

## ΕΙΔΙΚΟ ΑΡΘΡΟ SPECIAL ARTICLE

# Ο ρόλος των μοριακών τεχνικών στην τεκμηρίωση της διάγνωσης και στην προγνωστική κατηγοριοποίηση των αιματολογικών κακοηθειών

Στις ταξινομήσεις των αιματολογικών κακοηθειών από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) (2001 και 2008), εκτός από τα ευρήματα της κυτταρομορφολογίας και της ανοσοφαινοτυπικής μελέτης, σημαντικό ρόλο απέκτησαν και τα ευρήματα της Κυτταρογενετικής και των τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας. Βάσει της ταξινόμησης του WHO του 2008, θα επιχειρηθεί η καταγραφή των αιματολογικών κακοηθειών στις οποίες οι τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας έχουν εφαρμογή όχι μόνο στην τεκμηρίωση της διάγνωσης τους, αλλά και στην προγνωστική κατηγοριοποίησή τους. Σε ό,τι αφορά στην τεκμηρίωση της διάγνωσης, οι μοριακές τεχνικές έχουν εφαρμογή στις περιπτώσεις της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (ΟΜΛ), της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ΟΛΛ), της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (ΧΜΛ), των κλασικών μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων (ΜΥΝ), της συστηματικής μαστοκυττάρωσης και της χρόνιας ηωσινοφιλικής λευχαιμίας. Αναφορικά με την προγνωστική κατηγοριοποίηση, οι μοριακές τεχνικές έχουν εφαρμογή στις περιπτώσεις της ΟΜΛ, της ΟΛΛ και της Β-χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (Β-ΧΛΛ).

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις σχεδόν καθολικά αποδεκτές ταξινομήσεις των αιματολογικών κακοηθειών από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) (2001 και 2008), εκτός από τα ευρήματα της κυτταρομορφολογίας και της ανοσοφαινοτυπικής μελέτης, σημαντικό ρόλο απέκτησαν και τα ευρήματα της Κυτταρογενετικής και των τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας.<sup>1,2</sup> Στην παρούσα ανασκόπηση, η οποία θα βασιστεί στην ταξινόμηση του WHO του 2008, θα επιχειρηθεί η καταγραφή των αιματολογικών κακοηθειών στις οποίες οι τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας έχουν εφαρμογή όχι μόνο στην τεκμηρίωση της διάγνωσης τους, αλλά και στην προγνωστική κατηγοριοποίησή τους.

## 2. ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η ταξινόμηση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (ΟΜΛ) κατά WHO (2008) κατηγοριοποιεί τις ΟΜΛ ως εξής: (α) ΟΜΛ με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες (πίν. 1), (β) ΟΜΛ με δυσπλασία τουλάχιστον δύο σειρών, (γ) δευτεροπαθείς (μετά από θεραπεία για άλλη νεοπλασία

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2014, 31(5):624-630  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2014, 31(5):624-630

### Ι. Κάκκας

Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας,  
Γενικό Νοσοκομείο «Ο Ευαγγελισμός»,  
Αθήνα

Diagnosis documentation and  
prognostic classification of myeloid  
and lymphoid neoplasms by  
molecular techniques

Abstract at the end of the article

### Λέξεις ευρετηρίου

Αιματολογικές κακοήθειες  
Διάγνωση  
Μοριακές τεχνικές  
Πρόγνωση

Υποβλήθηκε 5.4.2014  
Εγκρίθηκε 20.5.2014

ΟΜΛ, (δ) ΟΜΛ μη ταξινομούμενες στις προαναφερθείσες υποκατηγορίες, (ε) μυελικό σάρκωμα, (στ) ΟΜΛ σχετιζόμενες με το σύνδρομο Down και (ζ) δενδριτικές ΟΜΛ.<sup>1</sup> Μέχρι σήμερα, τα ευρήματα της κυτταρογενετικής μελέτης κατά τη διάγνωση παρέχουν τις σημαντικότερες πληροφορίες για την πρόγνωση των ασθενών με ΟΜΛ και χρησιμοποιούνται για την κατηγοριοποίησή τους σε τρεις διακρι-

**Πίνακας 1.** ΟΜΛ με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες.

t(8;21) ΟΜΛ
inv(16) ΟΜΛ
t(15;17) ΟΜΛ
t(9;11) ΟΜΛ
t(6;9) ΟΜΛ
inv(3)-t(3;3) ΟΜΛ
t(1;22) ΟΜΛ
ΟΜΛ με γονιδιακές μεταλλάξεις
ΟΜΛ με μεταλλάξεις του γονιδίου <i>NPM1</i>
ΟΜΛ με μεταλλάξεις του γονιδίου <i>CEBPA</i>
ΟΜΛ: Οξεία μυελογενής λευχαιμία

