

# Pokroky v molekulovom monitoringu a význam skríningu BCR/ABL1 mutácií pri Ph pozitívnej chronickej myelocytovej leukémii

MUDr. Adriana Kafková, PhD., prof. MUDr. Elena Tóthová, CSc.

<sup>1</sup>HEMKO, s. r. o., Hematologická a onkohematologická ambulancia, Košice

**Molekulový monitoring transkriptov BCR/ABL1 u pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou (CML) je dôležitý v hodnotení odpovede na liečbu inhibítormi tyrozínkinázy (TKI) vrátane potvrdenia zlyhania liečby, ktoré si vyžaduje zmenu terapie. Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (Quantitative reverse-transcriptase-polymerase-chain-reaction -qRT-PCR) hodnotiaci hladinu BCR-ABL1 transkriptov sa stala súčasťou protokolov hodnotiacich efekt liečby pri CML. V posledných rokoch sme svedkami významu v dosiahnutí a udržaní hlbokoj molekulovej odpovede, čo si vyžaduje efektívnejšie určovanie leukemickej masy, monitorovanie minimálnej reziduálnej choroby (MRD), detekciu mutácií, ktoré sú príčinou rezistencie na liečbu TKI, ako aj určovanie prediktorov odpovede na liečbu TKI. Nové metódy ako Cartridge- BCR-ABL1 kvantifikácia, digitálna PCR a next generation sequencing (NGS) sú ďalšie príklady technológií, ktoré sú v súčasnosti v popredí výskumu, vyhodnocovania a ich translácie do klinickej praxe. V práci uvádzame prehľad molekulových metód/technológií, ktoré znamenajú pokrok v molekulovom monitorovaní.**

**Kľúčové slová:** chronická myelocytová leukémia, molekulové monitorovanie, BCR-ABL1, rezistencia, mutácie, digitálna PCR, sekvenovanie ďalšej generácie

## Advances in molecular monitoring and the importance of screening BCR/ABL1 mutation for Ph-positive chronic myelocytic leukemia

**Molecular monitoring of BCR/ABL 1 transcripts for patients with chronic myeloid leukemia (CML) is now used to assess response to tyrosine kinase inhibitors (TKI), including treatment failure that mandates a change of therapy. The last few years have witnessed the emergence of a new molecular response target, which is the achievement and maintenance of deep molecular response. Quantitative reverse-transcriptase-polymerase-chain-reaction (qRT-PCR) assessment of BCR-ABL1 transcript levels has become the standard of care protocol in CML. However, further developments are required to assess leukemic burden more efficiently, monitor minimal residual disease (MRD), detect mutations that drive resistance to tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy and identify predictors of response to TKI therapy. Cartridge-based BCR-ABL1 quantitation, digital PCR and next generation sequencing (NGS) are examples of technologies which are currently being explored, evaluated and translated into the clinic. Here we review the emerging molecular methods/technologies currently being developed to advance molecular monitoring.**

**Key words:** chronic myeloid leukemia, molecular monitoring, BCR-ABL1, resistance, mutations, digital PCR, next generation sequencing

Onkológia (Bratisl.), 2019;14(1):17-22

## Úvod

Molekulový monitoring transkriptov BCR/ABL1 u pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou (CML) je významný v hodnotení odpovede na liečbu s inhibítormi tyrozínkinázy vrátane potvrdenia zlyhania liečby, ktoré si vyžaduje zmenu terapie. Súčasná odporúčania pre molekulové monitorovanie CML sú založené na kvantifikácii BCR-ABL1 pomocou kvantitatívnej PCR (qRT-PCR) s/bez cytogenetiky ako uvádza ELN (European LeukemiaNet, 2013). U pacientov liečených s inhibítormi tyrozínkinázy (TKI) sa odporúča realizovať molekulové hodnotenie v čase diagnózy a v mesiacoch 3, 6 a 12 od začiatku liečby s TKI. Hladiny BCR-ABL1 transkriptov v týchto časových intervaloch

definujú molekulovú odpoveď (MR). ELN odporučila ako definíciu optimálnej odpovede: ak je hladina BCR-ABL1 transkriptov < 10 % po 3 mesiacoch meraná pomocou IS (International Scale, t. j. medzinárodnej stupnice), IS < 1 % po 6 mesiacoch a < 0,1 % po 12 mesiacoch liečby (obrázok 1) (1, 2, 3). Pacienti s hladinou transkriptov BCR-ABL1 > 10 % po 6 mesiacoch a > 1 % po 12 mesiacoch boli hodnotení ako zlyhanie liečby. Hodnoty BCR-ABL1 zistené medzi zlyhaním liečby a optimálnou odpoveďou dostali termín „warning zone“, kde sa odporúčalo frekventnejšie monitorovanie molekulovej odpovede (4, 5). ELN a NCCN Clinical Practice Guidelines v roku 2016 definovali ako zlyhanie liečby hodnotu BCR-ABL1 > 10 % v 3. alebo 6. mesiaci od začiatku liečby

