

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Studijní obor: Biologie



**Lenka Hovorková**

Postižení myeloidní linie u  
BCR/ABL-pozitivních akutních lymfoblastických leukémií

Myeloid  
lineage involvement in BCR/ABL-positive acute lymphoblastic leukaemia

Bakalářská práce

Školitel: doc. MUDr. Jan Zuna, Ph.D.

Praha, 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8. 5. 2011

Lenka Hovorková

**Poděkování:**

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Janu Zunovi, Ph.D. za pomoc, trpělivost a věnovaný čas.

# 1 Obsah

1	Obsah .....	4
2	Abstrakt.....	5
3	Abstract .....	6
4	Úvod.....	7
5	Leukémie.....	9
6	Philadelphský chromozom.....	9
6.1	Objev.....	9
6.2	Různé varianty fúzních genů a jejich vliv na maligní transformaci .....	10
7	Chronická myeloidní leukémie (CML).....	11
7.1	Klinické projevy a průběh onemocnění .....	12
7.2	Léčba a prognóza .....	13
8	Akutní lymfoblastická leukémie (ALL).....	13
8.1	Klinické projevy.....	14
8.2	Léčba a prognóza pro Ph <sup>+</sup> pacienty .....	14
8.3	ALL versus lymfoblastická krize CML .....	15
9	Postižení myeloidní řady u Ph <sup>+</sup> ALL .....	16
9.1	Postižení myeloidní řady.....	16
9.2	Prognóza pro pacienty v závislosti na postižení CD34 <sup>+</sup> buněk .....	18
9.3	Postižení myeloidních buněk a detekce minimální reziduální choroby.....	19
10	Závěr .....	21
11	Seznam použité literatury .....	23

## 2 Abstrakt

Philadelphský (Ph) chromozom byl od doby, kdy byl poprvé popsán (1960), po desetiletí spojován pouze s chronickou myeloidní leukémií (CML). Avšak tuto translokaci zahrnující chromozomy 9 a 22 lze nalézt i mezi pacienty trpícími odlišným typem poruchy zrání a diferenciací bílých krvinek – akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). Zatímco u Ph<sup>+</sup> ALL pacientů je Philadelphský chromozom nacházen v lymfoidních buňkách, u CML je tato chromozomální aberace nalézána zejména v buňkách myeloidních. Tato onemocnění jsou si však mnohem bližší, než by se na první pohled mohlo zdát, a v určité fázi je Ph<sup>+</sup> CML jen obtížně odlišitelná od Ph<sup>+</sup> ALL. Touto fází je období lymfoblastické krize CML. Nabízí se hypotéza, že k odlišení mezi oběma typy leukémií postačí vyšetření zaměřené na postižení myeloidních buněk - u ALL by mělo být postižení vázáno pouze na lymfoidní buňky. Avšak tento předpoklad neplatí absolutně. V případě Ph<sup>+</sup> ALL byli popsáni pacienti s postižením i myeloidních buněk. Navíc ani případy s Ph<sup>+</sup> CML nemusí mít jednoznačný průběh. Vzhledem k odlišným prognózám a léčebným postupům, které se v obou případech uplatňují, je nasnadě, že správná diagnóza není nepodstatnou součástí úspěšné léčby. Nalezení odlišnosti mezi Ph<sup>+</sup> ALL a Ph<sup>+</sup> CML tedy není pouze teoretickou otázkou, ale může mít vliv i na úspěšnou terapii těchto maligních onemocnění.

V práci jsou též diskutovány možnosti monitorování minimální reziduální nemoci s ohledem na postižení myeloidních či CD34<sup>+</sup> buněk.

**Klíčová slova:** akutní lymfoblastická leukémie, chronická myeloidní leukémie, Philadelphský chromozom, lymfoblastická krize, minimální reziduální nemoc

### 3 Abstract

The Philadelphia chromosome has been discovered in 1960. This chromosomal aberration was mistakenly associated only with chronic myeloid leukaemia (CML) for decade. However, this type of translocation including chromosomes 9 and 22 was found in patients with different type of neoplasia – acute lymphoblastic leukaemia (ALL). Different lineage involvement has been found in these two types of leukaemia. Whereas in Ph-positive ALL, the Philadelphia chromosome is restricted to the lymphoid lineage, in CML patients mostly myeloid cells are those being Ph-positive. Hence it seems quite trivial to distinguish between ALL and CML. But there is a phase of CML called lymphoid blast crisis which is indistinguishable from ALL. The possibility of distinguishing between CML in lymphoid blast crisis and ALL would inhere in determining myeloid lineage involvement. Actually it had been shown that some patients with Ph<sup>+</sup> ALL have involved also a myeloid lineage. Different types of treating protocols are used in CML and ALL. In addition, prognoses for both types of leukaemia are different. Thus it is crucial to distinguish between this two disorders and revealing of any difference can impact the treatment outcome of above mentioned malignancies.

Detection of minimal residual disease according to involvement of myeloid or CD34<sup>+</sup> cells is also mentioned in this work.

**Key words:** acute lymphoblastic leukaemia, chronic myeloid leukaemia, Philadelphia chromosome, lymphoid blast crisis, minimal residual disease

## 4 Úvod

Již od prvních zmínek o leukémii je patrný postupný nárůst počtu pacientů diagnostikovaných s tímto onemocněním. Zpočátku lze tento nárůst přisuzovat především novým způsobům diagnostiky (v úplných počátcích například používání světelných mikroskopů). Vzdávající počet pacientů je zaznamenán i v průběhu druhé poloviny minulého století (Jemal et al., 2005). Lze polemizovat nad tím, zda se na tomto nárůstu nejvíce podílejí pouze současné kvalitnější diagnostické metody a poskytování péče i sociálně slabším či také měnící se životní styl a s tím související změna v péči o děti. Byť byl doposud prokázán přímý vliv na rozvoj leukémie pouze ionizačnímu záření, podle v současnosti nejpřijímanější tzv. "infekční" teorie je pravděpodobné, že k rozvoji leukémie u dětí a mladistvých přispívá nedostatečná stimulace imunitního systému ve velmi raném věku (Gilham et al., 2005; Greaves, 2006). Vzhledem k tomu, že ve srovnání s ostatními malignitami stojí leukémie na prvním místě žebříčku příčin úmrtí u dětí a mladistvých do dvaceti let (Jemal et al., 2005), je patrné nemalé úsilí vynakládané na nalezení rizikových faktorů, které by mohly stát za vznikem tohoto druhu neoplázie.

Ve spektru maligních transformací postihujících myeloidní či lymfoidní vývojovou řadu, popřípadě jejich společné prekuzory, tvoří chronická myeloidní leukémie (CML) a akutní lymfoblastická leukémie (ALL) nezanedbatelnou skupinu neoplázií. Je tedy nasnadě, že oba tyto typy leukémií jsou pod neustálým drobnohledem vědecké komunity. I přes veškerá bádání, která na tomto poli probíhají již po několik desetiletí, však zůstávají neodhaleny mnohé mechanismy stojící za rozvojem a progresí leukémie. Nicméně nelze opomenout obrovský pokrok v chápání biologie těchto onemocnění a úspěšné výsledky z toho plynoucí. Mezi ně jistě můžeme zahrnout obecné zlepšení prognózy pro pacienty postižené leukémií a to mimo jiné i díky rozvoji chemoterapeutických agens, jejich kombinovanému použití a u části nemocných i využívání transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT, *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*).

Přestože zejména u dětí, kde je ALL nejčastější malignitou, se celkové křivky přežití posunuly za posledního půl století z nuly až k téměř 90 %, ne u všech skupin pacientů s leukémií se dá hovořit o uspokojivé prognóze. Jednu z takovýchto skupin tvoří pacienti s ALL v jejichž maligních buňkách se objevuje Philadelphský (Ph)

chromozom. Tito pacienti jsou označováni jako pacienti s Ph<sup>+</sup> ALL. Aberantní Ph chromozom, vzniklý translokací chromozomů 9 a 22, byl však původně považován za hlavní cytogenetickou charakteristiku odlišné neoplázie, a to chronické myeloidní leukémie (CML). Tento typ leukémie prochází několika fázemi: chronickou, zrychlenou (akcelerovanou) a fází blastické krize. Posledně zmíněná fáze vede k vyššímu zastoupení myeloidních či lymfoidních blastů v krvi (v závislosti na tom, zda blastická krize postihne myeloidní nebo lymfoidní buněčnou linii). V případě, že dojde k expanzi lymfoidních blastů, stává se z CML onemocnění velmi podobné Ph<sup>+</sup> ALL. Problém v podobě dvou možných, odlišných diagnóz vyvstává tehdy, dojde-li k manifestaci CML až v průběhu lymfoblastické krize. Potenciálním způsobem, jímž by se dala obě onemocnění rozlišit, je vyšetření postižení myeloidních buněk. Myeloidní linie by, čistě hypoteticky, totiž u Ph<sup>+</sup> ALL neměla být postižena. Nicméně se ukazuje, že Ph<sup>+</sup> ALL je ve vztahu k postižení myeloidních buněk heterogenním onemocněním. A tak zůstává rozlišení mezi lymfoblastickou krizí CML a Ph<sup>+</sup> ALL poněkud nejednoznačné.

