VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

Minimal restsygdom ved maligne blodsygdomme I

Baggrund og præklinisk validering

Professor Peter Hokland,
molekylærbiolog Charlotte Guldborg Nyvold,
overlæge Jesper Stentoft, reservelæge Hans Beier Ommen,
1. reservelæge Lene Hyldahl Ebbesen,
bioanalytiker Karin Brændstrup,
bioanalytiker Bodil Lind Andersen,
bioanalytiker Lone Siig Mikkelsen &
molekylærbiolog Mette Østergaard

Århus Universitetshospital, Århus Sygehus,
Hæmatologisk Afdeling R

Leukæmi opdeles traditionelt i akut eller kronisk, samt i lymfatisk eller myeloid. Mens den genetiske baggrund for den kronisk lymfatiske (CLL) hænger sammen med og til en vis grad udgår fra den leukæmiske celles B-celle-tilknytning, gælder for de tre andre, akut myeloid (AML), akut lymfatisk (ALL) og kronisk myeloid (CML), at der ofte er balancerede translokationer bag deres oprindelse. Ved balanceret translokation forstås en ombytning af kromosommateriale, der er uden samtidigt tab, og som går igen i alle den immortaliserede celles datterceller [1]. Et klassisk eksempel på en balanceret translokation er Philadelphiakromosomet. Her giver det fusionerede DNA på kromosom 22 anledning til et ribonukleinsyre (RNA)-fusionstranskript, der medfører dannelse af en abnormt fungerende tyrosinkinase, der giver cellerne en vækstfordel (se oversigt i [2]). Mens næsten alle CML-patienter bærer denne forandring i deres celler, gælder for ALL og AML, at de er betydeligt mere komplicerede i deres genetiske konstitution, og at kun en del af patienterne har påviselige translokationer (**Tabel 1**). Til gengæld findes ved både AML og ALL en række andre forandringer, som kan anvendes til diagnostik af den maligne klon [3]. Som det også fremgår af Tabel 1, er der tale om såvel genduplikationer som punktmutationer, og når dertil lægges, at en række gener, der ikke er ændrede, overudtrykkes i de maligne celler i forhold til de benigne, kan det uddrages, at langt de fleste patienter med akut og kronisk leukæmi har en anvendelig genetisk markør.

Minimal restsygdom – koncept og konsekvens

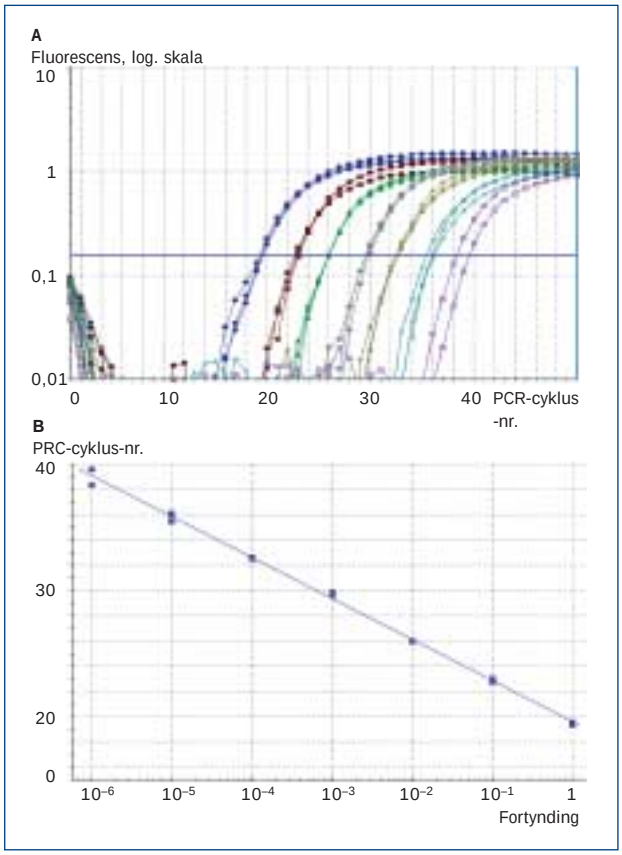
Traditionelt har man inden for hæmatologien anvendt begrebet komplet remission om den tilstand, hvor en patient med erkendt malignitet med cytoreduktion er bragt ind i en fase, hvor det med traditionelle metoder ikke længere er muligt at påvise sygdom. Denne grænse har de seneste årtier bevæget sig gradvist nedefter fra de 5% umodne celler (»blaster«), som en trænet hæmatopatolog kan erkende som abnorme. Dette er sket ved udvikling af en række nye metoder, heriblandt flowcytometri, G-bånds karyotypering, fluorescens in situ-hybridisering (FISH) samt på det seneste molekylærbiologi, hovedsageligt polymerasekædereaktions (PCR)-analyser. Dette kan eksemplificeres ved CML, hvor FISH og standardkaryotypering (1-2% følsomhed) anvendes diagnostisk, men hvor PCR-analysen har taget over ved opfølgning af patienterne, og med meget stor følsomhed (0,001%) kan afgøre, om der er sygdom til stede eller ej.

