

Je vysoká exprese genu WT1 znakem nádorových buněk?

Kalinová M.^{1,2}, Mužíková K.^{1,2}, Šrámková L.^{1,2}, Starý J.³, Horák J.⁴, Trka J.^{1,2}

¹CLIP – Childhood Leukaemia Investigation Prague

²Laboratorní centrum Kliniky dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF Praha

³Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF Praha

⁴Gynekologicko-porodnická klinika, UK 2. LF a FNM Praha

Souhrn

Význam exprese genu WT1 v blastech akutních leukemií a myelodysplastického syndromu (MDS) byl opakovaně prověřován s nejednoznačnými výsledky. V naší studii jsme se zaměřili na stanovení exprese WT1 pomocí kvantitativní PCR v diagnostických vzorcích dětských pacientů s akutními leukemiemi (n = 113), myelodysplastickým syndromem (n = 14) a aplastickou anémií (n = 25). Jako kontroly byly vyšetřeny vzorky kostních dřeví zdravých dárců a vzorky pupečnickových krví (n = 35), které exprimují gen WT1 na velice nízké nebo nedetekovatelné hladině. Expres genu WT1 v blastech akutních myeloidních (n = 62) i lymfoblastických leukemií (n = 51) se pohybovala v širokém rozpětí. Vysoká exprese byla u lymfoblastických leukemií spojena s přítomností hybridního genu MLL/AF4, zatímco BCR/ABL a TEL/AML1 pozitivní pacienti měli expresi nízkou. T buněčné lymfoblastické leukemie exprimovaly gen WT1 v širokém rozmezí. U myeloidních leukemií byla vysoká exprese spojena s méně zralými subtypy (zejména se subtypem M3), naopak leukemie subtypu M5 exprimovaly na signifikantně nízkých hladinách. Pacienti s aplastickou anémií mají velice nízké nebo nedetekovatelné hladiny transkriptu WT1, zatímco pacienti s myelodysplastickým syndromem souhrnně exprimují gen WT1 na vyšší hladině. Při porovnání pacientů s aplastickou anémií se skupinou pacientů s myelodysplastickým syndromem typu refrakterní anémie byl nalezen statisticky významný rozdíl (p = 0,0079). Význam stanovení hladiny transkriptu WT1 pro diferenciální diagnostiku těchto chorob je však omezený kvůli překryvu naměřených hodnot. Nízká exprese genu WT1 v blastech některých subtypů akutních leukemií dokazuje, že hyperexpres genu WT1 není „panleukemickým“ markerem.

Klíčová slova: aplastická anémie, myelodysplastický syndrom, akutní leukemie, qRT-PCR, exprese genu WT1

Summary

Kalinová M., Mužíková K., Šrámková L., Starý J., Horák J., Trka J.: Is WT1 gene hyperexpression a malignant cells marker?

WT1 expression in myelodysplastic syndrome (MDS) was repeatedly tested with unequivocal results. In our study we concentrated to the determination of WT1 expression using quantitative RT-PCR in the diagnostic samples of paediatric patients with acute leukaemia (n=113), myelodysplastic syndrome (n=14) and aplastic anaemia (n=25). We used normal bone marrow samples and cord blood samples (n=35) with very low or undetectable expression as the negative controls. The expression levels in both the blasts of acute myeloid (n=62) and lymphoblastic (n=51) leukaemia widely varied. High expression was linked to the presence of MLL/AF4 fusion gene in contrast to BCR/ABL and TEL/AML1 fusion. T-cell leukaemias expressed WT1 in a wide range. In AML, high WT1 expression was linked to less mature subtypes (particularly M3), in contrast M5 subtype expressed significantly less WT1. Aplastic anaemia patients had very low or undetectable WT1 transcript levels, whereas myelodysplastic syndrome patients expressed WT1 on a higher level. Comparison of patients with aplastic anaemia to the refractory anaemia subtype of myelodysplastic syndrome revealed statistically significant difference (P=0,0079). However, the significance of WT1 expression estimation is limited due to the overlap of measured values. Lower WT1 expression in blasts of some of the acute leukaemia subtypes clearly demonstrates that WT1 hyperexpression is not a „panleukaemic” marker.

Key words: aplastic anaemia, myelodysplastic syndrome, acute leukaemia, qRT-PCR, WT1 gene expression

Trans. Hemat. dnes, 12, 2006, No. 2, p. 76–82.

Úvod

Gen WT1

Gen WT1 je transkripční faktor, jehož název je odvozen od Wilmsova tumoru. Jde o potenciální nádorově supresorový gen.

Fyziologicky je gen WT1 exprimován prenatalně v mezoteliálních listách abdominální dutiny, zahrnujících perikard, slezinu, speciální populaci míšních neuronů a sklerotik vyvíjejících se somitů. Postnatálně přetrvává exprese genu WT1 v podocytech ledvin, v Sorteliho buňkách varlat a granulózních buňkách dělohy a vaječní-

ků a v hematopoetických prekurzorech (1, 2). Gen WT1 o velikosti 50kb je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 11 v oblasti 11p13 a obsahuje 10 exonů, kdy exony 7–10 kódují motiv transkripčního faktoru – motiv čtyř „zinkových prstů“. Posttranskripční modifikace a několik alternativních počátků transkripce dávají genu WT1 možnost velkého počtu (nejméně 36) různých proteinových izoforem, které jsou lokalizovány ve specifických buněčných kompartmentech v závislosti na jejich funkci a typu buněk (3–5).

