

Novinky v translačním výzkumu akutní lymfoblastické leukemie – výběr z konference Evropské hematologické školy

Novelties in translational research of acute lymphoblastic leukaemia – selection from the European School of Haematology Conference

Čuřík N.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Oddělení molekulární genetiky, Praha

SOUHRN: Článek předkládá vybraná sdělení z *Druhé konference translačního výzkumu: Akutní lymfoblastické leukemie* pořádané Evropskou hematologickou školou. Zaměřuje se přitom na roli nových technologií molekulární biologie a genetiky v dosažení nedávných výrazných pokroků v pochopení biologie akutní lymfoblastické leukemie a ve zlepšení diagnostiky, prognostiky a řízení léčby tohoto onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA: akutní lymfoblastická leukemie – MRD – přestavby

SUMMARY: The article presents selected communications from the *2nd Translational Research Conference: Acute Lymphoblastic Leukaemia* organized by the European School of Haematology. It focuses on the role of new molecular biology and genetic technologies in the recent significant advances in our understanding of the biology of acute lymphoblastic leukaemia and in the improvement of disease diagnostics, prognostics and therapy management.

KEY WORDS: acute lymphoblastic leukaemia – MRD – rearrangements

ÚVOD

Začátkem května 2021 se v rámci platformy European School of Haematology (ESH) konala „Druhá konference translačního výzkumu: Akutní lymfoblastické leukemie“. Pokračující pandemie COVID-19 zapříčinila, že se jednalo o konferenci virtuální, ale tato skutečnost celé události nijak neubrala na významu. Přednášky a další sdělení, které zde zazněly, dokládají současný významný pokrok v pochopení biologických základů akutní lymfoblastické leukemie (ALL) vč. podrobnějšího popisu jednotlivých genomických profilů leukemických buněk a v charakterizaci genově-expressních podtypů tohoto heterogenního onemocnění. Nové objevy na poli základního i translačního výzkumu se pak

promítly do zlepšení v oblasti stratifikace rizika, prognostiky a monitorování úspěšnosti terapie ALL na základě stanovení měřitelné zbytkové nemoci a do celkového zkvalitnění řízení léčby s příznivým dopadem na zdraví pacientů.

Následující text představuje obsah několika vybraných sdělení, která na konferenci zazněla, obohacený odkazy na příslušné původní práce. Navazuje do značné míry na sdělení v předchozích číslech časopisu *Transfuzie a hematologie dnes*, zaměřená na uplatnění nových progresivních metod molekulární biologie v hematologii obecně a v precizní medicíně ALL zvláště [1,2]. Výběr příspěvků byl veden snahou ukázat, jak nové metody a technologie typu *single-cell* analýz, konfokálního časosběrného

snímání živých buněk, RNAseq, sekvenování nové generace nebo průtokové cytometrie posouvají kupředu naše znalosti biologie a molekulárních mechanismů ALL. Článek je rovněž zaměřen na to, jak se využití nových metod promítá do zlepšení v oblastech stratifikace, prognostiky a monitorování výsledků léčby tohoto onemocnění. Naopak vědomě ponechává stranou významné pokroky v léčbě samotné, dosažené zejména díky rozvoji cílené léčby a imunoterapie refrakterní/relabující ALL s využitím bispecifických protilátek, protilátkových konjugátů nebo CAR T-buněk, protože k tomuto tématu je v současné české odborné literatuře dostupná řada kvalitních přehledových článků a knižních publikací [3–5].