τές προγνωστικές ομάδες (καλής, ενδιάμεσης και κακής πρόγνωσης).<sup>3-7</sup> Οι ασθενείς της ομάδας καλής (favorable) πρόγνωσης (25% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων ΟΜΛ) περιέχονται στην ομάδα των ΟΜΛ με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες και χαρακτηρίζονται από την παρουσία χιμαιρικών γονιδίων (*PML/RARα*, *AML1/ETO*, *CBFB/MYH11*), τα οποία προκύπτουν, αντίστοιχα, από τις ακόλουθες χρωμοσωμιακές αντιμεταθέσεις: t(15;17), t(8;21), inv(16).<sup>3-7</sup> Η πλειοψηφία των ασθενών με ΟΜΛ (55–60% περίπου) ανήκει στην ενδιάμεσης (intermediate) πρόγνωσης ομάδα και οι περισσότεροι από αυτούς (το 45% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων ΟΜΛ) εμφανίζουν φυσιολογικό καρυότυπο κατά τη διάγνωση της νόσου.<sup>5-7</sup> Από τα προαναφερθέντα καθίσταται σαφές ότι, τουλάχιστον για τους ασθενείς με ΟΜΛ καλής πρόγνωσης, εκτός από την κλασική κυτταρογενετική, υπάρχει και η δυνατότητα ταυτοποίησής τους μέσω της ανάδειξης της παρουσίας των χιμαιρικών γονιδίων *PML/RARα*, *AML1/ETO* και *CBFB/MYH11*, με τη βοήθεια των τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας. Η πλέον ευαίσθητη τεχνική ανίχνευσης των παραγομένων μεταγράφων από τα προαναφερθέντα χιμαιρικά γονίδια είναι η reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Η συγκεκριμένη στρατηγική χρησιμοποιείται κατά τη διάγνωση της ΟΜΛ στις ακόλουθες περιπτώσεις: (α) Όταν η αναρρόφηση ικανοποιητικής ποσότητας μυελού των οστών είναι αδύνατη (συνήθως λόγω υψηλού φορτίου νόσου) και υπάρχουν ενδείξεις (κλινικές, μορφολογικές, ανοσοφαινοτυπικές) ενδεχόμενης παρουσίας t(15;17) ΟΜΛ, t(8;21) ΟΜΛ ή inv(16) ΟΜΛ, (β) όταν οι καλλιέργειες του μυελού των οστών αποτυγχάνουν συνολικά ή εν μέρει να οδηγήσουν στην παραγωγή ικανοποιητικού αριθμού αξιολογήσιμων μεταφάσεων, ενώ υπάρχουν ενδείξεις (κλινικές, μορφολογικές, ανοσοφαινοτυπικές) ενδεχόμενης παρουσίας t(15;17) ΟΜΛ, t(8;21) ΟΜΛ ή inv(16) ΟΜΛ και (γ) όταν ο καρυότυπος είναι φυσιολογικός, ενώ υπάρχουν ενδείξεις (κλινικές, μορφολογικές, ανοσοφαινοτυπικές) ενδεχόμενης παρουσίας t(15;17) ΟΜΛ, t(8;21) ΟΜΛ ή inv(16) ΟΜΛ. Από αναδρομικές μελέτες προκύπτει το συμπέρασμα ότι η κλασική κυτταρογενετική αποτυγχάνει να αναδείξει την παρουσία της t(15;17) στο 5–10% των περιπτώσεων, της t(8;21) σε ποσοστό 8–10% των περιπτώσεων και της inv(16) στο 4–5% των περιπτώσεων.<sup>8</sup>

Η διαπίστωση της ύπαρξης γονιδιακών μεταλλάξεων αλλά και αυξημένης έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων κατέδειξε ακόμη περισσότερο την ετερογένεια των περιπτώσεων της ΟΜΛ, ακόμη και μέσα στις κυτταρογενετικά καθορισμένες προγνωστικές ομάδες, ιδιαίτερα δε στη μεγαλύτερη από αυτές (ενδιάμεσης πρόγνωσης) στην οποία περιλαμβάνονται οι ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο (cytogenetically normal-acute myeloid leukemia,

CN-AML). Ειδικότερα, κατά την τελευταία δεκαετία έχει διαπιστωθεί η παρουσία μεταλλάξεων σε αρκετά γονίδια (*FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *MLL*, *N-RAS*, *RUNX1*, *WT-1*, *IDH* κ.ά.). Οι μεταλλάξεις των προαναφερθέντων γονιδίων κατά κύριο λόγο ανιχνεύονται σε ασθενείς με CN-AML.<sup>3-7</sup> Οι μεταλλάξεις των *FLT3*, *NPM1* και *CEBPA* χρησιμοποιούνται ήδη για την προγνωστική κατηγοριοποίηση των ασθενών με CN-AML.<sup>4-7</sup> Επιπρόσθετα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μεταλλάξεις των *NPM1* και *CEBPA* χρησιμοποιούνται και στη διαγνωστική κατηγοριοποίηση της ΟΜΛ κατά WHO (2008).<sup>1</sup>