Det begreb, at det er muligt at detektere sygdom på trods af, at standardmetoder ikke har kunne påvise den, er blevet kaldt minimal restsygdom (på engelsk *minimal residual disease;* MRD) [4]. Det anvendes i stigende grad både på protokol- og på enkeltpatientniveau, og dets udbredelse skyldes den kvantificering af PCR-produkter, som blev mulig for godt ti år siden.

Tabel 1. Markører for minimal restsygdom ved akutte leukæmier, der undersøges rutinemæssigt på Immunhæmatologisk Laboratorium, Hæmatologisk Afdeling R, Århus Sygehus.

Involverede gener	Translokation	Hyppighed, %	Følsomhed
Akut myeloid leukæmi			
Fusiontranskripter			
PML-RARA	t(15;17)	12	1:5.000-1:200.000[a]
AML1-ETO	t(8;21)	8	1:3.000-1:500.000[a]
CBFB-MYH1	inv(16)	4	1:5.000-1:100.000[a]
DEK-CAN	t(6;9)	1	1:400-1:4.000[a]
Overudtrykte gener			
WT1	NA	80	1:1.000-1:20.000[a, b]
Muterede gener			
NPM1	NA	20	1:1.000
dupMLL	NA	6	1:100-1:2.000[a, b]
Akut lymfatisk leukæmi			
Fusiontranskripter			
TEL-AML1	t(12;21)	20[c]	1:3.000-1:250.000[a]
BCR-ABL	t(9;22)	15[d]	1:15.000-1:200.000[a]
EA2-PBX1	t(1;19)	5	1:50.000-1:1.000.000[a]
MLL-AF4	t(4;11)	5	1:80.000[a]
SIL-TAL1	Heterogen	10	1:50-1:5.000[a]
MLL-ELL	t(11;19)	Få	1:10.000[a]
MLL-ELN	t(11;19)	Få	1:10.000[a]
Muterede gener			
dupMLL	NA	6	1:100-1:2.000[a, b]

NA: *not applicable.*
a) Følsomhedsspænd hos patienter undersøgt på Immunhæmatologisk Laboratorium, Århus Sygehus.
b) Udtryk i normal hæmatopoiese medregnet. c) Flest børn.
d) Flest voksne.



Figur 1. Den dynamiske spændvidde i kvantitativ polymerasekædereaktion. I **A** ses, hvordan tifolds fortyndinger af en cellelinje (Kasumi), der er positiv for fusionstranskriptet AML1-ETO, kan ses (amplifikation på y-aksen), fra 1:1 (venstre kurve) til 1:1.000.000 (højre kurve). Det kan ses, at der er en direkte relation mellem mængde af tilblandet Kasumi, og hvor tidligt amplifikationen sker (den vandrette blå linje angiver den tærskel, som fluorescensniveauet skal op over, før det anses for signifikant forskelligt fra baggrundsfluorescensen). I **B** ses, at sammenhængen mellem starttranskriptniveau, og hvornår der ses en signifikant mængde fluorescens er lineær over seks dekader.