NOVÉ POZNATKY V BIOLOGII A MECHANIZMECH REZISTENCE ALL

Velmi zajímavé sdělení k molekulárním mechanismům leukemogeneze prezentovala **Lai Chan** z City of Hope Comprehensive Cancer Center ve městě Monrovia v Kalifornii. Ve své práci provedla analýzu 1148 vzorků od pacientů s ALL z prekursorových B-buněk (B-ALL), která ukázala četnou přítomnost jak řídicích (*driver*) mutací a jiných genetických aberací aktivujících leukemogenní signalizační dráhu přes protein signální transdukce STAT5 (např. BCR-ABL1 nebo přestavby zahrnující JAK2 a CRLF2, celkem 31 % vzorků), tak i častou přítomnost řídicích mutací aktivujících leukemogenní signalizační dráhu přes proteinkinázu ERK (např. mutace v genech *KRAS*, *NRAS*, *PTPN11* nebo *FLT3*; celkem ve 34 % vzorků). Pouze 3 % analyzovaných vzorků nicméně vykazovala současnou přítomnost řídicích mutací a chromozomových aberací aktivujících obě signalizační dráhy, STAT5 a ERK. Na základě *single-cell* mutačních a fosfoproteinových (signalizačních) analýz bylo navíc zjištěno, že i v těchto ojedinělých případech šlo o biklonální vzorky, a řídicí mutace či chromozomové přestavby aberantně aktivující signalizační dráhy přes STAT5 nebo ERK se nacházely v různých, vzájemně soupeřících klonálních populacích leukemických buněk. Přítomnost fosforylovaných, tj. aktivních forem ERK1/2 a STAT5 rovněž vykazovala silně negativní korelaci. Chan et al. navíc ve své práci experimentálně prokázali, že aktivace onkogenní signalizační dráhy ERK v leukemických buňkách s již aktivovanou signalizací přes STAT5 nedvedla k zesílení, ale naopak k narušení procesu nádorové transformace a *vice versa*. Tyto výsledky poukazují na vzájemnou nekompatibilitu mezi signalizací přes STAT5 a signalizací ERK v B-ALL. Podstatou tohoto jevu je, že STAT5 a ERK aktivují odlišné a vzájemně nekompatibilní transkripční programy, které jsou realizovány buď transkripčním faktorem MYC v případě STAT5 dráhy, nebo

transkripčním faktorem BCL-6 v případě ERK1/2 dráhy. Fyziologicky se tyto transkripční programy uplatňují v odlišných, přesně určených stádiích vývoje B lymfocytů [6]. Výše uvedená zjištění otevírají možnost dosud neuvažované strategie aktivace utlumených signalizačních drah s cílem narušit aberantně aktivní kaskádu, na které je daná leukemická buňka závislá, a tím zvýšit účinnost léčby ALL. Vedle toho Chan ukázala závislost subtypu B-ALL s přestavbami KMT2A na expresi BCL-6, který by pro tuto skupinu pacientů s velmi špatnou prognózou mohl představovat zajímavý terapeutický cíl [7].

Problematikou chemorezistence leukemických buněk se ve svém sdělení zabývala **Adele Fielding** z UCL Cancer Institut v Londýně. Práce její skupiny se zaměřila na klinickou hádanku ALL, kdy po zahájení léčby dosahuje většina pacientů, a to i ve starším věku, kompletní remise, přičemž ale i pacienti bez detekovatelné MRD mají nezanedbatelné riziko relapsu. V ALL přitom, na rozdíl třeba od myeloidních leukemií, nehrají roli leukemické kmenové buňky (výjimkou se ukazuje být CML-*like* Ph+ ALL, viz dále). Fielding ukázala, že zásadní roli při relapsu ALL může hrát ochranná role specifického mikroprostředí bránícího leukemické buňky před působením chemoterapie. Chemoterapeutika využívaná v léčbě ALL, jako jsou cytarabin a daunorubicin, poškozují DNA leukemických buněk, blokují činnost enzymů polymeráz, resp. topoizomeráz, a indukují reaktivní formy kyslíku (ROS) navozující buněčnou smrt. Zároveň však jejich působením dochází k aktivaci mezenchymálních kmenových buněk v kostní dřeni na tzv. s nádory asociované fibroblasty (CAF), které produkují velké množství prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8 a řadu chemokinů a vytvářejí protektivní niky pro leukemické buňky. Klíčovým mechanismem protekce buněk ALL v tomto mikroprostředí se ukázalo být kontaktně dependentní předávání mitochondrií z CAF do leukemických buněk zachycené časosběr-

ným snímáním živých buněk pomocí konfokálního mikroskopu, kde tyto mitochondrie následně chrání buňku před cytotoxickým působením ROS. Velmi zajímavým zjištěním ale je, že působením vinkristinu a/nebo dexametazonu je vznik této protektivní niky – a konkrétně přenos mitochondrií mikrotubuly z CAF do leukemických buněk – blokován. Na tomto základě Fielding et al. navrhuje otestovat v randomizované klinické studii jednoduchou úpravu současných terapeutických protokolů (hyperCVAD), kdy k cyklu B k cytarabinu bude současně podáván vinkristin/dexametazon s cílem zamezit možným výše zmíněným projevům vzniku chemorezistence [8].

