

KLINIČKI ZNAČAJ CITOGENETIKE U LEUKEMIJAMA DJEČJE DOBI

BERNARDA LOZIĆ¹, TATIJANA ZEMUNIK²

Citogenetske i molekularne analize su neophodne za klasifikaciju leukemija dječje dobi. Genetske nepravilnosti često povezuju s određenim kliničko-biološkim karakteristikama bolesti. U akutnoj limfoblastičnoj leukemiji genetske promjene zajedno sa staničnom morfologijom, citokemijom, imunofenotipizacijom i kliničkim značajkama, definiraju različite podskupine ove bolesti. U akutnoj mijeloidnoj leukemiji jedinstvena citogenetska preuređenja povezana su s određenim morfološkim podgrupama. Citogenetska analiza ne pruža samo važne informacije o dijagnozi, prognozi i praćenju bolesnika već kariotip daje sliku cijelog genoma, a preuređenja koja se događaju u malignom klonu su polazišta za daljnja istraživanja. U mnogim slučajevima molekularne analize otkrivaju točke loma kromosoma, kloniraju genske lokuse kako bi upoznali funkciju proteina uključenih u leukomogenezu. Poznavanje funkcija tih proteina otvara novi terapijski pristup s ciljanom i manje toksičnom terapijom. Nalazi citogenetske i molekularne analize uključuju se u kliničke protokole, a u pojedinim slučajevima kod rijetkih podskupina leukemija uvodi se ponekad i individualni terapijski pristup.

Deskriptori: LEUKEMIJE U DJEČJOJ DOBI, KROMOSOMSKE ABERACIJE, CITOGENETIKA, MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA

Uvod

Skraćenice:
DSB (engl. double strand break) = lom dvostruke uzvojnice; CA (engl. chromosomal aberration) = kromosomske aberacije; FISH (engl. fluorescence in situ hybridisation) = fluorescentna in situ hibridizacija; SKY (engl. spectral karyotyping) = spektralna kariotipizacija s 24 različite fluorescentne boje; CGH (engl. comparative genomic hybridization) komparativna genomna hibridizacija; PCR (engl. polymerase chain reaction) polimerazna lančana reakcija; RT-PCR = (engl. real time polymerase chain reaction) polimerazna lančana reakcija u stvarnom vremenu; ALL = akutna limfoblastična leukemija; AML = akutna mijeloidna leukemija; t-AML = terapijom posredovana akutna mijeloidna leukemija; CML = kronična mijeloidna leukemija; MDS = mijelodisplazija; Ph = Philadelphia; SZS = središnji živčani sustav; FAB = Francusko-Američko-Britanski sustav

Leukemije dječje dobi su heterogena skupina bolesti strogo povezana sa širokim spektrom čimbenika koji igraju ulogu u epidemiologiji, procjeni rizika i primjeni terapije (1). To su klonalne bolesti koje nastaju zbog genetske promjene u jednoj krvotvornoj stanici u koštanoj srži ili limfnom tkivu (2). Mehanizam nastanka klonalne promjene nije sasvim razjašnjen, ali se zna da je posljedica zajedničkog djelovanja genetskih i okolišnih čimbenika. Eukariotski kromosomi sadržavaju jednu kontinuiranu molekulu DNA, koja se replicira za vrijeme S-faze (u presintetičkoj fazi staničnog ciklusa). Takva molekula DNA je iznimno duga, kada se uspoređuje s metafaznim kromosomima, i zbog toga podložna kemijskim i fizičkim oštećenjima različitog podrijetla. Jedno od najopasnijih oštećenja genoma je lom dvostruke uzvojnice DNA, DSB (engl. double strand break) - DSB (3). Promjene broja ili strukture kromosoma nazivaju se kromosomske aberacije (engl. chromosomal aberration - CA). One su u čovjeka česta pojava a zapravo su mikroskopski vidljivi dijelovi patoloških DNA-promjena, akumulira-

nih različitim mehanizmima popravka loma dvolančane DNA (4). Jednom proizveden DSB u stanici, ako nije uspješno ponovno prespojen, može uzrokovati staničnu smrt, ostaviti genetsku mutaciju, kromosomska preuređenja, onkogeno transformaciju i uzrokovati druge fenotipske stanične abnormalnosti koji su važan mehanizmi leukemogeneze (5). Takva promijenjena stanica dijeli se, oblikujući patološki klon stanica, a dokaz klonalnosti se određuje citogenetskim nalazom iste ili istih promjena u tri metafaze (6). Promijenjena populacija stanica umnožava se i dominira, a krajnji rezultat su stanice koje sadrže specifične genetske promjene i fenotipski se očituju malignom bolešću. Danas, u kliničkoj medicini citogenetika je i dalje ključan dijagnostički test za procjenu rizika pri liječenju bolesnika (6).