Problematika spojovaná s postižením myeloidní řady u Ph<sup>+</sup> ALL pacientů však může zasahovat i do samotného průběhu léčby. V současné době se pacienti zařazují do léčebných protokolů mimo jiné i na základě monitorování minimální reziduální nemoci (MRD, *Minimal Residual Disease*). Metoda, která se k tomuto monitorování využívá, se opírá o fakt, že lymfoblastická leukémie je vlastně klonální expanzí lymfoidních buněk, s čímž souvisí klonální přestavby v genech pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TCR). V případě postižení myeloidních buněk však tento způsob detekce MRD není tak vhodný - a to z prostého důvodu: myeloidní buňky a jejich prekurzory zpravidla geny pro Ig/TCR nepřestavují. Z tohoto důvodu se jako nejlogičtější jeví detekovat MRD metodami zaměřenými na fúzní gen BCR/ABL, jenž vzniká maligní translokací. Zatímco metoda monitorující úroveň BCR/ABL mRNA je relativně jednoduchá a v praxi široce využívaná, metoda založená na detekci BCR/ABL fúze na úrovni genomické DNA u Ph<sup>+</sup> ALL pacientů je technicky velmi náročná, a proto zatím zůstává nepodložena relevantními konkrétními výsledky.

Cílem této práce je shrnout poznatky o postižení myeloidní linie u Ph<sup>+</sup> ALL pacientů a nastínit možné dopady na diagnostiku a na metody detekce minimální reziduální nemoci.



## 5 Leukémie

Poprvé bylo slovo *leukémie* použito pruským lékařem Robertem Virchowem v roce 1847. Virchow tehdy uvedl již svou druhou publikaci zabývající se pacientem se zvětšenou slezinou a nezvykle vysokým zastoupením bílých krvinek v krvi. Nebyl však ve své době jediný, kdo popsal pacienta s takovými příznaky. Nezávisle na Virchowovi podobné případy publikovali např. skotský lékař John Hughes Bennett (1845) či Francouz Alfred Donné (1844) (Historical review, 2001). V padesátých letech téhož století byla leukémie uznána za samostatné onemocnění.

S častějším využíváním mikroskopů v lékařské praxi rostl i počet popsaných případů. Již počátkem 20. století byla leukémie rozdělena na čtyři typy v závislosti na průběhu onemocnění a na postižení vývojové řady. Těmito typy jsou: akutní lymfoblastická leukémie (ALL), akutní myeloidní leukémie (AML), chronická lymfocytární leukémie (CLL) a chronická myeloidní leukémie (CML). S postupným získáváním dalších poznatků došlo v rámci jednotlivých typů leukémií k rozlišení určitých skupin pacientů. Tyto skupiny se vzájemně liší např. svým karyotypem (skupiny jsou definované určitým počtem chromozomů či přítomností konkrétní chromozomální aberace) a s tím související odlišnou prognózou či klinickými projevy.

## 6 Philadelphský chromozom

### 6.1 Objev

Philadelphský chromozom v roce 1960 poprvé popsala skupina vědců kolem P. C. Nowella a D. A. Hungerforda (Nowell et al., 1960). Philadelphský (Ph) chromozom se tak stal první chromozomální aberací, která byla spojena se specifickým typem leukémie – s chronickou myeloidní leukémií (viz dále). Dnes je již však patrné, že se Ph chromozom vyskytuje i u jiných hematopoetických onemocnění (například u akutní lymfoblastické leukémie). Roku 1973 bylo zjištěno, že Ph chromozom vzniká translokací části dlouhých ramének chromozomu 9 na chromozom 22 a že se jedná o balancovanou reciprokovou translokaci. Ph chromozom se podle míst zlomu

na obou chromozomech tedy cytogeneticky označuje jako translokace t(9;22)(q34;q11) (Rowley, 1973). O deset let později vyšlo najevo, že translokace zahrnuje proto-onkogen ABL (jedná se o lidský homolog genu Abelsonova viru myší leukémie; *Abelson murine leukemia virus*), ležící na chromozomu 9 (Bartram et al., 1983), a dříve neznámý gen na chromozomu 22, následně označený jako BCR podle anglického *breakpoint cluster region* (Groffen et al., 1984).

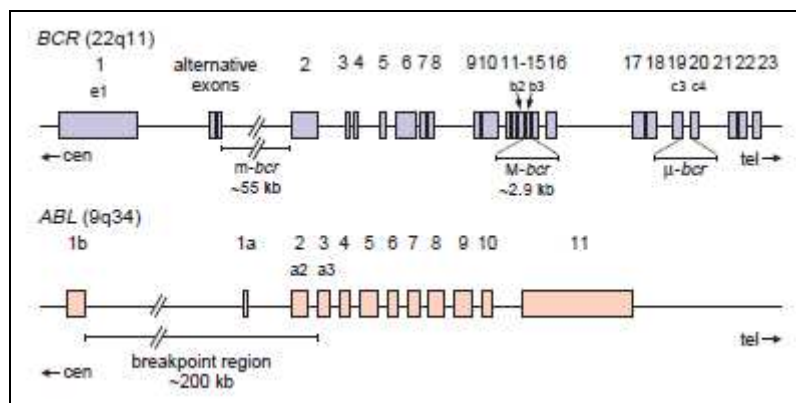
## 6.2 Různé varianty fúzních genů a jejich vliv na maligní transformaci

Díky různým polohám zlomů v genu BCR mohou vznikat tři různé fúzní proteiny:

- Protein p210 vzniká tehdy, pokud zlom leží v oblasti zvané *major breakpoint cluster region (M-BCR)*.
- V případě, že dojde ke zlomu v oblasti zvané *minor breakpoint cluster region (m-BCR)*, vzniká fúzní protein zvaný p190.
- Ke zlomu může dojít i v oblasti zvané *micro breakpoint cluster region (μ-BCR)*. Protein vzniklý transkripcí a následnou translací takto vzniklého genu se nazývá p230. Tento typ zlomů je spojován s chronickou neutrofilní leukémií (Pane et al., 1996) a je natolik vzácný, že v dalším textu se tomuto typu fúzního proteinu již nebudu věnovat.

Různé zlomy v genu ABL (před nebo za exonem A2) nemají na aktivitu proteinu významný vliv.

Obr.1 Oblasti zlomů na chromozomu 22 a 9.



Převzato z Dongen et al., 1999

Po transkripci nově vzniklého genu vzniká mRNA, která má na svém 5' konci část genu BCR a na 3' konci sekvenci genu ABL (Gale et al., 1984). Proteiny p210 i p190 jsou cytosolickými tyrosin kinasami (Dhut et al., 1990). Příčinou jejich patogenity je deregulovaná enzymatická aktivita tyrosin kinasy Abl, která tak aktivuje, popřípadě inhibuje, různé signalizační dráhy (např.: JAK, Ras, MEK) (Quintas-Cardama et al., 2009). Tyto signalizační dráhy mají vliv na nejrůznější buněčné procesy, mezi nimi i na ty, které se podílejí na transformaci normální buňky na buňku maligní. Obecně lze říci, že základním procesem stojícím za takovouto transformací je konstitutivní aktivace tyrosin kinasy Bcr/Abl, která způsobuje aktivaci řady proteinů buněčného cyklu, ztrátu diferenciace, utlumení apoptózy a inhibici DNA oprav (Deininger et al., 2000). Studie prováděné na myších ukázaly, že u p210<sup>+</sup> leukémií dochází k aktivaci odlišných signalizačních drah vedoucích k onemocnění připomínající buď CML, či ALL. Tento koncept však nebyl potvrzen u p190<sup>+</sup> případů (Hu et al., 2004; Roumainstev et al., 2001).

