

## ΕΙΔΙΚΟ ΑΡΘΡΟ SPECIAL ARTICLE

# Παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου στην οξεία μυελογενή λευχαιμία με τεχνικές μοριακής βιολογίας Πρόσφατα δεδομένα

Η διαπίστωση της ύπαρξης γονιδιακών μεταλλάξεων, αλλά και αυξημένης έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, κατέδειξε την ετερογένεια των περιπτώσεων της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (ΟΜΛ). Ειδικότερα, κατά την τελευταία δεκαετία έχει διαπιστωθεί η παρουσία μεταλλάξεων σε αρκετά γονίδια (*Flt-3*, *NPM1*, *CEBPA*, *MLL*, *N-RAS*, *RUNX1*, *WT-1*, *IDH*), καθώς και αυξημένη έκφραση άλλων γονιδίων (*WT-1*, *EVI1*, *PRAME*, *BAALC*, *ERG*, *MN-1*). Οι μεταλλάξεις και η αυξημένη έκφραση των προαναφερθέντων γονιδίων κατά κύριο λόγο ανιχνεύονται σε ασθενείς με φυσιολογικού καρυότυπου ΟΜΛ. Η παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (ΕΥΝ) μετά τη χημειοθεραπεία (Χ/Θ) εφόδου και ιδιαίτερα μετά τη Χ/Θ εδραίωσης είναι σημαντική για την αξιολόγηση του κινδύνου υποτροπής της νόσου στον κάθε ασθενή με ΟΜΛ ξεχωριστά. Η επίμονη προσπάθεια πρώιμης ανίχνευσης της υποτροπής (ανοσοφαινοτυπικής ή μοριακής) στους ασθενείς με ΟΜΛ δικαιώνεται από τη δυνατότητα αποτελεσματικότερης αντιμετώπισής της σε σύγκριση με την αιματολογική υποτροπή. Η δυνατότητα παρακολούθησης της ΕΥΝ στην ΟΜΛ με τις μοριακές τεχνικές ενισχύθηκε σημαντικά τόσο από τη χρήση της *real time quantitative polymerase chain reaction* (RQ-PCR), όσο και από την ταυτοποίηση ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων-«στόχων», τα οποία αναφέρθηκαν προηγουμένως. Από την ανασκόπηση των δεδομένων της βιβλιογραφίας προκύπτει το συμπέρασμα ότι η *NPM1* και το *WT-1* αποτελούν τα πλέον υποσχόμενα γονίδια-«στόχους» για την παρακολούθηση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ με την τεχνική της RQ-PCR, πέρα από τα χιμαιρικά γονίδια.

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) είναι μια κλινικά και γενετικά ετερογενής νόσος. Μέχρι σήμερα, τα ευρήματα της κυτταρογενετικής μελέτης κατά τη διάγνωση παρέχουν τις σημαντικότερες πληροφορίες για την πρόγνωση των ασθενών με ΟΜΛ και χρησιμοποιούνται για την κατηγοριοποίησή τους σε τρεις διακριτές προγνωστικές ομάδες (καλής, ενδιάμεσης και κακής πρόγνωσης). Οι ασθενείς της ομάδας καλής πρόγνωσης (25% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων ΟΜΛ) χαρακτηρίζονται από την παρουσία χιμαιρικών γονιδίων (*PML/RARα*, *AML1/ETO*, *CBFB/MYH11*), τα οποία προκύπτουν, αντίστοιχα, από τις ακόλουθες χρωμοσωμιακές αντιμεταθέσεις: t(15;17), t(8;21), inv(16). Τα προαναφερθέντα χιμαιρικά γονίδια αποτελούν απόλυτα ειδικούς «στόχους» για τη μελέτη της ελάχιστης

υπολειμματικής νόσου (ΕΥΝ) στην προαναφερθείσα ομάδα ασθενών με ΟΜΛ. Από την άλλη πλευρά, οι ασθενείς της ομάδας κακής πρόγνωσης (15–20% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων ΟΜΛ) χαρακτηρίζονται από την παρουσία μονοσωμιών, απαλείψεων μακρών σκελών χρωμοσωμάτων και σύνθετων καρυότυπων χωρίς να υπάρχει, στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, συσχέτιση με ειδικά χιμαιρικά γονίδια. Η πλειοψηφία των ασθενών με ΟΜΛ (55–60% περίπου) ανήκει στην ομάδα ενδιάμεσης πρόγνωσης και οι περισσότεροι από αυτούς (το 45% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων ΟΜΛ) εμφανίζουν φυσιολογικό καρυότυπο κατά τη διάγνωση της νόσου. Η διαπίστωση της ύπαρξης γονιδιακών μεταλλάξεων, αλλά και αυξημένης έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, κατέδειξε την ετερογένεια των περιπτώσεων της ΟΜΛ ακόμη και μέσα στις κυτταρογενετικά καθορισμένες προγνωστικές

