

Minimális reziduális betegség monitorozása gyermekkori akut leukémiában a WT1 gén perifériás vérben történő expressziójának nyomkövetésével

Rásó Erzsébet¹, Varga Norbert,¹ Tímár József,¹ Magyarosy Edina²

¹Országos Onkológiai Intézet, Tumor Progressziós Osztály, Budapest,

²Fővárosi Önkormányzat Heim Pál Gyermekkorház, Haemato-onkológiai Osztály, Budapest

A minimális reziduális betegség (MRD) kimutatásához és a relapszus korai előjelzéséhez a citomorfológiai módszerek és a Southern-blott technika érzékenysége nem elegendő, a különböző DNS-markerek kimutatásán alapuló PCR-technikák pedig csak a leukémiás esetek 20-30%-ában használhatók. Gyermekkori akut leukémiában a perifériás vérben a WT1 gén RNS-szintű expressziójának monitorozása számos kutatócsoport véleménye szerint kiválóan alkalmas a körlefolys követésére, az MRD érzékeny kimutatására, a relapszus korai jelzésére. Vizsgálatunkban 22 frissen diagnosztizált, 17 korábban diagnosztizált leukémiás és 19 nem-leukémiás gyermek perifériás vérét használtuk. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan a gyermekkori leukémiák mintegy 80%-a bizonyult WT1-pozitívnak, függetlenül azok immunfenotípusától, ugyanakkor fals-pozitív eredményt semmilyen más betegségben nem találtunk (nem-daganatos hematológiai kórképek, lymphadenopathiák, szolid tumorok stb). Tíz WT1⁺ leukémia esetében a teljes kezelési ciklus (1 év) során követtük a WT1-expresszió változásait a perifériás vérben. Megállapítható, hogy a WT1⁺ esetek mintegy 20%-ában lehet minimális reziduális betegséget valószínűsíteni a terápia során, amit a csontvelő és perifériás vér fénymikroszkópos vizsgálata nem jelez. Célunk ezen új, érzékeny diagnosztikus marker bevezetése a hazai klinikai gyakorlatba, amely az eddigieknél nagyobb érzékenységgel alkalmas az akut leukémiákban a minimális reziduális betegség kimutatására. *Magyar Onkológia* 44:297-303, 2000

Detection of minimal residual disease (MRD) in childhood leukemia is not possible by cytomorphology or Southern blotting due to their low sensitivity. On the other hand, the use of DNA markers and PCR amplification is helpful in a smaller proportion of leukemia cases (20-30%). Since childhood leukemia is characterized by WT1 gene expression in the majority of cases, monitoring of WT1 expression in the peripheral blood was suggested to be a method of choice to detect MRD. We have studied 22 newly diagnosed childhood acute leukemias and 17 cases in remission. As controls, 19 patients with non-leukemic diseases were included. The majority of our acute leukemia cases (80%) were proved to be WT1 expressors using a highly sensitive nested PCR technique. Ten WT1⁺ cases have been monitored for a year throughout the initial therapy phase, using peripheral blood tests. We observed that in 20% of the follow-up cases MRD was suggested which was not detectable by any other methods. It is our intention to introduce this new molecular technique into the clinical management of childhood acute leukemia. *Rásó E, Varga N, Tímár J, Magyarosy E. Nested PCR detection of WT1 expression in the peripheral blood in childhood acute leukemia. Hungarian Oncology* 44:297-303, 2000



Közlésre érkezett: 2000. szeptember 12.
Elfogadva: 2000. november 1.

Levelezési cím: dr. Rásó Erzsébet Ph.D, Országos Onkológiai Intézet, Tumor Progressziós Osztály,
1122 Budapest, Ráth György u. 7-9.
Tel: 224-8600/1353, Fax: 224-8706, E-mail: raso@oncol.hu

Bevezetés

A gyermekkori akut leukémia (AL) klinikai monitorozása a mai napig nem megoldott kérdés. Korábban a csontvelő és a perifériás vér morfológiai majd immuncitokémai vizsgálata képezte a betegség diagnózisának alapját, de később ugyanezen módszerek szolgálták a terápia hatékonyságának felmérésére (19), illetve a recidívák feldeírítésére is. A folyamat molekuláris mechanizmusainak egyre finomabb feltérképezése azonban lehetővé tette azt, hogy a betegség molekuláris markereit a folyamatos monitorozás során is felhasználjuk. Ennek elméleti hátterét az adja, hogy a gyermekkori akut leukémiák döntő többsége ún. klonális betegség, ahol a tumoros sejtpopuláció viszonylag stabil módon tartalmaz jellegzetes génhibát, illetve jellegzetes genotípussal rendelkezik. Miután a gyermekkori AL döntő többsége limfoblasztos jellegű, a tumoros populáció ezen sejtek geno-, illetve fenotípusának azonosításával megvalósítható. Erre a célra alapvetően kétféle módszer áll rendelkezésre, az immuncitokémia/áramlásos citometria és az RNS- illetve DNS-vizsgálatok. Az előbbi segítségével a kóros T- (3, 18), illetve B-sejtes markereket (4) hordozó tumoros sejteket mutathatók ki a csontvelőben. A perifériás vérben azonban erre többszörös jelölési technikákra van szükség („multiple phenotyping”), a biztonságos detektáláshoz 4-5-féle többes jelölésre is szükség lehet (18).