(ELN, 2016, NCCN, 2016). Obe odporúčania navrhujú zmenu liečby na alternatívny TKI, ak je u pacienta zistené zlyhanie terapie. Dosiahnutie hlbokoj molekulovej odpovede – DMR (deep molecular response) MR4, MR4.5, MR5 pomocou nových metód qRT-PCR, ako aj ďalšími metódami (digitálna PCR, NSG) sú významným cieľom pri CML a sú predpokladom možnosti ukončenia liečby v klinických skúšaniach (1, 3, 4, 5). Nedetegovateľnosť BCR-ABL1 technikou qRT-PCR s nedostatočnou senzitivitou môže viesť k nesprávnemu alebo predčasnému ukončeniu liečby (23). Súčasná pokroky v molekulových metódach sa sústreďujú na:

1. vývoj účinných metód, ktoré sú rýchle, citlivé na kvantifikáciu BCR-

ABL1, menej finančne náročné a použiteľné aj v ekonomicky menej vyspelých krajinách;

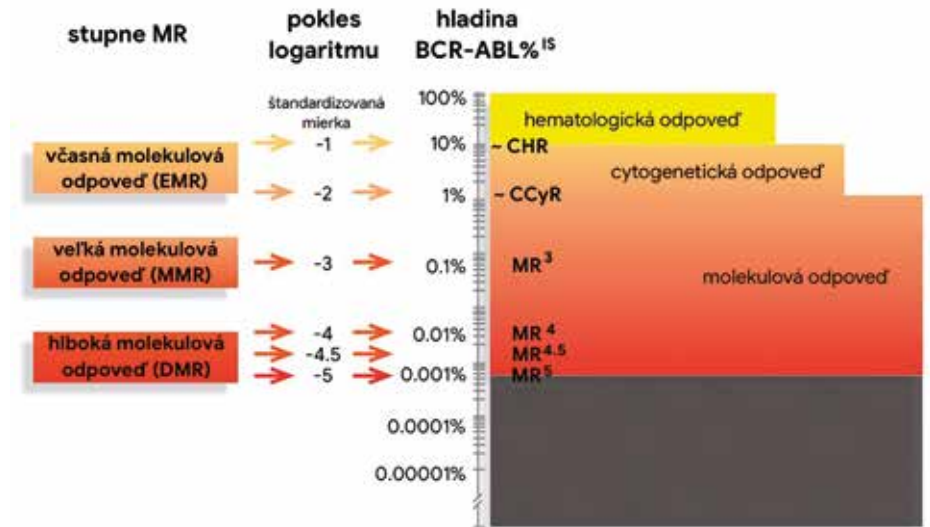
2. detekciu možnosti kvantifikácie aj nízkych hladín BCR-ABL1 a monitorovanie MRD;
3. možnosti zistenia mutácií rezistentných na liečbu s TKI;
4. objav molekulových markerov, významných v predikcii odpovede na liečbu alebo progresie ochorenia.

### Pokroky v kvantifikácii BCR-ABL1

#### GeneXpert cartridge-based BCR-ABL1 kvantifikácia

Na cartridge založený automatizovaný qRT-PCR systém (Xpert BCR-ABL1 Monitor Assay), kazetová metóda, ktorou sa merajú transkripty BCR-ABL1 p210, bola vyvinutá v Cepheid (California, USA). Tento systém využíva mikrofluidy na priame určenie vo vzorkách periférnej krvi (PK) v extrahovanej cartridge RNA. RT-PCR a fluorescenčná detekcia sú v prístroji 'all in one' (6, 7, 8). Najväčšou výhodou tohto systému je zjednodušený pracovný postup. Systém vyšetrenia je rýchlejší, praktickejší a vyžaduje menej technických odborností a zručností v porovnaní so súčasnými diagnostickými metódami. V kontraste s najpoužívanejšou metódou v súčasnosti BCR-ABL1 qRT-PCR, ktorá určuje absolútny počet kópií BCR-ABL1, GeneXpert systém hodnotí pomer BCR-ABL1/ABL1. Včasné porovnania metódy GeneXpert so štandardnou metódou qRT-PCR ukazujú, že hodnoty zistené metódou GeneXpert Ct a efektívnosť signifikantne korelujú so štandardnou metódou qRT-PCR a ukazuje sa, že aj napriek rozdielom v kvantifikačných metódach má systém potenciál možnosti zavedenia do klinickej praxe (6, 7). Aj keď metóda neudáva hodnotu BCR-ABL1 na základe IS, ktorej výsledkom je interpretácia a interlaboratórne porovnanie výsledkov, novší systém vyvinutý Cepheidom dokázal adjustáciu pomeru BCR-ABL1/ABL1 k IS. Metóda je spoľahlivá, čo potvrdili dosiahnuté merania pod 0,01 % BCR-ABL1 IS, hladiny potrebnej na detekciu MR4 (6, 7, 8, 9). K zlepšeniu metódy GeneXpert BCR-ABL1 viedlo zavedenie

**Obrazok 1.** Hladiny hematologickej, cytogenetickej, molekulovej odpovede, včasnej molekulovej odpovede (EMR) a hlbkej molekulovej odpovede (DMR) pri CML. Sivá farba ukazuje, že RQ-PCR nemôže hodnotiť MRD pod MR5 (BCR-ABL1 pod 0,001 %); avšak reziduálna leukémia môže byť prítomná. Nové technológie (digitálna PCR) a možnosti (určenie genomického DNA skôr ako RNA), môžu v budúcnosti viesť k detekcii MR pod hladinou MR5.



