

Nové perspektívy v cytogenetike a klasifikácii pediatrickej akútnej lymfoblastovej leukémie

Mgr. Anita Vaská¹, Mgr. Ágnes Baranyaiová¹, RNDr. Katarína Skalická, PhD.¹,
doc. MUDr. Alexandra Kolenová, PhD.²

¹Pracovisko klinickej a molekulovej genetiky, Detská klinika LF UK a DFNSP, Bratislava

²Klinika detskej hematológie a onkológie LF UK a DFNSP, Bratislava

Akútna lymfoblastová leukémia (ALL) je geneticky heterogénne ochorenie spôsobené malígnou transformáciou kmeňovej hematopoetickej bunky. Významný technologický pokrok v identifikácii genetických markerov priniesol nielen nové poznatky o genetickom pozadí a mechanizme vzniku ALL, ale prispel aj k presnejšiemu zaradeniu pacientov do rizikových skupín a k vývoju nových terapeutických postupov. Vďaka tomu v súčasnosti ALL patrí medzi najlepšie charakterizované onkologické ochorenie. Tento článok poskytuje aktuálny prehľad o nových možnostiach v diagnostike a klasifikácii pacientov.

Kľúčové slová: detská akútna lymfoblastová leukémia, cytogenetika, genomika, klasifikácia

New perspectives in cytogenetics and classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) belongs to the genetically heterogeneous diseases caused by malignant transformation of hematopoietic stem cells. Significant technological advances in the identification of genetic markers has brought not only new knowledge of the genetic background and mechanisms of ALL, but also contributes to more accurate classification of patients into risk groups and the development of new therapeutic procedures. Currently ALL is the one of the best characterized cancer. This article provides an overview of the new possibilities in the diagnosis and classification of patients.

Key words: pediatric acute lymphoblastic leukemia, cytogenetics, genomics, classification

Úvod

Akútna lymfoblastová leukémia (ALL) je najčastejšie malígne ochorenie u detí. U detí mladších ako 15 rokov zodpovedá približne za 25 % všetkých onkologických malignít a 80 % všetkých detských leukémií. Ročná incidencia v Slovenskej republike dosahuje približne 30 nových prípadov (1). ALL predstavuje biologicky a geneticky heterogénne ochorenie asociované so širokým spektrom genetických faktorov, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu vo vývine ochorenia. Cytogenetická analýza umožňuje detekciu chromozómových a genetických aberácií, čím sa stala zásadnou a nevyhnutnou súčasťou diagnostiky ochorenia a zaradenia pacientov do rizikovej skupiny, a tým aj zásadne ovplyvňuje aj spôsob liečby. Okrem toho viedla aj k lepšiemu pochopeniu mechanizmu leukomogenézy, vďaka čomu v súčasnosti ALL patrí medzi najlepšie charakterizované onkologické ochorenie. Stratifikácia pacientov podľa cytogenetických markerov a podľa odpovede na liečbu zvýšili mieru celkového prežitia z 10 % až takmer na 90 %. Napriek súčasnej vysokej miere vyliečenia zostávajú relaps ochorenia a následná rezistencia na liečbu významným klinickým problémom (2). Cieľom súčasných štúdií je dosiahnuť vyššiu mieru prežitia, a to zavedením výsledkov genomických štúdií do klinickej praxe s cieľom

zlepšiť klasifikáciu jednotlivých podtypov ALL a identifikovať nové genetické markery, ktoré by boli nápomocné v predikcii rizika zlyhania liečby a vo vyvinutí nových a cielených terapií.

Genómová éra v diagnostike ALL

Drvivá väčšina chromozómových abnormalít spojených s ALL bola pôvodne identifikovaná **konvenčnou cytogenetickou analýzou** (karyotypizácia), ktorá je dodnes uznávaná za zlatý štandard v cytogenetickej diagnostike. Poskytuje simultánny prehľad o všetkých mikroskopicky detegovateľných chromozómových aberáciách v leukemických bunkách. Vzhľadom na počet technických limitov tejto metodiky (ťažko dosiahnuteľné metafázové bunky, nízka rozlišovacia schopnosť, zlá morfológia chromozómov) však sama nie je postačujúca na stanovenie presnej diagnózy. Z tohto dôvodu cytogenetická diagnostika vyžaduje ďalšie dopĺňajúce technológie molekulárnej genetiky. **Fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH), reverzne transkripčná polymerázová reťazová reakcia (RT-PCR) a multiplexná hybridizácia ligovaných prúb (MLPA)** dokážu prekonať spomenuté limity konvenčnej cytogenetiky a zvýšiť detekčný záchyt abnormalít v genómoch pacientov. V porovnaní so štandardnou cytogenetikou sú

citlivejšie a majú aj vyššie rozlišovacie schopnosti, preto sú vhodnejšie na zachytenie menších (kryptických) štrukturálnych a numerických zmien (50 – 100 kb) vrátane vyvážených prestavieb (fúzijských génov) a mikrodélií. Keďže ide o ciele prístupy s obmedzeným počtom sond, v súčasnosti sú používané na diagnostiku častých a klinicky relevantných aberácií (3).