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2012, 29(1):100–105  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2012, 29(1):100–105

**Ι. Κάκκας**

Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας,  
ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός», Αθήνα

Minimal residual disease  
assessment in acute myeloid  
leukemia by molecular techniques:  
Recent advances

Abstract at the end of the article

### Λέξεις ευρετηρίου

Ελάχιστη υπολειμματική νόσος (ΕΥΝ)  
Οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ)  
*NPM1*  
RQ-PCR  
*WT-1*

Υποβλήθηκε 5.12.2010  
Εγκρίθηκε 15.5.2011

ομάδες, ιδιαίτερα δε στη μεγαλύτερη από αυτές (ενδιάμεσης πρόγνωσης), στην οποία περιλαμβάνονται οι ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο (cytogenetically normal-acute myeloid leukemia, CN-AML). Ειδικότερα, κατά την τελευταία δεκαετία έχει διαπιστωθεί η παρουσία μεταλλάξεων σε αρκετά γονίδια (*Flt-3*, *NPM1*, *CEBPA*, *MLL*, *N-RAS*, *RUNX1*, *WT-1*, *IDH*), καθώς και αυξημένη έκφραση άλλων γονιδίων (*WT-1*, *EVI1*, *PRAME*, *BAALC*, *ERG*, *MN-1*). Οι μεταλλάξεις και η αυξημένη έκφραση των προαναφερθέντων γονιδίων, κατά κύριο λόγο, ανιχνεύονται σε ασθενείς με CN-AML. Οι μεταλλάξεις των *Flt-3*, *NPM1* και *CEBPA* χρησιμοποιούνται ήδη για την προγνωστική κατηγοριοποίηση των ασθενών με CN-AML.<sup>1-4</sup>

Παρόλα αυτά, η εξέλιξη του κάθε ασθενούς ξεχωριστά δεν μπορεί να εκτιμηθεί αξιόπιστα, ενώ είναι γνωστό ότι έναν επιπρόσθετο σημαντικό προγνωστικό παράγοντα αποτελεί ο βαθμός ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία (Χ/Θ) εφόδου. Η παρακολούθηση της ΕΥΝ μετά τη Χ/Θ εφόδου και ιδιαίτερα μετά τη Χ/Θ εδραίωσης είναι σημαντική για την αξιολόγηση του κινδύνου υποτροπής της νόσου στον κάθε ασθενή με OML ξεχωριστά. Κατά την τελευταία εικοσαετία, διάφορες τεχνικές (κυτταρομετρία ροής, τεχνικές μοριακής βιολογίας) έχουν βελτιώσει τη δυνατότητα ανίχνευσης ΕΥΝ κάτω από το όριο ευαισθησίας της κυτταρομορφολογίας και της κλασικής κυτταρογενετικής. Η επίμονη προσπάθεια πρώιμης ανίχνευσης της υποτροπής (ανοσοφαινοτυπικής ή μοριακής) στους ασθενείς με OML δικαιώνεται από τη δυνατότητα αποτελεσματικότερης αντιμετώπισής της σε σύγκριση με την αιματολογική υποτροπή. Η δυνατότητα παρακολούθησης της ΕΥΝ στην OML με τις μοριακές τεχνικές ενισχύθηκε σημαντικά τόσο από τη χρήση της real time quantitative-polymerase chain reaction (RQ-PCR), όσο και από την ταυτοποίηση ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων-«στόχων», τα οποία αναφέρθηκαν προηγουμένως. Στην παρούσα ανασκόπηση, θα μας απασχολήσει η συμβολή της παρουσίας γονιδιακών μεταλλάξεων και της υπερέκφρασης γονιδίων στη μελέτη της ΕΥΝ σε ασθενείς με OML στους οποίους δεν ανιχνεύεται παρουσία χιμαϊρικών γονιδίων.<sup>5-10</sup>

## 2. REAL TIME QUANTITATIVE-POLYMERASE CHAIN REACTION (RQ-PCR)

Η τεχνική της RQ-PCR είναι ενδεχομένως η πλέον αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος παρακολούθησης του φορτίου της νόσου στις αιματολογικές κακοήθειες. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία βασίζεται (α) στη δράση 5-νουκλεάσης της Taq πολυμεράσης και (β) στη δυνατότητα σύνδεσης φθοροχρώματος στο προϊόν της PCR. Χρησιμοποιούνται ειδικοί θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα ανίχνευ-