Uzorkovanje i dostupne metode

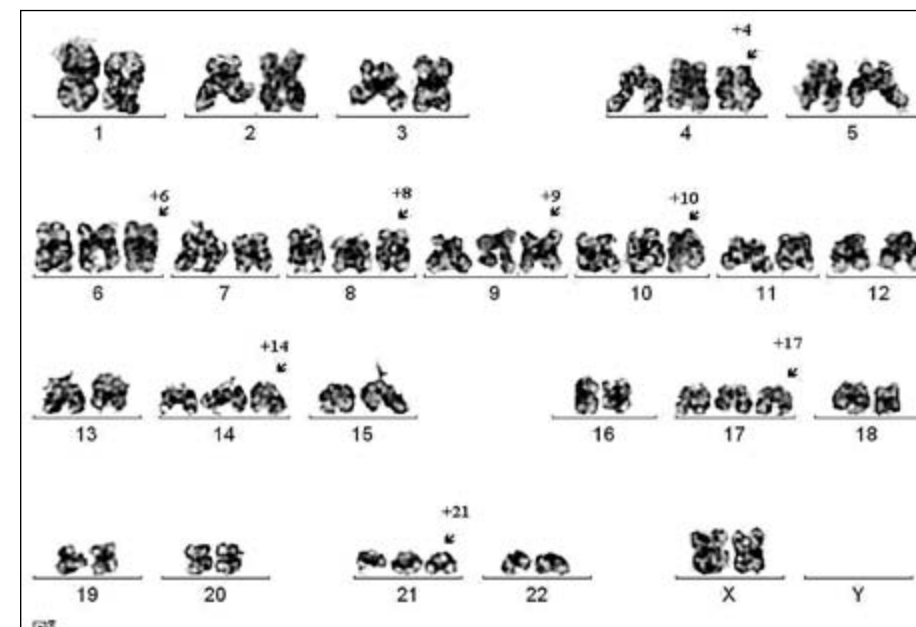
Prema pravilima Društva kliničkih genetičara pri uzimanju uzorka preferira se uzorak heparinizirane koštane srži, međutim ako je dokazana pojava blasta u perifernoj cirkulaciji i periferna krv

može biti dostatna. Upućivanje bolesnika na kariotipizaciju može biti pri dijagnozi, njegovom praćenju tijekom i nakon liječenja (uključujući i transplantacije), relapsu i transformaciji bolesti. Kvaliteta metafaza dobivenih iz uzorka nestimulirane krvi ili uzorka koštane srži je općenito slaba, posebno u leukemijama. U preparatu mogu biti prisutne normalne stanice koje imaju bolju morfologiju kromosoma, stoga je važno analizirati stanice različitih kvaliteta kako bi se povećala vjerojatnost otkrivanja klona. Za postavljanje dijagnoze normalnog kariotipa potrebno je najmanje 10 metafaza urednog kariograma, dok s manjim brojem metafaza ne možemo zaključiti kariotip. Kod svih patoloških nalaza, treba analizirati što je moguće veći broj stanica da bi se odredila klonalnost kromosomske aberacije. Pri analizi, tumačenju i izvještavanju nalaza vrlo je važna bliska suradnja između laboratorija i kliničara (7).

U somatskoj stanici može se proučavati slika patološke promjene povezane s kromosomskom topologijom, nuklearnom strukturom i genskom mapom. To se može postići različitim tehnikama standardne citogenetike kao i tehnikama molekularne genetike kao što su: fluorescentna in situ hibridizacija (engl. fluorescence in situ hybridisation - FISH), spektralna kariotipizacija s 24 različite fluorescentne boje (engl. spectral karyotyping - SKY), komparativna genomna hibridizacija (engl. comparative genomic hybridization - CGH) i polimerazna lančana reakcija (engl. polymerase chain reaction - PCR) (8).

Citogenetska analiza leukemijskih stanica omogućava dobar uvid u cijeli genom, pokazuje heterogenosti stanične populacije, razlikuje mnoge kromosomske i genetske aberacije u različitim tipovima hematoloških malignih bolesti, uključujući i akutne limfoblastične leukemije (ALL) i akutne mijeloidne leukemije (AML). Prisutnost ili odsutnost kromosomskih aberacija je značajan prognostički faktor za oba tipa ALL i AML (1).

Međutim, oko 30% citogenetskih nalaza kod ALL dječje dobi nema kliničkog značaja (9). U takvim slučajevima koristi se metoda molekularne genetike,



Slika 1. Visoka hiperdiploidija. Ženski kariotip dobiven G-pruganjem: 54,XX+4,+6,+8,+9,+10,+14,+17,+21.

array CGH, koja omogućava pregled cijelog genoma i ne ovisi o kulturi tkiva. Ova metoda otkriva dodatne kromosomske aberacije ili pogrešno interpretirane nalaze identificirane standardnom citogenetikom u oko 35% neinformativnih slučajeva. Naravno ona ima svoja ograničenja, ne prepoznaje balansirane translokacije, ne otkiva maligni klon u uzorku ukoliko je prisutan u manje od 25% stanične populacije, ne daje podatke o klonskoj evoluciji tj. sekundarnim promjenama koje su proizašle iz primarnog klona (10).

Tipovi kromosomskih aberacija

U osnovi postoje 2 tipa kromosomskih aberacija: promjene broja i promjene strukture kromosoma (11).

Promjene broja kromosoma

Promjene broja kromosoma najprije se određuju standardnom citogenetikom, a kasnije se potvrđuju FISH metodom. Promjene broja kromosoma mogu biti promjena haploidne kromosomske garniture koja zahvaća sve kromosome u setu (3n, 4n, 5n itd.) a naziva se poliploidija i promjena broja kromosoma unutar homolognog para kromosoma koja zahvaća pojedine kromosome u setu a naziva se aneuploidija (11).

Visoka hiperdiploidija

Bolesnici s visokom hiperdiploidijom imaju više od 50 kromosoma tj. imaju stanične klonove od 51-68 kromosoma, nalazimo ih u 25% to 30% slučajeva B-stanične ALL (B-ALL), dok se rijetko nalaze u T-staničnoj ALL (T-ALL) (12). Ovi bolesnici obično imaju dobar prognostički ishod, iako nešto lošiju prognozu ima podskupina povezana s klonovima od 51-55 kromosoma u komparaciji s podskupinom koja ima od 56-67 kromosoma (13). Hiperdiploidni klonovi rijetko su identični, kromosomi koji se učestalije pojavljuju u dodatnoj kopiji u većini slučajeva su 4, 6, 10, 14, 17, 18 i 21 (Slika 1). Poznato je da je dobitak kromosoma 4 i 10 kao i 6 i 17 povezan s povoljnom prognozom dok je dobitak kromosoma 5 i izokromosoma 17 (Slika 2a) povezan s lošijim prognostičkim ishodom. Molekularnom dijagnostikom, specifičnim panelom proba s najučestalijim kromosomskim setom, mogla bi se detektirati hiperdiploidija i na interfaznim stanicama (14). U ovakvih bolesnika uporabom prikladnih panela proba trebamo isključiti specifične translokacije kao što su t(9;22), t(1;19), t(12;21) i t(4;11). Ako se nađe neka od ovih translokacija leukemiju treba klasificirati s obzirom na translokaciju, a nalaz hiperdiploidije se smatra kao sekundarna citogenetska