Za maligní transformací buněk však nemusí stát pouze aktivita kinasy Abl. Ukazuje se, že k aktivaci některých drah není tato aktivita vyžadována - jedná se např. o dráhy ovlivněné rodinou proteinů Src (Warmuth et al., 1997). Výzkumy ukazují, že na progresi onemocnění se mohou podílet i delece či mutace v genech uplatňujících se při zrání CD34<sup>+</sup> buněk např. v genu pro proteiny rodiny Ikaros, které se podílejí na časně lymfoidní diferenciaci buněk (Hunger et al., 2011).

V posledních letech se díky lepším technickým možnostem prohlubuje poznání biologie Ph<sup>+</sup> leukémií. Jsou popisovány dráhy uplatňující se v maligní transformaci buněk a spolu s nimi i látky inhibující jejich vliv (Chen et al., 2010).

## **7 Chronická myeloidní leukémie (CML)**

CML je klonální myeloproliferativní onemocnění hematopoetických kmenových buněk, jehož nejvýznamnější genetickou charakteristikou je přítomnost Philadelphského chromozomu a fúzního genu BCR/ABL v maligních buňkách. Postihuje myeloidní vývojovou linii, prekuzory červených krvinek, megakaryocyty a B lymfocyty. U naprosté většiny pacientů s chronickou myeloidní leukémií dochází na chromozomu 22 ke zlomům v oblasti M-BCR, a tudíž k expresi fúzního proteinu p210.

## 7.1 Klinické projevy a průběh onemocnění

CML má v jednotlivých případech heterogenní projev. Mezi hlavní rysy CML patří úbytek hmotnosti, obecně zvýšený počet bílých krvinek v krvi (WBC; *white blood cell count*) a hepatosplenomegalie (Kantarjian et al., 1985). V průběhu onemocnění se dají rozlišit dvě, popřípadě tři fáze.

Počáteční fázi CML je fáze chronická. Tato fáze bývá relativně snadno zvládnutelná terapií a přežití v 90 měsících je přibližně 95 % (Tauchi et al., 2011). Avšak i při léčení chronické fáze může onemocnění postoupit do fáze zrychlené (akcelerované). Medián přežití pro pacienty v akcelerované fázi se pohybuje kolem 32 měsíců (Fava et al., 2009). Zrychlená fáze je pak zpravidla následována blastickou krizí (*blast crisis*). Ta je charakterizována neregulovaným růstem nezralých myeloidních či lymfoidních blastů a ztrátou jejich schopnosti diferenciaci. V závislosti na postižených blastech se rozlišuje myeloidní respektive lymfoidní blastická krize. První zmíněná se pak jen obtížně odlišuje od akutní myeloblastické leukémie, zatímco lymfoblastická krize se svými příznaky podobá ALL.

Blastická krize bývá u pacientů diagnostikována tehdy, pokud se v jejich krvi či kostní dřeni nalézá více než 30 % blastů. Klinickými projevy blastické krize jsou horečka, splenomegalie a nevolnost, přičemž u pacientů v blastické fázi hrozí i zvýšené riziko infekce (Rosenthal et al., 1977). Pro pacienty nacházející se v této fázi onemocnění je prognóza velmi nepříznivá. Uvádí se medián přežití 9 měsíců (Fava et al., 2009).

Příčiny přechodu onemocnění z chronické fáze do fáze blastické zůstávají nejasné. Posun by mohl být zapříčiněn tzv. „druhou“ či „další“ událostí, která nemusí přímo souviset s fúzním genem BCR/ABL. Tuto teorii podporují cytogenetické analýzy, pomocí nichž jsou v blastické fázi CML v buňkách nalézány další chromozomální aberace. Jedná se např. o trisomii chromozomu 8, o izochromozom 17, či o buňky se dvěma Ph chromozomy (Kantarjian et al., 1991; Kantarjian et al., 2002). Nejspíše se tedy v Ph<sup>+</sup> buňkách postupně kumulují další genetické aberace a některé z nich v důsledku vedou k progresi onemocnění.

V současné době se vzhledem k využívání chemoterapeutik ze skupiny TKI (viz dále) uvažuje o změně parametrů, které vedou k diagnóze blastické krize. Světová

zdravotnická organizace navrhla snížit procentuální hranici počtu blastů v krvi pacienta diagnostikovaného na blastickou fázi na 20 % (Cortes et al., 2006).

## 7.2 Léčba a prognóza

Prognózu CML v posledních letech významně změnil objev nového typu tak zvané cílené terapie. Ta spočívá v použití skupiny chemických látek označovaných jako inhibitory tyrosin kinas (TKI, *Tyrosin Kinase Inhibitors*). Mechanismus jejich účinku u CML spočívá v selektivní inhibici patologicky konstitutivně aktivované kinasové domény Abl (jako části fúzního proteinu Bcr/Abl). Tyto inhibitory jsou účinné zejména v chronické fázi CML. Do první generace těchto léčiv patří imatinib mesylát. V posledních letech se ukázalo, že kromě účinku na Ph<sup>+</sup> buňky by imatinib mohl stát i za podporou „antileukemických“ lymfocytů (Chen et al., 2008).

Většina pacientů nacházejících se v blastické krizi je však vůči účinkům imatinibu rezistentní. Rezistence může být patrně způsobena přílišnou expresí fúzního genu BCR/ABL či jeho mutací, která způsobí poruchu vazby kinasového inhibitoru. TKI druhé generace (dasatinib, nilotinib) jsou pak účinné i proti některým formám mutovaného BCR/ABL genu.

Další terapeutickou možností je transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT), nejlépe během chronické fáze CML. Ještě před začátkem využívání TKI v léčebných protokolech přinášela HSCT pacientům lepší prognózu než pacientům léčeným pouze chemoterapeutiky. S nástupem TKI se však ukazuje mortalita spojená s HSCT vyšší než mortalita pacientů léčených TKI (Druker et al., 2006; Tamascari et al., 2009).

## **8 Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)**

Akutní lymfoblastická leukémie je onemocnění charakterizované nekontrolovanou proliferací lymfoidních progenitorů a zastavením jejich zrání. Přestože až třetina dospělých ALL je pozitivních na přítomnost Ph chromozomu v maligních buňkách (Greaves, 1999; Wetzler et al., 1999), byla tato chromozomální aberace u ALL pacienta poprvé popsána až v roce 1970 (Propp a Lizzi, 1970). U dětských pacientů je t(9;22) nalézána ve 2 – 5 % všech ALL případů (Ribeiro et al., 1987; Stary et al., 2010;

Vaitkaviciene et al., 2010). V České republice jsou ročně diagnostikovány 2 – 3 dětské případy.

U pacientů s Ph<sup>+</sup> ALL dochází častěji ke zlomům v m-BCR oblasti a tudíž k expresi proteinu p190 (Labarthe et al., 2007; Pajor et al., 2000; Yanada et al., 2008). Odlišné projevy onemocnění mezi p190<sup>+</sup> a p210<sup>+</sup> pacienty nejsou pozorovány (Wassmann et al., 2004; Yanada et al., 2008).

### 8.1 Klinické projevy

Klinické projevy Ph<sup>+</sup> ALL se příliš neliší od projevů Ph<sup>-</sup> ALL, jejíž nejčastější rysy jsou nespecifické a pramení z postižení jednotlivých krevních řad. Jsou jimi únavnost, projevy zvýšené krvácivosti, snížená obranyschopnost a často i hepatosplenomegalie. Komparativní studie ukazují, že dětské Ph<sup>+</sup> pacienti mají zpravidla vyšší hladinu leukocytů v krvi (Suzuki et al., 2010; Vaitkaviciene et al., 2010).

### 8.2 Léčba a prognóza pro Ph<sup>+</sup> pacienty

Pacienti s Ph<sup>+</sup> ALL podstupují kombinovanou chemoterapii složenou mimo jiné např. z vincristinu, prednisonu či methotrexátu. Vzhledem k cytogenetické podobnosti s CML se i u Ph<sup>+</sup> ALL pro zvýšení účinnosti chemoterapie v nejnovějších protokolech využívá kombinace výše zmíněných chemoterapeutik s imatinibem či s TKI druhé generace. Část pacientů s Ph<sup>+</sup> ALL (stejně jako pacienti s CML v blastické krizi) je však vůči léčbě imatinibem rezistentní.