σης φθορισμού και συνδέονται με κατάλληλα υπολογιστικά συστήματα. Η ένταση φθορισμού προσδιορίζεται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης και είναι ανάλογη της ποσότητας του προϊόντος της PCR. Με βάση την ένταση του χωρίς ειδικότητα φθορισμού (background) καθορίζεται σε κάθε περίπτωση ένα όριο (cut off) αναγκαίο για την αξιολόγηση του αποτελέσματος. Η έκφραση του αποτελέσματος είναι είτε απόλυτη είτε σχετική. Η απόλυτη έκφραση βασίζεται στη χρήση πρότυπης καμπύλης, η οποία προκύπτει από αραιώσεις δειγμάτων πλασμιδιακού DNA με ενσωματωμένο το εξεταζόμενο γονίδιο. Η σχετική έκφραση βασίζεται στη συγκριτική αξιολόγηση του αριθμού των παραγομένων μεταγράφων του γονιδίου-«στόχου», με τον αντίστοιχο των παραγομένων από ένα γονίδιο αναφοράς. Τα χρησιμοποιούμενα γονίδια αναφοράς έχουν σταθερή έκφραση σε όλα τα κύτταρα. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο γονίδιο αναφοράς στη μελέτη των αιματολογικών κακοηθειών είναι το *ABL*.<sup>8-10</sup>

## 3. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

### 3.1. Μεταλλάξεις του Fms-related tyrosine kinase 3 (*Flt-3*) γονιδίου

Το *Flt-3* γονίδιο (χρωμόσωμα 13q12) κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη-υποδοχέα των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Ο ενδογενής αναδιπλασιασμός τμήματος του γονιδίου (*Flt-3* internal tandem duplication, *Flt-3/ITD*) που εντοπίζεται στα exon 14-15 οδηγεί στην επιμήκυνση των παραγομένων μεταγράφων κατά 3-400 βάσεις (συνήθως 30-150). Η επίπτωση του *Flt-3/ITD* στην CN-AML είναι περίπου 35% και στο σύνολο των OML ανέρχεται στο 25-30% περίπου. Όλες οι μελέτες συμφωνούν για την αρνητική προγνωστική αξία του *Flt-3/ITD* στην CN-AML. Από το 2001 έχουν παρουσιαστεί μελέτες στις οποίες επιχειρήθηκε να αξιολογηθεί η σημασία της συγκεκριμένης γενετικής βλάβης στην παρακολούθηση της ΕΥΝ. Η RQ-PCR δεν χρησιμοποιήθηκε ευρέως, επειδή απαιτούνται ειδικοί για κάθε ασθενή εκκινητές (primers). Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε η gene scan analysis μετά από κλασική ή RT-PCR. Στη συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιούνται εκκινητές σημασμένοι με φθορίοχρωμα. Κατά τη διάρκεια τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης, ειδικός ανιχνευτής καταγράφει την ένταση του παραγομένου φθορισμού από τα διαφορετικού μήκους προϊόντα της PCR. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως πηλίκο (ένταση φθορισμού μεταλλαγμένων μεταγράφων *Flt-3*/ένταση φθορισμού φυσιολογικών μεταγράφων *Flt-3*). Η ευαισθησία της μεθόδου είναι σχετικά χαμηλή (1/100-1/1.000) και εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από το αρχικό «φορτίο» των μεταλλαγμένων μεταγράφων του *Flt-3*. Η σταθερότητα έκφρασης

του *Flt-3/ITD* στην υποτροπή της ΟΜΛ δεν θεωρείται δεδομένη (80–95% των περιπτώσεων). Λαμβάνοντας υπ' όψη τα προαναφερθέντα, μάλλον εξηγείται η μη ευρεία διάδοση της χρήσης του *Flt-3/ITD* ως «στόχου» για την παρακολούθηση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ.<sup>17–15</sup>