¹Klinika za pedijatriju
Klinički bolnički centar Split
²Katedra za medicinsku biologiju
Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

Adresa za dopisivanje:
Prim. mr. sc. Bernarda Lozić
Klinika za pedijatriju
Klinički bolnički centar Split
21000 Split, Spinčićeva 1
E-mail: blozic@kbsplit.hr

Tablica 1.
Sažetak numeričkih kromosomskih aberacija u leukemijama dječje dobi

| Aberacija | Broj kromosoma | Prognoza | Tip bolesti | Metode detekcije |
|---------------------------------------|----------------|------------|-------------|---------------------------------|
| Visoka citogenetika hiperdiploidija | 51-67 | Povoljna | ALL, AML | Standardna CGH, FISH |
| Niska citogenetika hiperdiploidija | 47-50 | Nepovoljna | ALL | Standardna FISH |
| Citogenetika hipodiploidija | <46 | Nepovoljna | ALL | Standardna FISH |
| Bliska haploidija citogenetika | 23-29 | Nepovoljna | ALL | Protočna citometrija Standardna |
| monosomija 7 citogenetika delecija 7q | 45-46 | Nepovoljna | AML | Standardna aCGH, FISH |

Skraćenice: aCGH = array komparativna genomska hibridizacija; AML = akutna mijeloidna leukemija; ALL = akutna limfoblastična leukemija; CGH = komparativna genomska hibridizacija; FISH = fluorescentna in situ hibridizacija.

Prerađeno prema: Braoudaki M et al. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2012;12:230-7.

promjena (15). Međutim oko 50% visoko hiperdiploidnih slučajeva ALL pored numeričkog dobitka pojedinih kromosoma mogu imati dodatne strukturne aberacije kromosoma (16). Ovi bolesnici obično imaju nekoliko čimbenika povezanih s povoljnom prognozom, a to uključuje dob između 2 i 10 godina, broj leukocita $<10 \times 10^9/L$, L1 tip morfoloije i rani pre-B fenotip (16).

Što se tiče AML, većina hiperdiploidnih slučajeva imaju samo jedan ili dva dodatna kromosoma, najčešće je to trisomija 8 (Slika 2b) koja je pronađena u 5% do 10% bolesnika s AML, češće u bolesnika s Downovim sindromom i AML (17). Niska hiperdiploidija od 47-50 kromosoma je obično povezana sa starijom dobi bolesnika i kraćom periodom preživljavanja (18).

Hipodiploidija

Kariotipovi s manje od 46 kromosoma se klasificiraju kao hipodiploidni, nalaze se u oko 7% ALL dječje dobi i uglavnom imaju lošiju prognozu. Velika većina bolesnika ima 45 kromosoma i nešto povoljniji ishod u usporedbi s bolesnicima s manje od 45 kromosoma, kojih je manje od 1% ALL (19).

Bliska haploidija, definirana je kariotipom koji sadrži od 23-29 kromosoma, povezana je s vrlo rijetkom podskupinom B stanične ALL s prevalencijom od 0,7% do 2,4%, a povezuje se s kratkim trajanjem kompletne remisije i lošom prognozom (14).

Monosomija 7 i delecija 7q32-q35

Javlja se kao klonska promjena u kariotipu mijeloidnih leukemija, a ukazuje na prisustvo tumor supresorskog gena smještenog na dugom kraku 7. kromosoma koji regulira rast i diferencijaciju mijeloidnih stanica, a njegovim gubitkom stanice prelazi u leukemijsku transformaciju. Monosomija 7 ili delecija 7q32-q35 pojavljuje se u oko 5% do 7% slučajeva, prevladava uglavnom u bolesnika s AML, prema klasifikaciji Francusko-Američko-Britanskog sustava (FAB) subtipovima M4 i M6 i ima loš prognostički značaj. Delecija, del(7q) kao jedina promjena nalazi se u dvije podskupine AML, onoj nastaloj iz prethodne mijelodisplazije (MDS) i u osoba s konstitucijskim sindromima koji imaju predispoziciju za nastanak AML (20).

Promjene strukture kromosoma

Strukturne promjene kromosoma uključuju aberacije kao što su translokacije, delecije, insercije i inverzije, a pojavljuju se u oko 75% slučajeva ALL dječje dobi. One mogu biti balansirane ili nebalansirane. Standardna citogenetika u kliničkoj praksi je zlatni standard za rutinsku identifikaciju već dobro poznatih kromosomskih aberacija, npr. t(9;22)(q34;q11.2) dobro poznata Philadelphia (Ph) translokacija u kroničnoj mijeloidnoj leukemiji (engl. chronic myelogenous leukemia -CML), i ALL (11).

FISH je odgovoran za otkriće submikroskopske translokacije t(12;21)(p13;q22) koja je dovela do fuzije gena

TEL-AML1 ili ETV6-RUNX1, (eng. ets variant 6 - ETV6; engl. runt-related transcription factor1-RUNX1), i pronađena je kod oko 22% ALL dječje dobi. FISH se, uz druge molekularne pristupe, koristi za detekciju značajnih aberacija u ALL. Primjena multikolor FISH tehnike je važna za otkrivanje brojnih novih kromosomskih aberacija i razjašnjena kompleksnog kariotipa (11).