I u Ph<sup>+</sup> ALL pacientů je možno využít transplantace kostní dřeně. Tuto metodu lze aplikovat v chronické fázi onemocnění, zpravidla během kompletní remise, nikoliv však v průběhu fáze akutní.

Přes veškeré terapeutické úsilí zůstává prognóza Ph<sup>+</sup> ALL pacientů horší než pacientů s Ph<sup>-</sup> ALL. Ph<sup>+</sup> pacienti vykazují v průměru kratší celkové přežívání i kratší „období bez události“ (začínající v době diagnózy a končící nepříznivou událostí ve smyslu úmrtí, relapsu či sekundární malignity) (Lee et al., 2011; Rowe et al., 2005; Suzuki et al., 2010). Navíc v rámci Ph<sup>+</sup> skupiny pacientů lze rozlišit ještě několik rizikových skupin (rozdělení lze provést na základě WBC při diagnóze či na základě počáteční odpovědi na léčbu) (Arico et al., 2000). Toto rozlišení však zůstává sporné v době využívání TKI (Schultz et al., 2009; Yanada et al., 2006).

Navzdory výše zmíněným nepříznivým prognózám je patrné výrazné vylepšení prognózy oproti předešlým desetiletím (medián přežití ve studii z roku 2005 byl 33 měsíců, zatímco v roce 1986 to bylo pouhých 12 měsíců) (Bloomfield et al., 1986; Lee et al., 2005), na kterém se v posledních letech podílí i chemoterapeutika ze skupiny TKI. Ta napomáhají indukci kompletní remise (Labarthe et al., 2007; Yanada et al., 2008), a tak je například možné účinnější využití transplantace hematopoetických kmenových buněk. Avšak stejně tak jako u CML i u ALL případů zůstává otázka lepší prognózy pro pacienty podstupující HSCT sporná (Schultz et al., 2009; Yanada et al., 2006).

### 8.3 ALL versus lymfoblastická krize CML

CML a Ph<sup>+</sup> ALL sdílejí několik společných rysů. Jistě nejvýraznějším z nich je přítomnost Philadelphského chromozomu v maligních buňkách. Podobné jsou však i klinické projevy obou onemocnění (např. splenomegalie, vyšší WBC apod.).

V případě, že CML dospěje do blastické fáze lymfoidního typu, prekursorů B-buněk (blasty) vykazují částečně smíšený lymfoidní/myeloidní imunofenotyp a mohou nést klonální přestavby imunoreceptorových genů (geny pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TCR)). Blasty Ph<sup>+</sup> ALL pacientů na svém povrchu také prezentují antigeny charakteristické pro buňky jak lymfoidní, tak myeloidní vývojové řady (Akashi et al., 1993). I pro tyto blasty jsou charakteristické Ig/TCR přestavby. Ani v tomto ohledu se tedy blasty pacientů s CML neliší od blastů pacientů s Ph pozitivní ALL (Akashi et al., 1993), z čehož vyplývá, že CML je v lymfoidní blastické fázi morfologicky neodlišitelná od *de novo* Ph<sup>+</sup> ALL.

Nezřídka dochází k tomu, že pacient s CML v chronické fázi nevykazuje žádné nápadné klinické symptomy a onemocnění je tedy diagnostikováno až v průběhu blastické krize. Kvůli morfologické podobnosti mezi CML v lymfoidní blastické krizi a ALL, je v takovýchto případech obtížné určit jednoznačnou diagnózu.

V souvislosti s tímto faktem je třeba uvést, že byly popsány případy, kdy pacienti původně diagnostikovaní jako Ph<sup>+</sup> ALL během léčby přešli do obrazu chronické fáze CML (Catovsky et al., 1978; Hooberman et al., 1989; Kantarjian et al., 1991; Klein et al., 1986; Pajor et al., 2000). Tato skutečnost může ukazovat na původně nesprávnou diagnózu či na komplexitu tohoto onemocnění a složitost rozlišení mezi Ph<sup>+</sup> ALL

a lymfoidní blastickou fází CML. Nemožnost vyšetřit u naprosté většiny nemocných zpětně vzorky kostní dřeně předcházející diagnóze lymfoidní krize CML/ALL (a přesněji tedy tyto dvě jednotky odlišit) by mohla částečně ovlivnit i rozdíl v incidenci Ph<sup>+</sup> ALL mezi dětskou a dospělou populací. CML je totiž běžnější mezi dospělými, a tak je možné, že za vyšší incidencí v populaci dospělých do určité míry stojí i nesprávná diagnóza (Kantarjian et al., 1991).

Za pomocnou metodu diagnostiky lze považovat i analýzu kostní dřeně během kompletní remise. Zatímco pacienti s Ph<sup>+</sup> ALL by měli mít normální morfologii kostní dřeně (v kostní dřeni se nenacházejí Ph<sup>+</sup> buňky), pacienti s CML mohou mít i v průběhu kompletní remise v kostní dřeni buňky s Philadelphským chromozomem (Bhatia et al., 2003). Toto odlišení však rozhodně neplatí absolutně.

V některých studiích (Kitano et al., 1988) bylo navrženo, že by se tato onemocnění mohla rozlišovat na základě rozdílnosti svého původu. Chronická myeloidní leukémie má svůj počátek v hematopoetických kmenových buňkách a postihuje tedy vývojovou řadu myeloidní i lymfoidní. Naproti tomu u Ph<sup>+</sup> ALL by měla být teoreticky postižena pouze lymfoidní vývojová linie, neboť k reciproké translokaci t(9;22)(q34;q11) by mělo docházet až v pozdějším („committed“) progenitoru společném pro lymfoidní vývojovou řadu.

## **9 Postižení myeloidní řady u Ph<sup>+</sup> ALL**

### **9.1 Postižení myeloidní řady**

První zmínka o proliferaci myeloidní řady u Ph<sup>+</sup> ALL pacienta pochází z roku 1980 (Priest et al., 1980). Nicméně detekce Philadelphského chromozomu v myeloidních buňkách u ALL byla popsána až o 7 let později Tachibanou a jeho spolupracovníky (Tachibana et al., 1987). V následujících letech se ukázalo, že Ph<sup>+</sup> ALL je ve vztahu k postižení jiné než lymfoidní vývojové řady heterogenním onemocněním. Philadelphský chromozom byl nalezen v buňkách s původem v myeloidní vývojové řadě jak u pacientů se zlomy v M-BCR oblasti, tak u pacientů se zlomy v oblasti m-BCR. Soubor výsledků je uveden v tabulce (Tab. 1).



Tab. 1.: čísla označují počet pacientů

	Ph <sup>+</sup> pouze L		Ph <sup>+</sup> L a M	
	p190	p210	p190	p210
<i>Nespecifikováno</i>				
Turhan et al., 1988	1		2	
<i>Děti</i>				
Tachibana et al., 1987			2	
Dow et al., 1989	2		2	
Anastasi et al., 1996 <sup>a</sup>	1			2 <sup>b</sup>
Pajor et al., 2000	4	2		
Castor et al., 2005	2			1
Zaliova et al., 2009			1	
<i>Dospělí</i>				
Abe et al., 1985 <sup>a</sup>	1			
Kalousek et al., 1988 <sup>a</sup>	1		4	
Kitano et al., 1988 <sup>a</sup>	3			
Secker-Walker et al., 1988	2	4		1 <sup>b</sup>
Craig et al., 1990 <sup>a</sup>	1	1		
Cuneo et al., 1993		1 <sup>c</sup>		1
Estrov et al., 1993	4	1	1	1
Anastasi et al., 1996 <sup>a</sup>	3			2 <sup>b</sup>
Schenk et al., 1998			5	3
Kasprzyk et al., 1999	1			2
Pajor et al., 2000	5	2		3 <sup>b</sup>
Castor et al., 2005	2			3
	27	11	9	19
<i>Celkem pacientů</i>	44		36	

L – lymfoidní buňky; M – myeloidní buňky

a - data převzata z Pajor et al., 2000

b - pacienti z remise přešli do chronické fáze CML

c - pacientovi byla po relapsu diagnostikována Ph<sup>+</sup> akutní myeloidní leukémie

Z uvedené tabulky je patrné, že exprese fúzního proteinu p210 je převážně (v 63 % případů) vázána jak na buňky lymfoidní, tak i myeloidní, zatímco protein p190 je ve většině (75 %) případů vázán pouze na buňky lymfoidní. Ke vzniku Philadelphského chromozomu se zlomy v M-BCR oblasti tedy dochází častěji v progenitoru, který je společný pro obě vývojové řady. Naproti tomu translokace t(9;22)(q34;q11) se zlomem v oblasti m-BCR vzniká zřejmě především v „committed“ progenitoru společném

pouze pro lymfoidní buňky. Při pohledu na zastoupení jednotlivých variant proteinů v závislosti na postižení různých vývojových linií je třeba poukázat na fakt, že za postižením nejen lymfoidních buněk stojí v 72 % případů protein p210.

