

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Μοριακοί δείκτες προγνωστικής κατηγοριοποίησης και παρακολούθησης της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία

Μέχρι σήμερα, τα ευρήματα της κυτταρογενετικής μελέτης κατά τη διάγνωση παρέχουν τις σημαντικότερες πληροφορίες για την πρόγνωση των ασθενών με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (ΟΜΛ) και χρησιμοποιούνται για την κατηγοριοποίησή τους σε τρεις διακριτές προγνωστικές ομάδες (καλής, ενδιάμεσης και κακής πρόγνωσης). Στους ασθενείς της ομάδας καλής πρόγνωσης απαντώνται συγκεκριμένα χιμαιρικά γονίδια (*PML/RARα*, *AML1/ETO*, *CBFβ/MYH11*), στην ταυτοποίηση της παρουσίας των οποίων μπορούν να συμβάλλουν εκτός από την κλασική κυτταρογενετική και οι τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας. Η πλειοψηφία των ασθενών με ΟΜΛ ανήκει στην ενδιάμεσης πρόγνωσης ομάδα και οι περισσότεροι από αυτούς (το 45% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων ΟΜΛ) εμφανίζουν φυσιολογικό καρυότυπο κατά τη διάγνωση της νόσου (cytogenetically normal-acute myeloid leukemia, CN-AML). Με τη βοήθεια των τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας, αρκετοί συγκεκριμένους ασθενείς διαπιστώθηκε η παρουσία μεταλλάξεων σε αρκετά γονίδια (*FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *MLL*, *N-RAS*, *RUNX1*, *WT-1*, *IDH*), καθώς και αυξημένη έκφραση άλλων γονιδίων (*WT-1*, *EVI1*, *PRAME*, *BAALC*, *ERG*, *MN-1*). Από όλα αυτά, για την προγνωστική κατηγοριοποίηση των ασθενών με CN-AML ενδιαφέρουν τα γονίδια της *NPM1*, του *FLT3* και του *CEBPA*. Επίσης, πρόσφατα, αρκετές μελέτες που αφορούν σε ασθενείς με t(8;21) ΟΜΛ έχουν αναδείξει την παρουσία μεταλλάξεων σε ορισμένα γονίδια (*c-KIT*, *N-RAS*, *FLT3*). Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις, η παρουσία μεταλλάξεων του *c-KIT* (εντοπιζόμενες κυρίως στο exon 8) έχει συσχετιστεί με αρνητική πρόγνωση. Η παρακολούθηση της Ελάχιστης Υπολειμματικής Νόσου (ΕΥΝ) μετά τη χημειοθεραπεία (Χ/Θ) εδραίωσης είναι σημαντική για την αξιολόγηση του κινδύνου υποτροπής της νόσου στον κάθε ασθενή με ΟΜΛ ξεχωριστά. 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. Σ' ό,τι αφορά στη συμβολή των μοριακών τεχνικών στην παρακολούθηση της ΕΥΝ αξίζει να επισημανθεί ότι, εκτός από τα χιμαιρικά γονίδια *PML/RARα*, *AML1/ETO* και *CBFβ/MYH11*, το γονίδιο της *NPM1* και το *WT-1* αποτελούν τα πλέον υποσχόμενα γονίδια-«στόχους» για την παρακολούθηση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ με την τεχνική της RQ-PCR.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις ταξινομήσεις της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας (ΟΜΛ) από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) (2001 και 2008), εκτός από τα ευρήματα της κυτταρομορφολογίας και της ανοσοφαινοτυπικής μελέτης, σημαντικό ρόλο απέκτησαν τα ευρήματα αφ' ενός της κυτταρογενετικής

και αφ' ετέρου των τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας. Στην παρούσα ανασκόπηση, η οποία θα βασιστεί στην ταξινόμηση του WHO του 2008, θα επιχειρηθεί η ανάδειξη της αξίας των τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας όχι μόνο στην τεκμηρίωση της διάγνωσης της ΟΜΛ, αλλά και στην προγνωστική κατηγοριοποίησή της, καθώς και στη μελέτη της Ελάχιστης Υπολειμματικής Νόσου (ΕΥΝ).

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2013, 30(5):566-573
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2013, 30(5):566-573

Ι. Κάκκας

Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας,
Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών
«Ο Ευαγγελισμός», Αθήνα

Prognostic stratification and
minimal residual disease
assessment in Acute Myeloid
Leukemia by molecular techniques

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

AML1/ETO
CBFβ/MYH11
NPM1
PML/RARα
WT-1

Υποβλήθηκε 4.4.2013
Εγκρίθηκε 12.5.2013

2. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΑΣ ΜΥΕΛΟΓΕΝΟΥΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ

Η ταξινόμηση της ΟΜΛ κατά WHO (2008) κατηγοριοποιεί τις ΟΜΛ ως εξής: (α) ΟΜΛ με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες (πίν. 1), (β) ΟΜΛ με δυσπλασία τουλάχιστον δύο σειρών, (γ) δευτεροπαθείς (μετά από θεραπεία για άλλη νεοπλασία) ΟΜΛ, (δ) ΟΜΛ μη ταξινομούμενες στις προαναφερθείσες υποκατηγορίες, (ε) μυελικό σάρκωμα, (στ) ΟΜΛ σχετιζόμενες με το σύνδρομο Down και (ζ) δενδριτικές ΟΜΛ.¹ 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).²⁻⁵ Οι ασθενείς της ομάδας καλής (favorable) πρόγνωσης (25% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων ΟΜΛ) ανήκουν στην ομάδα των ΟΜΛ με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες και χαρακτηρίζονται από την παρουσία χιμαιρικών γονιδίων (*PML/RARα*, *AML1/ETO*, *CBFB/MYH11*), τα οποία προκύπτουν, αντίστοιχα, από τις ακόλουθες χρωμοσωμικές αντιμεταθέσεις: t(15;17), t(8;21), inv(16).²⁻⁵ Η πλειοψηφία των ασθενών με ΟΜΛ (55–60% περίπου) ανήκει στην ενδιάμεσης (intermediate) πρόγνωσης ομάδα και οι περισσότεροι από αυτούς (το 45% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων ΟΜΛ) εμφανίζουν φυσιολογικό καρυότυπο κατά τη διάγνωση της νόσου.²⁻⁵ Από τα προαναφερθέντα καθίσταται σαφές ότι τουλάχιστον για τους ασθενείς με ΟΜΛ καλής πρόγνωσης, εκτός από την κλασική κυτταρογενετική, υπάρχει και η δυνατότητα ταυτοποίησής τους μέσω της ανάδειξης της παρουσίας των χιμαιρικών γονιδίων *PML/RARα*, *AML1/ETO* και *CBFB/MYH11* με τη βοήθεια των τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας.⁶ Η πλέον ευαίσθητη τεχνική ανίχνευσης των παραγομένων

μεταγράφων από τα προαναφερθέντα χιμαιρικά γονίδια είναι η Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Η συγκεκριμένη στρατηγική χρησιμοποιείται κατά τη διάγνωση της ΟΜΛ στις ακόλουθες περιπτώσεις: (α) Όταν η αναρρόφηση ικανοποιητικής ποσότητας μυελού των οστών είναι αδύνατη (συνήθως λόγω υψηλού φορτίου νόσου) και υπάρχουν ενδείξεις (κλινικές, μορφολογικές, ανοσοφαινοτυπικές) ενδεχόμενης παρουσίας t(15;17) ΟΜΛ, t(8;21) ΟΜΛ ή inv(16) ΟΜΛ, (β) όταν οι καλλιέργειες του μυελού των οστών αποτυγχάνουν συνολικά ή εν μέρει να οδηγήσουν στην παραγωγή ικανοποιητικού αριθμού αξιολογήσιμων μεταφάσεων, ενώ υπάρχουν ενδείξεις (κλινικές, μορφολογικές, ανοσοφαινοτυπικές) ενδεχόμενης παρουσίας t(15;17) ΟΜΛ, t(8;21) ΟΜΛ ή inv(16) ΟΜΛ και (γ) όταν ο καρυότυπος είναι φυσιολογικός, ενώ υπάρχουν ενδείξεις (κλινικές, μορφολογικές, ανοσοφαινοτυπικές) ενδεχόμενης παρουσίας t(15;17) ΟΜΛ, t(8;21) ΟΜΛ ή inv(16) ΟΜΛ. Από αναδρομικές μελέτες προκύπτει το συμπέρασμα ότι η κλασική κυτταρογενετική αποτυγχάνει να αναδείξει την παρουσία της t(15;17) στο 5–10% των περιπτώσεων, της t(8;21) ΟΜΛ στο 8–10% των περιπτώσεων και της inv(16) στο 4–5% των περιπτώσεων.⁷

2.1. Έλεγχος παρουσίας χιμαιρικών γονιδίων

2.1.1. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Το πρώτο βήμα της εν λόγω τεχνικής είναι η ανάστροφη μεταγραφή RNA σε cDNA (complementary DNA) με τη χρήση του ενζύμου ανάστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) και κατάλληλων εκκινητών (primers). Στη συνέχεια, με κλασική PCR επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος cDNA.⁸

2.1.2. Ανίχνευση *PML/RARα* μεταγράφων κατά τη διάγνωση της ΟΜΛ. Όπως είναι γνωστό, η t(15;17) οδηγεί στο σχηματισμό του *PML/RARα* χιμαιρικού γονιδίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ομώνυμων μεταγράφων. Το γονίδιο *PML* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 15, ενώ το γονίδιο *RARα* στο χρωμόσωμα 17. Από τη σύντηξη αυτών των δύο γονιδίων προκύπτει το χιμαιρικό γονίδιο *PML/RARα* στο χρωμόσωμα 15. Η ανίχνευση των *PML/RARα* χιμαιρικών μεταγράφων κατά τη διάγνωση της ΟΜΛ είναι εύκολη με την εφαρμογή της RT-PCR με τους εκκινητές (primers) και τις συνθήκες αντίδρασης που παρουσιάστηκαν στη βιβλιογραφία από την ομάδα BIOMED-1 το 1999. Σημειώνεται ότι υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι *PML/RARα* χιμαιρικών μεταγράφων (*bcr1*, *bcr2* και *bcr3*), ανάλογα με τη θέση θραύσης του γονιδίου *PML* στο χρωμόσωμα 15. Αυτό συνεπάγεται ότι σε κάθε περίπτωση πιθανής t(15;17) ΟΜΛ θα πρέπει να πραγματοποιούνται τρεις διαφορετικές RT-PCR.⁹