V dôsledku nízkeho rozlišovania a úzkej cieľovej špecifity rutinných metód len približne u 75 % detských ALL prípadov je možné zistiť prognosticky významné chromozómové abnormality. V zostávajúcich 25 % detí s ALL (vrátane detí s relapsom) chýba kľúčový genetický marker, čo komplikuje terapeutické rozhodnutie. Vyvinutie vysoko rozlišovacích genetických metód na princípe microarray poskytli možnosť skúmať celý genóm malígnych buniek na väčšej úrovni rozlíšenia, s čím stále prispievajú k presnejšiemu definovaniu diagnóz, k detekcii nových genetických zmien a k lepšiemu pochopeniu zložitosti leukemického genómu (4).

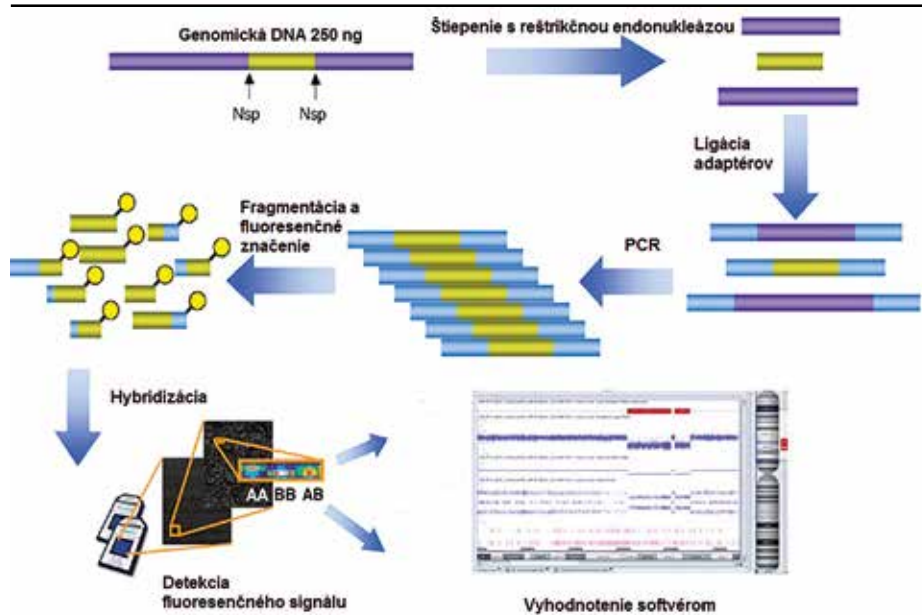
V poslednom desaťročí bolo vynaložené veľké úsilie na zmapovanie zmien v počte kópií DNA (CNA – copy number alteration) na úrovni celého genómu prostredníctvom microarray technológií, a to komparatívnej genómovej hybridizácie (aCGH) a analýzy jednonukleotidových polymorfizmov (SNP

array). Štúdie založené na **SNP array** boli významným medzníkom v diagnostike ALL. Vďaka svojej vysokej rozlišovacej schopnosti zohrávala kľúčovú rolu v odhalení nových génov asociovaných s ALL, ale aj s vysokým rizikom relapsu (5, 6). Výnimočnosť tejto metódy spočíva v tom, že súčasne poskytuje nielen informácie o genotype, ale aj o detekcii stavu v počte kópií, somatických strát heterozygotnosti s neutrálnym počtom kópií (CN-LOH), ktorá sa označuje aj ako somatická uniparentálna dizómia (UPD) (obrázok 1). Somatická UPD je častý genetický jav v onkologických ochoreniach, ktorá narušením tumor-supresorových génov, onkogénov s mutáciami alebo metylačnou zmenou génov sa podieľa na pozitívnej selekcii nádorového klonu a ovplyvňuje vývin leukémie. Je charakterizovaná stratou jednej alely v danej oblasti, ktorá zvyčajne vzniká počas klonálnej expanzie rakovinových buniek. Následné stratené segmenty sú nahradené duplikáciou identickej oblasti homológneho páru chromozómu, čo vedie k javu CN-LOH (UPD) bez akýchkoľvek zmien v počte kópií. CN-LOH môže zahŕňať celé alebo len časti chromozómov. Keďže detekcia UPD je založená na identifikácii veľkých homozygotných oblastí, SNP array s polymorfnými próbmami sú najlepšimi nástrojmi na molekulárnu karyotypizáciu hematologických malignít (5, 7). Vzhľadom na to, že rozlíšenie SNP array úzko súvisí s hustotou a umiestnením prôb pozdĺž chromozómov, prôby umiestnené podľa výskytu SNP nepokrývajú rovnomerne celý genóm a nepolymorfné oblasti ostávajú slabšie pokryté. Na prekonanie týchto limitov v súčasnosti bolo vyvinutých niekoľko komerčných platforiem, ktoré ponúkajú kombináciu polymorfných a nepolymorfných prôb s pokrytím stovky až tisícok génov. Vďaka čomu je už možné v jednej analýze identifikovať genetické zmeny celého genómu nielen na úrovni somatických mutácií, ale aj chromozómových aberácií. V dôsledku čoho umožnia získať nielen ucelený pohľad na molekulový mechanizmus ALL, ale postupne sa stávajú významnou súčasťou klasifikačného systému pacientov.