## 2.1. *FLT3-ITD*

Το γονίδιο *FLT3* (χρωμόσωμα 13q12) κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη-υποδοχέα των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Ο ενδογενής αναδιπλασιασμός τμήματος του γονιδίου (*FLT3* internal tandem duplication, *FLT3/ITD*) που εντοπίζεται στα exon 14–15 οδηγεί στην επιμήκυνση των παραγομένων μεταγράφων κατά 3–400 βάσεις (συνήθως 30–150). Η συχνότητα ανεύρεσης του *FLT3-ITD* στη CN-AML είναι περίπου 35% και στο σύνολο των ΟΜΛ 25–30%. Όλες οι μελέτες συμφωνούν για την αρνητική προγνωστική αξία του *FLT3-ITD* στη CN-AML. Η ανίχνευση του *FLT3-ITD* μπορεί να γίνει με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης μετά από κλασική PCR ή με capillary electrophoresis and fragment analysis μετά από κλασική ή RT-PCR με χρήση φθοριζόντων εκκινητών. Με τη συγκεκριμένη τεχνική υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης μικρού μεγέθους αναδιπλασιασμών (<20 βάσεις).<sup>9,10</sup>

## 2.2. Μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1*

Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις εντοπίζονται στο exon 12 του γονιδίου *NPM1* (χρωμόσωμα 5q35) και οδηγούν στην επιμήκυνσή του κατά τέσσερις βάσεις. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1* ανιχνεύονται στο 50% περίπου των ενηλίκων ασθενών με CN-AML και στο 35% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων ΟΜΛ. Κατά συνέπεια, είναι οι συχνότερα ανιχνευόμενες μεταλλάξεις στην ΟΜΛ. Όλες πλέον οι μελέτες συμφωνούν για τη θετική προγνωστική αξία της παρουσίας των *NPM1* μεταλλάξεων με σύγχρονη απουσία του *FLT3/ITD* σε ασθενείς με CN-AML. Έχουν περιγραφεί περισσότερες από 30 παραλλαγές μεταλλάξεων, με υπεροχή τριών (A, B και D), οι οποίες καλύπτουν τουλάχιστον το 90% των περιπτώσεων. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις ανιχνεύονται είτε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing) μετά από κλασική PCR, είτε με capillary electrophoresis and fragment analysis μετά από κλασική ή RT-PCR με χρήση φθοριζόντων εκκινητών.<sup>11-14</sup>

### 2.3. Μεταλλάξεις του γονιδίου *CEBPA*

Το γονίδιο *CEBPA* (χρωμόσωμα 19q13) κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη με δραστηριότητα μεταγραφικού παράγοντα, η οποία έχει σημαντική συμβολή στη διαφοροποίηση της μυελικής σειράς. Οι μεταλλάξεις στο ένα και μοναδικό εχον του προαναφερθέντος γονιδίου οδηγούν σε διαταραχή της λειτουργικότητας του *CEBPA* μεταγραφικού παράγοντα, με τελική συνέπεια την αναστολή διαφοροποίησης της μυελικής σειράς. Οι μεταλλάξεις συνήθως (>90% των περιπτώσεων) συνίστανται σε προσθήκες ή απαλείψεις μικρού αριθμού βάσεων και σχεδόν στα 2/3 των περιπτώσεων αφορούν και στα δύο αλληλία (biallelic). Η συχνότητα ανεύρεσης των *CEBPA* μεταλλάξεων στους ενήλικες ασθενείς με CN-AML είναι περίπου 15% (10% περίπου για το σύνολο των περιπτώσεων OML). Όλες σχεδόν οι μελέτες συμφωνούν για τη θετική προγνωστική αξία των μεταλλάξεων του γονιδίου *CEBPA* στους ασθενείς με CN-AML, ιδιαίτερα αυτών που αφορούν και στα δύο αλληλία (biallelic). Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις ανιχνεύονται με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων μετά από κλασική PCR.<sup>15-17</sup>

### 2.4. Core binding factor

#### οξείες μυελογενείς λευχαιμίες

Οι core binding factor (CBF) OML, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία της t(8;21) ή της inv(16), αποτελούν το 15% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων OML. Παρά το γεγονός ότι η πρόγνωση των CBF OML χαρακτηρίζεται ευνοϊκή, τουλάχιστον το 30% αυτών των ασθενών υποτροπιάζουν μετά την αρχική ανταπόκριση της νόσου. Πρόσφατα, αρκετές μελέτες που αφορούν σε ασθενείς με CBF OML έχουν αναδείξει την παρουσία μεταλλάξεων σε ορισμένα γονίδια (*c-KIT*, *N-RAS*, *FLT3*) στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *c-KIT* (χρωμόσωμα 4q11), το οποίο κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη-υποδοχέα, εντοπίζονται είτε στο εχον 8 (απαλείψεις/προσθήκες βάσεων) είτε στο εχον 17 (σημειακές μεταλλάξεις) και απαντώνται στο 20–30% των περιπτώσεων CBF OML. Στις περιπτώσεις των ασθενών με t(8;21) OML, η παρουσία μεταλλάξεων του *c-KIT* (εντοπιζόμενες κυρίως στο εχον 8) έχει συσχετιστεί με αρνητική πρόγνωση. Τα αποτελέσματα των μελετών αναφορικά με την προγνωστική αξία των *c-KIT* μεταλλάξεων (εντοπιζόμενων κυρίως στο εχον 17) στους ασθενείς με inv(16) OML είναι αντικρουόμενα. Στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν τεκμηριώνεται η αρνητική προγνωστική τους αξία για τη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών. Διάφορες τεχνικές χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μεταλλάξεων του *c-KIT*, με σημαντικότερες την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων και τη melting curve analysis.<sup>18-20</sup>