### 3.2. Μεταλλάξεις του γονιδίου της nucleophosmin (*NPM1*)

Τον Ιανουάριο του 2005 δημοσιεύτηκε η μελέτη των Falini et al, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι σε ένα σημαντικό ποσοστό περιπτώσεων ΟΜΛ υπήρχε μη φυσιολογική αποκλειστικά κυτταροπλασματική εντόπιση –αντί της αναμενόμενης καθ' υπεροχή πυρηνιακής/πυρηνικής εντόπισης– της πρωτεΐνης nucleophosmin (NPM), η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *NPM1* (χρωμόσωμα 5q35). Το εν λόγω φαινόμενο αποδόθηκε σε μεταλλάξεις εντοπιζόμενες στο exon 12 του γονιδίου *NPM1*, οι οποίες οδηγούν στην επιμήκυνσή του κατά τέσσερις βάσεις. Οι λειτουργίες της NPM αφορούν κατά κύριο λόγο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Οι μεταλλάξεις του *NPM1* γονιδίου ανιχνεύονται στο 50% περίπου των ενηλίκων ασθενών με CN-AML και στο 35% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων ΟΜΛ. Κατά συνέπεια, είναι οι συχνότερα ανιχνευόμενες μεταλλάξεις στην ΟΜΛ. Οι μεταλλάξεις του *NPM1* γονιδίου στην παιδική ΟΜΛ είναι αρκετά σπανιότερες (επίπτωση <10%). Όλες πλέον οι μελέτες συμφωνούν για τη θετική προγνωστική αξία της παρουσίας των *NPM1* μεταλλάξεων με σύγχρονη απουσία του *Flt-3/ITD* σε ασθενείς με CN-AML. Έχουν περιγραφεί >30 ποσοτικές παραλλαγές μεταλλάξεων με υπεροχή τριών (A, B και D), οι οποίες καλύπτουν τουλάχιστον το 90% των περιπτώσεων. Από το 2006 και μετά, αρκετές μελέτες έχουν δημοσιευτεί αναφορικά με τη χρήση της RQ-PCR για τη μέτρηση μεταλλαγμένων μεταγράφων *NPM1* κατά την παρακολούθηση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι υψηλή, κυμαινόμενη μεταξύ 1/10.000 και 1/1.000.000. Μελέτες περιπτώσεων ασθενών στη διάγνωση και στην υποτροπή επιβεβαιώνουν τη σταθερή (στο 100% των περιπτώσεων) παρουσία των μεταλλάξεων της *NPM1*. Όλες σχεδόν οι σχετικές μελέτες συμφωνούν ότι η μείωση του αριθμού των μεταγράφων της *NPM1* κατά 2 ή 3 λογαρίθμους μετά τη Χ/Θ εδραϊώσης συνοδεύεται από μικρότερη πιθανότητα υποτροπής της ΟΜΛ, ενώ η άνοδος του αριθμού των μεταγράφων κατά ένα λογάριθμο σε δύο τουλάχιστον συνεχόμενες μετρήσεις προαναγγέλλει την αιματολογική υποτροπή εντός 1–6 μηνών (διάμεσος χρόνος περίπου 3 μήνες). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αρκετές από αυτές τις μελέτες το χρησιμοποιούμενο cDNA προερχόταν από το περιφερικό αίμα, γεγονός που καθιστά την προαναφερθείσα μέθοδο ιδιαίτερα χρηστική και συνέβαλε στη σχετικά ευρεία διάδοσή της.<sup>16–19</sup>

### 3.3. Μεταλλάξεις του *CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA)* γονιδίου

Το *CEBPA* γονίδιο (χρωμόσωμα 19q13) κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη με δραστικότητα μεταγραφικού παράγοντα, η οποία έχει σημαντική συμβολή στη διαφοροποίηση της μυελικής σειράς. Οι μεταλλάξεις στο ένα και μοναδικό exon του προαναφερθέντος γονιδίου οδηγούν σε διαταραχή της λειτουργικότητας του *CEBPA* μεταγραφικού παράγοντα, με τελική συνέπεια την αναστολή διαφοροποίησης της μυελικής σειράς. Συνήθως (>90% των περιπτώσεων) πρόκειται για προσθήκες ή απαλείψεις μικρού αριθμού βάσεων. Η επίπτωση των *CEBPA* μεταλλάξεων στους ενήλικες ασθενείς με CN-AML είναι περίπου 15% (10% περίπου για το σύνολο των περιπτώσεων ΟΜΛ). Όλες σχεδόν οι μελέτες συμφωνούν για τη θετική προγνωστική αξία των μεταλλάξεων του γονιδίου *CEBPA* στους ασθενείς με CN-AML. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μικρός αριθμός μελετών αναφορικά με τη χρήση της RQ-PCR για την παρακολούθηση της ΕΥΝ σε ασθενείς με ΟΜΛ, οι οποίοι εμφανίζουν μεταλλάξεις του *CEBPA*. Η χρήση της κατ' αρχήν περιορίζεται από το γεγονός ότι απαιτούνται ειδικοί για κάθε ασθενή εκκινητές. Επίσης, η σταθερότητα έκφρασης των μεταλλάξεων του *CEBPA* στην υποτροπή της ΟΜΛ δεν θεωρείται δεδομένη (90% περίπου). Λαμβάνοντας υπ' όψη αυτά τα δεδομένα, διαπιστώνεται ότι οι μεταλλάξεις του *CEBPA* μάλλον δεν μπορούν να αποτελέσουν πρόσφορο «στόχο» για την παρακολούθηση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ.<sup>20,21</sup>