Vysvetlivky: CCyR – kompletná cytogenetická odpoveď; CHR – kompletná hematologická odpoveď; CML – chronická myelocytová leukémia; IS – International Scale; MMR – veľká molekulová odpoveď; MR – molekulová odpoveď; MRD – minimálna reziduálna choroba; RQ-PCR – real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction

systému Cepheid, skríningovej metódy na detekciu nových prípadov p 210 BCR-ABL1 CML. GeneXpert metóda je rýchla a vhodná aj za cieľom vylúčenia negatívnych vzoriek na CML, ktoré boli zistené z celkového množstva vzoriek dodaných do laboratória. V súčasnosti sa však odporúča používať zatiaľ v praxi štandardnú qRT-PCR z nasledovných dôvodov: 1. pre možnosť používania tejto novšej metódy je potrebné medzinárodné referenčné laboratórium na porovnanie tejto metódy so štandardne aplikovanou, 2. cieľom je určenie kinetiky odpovede, pre ktorú je súčasná metóda qRT-PCR optimalizovaná (4, 5, 9). Atypické transkripty, ktoré sú menej často detegované pri CML, neboli cieľom hodnotenia metódou GeneXpert BCR-ABL1 a nebude ich možné detegovať. Zaujímavé bolo, že použitie nového cartridge systému ukázalo vysokú konkordanciu dosiahnutých hodnôt použitím extrahovanej RNA tak z čerstvej krvi, ako aj zo suchých vzoriek (9). Štúdia ukazuje sľubné, nie drahé vyšetrenie, možné použiť aj v ekonomicky slabších krajinách k zlepšeniu monitoringu pacientov. GeneXpert systém nebol však validovaný na detekciu hladín BCR-ABL1 pod 0,01 % BCR-ABL1 (MR4), čo ukazuje neschopnosť merania veľmi nízkych hladín transkriptov (7, 10).

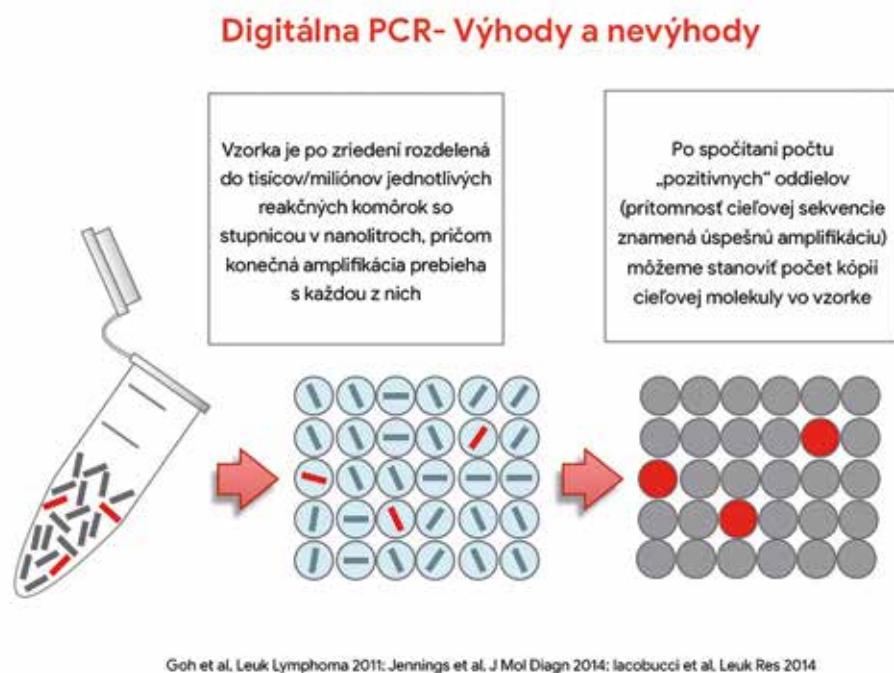
### Monitorovanie minimálnej reziduálnej choroby (MRD)

Cieľom monitorovania MRD je detekcia nízkych hladín reziduálnych leukemických buniek. Molekulárne metódy s vyššou senzitivitou umožňujú určenie asociácie medzi veľmi hlbokou MR (t. j. pod MR6) a určením TFR (treatment-free remission). Sokalovo klinické rizikové skóre je jediná známa veličina, ktorá významne koreluje s pravdepodobnosťou zlyhania liečby. Pacienti s nízkym rizikom podľa Sokala mali menšiu pravdepodobnosť molekulového relapsu (8, 11). Ďalšie prognostické faktory významné pre úspešné ukončenie liečby zostávajú neznáme (12). Modifikácia konvenčných qRT-PCR metód, aplikácia digitálnej PCR a DNA (deoxyribonucleic acid) PCR, sú metódy, ktoré by mohli viesť k zlepšeniu senzitivity a detekcie reziduálnych leukemických buniek.

