

Znaczenie współpracy pomiędzy laboratorium cytogenetycznym i molekularnym w diagnostyce genetycznej chorób hematoonkologicznych na przykładzie pacjenta pediatrycznego z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej (AML)

The importance of cooperation between cytogenetic and molecular laboratory in the genetic testing of hemato-oncological diseases on the example of a pediatric patient with acute myeloid leukemia (AML)

Teofila Książek^{1,2}, Katarzyna Szewczyk^{1,2}, Beata Sadowska², Przemysław Kaczówka^{3,4}, Agnieszka Grabowska^{1,2}, Mirosław Bik-Multanowski^{1,2}

¹Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Pediatrii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

²Laboratorium Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej, Uniwersytecki Szpital Dziecięcy w Krakowie

³Klinika Onkologii i Hematologii Dziecięcej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

⁴Studium Medycyny Molekularnej, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Profilowanie genetyczne komórek nowotworowych jest obecnie standardem w diagnostyce chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. Potwierdzenie obecności charakterystycznych zaburzeń genetycznych jest niezwykle istotne dla postawienia prawidłowego rozpoznania oraz przy doborze optymalnej terapii. W poniższym opracowaniu zarysowano problematykę metod stosowanych w onkogenetycznej diagnostyce cytogenetycznej i molekularnej, podkreślając ich zalety oraz wskazując ograniczenia. Przedstawiono także ich praktyczne wykorzystanie na przykładzie kompleksowej analizy zmian genetycznych w komórkach nowotworowych u pacjenta pediatrycznego z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej (AML). Prawidłowa interpretacja wyników zebranych z przeprowadzonych badań tj. klasycznego kariotypu, badania fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), analizy ekspresji genów fuzyjnych i mikromacierzy cytogenetycznej, przyczyniła się do wyboru optymalnego leczenia u pacjenta, uwzględniając stwierdzone u niego niekorzystne zmiany genetyczne.

Abstract

The genetic profiling of leukemic cells is currently the standard in routine diagnosis of haematopoietic malignancies. Detection of characteristic genetic abnormalities is extremely important in establishing the correct diagnosis and selecting the optimal treatment for the patient. In this paper we outline the problems of cytogenetic and molecular methods applied in the oncogenetic diagnostics. Moreover, we emphasize advantages and indicate limitations of these methods. Additionally, we present their practical use on the example of a comprehensive analysis of genetic changes in leukemic cells in a pediatric patient diagnosed with acute myeloid leukemia (AML). Simultaneous, proper interpretation of the results of all performed analysis – classical karyotype, fluorescence *in situ* hybridization (FISH), analysis of the expression of fusion genes and molecular karyotyping by microarrays, eventually led to the selection of optimal treatment which take into account the identified adverse genetic changes of the described patient.

Słowa kluczowe: ostra białaczka szpikowa, markery genetyczne, badania cytogenetyczna, badania molekularne

Key words: acute myeloid leukemia, genetic markers, cytogenetic studies, molecular studies

Wstęp

Profilowanie genetyczne komórek nowotworowych jest obecnie standardem w diagnostyce chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. Potwierdzenie obecności charakterystycznych zaburzeń genetycznych jest niezwykle istotne dla postawienia prawidłowego

rozpoznania. Potwierdzają to najnowsze opracowania Światowej Organizacji Zdrowia (WHO; *World Health Organization*), dotyczące klasyfikacji nowotworów tkanek krwiotwórczych i limfoidalnych [1, 2]. Swoiste zmiany genetyczne w komórkach nowotworowych są także ważnymi czynnikami prognostycznymi w przebiegu choroby,

a ponadto w wielu protokołach terapeutycznych decydują o podejmowanej u pacjenta terapii. Do markerów genetycznych zaliczane są wszystkie typy mutacji, od zmian genomowych, np. monosomie, hipo-, hiperdiploidie w ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL; *acute lymphoblastic leukemia*), poprzez strukturalne aberracje chromosomowe, np. chromosom Philadelphia powstający w wyniku translokacji t(9;22)(q34;q11.1) w przewlekłej białaczce szpikowej (AML; *acute myeloid leukemia*) do mutacji punktowych wykrywanych w poszczególnych genach (np. geny *NPM1* i *WT1* w ostrej białaczce szpikowej (CML; *chronic myeloid leukemia*).

W przypadku AML u dzieci diagnostyka genetyczna pełni niezwykle istotną rolę w stratyfikacji ryzyka niepowodzenia leczenia. Zidentyfikowane markery genetyczne, wraz z uzyskiwaną odpowiedzią na leczenie indukcyjne są najważniejszymi czynnikami pozwalającymi na dobór optymalnej terapii dla pacjenta – tabela 1 [3]. Do charakterystycznych dla dziecięcej AML zmian genetycznych zalicza się strukturalne aberracje chromosomowe (translokacje, inwersje), prowadzące do powstania w. genów fuzyjnych. Obecne w blastach białaczkowych geny fuzyjne ulegając ekspresji powodują powstanie nieprawidłowo funkcjonujących produktów białkowych [4-6]. Rutynowym narzędziem diagnostycznym w wykrywaniu tych zmian jest analiza cytogenetyczna metodą klasycznego kariotypu, wspomagana badaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Należy jednak podkreślić, że wykrywanie aberracji chromosomowych w AML za pomocą konwencjonalnej analizy kariotypu zwykle przeprowadza się przy średniej rozdzielczości prążkowej (dla prążków GTG) 450-550, co pozwala na detekcję zmian wielkości 6-10 Mbp (milionów par zasad). Niska rozdzielczość klasycznego kariotypu utrudnia wskazanie miejsc złamań na chromosomach podlegających translokacji, a w niektórych przypadkach uniemożliwia detekcję dodatkowych, małych aberracji chromosomowych oraz zmian zlokalizowanych w regionach telomerowych chromosomów. Badaniem o znacznie większej rozdzielczości (około 150-200 kbp) jest fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). FISH jest metodą celowaną, zatem jej zastosowanie wymaga uprzedniej znajomości badanego regionu