AML1/ETO

Translokacija t(8;21)(q22;q22), je jedan od najučestalijih strukturnih aberacija u AML kod djece, a rezultat je fuzije AML1 (RUNX1) gena sa 21q22 i ciklin srodnog D gena ETO (engl. cyclin D-related-ETO) na 8q22 (Slika 2c). Pronađena je u 7-16% AML, i najčešće je povezana s AML-M2 koja se razlikuje se od ostalih M2 leukemija po morfološkim, imunofenotipskim kao i kliničkim karakteristikama (starija dobna skupina, muški spol, visoki postotak remisije i preživljavanja). Gubitak spolnog kromosoma kao najučestalija sekundarna citogenetska promjena nema kliničkog značaja (21). Međutim oko 50% djece s ovom translokacijom ima recidiv, a on se povezuje s mutacijom onkogeno KIT (mapiran na 4q11), rjeđe s mutacijom gena FLT3 (engl. related tyrosine kinase 3-FLT3) koja je rijetka u ovoj skupini (21).

CBFB/MYH11

Inverzija (16)(p13;q22) i t(16;16)(p13;q22) su najučestalije promjene povezane s akutnom mijelomonocitnom leukemijom (AML-M4) praćenom ab-

Tablica 2.
Sažetak strukturnih aberacija kromosoma u leukemijama dječje dobi

| Aberacija | Fuzija gena | Prognoza | Tip bolesti | Metoda detekcije |
|---------------------|---------------|--|---------------------|-------------------------|
| t(8;21)(q22;q22) | AML1/ETO | Povoljna | AML | FISH, RT-PCR |
| Inv(16)(p13;q22) | CBFB/MYH11 | Povoljna | AML | FISH, RT-PCR, RQ-PCR |
| t(9;22)(q34;q11) | BCR/ABL1 | Nepovoljna | CML, AML, MDS, ALL | FISH, RT-PCR, RQ-PCR |
| t(15;17)(q22;q21) | PML/RARA | Povoljna | AML M3 | FISH, RT-PCR |
| 11q23 | MLL | Nepovoljan u ALL, u AML ovisno o subgrupi | ALL, AML | FISH, RT-PCR |
| t(4;11)(q21;q23) | MLL/AF4 | Nepovoljna | ALL | FISH, RT-PCR |
| t(11;19)(q23;p13.3) | MLL/ENL | Nepovoljna u AML | ALL, AML, M4 ili M5 | FISH, RT-PCR |
| t(6;11)(q27;q23) | MLL/AF6 | Nepovoljna u AML | ALL, AML, M4 ili M5 | FISH, RT-PCR |
| t(9;11)(p22;q23) | MLL/AF9 | Povoljna u AML (ali bez sekundarnih promjena ili M5) | ALL, AML | FISH, RT-PCR |
| t(10;11)(p12;q23) | MLL/AF10 | Nepovoljna u AML | ALL, AML, M4 ili M5 | FISH, RT-PCR |
| t(12;21)(p13;q22) | TEL/AML1 | Povoljna | B-ALL | FISH, RQ-PCR |
| t(1;19)(q23;p13) | TCF3/PBX1 | Poboljšana s terapijom | B-ALL | FISH, RT-PCR |
| Del(6q) | Nepoznat | Srednja | ALL | RT-PCR |
| 9p | MTS2/P15INK4B | Nepovoljna | T-ALL, pre-B-ALL | FISH, aCGH |
| 9q | Nepoznat | Nepovoljna | AML | FISH |
| t(1;22)(p13;q13) | OTT/MAL | Nepovoljna | AML M7 | Standardna citogenetika |

Skraćenice: aCGH = array komparativna genomska hibridizacija; ALL = akutna limfoblastična leukemija; AML = akutna mijeloidna leukemija; B-ALL = B-stanična limfocitna leukemija; FISH = fluorescentna in situ hibridizacija; RQ-PCR = polimerazna lančana reakcija u stvarnom vremenu; RT-PCR = polimerazna lančana reakcija reverznom transkriptazom; T-ALL = T-stanične limfocitna leukemija.

Prerađeno prema: Braoudaki M et al. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2012;12:230-7.

normalnom eozinofilijom, a pronađene su i u M0, M1, M2 i M5 (22). Ovo preuređenje gena rezultat je fuzije gena vežuće β podjedinice (engl. core binding factor- CBF β) sa pozicije 16q22 i gena za teški lanac miozina glatkog mišića (eng. smooth muscle myosin-MYH11) na poziciji 16p13. Učestalost se kreće od 3-8% u većini populacija, dok se u populaciji djece Kineskog podrijetla javlja s većom učestalošću od 11,6%.

Bolesnici imaju bolju prognozu od bolesnika s normalnim kariotipom. Ova promjena teško se otkriva klasičnom citogenetikom stoga je potrebna FISH i dijagnostika polimeraznom lančanom reakcijom u stvarnom vremenu RT-PCR (engl. real time polymerase chain reaction) (23).