A DNS-vizsgálatok segítségével a kórosan megváltozott géneket lehet kimutatni általában a PCR-technika valamely variánsának alkalmazásával. Ennek feltétele az, hogy az akut leukémiában ún. fúziós gének legyenek jelen, melyek a kromoszómátörések és -átrendeződések eredményeként keletkeznek: ilyenek lehetnek a TEL-AML1 (20), a BCR-ABL (7) és az MLL-AF4 (19) géntermékek, melyek a csontvelőben és/vagy a perifériás vérben akár igen kis számban jelenlévő tumoros sejtpopuláció azonosítására is alkalmasak. A limfoid sejtek, szemben más normális sejteinkkel, rendelkeznek ún. saját genetikai markerrel. A B- és T-sejtes immunválasz során ugyanis mindkét sejtpopulációban jellegzetes géntrendeződés megy végbe, amely azonban normális körülmények között poliklonális jellegű. A daganatos limfoid sejtekben a folyamat klonális jellege miatt azonban ez a genetikai sajátosság monoklonális formában jelenik meg, így ez a jelenség alkalmas a tumoros B- illetve T-sejtes populáció genetikai monitorozására T-sejtek esetében a T-sejt-receptor (TCR) $\alpha\beta/\gamma\delta$ (16, 21) míg B-sejtek esetében a IgH/Ig κ (13, 16, 22, 23) monoklonális átrendeződéseinek kimutatásával.

Az MRD kimutatásához, azaz a maradék malignus sejtek detektálásához, és a relapszus korai jelzéséhez a citomorfológiai módszerek és a Southern-blott technika érzékenysége nem elegendő. A citomorfológiai eljárásokkal ugyanis a perifériás vérben 1-5%-nál kevesebb, a Southern-blott technikával pedig 5-10%-nál kevesebb malignus sejt már nem detektálható a perifériás vérben (24). A különböző DNS-markerek (mint pl.:

Philadelphia kromoszóma (BCR-ABL fúzió), az újra átrendeződött immunglobulin- és T-sejt receptor gének, ill. más gének transzdukciója vagy inverziója stb.) kimutatásán alapuló PCR-technikák érzékenysége ugyan megfelel a célnak, de ezen DNS-markerek a leukémiás betegek mindössze 20-30%-ában vannak jelen.

Számos kutatócsoport véleménye szerint a WT1 gén (Wilms' tumor-asszociált gén; 1, 6, 12) expressziójának monitorozása a csontvelőben, de leginkább a perifériás vérben leukémiás betegeknél lehetővé teszi az MRD kimutatását, a körlefolysis követését, a remisszió megítélését és a relapszus korai felismerését (2, 9, 10). Miután a WT1 gén a csontvelői őssejtekben normálisan is expresszálódik (2), jelen vizsgálatunkban azt tanulmányoztuk, hogy a WT1 gén perifériás vérben történő expressziója alkalmas-e a gyermekkori akut leukémiák monitorozására.

Anyag és módszerek

Betegek

Vizsgálatunkba 22 frissen diagnosztizált leukémiás, illetve 19 más nem-leukémiás betegségben szenvedő gyermeket, illetve 17, vizsgálatunk megkezdése előtt diagnosztizált, követés alatt álló leukémiás gyermeket vontunk be, akiből hematológiai kivizsgálásukhoz vért vettek. A vizsgálatokhoz rendelkezünk a szükséges etikai engedéllyel, illetve a szülők beleegyező nyilatkozatával.

RNS-extrakció, cDNS-szintézis

A leukémiás, illetve kontrollként használt nem-leukémiás betegek heparinos perifériás vérből a gyártó protokollja szerint (Bio-Rad) RNS-t izoláltunk az AquaPure RNA kit segítségével. Egy μg RNS-t írtunk át reverz transzkripcióval oligo(dT) (12–18) primer (Sigma) és Moloney leukémia vírus reverz transzkriptáz (Gibco – BRL) felhasználásával, oly módon, hogy a reakcióelegyet 90 percig inkubáltuk 37°C-on, majd 20 percig tartottuk 70°C-on. Felhasználásig a mintákat -70°C-on tároltuk.