chromosomowego, w celu wykrycia rearanżacji specyficznych dla danego locus. Uzupełnieniem konwencjonalnej analizy cytogenetycznej metodą klasycznego kariotypu i FISH jest porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy tzw. analiza za pomocą mikromacierzy cytogenetycznych (aCGH; *array Comparative Genomic Hybridization*). Metoda z użyciem macierzy cytogenetycznych stanowi atrakcyjną formę badania genomu komórek nowotworowych. Przede wszystkim wyższa rozdzielczość badania aCGH (10-150 kpb) oraz możliwość równoczesnej analizy całego genomu, unikając konieczności prowadzenia hodowli komórkowej oferuje znaczne korzyści w stosunku do tradycyjnych metod cytogenetycznych [8]. Do innych metod biologii molekularnej stosowanych do potwierdzania rearanżacji chromosomowych należy technika łańcuchowej reakcji polimerazy poprzedzona odwrotną transkrypcją (RT-PCR; *reverse transcription-polymerase chain reaction*). Technika ta wykorzystuje obecność powstających w komórkach białaczkowych produktów genów fuzyjnych na poziomie mRNA. Analiza RT-PCR znalazła szerokie zastosowanie w diagnostyce hematologicznej np. w wykrywaniu partnerów fuzyjnych przy rearanżacjach genu *KMT2A* (dawniej *MLL*). W przypadku dziecięcej AML, partner fuzyjny genu *KMT2A* ma duże znaczenie prognostyczne – tabela I [3, 9]. W poniższym opracowaniu przedstawiono wyniki kompleksowej diagnostyki cytogenetycznej i molekularnej u pacjenta pediatrycznego z rozpoznaniem AML, które wspólnie doprowadziły do uzyskania pełnego obrazu zmian genetycznych występujących w komórkach białaczkowych.

Materiał i metody

Materiał diagnostyczny stanowiły próbki szpiku kostnego, zabezpieczone do badań cytogenetycznych i molekularnych, pobrane od 2-letniej dziewczynki z podejrzeniem AML.

Analiza cytogenetyczna obejmowała badanie klasycznego kariotypu, poszerzone o badanie FISH celowane na rearanżacje genu *KMT2A*. Analizę poprzedzała 24 godzinna hodowla pierwotna leukocytów ze szpiku kostnego, niestymulowana mitogenem.

Preparaty z metafazowymi jądrami komórkowymi trawiono trypsyną i barwiono odczynnikiem Wright-Giemsa w celu uzyskania wzoru prążkowego GTG do oceny kariotypu komórek nowotworowych. Oceny przeprowadzono z użyciem mikroskopu Olympus BX51 (Olympus, Tokio, Japonia). Ponadto, część preparatów, które nie były barwione przeznaczono do analizy metodą FISH z wykorzystaniem sondy molekularnej *MLL* (*KMT2A*) Breakapart (Cytocell Ltd, Cambridge, Anglia). Preparatyka FISH była zgodna z instrukcją producenta. Zastosowano osobną denaturację DNA pacjenta oraz sondy molekularnej. Oceny preparatów w badaniu metodą

Tabela I. Markery genetyczne o znaczeniu rokowniczym w dziecięcej ostrej białaczce szpikowej (AML) według stosowanego w Polsce protokołu terapeutycznego AML BFM 2012.

ROKOWANIE	MARKERY GENETYCZNE	CZĘSTOŚĆ [3-7]
Korzystne	t(8;21)(q22;q22) / <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	12%-14%
	inv(16)(p13;q22) lub t(16;16)(p13.1;q22) / <i>CBFB-MYH11</i>	8%
	t(15;17)(q24;q21) / <i>PML-RARA</i>	6%-10%
	t(1;11)(q21;q23) / <i>KMT2A (MLL)-MLLT1</i>	1%
	mutacje w genie <i>NPM1</i> przy prawidłowym kariotypie	5%-10%
	bialleliczne mutacje w genie <i>CEPBA</i> przy prawidłowym kariotypie	5%
Niekorzystne	monosomia 7	1,5%-2%
	t(4;11)(q21;q23) / <i>KMT2A (MLL)-AFF1</i>	<0,5%
	t(6;11)(q27;q23) / <i>KMT2A (MLL)-MLLT4</i>	<0,5%
	t(10;11)(p12;q23) / <i>KMT2A (MLL)-MLLT10</i>	2,5%
	t(5;11)(q35;p15.5) / <i>NUP98-NSD1</i>	<0,5%
	t(6;9) (p23;q34) / <i>DEK-NUP214</i>	<0,5%
	t(9;22) (q34;q11.2) / <i>BCR-ABL1</i>	0,5%
	t(7;12)(q36;p13) / <i>ETV6(TEL)-HLXB9(MNX1)</i>	<0,5%
	złożony kariotyp	1-2%
	mutacje w genie <i>WT1</i> i <i>FLT3/ITD</i>	<0,5%

FISH dokonano z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX51 (Olympus, Tokio, Japonia).