BCR/ABL1

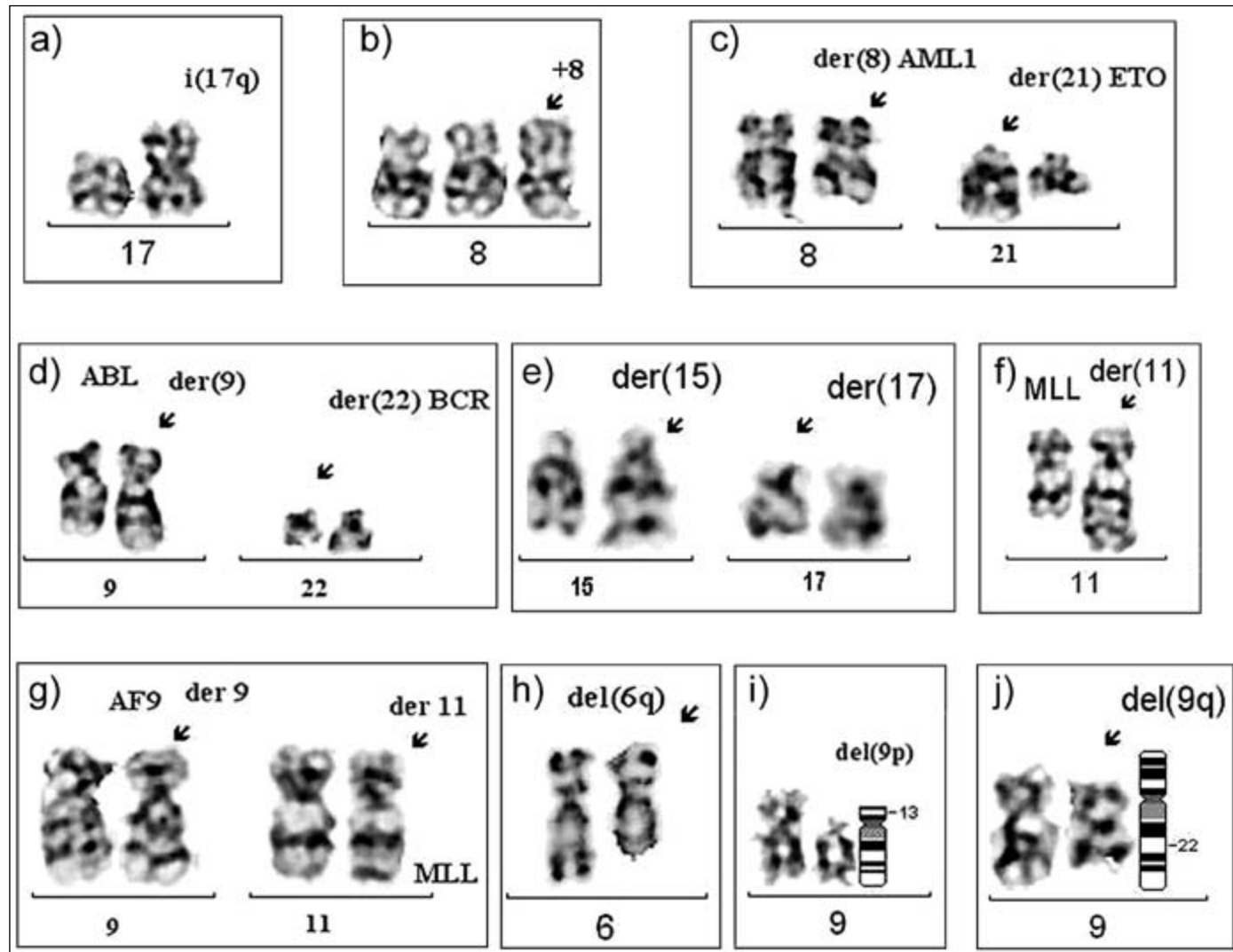
Značajna aberacija u ALL dječje dobi je recipročna translokacija između kromosoma 9 i 22, t(9;22)(q34;q11), koja rezultira u formaciji Ph kromosoma (Slika 2d). Ova translokacija prebacuje stanični onkogen ABL (engl. Abelson murine leukemia) s 9. kromosoma na regiju 22. kromosoma poznatu kao regija BCR (engl. breakpoint cluster) što rezultira fuziranim transkriptom obaju gena. Ovaj fuzirani (kimerni) gen izražava fuzijski protein čiji se amino- kraj sastoji od proteina BCR, a karbonski-kraj od proteina ABL i on ima sposobnost zloćudno preobraziti stanicu (24). Tipično je povezan s kroničnom mijeloidnom leukemijom CML, manje s ALL u odrasloj skupini bolesnika, a nađe se u manje od 5% ALL dječje dobi. Zbog dvije različite točke loma regija BCR "minor" (m-bcr) i "major" (M-bcr), fuzijski gen kodira

manji protein od 190 kDa (p190 kDa) ili veći protein od 210 kDa (p210 kDa). U pedijatrijskoj skupini bolesnika s ALL, Ph pozitivnoj u više od 90% slučajeva nastaje mali fuzijski transkript (p190) (24).

Uglavnom se nalazi u pre-B staničnom fenotipu. Bolesnici su stariji od 10 godina, imaju povećan broj leukocita, i najčešće imaju zahvaćen središnji živčani sustav (SZS) (18). Prisustvo Ph kromosoma u ALL dječje dobi je loš prognostički faktor, povećan je rizik od recidiva bolesti, a alogena transplantacija koštane srži smatra se terapijskim izborom (18).

PML/RARA

Translokacija t(15;17) je tipična za akutne promijelocitne leukemije (AML-M3), fuzija gena alfa receptora retinoične kiseline, RARA (engl. retinoic acid



Slika 2. Parcijalni kariotipovi dobiveni G-pruganjem: a) izokromosom (17) b) trisomija (8); c) translokacija (8, 21); d) translokacija (9, 22); e) translokacija (15-17); f) MLL preuređenje s nepoznatim partner kromosomom; g) translokacija (9, 11); h) delecija 6q; i) delecija 9p; j) delecija 9q.

receptor, alpha-RARA) s kromosoma 17q11-12 na gen promijelocitne leukemije, PML (engl. promyelocytic leukemia -PML) na kromosomu 15q22 rezultira fuzijskim transkriptom koji uzrokuje zastoj sazrijevanju u promijelocitnom stadiju (Slika 2e) (25). Ovaj tip translokacije detektira se FISH i RT-PCR tehnikom, ima incidenciju u 2-10% slučajeva AML dječje dobi, uglavnom starije dobne skupine, povezan je s povoljnom prognozom. Također su opisane i varijante ove translokacije (21, 25).