WT1 nested PCR, primerek

A DNS-amplifikációt Taq polimeráz (Gibco-BRL) segítségével végeztük Crocodile-III thermocyclerrel (Applied Biosystems, Oncor). A reakcióelegyben 200 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 100 pM primer, 4U (első lépés) és 2,5U Taq polimeráz (második lépés) volt mintapufferben (10 mM TRIS-HCl pH=9,0, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100) feloldva. Az alábbi ciklus-protokollt használtuk: 30 ciklus (94°C 1 perc, 64°C 1 perc, 72°C 2 perc) a külső primerpárral, 30 ciklus (94°C 1 perc, 64°C 1 perc, 72°C 2 perc) a belső primerpárral. Az első lépésben 2 μl cDNS-templátot használtunk, majd 1 μl -t használtunk fel az első ciklus keverékéből a második ciklus során. Az amplifikáció után 10 μl PCR-terméket 2%-os agaróz gélen szeparáltunk, ethidium bromiddal festettük, majd Geldoc (Bio-Rad) rendszerrel jelenítettük meg és archiváltuk.

A felhasznált primerek szekvenciája az 1. ábrán látható. A nested PCR lényege, hogy az átvitt cDNS-ről az első PCR-lépésben egy viszonylag nagy terméket szaporítunk fel (ún. outer primerpár segítségével

vel, esetünkben 481 bázispár), majd a második PCR-reakció során ezen a szakaszon belül található primerpárt (inner, esetünkben 343 bázispár) használunk és kiinduláshoz az outer primerpárral felszaporított DNS-t használjuk (1. ábra). Előnye, hogy növeli a reakció érzékenységét és biztonságát, hisz „ál”-bekötéshez egyszerre négy primernek kellene „jó helyen” lenni viszonylag kis szakaszon belül (2. ábra). Az érzékenységét mi sem bizonyítja jobban, mint hogy 1 µg teljes RNS-ből kiindulva perifériális vérben 10^{-5} az érzékenysége (csontvelőben, mivel csontvelői őssejtek is expresszálják a WT1 gént 10^{-3} és 10^{-4} közötti arányban, ez az érték alacsonyabb).

A minták megnyugtató értékelhetőségének alapja a többszörös kontroll. Azt, hogy az RNS átírása megbízhatóan megtörtént és a kiindulási cDNS mennyisége valóban azonos minden mintában, minden esetben egy „housekeeping” gén, a β -actin átírásával bizonyítottuk. Annak a lehetőségét, hogy a gén kimutatása nem az expresszáldott RNS-ből, hanem a mintát szennyező genomiális DNS-ből történt, az RT-enzim nélkül végzett reverz transzkripció során képződött kontroll minták segítségével zártuk ki. A környezetből származó DNS-szennyezés kimutatására az RT-PCR reakció során olyan mintát futtattunk a vizsgáló anyaggal párhuzamosan, amelybe a beteg RNS-e helyett az oldószerként használt nagy tisztasági fokú desztillált vizet adtuk (3. ábra).

Eredmények

Célunk az volt, hogy gyermekkori akut leukémiában tanulmányozzuk a WT1 gén expressziójának marker szerepét annak perifériás vérből történő kimutatásával. Ennek előfeltétele, hogy

1. a WT1-expresszió szoros korrelációban álljon a leukémiás állapottal
2. egészséges, vagy más típusú betegségben szenvedő gyermekeknél ne, vagy csak jól definiált esetekben expresszáldjon.

A fentiek igazolására a betegek három nagy csoportján végeztük vizsgálatainkat. Az első csoportba (22 eset) frissen diagnosztizált leukémiás gyermekek tartoztak (1. táblázat). A második csoportba 17 már korábban diagnosztizált leukémiás, míg a harmadik, kontroll csoportba 19 nem-leukémiás gyermek tartozott.

Az első csoportba 20 különböző immunfenotípusú akut limfoblasztos leukémia és 1-1 akut, illetve krónikus mieloid leukémia tartozott (1. táblázat). Anyagunkban a gyermekkori leukémiás esetek több mint 80%-a bizonyult WT1-pozitívnak (18/22), amit a nagyobb érzékenységű nested PCR technika alkalmazása tett lehetővé (1. ábra). Megjegyzendő, hogy a WT1-expresszió kimutatása nem mutatott összefüggést a perifériás vérben észlelt blasztsejt-számmal.