2.1.3. Ανίχνευση *AML1/ETO* μεταγράφων κατά τη διά-

Πίνακας 1. Οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες.

t(8;21) ΟΜΛ

inv(16) ΟΜΛ

t(15;17) ΟΜΛ

t(9;11) ΟΜΛ

t(6;9) ΟΜΛ

inv(3)-t(3;3) ΟΜΛ

t(1;22) ΟΜΛ

ΟΜΛ με γονιδιακές μεταλλάξεις

ΟΜΛ με μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1*

ΟΜΛ με μεταλλάξεις του γονιδίου *CEBPA*

γνωση της *OML*. Όπως είναι γνωστό, η *t(8;21)* οδηγεί στο σχηματισμό του *RUNX1/RUNX1T1 (AML1/ETO)* χιμαιρικού γονιδίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ομώνυμων μεταγράφων. Το γονίδιο *AML1* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 21, ενώ το γονίδιο *ETO* στο χρωμόσωμα 8. Από τη σύντηξη των δύο συγκεκριμένων γονιδίων προκύπτει το χιμαιρικό γονίδιο *AML1/ETO* στο χρωμόσωμα 21. Η ανίχνευση των *AML1/ETO* χιμαιρικών μεταγράφων κατά τη διάγνωση της *OML* είναι εύκολη με την εφαρμογή της RT-PCR με τους εκκινητές (primers) και τις συνθήκες αντίδρασης που παρουσιάστηκαν στη βιβλιογραφία από την ομάδα BIOMED-1 το 1999. Σημειώνεται ότι υπάρχει ένας και μόνο τύπος *AML1/ETO* χιμαιρικών μεταγράφων, επειδή οι θέσεις θραύσης του γονιδίου *AML1* στο χρωμόσωμα 21 και του γονιδίου *ETO* στο χρωμόσωμα 8 είναι σταθερές.⁸

2.1.4. Ανίχνευση *CBFB/MYH11* μεταγράφων κατά τη διάγνωση της *OML*. Όπως είναι γνωστό, η *t(16;16)* ή *inv(16)* οδηγεί στο σχηματισμό του *CBFB/MYH11* χιμαιρικού γονιδίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ομώνυμων μεταγράφων. Τόσο το γονίδιο *CBFB* όσο και το γονίδιο *MYH11* εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 16. Από τη σύντηξη αυτών των δύο γονιδίων προκύπτει το χιμαιρικό γονίδιο *CBFB/MYH11* στο χρωμόσωμα 16. Η ανίχνευση των χιμαιρικών μεταγράφων *CBFB/MYH11* κατά τη διάγνωση της *OML* είναι εύκολη με την εφαρμογή της RT-PCR με τους εκκινητές (primers) και τις συνθήκες αντίδρασης που παρουσιάστηκαν στη βιβλιογραφία από την ομάδα BIOMED-1 το 1999. Σημειώνεται ότι υπάρχουν δέκα διαφορετικοί τύποι *CBFB/MYH11* χιμαιρικών μεταγράφων (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J), ανάλογα με τις θέσεις θραύσης των γονιδίων *CBFB* (δύο διαφορετικές) και *MYH11* (10 διαφορετικές) στο χρωμόσωμα 16. Αυτό συνεπάγεται ότι σε κάθε περίπτωση πιθανής *inv(16)* *OML* θα πρέπει να εφαρμόζονται τουλάχιστον δύο διαφορετικές RT-PCR. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων *t(16;16)* ή *inv(16)* *OML* (85%) ανιχνεύονται τύπου A *CBFB/MYH11* χιμαιρικά μεταγραφα.⁸

2.2. Έλεγχος παρουσίας γονιδιακών μεταλλάξεων

Η διαπίστωση της ύπαρξης γονιδιακών μεταλλάξεων, αλλά και αυξημένης έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, κατέδειξε την ετερογένεια των περιπτώσεων της *OML* ακόμη και μέσα στις κυτταρογενετικά καθορισμένες προγνωστικές ομάδες, ιδιαίτερα δε στη μεγαλύτερη από αυτές (ενδιάμεσης πρόγνωσης), στην οποία περιλαμβάνονται οι ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο (Cytogenetically Normal-Acute Myeloid Leukemia, CN-AML).⁶ Ειδικότερα, κατά την τελευταία δεκαετία έχει διαπιστωθεί η παρουσία μεταλλάξεων σε αρκετά γονίδια (*FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *MLL*, *N-RAS*, *RUNX1*, *WT-1*, *IDH*), καθώς και αυξημένη έκφραση άλλων γονιδίων (*WT-1*, *EV11*, *PRAME*, *BAALC*, *ERG*, *MN-1*).⁶ Οι μεταλλάξεις και

η αυξημένη έκφραση των προαναφερθέντων γονιδίων κατά κύριο λόγο ανιχνεύονται σε ασθενείς με CN-AML. Οι μεταλλάξεις των *FLT3*, *NPM1* και *CEBPA* χρησιμοποιούνται ήδη για την προγνωστική κατηγοριοποίηση των ασθενών με CN-AML.⁶ Επιπρόσθετα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μεταλλάξεις των *NPM1* και *CEBPA* χρησιμοποιούνται και στη διαγνωστική κατηγοριοποίηση της *OML* κατά WHO (2008).⁷