### 3.4. Μεταλλάξεις του mixed lineage leukemia (*MLL*) γονιδίου

Το γονίδιο *MLL* (χρωμόσωμα 11q23) κωδικοποιεί την παραγωγή ενός μεταγραφικού παράγοντα με ειδικότητα δράσης στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Η παρουσία μερικού αναδιπλασιασμού (partial tandem duplication, PTD) του *MLL* ανιχνεύεται στο 10% περίπου των ενηλίκων ασθενών με CN-AML (5% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων ΟΜΛ). Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για διπλασιασμό της περιοχής του γονιδίου η οποία περιλαμβάνεται μεταξύ των exon 5 και 11 και στη συνέχεια ενσωμάτωσή της στο intron 4. Από κλινική άποψη, κάποιες μελέτες έχουν συσχετίσει την παρουσία του *MLL/PTD* σε ασθενείς με CN-AML, με ελάττωση της διάρκειας της πλήρους ύφεσης μετά από συμβατική Χ/Θ με αποτέλεσμα ελαττωμένη επιβίωση χωρίς εξέλιξη νόσου. Το 2005 παρουσιάστηκε στη βιβλιογραφία η σημαντικότερη και πλέον εμπειριστατωμένη μελέτη για την αξία του *MLL/PTD* ως «στόχου» αναφορικά με την παρακολούθηση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ, με την τεχνική της RQ-PCR. Αξίζει να ληφθεί σοβαρά υπ' όψη η διαπίστωση ότι μικρός αριθμός μεταγράφων *MLL/PTD* είναι δυνατόν να

ανιχνεύονται στο μυελό των οστών ή και στο περιφερικό αίμα υγιών ατόμων. Για το λόγο αυτόν, η ευαισθησία της μεθόδου δεν είναι σταθερή κυμαινόμενη μεταξύ 1/100 και 1/100.000, εξαρτώμενη από τον αριθμό των *MLL/PTD* μεταγράφων κατά την αρχική διάγνωση της ΟΜΛ. Από την άλλη πλευρά, η συσχέτιση της παρουσίας του *MLL/PTD* μεταξύ της διάγνωσης και της υποτροπής της ΟΜΛ είναι απόλυτη (στο 100% των περιπτώσεων). Στην προαναφερθείσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι η μείωση του αριθμού των *MLL/PTD* μεταγράφων κατά δύο τουλάχιστον λογαριθμούς μετά τη Χ/Θ εδραίωσης συσχετιζόταν με ελαττωμένη πιθανότητα υποτροπής. Η μοριακή υποτροπή (αύξηση του αριθμού των *MLL/PTD* μεταγράφων κατά έναν τουλάχιστον λογάριθμο) ήταν προάγγελος αιματολογικής υποτροπής σε χρονικό διάστημα 30 ημερών περίπου. Η σχετικά χαμηλή επίπτωση του *MLL/PTD* στην ΟΜΛ και η πιθανότητα ανίχνευσης χαμηλού έστω αριθμού *MLL/PTD* μεταγράφων σε υγιείς περιορίζουν σημαντικά τη χρήση της κατά τα άλλα αξιόπιστης προαναφερθείσας μεθόδου παρακολούθησης της ΕΥΝ στην ΟΜΛ.<sup>14,22</sup>

#### 4. ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Η χρήση των χιμαιρικών γονιδίων και των προαναφερθεισών γονιδιακών μεταλλάξεων ως «στόχων» για την παρακολούθηση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ αδυνατεί να καλύψει το σύνολο των περιπτώσεων, με αποτέλεσμα να εκτιμάται ότι στο 30–40% των ασθενών με ΟΜΛ δεν υπάρχει κάποια ειδική γενετική βλάβη χρήσιμη για την παρακολούθηση της ΕΥΝ. Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις υπήρξε η σκέψη να χρησιμοποιηθούν ως «στόχοι» για τη μελέτη της ΕΥΝ με την τεχνική της RQ-PCR γονίδια με αυξημένη έκφραση στην ΟΜΛ (*WT-1*, *EV11*, *PRAME*). Όμως, καθώς τα συγκεκριμένα γονίδια μπορεί να έχουν ένα βασικό επίπεδο έκφρασης και σε φυσιολογικά κύτταρα διαφόρων ιστών, η ευαισθησία της μεθόδου ποικίλλει και εξαρτάται κυρίως από το βαθμό αύξησης της έκφρασης αυτών των γονιδίων κατά τη διάγνωση της ΟΜΛ.