Jednocześnie przeprowadzono analizę genotypowania 28 najczęstszych rearanżacji chromosomowych o znaczeniu prognostycznym w białaczkach zestawem HemaVision-28N (DNA Diagnostic, Risskov, Dania). Materiał do badań stanowił kwas nukleinowy mRNA wyizolowany z komórek jednojądrzastych (MNC; *mononuclear cells*) wyodrębnionych z 1 ml szpiku kostnego i zabezpieczonych w odczynniku TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Pierwszym etapem analizy było przepisanie mRNA w reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). W kolejnym etapie wykonano analizę metodą multipleks RT-nested PCR dla transkryptów genów fuzyjnych, z rozdziałem elektroforetycznym w żelu agarozowym. Metoda ta polega na wykonaniu dwuetapowej amplifikacji produktów w oparciu o specyficzne wobec wybranych genów fuzyjnych pary starterów (nested PCR). Pozwala to na wykrywanie transkryptów z dużą czułością. Wykorzystanie w pierwszym etapie analizy mieszaniny starterów (multipleks), pozwala na ocenę szerokiego panelu sekwencji docelowych. Wykrywane zmiany są następnie potwierdzane reakcjami nested PCR w oparciu o pojedyncze pary starterów.

W celu uzupełnienia diagnostyki zmian na poziomie całego genomu oraz wyjaśnienia niejednoznacznych wyników przeprowadzonych analiz na zabezpieczonym materiale wykonano badanie metodą mikromacierzy cytogenetycznych. Z 250 µl szpiku kostnego wyizolowano DNA zestawem Genomic DNA Extraction Kit from Whole Blood of Human ze złożami kolumnowymi na aparacie QuickGene-Mini80 (Kurabo, Osaka, Japonia). Do analizy użyto 350 ng DNA pacjenta znakowanego cyjaniną-3 oraz 350 ng referencyjnego DNA żeńskiego znakowanego cyjaniną-5 (Agilent Technologies, Kalifornia, USA).

Ocenę zmian w genomie komórek nowotworowych przeprowadzono zestawem mikromacierzy oligonukleotydowych Agilent SurePrint G3 CGH ISCA v2 Kit 8x60K (Agilent Technologies, Kalifornia, USA). Preparatyka była zgodna z instrukcją producenta dla protokołu z trawieniem enzymatycznym. Wyniki analizowano w programie komputerowym Agilent CytoGenomics v4.0. Rozdzielczość badania aCGH dla oceny zmian w liczbie kopii

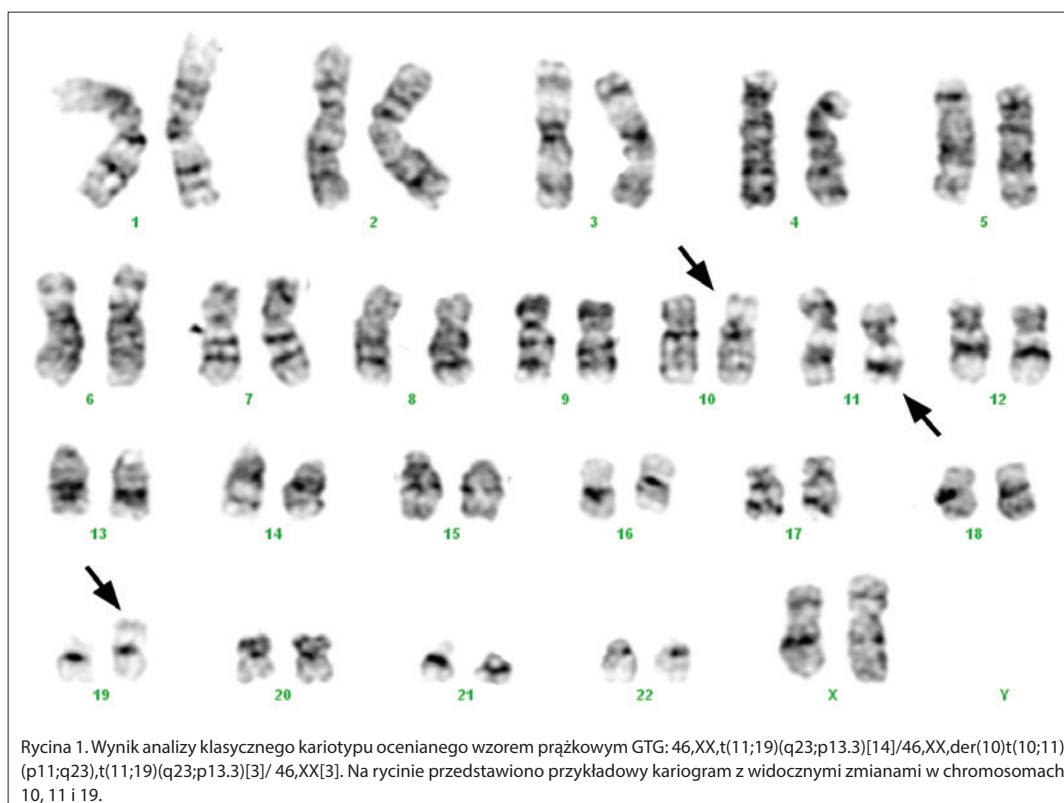
materiału genetycznego ustalono na poziomie 150 kb.