### Modifikácia konvenčnej metódy PCR (quantitative reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction)

Modifikáciou konvenčnej metódy qRT-PCR sa zvyšuje jej senzitivita. Zmenou typu primerov bola zistená alterácia reakcie RT (reverse transcrip-

**Obrázok 2.** Digitálna PCR – výhody a nevýhody. Metóda je drahšia, lepšia na stanovenie hĺbky odpovede než hodnotenie včasnej odpovede (t. j. v 3 mesiacoch), má však vyššiu senzitivitu, ktorá je potrebná na lepšiu identifikáciu kandidátov pre „stop treatment“.



tion). Táto zámena viedla k zvýšeniu senzitivity metódy. Hoci počet kópií BCR-ABL1 bol 2,3-násobne vyšší použitím pentamérov v porovnaní s hexamérmi, táto modifikácia nebola zatiaľ zavedená do rutinného klinického monitorovania CML. Maximálne množstvo templátovej RNA pridanej k reverznej transkriptázovej reakcii (RT) je ďalšia stratégia vedúca k zvýšeniu senzitivity konvenčnej qRT-PCR metódy. Táto modifikácia viedla k 6-násobnému zvýšeniu citlivosti a udržaniu vysokej korelácie s konvenčnou qRT-PCR. Je významné, že takto bolo možné dosiahnuť vyššiu proporciu vzoriek dosahujúcich senzitivitu MR4.5 (91 % vs 61 %) a vzostup citlivosti vzoriek k MR5 (78 % vs 9 %  $\geq 5$  log) (23). Efektivitu tejto metódy bude potrebné dokázať v klinickej praxi.

### Digitálna PCR (Digital polymerase chain reaction)

Konvenčná metóda BCR-ABL1 qRT-PCR používa štandardnú krivku absolútnej kvantifikačnej metódy na určenie hladín mRNA, kde vzorky s neznámymi hladinami BCR-ABL1 sú porovnávané so štandardnou krivkou známej kvantity (13). Táto kvantifikačná metóda sa spolieha na porovnanie medzi amplifikačnými cyklami, a preto je citlivejšia aj pri neefektívnej alebo odlišnej amplifikácii,

ktoré môžu limitovať senzitivitu metód (14, 15). Digitálna PCR (dPCR) je výhodnejšia oproti konvenčnej PCR vzhľadom na to, že vzorky sú rozložené do tisíc až k miliónom nanolitrov a amplifikácia je výsledkom mnohých priestorovo separovaných reakcií. Absolútna kvantita molekúl môže byť určená bez potreby štandardnej krivky. Hlavnou výhodou dPCR je presná kvantifikácia nukleových kyselín, uľahčenie merania aj malých percentuálnych rozdielov. Metóda dPCR má tak potenciál detegovať BCR-ABL1 s vyššou senzivitou a presnosťou ako qRT-PCR. Aplikácia dPCR pre monitoring MRD pri CML je súčasťou klinických hodnotení (obrázok 2). Iniciálne štúdie použitím oboch metód nanofluidickej a dPCR môžu byť vhodné aj na určenie kvantity pod 0,01 % BCR-ABL1 IS, ekvivalentnej ku MR4. Ďalšia štúdia uvádza aj možnosť kvantifikácie BCR-ABL1 hladín od 0,0032 % do 10 % IS pomocou 3 dPCR programov: Bio-Rad QX200, RainDance RainDrop System a Applied Biosystem QuantStudio3D (12, 13, 15). V týchto štúdiách boli úspešne detegované aj hladiny BCR-ABL1 pod MR5 a MR5.5, čo ukazuje na vysokú senzitivitu metód. Pre ich význam v klinickom manažmente CML pacientov je však potrebné porovnanie a opatrné vyhodnotenie v porovnaní s konvenčnou qRT-PCR.