Gen WT1 reguluje expresi mnoha cílových genů – bylo identifikováno více než 45 různých cílových genů (geny pro růstové faktory, receptory růstových faktorů

a další, např. CSF-1, TGF β -1, RAR α , c-myc, bcl-2, WT1, PDGF-A) a gen WT1 je také zahrnut v postranskripční úpravě RNA. Funkce genu WT1 je jak v kontrole proliferace, diferenciaci, buněčném cyklu, tak v apoptóze (6).

Důležitá je funkce genu v kontrole proliferace a diferenciaci hematopoetických buněk, kdy hematopoetické prekurzory (CD34+/CD38-) procházejí bifázickým vývojem exprese genu WT1: gen WT1 je exprimován v nezralých progenitorech, ve kterých navozuje stav „quiescence“, čímž tyto buňky udržuje ve fenotypicky primitivním stavu (G0 fáze), poté dochází k rapidnímu snížení exprese genu WT1 a znovuobjevení až ve zralejších prekurzorech granulocytární/monocytární řady (7).

U různých typů malignit a premaligních syndromů byly detekovány jak mutace v genu WT1, tak změny hladin exprese. Typickým příkladem je úloha WT1 jako nádorového supresoru u WAGR syndromu (Wilmsův tumor, aniridie, urogenitální vady a mentální retardace) (8).

První zmínky o tom, že gen WT1 může být účasten vývoje leukemií byly popsány v roce 1990 Callem et al. (9). Mutace v genu WT1 typu bodových mutací, malých delecí nebo inzercí byly nalezeny u 10–20 % pacientů s akutní leukemií, převážně u pacientů s bifenotypickou leukemií a akutní myeloidní leukemií (AML), vzácně u pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií (ALL). U pacientů s AML jsou tyto mutace spojeny s horší prognózou (3,10).

Aberace typu nadměrné exprese (hyperexprese) genu WT1 byly nalezeny u 80–90 % pacientů s AML, u 70–90 % pacientů s ALL a u pacientů s MDS (4, 10–17). Ztráta exprese genu WT1 u pacientů s CLL, HCL a „plasma cell leukemia“ naznačuje, že exprese genu WT1 je limitována pouze na nezralé leukemie (18). Někteří autoři (4, 19–23) našli nízkou hladinu exprese genu WT1 u AML se subtypem M5 a M7.

V několika studiích (19, 20, 23) byla vysoká exprese genu WT1 při diagnóze u pacientů s akutními leukemiemi určena jako nezávislý prognostický faktor spojený s horší prognózou, ale někteří autoři (21, 24) toto tvrzení ve svých studiích neprokázali.

Zprávy o přítomnosti, resp. nepřítomnosti jednotlivých izoform proteinu WT1 v různých stádiích vývoje fyziologických hematopoetických prekurzorů a jejich nepoměr v buňkách akutních leukemií jsou zatím neuspořádané a vzájemně si protičejí (25–28).

Myelodysplastický syndrom je způsoben klonálním postižením kmenové buňky a je charakterizován neefektivní hematopoézou. Je spojen s vysokým rizikem transformace do AML. Tamaki et al. (1999) (29) ve své práci ukazuje, že by hladina exprese genu WT1 mohla sloužit jako nádorový marker preleukemických nebo leukemických blastů MDS a že odráží progresi tohoto onemocnění. Pokud by exprese genu WT1 byla skutečně jednoznačným markerem maligního postižení, umožňovala by jeho kvantitativní detekce spolehlivé rozlišení refrakterní anémie (RA) od jiných forem anémie, zejména aplastické (SAA). Současně by umožňovala sledování progresu MDS.

Některé diskrepance mezi jednotlivými studiemi zabývajícími se hladinami exprese genu WT1 v různých buněčných populacích mohou být způsobeny nestandardizovanými technikami a různými kvantifikačními přístupy (semikvantitativní PCR vs. real-time PCR, relativní vs. absolutní kvantifikace, různé kontrolní geny). Proto jsme založili spolu s kolegy z Frankfurtu, Jeny (Německo) a Monzy (Itálie) European Study Group on WT1 Expression in Childhood AML (ESG-WT1-AML), v rámci které standardizujeme metody pro kvantifikaci exprese genu WT1 s kontrolou kvality minimálně 2krát ročně. Metodikou vyvinutou v naší laboratoři a otestovanou a přijatou skupinou ESG-WT1-AML jsme kvantifikovali expresi genu WT1 u velkých skupin pacientů s AML, ALL, MDS, SAA a zdravých kontrol. V této studii jsme se zaměřili zejména na porovnání hladin exprese mezi MDS a SAA, resp. jednotlivých stadií MDS.