POKROK V CHARAKTERIZACI SUBTYPŮ ALL A STRATIFIKACI

O tom, že uplatnění nových metod významně posunulo nejen základní, ale i translační výzkum ALL, si bylo možné vytvořit obrázek z přednášky **Henrika Lilljebjörna** z Univerzity v Lundu (Švédsko). B-ALL tvoří zhruba 85 % všech případů ALL, a jak již bylo zmíněno, jedná se o velmi heterogenní onemocnění jak svojí molekulárně-genetickou podstatou, tak i klinickým průběhem. Na základě identifikace nových molekulárních, resp. chromozomových aberací došlo v roce 2016 k úpravě stávající klasifikace této nemoci Světovou zdravotnickou organizací WHO. Na jejím základě jsou B-ALL/lymfomy nově tříděny do následujících skupin: B-ALL t(9;22) s přestavbou BCR-ABL1 (Ph+ ALL), B-ALL t(12;21) s přestavbou ETV6-RUNX1, B-ALL t(5;14) s přestavbou IL3-IGH, B-ALL t(1;19) s přestavbou TCF3-PBX1, B-ALL s hyperdiploidií, B-ALL s hypodiploidií, B-ALL s rekurentními genetickými abnormalitami, blíže nespecifikované (NOS) B-ALL, B-ALL t(v;11) s přestavbami s účastí genu *KMT2A* a variabilním partnerem, B-ALL s přítomností chromozomu *iAMP21* a B-ALL označované jako *Ph-like*; dvě posledně uvedené skupiny byly zatím zařazeny jako provizorní [9].

Díky uplatnění nových metod a technologií, mezi které patří např. RNA sekvenování (RNAseq), bylo u ALL možné identifikovat dosud neznámé fúzní varianty a zpřesnit rozdělení této nemoci do subtypů definovaných specifickými genově-expressními profily. V roce 2016 byla publikována studie na kohortě 195 případů B-ALL u dětí, která zjistila přítomnost *in-frame* fúzních genů u 127 (65 %) vzorků. Identifikovala bezmála 30 nových typů fúzí, a především na základě přítomnosti specifického, od jiných typů ALL odlišného profilu genové exprese stanovila dva nové subtypy B-ALL: B-ALL s přestavbami za účasti genu *DUX4* a subtyp *ETV6-RUNX1-like* leukemií s častou přítomností fúzí v genech *ETV6* nebo *IKZF1* [10]. Vedle toho byl detekován i subtyp s přestavbami za účasti genu *MEF2D* a subtyp s přestavbami genu *ZNF384*, které byly následně potvrzené v dalších studiích [11,12]. Definování výše zmíněných nových podtypů ALL – Ph-like B-ALL (fúze s účastí genů *CRLF2*, *ABL2* nebo *JAK2*, nezřídka doprovázená mutacemi v *STAT5-JAK2* signalizační dráze), B-ALL s přestavbami *DUX4* a *ETV6-RUNX1-like* B-ALL umožnilo výrazně redukovat nejasně konstituovanou skupinu onemocnění známou jako „B-ALL *other*“ s heterogenní biologii, a tudíž i různorodou klinickou manifestací a nejasnou prognózou.