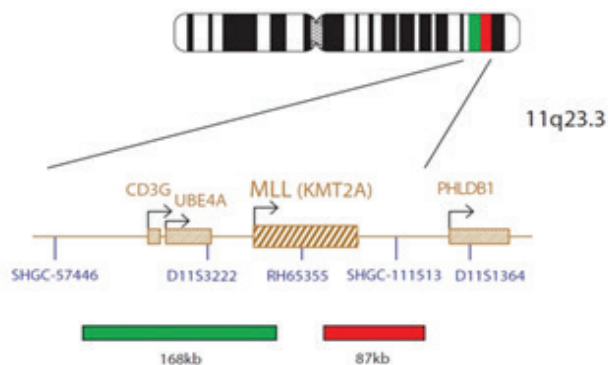
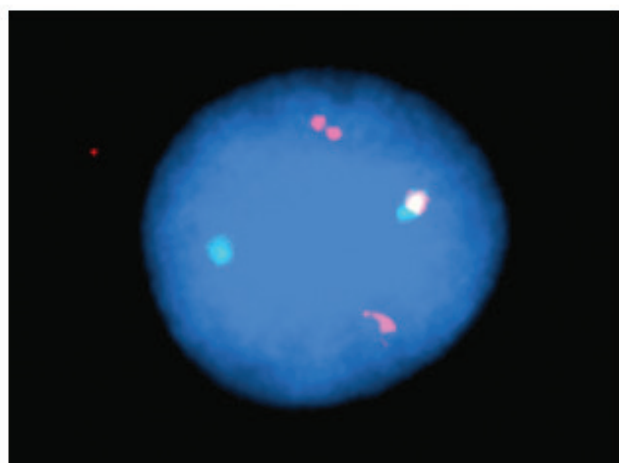
Wyniki klasycznego kariotypu, analizy FISH oraz mikromacierzy cytogenetycznej zostały zapisane zgodnie z międzynarodowymi normami The International System for Human Cytogenomic Nomenclature 2016 (ISCN).

Wyniki

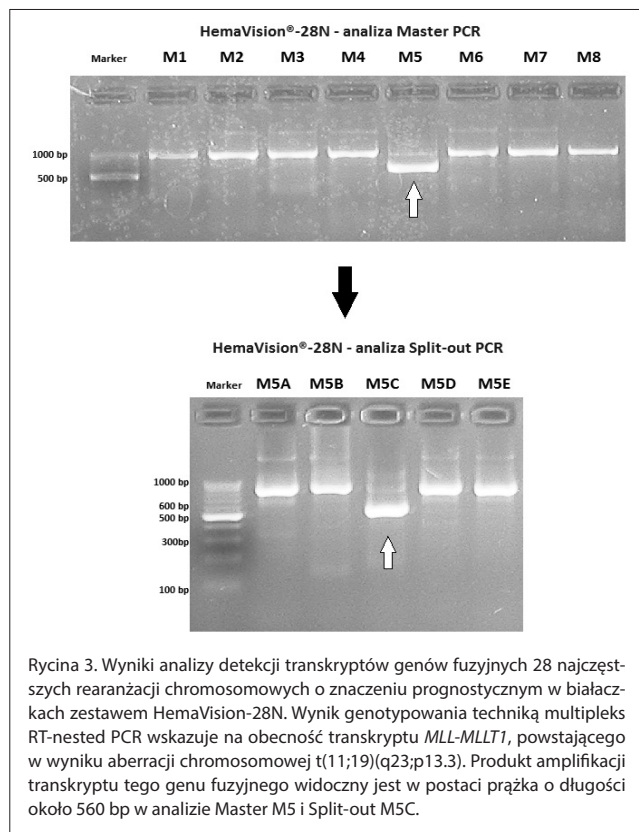
Badanie klasycznego kariotypu techniką GTG ze szpiku kostnego wykazało obecność linii komórek prawidłowych oraz komórek z nieprawidłowościami w obrębie chromosomów 10, 11, 19 i rearanżacją genu *KMT2A* (*MLL*), zlokalizowanego na chromosomie 11 (ryc. 1). Do opisywanych i często występujących translokacji chromosomowych w AML angażujących wymienione chromosomy zalicza się translokacje t(10;11)(p12;q23) oraz t(11;19)(q23;p13.3). Jednak, tylko translokację t(10;11)(p12;q23), prowadzącą do powstania genu fuzyjnego *KMT2A(MLL)-MLL10* uznaje się za niekorzystny marker genetyczny w dziecięcej AML. Niezwykle istotne było zatem dokładne przeanalizowanie i przebadanie materiału genetycznego pacjentki pod kątem wykrytych zmian strukturalnych w chromosomach. Wykonana w następnej kolejności analiza FISH sondą *MLL* (*KMT2A*) Breakapart potwierdziła obecność rearanżacji genu *KMT2A* (*MLL*) w 70% analizowanych interfazowych jąder komórkowych – nuc ish(5'MLLx3,3'MLLx2)(5'MLLcon3'MLLx1)[70/100] (ryc. 2).