Soubor pacientů

V této studii jsme vyšetřili vzorky kostní dřeně při diagnóze 14 dětských pacientů s MDS (4krát refrakterní anémie (RA), 3krát refrakterní anémie s excesem blastů (RAEB), 3krát refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci (RAEBt), 4krát juvenilní myelomonocytární leukemie (JMML)), 25 dětských pacientů s aplastickou anémií (SAA), 62 dětských pacientů s AML (4krát M0, 9krát M1, 17krát M2, 8krát M3, 14krát M4, 10krát M5), 49 dětských a 2 dospělé pacienty s ALL (5krát BCR/ABL+, 8krát dětské MLL/AF4+ a 2krát dospělé MLL/AF4+, 19krát TEL/AML1+, 10krát T-ALL, 7krát kojenecká ALL bez přítomnosti MLL/AF4: jeden pacient vyšetřen při diagnóze a při relapsu onemocnění) a 35 kontrolních vzorků (16krát kostní dřeň od zdravých dárců, 19krát pupečnicková krev – z toho 9krát celá buněčná populace, 5krát CD34+ populace a 5krát pupečnicková krev rozdělená magnetickou separací na frakce CD19+, CD19-, CD34+, CD 34-).

Pacienti byli diagnostikováni na základě morfologického a imunofenotypického vyšetření kostní dřeně podle standardních diagnostických kritérií. Vyšetření bylo provedeno s informovaným souhlasem pacientů, rodičů nebo jejich zástupců.

Materiál a metodika

Vzorky odebrané při diagnóze dětským pacientům z center Pracovní skupiny pro dětskou hematologii v České republice (Praha, Plzeň, České Budějovice, Hradec Králové, Ústí nad Labem, Brno, Olomouc, Ostrava,) s hematologickým onemocněním byly shromažďovány v Laboratoři molekulární genetiky (Laboratorní centrum Kliniky dětské hematologie a onkologie ve Fakultní nemocnici Motol, Praha). Dva vzorky dospělých pacientů byly odebrány v Ústavu hematologie a krevní transfuze, Praha.

Všechny vzorky byly zpracovány v Laboratoři molekulární genetiky (Laboratorní centrum Kliniky dětské hematologie a onkologie ve Fakultní nemocnici Motol, Praha).

Odběr vzorků

Vzorky aspirátů kostní dřeně a pupečnickové krve byly odebrány do sterilních zkumavek s antikoagulancii (K_2 nebo K_3 EDTA) a ihned transportovány při pokojové teplotě do laboratoře, kde proběhla izolace mononukleárních buněk pomocí centrifugace v hustotním gradientu (Ficoll-Paque, hustota 1,077g/ml; Pharmacia, Uppsala, Švédsko). Izolované mononukleární buňky byly uchovávány v alikvótech po 1×10^7 buněk (v případě dostatečného množství) a méně v -80 °C. Celková RNA byla extrahována zavedenou technologií (modifikace „single-step“ metody) podle Chomczynski a Sacchi (30) a kontrola integrity a množství získané RNA byla provedena pomocí vizualizace na agarózovém gelu. Přepis do cDNA probíhal pomocí MMLV reverzní transkriptázy a náhodných hexamerů v reakčních podmínkách: 1krát RT pufr (50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂); 0,01 M dithiotreitol; 12,5 μM hexamery; 0,5 mM každého dNTP, 200U MMLV reverzní transkriptázy – poté 1 h/37 °C.

Buněčné populace

Vybrané odběry pupečnickové krve (podle buněčnosti) byly po izolaci na hustotním gradientu následně separovány pomocí magnetických kuliček (CD34 a CD19 MACS-Magnetic Cell Sorting of Human Leukocytes, Miltenyi, Biotec, Germamy) na buněčné subpopulace obohacené o danou frakci, ze kterých následně probíhala izolace RNA a reverzní transkripce (viz výše).

Kvantitativní PCR

Kvantitativní detekce exprese genu WT1 a „housekeeping“ genu pro β2-mikroglobulin probíhala na přístroji LightCycler™ (Roche) za použití hydrolyzační sondy (gen WT1) a hybridizačních sond (gen pro β2-mikroglobulin).

Provedli jsme amplifikaci genu WT1 od exonu 5 k exonu 10 s následným vložením do plazmidu a transformováním do buněk bakterie E. coli (TOPO T/A Cloning Kit – Invitrogen, Groningen, Nizozemí). Po namnožení těchto transformovaných bakterií jsme izolovali plazmid s námi vloženým inzertem, poté jsme změřili koncentraci plazmidu pomocí spektrofotometru a vypočetli počet kopií genu WT1. Pro sestavení standardní kalibrační křivky pro absolutní kvantifikaci jsme provedli logaritmické ředění plazmidu. Ředění probíhalo ze zásobního roztoku (10^0), který odpovídal $2,5 \times 10^{10}$ počtu kopií genu WT1 v 1 μl. Tento roztok byl logaritmicky ředěn do roztoku pufrované vody TRIS-base pH 8,06 krok po kroku do ředění 10^{-3} . Toto ředění bylo poté logaritmicky ředěno do xeno-DNA (koncentrace 0,2 μg/μl, DNA z lososích spermií, (sigma-Aldrich, Deisenhofen, Německo) krok po kroku do ředění 10^{-9} , které odpovídá $2,5 \times 10^1$ počtu kopií genu WT1.

Standardní kalibrační křivka, která sloužila pro určení počtu kopií ve vyšetřovaném vzorku, byla sestavena z $2,5 \times 10^6$ do $2,5 \times 10^1$ kopií genu WT1.