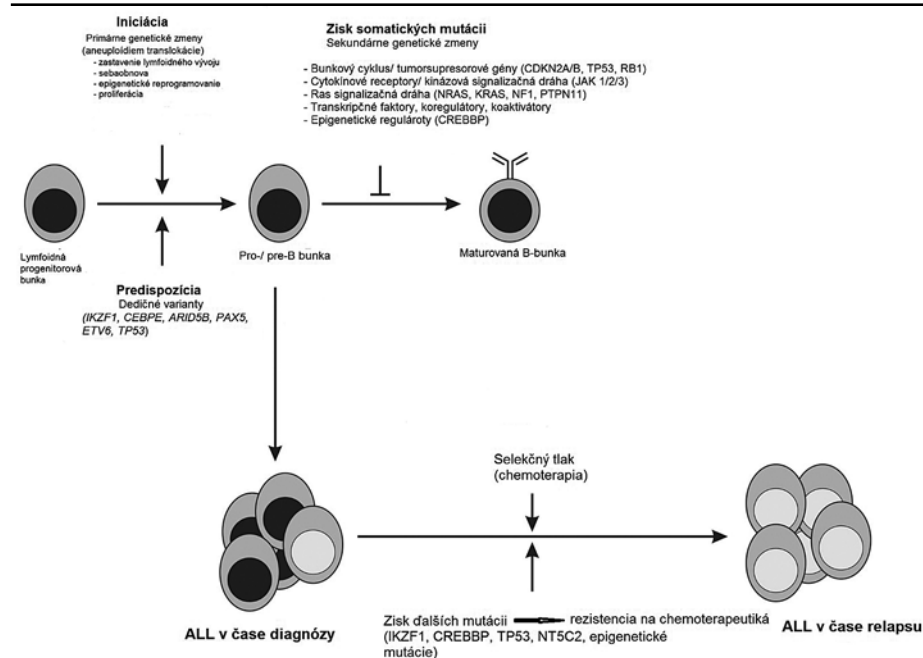
Nové poznatky o patogenéze ALL

Celogenómové analýzy viedli k odhaleniu, že v čase diagnózy je prítomných niekoľko rôznych leukemických subklonov v kostnej dreni. Tieto nesú rovnakú základnú (primárnu) aberáciu, ale líšia sa v získaných sekundárnych zmenách. Primárne aberácie sú zodpovedné za vytvorenie preleukemického klonu, ktorý po získaní ďalších sekundárnych alebo koope-

Obrázok 1. Princíp SNP array. Genomická DNA pacienta pomocou reštrikčného enzýmu (NspI) sa rozštiepi na menšie fragmenty. Ku koncom jednotlivých fragmentov DNA sa pridávajú adaptéry, ktoré so svojou špecifickou sekvenciou slúžia na naviazanie univerzálnych primerov. Pomocou primerov sa namnožia jednotlivé fragmenty. Fragmenty PCR produktov sa fluorescenčne označujú a hybridizujú k próbam na čipe. Po zachytení intenzity signálu a pomocou softvéru sa vyhodnotia nevyvážené genomické zmeny a genotypy (prevzaté a prerobené podľa 30).



Obrázok 2. Schéma genetickej patogenézy B-ALL. Niektoré dedičné varianty sa podieľajú na predispozícii ALL. Iniciačné genetické zmeny sú získané progenitorovými bunkami. Sekundárne zmeny zastavujú lymfoidný vývoj a narušujú viaceré bunkové dráhy, čo vedie ku klinickému prejavu leukémie. V čase diagnózy ALL je polyklonová. Iniciačná terapia potláča alebo eliminuje dominantné proliferatívne klony. Zvyškové bunky buď obsahujú, alebo následne získajú mutácie, v dôsledku čoho sa tieto bunky stávajú chemorezistentnými. Zriedkavejším prípadom je, keď relapsové klony nenesú žiadne genetické mutácie identické s diagnostickým klonom. V takomto prípade sa vytvorí sekundárna leukémia s genetickou predispozíciou (prerobený podľa 11).



rujúcich genetických zmien vedie k prejavu ALL. Od vzniku preleukemického klonu môže uplynúť niekoľko rokov až do získania sekundárnych zmien. Medzi primárne genetické zmeny patria chromozómové translokácie a veľké chromozómové aneuploidné zmeny,