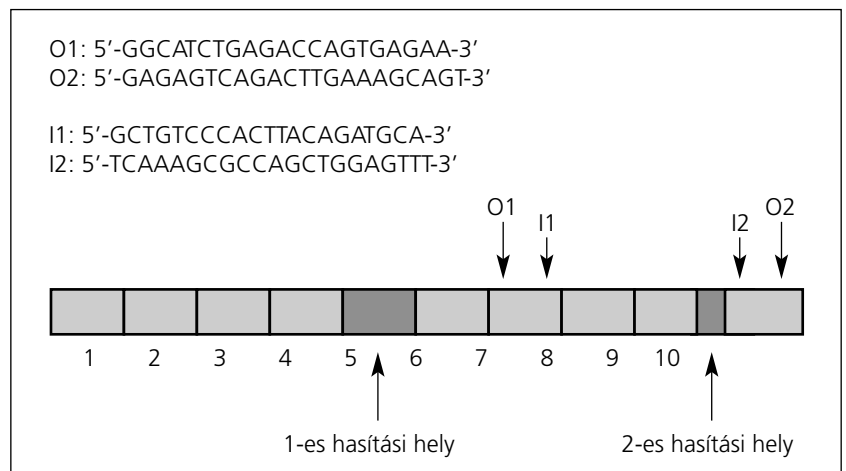
A kontrollcsoportba (2. táblázat) 19 olyan gyermeket soroltunk, akik egyéb, nem leukémiás betegségben szenvedtek (hematológiai betegségek, lymphadenopathiák, szolid daganatok stb). Mivel egyetlen esetben sem mutattunk ki WT1-pozitivitást, a leukémiák esetén tapasztalt pozitivitás spe-

cificitását ez az eredmény nagymértékben alátámasztotta. Felhívjuk a figyelmet arra, hogy még G-CSF-kezelést követően sem tudtunk kimutatni WT1⁺ sejtek megjelenését a perifériás vérben.

A továbbiakban 10 WT1⁺ leukémiás gyermek folyamatos monitorozását végeztük a leukémia diagnózisának felállításától számított 1 éven át a kemoterápiás kezelés során, annak meghatározott ellenőrzési pontjainál (8-10 meghatározás esetenként, 3. táblázat). A betegek hematológiai/morfológiai ellenőrzése a vizsgált periódusban nem jelezte a betegséget a perifériás vérben, illetve a csontvelőben egy eset kivételével (10. eset, fenntartó kezelés). Ugyanakkor az egyes ellenőrzési pontokon az esetek 20%-ában bizonyítottan pozitívnak a WT1-expresszió vizsgálata (3. táblázat). Megjegyzendő továbbá, hogy a fenntartó kezelés időszakában ez az arány jelentősen megemelkedett (7/10), aminek klinikai jelentőségét a további betegkövetés van hivatva eldönteni (3. táblázat).

A továbbiakban 17 régebben diagnosztizált, kezelés alatt álló vagy már a kezelés befejezését követően kontrollvizsgálaton megjelent beteg követésébe kapcsolódtunk be, ahol a kiindulási WT1-fenotípus ismeretlen. Ezen minták esetében a negatív WT1-expressziós eredmény természetesen jelentheti azt, hogy a gyermek eredetileg sem expresszáldott WT1 gént, és azt is hogy az adott időpontban remisszióban van. Mindazonáltal ebben

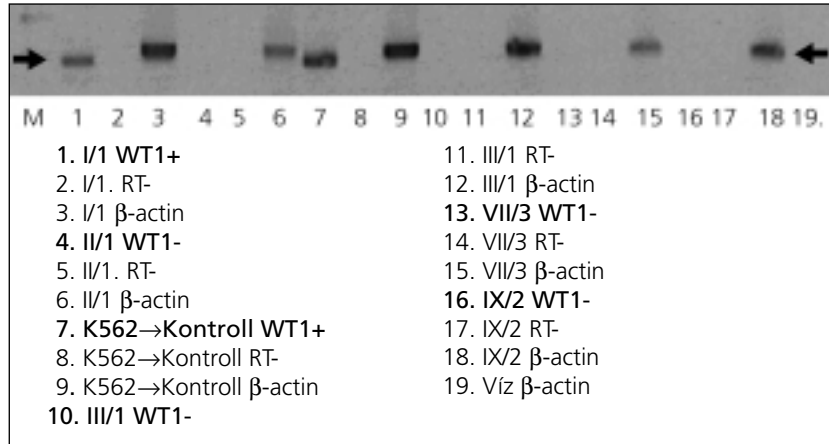
1. ábra: WT1 nested PCR sémája. Magyarazatot lásd az Anyag és Módszerek fejezetben.



