncol **12**(1): 3-12.
- Pui, C. H., W. L. Carroll, et al. (2011). "Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update." J Clin Oncol **29**(5): 551-65.
- Pui, C. H. and W. E. Evans (1998). "Acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **339**(9): 605-15.
- Pui, C. H., J. R. Kane, et al. (1995). "Biology and treatment of infant leukemias." Leukemia **9**(5): 762-9.
- Pui, C. H., M. V. Relling, et al. (2004). "Acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **350**(15): 1535-48.
- Reardon, D. A., C. A. Hanson, et al. (1994). "Lineage switch in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia." Cancer **73**(5): 1526-32.
- Renneville, A., C. Roumier, et al. (2008). "Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature." Leukemia **22**(5): 915-31.
- Reynaud, D., I. A. Demarco, et al. (2008). "Regulation of B cell fate commitment and immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Ikaros." Nat Immunol **9**(8): 927-36.
- Rhein, P., S. Scheid, et al. (2007). "Gene expression shift towards normal B cells, decreased proliferative capacity and distinct surface receptors characterize leukemic blasts persisting during induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia." Leukemia **21**(5): 897-905.
- Ross, M. E., R. Mahfouz, et al. (2004). "Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia." Blood **104**(12): 3679-87.
- Rubnitz, J. E., M. Onciu, et al. (2009). "Acute mixed lineage leukemia in children: the experience of St Jude Children's Research Hospital." Blood **113**(21): 5083-9.

- Schutte, J., V. Moignard, et al. (2012). "Establishing the stem cell state: insights from regulatory network analysis of blood stem cell development." Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **4**(3): 285-95.
- Smith, L. T., S. Hohaus, et al. (1996). "PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells." Blood **88**(4): 1234-47.
- Stary, J., Y. Jabali, et al. (2010). "Long-term results of treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in the Czech Republic." Leukemia **24**(2): 425-8.
- Starý, J., Mayer, J. a kolektiv (2002). "Leukémie." Grada Publishing: 66, 67, 84, 85.
- Stasik, C., S. Ganguly, et al. (2006). "Infant acute lymphoblastic leukemia with t(11;16)(q23;p13.3) and lineage switch into acute monoblastic leukemia." Cancer Genet Cytogenet **168**(2): 146-9.
- Strefford, J. C., H. Worley, et al. (2007). "Genome complexity in acute lymphoblastic leukemia is revealed by array-based comparative genomic hybridization." Oncogene **26**(29): 4306-18.
- Szczepanski, T., A. Orfao, et al. (2001). "Minimal residual disease in leukaemia patients." Lancet Oncol **2**(7): 409-17.
- Szczepanski, T., M. J. Willemse, et al. (2001). "Precursor-B-ALL with D(H)-J(H) gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14." Leukemia **15**(9): 1415-23.
- Trueworthy, R., J. Shuster, et al. (1992). "Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study." J Clin Oncol **10**(4): 606-13.
- van der Velden, V. H., M. Bruggemann, et al. (2004). "TCRB gene rearrangements in childhood and adult precursor-B-ALL: frequency, applicability as MRD-PCR target, and stability between diagnosis and relapse." Leukemia **18**(12): 1971-80.
- van der Velden, V. H., G. Cazzaniga, et al. (2007). "Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data." Leukemia **21**(4): 604-11.

- Van Der Velden, V. H., A. Hochhaus, et al. (2003). "Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects." Leukemia **17**(6): 1013-34.
- van der Velden, V. H., J. M. Wijkhuijs, et al. (2002). "T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis." Leukemia **16**(7): 1372-80.
- van der Velden, V. H., M. J. Willemsse, et al. (2002). "Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR." Leukemia **16**(5): 928-36.
- van Dongen, J. J., W. M. Comans Bitter, et al. (1990). "Development of human T lymphocytes and their thymus-dependency." Thymus **16**(3-4): 207-34.
- van Dongen, J. J., A. W. Langerak, et al. (2003). "Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936." Leukemia **17**(12): 2257-317.
- van Dongen, J. J., T. Seriu, et al. (1998). "Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood." Lancet **352**(9142): 1731-8.
- van Dongen, J. J. and I. L. Wolvers Tettero (1991). "Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects." Clin Chim Acta **198**(1-2): 1-91.
- Volejnikova, J., E. Mejstrikova, et al. (2011). "Minimal residual disease in peripheral blood at day 15 identifies a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with superior prognosis." Haematologica **96**(12): 1815-21.
- Weir, E. G., M. Ali Ansari-Lari, et al. (2007). "Acute bilineal leukemia: a rare disease with poor outcome." Leukemia **21**(11): 2264-70.
- Weng, A. P., A. A. Ferrando, et al. (2004). "Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia." Science **306**(5694): 269-71.

- Wognum, A. W., A. C. Eaves, et al. (2003). "Identification and isolation of hematopoietic stem cells." Arch Med Res **34**(6): 461-75.
- Yoda, A., Y. Yoda, et al. (2010). "Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(1): 252-7.
- Zdrahalova, K., Stary J. (2007). "Leukemie." Sanquis **51**: 14.
- Zhang, D. E., C. J. Hetherington, et al. (1996). "CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter." Mol Cell Biol **16**(3): 1231-40.
- Zhang, D. E., P. Zhang, et al. (1997). "Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 569-74.
- Zuna, J., O. Hrusák, et al. (1999). "TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group." Leukemia **13**(1): 22-4.

10. Přílohy

Příloha 1

CD2 positive B cell precursor acute lymphoblastic leukemia with an early switch to monocytic lineage

Ester Mejstrikova, Lucie Slamova, Eva Fronkova, Elena Vodickova, Jana Volejnikova, Marketa Zaliova, Julia Starkova, **Leona Reznickova**, Frederik W. van Delft, Zuzana Zemanova, Gunnar Cario, Tomas Kalina, Karel Fiser, Jean Pierre Bourquin, Michael Dworzak, Jan Zuna, Jan Trka, Jan Stary, Ondrej Hrusak

Rukopis v přípravě.

Příloha 2

Minimal residual disease in peripheral blood at day 15 identifies a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with superior prognosis

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

Haematologica, 2011