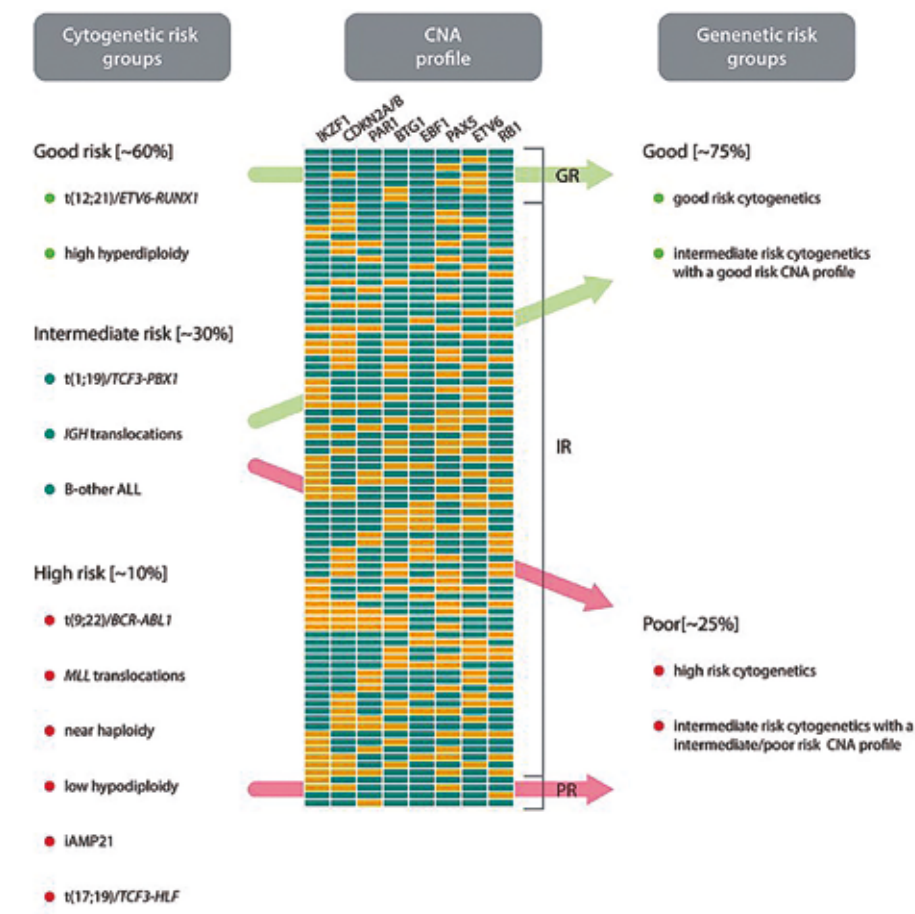
kým sekundárne abnormality sú zvyčajne zmeny v počte kópií (CNA) a bodové mutácie. Tieto sú prítomné vo všetkých bunkách leukemického klonu a definujú kľúčové charakteristiky leukémie. Naopak, sekundárne abnormality sú prítomné iba v podskupine leukemických buniek

Tabuľka. Prehľad kooperujúcich mutácií v genetických podtypoch B-ALL (prevzaté a prerobené podľa 9)

Kooperujúce sekundárne abnormality				
Primárne chromozómové abnormality	Lymfoidná diferenciácia	Regulácia bunkového cyklu	Proliferačná a prežívacia buniek	Transkripčné kofaktory
t(12;21)/ETV6-RUNX1	PAX5			ETV6, BTG1, TBLX1
high hyperdiploidy			KRAS, NRAS	CREBBP
t(1;19)/TCF3-PBX1	TCF3, PAX5	CDKN2A/B		
IGH translocations	IKZF1	CDKN2A/B		
B-other ALL	PAX5, IKZF1	CDKN2A/B	KRAS, NRAS, CRLF2, JAK2	
t(9;22)/BCR-ABL1	PAX5, IKZF1	CDKN2A/B		
MLL translocations		CDKN2A/B	KRAS, NRAS, FLT3	
IAMP21		RB1	RAS, FLT3, CRLF2	
complex karyotype		TP53		
near haploidy		CDKN2A/B	KRAS, NRAS, NF1	
low hyperdiploidy	IKZF2	TP53, RB1		

LEUKEMOGENÉZA

Obrázok 3. Návrh nového klasifikačného systému na základe primárnych chromozómových abnormalít a CNA profilu pacienta v detskej B-ALL. CNA profil je založený na spoločnom výskyt ošmich najčastejších deletovaných génov v B-ALL a hladine MRD (deletované gény sú označené žltou farbou). U pacientov s vysokým alebo nízkym rizikom integrácie CNA profilu do klasifikačného systému neovplyvňuje pôvodné zaradenie pacientov do rizikových skupín. Avšak pacienti so stredným rizikom (najmä B-other) na základe CNA profilu je možné zaradiť do skupiny s nízkym alebo vysokým rizikom. V dôsledku čoho u B-other pacientov s nízkym rizikom so znížením intenzity liečby je možné dosiahnuť zlepšenie dlhodobých výsledkov (prevzaté podľa 9).



a vedú ku komplexnému vetveniu subklonálnej architektúry (obrázok 2). SNP array technológie potvrdili, že genóm ALL buniek obsahuje široké spektrum CNA. V priemere na jeden prípad pripadá 6 až 8 CNA, čo je v porovnaní s genómom solidných tumorov oveľa menej. Zaujímavosťou je, že počet CNA varíuje aj v rámci jednotlivých molekulových podskupín ALL, napr. MLL prestavby sú charakterizované s malým počtom získaných mutácií, kým podskupiny *BCR-ABL1* a *ETV-RUNX1* sú asociované približne so 6 zmenami. Tento jav naznačuje to, že prestavba MLL je schopná sama indukovať leukemickú transformáciu, kým *BCR-ABL1* a *ETV-RUNX1* vyžadujú ďalšie zmeny na indukciu leukémie. Na základe týchto poznatkov je možné tvrdiť, že existuje korelácia medzi primárnymi genetickými abnormalitami a spektrom sekundárnych (kooperujúcich) mutácií (4, 8, 9).

Avšak nie každá genetická zmena má vplyv na biologický vznik či progresiu leukémie a nie je ľahké ich odlíšiť. Drvivá väčšina zmien pôsobí buď ako primárna, alebo sekundárna abnormalita. Hoci s pribúdajúcimi znalosťami o biológii ALL a s ďalšími publikovanými údajmi sa preukázalo, že niektoré aberácie, ktoré pôvodne boli považované za vedľajší nálež, hrajú dôležitú úlohu v procese leukomogenézy (8, 9).