Podle současného stavu poznání lze v případě B-ALL u dětí asociovat subtypy TCF3–PBX1, ETV6–RUNX1/ETV6–RUNX1-like, DUX4r, ZNF384r a vysoký stupeň hyperdiploidie s nízkým rizikem, nízký stupeň hyperdiploidie se středním rizikem a subtypy s fúzemi *MEF2D*, *BCR-ABL1/Ph-like* B-ALL a subtyp s přestavbami za účasti genu *KMT2A* s vysokým rizikem. Lilljebjörn upozornil, že vývoj dalšího zdokonalování stratifikace B-ALL jde s využitím RNAseq velmi rychle kupředu. V roce 2018 byla publikována studie transkripčních profilů na 1 223 vzorcích B-ALL, která zvýšila počet subtypů ALL stanovených na základě specifických transkripčních profilů na 14, vč. subtypu s přestavbami za

účasti genu pro chromatinový regulátor *NUTM1* s dosud neznámým prognostickým dopadem [13]. Již následující rok pak studie na 1 988 případech B-ALL u dětí i dospělých představila nový návrh taxonomie B-ALL s 23 subtypy onemocnění definovanými na základě chromozomových přestaveb, mutací a změn na genomické úrovni [14].

Ke skupině Ph-like B-ALL se ve své přednášce vrátil **Stephen Hunger** z Department of Pediatrics a Center for Childhood Cancer Research, Children's Hospital of Philadelphia z Filadelfie. Skupina Ph-like B-ALL se vyznačuje tím, že leukemické buňky nenesou *BCR-ABL1* přestavbu, ale mají podobný genově-expressní profil, jako mají B-ALL s chromozomem Filadelfia. Frekvence zastoupení této skupiny rostla s věkem, podobně jako u Ph+ B-ALL, u pacientů v diagnóze byl obvyklý vysoký počet bílých krvinek a skupina byla hodnocena jako skupina se špatnou prognózou a odpovědí na léčbu. Zároveň bylo zřejmé, že jde stále o heterogenní podtyp B-ALL a u pacientů se objevuje řada řídicích fúzí a mutací. Na základě nových prací se podařilo skupinu dále stratifikovat na podskupinu s přestavbou *CRLF2* (kterou mohou, ale nemusí doprovázet mutace v *JAK2*), podskupinu s přestavbami v *JAK2* nebo *EPOR* a podskupinu tzv. *ABL* třídy s přestavbami za účasti genů *ABL1*, *ABL2*, *PDGFRB* a *CSF1R*. Právě poslední zmíněná podskupina vykazovala až donedávna mimořádně špatné léčebné výsledky. Na základě identifikace biologických podobností mezi touto podskupinou Ph-like B-ALL a Ph+ B-ALL začala být u pacientů s přestavbami *ABL* třídy testovaná léčba kombinací chemoterapie s inhibitory tyrozinových kináz (TKI), konkrétně imatinibem nebo dasatinibem. Prvotní výsledky ukazují na snížený výskyt relapsů u pacientů léčených v kombinaci chemoterapie a TKI v první remisi, resp. různých fázích léčby, a naznačují benefit této léčby zejména při časném podání TKI, podobně jako tomu bylo při využití TKI v léčbě Ph+ B-ALL [15,16]. Nicméně je nutné brát

v potaz, že jde pouze o předběžné výsledky z retrospektivních studií, a efektivitu TKI v léčbě Ph-like B-ALL bude nutné dále ověřovat.

NOVÉ METODY PRO STANOVENÍ MĚRITELNÉ ZBYTKOVÉ NEMOCI ALL

Sdělení **Moniky Brüggemann** z Oddělení hematologie Univerzity Schleswig-Holstein v Kielu demonstrovalo, že vedle pokroku ve stanovení molekulárně genetických podtypů ALL umožňujících lepší stratifikaci pacientů podle míry rizika onemocnění se zavádění nových pokročilých metod stále výrazněji uplatňuje i v monitorování úspěšnosti samotné léčby. V případě B-ALL má dnes v tomto směru ústřední postavení koncept měřitelné nebo též minimální zbytkové nemoci (MRD), která je nejsilnějším celkovým prognostickým faktorem a vedle toho má její hodnota zásadní relevanci i pro predikci relapsů a rozhodování o indikaci transplantace kmenových buněk. Vedle toho je MRD neocenitelná při hodnocení účinku nových léčebných postupů v klinických studiích [17]. Zlatý standard stanovení MRD v B-ALL dosud představuje kvantifikace klonální přestavby *IG/TCR* na úrovni DNA pomocí *RQ-PCR* s využitím alelově-specifických primerů (v případě Ph+ ALL nebo *KMT2A* ALL je alternativou stanovení hladiny *BCR-ABL1*, resp. *KMT2A* přestaveb na úrovni transkriptu). Tato metoda zaručuje vysokou specifitu, senzitivitu i přesnost stanovení MRD, nicméně naráží na své limity dané především nestabilitou *IG/TCR*, tj. možností klonální evoluce s deplecí klonu nesoucí původně charakterizovanou přestavbu *IG/TCR*, a rizikem falešně negativních výsledků, resp. podhodnocení zbytkové choroby. Metoda je navíc časově náročná a nedovoluje další zvýšení citlivosti (senzitivita *RQ-PCR* dosahuje 10^{-5}), které by umožnilo precizní kvantifikaci velmi nízké MRD a dosažení ještě vyšší úspěšnosti v predikci relapsů. Problém dosažení limitů citlivosti detekce MRD se týká i standardní multiparametrické průto-