### 3. ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Στις ταξινομήσεις του WHO, τόσο στην πρόσφατη όσο και στην παλαιότερη, η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) κατηγοριοποιείται βάσει της κυτταρικής σειράς προέλευσης των λεμφοβλαστών και των ευρημάτων της κυτταρογενετικής μελέτης. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η πρόσφατη ταξινόμηση WHO χαρακτηρίζει τις ΟΛΛ ως «πρόδρομα λεμφικά νεοπλάσματα», εξαιρώντας από αυτές την ΟΛΛ τύπου Burkitt, θεωρώντας την εν λόγω οντότητα ως λέμφωμα με λευχαιμική έκφραση. Ειδικότερα, οι ΟΛΛ κατηγοριοποιούνται ως εξής: (α) Β-ΟΛΛ με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, (β) Β-ΟΛΛ μη ταξινομούμενες κυτταρογενετικά και (γ) Τ-ΟΛΛ/λεμφοβλαστικά λεμφώματα.<sup>7</sup>

#### 3.1. Β-ΟΛΛ με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες

Οι ασθενείς της συγκεκριμένης ομάδας κατηγοριοποιούνται βάσει της κυτταρογενετικής μελέτης ως εξής: (α) t(9;22) Β-ΟΛΛ, (β) t(v;11) Β-ΟΛΛ, (γ) t(12;21) Β-ΟΛΛ, (δ) Β-ΟΛΛ με υπερδιπλοειδία, (ε) Β-ΟΛΛ με υποδιπλοειδία, (στ) t(5;14) Β-ΟΛΛ και (ζ) t(1;19) Β-ΟΛΛ. Στη Β-ΟΛΛ των ενηλίκων, οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες έχουν και προγνωστική σημασία, με τις αντιμεταθέσεις t(9;22)(q34;q11) και t(4;11)(q21;q23) να συνοδεύονται από πολύ κακή πρόγνωση. Οι προαναφερθείσες γενετικές βλάβες ανιχνεύονται με τον κλασικό καρυότυπο, αλλά σε περίπτωση μη διαγνωστικού αποτελέσματος η παρουσία των συγκεκριμένων αναδιατάξεων τεκμηριώνεται μέσω της ανίχνευσης με RT-PCR μεταγράφων των χιμαιρικών γονιδίων, τα οποία προκύπτουν από τις προαναφερθείσες αναδιατάξεις (BCR-ABL και AF4-MLL, αντίστοιχα). Στην παιδική Β-ΟΛΛ, η παρουσία της t(12;21) έχει θετική προγνωστική αξία. Η ανάδειξη της συγκεκριμένης κυτταρογενετικής βλάβης με κλασικό καρυότυπο είναι αρκετά δύσκολη και για το λόγο αυτόν η παρουσία της τεκμηριώνεται μέσω της ανίχνευσης με RT-PCR μεταγράφων του χιμαιρικού γονιδίου *TEL-AML1*, το οποίο προκύπτει από την προαναφερθείσα αναδιάταξη.<sup>21-26</sup>

### 4. ΧΡΟΝΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η διάγνωση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (ΧΜΛ) απαιτεί την ανάδειξη της αντιμετάθεσης t(9;22)(q34;q11) με καρυότυπο ή την ανίχνευση των χιμαιρικών μεταγράφων BCR/ABL με RT-PCR. Το πλεονέκτημα των μοριακών μεθόδων είναι ότι μπορούν να ανιχνεύσουν την παρουσία της προαναφερθείσας αντιμετάθεσης ακόμη και στην περίπτωση που αυτή δεν είναι εμφανής στον καρυότυπο (cryptic rearrangement). Θεραπευτικά, στη χρόνια φάση, η ΧΜΛ αντιμετωπίζεται με αναστολείς τυροσινικής κινάσης

(tyrosine kinase inhibitors, TKIs). Η αποτελεσματική θεραπεία της ΧΜΛ τα τελευταία έτη έχει επιβάλει την προσεκτική εκτίμηση της υπολειμματικής νόσου και την ανίχνευση των αιτιών που οδηγούν σε απώλεια της ανταπόκρισης στους TKIs. Σε περιπτώσεις μη ικανοποιητικής ανταπόκρισης ή αποτυχίας στη χορήγηση των TKIs γίνεται έλεγχος σημειακών μεταλλάξεων της τυροσινικής κινάσης, που αποτελεί έναν αρκετά συχνό λόγο μη επίτευξης των θεραπευτικών στόχων. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις ανιχνεύονται συνήθως με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων μετά από κλασική PCR. Η ανεύρεση συγκεκριμένων μεταλλάξεων σε περίπτωση αποτυχίας ή μη ικανοποιητικής ανταπόκρισης κατά τη διάρκεια θεραπείας με TKIs επιβάλλει την τροποποίηση της ακολουθούμενης θεραπευτικής στρατηγικής.<sup>27-29</sup>