### Deoxyribonucleic acid polymerase chain reaction – DNA – PCR

Expresia hladín BCR-ABL1 mRNA nie je v priamom vzťahu k počtu Ph+ leukemických buniek, preto detekcia perzistujúcich leukemických buniek použitím štandardnej qRT-PCR je odkázaná na expresiu BCR-ABL1. Genómová DNA (gDNA) BCR-ABL1 zlomu je alternatívna stratégia pre identifikáciu Ph pozitivity. Na DNA založená metóda má početné výhody v porovnaní s RNA metódami, molekulové monitorovanie DNA je stabilné, a tak menej subjektívne. Metóda je technicky menej náročná s vysokou kvalitou, počet molekúl detegovaných je v priamej korelácii s počtom Ph+ buniek, a tak je teoreticky ľahšie štandardizovať interlaboratorne merania. Avšak BCR/ABL1 zlomy sú rozptýlené ~5 kb BCR v intrónoch 13 a 14 a ~140 kb oblasti ABL1 intrónu 1. Ďalšou limitáciou na DNA založených technikách je, že si vyžadujú prípravu špecifických PCR oligonukleotidov (12). Výhody stanovenia DNA PCR viedli k zvýšenej senzitive v potvrdení BCR-ABL1 pozitivitu v porovnaní s qRT-PCR mRNA metódou. Porovnaním 4 BCR-ABL1 kvantitatívnych metód (qRT-PCR, DNA qPCR, mRNA dPCR a DNA dPCR) bolo dokázané, že tieto metódy boli v 100 % konkordantné v detekcii prítomnosti hladín BCR-ABL1 nižších ako MR4 (2, 16). S cieľom určenia klinického významu metódy BCR-ABL1 DNA. Ross a spolupracovníci merali hladiny transkriptov v klinickej štúdii u pacientov pred ukončením liečby s imatinibom. Všetci pacienti mali nedetegovateľné hladiny BCR-ABL1 transkriptov použitím striktných kritérií senzitivity. Cieľom bolo určiť, či viac citlivé metódy detegujúce BCR-ABL1 môžu identifikovať pacientov s molekulovým relapsom po ukončení liečby s imatinibom. Pomocou metódy založenej na DNA bola zistená vyššia senzitivita. BCR-ABL1 DNA pozitivita bola potvrdená u 7 z 8 pacientov, u ktorých po ukončení liečby s imatinibom neboli detegované hladiny pomocou BCR-ABL1 mRNA. Avšak táto štúdia ukázala, že prítomnosť BCR-ABL1 DNA pred vynechaním imatinibu nebola predpoveďou následného relapsu (12). Preto klinické použitie na DNA-



založených metódach je limitované a nie je v súčasnosti implementované do rutinného molekulového monitoringu pri CML.

### Detekcia mutácií rezistentných na TKI

Mutácie v BCR-ABL1 kinázovej doméne (KD) sú najčastejšou príčinou rezistencie na terapiu s TKI a tvoria pri CML ~50 % zo získaných rezistencií. Väčšina KD mutácií bola potvrdená v súvislosti s rezistenciou na imatinib. Druhgeneračné TKI nilotinib, dasatinib, bosutinib sú aktívne oproti väčšine imatinib – rezistentným mutáciám, ale niektoré konferujú aj s klinickou rezistenciou na nilotinib (Y253H, E255K, E255V, F359V a F359C), dasatinib (V299L, T315A, F317L, F317I, F317V a F317C), bosutinib (V299L) alebo oproti všetkým druhogeneračným inhibítorm (T315I). V súčasnosti sa odporúča včasná identifikácia mutácií, pretože vedú k rezistencii na liečbu. Ich potvrdením je možné upraviť liečbu a zabrániť jej zlyhaniu (2, 5, 12, 17). BCR-ABL1 KD mutácie sú najčastejšie detegované Sangerovým sekvenovaním BCR-ABL1 cDNA. Avšak Sangerovo sekvenovanie môže detegovať iba mutácie, ktorých hladina presahuje množstvo alel nad 10 – 20 % (18, 19, 20). Molekulové techniky s väčšou senzitivitou identifikujú mutácie pod hladinou 0,5 %. Ak mutácie spôsobujúce rezistenciu, sú detegované už v nízkych hladinách, môžu viesť k správnej liečbe a zabráneniu klinickej rezistencie (16, 21, 22, 23).

### Metóda NGS (Next Generation Sequencing)

Výšetrenie prítomnosti/nepřítomnosti mutácií jednotlivých génov hodnotené Sangerovou metódou sekvenovania je zamerané vždy iba na jeden gén, pretože sa však zvyšuje počet génov, ktoré je potrebné vyšetriť, je ekonomickejšie a časovo úspornejšie previesť testovanie celého panelu génov naraz. Hlavné multigénové platformy, ktoré sa dnes používajú v klinickej praxi, sú založené na sekvenovaní novej generácie (NGS- Next Generation Sequencing), pri ktorom sú najskôr vybrané alebo amplifikované príslušné genomické oblasti, potom sú na základe masívnej

paralelizácie sekvenované milióny zvolených molekúl DNA, a nakoniec sú tieto sekvencie porovnané s referenčným genómom. Metóda umožňuje detegovať nielen SNV (single nucleotide variant), a malé indely, ale aj odhaliť variabilitu počtu kópií génov, získkové a stratové mutácie, spôsobom podobným komparatívnej génovej hybridizácii na mikročipe (aCGH-array comparative genome hybridization). Cena panelov NGS v poslednom čase postupne klesá, zatiaľ čo kvalita a spoľahlivosť sa neustále zvyšuje. O klinickom význame detekcie mutácií nie sú pochybnosti. Je známe, že detekcia kombinovaných mutácií sa spája s horšou odpoveďou v porovnaní s pacientmi bez alebo iba s jednou KD mutáciou (18, 24). Kombinované mutácie (viac ako 1 mutácia v 1 molekule) majú takisto pozoruhodne vyšší počet získaných rezistencií k prvo- a druholíniovým TKI. Ponatinib, tretogeneračný TKI, predchádza rezistencii spôsobenej jednotlivými mutáciami v BCR-ABL1 KD, ktoré zapríčínujú rezistenciu na TKI a takisto inhibuje mutáciu T315I (gatekeeper). Existujú však protichodné údaje v súvislosti s rezistenciou na ponatinib a nálezom viacnásobných mutácií. U pacientov liečených v chronickej fáze CML navodí ponatinib trvalé odpovede v súvislosti s mutačným stavom rezistentným na TKI (20). Toto nie je možné potvrdiť v prípadoch pokročilého ochorenia. Metódou NGS je možná identifikácia kombinácie BCR-ABL1 KD mutácií, čo dovoľuje včasné klinické rozhodovanie a výber správnej liečby po TKI zlyhaní. dPCR alebo použitie chromatografie (denaturing high-performance liquid) kombinovanej s priamym sekvenovaním sú metódy prezentované v súčasnosti k detekcii BCR-ABL1 mutácií (20). NGS sekvenčné technológie sú metódy významne preferované aj pre kvantifikáciu potvrdených rezistentných mutácií.

