

Genetické aberace u dětských akutních lymfoblastických leukemií a sledování residuální nemoci

(These přednášky k profesorskému řízení)

Doc. MUDr. Jan Trka, Ph.D.

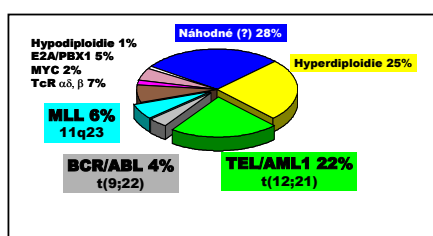
Laboratorní centrum, Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2.LF

Úvod

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) je nejčastějším maligním onemocněním dětského věku. Přesto se jedná o relativně vzácné onemocnění – ročně je s ALL v České republice diagnostikováno asi 65 –70 dětí (2005 – 66). Přestože se celkové léčebné výsledky dětí s ALL významně zlepšily (až na dnešní přežití více než 80% pacientů v první kompletní remisi nemoci, jsou-li léčeni chemoterapií podle moderních léčebných protokolů), stále u téměř 20% z nich dochází k relapsu onemocnění. Prvořadým úkolem v léčbě dětských ALL je tedy vytipovat na jedné straně rizikovou skupinu pacientů, kterým je třeba podat agresivnější léčbu (případně provést allogenní transplantaci hemopoetických progenitorů – HSCT) a na druhé straně děti s velmi dobrou prognosou. Těm je možno léčbu desintensifikovat a uchránit je tak nežádoucích vedlejších účinků léčby, případně i jejích pozdních následků.

Genotypové podskupiny dětských ALL

Přestože mluvíme souhrnně o ALL, ve skutečnosti se jedná o dosti heterogenní skupinu onemocnění, která se projevují expansí lymfocytárních progenitorů B nebo T řady v kostní dřeni. Genotypový základ (a tím i základ maligního procesu) je však u jednotlivých podskupin odlišný. Na jedné straně existují dobře charakterisované subtypy leukemií nesoucí specifické nenáhodné chromosomální aberace s prokazatelnou rolí v leukemogeneze (např. translokace t(9;22), t(12;21) nebo aberace postihující gen MLL), na druhé straně odchylky počtu chromosomů typu hyperdiploidie a hypodiploidie. U značné části ALL nebyla dosud rozhodující genetická aberace popsána (viz obr. 1). Empiricky bylo zjištěno, že přítomnost některých z těchto aberací v leukemických buňkách koreluje s horší

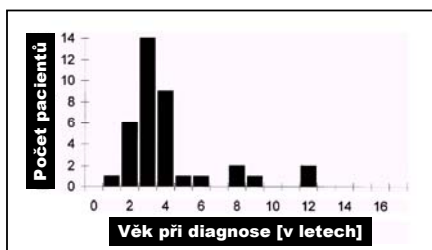


v leukemických buňkách koreluje s horší (např. t(9;22), přestavby MLL, hypodiploidie) nebo lepší prognosou (hyperdiploidie). Vyšetření těch prognosticky nejvýznamnějších je tedy povinnou součástí všech léčebných protokolů a naše laboratoř je provádí pro pacienty z celé ČR od roku 1995.

Translokace t(12;21)

Tato kryptická translokace byla popsána až v roce 1994 Romanou et al., přestože se jedná o vůbec nejčastější chromosomální aberaci u dětských ALL (nachází se u téměř jedné čtvrtiny pacientů). Jejím výsledkem je vznik hybridního genu TEL/AML1 (ETV6/RUNX1). Gen TEL/AML1 je deset let jedním z hlavních objektů zájmu naší laboratoře. Nejprve jsme ověřili incidenci tohoto subtypu leukemie v naší populaci a jako první popsali

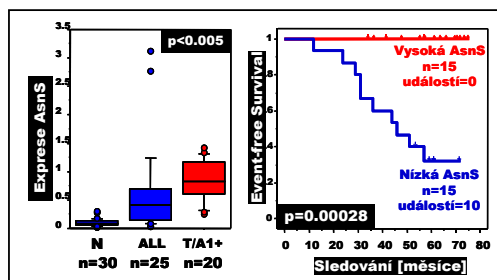
specifickou akumulaci TEL/AML1 pozitivních ALL ve věkové skupině 2-5 let (viz obr.2) ¹. Zabývali jsme se charakterem leukemických buněk nesoucích



t(12;21) a popsali u nich různé hladiny koexprese myeloidních antigenů (zejména nepřítomnost antigenu CD66c) ². Na tuto práci jsme později navázali s použitím moderních technologií (včetně analýzy výsledků expresního profilování) a vytipovali dvě molekuly (CD27 a CD44), jejichž přítomnost, resp. nepřítomnost

v leukemických blastech s velkou spolehlivostí odpovídá přítomnosti genu TEL/AML1 a které mohou být snadno detekovány pomocí průtokové cytometrie ^{3,4}.