2.2.1. *FLT3/ITD*. Το *FLT3* γονίδιο (χρωμόσωμα 13q12) κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη-υποδοχέα των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Ο ενδογενής αναδιπλασιασμός τμήματος του γονιδίου (*FLT3* Internal Tandem Duplication, *FLT3/ITD*) που εντοπίζεται στα exon 14–15 οδηγεί στην επιμήκυνση των παραγομένων μεταγράφων κατά 3–400 βάσεις (συνήθως 30–150). Η επίπτωση του *FLT3/ITD* στη CN-AML είναι περίπου 35% και στο σύνολο των *OML* 25–30% περίπου. Όλες οι μελέτες συμφωνούν για την αρνητική προγνωστική αξία του *FLT3/ITD* στη CN-AML. Η ανίχνευση του *FLT3/ITD* μπορεί να πραγματοποιηθεί με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης μετά από κλασική PCR, ή με Capillary Electrophoresis and Fragment Analysis μετά από κλασική ή RT-PCR με χρήση φθορίζοντων εκκινητών. Με τη συγκεκριμένη τεχνική υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης μικρού μεγέθους αναδιπλασιασμών (κάτω από 20 βάσεις).^{9,10}

2.2.2. Μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1*. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις εντοπίζονται στο exon 12 του γονιδίου *NPM1* (χρωμόσωμα 5q35) και οδηγούν στην επιμήκυνσή του κατά τέσσερις βάσεις. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1* ανιχνεύονται στο 50% περίπου των ενηλίκων ασθενών με CN-AML και στο 35% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων *OML*. Κατά συνέπεια, είναι οι συχνότερα ανιχνευόμενες μεταλλάξεις στην *OML*. Όλες πλέον οι μελέτες συμφωνούν για τη θετική προγνωστική αξία της παρουσίας των *NPM1* μεταλλάξεων με σύγχρονη απουσία του *FLT3/ITD* σε ασθενείς με CN-AML. Έχουν περιγραφεί >30 παραλλαγές μεταλλάξεων με υπεροχή τριών (A, B και D), οι οποίες καλύπτουν τουλάχιστον το 90% των περιπτώσεων. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις ανιχνεύονται είτε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing) μετά από κλασική PCR, είτε με Capillary Electrophoresis and Fragment Analysis μετά από κλασική ή RT-PCR με χρήση φθορίζοντων εκκινητών.^{11–13}

2.2.3. Μεταλλάξεις του *CEBPA* γονιδίου. Το *CEBPA* γονίδιο (χρωμόσωμα 19q13) κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη με δραστηριότητα 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. Η επίπτωση των *CEBPA* μεταλλάξεων

στους ενήλικες ασθενείς με CN-AML είναι περίπου 15% (10% περίπου για το σύνολο των περιπτώσεων OML). Όλες σχεδόν οι μελέτες συμφωνούν για τη θετική προγνωστική αξία των μεταλλάξεων του γονιδίου *CEBPA* (ιδιαίτερα των biallelic) στους ασθενείς με CN-AML. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις ανιχνεύονται με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing) μετά από κλασική PCR.¹⁴⁻¹⁶

2.2.4. Core Binding Factor (CBF) OML. Οι CBF OML, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία της t(8;21) ή της inv(16), αποτελούν το 15% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων OML. Παρά το γεγονός ότι η πρόγνωση των CBF OML χαρακτηρίζεται ευνοϊκή, τουλάχιστον το 30% των εν λόγω ασθενών υποτροπιάζουν μετά την αρχική ανταπόκριση της νόσου. Πρόσφατα, αρκετές μελέτες που αφορούν σε ασθενείς με CBF OML έχουν αναδείξει την παρουσία μεταλλάξεων σε ορισμένα γονίδια (*c-KIT*, *N-RAS*, *FLT3*) στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών. Οι μεταλλάξεις του *c-KIT* γονιδίου (χρωμόσωμα 4q11), το οποίο κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη-υποδοχέα, εντοπίζονται είτε στο exon 8 (απαλείψεις/προσθήκες βάσεων), είτε στο exon 17 (σημειακές μεταλλάξεις). Απαντώνται στο 20-30% των περιπτώσεων CBF OML. Στις περιπτώσεις των ασθενών με t(8;21) OML, η παρουσία μεταλλάξεων του *c-KIT* (εντοπιζόμενες κυρίως στο exon 8) έχουν συσχετιστεί με αρνητική πρόγνωση. Τα αποτελέσματα των μελετών αναφορικά με την προγνωστική αξία των *c-KIT* μεταλλάξεων (εντοπιζόμενων κυρίως στο exon 17) στους ασθενείς με inv(16) OML είναι αντικρουόμενα. Στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν τεκμηριώνεται η αρνητική προγνωστική τους αξία για τη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών. Διάφορες τεχνικές χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μεταλλάξεων του *c-KIT*, με σημαντικότερες την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing) και τη Melting Curve Analysis.¹⁷⁻¹⁹

3. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Είναι γνωστό ότι η εξέλιξη του κάθε ασθενούς με OML ξεχωριστά δεν μπορεί να εκτιμηθεί αξιόπιστα, ενώ σημαντικό προγνωστικό παράγοντα αποτελεί ο βαθμός ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία (X/Θ) εφόδου. Η παρακολούθηση της Ελάχιστης Υπολειμματικής Νόσου (EYN) μετά τη X/Θ εφόδου και ιδιαίτερα μετά τη X/Θ εδραίωσης είναι σημαντική για την αξιολόγηση του κινδύνου υποτροπής της νόσου στον κάθε ασθενή με OML ξεχωριστά.²⁰⁻²⁴ Κατά την τελευταία 20ετία, διάφορες τεχνικές (κυτταρομετρία ροής, τεχνικές Μοριακής Βιολογίας) έχουν βελτιώσει τη δυνατότητα ανίχνευσης EYN 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 EYN στην OML με τις μοριακές τεχνικές ενισχύθηκε σημαντικά τόσο από τη χρήση της RQ-PCR όσο και από την ταυτοποίηση ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων-«στόχων», τα οποία αναφέρθηκαν προηγουμένως.^{6,25} Στη συνέχεια, θα μας απασχολήσει η συμβολή της παρουσίας χμαιρικών γονιδίων (*PML/RARα*, *AML1/ETO*, *CBFB/MYH11*), γονιδιακών μεταλλάξεων και της υπερέκφρασης γονιδίων στη μελέτη της EYN σε ασθενείς με OML. Θα προηγηθεί μια σύντομη περιγραφή της τεχνικής της RQ-PCR.

3.1. Real Time Quantitative-Polymerase Chain Reaction

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 της 5-νουκλεάσης της Taq πολυμεράσης και (β) στη δυνατότητα σύνδεσης φθοριοχρώματος στο προϊόν της PCR. Χρησιμοποιούνται ειδικοί θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης 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*.²⁵

3.2. Έλεγχος παρουσίας χμαιρικών γονιδίων

3.2.1. Ανίχνευση *PML/RARα* μεταγράφων. Το 2009 δημοσιεύθηκαν κατευθυντήριες οδηγίες για το χειρισμό ασθενών με t(15;17) OML. Με βάση τις οδηγίες αυτές, η μοριακή ύφεση (μη ανίχνευση *PML/RARα* μεταγράφων με RQ-PCR) είναι ο θεραπευτικός στόχος στην t(15;17) OML.²⁶ Η μοριακή εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία εφόδου με RQ-PCR δεν έχει κλινική χρησιμότητα. Αντίθετα, το αποτέλεσμα της

RQ-PCR σε δείγμα μυελού των οστών μετά τον τελευταίο κύκλο θεραπείας (δηλαδή μετά το τέλος της θεραπείας εδραίωσης) παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τον κίνδυνο υποτροπής της νόσου. Η μοριακή ύφεση στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο υποτροπής. Οι ασθενείς με t(15;17) OML, στους οποίους ανιχνεύεται η παρουσία *PML-RARα* μεταγράφων με RQ-PCR σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή μετά το πέρας της θεραπείας εδραίωσης, θα πρέπει να επανελέγχονται μετά από δύο εβδομάδες προκειμένου να επιβεβαιωθεί η μοριακή υποτροπή της νόσου. Είναι γνωστό ότι τα αποτελέσματα της θεραπευτικής αντιμετώπισης της υποτροπής της συγκεκριμένης νόσου είναι πολύ καλύτερα όταν αυτή λαμβάνει χώρα πρώιμα σε φάση μοριακής υποτροπής (δηλαδή πριν από την εμφάνιση αιματολογικής υποτροπής). Η ανίχνευση των *PML/RARα* μεταγράφων για την παρακολούθηση των ασθενών με t(15;17) OML γίνεται με RQ-PCR. Οι εκκινητές (primers) και οι συνθήκες αντίδρασης παρουσιάστηκαν στη βιβλιογραφία από την ομάδα EAC το 2003.²⁷ Όπως έχει αναφερθεί ήδη, υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι *PML/RARα* χιμαιρικών μεταγράφων (*bcr1*, *bcr2* και *bcr3*). Με RQ-PCR επιχειρείται η ανίχνευση ενός τύπου μεταγράφων που έχει ήδη ταυτοποιηθεί κατά τη διάγνωση με RT-PCR. Υπάρχουν δύο βασικά πρωτόκολλα ελέγχου ασθενών πασχόντων από t(15;17) OML με RQ-PCR. Στο πρώτο, προβλέπεται έλεγχος δειγμάτων μυελού των οστών μετά την ολοκλήρωση της Χ/Θ εδραίωσης, ανά τρίμηνο κατά το πρώτο έτος παρακολούθησης, ανά τετράμηνο κατά το δεύτερο έτος παρακολούθησης και ανά εξάμηνο μετά το δεύτερο έτος παρακολούθησης μέχρι τη διακοπή της (με την ολοκλήρωση του πέμπτου έτους παρακολούθησης). Στο δεύτερο, προβλέπεται έλεγχος δειγμάτων μυελού των οστών μετά την ολοκλήρωση της Χ/Θ εδραίωσης και ανά τρίμηνο για 3 έτη παρακολούθησης.