Tato fakta vedla k hypotéze považovat p210<sup>+</sup> ALL za CML manifestující se v lymfoblastické krizi a p190<sup>+</sup> ALL za *de novo* Ph<sup>+</sup> ALL (Estrov et al., 1993). Tuto domněnku navíc podporuje skutečnost, že případy diagnostikované jako Ph<sup>+</sup> ALL, které v průběhu léčby přešly do obrazu chronické fáze CML, jsou pouze p210 pozitivní (Anastasi et al., 1996; Kantarjian et al., 1991; Pajor et al., 2000).

Z dat uvedených v tabulce lze obecně vyvodit závěr, že Philadelphský chromozom je vázán jen na lymfoidní řadu v mírné většině (55 %) Ph<sup>+</sup> ALL případů.

Mezi popisovanými pacienty lze však nalézt rozdíly, a to především mezi pacienty dospělými a pacienty ve věku do osmnácti let. U dětských pacientů se Ph chromozom objevuje vázán převážně na lymfoidní řadu, což může být způsobeno tím, že převážná část (71 %) popsáných pacientů je p190<sup>+</sup>. Zato u dospělých je zastoupení p190<sup>+</sup> a p210<sup>+</sup> pacientů poměrně vyrovnané (p210<sup>+</sup> pacientů je 51 %) a vyrovnané je i postižení obou řad či řady pouze lymfoidní (pacienti s postižením obou řad tvoří 45 % uvedených případů).

Výsledky demonstrující postižení lymfoidní i myeloidní buněčné linie ukazují na vznik maligní transformace již v hematopoetické kmenové buňce (HSC). K myšlence existence Ph<sup>+</sup> HSC vedou i výsledky získané na základě pozorování pacientů během dlouhodobé kompletní remise. U části z nich byly během této fáze nalezeny v kostní dřeni Ph<sup>+</sup> buňky (Dow et al., 1989; Tachibana et al., 1987). Existence Ph<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> buněk byla prokázána i u p190<sup>+</sup> pacientů (Cobaleda et al., 2000; Dow et al., 1989).

## 9.2 Prognóza pro pacienty v závislosti na postižení CD34<sup>+</sup> buněk

I přes příznivé výsledky, které s sebou přináší využívání imatinibu v léčebných protokolech, zůstává problémem udržení Ph<sup>+</sup> ALL pacientů v kompletní remisi. Jednou z možných příčin by mohlo být postižení CD34<sup>+</sup> buněk. U CML pacientů jsou v kostní dřeni nalézány Ph<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> buňky i po dvouletém podávání imatinibu (Bhatia et al., 2003). Prováděné pokusy ukazují, že CD34<sup>+</sup> buňky nejsou k podávání imatinibu sensitivní, v kostní dřeni přežívají a jejich počet naopak vzrůstá (Graham et al., 2002; Hu et al., 2009). Možnou příčinou je aktivace signálních drah, které nevyžadují tyrosin

kinasovou aktivitu proteinů Bcr/Abl. K eradikaci CD34<sup>+</sup> buněk z kostní dřeně je tedy pravděpodobně potřeba začít využívat chemoterapeutika zaměřená na inhibici i jiných proteinů a signalizačních kaskád než pouze tyrosin kinasové aktivity proteinu Bcr/Abl.

### 9.3 Postižení myeloidních buněk a detekce minimální reziduální choroby

Metodou, jejíž výsledky daná problematika, tedy postižení myeloidní řady u Ph<sup>+</sup> ALL, ovlivňuje, je detekce minimální reziduální nemoci (MRD). Výsledek vyšetření hladin MRD ukazuje na zastoupení leukemických buněk v kostní dřeni či v krvi pacienta. Hladiny MRD mají prognostický význam (Cave et al., 1998; Mortuza et al., 2006) a pomáhají zařadit pacienty do rizikových skupin, a tedy i do léčebných protokolů. Hladina MRD je důležitá i ve vztahu k transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Bylo prokázáno, že pacienti s detekovatelnou MRD před transplantací mají ve srovnání s MRD negativními pacienty zvýšené riziko relapsu po transplantaci (Sramkova et al., 2007).

V běžné klinické praxi se hladina MRD stanovuje pomocí několika způsobů: imunofenotypizací, na základě klonálních přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory, či detekcí aberantních genů (Szczepanski et al., 2007). U pacientů s ALL se standardně využívá metody detekce Ig/TCR přestaveb. Avšak myeloidní buňky, jejich prekurzory a ani prekurzory společné oběma vývojovým liniím své imunoreceptorové geny zpravidla nepřestavují. Výsledky takového monitorování u Ph<sup>+</sup> ALL pacientů s postižením obou linií by tedy mohly být falešně negativní (v případě, že by došlo k eradikaci pouze Ph<sup>+</sup> lymfoidních buněk).

Nabízí se tedy alternativní možnost detekce MRD. Tou je monitorování úrovně exprese fúzního genu BCR/ABL či detekce zaměřená na samotnou genomickou DNA genu BCR/ABL (obě metody, jakož i metoda monitorující Ig/TCR přestavby, využívají různé varianty polymerázové řetězové reakce (PCR; *Polymerase chain reaction*)).

Při měření úrovně MRD na základě množství BCR/ABL mRNA však vyvstává několik problémů. Mezi nejvýznamnější jistě patří možnost snadné kontaminace vzorků. Na rozdíl od detekce MRD pomocí Ig/TCR přestaveb, které jsou specifické pro každého pacienta, mRNA metoda tuto specifiku postrádá, a tak může dojít ke kontaminaci vzorků mezi pacienty. Přísná protikontaminační opatření jsou tak základním požadavkem ve všech laboratořích provádějících tato vyšetření.

Dalším rizikem spojeným s mRNA metodou je možnost falešné negativity

či pozitivitu. Obě dvě varianty nás opět přivedou k pacientům s CML, jelikož ve vztahu k Ph<sup>+</sup> ALL nejsou tyto možnosti dořešeny. Při studiu zdravých lidí bylo prokázáno, že – byť vzácně – v krevních buňkách dochází i v běžné populaci k translokaci t(9;22), a tím i k expresi genu BCR/ABL (Bose et al., 1998). V konečném důsledku může být hladina exprese tak „vysoká“, že není patrný rozdíl mezi CML pacienty v kompletní remisi a zdravými jedinci (obě detekce byly prováděny mRNA metodou) (Ross et al., 2010). Otázka falešné negativitu zůstává otázkou spíše teoretickou. Na rozdíl od metod zaměřených na detekci genomické DNA nemusí hladina transkriptu přesně odpovídat množství pozitivních buněk - intenzita přepisu genu do mRNA může být v různých typech buněk různá a někdy nemusí k přepisu docházet vůbec. Vrátime-li se opět k pacientům s CML, je nutno v této části textu podotknout, že u Ph<sup>+</sup> primitivních hematopoetických prekurzorů (CD34<sup>+</sup> CD33<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD5<sup>-</sup>) byly ve srovnání se zralějšími buněčnými prekurzory (CD34<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup>) zaznamenány jen stopy exprese fúzního genu BCR/ABL (Bedi et al., 1993). V případě, že by i u Ph<sup>+</sup> ALL pacientů došlo k translokaci t(9;22)(q34;q11) již v primitivních hematopoetických buňkách, nemusela by tedy být BCR/ABL mRNA detekována.

Výsledky získané analýzou MRD by měly jasně ukazovat na množství leukemických buněk přetrvávajících v pacientově kostní dřeni, popřípadě krvi. Jak je již uvedeno výše, detekce MRD pomocí BCR/ABL mRNA však nemusí být v tomto směru jednoznačná (odlišná úroveň exprese v Ph<sup>+</sup> CML buňkách v závislosti na zralosti buněčných prekurzorů; méně zralé myeloidní buňky (promyelocyty, myeloblasty) v experimentu vykazovaly vyšší úroveň exprese genu BCR/ABL než polymorfonukleární buňky (Wetzler et al., 1993)). Není důvod nepředpokládat, že by se stejný princip mohl uplatňovat i u Ph<sup>+</sup> ALL pacientů s postižením myeloidní řady.