Kvantitativ polymerasekædereaktion – en metode til at bestemme minimal restsygdom

Ved PCR opnår man en eksponentiel tilvækst af kopier af en konkret nukleinsyresekvens. Mens resultatet af en standard-PCR er et positivt eller negativt svar, blev det i 1990'erne med en ny fluorescensbaseret metode muligt løbende at kvantificere PCR-produkterne for hver enkelt cyklus i amplifikationsforløbet [5]. I apparatur, der er udviklet specielt til metoden, måles tilvæksten af produktet for hver enkelt PCR-cyklus som en tilvækst af fluorescens, og det kvantitative aspekt indgår derved, at jo før et bestemt produkt giver anledning til et fastsat tærskelniveau af fluorescens, jo flere kopier var der af nukleotidsekvensen fra starten (**Figur 1A**). På denne måde kan tærskelværdier for opformering af produkter (f.eks. fusionstranskripter, dvs. sammensmeltningen på RNA-niveau af produkter fra to forskellige gener) anvendes som grundlag for beregning af MRD. Et kendetegn for teknikken er, at der for hver biologisk prøve tages hensyn til opformering af en række gener, der er ensartet til stede i alle humane celler (såkaldte »husholdningsgener«). Sidstnævnte fungerer også som intern kvalitetskontrol for analysen, idet sen opformering er ensbetydende med dårligt prøvemateriale og dermed også nedsat følsomhed af MRD-bestemmelsen i den pågældende prøve [6]. På denne måde vil hver patientprøve således have sin egen interne kontrol, hvilket er af stor betydning ved fortolkningen af den enkelte prøve.

En anden styrke ved kvantitativ polymerasekædereaktion (RQ-PCR) er dens dynamiske spændvidde. Som det således vil fremgå af Figur 1B, er opformeringen lineær over 5-6 logaritmedekader, hvilket gør den let at aflæse og fortolke. Vigtigst er dog, at analysen på denne måde bliver helt usædvanlig følsom, da signaler fra en enkelt celle kan spores imellem 100.000 andre celler.

Præklinisk validering af kvantitativ polymerasekædereaktion for fusionstranskripter

Efter at tidlige rapporter havde godtgjort, at RQ-PCR indebar en følsomhed for sygdomsdetektion helt ned til de nævnte 1:100.000, og efter at anekdotiske fund havde antydet, at molekylære tilbagefald kunne forudgå de kliniske med adskillige måneder, iværksattes multicenterinitiativer, der havde til formål at standardisere anvendelsen af analysen.

Ud over at afklare mere tekniske detaljer i fremstilling af kopi-DNA (cDNA) fra nativt RNA og opformering af PCR-produkter herfra, havde det såkaldte *Europe Against Cancer* (EAC) *Concerted Action* til formål at definere de optimale RQ-PCR-*assays* mod de hyppigst forekommende balancerede translokationer. Ved rundsending af prøvemateriale mellem 25 europæiske laboratorier kunne de udvalgte *assays*' validitet godtgøres, og disse har efterfølgende vundet generelt indpas internationalt [7]. I tillæg til dette indebar EAC-samar-

Faktaboks

Ved leukæmi er den molekylærbiologiske baggrund for manges vedkommende kendt. Balancerede translokationer er en vigtig forandring.

Ved kvantitativ polymerasekædereaktion (RQ-PCR) kan de molekylærbiologiske forandringer bestemmes nøjagtigt.

Ved samtidig bestemmelse af mængden af husholdningsgener, som i princippet er nøjagtig ens udtrykt i alle celler, kan en prøves kvalitet bestemmes.

Polymerasekædereaktionsanalysens spændvidde gør, at en celle med en genforandring kan spores i en prøve med 100.000 celler.

RQ-PCR har kunnet valideres præklinisk, således at den kan anvendes reproducerbart ved opfølgning af patienter.

Forkortelser

CLL = kronisk lymfatisk leukæmi
AML = akut myeloid leukæmi
ALL = akut lymfatisk leukæmi
CML = kronisk myeloid leukæmi
RNA = ribonukleinsyre
FISH = fluorescens in situ-hybridisering
PCR = polymerasekædereaktion
MRD = *minimal residual disease*
RQ-PCR = kvantitativ polymerasekædereaktion
cDNA = kopi-DNA
EAC = *Europe Against Cancer*

bejdet også en udvælgelse af de gener, der fungerede bedst som husholdningsgener.

Samlet set betød dette og andre mindre initiativer, at RQ-PCR i 2005 kunne betragtes som præklinisk valideret. Anvendelsen af EAC-fremgangsmåden har ydermere medført, at der for andre (mindre hyppige) translokationer har kunnet udvikles lignende validerede *assays* [8].