##### 4.1. Υπερέκφραση του Wilms Tumor 1 (*WT-1*) γονιδίου

Το *WT-1* γονίδιο (χρωμόσωμα 11p13) κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα με ποικίλη δραστηριότητα, εξαρτώμενη από τα γονίδια και τα κύτταρα-στόχους. Έχει διαπιστωθεί υπερέκφρασή του στην ΟΜΛ, οριζόμενη ως αύξηση του αριθμού των *WT-1* μεταγράφων, τουλάχιστον κατά τρεις λογαριθμούς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, στο 70–85% των ασθενών. Για το λόγο αυτόν, η μελέτη των μεταγράφων του *WT-1* φαίνεται ως αξιόπιστη στρατηγική για την παρακολούθηση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ. Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται συνήθως μεταξύ

1/10.000–1/100.000. Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι η μείωση του αριθμού των μεταγράφων του *WT-1* μετά τη Χ/Θ εδραίωσης κάτω από δύο λογαριθμούς σε σύγκριση με αυτόν της διάγνωσης έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της ΟΜΛ. Η μοριακή υποτροπή – αύξηση του αριθμού των *WT-1* μεταγράφων κατά έναν τουλάχιστον λογάριθμο – ήταν προάγγελος αιματολογικής υποτροπής σε χρονικό διάστημα κυμαινόμενο από 1–3 μήνες. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αρκετές από τις μελέτες που αναφέρθηκαν πιο πάνω το χρησιμοποιούμενο cDNA προερχόταν από το περιφερικό αίμα, γεγονός που καθιστά την προαναφερθείσα μέθοδο παρακολούθησης της ΕΥΝ στην ΟΜΛ αρκετά χρηστική και συνέβαλε στην σχετικά ευρεία διάδοσή της.<sup>23–27</sup>

##### 4.2. Υπερέκφραση του ecotropic virus integration site 1 (*EV11*) γονιδίου

Μέχρι σχετικά πρόσφατα, η υπερέκφραση του γονιδίου *EV11* (χρωμόσωμα 3q26) συσχετιζόταν είτε με αναστροφή είτε με αντιμετάθεσή του και αφορούσε σε ασθενείς με κακής πρόγνωσης ΟΜΛ. Η διαπίστωση ότι η υπερέκφραση του *EV11* γονιδίου μπορεί να συμβαίνει και χωρίς την παρουσία αναστροφής ή αντιμετάθεσής του οδήγησε στη μελέτη της έκφρασής του και σε ασθενείς με CN-AML. Έχει διαπιστωθεί αυξημένη έκφρασή του στο 10–20% των περιπτώσεων CN-AML. Στη βιβλιογραφία υπάρχει σχετικά μικρός αριθμός μελετών αναφορικά με την αξιολόγηση της σημασίας της υπερέκφρασης του *EV11* στην παρακολούθηση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ με τη μέθοδο της RQ-PCR. Η σχετικά χαμηλή επίπτωση της υπερέκφρασής του στην CN-AML και η σχετικά μικρή αύξηση του αριθμού των *EV11* μεταγράφων στους ασθενείς με ΟΜΛ, συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες, δεν επιτρέπουν την ευρεία χρήση του προαναφερθέντος γονιδίου ως «στόχου» για την παρακολούθηση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ.<sup>28</sup>

##### 4.3. Υπερέκφραση του preferentially expressed antigen in melanoma (*PRAME*) γονιδίου

Το γονίδιο *PRAME* (χρωμόσωμα 22q11), όπως μαρτυρά άλλωστε και η ονομασία του, συσχετίστηκε αρχικά με το κακόηθες μελάνωμα. Σχετικά πρόσφατα και σε μικρό αριθμό μελετών, διαπιστώθηκε υπερέκφρασή του στο 30% περίπου των ασθενών με ΟΜΛ οι οποίοι αξιολογήθηκαν στις προαναφερθείσες μελέτες. Σε μικρό σχετικά αριθμό των εν λόγω ασθενών με ΟΜΛ επιχειρήθηκε η αξιολόγηση της ΕΥΝ με την παρακολούθηση του αριθμού των *PRAME* μεταγράφων χρησιμοποιώντας την τεχνική της RQ-PCR. Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν ικανοποιητική. Πάντως, η προαναφερθείσα μεθοδολογία, μέχρι πρόσφατα, δεν έχει