Podobným způsobem jsme postupovali i v případě tzv. housekeeping genu – vybrali jsme si gen pro β2-mikroglobulin. Tento gen splňuje všechny podmínky pro „housekeeping gen“, neboť lidský genom neobsahuje žádné jeho pseudogeny (na rozdíl od známých kontrolních genů, jako je např. gen pro β-actin a gen pro glyceraldehyd – fosfát dehydrogenázu, kde je známo $n=8$ respektive $n=52$ možných pseudogenů). Dále nemá tento gen velmi vysokou expresi jako např. kontrolní gen pro 18S rRNA a nevyznačuje se ani velmi nízkou expresí a neobsahuje žádné alternativní začátky transkripce.

Pro sestavení standardní kalibrační křivky jsme provedli ředění, které probíhalo ze zásobního roztoku (10^0), který odpovídal 1×10^{10} počtu kopií genu pro β2-mikroglobulin v 1 μl. Tento zásobní roztok byl ředěn do roztoku pufrované vody TRIS-base pH 8,06.

Standardní kalibrační křivka, která sloužila pro určení počtu kopií ve vyšetřovaném vzorku byla sestavena z 1×10^7 kopií „housekeeping genu“ což odpovídalo expresi „housekeeping genu“ z množství izolovaného z 1×10^7 buněk zdravých dárců (odpovídá 100 %) . Toto ředění bylo ředěno do pufrované vody v ředění 30 %, 10 %, 3 %, 1 %, případně 0,1 %; které odpovídá 1×10^4 počtu kopií „housekeeping genu“.

Účinnost obou systémů – jak detekce exprese genu WT1, tak detekce exprese „housekeeping genu“ se pohybovala ve stejných rozmezích (sklon křivky $3,33 \pm 0,2$, korelační koeficient 1,00).

Normalizovaná hladina exprese genu WT1 je poté určena jako poměr exprese genu WT1 k expresi „housekeeping genu“ – genu pro β2-mikroglobulin.

Reakční podmínky kvantitativní PCR

Primery používané pro kvantitativní detekci exprese genu WT1(31):

WT F: ACA ggg TAC gAg AgC gAT AAC CA

WT R: CAC ACg TCg CAC ATC CTg AAT

WT TM: 6FAM-CAA CgC CCA TCC TCT gCg gAg CCC A XT p

Do reakce vstupovalo 250 nM primerů a 100 nM sondy (WT TM), TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) v reakčních podmínkách: 50 °C/2 min., 95 °C/10 min., 50x: 95 °C/15 s, 60 °C/60 s. V případě používání kvantitativního přístroje typu LightCycler™ nutno přidávat do reakce 0,25 g/l BSA (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Německo).

Primery používané pro kvantitativní detekci „housekeeping genu“ (32):

β2 MIC F: 5' - CCA gCA gAg AAT ggA AAg TC- 3'

β2 MIC A: 5' - gAT gCT gCT TAC ATg TCT Cg - 3'

β2 M5LC: LC Red640-ATg AAA CCC AgA CAC ATA gCA ATT CAg p

β2M3FL: TTCTTCAGTAAgTCAACTTCAATgTCgA-Fl

Do reakce vstupovalo 500 nM primerů a 200 nM sond ($\beta 2$ M5LC, $\beta 2$ M3FL), 1x pufr, 3 mM $MgCl_2$, 0,2 mM každého dNTP, 1U Platinum Taq DNA Polymerázy (Invitrogen) v reakčních podmínkách – platí pro LightCycler™: 95 °C/1 min, 50x: 95 °C/3 s, 62 °C/10 s, 72 °C/5 s. V případě používání kvantitativního přístroje typu LightCycler nutno přidávat do reakce 0,25 g/l BSA.

Analýza výsledků a statistické zpracování

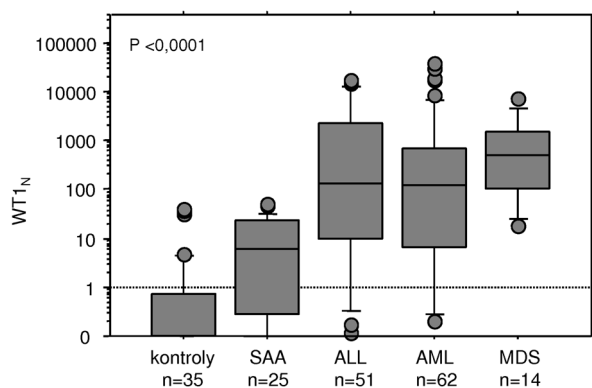
Všechny statistické analýzy zahrnující deskriptivní neparametrickou regresní analýzu byly zhotoveny za pomoci Instant a Stat-View softwaru (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Výsledky

Kontrolní vzorky

Vyšetřili jsme celkem 35 kontrolních vzorků (16krát kostní dřeň od zdravých dárců, 19krát pupečnicková krev – z toho 9krát celá buněčná populace, 5krát CD34+ populace a 5krát pupečnicková krev rozdělená magnetickou separací na frakce CD19+, CD19-, CD34+, CD 34-).