2. ábra: WT1 kimutatása gyermekkori leukémiában a perifériás vérből: nested PCR. 1 = K562 (+ kontroll), 2 = VII/1, 3 = IX/1, 4 = X/1, 5 = IX/1, 6 = V/3, 7 = IX/1, 8 = IX/2, 9 = VII/2, 10 = VI/3. A római szám az adott beteg kódja (1. táblázat), míg az arab szám a kiindulási expressziót (1 = 0. nap), illetve a terápia megkezdése utáni 15. (2) vagy 33. napon észlelt expressziót jelöli.

M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
M	Marker					6. XI/2								12. IX/1			
	1. K526+kontroll					7. X/2								13. V/3			
	2. IX/3					8. VII/2								14. IX/1			
	3. VII/3					9. VII/1								15. IX/2			
	4. VII/3					10. XI/1								16. VII/2			
	5. III/4					11. X/1								17. VI/3			

3. ábra: WT1 nested PCR reakció-kontrolljai A vizsgálatban az I, II, III, VII és IX beteg mintái (1. táblázat) illetve a + kontroll K562 sejtvonala (7-9) szerepelnek. Az átírási hatékonyság ellenőrzésére a β -actin gén szolgált (I/3, II/6, K/9, VII/15, IX/18). Pozitív reakció az I/1, K/7 esetekben volt megfigyelhető. Genomiális DNS-szennyezés kimutatására az RT enzim-mentes minták szolgáltak (I/2, II/5, K/8, III/11, VII/14, IX/17), ami esetünkben negatívnak bizonyult. RNS-szennyezés kimutatására a víz-kontroll szolgált (19)



1. táblázat. Gyermekkori akut leukémiás betegek klinikai adatai

ID	Nem	(év)	Diagnózis	Immun-	Citogenetikai fenotípus	Rizikó-csoport	Fvs/ml (periféria)	Blasztsejt (periféria)	WT1-expresszió (periféria)
II.	Fiú	4	ALL1	CALLA+	Normál	SR	8700	28%	+
VII.	Fiú	2	ALL1	CALLA+	Hiperdiploid	SR	17800	62%	+
XIII.	Fiú	5	ALL2	CALLA+	21 trizómia	SR	4900	25%	+
XIV.	Leány	3	ALL2	CALLA+	Sikertelen	SR	3200	6%	-
XXXIV.	Leány	4	ALL1	CALLA+	Normál	SR	7200	0%	-
XXXVIII.	Leány	2	ALL	CALLA+	Sikertelen	SR	7500	17%	+
I.	Fiú	9	ALL2	CALLA+	Normál	MR	84500	88%	+
IV.	Leány	9	ALL1	CALLA+	Sikertelen	MR	19900	62%	+
V.	Fiú	4	ALL2	B/T	Normál	MR	3900	50%	+
VI.	Fiú	5	ALL1	CALLA+	Normál	MR	5900	97%	+
VIII.	Leány	7	ALL1	Pre-B	Hiperdiploid	MR	1200	14%	-
IX.	Fiú	10	ALL1	CALLA+	Sikertelen	MR	7000	17%	+
X.	Leány	15	ALL1	T	Normál	MR	7500	16%	+
XI.	Fiú	10	ALL1	CALLA+	Normál	MR	4000	0%	+
XVIII.	Fiú	3	ALL1	CALLA+	Normál	MR	30200	56%	+
XXXVI.	Fiú	8	ALL	CALLA+	Sikertelen	MR	1400	26%	+
XXXVII.	Fiú	7	ALL	Pre-B	Sikertelen	MR	1600	12%	+
XXXIX.	Fiú	7	ALL	CALLA+	Sikertelen	MR	88300	86%	+
III.	Fiú	7	ALL1	T	Normál	HR	544000	98%	+
XXXV.	Fiú	4	ALL	Pre-B	Normál	HR	23400	55%	+
XII.	Fiú	14	AML	Mieloid	Számbeli elt.	HR	16500	92%	+
XIX.	Leány	10	CML	Mieloid	T9,22 Ph+		394800		-

ALL = akut limfoblasztos leukémia, AML = akut mieloid leukémia, CML = krónikus mieloid leukémia, Ph+ = Philadelphia-kromoszóma+, SR = átlag (standard) rizikó, MR = közepes, HR = magas rizikó

a betegcsoportban a WT1-pozitivitás mindenképpen a minimális reziduális betegség jelenlétére utalhat. A betegeket ismételt (3-4 alkalommal) vizsgáltuk. A 17 betegből 5 esetében fordult elő legalább egy alkalommal WT1-pozitivitás és ötből négy klinikailag recidivált eset WT1-expresszió szempontjából is pozitívnak bizonyult. Jelenleg 3 hematológiai módszerekkel remisszióban lévő gyermek perifériás vérének WT1-pozitivitását mutattuk ki, melynek klinikai jelentőségét csak a szoros betegkövetés fogja megadni.