MLL

Translokacije koje pogađaju regiju 11q23 kromosoma, rezultiraju u preraspodjeli gena MLL (engl. myeloid/lymp-

hoid or mixed-lineage leukemia-MLL). Gen se zove MLL jer je promijenjen u oba tipa leukemijskih stanica (limfoidne i mijeloidne), što sugerira podrijetlo iz matičnih stanica hematopoeze. Stoga se ova promjena nalazi kod ALL kao i AML, a najučestalija je u leukemijama najmlađe dobne skupine tj. leukemijama dojenčadi i to s učestalošću od 40-50%. Točnije u ALL preuređenja gena MLL su češća kod djece ispod 6 mjeseci starosti (oko 90% pri dijagnozi), u usporedbi s 30% do 50% kod dojenčadi u dobi od 6 do 12 mjeseci. Dodatne karakteristike koje obično ima ova skupina djece su povišeni broj leukocita, pre-B imunofenotip (CD19+, CD10-), i infiltracija SŽS (14).

U AML, učestalost MLL preuređenja također se smanjuje se s dobi, prevladava u dobi ispod 12 mjeseci 43-50%, potom se smanjuje na 39% u dobi od 13-24 mjeseca, a u starijoj dobi, iznad 24 mjeseca, njegova učestalost je svega 8-9% (18).

Preuređenja MLL izuzev t(9;11), povezana su sa lošom prognozom, ali nedavne studije podupiru intermedijalnu prognozu u M4 i M5. MLL preuređenje našlo se u različitim translokacijama s poznatim fuzijskim genom (više od 50 različitih gena), a tip gena partnera ne utječe na prognozu (Slika 2f) (26). Najučestalije translokacije su t(9;11)(p21;q23) (Slika 2g), t(10;11)(p13;q23), i t(11;19)(q23;p13). Osim toga MLL preuređenja

su često primijećena u terapijski posredovanoj AML (t-AML) nakon provedene terapije sa inhibitorima topizomeraze II. Prisustvo MLL preuređenja ne utječe na dobar prognostički status koji je proizišao iz povoljnih citogenetskih aberacija kao što su t(8;21), inv(16) ili t(15;17) (26).

MLL preuređenja gena blokiraju diferencijaciju stanica i povezuju se mutacijom gena FLT3. Gen FLT3 je smješten na kromosomu 13q12 i kodira tip membranskog receptora tirozin kinaze 3 koji regulira normalnu hematopoezu. FLT3 mutacija je najpoznatija mutacija jednog gena u AML, a njegova aktivacija je od velikog interesa zbog razvoja novih terapija, inhibitora FLT3 koji bi bili efikasniji kod onih leukemija u kojima je on aktivan. Mutacije u FLT3 u AML dječje dobi događa se u 5-15% dok je u ALL njena učestalost nešto manja 1-8% i nađena je u podgrupi s visokom hiperplodijom i kod MLL preuređenja (27).

TEL/AML1 ili ETV6/RUNX1

Translokacija, t(12;21)(p13;q22) uključuje gen TEL poznat još pod nazivom ETV6 smješten na 12p13 i gen AML1 poznat još kao gen RUNX1 smješten na 21q22. TEL i AML1 translokacije se javljaju u izrazito velikom broju različitih aberacija u hematoloških malignih bolesti, a najčešća je u ALL dječje dobi s prevalencijom od 20 do 25%. Osim s AML1, TEL se često fuzira s genima koji kodiraju tirozin kinazu, osim toga TEL/AML1 nije pronađen u bolesnika s hiperdiploidijom.

Kod AML najčešće nalazimo fuziju gena AML1 i ETO. Bolesnici s ovom translokacijom su obično u dobi između 1 i 10, imaju B-stanični fenotip, ali nemaju nepovoljne prognostičke biljege, uključujući visoki broj leukocita, zahvaćenost CNS, ili hepatosplenomegaliju. Prognostički ishod bolesnika s TEL/AML1 smatra se povoljnim, 90% djece je bez recidiva, iako postoje izvješća koja sugeriraju da se može dogoditi kasni recidiv (24). FISH je brza i osjetljiva metoda za otkrivanje translokacija, t(12;21), a koristi se u trenutku dijagnoze i tijekom praćenja minimalne ostatne bolesti kod bolesnika (24).

TCF3/PBX1

Gen za transkripcijski faktor 3 TCF3 (engl. transcription factor 3-TCF3) je smješten unutar kromosomskog banda 19p13 i 3 na točkama loma t(1;19)(q23;p13) translokacije. Ova translokacija karakteristična je za prekursorske B-stanične linije kod bolesnika s ALL i može biti u cijelosti balansirana: -1, -19, +der(1), +der(19) ili nebalansirana: -19, +der(19) (14).

Translokacija 1;19 rezultira u fuziji gena TCF3 na lokusu 19p13 s genom PBX1 (engl. pre-B-cell leukemia homeobox1-PBX) na lokusu 1q23. Nastaje TCF3/PBX1 kimerički fuzijski gen koji ima funkciju transkripcijskog faktora, utječe na ekspresiju evolucijski očuvanog razvojnog gena PBX1 koji aktivira druge skupine gena i njihovim međudjelovanjem utječu na stvaranje malignih stanica hematopoeze (28).

Iako ovu kromosomsku aberaciju obično prate negativni parametri prognoze (broj leukocita i zahvaćenost SŽS), ipak je povezana s dobrom prognozom zbog primjene modernih intenzivnih protokola. Medijan 5 godišnjeg preživljavanja za ALL dječje dobi je 85%. Broj leukocita i dob nemaju prognostički značaj, a također balansirana i nebalansirana translokacija ne utječu na prognozu (29, 30).