### Metóda duplex sekvenovania (Duplex deoxyribonucleic acid sequencing)

Metóda duplex sekvenovania je alternatíva ku konvenčnej metóde NGS, kde sú sekvenované obe vlákna jednej molekuly DNA. Touto metódou je možné odlišenie medzi artefaktmi a pravými

mutáciami. Právne mutácie sa nachádzajú v oboch vláknach, kým artefakty sú prezentované iba v jednom vlákne. Duplex sekvenovanie má výhodu oproti jednoduchému sekvenovaniu, pretože chyby, ktoré sa vyskytnú počas prvej PCR, môžu byť identifikované a eliminované. Táto metóda bola použitá na detekciu ABL1 KD mutácií u ťažko predliečených pacientov, zväčša užívajúcich tri alebo viac TKI pred terapiou s ponatinibom. Predbežné údaje u 9/29 patientskych vzoriek demonštrovali v priemere detekciu mutácií u 1 z 11,412 buniek (< 0,01%), u 4 pacientov ukázali aj zriedkavé subklony, ktoré neboli dokázané pomocou NGS alebo Sangerovho sekvenovania (12, 16). Limitáciou tejto sekvenčnej stratégie je však to, že amplifikácia nie je špecifická k BCR-ABL1 fúznemu génu – gDNA. Nie je možné určiť, či mutácie sú prítomné v BCR-ABL1 fúznom géne alebo vo wild-type ABL1 génu. Ďalšie prospektívne štúdie by mali viesť k potvrdeniu asociácie medzi nízkymi hladinami rezistentných mutácií detegovanými pomocou duplex sekvenovania a rezistenciou na lieky alebo progresiou ochorenia.

Ďalšie metódy s cieľom potvrdenia kombinovaných mutácií (Molecular barcoding in next-generation, Long-read next-generation sequencing) a ich podrobný opis a a perspektívne výhody sú súčasťou genetických publikácií (12, 17).

### Prognostické ukazovatele efektivity liečby a progresie ochorenia

#### Typ BCR-ABL1 transkriptu ako prediktor odpovede na liečbu TKI

Početné práce uvádzajú, že identifikácia molekulových markerov pri CML môže viesť v predpovedi odpovede na liečbu s TKI už v čase diagnózy. Niektoré typy BCR-ABL1 transkriptov detegované u pacientov s CML sú častejšie, ako e13a2 (b2a2), e14a2 (b3a2), iné transkripty sa vyskytujú zriedka e1a2 a e13a3. Podľa niektorých veľkých klinických skúšaní sa ukázalo, že výskyt zriedkavých transkriptov e1a2 sa spája s horšou odpoveďou na TKI (11, 25). Iné správy uvádzajú, že pacienti s e13a3

transkriptom mali tendenciu k lepšej citlivosti na TKI (26). Asociácia medzi typom transkriptu a dlhotrvajúcimi výsledkami liečby bola predmetom ďalšieho sledovania. V čase pred-TKI obdobím pacienti so zlomami v e14a2 mali potvrdené kratšie trvanie chronickej fázy v porovnaní s pacientmi s e13a2 (36.6 vs 56.1 mesiacov). V ére liečby s TKI rozličné klinické skúšania určujú prognostickú hodnotu typov transkriptov BCR-ABL1 v súvislosti s výsledkami liečby. V malom klinickom skúšaní (71 pacientov) s expresiou transkriptov e14a2 alebo e13a2 liečených s imatinibom (400 mg) sa ukázalo, že v skupine pacientov s e14a2 dosiahli signifikantne vyšší počet kompletných cytogenetických odpovedí (CCyR) v porovnaní s e13a2 pacientmi, ale žiadne signifikantné zmeny v celkovom prežívaní (OS) alebo v prežívaní bez udalosti (EFS). V danom klinickom skúšaní (KS) našli u pacientov s e13a2 vyššie množstvo predliečebnej pCrKL/CrKL (phospho-CrKL/CrKL), čo potvrdzuje, že pacienti s transkriptom e13a2 majú vyššiu BCR-ABL1 kinázovú aktivitu. Vo veľkom KS (1105 CML pacientov) liečených v prvej línii imatinibom sa ukázalo, že transkript e14a2 bol v korelácii s vyšším počtom dosiahnutej MMR a MR4; ale nebola dokázaná žiadna súvislosť s dosiahnutím CCyR, prežívania bez progresie (PFS) alebo OS (26). V nedávnom KS u 481 pacientov liečených v prvej línii s imatinibom (400 alebo 800 mg) (n = 268), dasatinibom (n = 105) alebo nilotinibom (n = 108) bolo dokázané, že pacienti s transkriptom e14a2 dosahovali vyšší počet MMR a MR4.5 (12). Neboli však potvrdené žiadne signifikantné rozdiely v pravdepodobnosti 5-ročného EFS alebo OS medzi jednotlivými typmi. Rozdiely v prognostickom význame typu transkriptov v jednotlivých klinických štúdiách môžu súvisieť s odlišnými miestami odberu vzorky, typu použitej BCR-ABL1 metódy, typu liečebnej modality a odlišného hodnotenia výsledkov liečby. Vzhľadom na uvedené skutočnosti (nonkonzistenciu prognostického významu v jednotlivých KS), hlavne v súvislosti s výsledkami prežívania, dôkazy z týchto KS v súčasnosti nepodporujú inkorporáciu typu transkriptu do klinických odporúčaní.