S heterogenitou leukemickej populácie súvisí aj fakt, že asi u polovice pacientov s relapsom, leukemický klon v čase relapsu nie je totožný s dominantným klonom z času diagnózy. Štúdie porovnávajúce vzorky z času diagnózy a z času relapsu potvrdili, že relapsový klon je často odvodený od niektorých z minoritných klonov z času diagnózy (10). V prípade skutočného relapsu primárne aberácie sa zachovávajú, ale získavajú sa rôzne sekundárne zmeny. Často sa v relapse objavujú aberácie spojené s vyššou agresivitou či rezistenciou buniek na chemoterapiu, ktoré môžu vzniknúť v dôsledku selektívneho tlaku v priebehu intenzívnej liečby (8, 11).

Revolúcia v klasifikácii ALL

Vzhľadom na to, že primárne genetické abnormality definujú kľúčové vlastnosti klonu, sú považované za spoľahlivejšie prognostické markery ako sekundárne abnormality. Preto väčšina skríningových algoritmov pre klasifikáciu pacientov do rôznych rizikových skupín odporúča skríning primárnych kľúčových chromozómových abnormalít. V poslednom čase vďaka moderným celogenómovým metódam (SNP array alebo cieľené sekvenovanie génov) cieľom súčasných štúdií sa stalo nielen

hľadanie nezávislých prognostických prediktorov, ale aj integrácia sekundárnych CNA do existujúcej cytogenetickej klasifikácie rizikových skupín (obrázok 3, tabuľka).

Genetické biomarkery s priaznivým prognostickým významom

Vysoká hyperdiploidia (51 – 65 chromozómov) a *t(12;21)/ETV6-RUNX1* (alebo *TEL/AML1*) patria medzi najlepšie charakterizované diagnostické a prognostické markery, ktoré sa vyskytujú približne u 60 % pediatrických a dospievajúcich ALL pacientov. Pediatrickí pacienti po podávaní štandardnej terapie majú veľmi dobré výsledky a miera ich 5-ročného prežitia dosahuje až 90 %. Skúmaním prognostickej relevancie sekundárnych genetických markerov (delécie *IKZF1*, delécie *ETV6*, mutácie v Ras signálizačnej dráhe) v týchto dvoch podskupinách sa neidentifikovali spoľahlivé sekundárne biomarkery, ktoré by mohli byť univerzálne použiteľné v klasifikácii ALL (12, 13).

Genetické biomarkery s nepriaznivým prognostickým významom

Medzi najznámejšie nepriaznivé prognostické biomarkery patria translokácie *MLL (KMT2A)*, *t(9;22)/BCR-ABL1*, *t(17;19)/TCF3-HLF* a **hypodiploidia**. Pacienti s jedným z týchto piatich abnormalít sú klasifikovaní do vysokého rizika a liečia sa najintenzívnejšou terapiou. Avšak napriek zintenzívneniu liečby niektoré podtypy majú stále veľmi nepriaznivú prognózu a ďalšie zintenzívnenie liečby by znamenalo vyššiu a závažnejšiu akútnu aj neskorú toxicitu. Na zlepšenie celkových výsledkov ALL pacientov s vysokým rizikom je potrebné včasné identifikovanie týchto pacientov, a to už v čase iniciálnej diagnózy a následne vyvinutie cielej liečby (4).

Každá spomenutá translokácia je ľahko zistiteľná pomocou cytogenetiky, FISH alebo RT-PCR. Hypodiploidia sa vyskytuje u 1 % detských prípadov. Je definovaná masívnou chromozómovou stratou, v dôsledku čoho počet chromozómov klesne pod 44. Nedávne štúdie našli kľúčové sekundárne mutácie v génoch *RAS* a *TP53*, ktoré sú spúšťačmi vzniku hypodiploidného genómu. Existujú prípady, kedy hypodiploidný genóm zdvojnásobením chromozómov spôsobuje falošnú hyperdiploidiu, čo môže viesť k nesprávnemu rozhodnutiu liečby. Avšak pomocou SNP-array takéto prípady môžu byť spoľahlivo odhalené (14).

Dramatické zlepšenie výsledkov liečby sa dosiahlo u pacientov s fúznym génom *BCR-ABL1* po vyvinutí cielej liečby s inhibítormi tyrozínových kináz, ktoré v kombinácii

so štandardnou terapiou priamo inhibujú účinok leukomogenných *BCR-ABL1* onkoproteínov (15 Biondi, 2012). Nedávne štúdie MLL prestavieb zdôraznili epigenetickú dysreguláciu v tejto skupine pacientov, čo zvyšuje možnosť vytvorenia cielej terapie použitím inhibítora histón metyltransferázy (9, 16).

TCF3-PBX1 (alebo E2A-PBX1)

Približne 3 % detí s ALL nesie translokáciu *t(1;19)*, ktorá v 95 % prípadov vedie k vzniku fúzneho génu *TCF3-PBX1*. Je ideálnym prognostickým biomarkerom, ktorý sa ľahko a spoľahlivo deteguje metódou konvenčnej cytogenetiky FISH a RT-PCR. Prvotné štúdie považovali túto translokáciu za nepriaznivý prognostický marker u detských pacientov. Nedávne štúdie však po zintenzívnení liečby preukázali výrazne zlepšenie výsledkov pacientov (OS > 80 %). Niektoré štúdie preukázali asociáciu s relapsom centrálného nervového systému (CNS) a s nepriaznivými výsledkami po prvom relapse. Klinická heterogenita tejto skupiny môže naznačiť prítomnosť ďalších prognostických biomarkerov (17, 18).