W celu detekcji ekspresji potencjalnych genów fuzyjnych powstałych w wyniku rearanżacji chromosomu 11 zastosowano analizę molekularną zestawem HemaVision-28N, która nie wykazała obecności transkryptu genu fuzyjnego *KMT2A* (*MLL*)-*MLL10*. Wykonana analiza potwierdziła natomiast obecność transkryptu innego genu fuzyjnego z udziałem genu *KMT2A* – *KMT2A* (*MLL*)-*MLL11*, powstającego w wyniku zrównoważonej translokacji t(11;19)(q23;p13.3). Zidentyfikowany transkrypt genu fuzyjnego był wi-





Rycina 2. Wynik analizy FISH z wykorzystaniem sondy molekularnej MLL (KMT2A) Breakapart (CytoCELL Ltd, Cambridge, Anglia). Na obrazie widoczny jest sygnał żółty potwierdzający obecność prawidłowej kopii badanego regionu chromosomowego. Pojedyncze sygnały zielony i czerwony wskazują na rearanżację genu *KMT2A* (*MLL*) ze zwielokrotnieniem analizowanego regionu w komórce (dwa sygnały czerwone). Wyniki badania: nuc ish(5'*MLL*x3,3'*MLL*x2)(5'*MLL*con3'*MLL*x1)[70/100]. Schemat lokalizacji sondy MLL (KMT2A) Breakapart według CytoCELL Ltd (<https://www.cytoCELL.com/probes/41-ml-mlt2a-breakapart>).



Rycina 3. Wyniki analizy detekcji transkryptów genów fuzyjnych 28 najczęstszych rearanżacji chromosomowych o znaczeniu prognostycznym w białaczkach zestawem HemaVision-28N. Wynik genotypowania techniką multiplex RT-nested PCR wskazuje na obecność transkryptu *MLL-MLL1*, powstającego w wyniku aberracji chromosomowej t(11;19)(q23;p13.3). Produkt amplifikacji transkryptu tego genu fuzyjnego widoczny jest w postaci prążka o długości około 560 bp w analizie Master M5 i Split-out M5C.

doczny, jako dodatkowy produkt amplifikacji o długości około 560 bp, poza produktem pochodzącym od genu kontrolnego o długości 911 bp w analizie Master M5 i Split-out M5C – rycina 3. Analiza wskazała także dokładną lokalizację miejsc pęknięć DNA na chromosomie 11 w eksonie 10 genu *KMT2A* (*MLL*) i na chromosomie 19 w eksonie 7 genu *MLL1*.

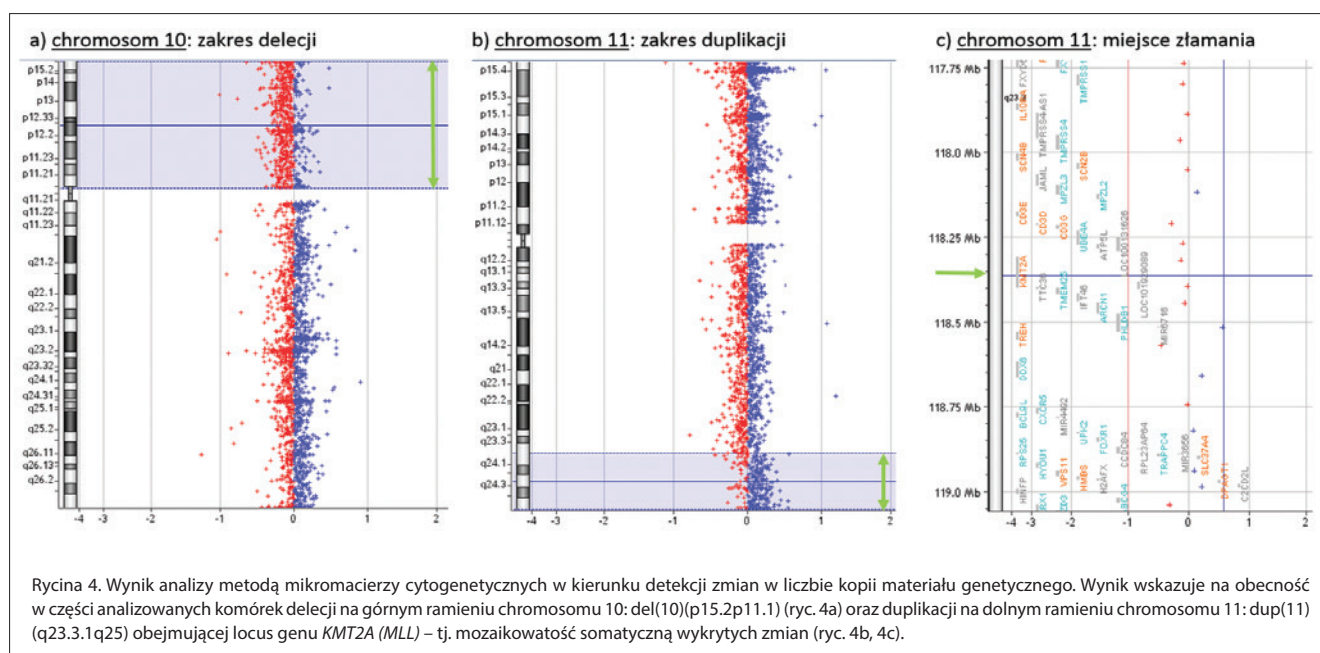
Złożoność wykrytych zmian genetycznych przeanalizowano również za pomocą mikromacierzy cytogenetycznej, wykonanej na zabezpieczonym materiale diagnostycznym pacjentki. Analizę prowadzono w kierunku detekcji zmian w liczbie kopii materiału genetycznego w blastach białaczkowych. Badanie wykazało obecność delekcji w regionie 10p15.2p11.1(136361_38408609) wielkości 38,27 Mbp oraz duplikacji w regionie 11q23.3.