Megbeszélés

A WT1 gént 1990-ben izolálták először, mint egy, a Wilms' tumorért (gyermekkori nephroblastoma) felelős gént, és hosszú ideig mással nem is hozták kapcsolatba. Később mutációit mutatták ki WAGR-szindrómában és Denys-Drash-szindrómában is. A WT1 gén lokalizációja a humán genomon: 11p13. A génnek 10 exonrégiója van, és két darab hasítási hely révén négy különböző splice variánsa létezik, amelyek egymástól eltérő szerepet tölthetnek be (6, 12, 15).

A WT1 gén egy cinkujj transzkripciós faktor-ként funkcionáló proteint (a protein karboxi terminusán négy darab Cys2-His2 típusú cinkujj-mo-

tívumot tartalmaz) kódol, amely az EGR-1 (Early Growth Response) DNS konszenzus szekvenciához kötődve számos növekedési és differenciációs faktor (mint pl. IGF-II, PDGF- α , IGF-I-receptor, CSF-1, TGF- β 1, RAR- α , PAX-1, syndecan-1, c-myc, bcl-2) expressziójának szabályozásában játszik szerepet (1, 11). A WT1 gént tumorszuppresszor géneként szokták emlegetni, szerepe azonban sokkal ellentmondásosabb, mint más tumorszuppresszor géneké. A WT1 fehérje ugyanis p53 jelenlétében transzkripció represszorként működik, míg p53 hiányában vagy mutáns p53 mellett transzkripció aktivátor hatású. Ezenkívül a helyzetet tovább bonyolítja, hogy a WT1 fehérje önmaga átíródását is szabályozza.

A WT1 fehérje normális expressziója szűk szöveti és időbeli mintázatot mutat. Magzati korban a lépben és a foetalis vese blastema-sejtjeiben is expresszálódik, később azonban egészséges emberben csupán a gonádokban, az uterus myometriumban és kötőszöveti sejtjeiben, a lép kötőszövetes tokjában, a testüregék és zsigerek (szív, tüdő, máj, bél) mesotheliális bélésében, és az éretlen CD34⁺ csontvelői hematopoetikus progenitor sejtekben mutatható ki a WT1 gén transzkripciója. A WT1 gén a fentebb említett gének transzkripciójának bonyolult szabályozása révén fontos irányítója és egyben kényes pontja is a szervezetben lezajló egyes sejtprolifерációs és -differenciációs folyamatoknak. Így a WT1 fehérje fontos szerepet játszik az urogenitális szervrendszer fejlődésének irányításán túl a vérképzésben is, melynek során kizárólag az éretlen CD34⁺ csontvelői progenitor sejtekben expresszálódik, a belőlük differenciálódó CD34⁻ ún. post-progenitor sejtekben már nem. Ezt a tényt mind az RT-PCR vizsgálatok, mind pedig az immuncitokémiai módszerek alátámasztották (2).

A WT1 gén normál haemopoiesisben betöltött szerepére utalnak a következő kutatási eredmények: habár a CD34⁺ sejtek csak egy kis hányadát alkotják a csontvelői mononukleáris sejteknek, egy nagyon heterogén sejtekből álló csoportot

2. táblázat. WT1-expresszió vizsgálata nem-leukémiás gyermekek perifériás vérében

NEM	ÉLETKOR	DIAGNÓZIS	WT1- EXPRESSZIÓ
LYMPHADENITIS			
Leány	4	Akut	-
Leány	8	Akut	-
Fiú	15	Akut	-
Fiú	14	Akut	-
Fiú	9	Akut	-
Fiú	6	Akut	-
Fiú	11	Akut	-
HEMATOLÓGIAI MEGBETEGEDÉSEK			
Leány	6	ITP	-
Fiú	20	ITP	-
Fiú	5	Haemolyticus anaemia	-
Leány	8	Sphaerocytosis	-
Fiú	2	Vashiányos anaemia	-
Fiú	12	Aplasticus anaemia	-
Leány	18	Véralvadási zavar	-
EGYÉB MEGBETEGEDÉS			
Leány	12	Rhabdomyosarcoma	-
Leány	3	Colica abdominalis	-
Leány	14	Colica abdominalis	-
Leány	25	Donor allogén csontvelő	.. ^a .. ^b
Leány	5	Autológ csontvelő- transzplantáció (Neuroblastoma)	.. ^a .. ^b

^a, ^b 5 napos Neopogén (G-CSF) stimulálást megelőzően (^a), illetve azt követően (^b)

3. táblázat. WT1-expresszió monitorozása WT1⁺ ALL-es gyermekek perifériás vérében

