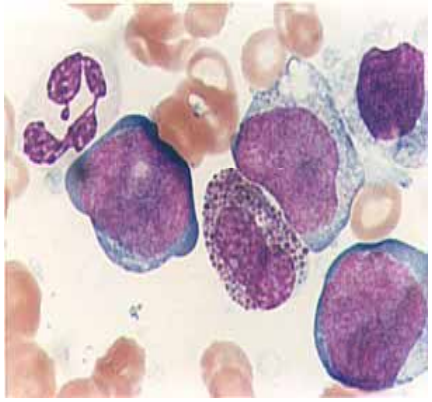
Přestavby MLL genu a jejich klinický význam u dětských pacientů s akutními leukémiemi

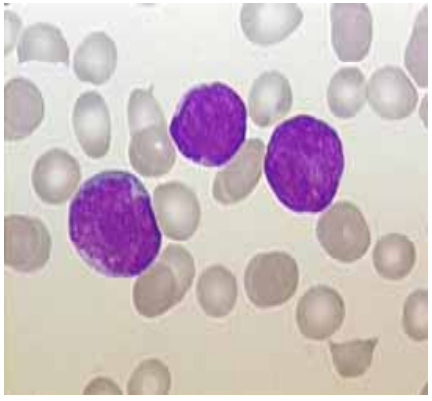
Leona Řezníčková

Školitel: Prof. MUDr. Jan Trka Ph.D.

Univerzita Karlova v Praze, 2. LF
Laboratoř molekulární genetiky, KDHO

MLL (Mixed Lineage Leukaemia) gen





11q23 oblast

~ 5 - 10% dětských leukémií

AML (M4,M5)

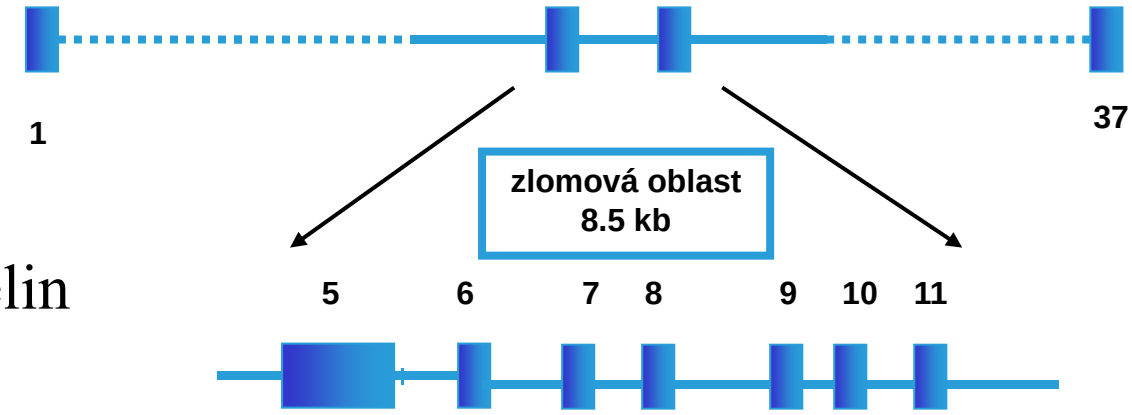
kojenecké leukémie

sekundární leukémie

obvykle špatná prognóza

Gen MLL

37 exonů
3 969 aminokyselin



Přestavby MLL genu

> 100 fúzních partnerů (popsáno cytogeneticky)
> 60 partnerských lokusů charakterizováno na molekulární úrovni