1q25(118318090_134868407) wielkości 16,55 Mbp, obejmującej *locus* genu *KMT2A* (*MLL*) (ryc. 4). Wynik analizy ustalono jako: arr[hg19]10p15.2p11.1(136361_38408609)x1[>0.25],11q23.3.1q25(118318090_134868407)x3[>0.25]. Nieprawidłowy wynik analizy mikromacierzy cytogenetycznej świadczy o niezrównoważonym charakterze aberracji z udziałem chromosomów 10 i 11 pary, zidentyfikowanej wstępnie w kariotypie wykonanym klasyczną techniką GTG ze szpiku kostnego. Ponadto, na podstawie profilu genetycznego uzyskanego w analizie mikromacierzy cytogenetycznej stwierdzono, że zidentyfikowane w tym badaniu aberracje chromosomowe z dużym prawdopodobieństwem występują w formie mozaiki, co potwierdzał wynik klasycznego kariotypu. Jednak rodzaj zastosowanych mikromacierzy cytogenetycznych, które nie uwzględniają profilu zmian typu polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP; *single nucleotide polymorphism*) uniemożliwił jednoznaczną odpowiedź w tym zakresie. Ponadto, biorąc pod uwagę charakter badanego materiału oraz metodę analizy należy zauważyć, że niemożliwe było rozróżnienie komórek somatycznych pacjenta od komórek nowotworowych oraz rozróżnienie pomiędzy klonami komórek nowotworowych, co nie wyklucza, iż w którymś z klonów białaczkowych obecna była translokacja zrównoważona t(11;19)(q23;p13.3).

Ostateczny wynik analizy kariotypu klasycznego, uzupełniony o informacje z przeprowadzonych dodatkowo badań genetycznych wykazał obecność 3 linii komórkowych w szpiku kostnym pacjentki: (i) prawidłowej, (ii) nieprawidłowej ze zrównoważoną translokacją t(11;19)(q23;p13.3) oraz (iii) nieprawidłowej z translokacją t(11;19)(q23;p13.3) współistniejącą ze złożoną rearanżacją der(10)t(10;11)(p11;q23), która nie prowadziła do ekspresji genu fuzyjnego *KMT2A* (*MLL*)-*MLL10* i tym samym nie została uznana za niekorzystny czynnik rokowniczy u pacjenta. Kariotyp pacjenta ustalono jako: 46,XX,t(11;19)(q23;p13.3)[14]/46,XX,der(10)t(10;11)(p11;q23),t(11;19)(q23;p13.3)[3]/46,XX [3].

Dyskusja

Złożoność zmian genetycznych występujących w komórkach nowotworowych od lat stanowi wyzwanie dla osób, które je badają.



W ostatnich dwóch dekadach wyniki prac naukowych z tej dziedziny wkroczyły do rutynowej diagnostyki genetycznej wykonywanej u pacjentów onkologicznych. Identyfikacja specyficznych zmian w genomie komórek nowotworowych, jako czynników rokowniczych i ustanowienie ich markerami genetycznymi w ostrej białaczce szpikowej jest tylko jednym z wielu przykładów. Potrzeba coraz dokładniejszej diagnostyki genetycznej o globalnym zasięgu, dającej informacje o całym genomie wymusza wprowadzanie do laboratoriów szerokiego zakresu technik cytogenetycznych i molekularnych.