kové cytometrie (MFC), jejíž senzitivita dosahuje 10^{-4} [18]. Existence limitací stávajících vyšetřovacích metod a zároveň rozvoj v oblasti technologií, softwarového zpracování dat a standardizace jejich využití v posledních letech otevřely prostor pro využití progresivních metod umožňujících dosažení vyšší senzitivity i specifcity vyšetření MRD při navýšení kapacity zpracování vzorků a s úsporou práce i finančních zdrojů. Konkrétně se jedná o amplikonové sekvenování nové generace (NGS) a průtokovou cytometrii někdy označovanou jako cytometrii nové generace (NGF). Kromě již uvedeného zvýšení citlivosti detekce MRD (10^{-5} pro NGF při využití protokolu lyzace erytrocytů v celkovém vzorku; 10^{-6} pro NGS) umožňuje NGS detekci klonální variability přestavby IG/TCR v době diagnózy (jejíž rozsah je sám o sobě prognostický faktor) a jejich další monitorování. Dosavadní studie ukazují, že metoda skutečně umožňuje vyšší specifitu při predikci relapsů ve srovnání s RQ-PCR [19,20]. NGF se od standardního MFC liší zejména vysoce standardizovaným průběhem zpracování a analýzy vzorků vč. definování jednotlivých buněčných populací. Jeho výhodou je vedle stanovení MRD také možnost charakterizovat expresi cílených antigenů leukemických buněk. Tím nabízí i vhodný přístup ke sledování efektivity léčby ALL pomocí blinatumomabu nebo CART-buněk s protilátkou proti antigenu CD19. Zaměření na monitorování antigenu CD19 ale zároveň může představovat problém v situaci, kdy při použití anti-CD19 terapie u B-ALL dojde ke snížení jeho povrchové exprese, a tudíž i úniku před terapií cestou klonální selekce buněk s mutovaným genem pro CD19 (případně alternativně sestříženými formami CD19 bez epitopů rozpoznávaných CART buňkami), nebo cestou přesmyku do myeloidní řady [21].

Ačkoli NGS i NGF přístup skýtá teoreticky i prakticky řadu výhod oproti stávajícím metodám detekce MRD, jejich rutinnímu využití zatím brání nedostatečná standardizace a validace postupů

v multicentrických studiích. Pro stanovení MRD metodou NGS byl dosud vyvinut a publikován jediný standardizovaný protokol v rámci pracovní skupiny EuroClonality-NGS [22,23]. Jak NGS, tak NGF vykazují vysokou konkordanci detekce MRD s metodou kvantifikace IG/TCR, mezi vzájemnými výsledky NGS a NGF analýzy však zatím bylo dosaženo jen poměrně nízkého stupně korelace. Je tedy zřejmé, že využití obou technologií bude ještě muset být optimalizováno.