Kontrolní vzorky kostních dření a pupečnickových krví exprimují gen WT1 na velice nízké nebo nedetekovatelné hladině (0–41,4; medián 0) – obrázek 1. Při rozdělení



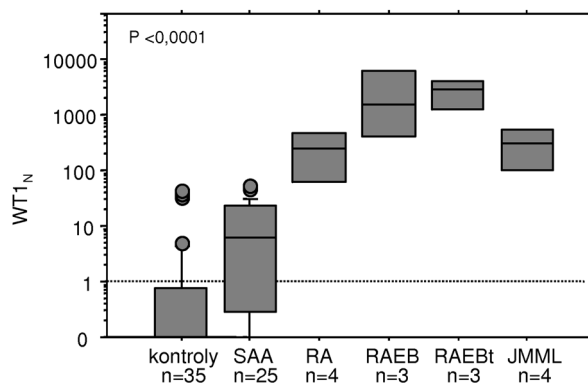
Obr. 1. Porovnání hladin transkriptu WT1 u jednotlivých diagnóz při základním rozdělení.

Vysvětlivky: Jednotlivé boxy reprezentují hodnoty mezi 25–75 percentilem okolo mediánu, který je znázorněn přímkou uvnitř boxu. Hodnoty mezi 10–90 percentilem jsou vyznačeny přímkou mimo box a odlehle hodnoty jsou reprezentovány body (ANOVA test).

na vzorky kostních dření a pupečnickové krve: kostní dřeň 0–41,4; medián 1 a ve vzorcích pupečnickové krve byly hladiny nedetekovatelné kromě 5 vzorků ve kterých byla detekovatelná hladina na velice nízké úrovni (0,1–4).

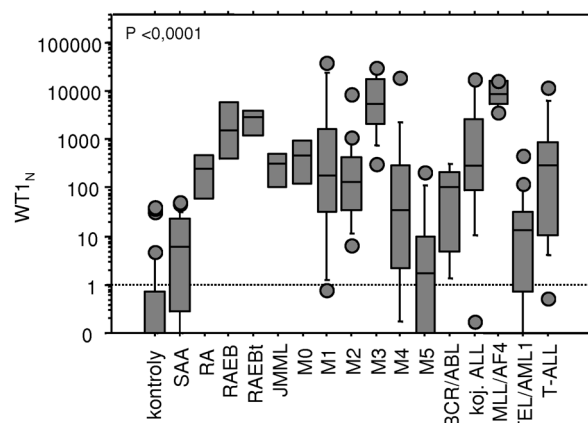
Aplastická anémie a MDS

Pacienti s aplastickou anémií (n = 25) mají velice nízkou nebo nedetekovatelnou hladinu exprese genu WT1 (0–50,9 normalizovaných kopií genu WT1, medián 5,9). Pacienti s MDS (n = 14) souhrnně exprimují gen WT1 na vyšší hladině než pacienti s aplastickou anémií



Obr. 2a. Porovnání hladin transkriptu WT1 pacientů s SAA a pacientů s MDS – rozčleněno na jednotlivé subtypy MDS.

Vysvětlivky: Jednotlivé boxy reprezentují hodnoty mezi 25–75 percentilem okolo mediánu, který je znázorněn přímkou uvnitř boxu. Hodnoty mezi 10–90 percentilem jsou vyznačeny přímkou mimo box a odlehle hodnoty jsou reprezentovány body (ANOVA test).



Obr. 2b. Souhrnné porovnání hladin transkriptu WT1 u pacientů podle subtypů a podjednotek jednotlivých diagnóz.

Vysvětlivky: Jednotlivé boxy reprezentují hodnoty mezi 25–75 percentilem okolo mediánu, který je znázorněn přímkou uvnitř boxu. Hodnoty mezi 10–90 percentilem jsou vyznačeny přímkou mimo box a odlehle hodnoty jsou reprezentovány body (ANOVA test).

(18,4–7261,9, medián 495,1) – viz obrázek 1. Při rozdělení MDS pacientů na jednotlivé podskupiny byla distribuce expresních hladin následující: RA (18,4–551,4; medián 238,8), RAEB (34,2–7261,9; medián 1441,6), RAEBt (597,1–4251,2; medián 2864,6) a JMML (25,4–581,6; medián 307,7) – obrázek 2.

Po statistické analýze pomocí neparametrických testů Mann-Whitney (2 parametry) a Kruskal-Wallis (více než 2 parametry) jsme našli statistickou významnost při porovnání hladin exprese u pacientů s aplastickou anémií a pacientů s MDS ($p < 0,001$), a stejně statisticky významné je i porovnání těchto skupin s kontrolními vzorky. V případě rozčlenění MDS na jednotlivé subtypy (RA, RAEB, RAEBt a JMML) dosahuje statistická významnost hodnoty $p < 0,001$; při porovnání se skupinou pacientů s aplastickou anémií a zdravými kontrolami. Při porovnání pacientů s SAA se skupinou pacientů s RA nacházíme rozdíl statisticky významný ($p = 0,0079$). Jednoznačné rozlišení mezi RA a SAA ale komplikuje fakt, že se hodnoty naměřené u obou skupin překrývají.

Pacienti s ALL

U pacientů s fúzním genem BCR/ABL ($n = 5$) jsme detekovali nízkou hladinu exprese genu WT1 (1,31–182,4, medián 106), pacienti nesoucí fúzní gen TEL/AML1 ($n = 19$) měli také nízkou hladinu exprese genu WT1 (0–459,5; medián 13,1). Naopak pacienti s fúzním genem MLL/AF4 ($n = 10$) exprimují gen WT1 na vysoké úrovni (3449,5–16422; medián 8642). U pacientů s T typem ALL ($n = 10$) jsme detekovali expresi genu WT1 v široké škále hladin, od 0,5 do 11532,5 s mediánem 287,7. V případě kojeneckých ALL ($n = 7$) jsme našli hladinu exprese genu WT1 od 0,17; kdy tato nízká hladina byla nalezena u kojence s fúzním genem MLL/AF9 do hladiny exprese 16 554,5 nalezené u kojence s detekovanou MLL přestavbou v translokaci t(4;11;18). Medián exprese u kojeneckých ALL je 293,2; nízká hladina exprese je nalezena také u pacienta s diagnózou kojenecké preB ALL jak při diagnóze, tak při relapsu onemocnění (35,6 vs. 186,8) – obrázek 2b.