N	ID	ALL rizikócsoport	0. nap	Indukció		Konszolidáció (2 hó)	Reindukció (2 hó)		Fenntartó kezelés (ellenőrző mintavétel)
				5. nap	33. nap				
1	II.	SR	+	-	-	-	+	+	- - - - +
2	VII.	SR	+	-	-	-	-	-	- - +
3	XIII.	SR	+	-	+	-	-	-	- + +
4	IV.	MR	+	∅	-	-	-	-	- - -
5	V.	MR	+	+	-	-	-	-	- - - - - +
6	VI.	MR	+	+	-	-	-	-	- - - + - -
7	IX.	MR	+	-	-	+	-	-	- - - - -
8	X.	MR	+	-	+	-	+	-	- - +
9	XI.	MR	+	-	-	-	-	-	- - -
10	III.	HR	+	+	-	+	-	-	- - - + - +*
			10/10	3/10	2/10	2/10	2/10	7/10	

* klinikai recidíva

tot képeznek, amelyekben az egyes sejtek különböznek ciklusidejükben, sejtvonalszintű elkötelezettségükben, és a differenciációs stádiumukban. Az egyes CD34⁺ sejtek vizsgálata pedig azt mutatta, hogy a különböző WT1 izoformák (a négy splice variáns) expressziója variál az egyedi progenitor sejtek között, mégpedig összefüggésben az egyes progenitor sejtek differenciációs státuszával. A WT1 fehérjét a CD34⁺ sejteknél érettebb sejtalakok nem expresszálják, ezért míg a csontvelőben egészséges emberben is kimutatható WT1-expresszió (2), addig egészséges ember perifériás véréből izolált mononukleáris sejtekben nem detektálható a WT1 gén hírvivő RNS-e (1, 9, 10). Több beszámoló is alátámasztja azonban a WT1 gén megnövekedett expresszióját csontvelőben és WT1-expressziót a perifériás vérben akut leukémiás betegekben, és CML-es betegekben a blasztos krízis ideje alatt. Több kísérlet is azt mutatja, hogy a leukémiák esetében a WT1 gén nem megfelelő működése játszik szerepet a proliferációs és differenciációs zavar okozta kóros haemopoiesis kialakulásában (1, 15). 32D cl3-sejteket (egy IL-3-dependens mieloid progenitor sejt vonal) vad típusú WT1 génnel transzfektálva például azt találták, hogy ezekben a sejtekben a WT1 gén vad típusának folyamatos transzkripciója megállítja a differenciációt, és a sejtek G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) jelenlétében csak proliferálnak, míg a nem transzfektált, valamint a mutáns WT1 génnel transzfektált 32D cl3 sejtek G-CSF hatására érett neutrofil granulocitákká differenciálódtak (1, 11). A vizsgálatok azt mutatták, hogy a WT1-expresszió hatására változások következtek be a G-CSF receptor által mediált STAT (signal transducers and activators of transcription) útvonalban. A vad típusú WT1 gén tartós expressziója megváltoztatta a sejtekben a Stat 3 izoformák arányát, amely befolyásolja a sejten belüli génaktivációt és így a sejt differenciációs képességét. Az AML sejtek szintén differenciálódás nélkül proliferálnak G-CSF jelenlétében, amely a WT1 gén magas expressziójával magyarázható. További érdekes tény, hogy WT1 antisense oligonukleotidok gátolják a proliferációt és apoptózist indukálnak mieloid leukémiá sejt vonalakban. Ezek az eredmények is alátámasztják azt az elképzelést, hogy a WT1 gén két alapvető funkciója (tumorszuppresszor gén, onkogén) közül leukémiás sejtek esetében inkább az onkogén funkció jut érvényre.

Habár a WT1 gén szerepe a leukemogenezisben részleteiben még nem ismert, a WT1 gén expressziójának követése a leukémiás betegek csontvelőjében és perifériás vérében számos kutatócsoport véleménye szerint is alkalmas az MRD hosszú távú követésére (9, 10). A különböző újonnan detektált akut leukémiás esetek, valamint a CML blasztos krízise alatt vizsgált esetek mintegy 70%-ában lehet megnövekedett WT1-expressziót észlelni a betegek csontvelőjében, és WT1-expressziót detektálni a perifériás vérben is. A komplett remisszió után bekövetkező relapszus állapotában lévő betegeknek pedig mintegy 90%-ában lehet kimutatni WT1-expressziót a pe-

rifériás vérben, illetve expressziónövekedést a csontvelőben. A vizsgálatok azt mutatják, hogy a relapszus bekövetkezésekor mindig jelentős mértékben megnő a WT1 gén expressziója, még azon betegek esetében is, akiknél a komplett remisszió ideje alatt nem volt detektálható WT1-expresszió a perifériás vérben.