Problémů souvisejících s využíváním detekce MRD pomocí BCR/ABL mRNA je více, avšak výše zmíněné jsou, s ohledem na téma této práce, významné.

Již v dřívějších letech bylo ukázáno, že detekce hladiny mRNA genu BCR/ABL při vyšetření hladin MRD má schopnost predikce relapsu (Scheuring et al., 2003; Preudhomme et al., 1997). Avšak studie zabývající se při detekci MRD korelací mezi standardní metodou (Ig/TCR) a kvantifikací transkriptu BCR/ABL prováděná na vzorcích dětských pacientů s Ph<sup>+</sup> ALL byla předložena teprve nedávno (Zaliova et al., 2009). Výsledky ukázaly včasnější možnost predikce relapsu na základě mRNA metody a klinický význam Ig/TCR negativních-BCR/ABL pozitivních (tedy zřejmě myeloidních) buněk.

Způsob detekce MRD, který by mohl zajistit částečné odfiltrování výše zmíněných problémů, se opírá o detekci BCR/ABL DNA. Zlomky, které vznikají při translokaci, jsou totiž pro každého pacienta specifické. Většinou vznikají v intronových oblastech (Szczepanski et al., 2007), a proto nemohou být využity u mRNA metody. Tato DNA metoda je však pro rutinní využití technicky velmi náročná, neboť intronové oblasti, ve kterých dochází ke zlomům, jsou velmi dlouhé. Dosud byla použita u několika pacientů s CML, kde vykazuje vyšší senzitivitu než mRNA metoda (Ross et al., 2010). Studie popisující tento způsob detekce u pacientů s Ph<sup>+</sup> ALL doposud nebyly prezentovány.

## 10 Závěr

Již v prvních letech studia Ph<sup>+</sup> ALL je viditelná snaha nalézt jakýkoliv projev, který by toto onemocnění odlišoval od CML. Zpočátku byla navržena hypotéza rozlišovat CML a Ph<sup>+</sup> ALL na základě exprese odlišných fúzních proteinů. Zatímco CML se manifestuje expresí proteinu p210, ALL se projevuje translací mRNA pro protein p190. V průběhu času se však ukázalo, že i pacienti s ALL mohou exprimovat protein p210 a naopak, a tak začal být tento koncept považován za nepravděpodobný (Selleri et al., 1990).

Byla tedy vyvinuta snaha nalézt jiný rys, který by byl odlišný u obou onemocnění. Jako o jednom z kandidátních rozdílů bylo uvažováno o různém postižení myeloidní vývojové řady. Podrobné zkoumání této domněnky však ukázalo na heterogenitu jak mezi CML pacienty, tak zejména mezi Ph<sup>+</sup> pacienty. U části Ph<sup>+</sup> ALL pacientů bylo zjištěno postižení myeloidních buněk, přičemž část z nich přešla během léčby do chronické fáze CML. Postižení i myeloidních buněk navíc ukazuje na vznik Philadelphského chromozomu již v prekurzoru společném oběma vývojovým liniím či již v hematopoetické kmenové buňce. Tato translokace ve společných progenitorech je však spojována spíše s chronickou myeloidní leukémií. V současné době se tedy diagnostika provádí na základě komplexních údajů, které jsou o pacientovi známy. Avšak i tak zůstává odlišení Ph<sup>+</sup> ALL a CML v lymfoidní blastické krizi v některých případech velmi sporné.

Údaje o postižení nelymfoidních hematopoetických buněk mají i jiný dopad - zejména při monitorování minimální reziduální nemoci. To se v současné době provádí

na základě klonálních přestaveb DNA imunoreceptorových genů, které jsou specifické pro lymfoidní buňky. Tato metoda tedy zpravidla nepostihuje postižení myeloidních buněk. Změnu na tomto poli nabízí metoda sledující hladinu MRD na základě fúzního genu BCR/ABL – a to jak na DNA, tak i na mRNA úrovni. Metoda využívající BCR/ABL mRNA již potvrdila schopnost predikce relapsu pacientů, zatímco kvantifikace BCR/ABL na DNA úrovni se doposud u Ph<sup>+</sup> ALL pacientů nezačala rutinně využívat.

## 11 Seznam použité literatury

- Akashi K., Taniguchi S., Nagafuji K., Harada M., Shibuya T., Hayashi S., Gondo H., Niho Y. (1993) B-lymphoid/myeloid stem cell origin in Ph-positive acute leukemia with myeloid markers. *Leukemia Research* 17, 549-555
- Anastasi J., Feng J., Dickstein J. I., Le Beau M. M., Rubin C. M., Larson R. A., Rowley J. D., Vardiman J. W. (1996) Lineage involvement by BCR/ABL in Ph+ lymphoblastic leukemias: chronic myelogenous leukemia presenting in lymphoid blast phase vs Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 10, 795-802
- Arico M., Valsecchi M. G., Camitta B., Schrappe M., Chessells J., Baruchel A., Gaynon P., Silverman L., Janka-Schaub G., Kamps W., Pui C. H., Masera G. (2000) Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 342, 998-1006.
- Bartram C. R., de Klein A., Hagemeijer A., van Agthoven T., Geurts van Kessel A., Bootsma D., Grosveld G., Ferguson-Smith M. A., Davies T., Stone M., Heisterkamp N., Stephenson J. R., Groffen J. (1983) Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306, 277-280
- Bedi A., Zehnbauser B. A., Collector M. I., Barber J. P., Zicha M. S., Sharkis S. J., Jones R. J. (1993) BCR-ABL gene rearrangement and expression of primitive hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood* 81, 2898-2902
- Bhatia R., Holtz M., Niu N., Gray R., Snyder D. S., Sawyers Ch. L., Arber D. A., Slovak M. L., Forman S. J. (2003) Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood* 101, 4701-4707
- Bloomfield C. D., Goldman A., Alimena G., Berger R., Borgstrom G. H., Brandt L., Catovsky D., de la Chapelle A., Dewald G. W., Garson O. M., Garwicz S., Gobomb H. M., Hoosfeld D. K., Lawler S. D., Mitelman F., Nibsson P., Pierre R. V., Philip P., Prigogina E., Rowley J. D., Sakurai M., Sandberg A. A., Seeker-Walker L. M., Iricot G., Van Den Gerghe H., Van Orshover A., Vuopio P., Whang-Peng J. (1986) Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 67, 415-420
- Bose S., Deininger M., Gora-Tybor J., Goldman J. M., Melo J. V. (1998) The Presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: Biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* 92, 3362-3367
- Castor A., Nilsson L., Astrand-Grundstrom I., Buitenhuis M., Ramirez C., Anderson K., Strombeck B., Garwicz S., Bekassy A.N., Schmiegelow K., Lausen B., Hokland P., Lehmann S., Juliusson G., Johansson B., Jacobsen S. E. (2005) Distinct patterns

of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nature Medicine* 11, 630–637