Věnovali jsme se i prognostickému významu genu TEL/AML1. Naše první studie z roku 1999 ukázala signifikantně nižší počet relapsů ve skupině dětí s TEL/AML1 pozitivní ALL ve srovnání s ostatními ALL při použití léčebných protokolů skupiny BFM (Berlin – Frankfurt – Münster) ^{5,6}. Lepší léčebné výsledky později zpochybnila německá studie využívající identické protokoly, zejména na základě vyšší incidence pozdních relapsů onemocnění. V jiné léčebné studii (bostonského Dana-Farber Cancer Institute) si děti s TEL/AML1 pozitivní leukemií udržují excelentní prognosu. Přestože jsou si léčebné protokoly dětských ALL celosvětově velmi podobné, v tomto konkrétním případě však zřejmě sehrává důležitou roli variace v dávce L-Asparaginasu. Toto cytostatikum je jedním ze základních v kombinované chemoterapii dětské ALL. Poté, co skupina R. Pieterse (Ramakers-van Woerden et al., 2000) popsala signifikantně vyšší citlivost TEL/AML1 pozitivních leukemických blastů na L-Asparaginasu *in vitro*, začali jsme se tímto fenoménem zabývat. Zjistili jsme, že TEL/AML1 pozitivní leukemické buňky paradoxně více exprimují gen pro Asparagin syntetasu než jiné leukemické i neleukemické buňky a že nižší exprese Asparagin syntetasy u jejich malé podskupiny přispívá k horší prognóze (viz obr. 3) ⁷. Jaké jsou další

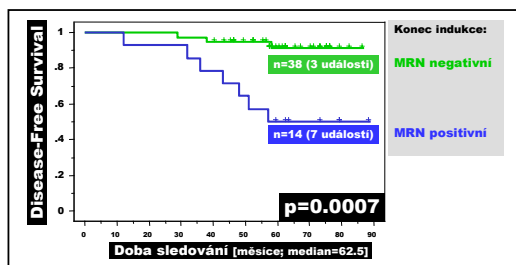


faktory, které rozhodují o relapsu v této jinak prognosticky příznivé skupině? Jedním z nich je rychlá odpověď na léčbu charakterisovaná rychlým poklesem residuální nemoci.

Minimální residuální nemoc

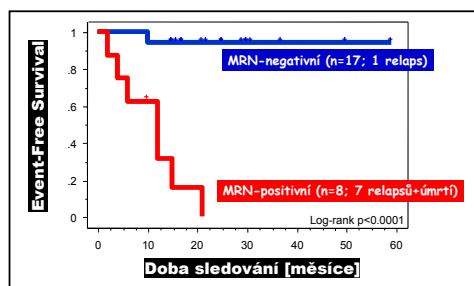
Jako minimální residuální nemoc (MRN) označujeme submikroskopickou hladinu nemoci v době, kdy pacient je v kompletní remisi onemocnění. Nejcitlivější možnost detekce MRN u ALL poskytují metody založené na kvantitativní polymerasové řetězové reakci (qPCR), případně s nižší citlivostí a specifitou i metody průtokové cytometrie. Podle retrospektivních studií monitorování hladin zbytkových leukemických buněk zejména v první fázi léčby (po prvním a třetím měsíci) MRN dobře rozděljuje pacienty do skupiny s vysokou hladinou a pomalým ústupem (potvrzujícími vysoké riziko relapsu), do skupiny s rychlou odpovědí a excelentní prognosou a do skupiny střední

(van Dongen et al., 1998). My jsme prokázali, že i MRN měřená pomocí kvantifikace mRNA hybridního genu TEL/AML1 předpovídá léčebný výsledek (viz obr. 4) ⁸. Porovnali jsme také detekci MRN pomocí této metody a



standardu používaného u ALL, kterým je kvantifikace klonálně specifických přestavbě imunoreceptorových genů. Zjistili jsme, že kvantitativní sledování exprese TEL/AML1 může sloužit jako komplementární nebo náhradní metodika pro detekci MRN v nepřítomnosti lepších markerů ⁹.