Nejčastější fúzní partneři: AF4, AF9, ENL, AF10, AF6, ELL

Cíl práce

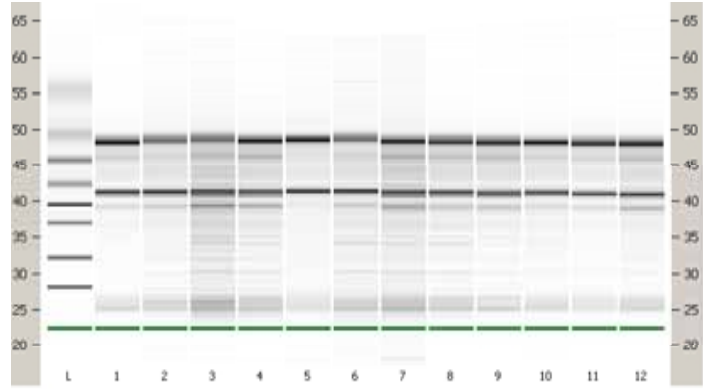
1. Zastoupení přestaveb genu MLL (MLL/AF4, MLL/AF6, MLL/AF9, MLL/AF10, MLL/ENL, MLL/ELL) v těchto souborech pacientů:

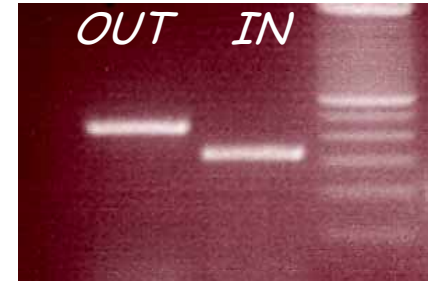
   - kojenecká ALL
   - AML - M4 a M5
   - sekundární leukémie
   - B-prekurzorová ALL splňující alespoň jedno z kritérií:
     - pro B imunofenotyp
     - cytogeneticky prokázaná přestavba genu MLL
     - exprese molekuly NG2 prokázaná průtokovou cytometrií

2. Sledování minimální reziduální nemoci (MRN) u pacientů s přestavbou genu MLL před a po transplantaci hematopoetických progenitorů (SCT)

Metody

- Izolace mononukleárních buněk (Ficoll)
- Izolace RNA, detekce RNA, RT
- Vyšetření kontrolního genu ABL
- Multiplex RT-PCR (AF4, AF6, AF9, AF10, ENL, ELL)
- Sekvenace, vyhodnocení sekvencí
- Izolace DNA (Biorobot)
- Kvantitativní PCR (qPCR) na cDNA i gDNA úrovni





Výsledky I.

Kojenecká ALL - 25 pacientů
AML – M4, M5 - 34 patienti
Sekundární leukémie - 9 pacientů
B – prekurzorová ALL - 11 pacientů