Intrachromozomálna amplifikácia chromozómu 21 (iAMP21)

V posledných niekoľkých rokoch sa iAMP21 stala dôležitým prognostickým a prediktívnym biomarkerom v detskej ALL. Je to vzácna aberácia, ktorá sa vyskytuje u 2 % pediatrických ALL prípadov bez rekurentnej chromozómovej translokácie. iAMP21 je definovaná prítomnosťou najmenej 3 kópií génu *RUNX1(AML1)* na chromozóme 21. Je charakterizovaná vyšším vekom detských pacientov (medián veku 9), ale nižším počtom bielych krviniek. Na základe analýzy prežitia pacientov sa preukázalo, že majú vyššie riziko relapsu (> 80 %), ak sú liečení podľa štandardného protokolu. Intenzívnejšia terapia v tejto skupine pacientov môže výrazne znížiť riziko relapsu (< 20 %) (19).

Translokácie zahŕňajúce IGH lokusu

Nedávne štúdie odhalili rozsiahlu sieť *IGH* (ťažký reťazec imunoglobulínu) translokácií špecifických pre B bunkovú ALL, ktoré vedú k nadmernej expresii rôznych onkogénov. Najpozoruhodnejším klinickým javom v tejto skupine je vekový profil pacientov. Frekvencia translokácií je nižšia u pacientov mladších ako desať rokov (< 3 %), ale výrazne vyššia u dospievajúcich a mladých dospelých. Pacienti s *IGH* translokáciami majú horšie výsledky v porovnaní s ostatnými pacientmi (20).

B-other ALL

Skupina pacientov, u ktorej sa primárne genetické zmeny neidentifikujú, sa označuje ako B-other ALL. Objasnenie genetického pozadia tejto skupiny bolo hlavným cieľom výskumného úsilia v posledných desiatich rokoch. V hľadaní a určení biomarkerov zohrávala SNP array podstatnú rolu. Objavilo sa množstvo mikrodelécií v génoch kľúčových dráh, v dôsledku čoho ďalším cieľom mnohých štúdií sa stalo definovanie prognostickej úlohy jednotlivých nálezov a CNA profilu. Metodický prístup ako analýza exprese génov umožnila určiť cytogenetické podskupiny v rámci B-other ALL a zároveň prispela aj k objaveniu nových cytogenetických podskupín (11).

Delécia v géne IKZF1 a ERG

Delécia *IKZF1* (Ikaros) génu sa vyskytuje u 15 % detských pacientov a u 30 % dospelých pacientov, ale oveľa častejším výskytom sa objavuje u pacientov s *BCR-ABL* fúznym génom. Delécia *IKZF1* génu je asociovaná s klinickými príznakmi vysokého rizika, ako sú vyšší vek, vysoký počet bielych krviniek, perzistujúca minimálna reziduálna choroba (MRD) alebo Downov syndróm. Podľa prvotných štúdií bola spojená s nepriaznivou prognózou, preto sa uvažovalo o zaradení tejto aberácie do stratifikačného systému liečby ALL. Súčasné štúdie založené na súbore s väčším počtom pacientov však potvrdili pleiotropický (heterogénny) účinok *IKZF1* génu (21, 22). Zistilo sa, že ak pacient má deléciu v géne *IKZF1*, ale má aj iné genetické abnormality so štandardným rizikom (delécia *ERG* alebo *ETV-RUNX1*), nepriaznivý prognostický vplyv *IKZF1* sa naruší a pacient so súčasným výskytom oboch aberácií bude mať dobrú prognózu (23, 24). Niektoré súčasné štúdie uvádzali, že *IKZF1* delécia nemá prognostický význam u pacientov s rýchlym vymiznutím choroby. Naopak, prognostický efekt je obmedzený alebo oveľa silnejší u pacientov s horšou reakciou na iniciačnú terapiu. Spojenie s vyšším rizikom druhého relapsu alebo s úmrtím po prvom relapse však nebolo potvrdené. Silný prognostický efekt sa preukázal v skupine pacientov s *BCR-ABL1* fúznym génom počas liečby s inhibítormi tyrozínových kináz. Pacienti s *IKZF1* deléciou reagovali horšie na terapiu, čo zdôrazňuje potrebu alternatívnych terapií (25). Preto je veľmi pravdepodobné, že sekundárne *IKZF1* abnormality sú skôr sekundárnymi markermi nepriaznivých výsledkov ako prognostickými markermi.

Ďalšia podskupina pediatrickej B-other ALL je charakterizovaná monoalaelickou deléciou génu *ERG*. Táto podskupina tvorí 10 – 15 % B-other skupiny, čo celkovo zodpovedá 3 – 5 % všetkých B-ALL prípadov. Pacienti s *ERG* deléciou majú vynikajúce výsledky. Napriek vysokému výskytu *IKZF1* delécií (približne 40 % pacientov), miera ich 5-ročného prežívania dosahuje viac ako 90 %. Delécia *ERG* génu je subklonálnym javom, ktorý môže vzniknúť alebo vymiznúť medzi diagnózou a relapsom (23, 24). Jej úloha a prognostický význam zatiaľ nie sú známe, preto sú potrebné ďalšie štúdie skúmajúce tieto faktory.