Při statistické analýze jsme našli signifikantně vysokou hladinu exprese genu WT1 u pacientů nesoucích fúzní gen MLL/AF4 ($p < 0,001$).

Pacienti s AML

U pacientů s AML ($n = 62$) jsme našli signifikantně vyšší hladinu exprese genu WT1 u subtypu AML M3 ($n = 8$) (319–29213,9; medián 5212,1). U subtypu AML M5 ($n = 10$) jsme shodně s literaturou našli nižší hladinu exprese, a to v hodnotách od 0 do 209,2 s mediánem exprese 1,7. Při porovnání hladin exprese genu WT1 v celé skupině AML s kontrolními vzorky nacházíme statistickou významnost $p < 0,001$. Statisticky významná je i vysoká hladina exprese genu WT1 u subtypu AML M3 v porovnání s ostatními skupinami u pacientů s AML ($p = 0,0001$) a při porovnání hladin exprese se skupinou AML M5 nacházíme $p = 0,0005$.

Porovnání hladin exprese genu WT1 u všech vyšetřených pacientů dělených podle jednotlivých diagnóz je na obrázku 2a a 2b.

Diskuse

Aberantní exprese genu WT1 v leukemických blastech a v některých typech nádorových buněk byla a je opakovaně studována (28). V případě vysokých hladin exprese u leukemií, převážně AML, patří podle některých autorů vysoká hladina exprese genu WT1 mezi nezávislé prognostické faktory s možností využití kvantitativní detekce exprese genu WT1 jako markeru pro sledování minimální reziduální nemoci (MRN) (15, 23, 33).

Expresí genu WT1 v nemaligních krevních buňkách (s výjimkou malé frakce časných progenitorů CD34+/CD38-) by měla být na nízké nebo nedetekovatelné hladině, proto jsme se zaměřili na studium nemaligního typu onemocnění SAA. Diferenciální diagnostika SAA a některých typů myelodysplastického syndromu (MDS typu refrakterní anémie) je stále komplikova-

ná a neexistuje jednoznačné kritérium, které by tato zásadně rozdílná onemocnění odlišilo.

Dle výsledků v našem malém souboru (jen 4 RA) hladiny exprese genu WT1 rozlišují nemaligní typ anémie SAA a maligní typ anémie MDS – RA ($p = 0,0079$). Velikost souboru v tomto případě není zásadním problémem: statistické významnosti bylo dosaženo, ale zásadní překážka využití v diferenciální diagnostice je zřejmá. Jak ukazuje obrázek 2, naměřené hodnoty pro SAA a RA tvoří plynulou škálu. Je třeba přihlídnout i k tomu, že diagnostika probíhala na základě morfologického obrazu kostní dřeně a otázkou zůstává i morfologická hranice mezi SAA a RA a z toho odvozená diagnóza (a také RA s multilineární dysplázií vs. RA). V případě dalších studií zabývajících se hladinami exprese genu WT1 u MDS našli autoři ve shodě s námi expresi u RA také na nízké nebo nedetekovatelné hladině (29, 34, 35).

Tamaki et al. (29) ve své studii demonstrují, že hladina exprese genu WT1 odráží stupeň progresu MDS do AML a že monitorování hladiny exprese genu WT1 může predikovat transformaci MDS. Ve své studii ukazují, že mezi hladinami exprese genu WT1 u MDS pacientů s RAEB a RAEBt není statisticky významný rozdíl, ale našel u nich zhruba o 2 řády vyšší hladinu exprese než u RA. Výsledky však neporovnával s kontrolami ani s nemaligním onemocněním. Naše výsledky korelují s výsledky Tamakiho et al., kdy v naší skupině MDS pacientů s RA jsme našli o jeden řád nižší hladinu exprese než u pacientů s RAEB a RAEBt a pacienti s RAEB a RAEBt mají podobné hladiny (medián exprese 1441,6 vs. 2864,6).

V případě porovnávání pacientů s RA s ostatními pacienty s MDS (RAEB, RAEBt, JMML) – jsme našli statistickou významnost, kdy vyšší hladina exprese genu WT1 koreluje v zásadě s vyšším zastoupením blastů.

U pacientů s ALL jsme našli velice variabilní hladiny exprese genu WT1. U pacientů nesoucích fúzní gen MLL/AF4 jsme našli signifikantně vysokou hladinu exprese a tyto pacienti mají horší prognózu danou však přítomností této prognosticky nepříznivé translokace. V případě nízkých hladin exprese genu WT1 u pacientů s horší prognózou danou fúzním genem BCR/ABL a naopak u pacientů s fúzním genem TEL/AML1 spojeným s lepší prognózou nám ukazuje, že podle hladin exprese genu WT1 nelze zařazovat pacienty s ALL do prognostických skupin a že vysoká i nízká exprese genu WT1 v případě pacientů s ALL má nevalný prognostický význam. Prognostickým významem vyšších a nižších hladin exprese genu WT1 u dětských pacientů s ALL v porovnání s kontrolními vzorky kostních dření se blíže zabýváme v naší publikované studii (36).