Celkem 79 pacientů

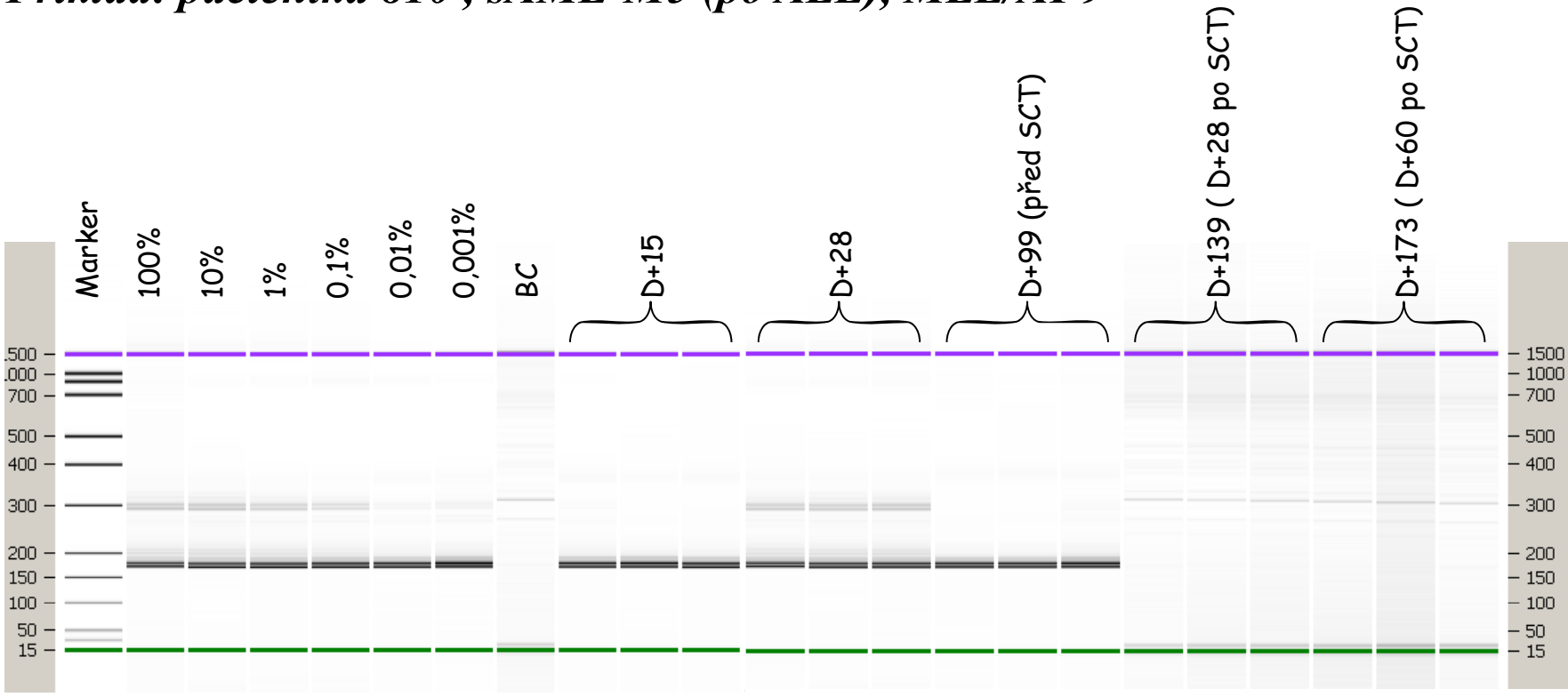
	MLL/AF4	MLL/AF9	MLL/AF10	ostatní MLL	negativní
Kojenecká ALL	12 (48%)	2 (8%)	2 (8%)	2 (8%)	7 (28%)
AML M4, M5	0	10 (29%)	7 (21%)	5 (15%)	12 (35%)
Sekundární leukémie	0	2 (22%)	0	4 (44%)	3 (33%)
B - prekurzorová ALL	3 (27%)	1 (9%)	0	2 (18%)	5 (45%)

Výsledky II.

Kvalitativní sledování MRN

- MRN – 12 pacientů, z toho 7 pacientů po SCT
- 4 pacienti - RNA (cDNA), 8 pacientů – gDNA