Zvýšená expresia *CRLF2*

Zvýšená expresia *CRLF2* môže vzniknúť z fúzie génov *P2RY8-CRLF2*, z prestavby s génom ťažkého imunoglobulínového reťazca (*IGH*) alebo fokálnou deléciou krátkeho úseku pred kódujúcou oblasťou *CRLF2*. Zmeny v *CRLF2* sú spojené s aktiváciou signálnych dráh *JAK-STAT*, *ERK*, *mTOR/PI3K* a mutáciami v *JAK1* alebo *JAK2*. Celková frekvencia *CRLF2* prestavieb v B-ALL je 5 %, ale s oveľa vyššou frekvenciou sa vyskytuje v skupine B-other ALL (30%) a u pacientov s Downovým syndrómom (> 50%). Prognostický význam *CRLF2* nie je úplne jasný, ale môže byť vhodným terapeutickým cieľom najmä u pacientov s Downovým syndrómom, ktorí sú náchyľnejší na toxické vedľajšie účinky chemoterapie (9, 11, 26).

BCR-ABL1 –like (alebo Ph-like)

Táto podskupina tvorí 50 % B-other ALL prípadov a 10 – 15 % všetkých pediatrických prípadov. Expresný profil tejto podskupiny sa zhoduje s expresným profilom pacientov s *BCR-ABL* fúznym génom. Napriek tomu, že u pacientov s Ph-like ALL chýba fúzny gén, vykazujú rovnako zlé výsledky ako pacienti s *BCR-ABL1*. Ph-like ALL je charakterizovaná širokým spektrom genetických zmien (delécia *IKZF1*, prestavby *CRLF2*, *JAK2* mutácie), ktoré narúšajú rad cytokínových receptorov a tyrozínových kináz. Analýza vyše 1700 B-ALL prípadov preukázala, že tieto zmeny predstavujú molekulový terč pre cieľnú terapiu s tyrozínkinázovými inhibítormi (TKI) (27). Členovia tejto podskupiny sú identifikovaní na základe ich rozdielných genomických abnormalít.

T-ALL

T-ALL tvorí 15 – 20 % detských ALL. Je možné ju klasifikovať na základe profilov génovej exprese do niekoľkých zreteľne odlišných genetických

podskupín, ktoré korešpondujú so špecifickými štádiami vývoja T-lymfocytov: *HOX11L2* (nepriaznivá prognóza), *LYL1* plus *LMO2*, *TAL1* plus *LMO1* alebo *LMO2*, *HOX 11* (priaznivá prognóza) a *MLL-ENL* (priaznivá prognóza). Použitím SNP array a ostatných nových genomických techník bolo možné identifikovať veľa nových zmien v genóme, ako je napr.: *NOTCH1* a *FBXW7* mutácie, delécie *RB1*, *PTEN* delécie a mutácie, dysregulácia exprese *TAL1* a *LMO2* a fúzie *SET* s *ABL1* alebo *NUP214* (9).

Včasná T-prekurzorová ALL (ETP-early T precursor) je nedávno opísaný podtyp ALL s vysokým rizikom relapsu. Je charakterizovaná zníženou expresiou T-bunkových markerov (CD1a, CD8 a CD5) a aberantnou expresiou myeloidných a kmeňových bunkových markerov. Táto podskupina tvorí sivú zónu medzi AML a T-ALL. Predstavuje osobitný fenotyp, transkripčný profil a niekoľko ďalších prídavných zmien. Mnohé štúdie uvádzajú veľmi nepriaznivé výsledky, ktoré môžu byť zmiernené kotemporálnou terapiou podľa rizikovej stratifikácie. Je to geneticky veľmi heterogénna skupina. Mutácie sa vyskytujú vo viacerých bunkových dráhach: a) v hematopoetickom a lymfoidnom vývoji (*RUNX1*, *IKZF1*, *ETV6*, *GATA3* a *EP300*), b) v cytokínových receptoroch, v signalizačných dráhach Ras a kinázových dráhach (NRAS, IL7R, KRAS, JAK1, JAK3, NF1, PTPN11 a SH2B3), c) stratové mutácie „loss of function“ v epigenetických regulátoroch (PRC2; EZH2, SUZ12, and EED, *SETD2*). Mutácie a chimérické fúzie zahŕňajúce kinázy v T-ALL podskupine (*ABL1*, *PTK2B* a *JAK2*) môžu byť liečené cieľnou TKI terapiou. Odhalenie genetického pozadia tohto podtypu vyžaduje komplexnú analýzu kódujúcich a nekódujúcich genomických, transkripčomických a epigenetických zmien (11, 28).

Záver

Obrovský technologický pokrok v poslednom desaťročí revolucionizoval molekulárne poznatky v akútnej lymfoblastovej leukémii. Väčšie rozlíšenie/citlivosť a možnosť skúmať celý genóm v jednom kroku prispeli k identifikácii veľmi pestrej škále genetických mutácií (7). Analýzy genetického profilu malígnych buniek poskytli nielen kritický pohľad na leukomogénu, ale viedli aj k účinnejšej liečbe pacientov. Nádorová heterogenita a klonálna evolúcia sú však stále veľkým problémom pri vývoji cieľenej terapie. Sú potrebné ďalšie výskumy na určenie celého repertoáru zdedených a somatických zmien, ktoré prispievajú k zlyhaniu liečby a relapsu ochorenia.