U skupiny dětských pacientů s AML jsme našli shodně s literaturou nízkou hladinu exprese genu WT1 u subtypu M5 (4, 19–23) a u subtypu M3 vyšší hladinu exprese genu WT1 v porovnání s ostatními subtypy.

V naší předchozí studii (23) jsme našli signifikantně horší prognózu u dětských AML pacientů, kteří exprimovali gen WT1 ve vysokých hladinách. Shodně s námi

popisují vysokou hladinu exprese genu WT1 jako nezávislý prognostický faktor i jiní autoři (19, 20, 31, 37–39), ale někteří toto tvrzení vyvracejí (21, 24, 40, 41). Jak jsme už naznačili, tyto rozdíly mohou být způsobeny technickým přístupem ke kvantifikaci exprese WT1, volbou a kvalitou použitých kontrol a také zaměřením na dětské, resp. dospělé pacienty. Z naší současné studie zaměřené na SAA a MDS však jednoznačně vyplývá, že přestože subtypy MDS s přítomností blastů exprimují WT1 na signifikantně vyšších hladinách, pro diferenciální diagnostiku SAA a RA představuje kvantitativní detekce exprese genu WT1 jen omezený přínos.

Závěr

Autoři této publikace nabízejí všem akademickým pracovištím v ČR i SR zaslání plazmidů WT1 a B2M s podrobným návodem pro absolutní kvantifikaci genu WT1.

Literatura

1. **Pritchard-Jones K.** The Wilms tumor gene, WT1, in normal and abnormal nephrogenesis. *Pediatr. Nephrol.* 1999; 620–625.
2. **Papežová M. MJ, Goetz P.** Molekulární genetika Wilmsova tumoru. *Časopis lékařů českých* 2001; 11: 323–327.
3. **Sugiyama H.** Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol* 2001; 73: 177–187.
4. **Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, et al.** Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 1995; 9: 1060–1067.
5. **Loeb DM, Sukumar S.** The role of WT1 in oncogenesis: tumor suppressor or oncogene? *Int J Hematol* 2002; 76: 117–126.
6. **Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG.** WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* 2001; 273: 141–161.
7. **Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, Scadden DT, Haber DA.** The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *Embo J* 2001; 20: 1897–1909.
8. **Hirose M.** The role of Wilms' tumor genes. *J Med Invest* 1999; 46: 130–140.
9. **Call KM GT, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, et al.** Isolation and characterization of zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990; 60: 509–520.
10. **Menssen HD, Siehl JM, Thiel E.** Wilms tumor gene (WT1) expression as a panleukemic marker. *Int J Hematol* 2002; 76: 103–109.
11. **Sugiyama H.** Wilms tumor gene (WT1) as a new marker for the detection of minimal residual disease in leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998; 30: 55–61.
12. **Ostergaard 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.
13. **Niegemann E, Wehner S, Kornhuber B, Schwabe D, Ebener U.** wt1 gene expression in childhood leukemias. *Acta Haematol* 1999; 102: 72–76.
14. **Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, et al.** Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 1997; 89: 1405–1412.
15. **Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D, et al.** Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* 2002; 16: 2115–2121.
16. **Chen Z.** The possible role and application of WT1 in human leukemia. *Int J Hematol* 2001; 73: 39–46.
17. **Bergmann L, Maurer U, Weidmann E.** Wilms tumor gene expression in acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma* 1997; 25: 435–443.
18. **Miwa H, Beran M, Saunders GF.** Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia* 1992; 6: 405–409.
19. **Bergmann L, Miething C, Maurer U, et al.** High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* 1997; 90: 1217–1225.
20. **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* 1994; 84: 3071–3079.
21. **Schmid D, Heinze G, Linnerth B, et al.** Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 639–643.
22. **Patmasiriwat P, Fraizer GC, Claxton D, Kantarjian H, Saunders GF.** Expression pattern of WT1 and GATA-1 in AML with chromosome 16q22 abnormalities. *Leukemia* 1996; 10: 1127–1133.
23. **Trka J, Kalinova M, Hrusak O, et al.** Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia* 2002; 16: 1381–1389.
24. **Gaiger A, Linnerth B, Mann G, et al.** Wilms' tumour gene (wt1) expression at diagnosis has no prognostic relevance in childhood acute lymphoblastic leukaemia treated by an intensive chemotherapy protocol. *Eur J Haematol* 1999; 63: 86–93.
25. **Siehl JM, Reinwald M, Heufelder K, Menssen HD, Keilholz U, Thiel E.** Expression of Wilms' tumor gene 1 at different stages of acute myeloid leukemia and analysis of its major splice variants. *Ann Hematol* 2004; 83: 745–750.
26. **Renshaw J, et al.** Differential splicing of exon 5 of the Wilms tumor (WT1) gene. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 19: 256–266.
27. **Renshaw J, King-Underwood L, Pritchard-Jones K.** Differential splicing of exon 5 of the Wilms tumour (WT1) gene. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 19: 256–266.
28. **Keilholz U, Menssen HD, Gaiger A, et al.** Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia. *Leukemia* 2005; 19: 1318–1323.
29. **Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, et al.** The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1999; 13: 393–399.
30. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–159.
31. **Kreuzer KA, Saborowski A, Lupberger J, et al.** Fluorescent 5'-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumour gene (WT1) mRNA: implications for monitoring human leukaemias. *Br J Haematol* 2001; 114: 313–318.
32. **Pallisgaard N, Clausen N, Schroder H, Hokland P.** 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: 355–365.
33. **Cilloni D, Saglio G.** WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 2004; 112: 79–84.
34. **Cilloni D, Gottardi E, Messa F, et al.** Significant correlation between the degree of WT1 expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1988–1995.