## 5. ΚΛΑΣΙΚΑ ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ: ΑΛΗΘΗΣ ΠΟΛΥΚΥΤΤΑΡΑΙΜΙΑ, ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΘΡΟΜΒΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ, ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΜΥΕΛΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

Βάσει της ταξινόμησης WHO (2008), στα διαγνωστικά κριτήρια των μυελοΐπερπλαστικών νεοπλασμάτων (ΜΥΝ) (αληθής πολυκυτταραιμία [ΑΠ], ιδιοπαθής θρομβοκυτταρωση [ΙΘ], ιδιοπαθής μυελοσκληρύωση [ΙΜ]) περιλαμβάνεται η παρουσία μεταλλάξεων συγκεκριμένων γονιδίων, δηλαδή του *JAK2* (χρωμόσωμα 9) και του *MPL* (χρωμόσωμα 1).<sup>1,30</sup>

### 5.1. Μεταλλάξεις του *JAK2*

Η μετάλλαξη V617F, η οποία εντοπίζεται στο exon 14 του γονιδίου *JAK2*, ανιχνεύεται στο 95% περίπου των περιπτώσεων ΑΠ, στο 50–60% των περιπτώσεων ΙΘ και στο 20–50% των περιπτώσεων ΙΜ. Το 2007, σε ασθενείς με ΑΠ και απουσία της μετάλλαξης JAK2V617F, διαπιστώθηκε η παρουσία μεταλλάξεων στο exon 12 του γονιδίου *JAK2*. Η πιο συχνή ανάμεσα στις >10 μεταλλάξεις του exon 12 που έχουν περιγραφεί μέχρι πρόσφατα είναι η μετάλλαξη N542-E543del. Η συχνότητα των μεταλλάξεων αυτών στην ΑΠ εκτιμάται σε ποσοστό 3–5%. Η ανίχνευση των προαναφερθεισών μεταλλάξεων πραγματοποιείται είτε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων μετά από κλασική PCR, είτε με allele specific oligonucleotides (ASO)-PCR.<sup>30-33</sup>

### 5.2. Μεταλλάξεις του *MPL*

Οι συχνότερες από τις μεταλλάξεις του γονιδίου *MPL* που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα εντοπίζονται στο exon 10 και είναι σημειακές (W515L και W515K). Αθροιστικά, η συχνότητα των εν λόγω μεταλλάξεων είναι 5–15% στην ΙΜ και 1–5% στην ΙΘ. Η ανίχνευση των προαναφερθεισών μεταλλάξεων πραγματοποιείται είτε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων μετά από κλασική PCR, είτε με ASO-PCR.<sup>34</sup>

## 6. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΜΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ

Η ανίχνευση της μετάλλαξης D816V στο exon 17 του γονιδίου *c-KIT* (χρωμόσωμα 4) ενισχύει σημαντικά τη διάγνωση της συστηματικής μαστοκυττάρωσης (ΣΜ). Η συγκεκριμένη γενετική βλάβη ανιχνεύεται στο 95% περίπου των περιπτώσεων ΣΜ. Η ανίχνευση των προαναφερθεισών μεταλλάξεων πραγματοποιείται είτε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων μετά από κλασική PCR, είτε με ASO-PCR.<sup>35</sup>

## 7. ΜΥΕΛΙΚΑ ΚΑΙ ΛΕΜΦΙΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΜΕ ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *PDGFRA*, *PDGFRB* Ή *FGFR1*

### 7.1. Το χιμαιρικό γονίδιο *FIP1L1-PDGFRB*

Το χιμαιρικό γονίδιο *FIP1L1-PDGFRB* προκύπτει από αναδιάταξη εντός του χρωμοσώματος 4, στο οποίο εντοπίζονται και τα δύο προαναφερθέντα γονίδια. Η συγκεκριμένη γενετική βλάβη δεν ανιχνεύεται με την κλασική κυτταρογενετική μελέτη. Η ανίχνευσή της μπορεί να επιτευχθεί είτε με μοριακή κυτταρογενετική (FISH) είτε με RT-PCR. Η παρουσία της συγκεκριμένης γενετικής βλάβης ενισχύει σημαντικά τη διάγνωση της χρόνιας ηωσινοφιλικής λευχαιμίας.<sup>36,37</sup>