Translation af teknikken til kvantitativ polymerasekædereaktion fra laboratorium til individualiseret klinisk anvendelse

Udbredelsen af en ny metodologi hænger i høj grad sammen med standardisering af *assay* og datapræsentation, så klinisk arbejdende læger får entydige svar. For så vidt angår *assay*-variation fra laboratorium til laboratorium er det for RQ-PCR's vedkommende særdeles vigtigt at kunne fastlægge et regelsæt for sammenligninger, eftersom metoden på grund af ovenstående ensartethed kan anvendes løbende i et længere opfølgningsforløb også i multicenterregi. Ofte anvendes en prøve der er udtaget på diagnosetidspunktet som grundlag for efterfølgende analyser.

Ved CML, hvor man i adskillige multicenterprotokoller har søgt at afklare effektiviteten af imatinibbehandling (se efterfølgende statusartikel) har man anvendt en positiv cellelinje – K562 – som sammenligningsgrundlag og anvendt »K562-ækvivalenter« i et forsøg på at udligne forskellen i genekspression mellem de enkelte centre. Ydermere er kommercielt fremstillede frysetørrede præparationer af K562 for nylig blevet introduceret som en kilde til monitorering af dag-til-dag-variation af testen [9].

Datapræsentation har vist sig at være en vigtig faktor i udbredelsen af RQ-PCR-teknikken. Dette skyldes, at teknikken trods sin standardiserbarhed kun vanskeligt lader sig omsætte til en form, hvor det longitudinelle forløb fremstilles på en intuitiv måde. På tabelform vil det positive element i metodens ekstraordinære følsomhed blive tabt ved angivelse af restsygdom som brøker eller decimaler, mens det har vist sig, at grafik, der tager udgangspunkt i ovennævnte form for diagnoseprøve, kan give relativt let forståelig visuel fornemmelse af et sygdomsforløb. Vort laboratorium har i regi af en arbejdsgruppe i det EU-sponserede LeukemiaNet stået for udviklingen af en softwarepakke [10], der på tværs af apparatur og databehandling søger at harmonisere præsentationen af kliniske resultater og dermed øge forståelsen for metodologien. Anvendelse af denne pakke bidrager således til, at sammenligning af data bliver mulig på tværs af centre, der deltager i kliniske gennemprøvninger.

Konklusion

Med en følsomhed på ofte 1:100.000 er RQ-PCR et meget stærkt værktøj til at måle MRD. Teknikken er således nu præklinisk valideret og standardiseret og er på vej ind i stadig flere protokollerede behandlingsforsøg. Det forudses, at RQ-PCR vil vinde stadig mere indpas ved opfølgning af de fleste patienter med maligne hæmatologiske lidelser, hos hvem en MRD-markør kan identificeres.

Korrespondance: *Peter Hokland,* Immunhæmatologisk Laboratorium, Hæmatologisk Afdeling R, Århus Universitetshospital, Århus Sygehus DK-8000 Århus C. E-mail: phokland@ki.au.dk

Antaget: 31. august
Interessekonflikter: Ingen

Litteratur

1. Rowley JD. The role of chromosome translocations in leukemogenesis. Semin Hematol 1999;36:59-72.
2. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z et al. The biology of chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 1999;341:164-72.
3. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. Lancet 2006;368:1894-1907.
4. Pallisgaard N, Clausen N, Schroder H et al. Rapid and sensitive minimal residual disease detection in acute leukemia by quantitative real-time RT-PCR exemplified by t(12;21) TEL-AML1 fusion transcript. Genes Chromosomes Cancer 1999;26:355-65.
5. Heid CA, Stevens J, Livak KJ et al. Real time quantitative PCR. Genome Res 1996;6:986-94.
6. Beillard EPN, van der Velden VH, Bi W et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. Leukemia 2003;17:2474-86.
7. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH 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;17:2318-57.
8. Ostergaard M, Stentoft J, Hokland P. A real-time quantitative RT-PCR assay for monitoring DEK-CAN fusion transcripts arising from translocation t(6;9) in acute myeloid leukemia. Leuk Res. 2004;28:1213-5.
9. Saldanha, J, Silvy M, Beaufils N, et al. Characterization of a reference material for BCR-ABL (M-BCR) mRNA quantitation by real-time amplification assays: towards new standards for gene expression measurements. Leukemia 2007;21:1481-7.
10. www.leukemianet.eu/ (14 okt 2008).