35. **Bader P, Niemeyer C, Weber G, et al.** WT1 gene expression: useful marker for minimal residual disease in childhood myelodysplastic syndromes and juvenile myelo-monocytic leukemia? *Eur J Haematol* 2004; 73: 25–28.
36. **Boublikova L, Kalinova M, Ryan J, et al.** Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2006; 20: 254–63.
37. **Inoue K, Ogawa H, Yamagami T, et al.** Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood* 1996; 88: 2267–2278.
38. **Brieger J, Weidmann E, Maurer U, Hoelzer D, Mitrou PS, Bergmann L.** The Wilms' tumor gene is frequently expressed in acute myeloblastic leukemias and may provide a marker for residual blast cells detectable by PCR. *Ann Oncol* 1995; 6: 811–816.
39. **Brieger J, Weidmann E, Fenchel K, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L.** The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells. *Leukemia* 1994; 8: 2138–2143.
40. **Gaiger A, Schmid D, Heinze G, et al.** Detection of the WT1 transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 1886–1894.
41. **Elmaagacli AH, Beelen DW, Trensche R, Schaefer UW.** The detection of wt-1 transcripts is not associated with an increased leukemic relapse rate in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 91–96.

RNDr. Markéta Kalinová

CLIP – Childhood Leukaemia Investigation Prague

Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK

FN Motol

V Úvalu 84

150 06 Praha 5

Korespondující autor:

Doc. MUDr. Jan Trka, Ph.D.

jan.trka@lfmotol.cuni.cz

Práce byla podpořena grantem IGA MZ 7439.

Došlo do redakce: 13. 1. 2006

Přijato: 10. 4. 2006

Clinical and Laboratory Manifestations of Congenital Dyserythropoietic Anemia Type I in a Cohort of French Children

Brigitte Bader-Meunier, et al.
Pediatr Hematol Oncol, Volume 27, Numer 8, August 2005, p. 416–419

Předmětem práce je vzácné onemocnění erythropoezy, zapadající do heterogenní skupiny kongenitálních dyserythropoetických anémií. Retrospektivní francouzská multicentrická studie zahrnuje 12 dětí z 9 rodin. CDA I nebyla zpočátku správně diagnostikována ve 4 případech (dvakrát hereditární sférocytóza, dále thalasémie a 1x fetopatie). Do správné diagnózy uplynulo od začátku anémie 5,1 roku (hranice 0,2 až 18). Průměrný věk při diagnóze byl 6,7 roku (2 měsíce až 20 let). U 8 dětí byly přítomny kongenitální malformace, nejčastěji kostní (spondyloepifyseální dysplazie, hemivertebrae, brachydaktylie, syndaktylie). Nutno proto odlišit CDA I od jiných neonatálních anémií s anomáliemi skeletu, jako je Diamondova-Blackfanova anémie. Fanconiho anémie a vzácné případy Shwachmanova-Diamondova syndromu. Způsob dědičnosti proti hereditární sférocytóze je odlišný, CDA I je recesivně dědičná, hereditární sférocytóza má dominantní způsob dědičnosti. Hematologický obraz a kostní dřevň vykazovaly charakteristické nálezy, včetně elektronové mikroskopie vyšetřené v 9 případech. Byly vyšetřeny též membránové proteiny erytrocytů. Zjištěno, že protein 4.1 (hlavní složka skeletonu erytrocytů) byl v 5 testovaných

případech snížen. Ve všech těchto případech byl osmotický gradient ektacytometrie normální. Mutace genu CDAN1 (gene encoding codanin-1), považované za zodpovědné pro tuto chorobu, byly zjištěny u 3 vyšetřených pacientů.

Transfuze byly nutné u 11 dětí, pouze 3 děti nepotřebovaly transfuze po prvním roce věku, 5 dětí dostávalo pravidelně transfuze v měsíčních intervalech. Jedno dítě vyžadovalo intrauterinní transfuze pro těžkou fetální anémii (35 g/l) ve 28. a 30. týdnu těhotenství. Sekundární hemochromatóza se vyvinula u dětí s pravidelnými transfuzemi. Žlučové kameny zaznamenány u více než poloviny dětí časně, už i ve věku 4 let. Léčba interferonem IFN alfa 2 byla úspěšná u 3 pacientů. Má být indikována jako léčba první řady u nemocných závislých na transfuzích. Velký pozor je třeba dávat na riziko těžké neurotoxicity, zvláště u dětí, které dostávaly denní dávky dosahující více než 1×10^9 U/týden. Je třeba hledat nejmenší účinnou dávku.

Prof. MUDr. Otto Hrodek, DrSc.

FN Motol Praha