V súčasnosti sa molekulová karyotypizácia prostredníctvom mikročipových technológií postupne stáva nevyhnutnou súčasťou diagnostiky leukemických pacientov. Mnohé laboratória ich bežne používajú ako komplementárnu metódu k štandardným cytogenetickým metódam s cieľom presnej diagnostiky podtypov ALL. Molekulárne metódy založené na sekvenovaní novej generácie (NGS) dokážu prekonať jednotlivé nedokonalosti molekulárných cytogenetických metód a prinášajú komplexnejšiu a podrobnejšiu charakteristiku molekulovej podstaty leukemických buniek, čo v budúcnosti môže vyústiť do personalizovanej liečby pacientov. Na dosiahnutie týchto cieľov však bude potrebné vyšetriť veľké množstvo vzoriek a identifikované zmeny podrobne preštudovať. Integrácia nových genetických poznatkov do klinickej praxe prinesie ďalšie zlepšenie prognózy pre deti s ALL a zníženie nežiaducich účinkov cytostatickej liečby (29).

Literatúra

1. Kolenová A. Akútna lymfoblastová leukémia. Čes-slov Pediat. 2015;70(2):99–107.
2. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. N Engl J Med. 2015;373:1541–1552.
3. Mason J, Griffiths M. Molecular Diagnosis of Leukemia. Expert Rev Mol Diagn. 2012;12(5):511–526.
4. Kolenová A. Akútna lymfoblastová leukémia v detskom veku: od genómu k pacientovi. Onkológia (Bratisl.). 2016;11(1):8–12.
5. Simons A, Sikkema-Raddatz B, Leeuw N, et al. Genom-wide arrays in routine diagnostics of hematological malignancies. Hum Mutat. 2013;34(6):941–948.
6. Wang Y, Miller S, Roulston D, et al. Genome-wide Single-nucleotide Polymorphism Array Analysis Improves Prognostication of Acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. J Mol Diagn. 2016;18(4):595–603.
7. Iacobucci I, Lonetti A, Papayannidis C, et al. Use of single nucleotide polymorphism array technology to improve the identification of chromosomal lesions in leukemia. Curr Cancer Drug Targets. 2013;13(7):791–810.
8. Zuna J, Žaliová M, et al. Etiologie dětských ALL a AML, molekulární genetika, minimální reziduální nemoc. Čes-slov Pediat. 2015;70(2):70–84.
9. Moorman AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2016;101(4):407–416.
10. Ma X, Edmondson M, Yergeau D et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. Nat Commun. 2015;19:66604.
11. Hunger SP, Mullighan CG. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. Blood. 2015;125(26):3977–3987.
12. Enshaie A, Schwab CJ, Konn ZJ, et al. Longterm follow-up of ETV6-RUNX1 ALL reveals that NCI risk, rather than secondary genetic abnormalities, is the key risk factor. Leukemia. 2013;27(11):2256–2259.
13. Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer. 2009;48(8):637–660.
14. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet. 2013;45(3):242–252.

15. Biondi A, Schrappe M, De Lorenzo Pet, al. Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. *Lancet Oncol.* 2012;13(9):936–945.
16. Bernt KM, Zhu N, Sinha AU, et al. MLL rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L. *Cancer Cell.* 2011;20(1):66–78.
17. Jeha S, Pei D, Raimondi SC, et al. Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. *Leukemia.* 2009;23(8):1406–1409.
18. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(5):429–438.
19. Harrison CJ, Moorman AV, Schwab C, et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia.* 2014;28(5):1015–1021.
20. Russell LJ, Enshaie A, Jones L, et al. IGH@ translocations are prevalent in teenagers and young adults with acute lymphoblastic leukemia and are associated with a poor outcome. *J Clin Oncol.* 2014;32(14):1453–1462.
21. Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2009;360(5):470–480.
22. Palmi C, Valsecchi MG, Longinotti G, et al. What is the relevance of Ikaros gene deletions as prognostic marker in pediatric Philadelphia negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia? *Haematologica.* 2013;98(8):1226–1231.
23. Clappier E, Auclerc MF, Rapon J, et al. An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. *Leukemia.* 2014;28(1):70–77.
24. Zaliouva M, Zimmermannova O, Dorge P, et al. ERG deletion is associated with CD2 and attenuates the negative impact of IKZF1 deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2014;28(1):182–185.
25. van der Veer A, Zaliouva M, Mottadelli F, et al. IKZF1 status as a prognostic feature in BCR-ABL1-positive childhood ALL. *Blood.* 2014;123(11):1691–1698.
26. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, et al. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell.* 2012;22(2):153–166.
27. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2014;12:344–357.
28. Chiaretti S, Gianfelici V, Ceglie G, et al. Genomic Characterization of Acute Leukemias. *Med Princ Pract.* 2014;23(6):487–506.
29. Dixon-McIver A. Emerging technologies in paediatric leukaemia. *Transl Pediatr.* 2015;4(2):116–124.
30. Tiu R, Gondek L, O'Keefe C, Maciejewski CP. Clonality of the stem cell compartment during evolution of myelodysplastic syndromes and other bone marrow failure syndromes. *Leukemia.* 2007;21:1648–1657.

Článok je prevzatý z:

Onkológia (Bratislava), 2017; roč. 12(1): 42–47

Mgr. Anita Vaská

Pracovisko klinickej a molekulovej genetiky,
Detská klinika LF UK a DFNsP
Limbová 1, 833 40 Bratislava
anitavasky@gmail.com