τύχει ευρείας εφαρμογής στην παρακολούθηση της EYN σε ασθενείς με ΟΜΛ.<sup>29,30</sup>

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα προαναφερθέντα, αβίαστα προκύπτει το συμπέρασμα ότι η *NPM1* και το *WT-1* αποτελούν τα πλέον υποσχόμενα γονίδια-«στόχους» για την παρακολούθηση

της EYN στην ΟΜΛ με την τεχνική της RQ-PCR, εκτός από τα χιμαιρικά γονίδια. Η ικανοποιητική ευαισθησία της RQ-PCR, η δυνατότητα χρήσης περιφερικού αίματος, η σταθερότητα έκφρασης κατά την υποτροπή της νόσου και η ύπαρξη σταθερών συσχετίσεων μεταξύ μοριακής και αιματολογικής υποτροπής συνηγορούν ισχυρά υπέρ της «αξιοποίησης» των προαναφερθέντων γονιδίων στην παρακολούθηση της EYN στην ΟΜΛ.

## ABSTRACT

### Minimal residual disease assessment in acute myeloid leukemia by molecular techniques: Recent advances

I. KAKKAS

Department of Immunology and Histocompatibility, "Evangelismos" General Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2012, 29(1):100–105

In recent years a number of gene mutations (*FIt-3*, *NPM1*, *CEBPA*, *MLL*, *N-RAS*, *RUNX1*, *WT-1*, *IDH*) and deregulated expression of genes (*WT-1*, *EVI1*, *PRAME*, *BAALC*, *ERG*, *MN-1*) have been identified, illustrating the enormous heterogeneity of cytogenetically defined subsets of acute myeloid leukemia (AML), in particular in the large subset of cytogenetically normal (CN) AML. Monitoring of the minimal residual disease (MRD) in AML patients is now recognized to be an important diagnostic tool that can be used to assess the response to treatment and to establish the risk of relapse in the individual patient. The most recent techniques, based principally on immunophenotyping by multiparametric flow cytometry (MFC) or real time-quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) analysis, have in most instances the sensitivity to detect at least one leukemic cell out of 10<sup>4</sup> background cells. Standardized RQ-PCR procedures for the most common types of fusion transcripts present in AML (i.e., *PML/RARα*, *AML1/ETO* and *CBFB/MYH11*, representing about 30% of all AML cases) have now been developed, permitting large scale MRD studies. In addition, a reliable and highly sensitive RQ-PCR test can be performed in almost 90% of patients with *NPM1* mutations (about 35–40% of all AML cases). Finally, RQ-PCR assessment of the disease level is, through the use of *WT-1* overexpression, now feasible in more than 70% of AML patients.

**Key words:** Acute myeloid leukemia (AML), Minimal residual disease (MRD), *NPM1*, RQ-PCR, *WT-1*

## Βιβλιογραφία

- FRÖHLING S, SCHOLL C, GILLILAND DG, LEVINE RL. Genetics of myeloid malignancies: Pathogenesis and clinical implications. *J Clin Oncol* 2005, 23:6285–6295
- MRÓZEK J, MARCUCCI G, PASCHKA P, WHITMAN SP, BLOOMFIELD CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: Are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 2007, 109:431–448
- SCHLENK RF, DÖHNER K, KRAUTER J, FRÖHLING S, CORBACIOGLU A, BULLINGER L ET AL. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008, 358:1909–1918
- DÖHNER K, DÖHNER H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008, 93:976–982
- CONSTAN-SMITH E, RIBEIRO RC, RUBNITZ JE, RAZZOUK BI, PUI CH, POUNDS S ET AL. Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2003, 123:243–252
- CAMPANA D. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. *Br J Haematol* 2003, 121:823–838
- CHESON BD, BENNET JM, KOPECKY KJ, BÜCHNER T, WILLMAN CL, ESTEY EH ET AL. Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2003, 21:4642–4649
- KERN W, HAFERLACH C, HAFERLACH T, SCHNITTGER S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008, 112:4–16
- FREEMAN SD, JOVANOVIĆ JV, GRIMWADE D. Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 2008, 35:388–400