- Catovsky D., O'Brien M., Cherchi M., Benavides I. (1978) Ultrastructural, cytochemical and surface marker analysis of cells during blast crisis of chronic granulocytic leukaemia. *Boll Ist Sieroter Milan* 57, 344-354
- Cave H., Jutte W. B., Suci S., Guidal Ch., Waterkeyn C., Otten J., Bakkus M., Thielemans K., Grandchamp B., Vilmer E. (1998) Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 339, 591-598
- Cobaleda C., Gutiérrez-Cianca N., Pérez-Losada J., Flores T., García-Sanz R., González M., Sánchez-García I. (2000) A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 95, 1007-1013
- Cortes J. E., Talpaz M., O'Brien S., Faderl S., Garcia-Manero G., Ferrajoli A., Verstovsek S., Rios M. B., Shan J., Kantarjian H. M. (2006) Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Cancer* 106, 1306-1315
- Cuneo A., Balboni M., Piva N., Carli M. G., Tomasi P., Previati R., Negrini M., Scapoli G., Spanedda R., Castoldi G. (1994) Lineage switch and multilineage involvement in two cases of Ph chromosome-positive acute leukemia: Evidence for a stem cell disease. *Haematologica* 79, 76-82
- Deininger M. W. N., Goldman J. M., Melo J. V. (2000) The Molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96, 3343-3356
- Dhut S., Chaplin T., Young B. D. (1990) BCR-ABL and BCR proteins: biochemical characterization and localization. *Leukemia* 11, 745-750
- Dongen J. J. M., Macintyre E. A., Gabert J. A., Delabesse E., Rossi V., Saglio G., Gottardi E., Rambaldi A., Dotti G., Griesinger F., Parreira A., Gameiro P., Diaz M. G., Malec M., Langerak A. W., San Miguel J. F., Biondi A. (1999) Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease - Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13, 1901-1928
- Dow L. W., Tachibana N., Raimondi S., Lauer S. J., Witte O. N., Clark S. S. (1989) Comparative biochemical and cytogenetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 73, 1291-1297
- Druker B. J., Guilhot F., O'Brien S. G., Gathmann I., Kantarjian H. M., Gattermann N., Deininger M. W. N., Silver R. T., Goldman J. M., Stone R. M., Cervantes F., Hochhaus A., Powell B. L., Gahrilove J. L., Rousselot P., Reiffers J., Cornelissen J. J., Hughes T., Agis H., Fischer T., Verhoef G., Shepherd J., Saglio G., Gratwohl A., Nielsen J. L., Radich J. P., Simonsson B., Taylor K., Baccarani M., So C., Letvak



- L., Larson R. A. (2006) Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 335, 2408-2417
- Estrov Z., Talpaz M., Kantarjian H. M., Zipf T. F., McClain K. L., Kurzrock R. (1993) Heterogeneity in lineage derivation of Philadelphia-Positive acute lymphoblastic leukemia expressing P190B mABL or P210BC ABL: determination by analysis of individual colonies with the polymerase chain reaction. *Cancer Research* 53, 3289-3293
- Fava C., Kantarjian H. M., Jabbour E., O'Brien S., Jain N., Rios M. B., Garcia-Manero G., Ravandi F., Verstovsek S., Borthakur G., Shan J., Cortes J. (2009) Failure to achieve a complete hematologic response at the time of a major cytogenetic response with second-generation tyrosine kinase inhibitors is associated with a poor prognosis among patients with chronic myeloid leukemia in accelerated or blast phase. *Blood* 113, 5058-5063
- Gale R. P., Canaani E. (1984) An 8-kilobase abl RNA transcript in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 5648-5652
- Gilham C., Peto J., Simpson J., Roman E., Eden T. O. B., Greaves M. F., Alexander F. E. (2005) Day care in infancy and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: findings from UK case-control study. *British Medical Journal* 330, 1294-1297
- Graham S. M., Jorgensen H. G., Allan E., Pearson Ch., Alcorn M. J., Richmond L., Holyoake T. L. (2002) Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99, 319-325
- Greaves M. (1999) Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *European Journal of Cancer* 35, 173-185
- Greaves M. (2006) Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature Reviews Cancer* 6, 193-203
- Groffen J., Stephenson J. R., Heisterkamp N., de Klein A., Bartram C. R., Grosveld G. (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region bcr on chromosome 22. *Cell* 36, 93-99
- Historical Review (2001) Leukaemia – A Brief historical review from ancient times to 1950. *British Journal of Haematology* 112, 282 – 292
- Hooberman A. L., Rubin C. M., Barton K. P., Westbrook C. A. (1989) Detection of the Philadelphia chromosome in acute lymphoblastic leukemia by pulsed-field gel electrophoresis. *Blood* 74, 1101-1107
- Hu Y., Chen Y., Douglas L., Li S. (2009)  $\beta$ -Catenin is essential for survival of leukemic stem cells insensitive to kinase inhibition in mice with BCR-ABL-induced chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 23, 109-116

- Hu Y., Liu Y., Pelletier S., Buchdunger E., Warmuth M., Fabbro D., Hallek M., Etten R. A., Li S. (2004) *Nature Genetics* 35, 453-461
- Hunger S. P., Raetz E. A., Loh M. L., Mullighan Ch. G. (2011) Improving outcomes for high-risk ALL: Translating new discoveries into clinical care. *Pediatr Blood Cancer* 56, 984-993
- Chen C. I. U., Maecker H. T., Lee P. P. (2008) Development and dynamics of robust T-cell responses to CML under imatinib treatment. *Blood* 111, 5342-5349
- Chen Y., Peng C., Sullivan C., Li D., Li S. (2010) Critical molecular pathways in cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 24, 1545-1554
- Jemal A., Murray T., Ward E., Samuels A., Tiwari R. C., Ghafoor A., Feuer E. J., Thun M. J. (2005) Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians* 55, 10-30
- Kantarjian H. M., Cortes J., O'Brien S., Giles F. J., Albitar M., Rios M.B., Shan J., Faderl S., Garcia-Manero G., Thomas D. A., Resta D., Talpaz M. (2002) Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. *Blood* 99, 3547-3553
- Kantarjian H. M., Smith T. L., McCredie K. B., Keating M. J., Walters R. S., Talpaz M., Hester J. P., Bligham G., Gehan E., Freireich E. J. (1985) Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival. *Blood* 66, 1326-1335
- Kantarjian H. M., Talpaz M., Dhingra K., Estey E., Keating M. J., Ku S., Trujillo J., Huh Y., Stass S., Kurzrock R. (1991) Significance of the P210 versus P190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute leukemia. *Blood* 78, 2411-2418
- Kasprzyk A., Harrison C. J., Secker-Walker L. M. (1999) Investigation of clonal involvement of myeloid cells in Philadelphia-positive and high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 13, 2000-2006
- Kitano K., Sato Y., Suda T., Miura Y. (1988) Difference of cell lineage expression of haematopoietic progenitor cells in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia and chronic myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology* 70, 21-26
- Klein A., Hagemeijer A., Bartram C. R., Houwen R., Hoefsloot L., Carbonell F., Chan L., Barnett M., Greaves M., Kleihauer E. (1986) BCR rearrangement and translocation of the c-abl oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 68, 1369-1375
- Labarthe A., Rousselot P., Huguet-Rigal F., Delabesse E., Witz F., Maury S., Réa D., Cayuela J-M., Vekemans M-CH., Reman O., Buzyn A., Pigneux A., Escoffre M., Chalandon Y., MacIntyre E., Lheritier V., Vernant J-P., Thomas X., Ifrah N., Dombret H. (2007) Imatinib combined with induction or consolidation chemotherapy in patients with de novo Philadelphia chromosome-positive acute

- lymphoblastic leukemia: results of the GRAAPH-2003 study. *Blood* 109, 1408-1413
- Lee K. H., Lee J. H., Choi S. J., Lee J. H., Seol M., Lee Y. S., Kim W. K., Lee J. S., Seo E. J., Jang S., Park C. J., Chi H. S. (2005) Clinical effect of imatinib added to intensive combination chemotherapy for newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 19, 1509-1516
- Lee H. J., Thompson J. E., Wang E. S., Wetzler M. (2011) Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia current treatment and future perspectives. *Cancer* 117, 1583-1594
- Mortuza F. Y., Papaioannou M., Moreira I. M., Coyle L. A., Gameiro P., Gandini D., Prentice H. G., Goldstone A., Hoffbrand A. V., Foroni L. (2006) Minimal residual disease tests provide an independent predictor of clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 20, 1094-1104
- Nowell P. C., Hungerford D. A. (1960) A Minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132, 1497
- Pane F., Frigeri F., Sindona M., Luciano L., Ferrara F., Cimino R., Meloni G., Saglio G., Salvatore F., Rotoli B. (1996) Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 88, 2410-2414
- Pajor L., Vass J. A., Kereskai L., Kajtar P., Szomor A., Egyed M., Ivanyi J., Jakso P. (2000) The existence of lymphoid lineage restricted Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia with heterogeneous bcr-abl rearrangement. *Leukemia* 14, 1122-1126
- Preudhomme C., Henic N., Cazin B., Lai J. L., Bertheas M. F., Vanrumbeke M., Lemoine F., Jouet J. P., Deconninck E., Nelken B., Cosson A., Fenaux P. (1997) Good correlation between RT-PCR analysis and relapse in Philadelphia (Ph1)-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leukemia* 11, 294-298
- Priest J. R., Robison L. L., McKenna R. W., Lindquist L. L., Warkentin P. I., LeBein T. W., Woods W. G., Kersey J. H., Coccia P. F., Nesbit M. E. Jr. (1980) Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 56, 15-22
- Propp S. and Lizzi F. A. (1970) Philadelphia chromosome in acute lymphocytic leukemia. *Blood* 36, 353-360
- Quintas-Cardama A., Cortes J. (2009) Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 113, 1619-1630
- Ribeiro R. C., Abromowitch M., Raimondi S. C., Murphy S. B., Behm F., Williams D. L. (1987) Clinical and biologic hallmarks of the Philadelphia chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79, 948-953