HOX11L2/TLX3

Submikroskopska translokacija t(5;14)(q35;q32) učestalo se nađe u T-staničnoj ALL u djece (oko 20% svih T-staničnih leukemija), dokazuje se multicolor FISH metodom i njeno prisustvo ima loš prognostički značaj. Posljedica ove translokacije ne nastaje zbog fuzije gena već zbog ektopične ekspresije gena HOX11L2, (engl. T-cell leukemia homeobox 3-TLX3) koji je normalno smješten na 5q35, a obilježava se još kao TLX3. Premještanjem na lokus 14q32 izgubi svoju funkciju, odnosno izgubi regulaciju transkripcijske aktivnosti zbog promijenjene kontrole ekspresije regulirane genom CTPI2 koji je smješten na 14q32 (31, 32).

AF4-MLL

Ovaj fuzijski gen nastaje recipročnom translokacijom između 4q21 i 11q23 kromosoma, a geni uključeni u fuzijski transkript su AF4 (engl. FMR2 family, member1-AF4) i MLL. Nalazi se kao citogenetska promjena u B-ALL (L1 ili L2), bifenotipskoj akutnoj leukemiji, terapijski posredovanoj akutnoj leukemiji visokog rizika, a rijetko u T-staničnoj leukemiji. Klinička slika obično uključuje organomegaliju, zahvaćenost SŽS-a, visoki broj leukocita, anemiju i trombotopeniju. Zbog izrazito lošeg prognostičkog značaja posebno dojenčadi transplatacija koštane srži je indicirana kao terapija izbora (33).

Delecija 6q

Strukturna aberacija (delecija) dugog kraka 6. kromosoma (6q) je pronađena u 11% ALL dječje dobi (Slika 2h). Velika većina delecija obuhvaća regiju od 6q15 do 6q21. Ova citogenetska promjena ukazuje na prisustvo recesivnog tumor supresorskog gena na 6q čiji nedostatak doprinosi malignoj transformaciji i razvoju u T-ALL i B-ALL, kao i nedostatku specifičnosti za pojedini imunofenotip. Prognostički ima sličan ishod kao i leukemija s normalnim kariotipom (34).

9p i 9q aberacije

Citogenetska aberacija kratkog kraka 9. kromosoma (9p) je uočena u oko 10% ALL leukemija dječje dobi. Većina 9p aberacija rezultat je delecije ovog kraka na kojem se nalaze geni regulatori staničnog ciklusa, poglavito gen za ciklin ovisnu kinazu inhibitora 2A INK4 (engl. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A-INK4) (Slika 2i). Različite vrste 9p aberacija mogu imati različite molekularne posljedice, kada nastane delecija 9p, nedostaju brojni geni za koje se vjeruje da imaju funkciju tumor supresora. Spomenuti geni mogu se inaktivirati i gubitkom heterozigotnosti, a nerijetko i mutacijom kao i metilacijskom inaktivacijom (35).

Delecija dugog kraka 9. kromosoma, del(9q) dovodi do gubitak varijabilne regije između 9q21-22 na kojem se najvjerovatnije nalaze jedan ili više nepozna-

tih tumor supresorskih gena (Slika 2j). Nalazimo je kao jedinu, primarnu aberaciju u AML, ali učestalo se javlja kao sekundarna promjena udružena s t(8;21) u slučajevima AML. Prognoza primarne promjene del(9q) ovisi o podgrupi AML, a ako je udružena s t(8;21) nema prognostički značaj (36).

OTT/MAL

Translokacija t(1;22)(p13;q13) rezultira fuzijom gena RNA vežućeg kraja proteina 15, OTT (engl. RNA binding motif protein 15-OTT) i gena za protein T-stanične diferencijacije, MAL (engl. T-cell differentiation protein -MAL). Isključivo se pojavljuje kod mlađe djece (96% kod mlađih od 24 mjeseca), većinom kod djevojčica, ima loš prognostički značaj i povezana je uglavnom s akutnom megakarblastičnom leukemijom (AML M7). Jaka povezanost s mlađom životnom dobi i M7 ukazuje na prenatalne faktore rizika u leukomogenezi ovog tipa leukemije (37).

Sekundarne citogenetske aberacije

Nerijetko jedna grupa bolesnika s AML ima više od jedne citogenetske promjene u kariotipu maligne populacije stanica. Dodatne citogenetske abnormalnosti kromosoma nazivaju se sekundarne aberacije, one često prate primarnu promjenu i utječu na varijabilnost prognoze. One uključuju deleciju dugog kraka 7. kromosoma, del(7q), monosomiju 7(-), trisomiju 8 (+8) (Slika 2b), derivirani 16. kromosom der(16)t(1;16)(q12-23;q12-24), i trisomiju 21 (+21), koje su pronađene u oba tipa ALL i AML (1).

Zaključak

Ove genetske aberacije imaju bazičnu ulogu u dijagnozi, prognozi i praćenju minimalne ostatne bolesti ALL i AML dječje dobi. S obzirom da molekularna procjena rizika također igra važnu ulogu u terapijskoj strategiji akutnih leukemija dječje dobi, neophodno je unaprijediti i standardizirati molekularne metode za pouzdaniju interpretaciju genske promjene. Dok su citogenetski i molekularni nalazi danas sastavni dio terapijskih

protokola, u budućnosti će doprinijeti razvoju nove manje toksične ciljane genske terapije.

Autori izjavljuju da nisu bili u sukobu interesa. Authors declare no conflict of interest.