Další přístup ve stanovování MRD, kromě výše zmíněných, představuje monitorování konkrétních přestavb na úrovni mRNA, které se nejvíce využívá při detekci přestavb s účastí genu *KMT2A* nebo fúze BCR-ABL1. Problematice detekce MRD u Ph+ B-ALL se ve své přednášce věnoval **Jan Zuna** z Childhood Leukemia Investigation Group (CLIP) Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol v Praze. Prognostická hodnota MRD u Ph+ ALL léčené inhibitory tyrozinových kináz není zcela zřejmá. Mezi MRD měřené detekcí transkriptu BCR-ABL1 a MRD měřené detekcí IG/TCR přestavb na úrovni DNA pomocí QT-PCR panuje poměrně nízká korelace s celkovou konkordancí 69 % [24]. Zhruba 18 % BCR-ABL1 pozitivních vzorků je negativních na IG/TCR. To je situace značně odlišná od korelace mezi detekcí transkriptů s přestavbami *KMT2A* a detekcí přestavby IG/TCR, která je velmi dobrá. Jak profesor Zuna ukázal, tato diskrepance v případě BCR-ABL1 nemá technické vysvětlení vycházející z rozdílné povahy použitých metod (kvantifikace IG/TCR přestavby na úrovni DNA a měření exprese BCR-ABL1 na úrovni mRNA). Při monitorování MRD na úrovni genomické BCR-ABL1 byla totiž neshoda s detekcí IG/TCR ještě o něco vyšší (23 % BCR-ABL1⁺ IG/TCR⁻ vzorků!). Ukázalo se, že ve vzorcích, kde byla zjištěna konkordance mezi vyšetřením BCR-ABL1 a IG/TCR přestavby, byla přítomnost BCR-ABL1 detekována výhradně v buňkách ALL blastů (cca 66 % vzorků). V případě, že byl BCR-ABL1 detekován vedle blastů i v jiných buněč-

ných populacích, docházelo při porovnání výsledků obou metod k neshodě. Na základě toho se ukázalo, že je nutné rozlišovat „typickou“ Ph+ ALL, u které dochází ke vzniku přestavby BCR-ABL1 v lymfoidním progenitoru, a CML-like Ph+ ALL (nezaměňovat s Ph-like ALL), u které vzniká BCR-ABL1 přestavba v multipotentním progenitorové buňce s následnou mutací genu *IKZF1* (a vznikem IG/TCR) v lymfoidních blastech [25]. Prognostický význam hladiny MRD není v současnosti u dětských pacientů s Ph+ ALL léčených TKI jasně určen, nicméně některé studie naznačují, že detekce přestavb IG/TCR má přesnější vypovídací hodnotu než měření hladiny transkriptu BCR-ABL1 [24,26]. Současné monitorování MRD oběma postupy může být užitečné pro odhalení diskordantních CML-like případů za předpokladu, že by se biologická odlišnost této podskupiny ukázala být relevantní pro nastavení specifického optimálního léčebného režimu.

ZÁVĚR

Konference zaměřená na translační výzkum ALL informovala o významných objevech, kterých bylo v nedávné době dosaženo v porozumění biologii tohoto onemocnění vč. jeho genetické různorodosti a mechanismů rezistence na terapii. Rovněž ilustrovala výrazné pokroky ve stratifikaci, prognostice a monitorování průběhu nemoci, které se promítají do celkového zlepšení klinického managementu ALL a úspěšnosti její léčby. Těchto slibných výsledků by nebylo možné dosáhnout bez využití nových metod a technologií molekulární biologie a genetiky. V řadě případů jde o technologie, které si teprve nacházejí nebo již našly cesty do klinické praxe, nicméně pro jejich širší a rutinní uplatnění je potřeba dořešit technické detaily a provést další validaci a standardizaci používaných postupů. V každém případě je to právě využití vysoce senzitivních a specifických diagnostických a monitorovacích postupů ve spojení s cílenou biologickou terapií, které ote-

vírá dveře precizní a personalizované medicíně závažných hematoonkologických onemocnění.