- Rosenthal S., Canellos G. P., DeVita V. T., Gralnick H. R. (1977) Characteristics of blast crisis in chronic granulocytic leukemia. *Blood* 49, 705-714
- Ross D. M., Branford S., Seymour J. F., Schwarzer A. P., Arthur C., Bartley P. A., Slader C. A., Field C. A., Dang P., Filshie R. J., Mill A. K., Grigg A. P., Melo J. V., Hughes T. P. (2010) Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia* 24, 1719–1724
- Roumainstev S., Aoi I. E., Varticovski L., Ilaria R. L., Etten R. A. (2001) The Src homology 2 domain of Bcr/Abl is required for efficient induction of chronic myeloid leukemia -like disease in mice but not for lymphoid leukemogenesis or activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood* 97, 4-13
- Rowe J. M., Buck G., Burnett A. K., Chopra R., Wiernik P. H., Richards S. M., Lazarus H. M., Franklin I. M., Litzow M. R., Ciobanu N., Prentice H. G., Durrant J., Tallman M. S., Goldstone A. H. (2005) Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood* 106, 3760-3767
- Rowley J. D. (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290-293
- Schenk T.M., Keyhani A., Bottcher S., Kliche K. O., Goodacre A., Guo J. Q., Arlinghaus R. B., Kantarjian H. M., Andreeff M. (1988) Multilineage involvement of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 12, 666–674
- Scheuring U. J., Pfeifer H., Wassmann B., Bruck P., Gehrke B., Petershofen E. K., Gschaidmeier H., Hoelzer D., Ottmann O. G. (2003) Serial minimal residual disease (MRD) analysis as a predictor of response duration in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL) during imatinib treatment. *Leukemia* 17, 1700-1706
- Schultz K. R., Bowman W. P., Aledo A., Slayton W. B., Sather H., Devidas M., Wang Ch., Davies S. M., Gaynon P. S., Trigg M., Rutledge R., Burden L., Jorstad D., Carroll A., Heerema N. A., Winick N., Borowitz M. J., Hunger S. P., Carroll W. L., Camitta B. (2009) Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome–positive acute lymphoblastic leukemia: A Children’s Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology* 27, 5175-5181
- Secker-Walker L. M., Cooke H. M. G., Browett P. J., Shippey C. A., Norton J. D., Coustan-Smith E., Hoffbrand A. V. (1988) Variable Philadelphia breakpoints and potential lineage restriction of bcr rearrangement in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 72, 784-791
- Secker-Walker L. M., Craig J. M. (1993) Prognostic implications of breakpoint and lineage heterogeneity in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: a review. *Leukemia* 7, 147-151

- Selleri L., Lindern M., Hermans A., Meijer D., Torelli G., Grosveld G. (1990) Chronic myeloid leukemia may be associated with several bcr-abl transcripts including the acute lymphoid leukemia-type 7 kb transcript. *Blood* 75, 1146-1153
- Sramkova L., Muzikova K., Fronkova E., Krejci O., Sedlacek P., Formankova R., Mejstrikova E., Sary J., Trka J. (2007) Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 48, 93-100
- Sary J., Jabali Y., Trka J., Hrusak O., Gajdos P., Hrstkova H., Sterba J., Blazek B., Hak J., Prochazkova D., Cerna Z., Smisek P., Sedlacek P., Vavra V., Mihal V., Hrodek O. (2010) Long-term results of treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in the Czech Republic. *Leukemia* 24, 425–428
- Suzuki N., Yumura-Yagi K., Yoshida M., Hara J., Nishimura S., Kudoh T., Tawa A., Usami I., Tanizawa A., Hori H., Ito Y., Miyaji R., Oda M., Kato K., Hamamoto K., Osugi Y., Hashii Y., Nakahata T., Horibe K. (2010) Outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with induction failure treated by the Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS) ALL F-Protocol. *Pediatr Blood Cancer* 54, 71-78
- Szczepanski T. (2007) Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia* 21, 622–626
- Tachibana N., Raimondi S. C., Lauer S. J., Sartain P., Dow L. W. (1987) Evidence for a multipotential stem cell disease in some childhood Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 70, 1458-1461
- Tamasciaro I., Ramanarayanan J. (2009) Targeted treatment of chronic myeloid leukemia: role of imatinib. *Oncological Targets and Therapy* 2, 63-71
- Tauchi T., Kizaki M., Okamoto S., Tanaka H., Tanimoto M., Inokuchi K., Murayama T., Saburi Y., Hino M., Tsudo M., Shimomura T., Isobe Y., Oshimi K., Dan K., Ohyashiki K., Ikeda Y. (2011) Seven-year follow-up of patients receiving imatinib for the treatment of newly diagnosed chronic myelogenous leukemia by the TARGET system. *Leukemia Research* 35, 585-590
- Turhan A. T., Eaves C. J., Kalousek D. K., Eaves A. C., Humphries R. K. (1988) Molecular analysis of clonality and bcr rearrangements in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 71, 1495-1498
- Vaitkaviciene G., Forestier E., Hellebostad M., Heyman M., Jonsson O. G., Lahteenmaki P. M., Rosthøj S., Soderhall S., Schmiegelow K. (2010) High white blood cell count at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukaemia: biological background and prognostic impact. Results from the NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies. *European Journal of Haematology* 86, 38-46
- Warmuth M., Bergmann M., Priess A., Hauslmann K., Emmerich B., Hallek M. (1997) The Src family kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent

mechanism and phosphorylates the Grb2-binding site of Bcr. *Journal of Biological Chemistry* 272, 33260-33270

- Wassmann B., Pfeifer H., Scheuring U. J., Binckebanck A., Gokbuget N., Atta J., Bruck P., Rieder H., Schoch C., Leimer L., Schwerdtfeger R., Ehninger G., Lipp T., Perz J., Stelljes M., Gschaidmeier H., Hoelzer D., Ottmann O. G. (2004) Early prediction of response in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph + ALL) treated with imatinib. *Blood* 103, 1495-1498
- Wetzler M., Dodge R. K., Mrózek K., Carroll A. J., Tantravahi R., Block A. M. W., Pettenati M. J., Le Beau M. M., Frankel S. R., Stewart C. C., Szatrowski T. P., Schiffer C. A., Larson R. A., Bloomfield C. D. (1999) Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: The Cancer and Leukemia Group B Experience. *Blood* 93, 3983-3993
- Wetzler M., Talpaz M., Van Etten R. A., Hirsh-Ginsberg Ch., Beran M., Kurzrock R. (1993) Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *Journal of Clinical Investigation* 92, 1925-1939
- Yanada M., Sugiura I., Takeuchi J., Akiyama H., Maruta A., Ueda Y., Usui N., Yagasaki F., Yujiri T., Takeuchi M., Nishii K., Kimura Y., Miyawaki S., Narimatsu H., Miyazaki Y., Ohtake S., Jinnai I., Matsuo K., Naoe T., Ohno R. (2008) Prospective monitoring of BCR-ABL1 transcript levels in patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia undergoing imatinib-combined chemotherapy. *British Journal of Haematology* 143, 503-510
- Yanada M., Takeuchi J., Sugiura I., Akiyama H., Usui N., Yagasaki F., Kobayashi T., Ueda Y., Takeuchi M., Miyawaki S., Maruta A., Emi N., Miyazaki Y., Ohtake S., Jinnai I., Matsuo K., Naoe T., Ohno R. (2006) High complete remission rate and promising outcome by combination of imatinib and chemotherapy for newly diagnosed *BCR-ABL*-positive acute lymphoblastic leukemia: A Phase II study by the Japan Adult Leukemia Study Group. *Journal of Clinical Oncology* 24, 460- 466
- Zaliova M., Fronkova E., Krejcikova K., Muzikova K., Mejstrikova E., Stary J., Trka J., Zuna J. (2009) Quantification of fusion transcript reveals a subgroup with distinct biological properties and predicts relapse in BCR/ABL-positive ALL: implications for residual disease monitoring. *Leukemia* 23, 944-951