### 7.2. Το γονίδιο *PDGFRB*

Η συχνότερη γενετική βλάβη στην οποία συμμετέχει το γονίδιο *PDGFRB* (χρωμόσωμα 5) είναι η t(5;12), η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του *TEL-PDGFRB* χιμαιρικού γονιδίου και συσχετίζεται ισχυρά με τη χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία.<sup>7</sup> Η συγκεκριμένη γενετική βλάβη συνήθως αναδεικνύεται με την κλασική κυτταρογενετική μελέτη, ενώ σε περιπτώσεις μη διαγνωστικού καρυότυπου και επί ισχυρής κλινικής υποψίας η ανάδειξη της παρουσίας της επιτυγχάνεται είτε με RT-PCR είτε με FISH.<sup>8</sup>

### 7.3. Το γονίδιο *FGFR1*

Οι γενετικές βλάβες (αναδιατάξεις) στις οποίες συμμετέχει το γονίδιο *FGFR1* (χρωμόσωμα 8) είναι αρκετές, συνοδεύονται από ηωσινοφιλία και έχουν συσχετιστεί με ΜΥΝ, οξείες λευχαιμίες και λεμφοβλαστικά λεμφώματα. Οι συγκεκριμένες αναδιατάξεις συνήθως αναδεικνύονται με τον κυτταρογενετικό έλεγχο.<sup>8</sup>

## 8. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Από τα μέσα της δεκαετίας του 1990, μεγάλος αριθμός μελετών ανέδειξε ως αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για την εξέλιξη της νόσου, την ανταπόκριση στη θεραπεία

και τη συνολική επιβίωση ασθενών με Β-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Β-ΧΛΛ), την απουσία «υπερμεταλλάξεων» στη μεταβλητή περιοχή του γονιδίου της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης-υποδοχέα των «κλωνικών» Β-λεμφοκυττάρων (*IgVH* υπερμεταλλάξεις). Εκτιμάται ότι το 55% περίπου των ασθενών με Β-ΧΛΛ εμφανίζουν κατά τη διάγνωση της νόσου *IgVH* υπερμεταλλάξεις. Οι ασθενείς αυτοί διαγιγνώσκονται συνήθως σε αρχικά στάδια της νόσου και η επιβίωσή τους μπορεί να υπερβεί τα 20 έτη. Πλέον πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει με αρνητική πρόγνωση και την παρουσία της «οικογένειας» *IgVH3-21* γονιδίων της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης-υποδοχέα των «κλωνικών» Β-λεμφοκυττάρων, ανεξάρτητα από την παρουσία *IgVH* υπερμεταλλάξεων. Ο έλεγχος για την παρουσία ή την απουσία *IgVH* υπερμεταλλάξεων διεκπεραιώνεται με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων μετά από κλασική PCR και σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα δεδομένα «βιβλιοθηκών» αλληλουχιών του γονιδίου *IgVH*.<sup>38-44</sup>

## 9. ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ/ΛΕΜΦΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Σε ορισμένους ιστολογικούς τύπους λεμφωμάτων, η τεκμηρίωση της διάγνωσης βασίζεται στην ανάδειξη της παρουσίας συγκεκριμένων γενετικών βλαβών. Ειδικότερα: (α) Το οζώδες λέμφωμα συσχετίζεται με την παρουσία της t(14;18), η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του χιμαιρικού

γονιδίου *BCL2-IGH*, (β) το λέμφωμα από κύτταρα μανδύα (mantle cell lymphoma) συσχετίζεται με την παρουσία της t(11;14), η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του χιμαιρικού γονιδίου *BCL1-IGH*, (γ) το λέμφωμα Burkitt συσχετίζεται κυρίως με την παρουσία της t(8;14), η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του χιμαιρικού γονιδίου *CMYC-IGH* και (δ) το αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα συσχετίζεται με την παρουσία της t(2;5), η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του χιμαιρικού γονιδίου *NPM1-ALK*. Η ανάδειξη της παρουσίας των προαναφερθεισών γενετικών βλαβών επιτυγχάνεται είτε με RT-PCR είτε με FISH. Πάντως, στις συγκεκριμένες περιπτώσεις (με πιθανή εξαίρεση το αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα), η μοριακή κυτταρογενετική (FISH) προτιμάται έναντι της RT-PCR, εμφανίζοντας σαφώς μεγαλύτερη ευαισθησία.<sup>2,8</sup>

## 10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα προαναφερθέντα καθίσταται σαφές πως σ' ό,τι αφορά στην τεκμηρίωση της διάγνωσης, οι μοριακές τεχνικές έχουν εφαρμογή στις περιπτώσεις της ΟΜΛ, της ΟΛΛ, της ΧΜΛ, των κλασικών ΜΥΝ, της συστηματικής μαστοκυττάρωσης και της χρόνιας ηωσινοφιλικής λευχαιμίας. Σ' ό,τι αφορά στην προγνωστική κατηγοριοποίηση, οι μοριακές τεχνικές έχουν εφαρμογή στις περιπτώσεις της ΟΜΛ, της ΟΛΛ και της Β-ΧΛΛ.