W przedstawionym przypadku klinicznym wstępna analiza kariotypu, pomimo że wskazała na rearanżacje genu *KMT2A (MLL)*, nie dała jednoznacznie odpowiedzi na pytanie, czy doszło do translokacji t(10;11)(p12;q23), prowadzącej do powstania genu fuzyjnego *KMT2A(MLL)-MLLT10*. Informacja ta była niezwykle istotna dla postępowania terapeutycznego u pacjenta, ponieważ wspomniana translokacja jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w stosowanym w Polsce protokole terapeutycznym [3]. W przypadku klasycznego kariotypu należy pamiętać, że rozdzielczość prążkowa, a tym samym dokładność badania są silnie uzależnione od stopnia kondensacji chromatyny. Ponadto, u części pacjentów z AML można spotkać tzw. złożony kariotyp (ang. *complex karyotype*). Dlatego też, dokładna charakterystyka wielu, często bardzo złożonych translokacji pomiędzy kilkoma chromosomami jest niezwykle trudna. Dodatkową trudnością w przeprowadzeniu wiarygodnego badania metodą klasycznego kariotypu jest wymagana obecność dzielących się komórek. W takich sytuacjach optymalnym rozwiązaniem jest analiza zmian metodą FISH interfazowego, wykonywanego bezpośrednio na rozmazach szpiku kostnego lub interfazowych jądrach komórkowych, pozostałych po pierwotnej hodowli leukocytów. Należy jednak pamiętać, że badanie FISH nie może być wykorzystane do przesiewowego badania całego genomu w poszukiwaniu nieznanymi aberracji, lecz jest skutecznym narzędziem do analizy konkretnych regionów chromosomowych. W przypadku rearanżacji genu *KMT2A (MLL)*, technika FISH pozwala na szybką detekcję

obecności zmian strukturalnych w obrębie prążka 11q23. Jest więc często wykorzystywana do wykluczania obecności tych zmian nie tylko w AML, ale i w ALL, gdzie obecność rearanżacji t(4;11)(q21;q23) także ma istotne znaczenie prognostyczne.

Do ustalenia partnerów w genach fuzyjnych, powstających w wyniku rearanżacji chromosomów z dużym powodzeniem stosuje się metody molekularne. Metody te mogą być oparte o badanie ekspresji genów fuzyjnych na poziomie mRNA. Za ich pomocą można w krótkim czasie ocenić obecność genów fuzyjnych, powstających w wyniku różnych translokacji chromosomu 11 angażujących gen *KMT2A (MLL)*. Należy jednak pamiętać, że w tym przypadku do diagnostyki wykorzystuje się jedynie znane warianty genów fuzyjnych, najczęściej o ustalonym znaczeniu prognostycznym. Dlatego też, w analizowanym przypadku stwierdzono obecność genu fuzyjnego *KMT2A (MLL)-MLLT1*, który powstaje w wyniku translokacji zrównoważonej t(11;19)(q23;p13.3) często występującej w białaczkach. Nie wykryto natomiast ekspresji genów fuzyjnych, powstających przy złożonej rearanżacji pomiędzy chromosomami 10, 11 i 19. Istnieją metody molekularne pozwalające na ocenę nieopisywanych, specyficznych dla pacjenta fuzji w obrębie genu *KMT2A (MLL)* [10,11]. Wymagają one jednak dużego nakładu pracy i specjalistycznego sprzętu i nie są rutynowo dostępne w laboratoriach genetycznych. Przeprowadzone przez Meyer i wsp. analizy w dużych grupach pacjentów z rearanżacjami w genie *KMT2A (MLL)* [12,13] przyczyniły się do poznania zmian zachodzących na poziomie sekwencji DNA tego genu i określenia zróżnicowania oraz częstości partnerów fuzyjnych, a tym samym do opracowywania testów diagnostycznych szeroko dostępnych dla potrzeb pacjentów.

Ważną techniką służącą do wykrywania zmian w liczbie kopii materiału genetycznego z wysoką rozdzielczością na poziomie całego genomu są mikromacierze cytogenetyczne – aCGH [14, 15]. W przedstawionym przypadku klinicznym wynik analizy tą techniką pozwolił na potwierdzenie nie zrównoważonego charakteru wykrytych zmian na chromosomach 10 i 11. Wskazał też z dużą dokładnością konkretne rejony prążków na chromosomach w ob-

rzebie stwierdzonych aberracji. Słabą stroną badania aCGH jest jednak brak możliwości identyfikacji rearanżacji chromosomowych o charakterze zrównoważonym oraz utrudniona diagnostyka zaburzeń klonalnych, jeżeli występują one na bardzo niskim poziomie. Dlatego też w wykonanej analizie aCGH u przedstawianego pacjenta nie zaobserwowano żadnych zmian na chromosomie 19. Podsumowanie zalet oraz ograniczeń zastosowanych w przedstawionym przypadku badań cytogenetycznych i molekularnych przedstawiono w tabeli II.

Na przykładzie prezentowanej pacjentki podkreślamy fakt, że we współczesnym onkogenetycznym laboratorium diagnostycznym ścisła współpraca pomiędzy cytogenetykami i genetykami molekularnymi jest optymalnym rozwiązaniem, prowadzącym do uzyskania pełnego obrazu zmian genetycznych. Wspólna interpretacja zebranych wyników przeprowadzonych badań – klasycznego kariotypu, badania FISH, analizy ekspresji genów fuzyjnych i mikromacierzy cytogenetycznej, doprowadziła ostatecznie do wyboru optymalnego leczenia u pacjenta, uwzględniającego stwierdzone u niego zmiany genetyczne.

Podziękowania

Autorzy pracy serdecznie dziękują za pomoc i owocną współpracę wszystkim pracownikom Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie zaangażowanym w proces genetycznej diagnostyki onkologicznej u dzieci, w tym szczególnie pracownikom Laboratorium Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej.