### Prídatné chromozomálne abnormality

Okrem prídavného Ph chromozómu boli približne u 7 % pacientov s CML opísané v čase diagnózy aj ďalšie chromozómové abnormality. Prídatné chromozómové abnormality môžu byť detegované vyšetrením metafáz klasickou cytogenetikou kostnej drene alebo FISH. Vysokorizikové 'major route' cytogenetické abnormality vrátane Ph duplikácie, izochrómu 17q a trizómie 8 sa spájajú so signifikantne horším dosiahnutím MR a kratším OS v porovnaní s pacientmi so štandardnou translokáciou BCR-ABL1. Týmto testom však chýba senzitivita, ktorá je potrebná na monitorovanie nízkych hladín reziduálnej choroby. Celogenómové sekvenovanie (WGS) a RNA-sekvenovanie (RNAseq) sú významné technológie, ktoré sa používajú k detekcii štruktúrnych variácií a fúzných génov (8, 12). WGS bola použitá na identifikáciu amplifikácie BCL2 v súvislosti s niektorými mutáciami (T315I, F359V) u ponatinib-rezistentných CML pacientov. V *in vitro* skúšaní autori dokázali, že primárne CD34+ CML bunky pacienta mali zvýšenú senzitivitu k BCL2 inhibítoru, ABT-263, čo poukazuje na možný potenciál WGS metódy identifikovať mechanizmy rezistencie. V ďalšom klinickom skúšaní bol nájdený nový fúzny gén (RNF213-SLC26A11) u CML pacienta použitím RNAseq, ale klinický význam tohto nálezu zostáva neznámy. Cílené sekvenčné panely, ktoré by uľahčili sekvenovanie hlbších oblastí, ponúkajú alternatívne otázky na detekciu fúzných génov. Technológia obohatená o jednoduché primery použitá pomocou Ovation Fusion Panel Target Enrichment System (NuGen, California, USA), ktorá umožňuje cieľné RNA sekvenovanie známych fúzných génov alebo fúzných génov so známymi partnermi, dokázala identifikovať viac fúzií použitím menšieho množstva „readov“ než štandardná RNAseq (12). Touto metódou boli úspešne detegované BCR-ABL1 fúzie v Universal Human Reference RNA, ale detekcia ďalších iniciálne významných fúzií nebola opísaná. Z tohto dôvodu nie je dosiaľ možné klinické použitie týchto techník.

### Záver

Hĺbka včasného dosiahnutia molekulovej odpovede signifikantne koreluje s efektivitou dlhodobej liečby u pacientov s CML. Preto molekulové monitorovanie, ktoré analyzuje aj nízke hladiny transkriptov počas terapie TKI, má pri CML veľký význam. Okrem pokroku v kvantitatívnych molekulových technikách s cieľom určenia hĺbky odpovede, významný pokrok pre senzitivitu a detekciu rezistentných BCR-ABL1 KD mutácií znamenajú aj NGS technológie, čo dovoľuje personalizovaný prístup v liečbe CML pacientov. V kontraste so zvýšenou senzitivitou detekcie BCR-ABL1 sú ešte mnohé oblasti výskumu s neurčeným klinickým významom, čo brzdí ich transláciu do klinického manažmentu CML. Avšak neustále pokroky v genetikých technológiách sú významnou cestou k identifikácii nových mechanizmov rezistencie a progresie ochorenia, ktoré budú inkorporované do molekulového monitorovania, a tak aj prognózy v liečbe CML v blízkej budúcnosti. Vzhľadom na rýchlosť poznatkov týkajúcich sa technologického pokroku, ako aj monitorovacích schém a zmien v terapeutickom rozhodovaní sa vyžaduje úzka spolupráca medzi hematológom/onkológom a laboratórnym profesionálom.