## ABSTRACT

### Diagnosis documentation and prognostic classification of myeloid and lymphoid neoplasms by molecular techniques

I. KAKKAS

Department of Immunology and Histocompatibility, "Evangelismos" General Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2014, 31(5):624-630

The earlier (2001) and current (2008) WHO classification of "tumours of hematopoietic and lymphoid tissues" use all available information (cytomorphology, immunophenotype, genetic features, clinical features) to define these diseases. Certain genetic (cytogenetic or molecular) abnormalities are characteristic for specific diseases, and others constitute prognostic factors for several diseases; thus, for disease recognition, molecular abnormalities can be used for the prognostic classification of specific diseases. The current (2008) WHO classification documents the hematological malignancies in which molecular biological techniques have been applied for either diagnosis or prognostic classification. Regarding documentation of diagnosis, molecular biological techniques have been applied in the case of acute myeloid leukemia (AML), acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic myeloproliferative neoplasms (MPN), systemic mastocytosis and chronic eosinophilic leukemia. Regarding prognostic classification, molecular biological techniques have been applied in the case of AML, ALL and B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL).

**Key words:** Diagnosis, Documentation, Molecular techniques, Myeloid and lymphoid neoplasms, Prognostic classification

## Βιβλιογραφία

- SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H ET AL (eds). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. IARC Press, Lyon, 2008
- JEVREMOVIC D, VISWANATHA DS. Molecular diagnosis of haematopoietic and lymphoid neoplasms. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009, 23:903–933
- FRÖHLING S, SCHOLL C, GILLILAND DG, LEVINE RL. Genetics of myeloid malignancies: Pathogenesis and clinical implications. *J Clin Oncol* 2005, 23:6285–6295
- MRÓZEK J, MARCUCCI G, PASCHKA P, WHITMAN SP, BLOOMFIELD CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: Are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 2007, 109:431–448
- SCHLENK RF, DÖHNER K, KRAUTER J, FRÖHLING S, CORBACIOGLU A, BULLINGER L ET AL. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008, 358:1909–1918
- DÖHNER K, DÖHNER H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008, 93:976–982
- DÖHNER H, ESTEY EH, AMADORI S, APPELBAUM FR, BÜCHNER T, BURNETT AK ET AL. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010, 115:453–474
- KEARNEY L. Molecular cytogenetics. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001, 14:645–669
- THIEDE C, STEUDEL C, MOHR B, SCHAICH M, SCHÄKEL U, PLATZBECKER U ET AL. Analysis of *FLT3*-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: Association with *FAB* subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002, 99:4326–4335
- SCHNITTGER S, SCHOCH C, DUGAS M, KERN W, STAIB P, WUCHTER C ET AL. Analysis of *FLT3* length mutations in 1,003 patients with acute myeloid leukemia: Correlation to cytogenetics, *FAB* subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002, 100:59–66
- FALINI B, MECUCCI C, TIACCI E, ALCALAY M, ROSATI R, PASQUALUCCI L ET AL. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005, 352:254–266
- SCHNITTGER S, SCHOCH C, KERN W, MECUCCI C, TSCHULIK C, MARTELLI MF ET AL. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005, 106:3733–3739
- THIEDE C, KOCH S, CREUTZIG E, STEUDEL C, ILLMER T, SCHAICH M ET AL. Prevalence and prognostic impact of *NPM1* mutations in 1,485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006, 107:4011–4020
- GALE RE, GREEN C, ALLEN C, MEAD AJ, BURNETT AK, HILLS RK ET AL. The impact of *FLT3* internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with *NPM1* mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008, 111:2776–2784
- PREUDHOMME C, SAGOT C, BOISSEL N, CAYUELA JM, TIGAUD I, DE BOTTON S ET AL. Favorable prognostic significance of *CEBPA* mutations in patients with *de novo* acute myeloid leukemia: A study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 2002, 100:2717–2723
- FRÖHLING S, SCHLENCK RF, STOLZE I, BIHLMAYR J, BENNER A, KREITMEIER S ET AL. *CEBPA* mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 2004, 22:624–633
- WOUTERS BJ, LÖWENBERG B, ERPELINCK-VERSCHUEREN CA, VAN PUTTEN WL, VALK PJ, DELWEL R. Double *CEBPA* mutations, but not single *CEBPA* mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009, 113:3088–3091
- BOISSEL N, LEROY H, BRETHON B, PHILIPPE N, DE BOTTON S, AUVRINGNON A ET AL. Incidence and prognostic impact of *c-Kit*, *FLT3*, and *RAS* gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* 2006, 20:965–970
- CAIROLI R, BEGHINI A, GRILLO G, NADALI G, ELICE F, RIPAMONTI CB ET AL. Prognostic impact of *c-KIT* mutations in core binding factor leukemias: An Italian retrospective study. *Blood* 2006, 107:3463–3468
- PASCHKA P, MARCUCCI G, RUPPERT AS, MRÓZEK K, CHEN H, KITTLES RA ET AL. Adverse prognostic significance of *KIT* mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2006, 24:3904–3911
- LUDWIG WD, RIEDER H, BARTRAM CR, HEINZE B, SCHWARTZ S, GASSMANN W ET AL. Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: Results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. *Blood* 1998, 92:1898–1909
- LENORMAND B, BÉNÉ MC, LESEVE JF, BASTARD C, TILLY H, LEFRANC MP ET AL. PreB1 (CD10-) acute lymphoblastic leukemia: Immunophenotypic and genomic characteristics, clinical features and outcome in 38 adults and 26 children. The Groupe d'Étude Immunologique des Leucémies. *Leuk Lymphoma* 1998, 28:329–342
- PUI CH, RELLING MV, DOWNING JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004, 350:1535–1548
- RAIMONDI SC, SHURTLEFF SA, DOWNING JR, RUBNITZ J, MATHEW S, HANCOCK M ET AL. 12p abnormalities and the *TEL* gene (*ETV6*) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997, 90:4559–4566
- MANCINI M, SCAPPATICCI D, CIMINO G, NANNI M, DERME V, ELIA L ET AL. A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): Analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *Blood* 2005, 105:3434–3441
- YANADA M, TAKEUCHI J, SUGIURA I, AKIYAMA H, USUI N, YAGASAKI F ET AL. Karyotype at diagnosis is the major prognostic factor predicting relapse-free survival for patients with Phil-

- adelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib-combined chemotherapy. *Haematologica* 2008, 93:287–290
27. DRUKER BJ, TALPAZ M, RESTA DJ, PENG B, BUCHDUNGER E, FORD JM ET AL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the *BCR-ABL* tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001, 344:1031–1037
  28. BACCARANI M, CORTES J, PANE F, NIEDERWIESER D, SAGLIO G, AP-  
PERLEY J ET AL. Chronic myeloid leukemia: An update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009, 27:6041–6051
  29. SOVERINI S, HOCHHAUS A, NICOLINI FE, GRUBER F, LANGE T, SAGLIO G ET AL. *BCR-ABL* kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: Recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011, 118:1208–1215
  30. CAMPBELL PJ, GREEN AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006, 355:2452–2466
  31. VAINCHENKER W, CONSTANTINESCU SN. A unique activating mutation in *JAK2* (V617F) is at the origin of polycythemia vera and allows a new classification of myeloproliferative diseases. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:195–200
  32. BAXTER EJ, SCOTT LM, CAMPBELL PJ, EAST C, FOUROUCLAS N, SWANTON S ET AL. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005, 365:1054–1061
  33. SCOTT LM, TONG W, LEVINE RL, SCOTT MA, BEER PA, STRATTON MR ET AL. *JAK2* exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007, 356:459–468
  34. PARDANANI AD, LEVINE RL, LASHO T, PIKMAN Y, MESA RA, WADLEIGH M ET AL. *MPL515* mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1,182 patients. *Blood* 2006, 108:3472–3476
  35. HORNY HP. Mastocytosis: An unusual clonal disorder of bone marrow-derived hematopoietic progenitor cells. *Am J Clin Pathol* 2009, 132:438–447
  36. PARDANANI A, BROCKMAN SR, PATERNOSTER SF, FLYNN HC, KETTERLING RP, LASHO TL ET AL. *FIP1L1-PDGFRA* fusion: Prevalence and clinicopathologic correlates in 89 consecutive patients with moderate to severe eosinophilia. *Blood* 2004, 104:3038–3045
  37. JOVANOVIĆ JV, SCORE J, WAGHORN K, CILLONI D, GOTTARDI E, METZGEROTH G ET AL. Low-dose imatinib mesylate leads to rapid induction of major molecular responses and achievement of complete molecular remission in *FIP1L1-PDGFRA*-positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* 2007, 109:4635–4640
  38. HAMBLIN TJ, DAVIS Z, GARDINER A, OSCIER DG, STEVENSON FK. Unmutated *Ig V(H)* genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999, 94:1848–1854
  39. DAMLE RN, WASIL T, FAIS F, GHIOTTO F, VALETTO A, ALLEN SL ET AL. *Ig V* gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999, 94:1840–1847
  40. DÖHNER H, STILGENBAUER S, BENNER A, LEUPOLT E, KRÖBER A, BULLINGER L ET AL. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000, 343:1910–1916
  41. CHIORAZZI N, RAI KR, FERRARINI M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005, 352:804–815
  42. HALLEK M, CHESON BD, CATOVSKY D, CALIGARIS-CAPPIO F, DIGHI-  
RO G, DÖHNER H ET AL. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008, 111:5446–5456
  43. GHIA P, STAMATOPOULOS K, BELESSI C, MORENO K, STILGENBAUER S, STEVENSON F ET AL. ERIC recommendations on *IGHV* gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007, 21:1–3
  44. THORSÉLIUS M, KRÖBER A, MURRAY F, THUNBERG U, TOBIN G, BÜHLER A ET AL. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood* 2006, 107:2889–2894

*Corresponding author:*

I. Kakkas, Department of Immunology and Histocompatibility, “Evangelismos” General Hospital, Athens, Greece  
e-mail address: ioankakkas@hol.gr