Literatura

- Machová Poláková K, Čuřík N, Votavová H, et al. 25 let vývoje metod molekulární biologie a jejich uplatnění v hemato(onko)logii. *Transfuzie Hematol Dnes*. 2019;25:34–42.
- Čuřík N a Koblihová J. Vzdělávací workshop – uplatnění nových technologií v precizní medicíně CML a ALL. *Transfuzie Hematol Dnes*. 2020;26:66–69.
- Starý J. Novinky v léčbě akutní lymfoblastické leukemie u dětí. *Remedia*. 2020;30:62–64.
- Vokurka S, Hugo J. Moderní molekuly v onkologii. Vydal Maxdorf s.r.o., Praha, 2019.
- Büchler T a kol. Speciální onkologie. Vydal Maxdorf s.r.o., 2. vydání, Praha, 2020.
- Chan LN, Murakami MA, Robinson ME, et al. Signalling input from divergent pathways subverts B cell transformation. *Nature*. 2020;583:845–851.
- Hurtz C, Chan LN, Geng H, et al. Rationale for targeting BCL6 in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev*. 2019;33:1265–1279.
- Burt R, Dey A, Aref S, et al. Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress. *Blood*. 2019;134:1415–1429.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391–2405.
- Lilljebjörn H, Henningsson R, Hyrenius-Wittsten A, et al. Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 2016;7:11790.
- McClure BJ, Heatley SL, Kok CH, et al. Pre-B acute lymphoblastic leukaemia recurrent fusion, EP300-ZNF384, is associated with a distinct gene expression. *Br J Cancer*. 2018;118:1000–1004.
- Gu Z, Churchman M, Roberts K, et al. Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 2016;7:13331.
- Li JF, Dai YT, Lilljebjörn H, et al. Transcriptional landscape of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on an international study of 1,223 cases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115:E11711–E11720.
- Gu Z, Churchman ML, Roberts KG, et al. PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2019;51:296–307.
- Moorman AV, Schwab C, Winterman E, et al. Adjuvant tyrosine kinase inhibitor therapy improves outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukaemia who have an ABL-class fusion. *Br J Haematol*. 2020;191:844–851.
- Cairo G, Leoni V, Conter V, et al. Relapses and treatment-related events contributed equally to poor prognosis in children with ABL-class fusion positive B-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to AIEOP-BFM protocols. *Haematologica*. 2020;105:1887–1894.
- Brüggemann M, Kotrova M. Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Blood Adv*. 2017;1:2456–2466.
- Kim IS. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: technical aspects and implications for clinical interpretation. *Blood Res*. 2020; 55: S19–S26.
- Kotrova M, Trka J, Kneba M, et al. Is next-generation sequencing the way to go for residual disease monitoring in acute lymphoblastic? *Mol Diagn Ther*. 2017;21:481–492.
- Kotrova M, van der Velden VHJ, van Dongen JJM, et al. Next-generation sequencing indicates false-positive MRD results and better predicts prognosis after SCT in patients with childhood ALL. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52:962–968.
- Ruella M, Maus MV. Catch me if you can: Leukemia escape after CD19-Directed T cell immunotherapies. *Comput Struct Biotechnol J*. 2016;14:357–362.
- Kotrova M, Darzentas N, Pott C, et al. Next-generation sequencing technology to identify minimal residual disease in lymphoid malignancies. *Methods Mol Biol*. 2021;2185:95–111.
- Brüggemann M, Kotrova M, Knecht H, et al. Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia*. 2019;33:2241–2253.
- Cazzaniga G, De Lorenzo P, Alten J, et al. Predictive value of minimal residual disease in Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib in the European intergroup study of post-induction treatment of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia, based on immunoglobulin/T-cell receptor and BCR/ABL1 methodologies. *Haematologica*. 2018;103:107–115.
- Hovorkova L, Zaliava M, Venn NC, et al. Monitoring of childhood ALL using BCR-ABL1 genomic breakpoints identifies a subgroup with CML-like biology. *Blood*. 2017;129:2771–2781.
- Huang YJ, Kuo MC, Jaing TH, et al. Comparison of two quantitative PCR-based assays for detection of minimal residual disease in B-precursor acute lymphoblastic leukemia harboring three major fusion transcripts. *J Mol Diagn*. 2021;23:1373–1379.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ AUTORA

Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyla podpořena žádnou farmaceutickou firmou.

Doručeno do redakce dne: 8. 10. 2021.

Přijato po recenzi dne: 5. 11. 2021.

RNDr. Nikola Čuřík, Ph.D.

Oddělení molekulární genetiky

Ústav hematologie a krevní transfuze

U Nemocnice 1

128 00 Praha

e-mail: nikola.curik@uhkt.cz