3.2.2. Ανίχνευση *AML1/ETO* μεταγράφων. Η ποσοτική μέτρηση των *AML1/ETO* χιμαιρικών μεταγράφων στις t(8;21) OML με RQ-PCR για την εκτίμηση υπολειμματικής νόσου έχει χρησιμοποιηθεί από πολλές ομάδες, προκειμένου να βρεθούν οι ασθενείς με υψηλές πιθανότητες υποτροπής. Στην κλινική πράξη, ασθενείς σε αιματολογική ύφεση και με σταθερά χαμηλά ή μηδενικά επίπεδα *AML1/ETO* χιμαιρικών μεταγράφων μετά από την ολοκλήρωση της Χ/Θ εδραίωσης παραμένουν σε ύφεση, ενώ ασθενείς με αυξανόμενα επίπεδα ή θετικοποίηση αρνητικής RQ-PCR (επιβεβαιωμένης με διαφορά 15 ημερών) οδηγούνται σε αιματολογική υποτροπή της νόσου.²⁸ Για τις μετρήσεις των *AML1/ETO* χιμαιρικών μεταγράφων στις t(8;21) OML με RQ-PCR για την εκτίμηση υπολειμματικής νόσου μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο μυελός των οστών, όσο και περιφερικό αίμα.²⁸ Οι εκκινητές (primers) και οι συνθήκες

της RQ-PCR για την ανίχνευση των *AML1/ETO* χιμαιρικών μεταγράφων παρουσιάστηκαν στη βιβλιογραφία από την ομάδα EAC το 2003.²⁷ Υπάρχει ένα βασικό πρωτόκολλο ελέγχου ασθενών πασχόντων από t(8;21) OML με RQ-PCR. Σε αυτό, προβλέπεται έλεγχος δειγμάτων είτε μυελού των οστών είτε περιφερικού αίματος μετά την ολοκλήρωση της Χ/Θ εδραίωσης, ανά τρίμηνο κατά το πρώτο έτος παρακολούθησης, ανά τετράμηνο κατά το δεύτερο έτος παρακολούθησης και ανά εξάμηνο μετά το δεύτερο έτος παρακολούθησης μέχρι τη διακοπή της (με την ολοκλήρωση του πέμπτου έτους παρακολούθησης).

3.2.3. Ανίχνευση *CBFB/MYH11* μεταγράφων. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως για τους ασθενείς με t(8;21) OML, έτσι και οι ασθενείς με inv(16) OML σε αιματολογική ύφεση και με σταθερά χαμηλά ή μηδενικά επίπεδα χιμαιρικών *CBFB/MYH11* μεταγράφων μετά από την ολοκλήρωση της Χ/Θ εδραίωσης παραμένουν σε ύφεση, ενώ ασθενείς με αυξανόμενα επίπεδα ή θετικοποίηση αρνητικής RQ-PCR (επιβεβαιωμένης με διαφορά 15 ημερών) οδηγούνται σε αιματολογική υποτροπή της νόσου.²⁸ Για τις μετρήσεις των *CBFB/MYH11* χιμαιρικών μεταγράφων στις inv(16) OML με RQ-PCR για την εκτίμηση υπολειμματικής νόσου μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο μυελός των οστών, όσο και περιφερικό αίμα.²⁸ Οι εκκινητές (primers) και οι συνθήκες της RQ-PCR για την ανίχνευση των *CBFB/MYH11* χιμαιρικών μεταγράφων παρουσιάστηκαν στη βιβλιογραφία από την ομάδα EAC το 2003.²⁷ Όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπάρχουν δέκα διαφορετικοί τύποι *CBFB/MYH11* χιμαιρικών μεταγράφων (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J). Με RQ-PCR, επιχειρείται η ανίχνευση ενός τύπου μεταγράφων που έχει ήδη ταυτοποιηθεί κατά τη διάγνωση με RT-PCR. Υπάρχει ένα βασικό πρωτόκολλο ελέγχου ασθενών πασχόντων από inv(16) OML με RQ-PCR. Σε αυτό, προβλέπεται έλεγχος δειγμάτων είτε μυελού των οστών είτε περιφερικού αίματος μετά από την ολοκλήρωση της Χ/Θ εδραίωσης, ανά τρίμηνο κατά το πρώτο έτος παρακολούθησης, ανά τετράμηνο κατά το δεύτερο έτος παρακολούθησης και ανά εξάμηνο μετά το δεύτερο έτος παρακολούθησης μέχρι τη διακοπή της (με την ολοκλήρωση του πέμπτου έτους παρακολούθησης).

3.3. Έλεγχος παρουσίας γονιδιακών μεταλλάξεων

3.3.1. Μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1*. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα >30 παραλλαγές μεταλλάξεων του γονιδίου *NPM1* 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* (A, B και D) κατά την παρακολούθηση της EYN στην OML.²⁹ 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*.^{30–32} Όλες σχεδόν οι σχετικές μελέτες συμφωνούν ότι η μείωση του αριθμού των μεταγράφων της *NPM1* κατά δύο ή τρεις λογάριθμους μετά από τη Χ/Θ εδραίωσης συνοδεύεται από μικρότερη πιθανότητα υποτροπής της ΟΜΛ, ενώ η άνοδος του αριθμού των μεταγράφων κατά ένα λογάριθμο σε δύο τουλάχιστον συνεχόμενες μετρήσεις (σε μεσοδιαστήματα 15 ημερών ή ενός μήνα) προαναγγέλλει την αιματολογική υποτροπή εντός 1–6 μηνών (διάμεσος χρόνος περίπου 3 μήνες).^{30–32} Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αρκετές από αυτές τις μελέτες το χρησιμοποιούμενο cDNA προερχόταν από το περιφερικό αίμα, γεγονός που καθιστά την προαναφερθείσα μέθοδο αρκετά χρηστική και συνέβαλε στη σχετικά ευρεία διάδοσή της.