Příklad: pacientka 810 , sAML-M5 (po ALL), MLL/AF9

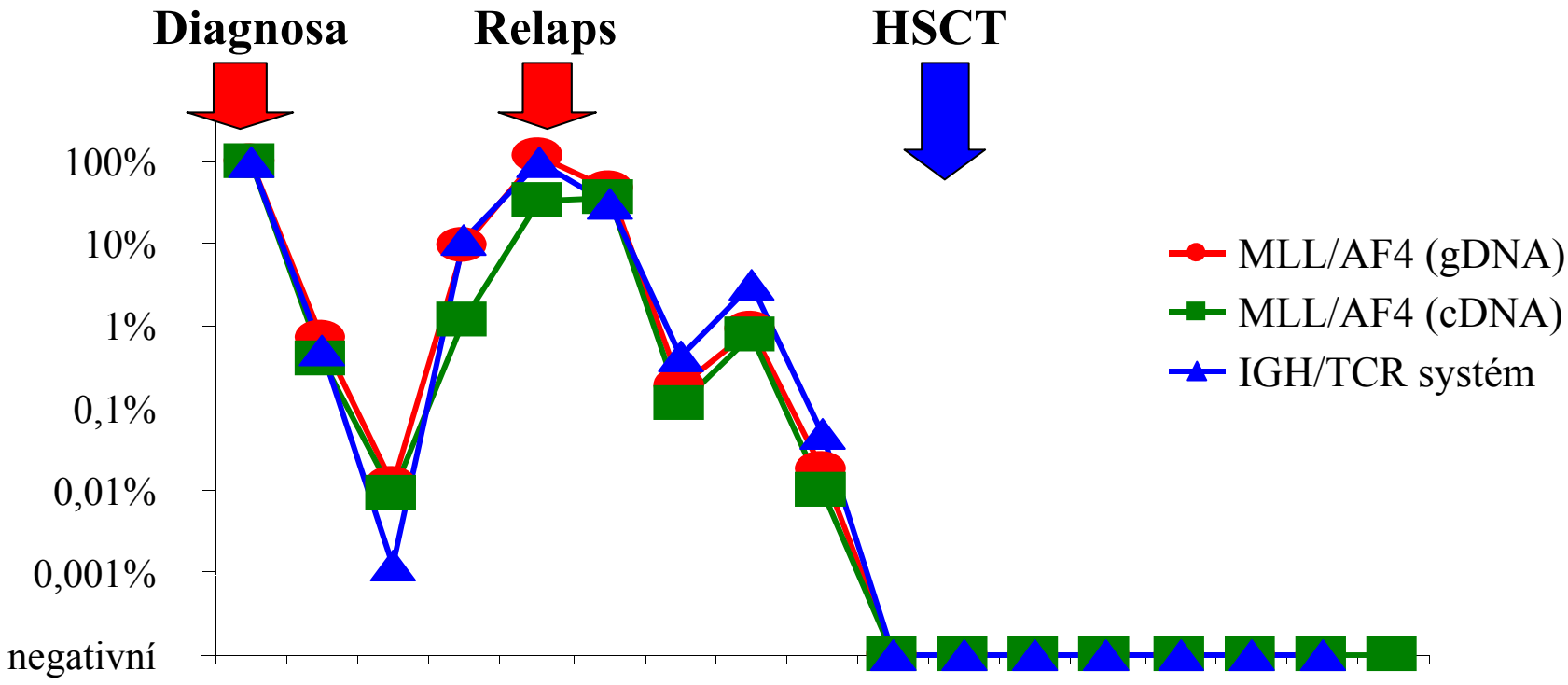


Výsledky III.

Kvantitativní sledování MRN

- optimalizace qPCR přestaveb genu MLL (cDNA, gDNA)
- porovnání hladin MRN - MLL cDNA vs. gDNA vs. Ig/TCR (7 pacientů)

Příklad: pacientka 923, kojenecká ALL, MLL/AF4



Shrnutí výsledků

AML-M4,M5 - převažují fúze **MLL/AF9, MLL/AF10**

kojenecké ALL - převažuje varianta **MLL/AF4**

nalezení **nových MLL fúzních partnerů**

MLL/APBB1IP a MLL/MAML2

Dynamika odpovědi na léčbu (MRN) sledována
u 19 pacientů s MLL+ leukémií

Závěr

Screeningová metoda v kombinaci s DNA vyšetřením umožňuje efektivně odhalit převážnou většinu pacientů s MLL přestavbou

Naše výsledky potvrzují, že fúzní partner genu MLL ovlivňuje výsledný fenotyp leukémie

MLL přestavby jsou vhodným a citlivým cílem pro sledování MRN (obvykle jediným cílem u pacientů s AML)

Korelace hladin MRN určených kvantifikací přestaveb Ig/TCR (na gDNA úrovni) a přestaveb MLL na gDNA i cDNA úrovni je velmi dobrá

Vyšetření hladin MRN přímo ovlivňuje další terapeutický postup

Poděkování

Jan Trka

Jan Zuna

Veronika Grecová

Eva Froňková

Katka Mužíková

všechna centra PSDH v ČR
a jejich cytogenetické
laboratoře