### Literatúra

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R et al. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127 (20): 2391-1406.
2. Alikian, M., Ellery, P., Forbes, et al. (2016) Next generation sequencing-assisted DNA-based digital PCR for a personalized approach to the detection and quantification of residual disease in chronic myeloid leukemia patients. *J Mol Diagn JMD* 18: 176-189.
3. Baccarani, M., Deininger, M., Rosti, et al. (2013) European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 122: 872-884.
4. Bartley, P., Latham, S., Budgen, B, et al. (2015) A DNA real time quantitative PCR method suitable for routine monitoring of low levels of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *J Mol Diagn JMD* 17: 185-192.
5. Branford, S. (2016) Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia- how low can you go? *Hematology*, 58th ASH Annual Meeting, San Diego, CA, December 3-6: 5156-163.
6. Cayuela, J., Macintyre, E., Darlington, M, et al. (2011) Cartridge based automated BCR-ABL1 mRNA quantification: solving the issues of standardization, at what cost? *Haematologica* 96: 664-671.
7. Enjeti, A., Granter, N., Ashraf, A., et al. (2015) A longitudinal evaluation of performance of automated BCR-ABL1 quantitation using cartridge-based detection system. *Pathology* 47: 570-574.

8. Hughes, T., Branford, S. (2006) Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Rev* 20: 29–41.
9. Hehlmann, R., Müller, M., Lauseker, M., et al. (2014) Deep molecular response is reached by the majority of patients treated with imatinib, predicts survival, and is achieved more quickly by optimized high-dose imatinib: results from the randomized CML-study IV. *J Clin Oncol* 32: 415–423.
10. Etienne, G., Dulucq, S., Nicolini, F., et al. (2014) Achieving deeper molecular response is associated with a better clinical outcome in chronic myeloid leukemia patients on imatinib front-line therapy. *Haematologica* 99: 458–464.
11. Cross, N., White, H., Colomer, D., et al. (2015) Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 29: 999–1003.
12. Marum J, Branford S. (2016): Current developments in molecular monitoring in chronic myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol* 7(5) 237-251.
13. Franke, G., Maier, J., Wildenberger, K., et al. (2015) Quantification of BCR-ABL with digital PCR results in a significantly lower rate of deep molecular responses when compared to RT-qPCR in CML patients treated in the ENEST 1st trial. *Blood* 126: 135–135.
14. Huang, A., Salcius, J., Wong, C., et al. (2015) International scale (IS)-standardized BCR-ABL1 digital polymerase chain reaction (dPCR) assays using ABL1, BCR, and GUS control genes for measuring deep molecular response (MR) in chronic myeloid leukemia (CML). *Blood* 126: 136–136.
15. Jennings, L., George, D., Czech, J., et al. (2014) Detection and quantification of BCR-ABL1 fusion transcripts by droplet digital PCR. *J Mol Diagn* 16: 174–179.
16. Pagani, I., Spinelli, O., Mattarucchi, E., et al. (2014) Genomic quantitative real-time PCR proves residual disease positivity in more than 30% samples with negative mRNA-based qRT-PCR in chronic myeloid leukemia. *Oncoscience* 1: 510–521.
17. Deininger, M., Hodgson, J., Shah, N., et al. (2016) Compound mutations in BCR-ABL1 are not major drivers of primary or secondary resistance to ponatinib in CP-CML patients. *Blood* 127: 703–712.
18. Kluk MJ, Lindsley RC, Aster JC, et al. (2016) Validation and implementation of a custom next-generation sequencing clinical assay for hematologic malignancies. *J. Mol. Diagn.* 18 (4): 507-515.
19. Kuo F, Steensma D, Cin P. (2017) Conventional cytogenetics for myeloid neoplasms in the era of next-generation-sequencing. *Am J Hematol.* 92227-229.
20. Linhartova, J., Hovorkova, L., Soverini, S. et al. (2015) Characterization of 46 patient-specific BCRABL1 fusions and detection of SNPs upstream and downstream the breakpoints in chronic myeloid leukemia using next generation sequencing. *Mol Cancer* 14: 89.
21. Parker, W., Yeung, D., Yeoman, A., et al. (2016) The impact of multiple low-level BCR-ABL1 mutations on response to ponatinib. *Blood* 127: 1870–1880.
22. Soverini, S., De Benedittis, C., Machova Polakova, K. et al. (2013) Unraveling the complexity of tyrosine kinase inhibitor-resistant populations by ultra-deep sequencing of the BCR-ABL kinase domain. *Blood* 122: 1634–1648.
23. Soverini, S., De Benedittis, C., Mancini, M. et al. (2015) Mutations in the BCR-ABL1 kinase domain and elsewhere in chronic myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 15: S120–S128.
24. Kastner, R., Zopf, A., Preuner, S., et al. (2014) Rapid identification of compound mutations in patients with Philadelphia positive leukaemias by long-range next generation sequencing. *Eur J Cancer* 50: 793–800.
25. Dmytrenko, I., Fedorenko, V., Shlyakhtychenko, T., et al. (2015) Assessment of response to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia with e13a2 and e14a2 transcripts of BCR/ABL1 gene. *Probl Radiac Med Radiobiol* 20: 328–340.
26. Hanfstein, B., Lauseker, M., Hehlmann, R., et al. (2014) Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *Haematologica* 99: 1441–1447.

**MUDr. Adriana Kafková, PhD.**  
HEMKO, s. r. o., Hematologická  
a onkohematologická  
ambulancia, Košice