4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΥΞΗΜΕΝΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Η χρήση των χιμαιρικών γονιδίων και των μεταλλάξεων της *NPM1* ως «στόχων» για την παρακολούθηση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ αδυνατεί να καλύψει το σύνολο των περιπτώσεων, με αποτέλεσμα να εκτιμάται ότι για το 40% περίπου των ασθενών με ΟΜΛ δεν υπάρχει κάποια ειδική γενετική βλάβη χρήσιμη για την παρακολούθηση της ΕΥΝ.⁶ Στις περιπτώσεις αυτές, υπήρξε η σκέψη να χρησιμοποιηθούν ως «στόχοι» για τη μελέτη της ΕΥΝ με την τεχνική της RQ-PCR γονίδια με αυξημένη έκφραση στην ΟΜΛ, με κυριότερο εκπρόσωπο το *WT-1*.

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 λογάριθμους σε σύγκριση με τους υγιείς μάρ-

τυρες, στο 70–85% των ασθενών.³³ Για το λόγο αυτόν, η μελέτη των μεταγράφων του *WT-1* φαντάζει ως αξιόπιστη στρατηγική για την παρακολούθηση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ. Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 1/10.000–1/100.000.^{34–37} Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι η μείωση του αριθμού των μεταγράφων του *WT-1* μετά από τη Χ/Θ εδραίωσης κάτω από δύο λογάριθμους, 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 μεταξύ 1–3 μηνών.^{34–37} Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αρκετές από τις μελέτες που αναφέρθηκαν προηγουμένως το χρησιμοποιούμενο cDNA προερχόταν από το περιφερικό αίμα, γεγονός που καθιστά την προαναφερθείσα μέθοδο παρακολούθησης της ΕΥΝ στην ΟΜΛ αρκετά χρηστική και συνέβαλε στη σχετικά ευρεία διάδοσή της.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σ' ό,τι αφορά στη συμβολή των μοριακών τεχνικών στην προγνωστική κατηγοριοποίηση των ασθενών με ΟΜΛ αξίζει να επισημανθούν τα ακόλουθα: (α) Η θετική προγνωστική αξία της παρουσίας των *t(8;21)*, *t(15;17)* και *inv(16)*, καθώς και των αντίστοιχων χιμαιρικών γονιδίων *PML/RARα*, *AML1/ETO* και *CBFB/MYH11* είναι δεδομένη. (β) Η θετική προγνωστική αξία της παρουσίας των μεταλλάξεων της *NPM1* με τη σύγχρονη απουσία του *Fit-3/ITD* και των *biallelic* μεταλλάξεων του *CEBPA* θεωρείται πλέον τεκμηριωμένη για τους ασθενείς με CN-AML. (γ) Το ενδιαφέρον για τη μελέτη των μεταλλάξεων του *c-KIT* στις *t(8;21)* ΟΜΛ διευρύνεται συνεχώς.

Σ' ό,τι αφορά στη συμβολή των μοριακών τεχνικών στην παρακολούθηση της ΕΥΝ αξίζει να επισημανθεί ότι, εκτός από τα χιμαιρικά γονίδια *PML/RARα*, *AML1/ETO* και *CBFB/MYH11*, το γονίδιο της *NPM1* και το *WT-1* αποτελούν τα πλέον υποσχόμενα γονίδια-«στόχους» για την παρακολούθηση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ με την τεχνική της RQ-PCR.

ABSTRACT

Prognostic stratification and minimal residual disease assessment in Acute Myeloid Leukemia by molecular techniques

I. KAKKAS

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

Archives of Hellenic Medicine 2013, 30(5):566–573

Currently cytogenetic analysis at diagnosis provides the most important information about the prognosis of Acute Myeloid Leukemia (AML), with categorization into three distinct prognostic groups (favorable, intermediate and un-

favorable). In favorable prognosis AML, specific fusion genes (*PML/RAR α* , *AML1/ETO*, *CBF β /MYH11*) are present. Both conventional cytogenetic analysis and molecular biology techniques contribute to the identification of these genetic lesions. The majority of patients with AML patients belong to the intermediate prognosis group and most of these (about 45% of all cases of AML) carry a normal karyotype at diagnosis, Cytogenetically Normal AML (CN-AML). In recent years, various gene mutations (*FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *MLL*, *N-RAS*, *RUNX1*, *WT-1*, *IDH*) and forms of deregulated gene expression (*WT-1*, *EVI1*, *PRAME*, *BAALC*, *ERG*, *MN-1*) have been identified, illustrating enormous heterogeneity in the CN-AML subset. The prognostic relevance of *FLT3* Internal Tandem Duplication (*FLT3/ITD*), *NPM1* mutations and *CEBPA* biallelic mutations in the CN-AML subset has been documented, and these genetic lesions are currently used for prognostic classification. In studies on patients with t(8;21) AML specific gene mutations (*c-KIT*, *N-RAS*, *FLT3*) have been identified. The *c-KIT* mutations, identified mainly in exon 8, were found to be associated with an adverse prognosis. Monitoring the Minimal Residual Disease (MRD) after consolidation chemotherapy in patients with AML is important for assessing the risk of relapse. Real time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RQ-PCR) analysis has in most instances the sensitivity to detect at least one leukemic cell in 10⁴ background cells. Standardized RQ-PCR procedures have now been developed for the most common types of fusion transcripts (*PML/RAR α* , *AML1/ETO* and *CBF β /MYH11*) present in AML, allowing 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% of all cases of AML, and RQ-PCR assessment of disease level is, through the use of *WT-1* overexpression, now feasible in more than 70%.