MRN hraje důležitou roli v identifikaci rizikových pacientů všech genotypových podskupin. Využíváme ji dnes u pacientů léčených pro relaps ALL, u kterých přítomnost detekovatelné MRN po dvou blocích léčby jasně nalézá podskupinu se špatnou odpovědí na léčbu a indikuje je k HSCT. Pacienti, kteří přicházejí k allogenní HSCT s detekovatelnou hladinou MRN, jsou ve velmi vysokém riziku potransplantačního relapsu (viz obr. 5.) ^{10,11}. Toto zjištění vede v současné době k intenzivním snahám o úpravu před- a potransplantační léčby.



V poslední době začínají kriteria MRN využívat ke stratifikaci pacientů i některé léčebné protokoly pro nově diagnostikované pacienty s ALL.

Protokol využívaný v posledních třech letech v ČR (ALL-IC BFM 2002) se zaměřil na jiné moderní formy stratifikace pacientů (odpověď na léčbu je hodnocena morfologicky, je zohledněna přítomnost některých chromosomálních aberací), sledování MRN jsme však prováděli jako součást kolaterálního vědeckého projektu MiniRisk. Z našich dat připravených k publikaci vyplývá, že zatímco identifikace pacientů s vysoce rizikovou ALL je možná bez detekce MRN, ve skupině středního a nízkého rizika dochází ke značnému překryvu skupin určených klasickou metodikou a pomocí MRN. Zhruba třetina pacientů zařazených do skupiny nízkého rizika má pomalější pokles MRN a měla by být stratifikována do skupiny střední. Toto zjištění potvrzuje nutnost zařazení monitorace hladin MRN do léčebného protokolu.

Závěr

Metody molekulární hematologie hrají stále významnější roli nejen v odhalování vlastností leukemických buněk a mechanismů leukemogeneze. Prakticky ovlivňují i léčbu a prognosu pacientů s ALL. Nový léčebný protokol, který bude spuštěn v ČR v součinnosti s Německem, Rakouskem a Itálií v roce 2007, již bude zahrnovat stratifikační kriteria MRN.

Publikace

(pouze publikace naší skupiny vztahující se k tématu přednášky)

1. Trka J, Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Lauschman H, Sary J. Impact of TEL/AML1-positive patients on age distribution of childhood acute lymphoblastic leukemia in

- Czech Republic. Pediatric Hematology Working Group in Czech Republic. *Leukemia*. 1998;12:996-997
2. Hrusak O, Trka J, Zuna J, Houskova J, Bartunkova J, Sary J. Aberrant expression of KOR-SA3544 antigen in childhood acute lymphoblastic leukemia predicts TEL-AML1 negativity. The Pediatric Hematology Working Group in the Czech Republic. *Leukemia*. 1998;12:1064-1070
 3. Vaskova M, Mejstrikova E, Kalina T, Martinkova P, Omelka M, Trka J, Sary J, Hrusak O. Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2005;19:876-878
 4. Kalina T, Vaskova M, Mejstrikova E, Madzo J, Trka J, Sary J, Hrusak O. Myeloid antigens in childhood lymphoblastic leukemia: clinical data point to regulation of CD66c distinct from other myeloid antigens. *BMC Cancer*. 2005;5:38
 5. Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Sary J, Trka J. TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group. *Leukemia*. 1999;13:22-24
 6. Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Sary J, Trka J. Significantly lower relapse rate for TEL/AML1-positive ALL. *Leukemia*. 1999;13:1633
 7. Krejci O, Starkova J, Otova B, Madzo J, Kalinova M, Hrusak O, Trka J. Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells. *Leukemia*. 2004;18:434-441
 8. Madzo J, Zuna J, Muzikova K, Kalinova M, Krejci O, Hrusak O, Otova B, Sary J, Trka J. Slower molecular response to treatment predicts poor outcome in patients with TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia: prospective real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Cancer*. 2003;97:105-113
 9. Fronkova E, Madzo J, Zuna J, Reznickova L, Muzikova K, Hrusak O, Sary J, Trka J. TEL/AML 1 real-time quantitative reverse transcriptase PCR can complement minimal residual disease assessment in childhood ALL. *Leukemia*. 2005;19:1296-1297
 10. Krejci O, van der Velden VH, Bader P, Kreyenberg H, Goulden N, Hancock J, Schilham MW, Lankester A, Revesz T, Klingebiel T, van Dongen JJ. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32:849-851
 11. Sramkova L, Muzikova K, Fronkova E, Krejci O, Sedlacek P, Formankova R, Mejstrikova E, Sary J, Trka J. Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2006