Több vizsgálat is igazolta, hogy a gyermekkori leukémiák döntő többségében a WT1 gén expresszálódik, gyakorlatilag függetlenül a leukémia genotípusától (5, 8, 17). Ugyanakkor WT1 mutációt ezen esetekben nem sikerült kimutatni (14), ami segíthetne abban, hogy a csontvelőben fiziológián is expresszálódó WT1-től el lehessen különíteni a leukémia-sejtek által expresszált WT1-et. Emiatt a WT1-expresszió perifériás vérből történő kimutatásának módszere a WT1⁺ gyermekkori leukémiák monitorozására alkalmas. Míután azonban a gyermekkori leukémiák döntő többsége WT1⁺, a perifériás vér WT1-expressziójának folyamatos követése kitűnő lehetőséget nyújthat az esetleges relapszusnak akár hónapokkal előre történő jelzésére. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a WT1⁻ esetekben nem lehet eltekinteni a bonyolultabb (és drágább), de más szempontból specifikusabb genetikai markerek alkalmazásától.

Köszönetnyilvánítás

A munkát az OTKA T026250 támogatta

Irodalom

1. Algar EM, Khromikh T, Smith SI, et al. A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene* 12:1005-1014, 1996
2. Baird PN, Simmons PJ. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp Hematol* 25:312-320, 1997
3. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96:2691-2696, 2000
4. Dworzak MN, Fritsch G, Panzer-Grumayer ER, et al. Detection of residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia by comparative phenotype mapping: method and significance. *Leuk Lymphoma* 38:295-308, 2000
5. Gaiger A, Linnerth B, Mann G, et al. Wilms' tumour gene (wt1) expression at diagnosis has no prognostic relevance in childhood acute lymphoblastic leukemia treated by an intensive chemotherapy protocol. *Eur J Haematol* 63:86-93, 1999
6. Hirose M. The role of Wilms' tumor genes. *J Med Invest* 46:130-140, 1999
7. Hoelzer G, Gokbuget N. New approaches to acute lymphoblastic leukemia in adults: where do we go? *Semin Oncol* 27:540-559, 2000
8. Im HJ, Kong G, Lee H. Expression of Wilms tumor gene (WT1) in children with acute leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 16:109-118, 1999
9. Inoue K, Ogawa H, Yamagami Y, et al. Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms' tumor gene) expression levels. *Blood* 86:2267-2278, 1996
10. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of Minimal Residual Disease in acute leukemia. *Blood* 84:3071-3079, 1994
11. Inoue K, Tamaki H, Ogawa H, et al. Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 91:2969-2976, 1998

12. Little M, Holmes G, Walsh P. WT1: what has the last decade told us? *Bioassays* 21:191-202, 1999
13. Matolcsy A, Borbényi Z, Demeter J, és mtsai. Detection of minimal residual diseases in B-cell tumors using PCR specific for the immunoglobulin heavy chain gene. *Orv Hetil* 141:1403-1406, 2000
14. Miyagawa K, Hayashi Y, Fukuda T, et al. Mutations of the WT1 gene in childhood nonlymphoid hematological malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* 25:176-183, 1999
15. Moorwood K, Salpekar A, Ivius SM, et al. Transactivation of the WT1 antisense promoter is unique to the WT1[+/-] isoform. *FEBS Letters* 456:131-136, 1999
16. Nakao M, Janssen JW, Flohr T, et al. Rapid and reliable quantification of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using rearranged immunoglobulin and T-cell receptor loci by LightCycler technology. *Cancer Res* 60:3281-3289, 2000
17. Niegemann E, Wehner S, Kornhuber B, et al. Wt1 gene expression in childhood leukemias. *Acta Haematol* 102:72-76, 1999
18. Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Lucio P, et al. BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 14:816-825, 2000
19. Rubnitz JE. Molecular diagnostics in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Biol Regul Homeost Agents* 14:182-186, 2000
20. Sedláček P, Trka J, Zuna J, et al. Monitoring of minimal residual disease and mixed chimerism in a case of high-risk TEL/AML1-positive acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* 85:1100-1102, 2000
21. Szczepanski T, Langerak AW, Willemse MJ, et al. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T cell acute lymphoblastic leukemia reflect "end-stage" recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 14:1208-1214, 2000
22. van Wering ER, van der Linden-Schrever BE, Szczepanski T, et al. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukemia: implications for monitoring of minimal residual disease. *Br J Haematol* 110:139-146, 2000
23. Verhange OJ, Willemse MJ, Breunis WB, et al. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 14:1426-1435, 2000
24. von Knebel Doeberitz M, Lacroix J. Nucleic acid based techniques for the detection of rare cancer cells in clinical samples. *Cancer Metastasis Rev*, 18:43-64, 1999