LITERATURA

- Braoudaki M, Tzortzatu-Stathopoulou F. Clinical cytogenetics in pediatric acute leukemia: an update. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2012; 12: 230-7.
- Dewald GW, Morris MA, Lilla VC. Chromosome studies in neoplastic hematologic disorders. In: McClatchez KD, editor. Clinical Laboratory Medicine. Baltimore : Williams and Wilkins; 1994; 703-40.
- Gollin SM. Mechanisms leading to chromosomal instability. Semin Cancer Biol 2005; 15: 33-42.
- Obe G, Pfeiffer P, Savage JR et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. Mutat Res 2002; 504: 17-36.
- Ferguson DO, Alt FW. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. Oncogene 2001; 20: 5572-9.
- Mitelman F, Kaneko Y, Berger R. Report of the Committee on Chromosome Changes in neoplasia. U: Cuticchia JA, Pearson PL, ur. Human Gene Mapping. Baltimore : Johns University Press; 1994; 773-812.
- Association for Clinical Cytogenetics. General Best Practice Guidelines. Birmingham: British society for human genetics; 2007; 15-6.
- Mühlmann M. Molecular cytogenetics in metaphase and interphase cells for cancer and genetic research, diagnosis and prognosis. Application in tissue sections and cell suspensions. Genet Mol Res 2002; 1: 117-27.
- Strefford JC, Worley H, Barber K et al. Genome complexity in acute lymphocytic leukemia is revealed by array-based comparative genomic hybridization. Oncogene 2007; 26: 4306-18.
- Rabin KR, Man TK, Yu A et al. Clinical utility of array comparative genomic hybridization for detection of chromosomal abnormalities in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Blood Cancer 2008; 51: 171-7.
- Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 2009; 144: 147-56.
- Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer 2009; 48: 637-60.
- Harrison CJ. The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Blood Rev 2001; 15: 49-59.
- Harrison CJ, Foroni L. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. Rev Clin Exp Hematol 2002; 6: 91-113.
- Gibbons B. High hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. June 1999. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/hyperploidID1085.html>
- Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer 2009; 48: 637-60.
- Martinez-Climent JA, Garcia-Conde J. Chromosomal rearrangements in childhood acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. J Pediatr Hematol Oncol 1999; 21: 91-102.
- Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. Blood Rev 2004; 18: 115-36.
- Pui CH, Carroll AJ, Raimondi SC et al. Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid less than 45 line. Blood 1990; 75: 1170-7.
- Desangles F. -7/del(7q) in childhood. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. June 1999. URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/del7qChildID1152.html>
- Manola KN. Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. Eur J Haematol 2009; 83: 391-405.
- Chang M, Raimondi SC, Ravinranath Y et al. Prognostic factors in children and adolescents with acute myeloid leukaemia (excluding children with Down syndrome and acute promyelocytic leukaemia): univariate and recursive partitioning analysis of patients treated on Pediatric Oncology Group (POG) Study 8821. Leukemia 2000; 14: 1201-7.
- Chan NPH, Wong WS, Ng MHL et al. Childhood acute myeloid leukaemia with CBFb-MYH11 rearrangement: study of incidence, morphology, cytogenetics, and clinical outcomes of Chinese in Hong Kong. Am J Hematology 2004; 76: 300-3.
- Lazic J, Tosic N, Dokmanovic L et al. Clinical features of the most common fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Med Oncol 2010; 27: 449-53.
- Martinez-Climent JA. Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. Leukemia 1997; 11: 1999-2021.
- Bhojwani D, Howard SC, Pui CH. High-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. Clin Lymphoma Myeloma 2009; 9 (3): 222-30.
- Chang P, Kang M, Xiao A et al. FLT3 mutation incidence and timing of origin in a population case series of pediatric leukemia. BMC Cancer 2010; 10: 513.

- Burmeister T, Gökbuget N, Schwartz S et al. Clinical features and prognostic implications of TCF3-PBX1 and ETV6-RUNX1 in adult acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2010; 95: 241-6.
- Huret JL. t(1;19)(q23;p13) TCF3/PBX1. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. October 1997. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0119.html>
- Alonso CN. t(1;19)(q23;p13) TCF3/PBX1. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. July 2012. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0119.html>
- Huret JL. t(5;14)(q35;q32). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. February 2002. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0514q35q32ID1227.html>

- Berger R. t(5;14)(q35;q32). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. June 2002. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0514q35q32ID1227.html>
- Huret JL. t(4;11)(q21;q23). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. December 1997. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0411.html>
- Brigaudeau C and Bilhou-Nabera C. del(6q) abnormalities in lymphoid malignancies. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. December 1998. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/del6qID1148.html>

- Heerema NA. 9p Rearrangements in ALL. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. August 1999. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/9prearrALLID1156.html>
- Viguié F. del(9q) solely. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol February 1998. Available at: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/del9q.html>. Accessed: May 1, 2012.
- Lion T, Haas OA. Acute megakaryocytic leukemia with the t(1;22)(p13; q13). Leuk Lymphoma 1993; 11: 15-20.

Summary

CLINICAL SIGNIFICANCE OF CYTOGENETICS IN CHILDHOOD

B. Lozić, T. Zemunik

Cytogenetic and molecular analyzes are essential for classification of childhood leukemias. Genetic abnormalities are often associated with certain clinical and biological characteristics of the disease. In acute lymphoblastic leukemia genetic alterations together with cell morphology, cytochemistry, immunophenotyping and clinical features, define different subgroups of the disease. In acute myeloid leukemia, unique cytogenetic aberrations are associated with certain morphological subgroups. Cytogenetic analysis not only provides important information about the diagnosis, prognosis and monitoring of patients but a karyotype provides screening of the whole genome. Rearrangements that occur in the malignant clone presents source for further analyses. In most cases, molecular analyzes determine chromosomal break points and clone gene loci in order to delineate the function of proteins involved in leukomogenesis. Based on the knowledge of protein function new therapeutic approaches with targeted and less toxic therapy are developed. Furthermore, cytogenetic and molecular findings are incorporated in clinical protocols, and in some cases of rare leukemia subtypes they point out individual therapeutic approach.

Descriptors: LEUKEMIA IN CHILDHOOD, CHROMOSOMAL ABERRATIONS, CYTOGENETICS, MOLECULAR DIAGNOSTICS

Primljeno/Received: 5. 3. 2013.
Prihvaćeno/Accepted: 29. 3. 2013.