Piśmiennictwo

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumors of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2008.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised Fourth Edition, WHO Classification of Tumours, Volume 2. 2017.
3. Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2012; 120(16): 3187-3205.
4. Manola KN. Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2009; 83: 391-405.

Tabela II. Podsumowanie podstawowych zalet i ograniczeń wybranych technik diagnostyki cytogenetycznej i molekularnej stosowanych w hematologii dziecięcej.

METODA	ZALETY	WADY
Kariotyp klasyczny	<ul style="list-style-type: none"> – pozwala na identyfikację nieprawidłowości w liczbie i budowie chromosomów w pojedynczym jądrze komórkowym – pozwala na poznanie struktury chromosomów w tym występowania translokacji zrównoważonych, inwersji, chromosomów pierścieniowych – pozwala na stwierdzanie mozaikowej formy aberracji chromosomowych 	<ul style="list-style-type: none"> – ocenie poddawane są wyłącznie metafazowe lub prometafazowe jądra komórkowe – wymagana jest hodowla komórkowa, niemożliwe jest wykonanie tego badania z komórek utrzalonych lub materiału z bloczka parafinowego – ograniczona rozdzielczość wykrywanych zmian umożliwia ujawnienie nieprawidłowości w wielkości 5-10 Mbp
FISH	<ul style="list-style-type: none"> -pozwala na identyfikację nieprawidłowości w liczbie i budowie chromosomów w zależności od użytej w badaniu sondy -wyższa rozdzielczości w stosunku do klasycznego kariotypu, wynoszącej 150-200 kbp, co pozwala na detekcję zmian submikroskopowych – możliwość wykonania analizy również w interfazowych jądrach komórkowych, gdy komórki nie uległy podziałom w hodowli <i>in vitro</i> 	<ul style="list-style-type: none"> – należy do tzw. diagnostyki „celowanej”, co oznacza ograniczenie analizy do wybranego regionu chromosomowego
aCGH	<ul style="list-style-type: none"> – pozwala na identyfikację zmian liczby kopii fragmentów materiału genetycznego -charakteryzuje się wysoką średnią rozdzielczością analizy 5-100 kbp, umożliwiając detekcję zmian submikroskopowych w chromosomach (mikrodelekcji i mikroduplikacji) – nie jest konieczna hodowla komórkowa materiału biologicznego pacjenta przed wykonaniem badania (analiza DNA pacjenta) 	<ul style="list-style-type: none"> – nie jest możliwa identyfikacja zmian zrównoważonych w genomie -trudności interpretacyjne w przypadku występowania mozaikowości w analizowanym materiale
Wykrywanie genów fuzyjnych techniką PCR	<ul style="list-style-type: none"> – pozwala na szybką i jednoznaczną ocenę występowania genów fuzyjnych, powstających w wyniku konkretnych rearanżacji chromosomowych – istnieje możliwość multipleksowania reakcji, prowadząca do jednoczesowej detekcji kilku różnych rearanżacji – nie jest konieczna hodowla komórkowa materiału biologicznego pacjenta przed wykonaniem badania (analiza na poziomie DNA lub mRNA) 	<ul style="list-style-type: none"> – należy do tzw. „diagnostyki celowanej”, zazwyczaj jest prowadzona w kierunku detekcji specyficznych genów fuzyjnych, charakterystycznych dla danej jednostki chorobowej – wymaga wcześniejszego zaprojektowania panelu diagnostycznego lub korzystania z dostępnych na rynku zestawów

5. Braoudaki M & Tzortzatou-Stathopoulou F. Clinical cytogenetics in pediatric acute leukemia: an update. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012; 12(4): 230-237.
6. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arcenci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011; 29(5): 551-565.
7. Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood.* 2009; 114(12): 2489-2496.
8. Kozłowska J, Łączmańska I. Techniki cytogenetyczne i molekularne stosowane w diagnostyce chorób uwarunkowanych genetycznie. *Diagn Lab.* 2008; 44: 379-387.
9. Balgobind BV, Zwaan CM, Pieters R, Van den Heuvel-Eibrink MM. The heterogeneity of pediatric MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2011; 25(8): 1239-1248.
10. Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia.* 2009; 23(8): 1490-1499.
11. Afrin S Zhang ChRC, Meyer C, et al. Targeted next generation sequencing for detecting MLL gene fusions in leukemia. *Mol Cancer Research.* 2018; 16(2): 279-285.
12. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia.* 2013; 27(11): 2165-2176.
13. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia.* 2018; 32(2): 273-284.
14. Mehrotra M, Luthra R, Ravandi F, et al. Identification of Clinically Important Chromosomal Aberrations in Acute Myeloid Leukemia by Array-Based Comparative Genomic Hybridization. *Leuk Lymphoma.* 2014; 55(11): 2538-2548.
15. Tybäckinoja A, Elonen E, Piippo K, et al. Oligonucleotide array-CGH reveals cryptic gene copy number alterations in karyotypically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2007; 21(3): 571-574.

Autor do korespondencji:

dr n. med. Teofila Książek
Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Pediatrii
Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków,
tel. +48 12 6580261, +48 126582011 wew. 1296
e-mail: teofila.ksiazek@uj.edu.pl

Otrzymano: 19.06.2018

Akceptacja do druku: 9.10.2018

Nie zgłoszono sprzeczności interesów