10. BÉNÉ MC, KAEDA JS. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: A review from WP10 and WP12 of the European LeukaemiaNet. *Haematologica* 2009, 94:1135–1150
  11. STIREWALT DL, WILLMAN CL, RADICH JP. Quantitative, real-time polymerase chain reactions for FLT3 internal tandem duplications are highly sensitive and specific. *Leuk Res* 2001, 25:1085–1088
  12. THIEDE C, STEUDEL C, MOHR B, SCHAICH M, SCHÄKEL U, PLATZBECKER U ET AL. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: Association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002, 99:4326–4335
  13. SCHNITTGER S, SCHOCH C, DUGAS M, KERN W, STAIB P, WUCHTER C ET AL. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: Correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002, 100:59–66
  14. LIBURA M, ASNAFI V, TU A, DELABESSE E, TIGAUD I, CYMBALISTA F ET AL. FLT3 and MLL intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress. *Blood* 2003, 102:2198–2204
  15. SCHNITTGER S, SCHOCH C, KERN W, HIDDEMANN W, HAFERLACH T. FLT3 length mutations as marker for follow-up studies in acute myeloid leukemia. *Acta Haematol* 2004, 112:68–78
  16. GORELLO P, CAZZANIGA G, ALBERTI F, DELL'ORO MG, GOTTARDI E, SPECCHIA G ET AL. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (*NPM1*) gene mutations. *Leukemia* 2006, 20:1103–1108
  17. CHOU WC, TANG JL, WU SJ, TSAY W, YAO M, HUANG SY ET AL. Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (*NPM1*) mutations. *Leukemia* 2007, 21:998–1004
  18. DVORAKOVA D, LENGEROVA M, POSPISILOVA J, PALASEKI, MAYER J. A novel quantitative assessment of minimal residual disease in patients with acute myeloid leukemia carrying *NPM1* (nucleophosmin) exon 12 mutations. *Leukemia* 2009, 23:793–796
  19. SCHNITTGER S, KERN W, TSCHULIK C, WEISS T, DICKER F, FALINI B ET AL. Minimal residual disease levels assessed by *NPM1* mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood* 2009, 114:2220–2231
  20. SHIH LY, LIANG DC, HUANG CF, WU JH, LIN TL, WANG PN ET AL. AML patients with *CEBPalpha* mutations mostly retain identical mutant patterns but frequently change in allelic distribution at relapse: A comparative analysis on paired diagnosis and relapse samples. *Leukemia* 2006, 20:604–609
  21. SMITH LL, PEARCE D, SMITH ML, JENNER M, LISTER TA, BONNET D ET AL. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction method for monitoring *CEBPA* mutations in normal karyotype acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2006, 133:103–105
  22. WEISSER M, KERN W, SCHOCH C, HIDDEMANN W, HAFERLACH T, SCHNITTGER S. Risk assessment by monitoring expression levels of partial tandem duplications in the *MLL* gene in acute myeloid leukaemia during therapy. *Haematologica* 2005, 90:881–889
  23. ØSTERGAARD M, OLESEN LH, HASLE H, KJELDSSEN E, HOKLAND P. *WT1* gene expression: An excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients – results from a single-centre study. *Br J Haematol* 2004, 125:590–600
  24. CILLONI D, MESSA F, ARRUGA F, DEFILLIPI I, GOTTARDI E, FAVA M ET AL. Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of *WT1* transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy. *Haematologica* 2008, 93:921–924
  25. WILLASCH AM, GRUHN B, COLIVA T, KALINOVA M, SCHNEIDER G, KREYENBERG H ET AL. Standardization of *WT1* mRNA quantitation for minimal residual disease monitoring in childhood AML and implications of *WT1* gene mutations: A European multicenter study. *Leukemia* 2009, 23:1472–1479
  26. CILLONI D, RENNEVILLE A, HERMITTE F, HILLS RK, DALY S, JOVANOVIĆ JV ET AL. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized *WT1* assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol* 2009, 27:5195–5201
  27. GIANFALDONI G, MANNELLI F, PONZIANI V, LONGO G, BENCINI S, BOSI A ET AL. Early reduction of *WT1* transcripts during induction chemotherapy predicts for longer disease free and overall survival in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2010, 95:833–836
  28. WEISSER M, KERN W, SCHOCH C, TSCHULIK C, HIDDEMANN W, HAFERLACH T ET AL. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction based quantification of the combined *MDS-EV11/EV11* gene in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2006, 47:2645–2647
  29. PAYDAS S, TANRIVERDI K, YAVUZ S, DISEL U, BASLAMISLI F, BURGUT R. PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: Clinical importance and future prospects. *Am J Hematol* 2005, 79:257–261
  30. SANTAMARIA C, CHILLÓN MC, GARCÍA-SANZ R, BALANZATEGUI A, SARASQUETE ME, ALCOCEBA M ET AL. The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2008, 93:1797–1805
- Corresponding author:
- I. Kakkas, Department of Immunology and Histocompatibility, “Evangelismos” General Hospital, Athens, Greece  
e-mail: ioankakkas@hol.gr