Key words: *AML1/ETO*, *CBF β /MYH11*, *NPM1*, *PML/RAR α* , *WT-1*

Βιβλιογραφία

- SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H ET AL (eds). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. IARC Press, Lyon, 2008
- SLOVAK ML, KOPECKY KJ, CASSILETH PA, HARRINGTON DH, THEIL KS, MOHAMED A ET AL. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: A Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000, 96:4075–4083
- GRIMWADE D, WALKER H, HARRISON G, OLIVER F, CHATTERS S, HARRISON CJ ET AL. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): Analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML 11 trial. *Blood* 2001, 98:1312–1320
- BYRD JC, MRÓZEK K, DODGE RK, CARROLL AJ, EDWARDS CG, ARTHUR DC ET AL. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with *de novo* acute myeloid leukemia: Results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002, 100:4325–4336
- GRIMWADE D, HILLS RK, MOORMAN AV, WALKER H, CHATTERS S, GOLDSTONE AH ET AL. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: Determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010, 116:354–365
- DÖHNER K, DÖHNER H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008, 93:976–982
- GRIMWADE D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001, 14:497–529
- VAN DONGEN JJ, MACINTYRE EA, GABERT JA, DELABESSE E, ROSSI V, SAGLIO G ET AL. 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* 1999, 13:1901–1928
- THIEDE C, STEUDEL C, MOHR B, SCHAICH M, SCHAKEL 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
- 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
- FALINI B, MECUCCI C, TIACCI E, ALCALAY M, ROSATI R, PASQUALUCCI L ET AL. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005, 352:254–266
- SCHNITTGER S, SCHOCH C, KERN W, MECUCCI C, TSCHULIK C, MARTELLI MF ET AL. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005, 106:3733–3739
- THIEDE C, KOCH S, CREUTZIG E, STEUDEL C, ILLMER T, SCHAICH M ET AL. Prevalence and prognostic impact of *NPM1* mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006, 107:4011–4020
- PREUDHOMME C, SAGOT C, BOISSEL N, CAYUELA JM, TIGAUD I, DE BOTTON S ET AL. Favorable prognostic significance of *CEBPA*

- mutations in patients with *de novo* acute myeloid leukemia: A study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 2002, 100: 2717–2723
15. FRÖHLING S, SCHLENCK RF, STOLZE I, BIHLMAYR J, BENNER A, KREITMEIER S ET AL. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 2004, 22:624–633
 16. WOUTERS BJ, LÖWENBERG B, ERPELINCK-VERSCHUEREN CA, VAN PUTTEN WL, VALK PJ, DELWEL R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009, 113:3088–3091
 17. BOISSEL N, LEROY H, BRETHON B, PHILIPPE N, DE BOTTON S, AUVRI-GNON A ET AL. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* 2006, 20:965–970
 18. CAIROLI R, BEGHINI A, GRILLO G, NADALI G, ELICE F, RIPAMONTI CB ET AL. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: An Italian retrospective study. *Blood* 2006, 107:3463–3468
 19. PASCHKA P, MARCUCCI G, RUPPERT AS, MRÓZEK K, CHEN H, KITTLES RA ET AL. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2006, 24:3904–3911
 20. CAMPANA D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol* 2003, 121:823–838
 21. 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
 22. KERN W, HAFERLACH C, HAFERLACH T, SCHNITTGER S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008, 112:4–16
 23. FREEMAN SD, JOVANOVIĆ JV, GRIMWADE D. Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 2008, 35:388–400
 24. 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
 25. VAN DER VELDEN VH, HOCHHAUS A, CAZZANIGA G, SZCZEPANSKI T, GABERT J, VAN DONGEN JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003, 17:1013–1034
 26. SANZ MA, GRIMWADE D, TALLMAN MS, LOWENBERG B, FENAUX P, ESTEY EH ET AL. Management of acute promyelocytic leukemia: Recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2009, 113:1875–1891
 27. GABERT J, BEILLARD E, VAN DER VELDEN VH, BI W, GRIMWADE D, PAL-LISGAARD N ET AL. Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003, 17:2318–2357
 28. OMMEN HB, SCHNITTGER S, JOVANOVIĆ JV, OMMEN IB, HASLE H, ØSTERGAARD M ET AL. Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CBFβ-MYH11 acute myeloid leukemias. *Blood* 2010, 115:198–205
 29. 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
 30. 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
 31. DVORAKOVA D, LENGEROVA M, POSPISILOVA J, PALASEK I, 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
 32. 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
 33. ØSTERGAARD M, OLESEN LH, HASLE H, KJELDSEN 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
 34. CILLONI D, MESSA F, ARRUGA F, DEFILLIPI I, GOTARDI 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
 35. 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
 36. 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
 37. 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
- Corresponding author:*
- I. Kakkas, Department of Immunology and Histocompatibility, “Evangelismos” General Hospital, Athens, Greece
e-mail: ioankakkas@hol.gr
-