

# Uporaba panelov FISH pri otroških akutnih levkemijah

FISH panels for pediatric acute leukemias

Helena Podgornik,<sup>1</sup> Janez Jazbec<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za hematologijo, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični oddelek za otroško hematologijo in onkologijo, Bohoričeva, 1000 Ljubljana

## Korespondenca/ Correspondence:

Helena Podgornik,  
Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za hematologijo, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana  
tel.: 01 522 4854  
helena.podgornik@kclj.si

## Ključne besede:

akutna levkemija, fluorescentna *in situ* hibridizacija, citogenetske spremembe

## Key words:

Acute leukemia, fluorescent *in situ* hybridization, cytogenetic aberrations

## Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2010;  
79: 667–83

Prispelo: 11. mar. 2010,  
Sprejeto: 24. maj 2010

## Izvilleček

**Izhodišča:** Citogenetska preiskava je zlati standard pri obravnavi bolnika z akutno levkemijo (AL). Njena uspešnost je najmanjša pri akutni limfoblastni levkemiji (ALL), ki je pri otrocih najpogostejša. Poleg objektivnih razlogov, ki otežujejo njeno izvedbo, z njo tudi ne zaznamo nekaterih ključnih kromosomskih sprememb pri B-ALL. Zaradi naštetega je uporaba fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) nujna za celovito citogenetsko obravnavo. Nabor DNA-sond, ki jih uporabljamo, je prepuščen strokovni odločitvi posameznega diagnostičnega centra.

**Metode:** Tarčne kromosomske spremembe smo določali s komercialno dostopnimi DNA-sondami.

**Rezultati:** Pri 85 % slovenskih otrok z AL uspešno opravimo standardno citogenetsko preiskavo. Pri polovici tudi najdemo kromosomske preureditve, z uporabo panelov FISH pa se delež otrok s kromosomskimi spremembami dvigne na 70 %. Še večja je razlika pri B-ALL, kjer je standardna citogenetska preiskava manj uspešna. Z izbranimi DNA-sondami določimo poleg tarčnih tudi nekatere dodatne ponavljajoče se preureditve, ki so pomembne diagnostično, napovedno ali kot označevalec za sledenje med zdravljenjem in po njem. Pojavnost preureditev je v splošnem primerljiva s podatki iz literature, opazili pa smo posamezna odstopanja.

**Zaključki:** Pokazali smo, da je algoritem za sestavo panelov FISH zlasti pri B-ALL učinkovit in prepričani smo, da so s predstavljenim pristopom slovenski otroci z AL celovito citogenetsko obravnavani.

## Abstract

**Background:** Conventional cytogenetics is the gold standard in the diagnostic work up of acute leukemia patients. Due to a low mitotic index, lack of sample, and poor chromosome morphology, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is widely used as a complementary method to conventional cytogenetics. Additionally, some cryptic chromosomal rearrangements, which are crucial for stratification of patients, can be detected only by FISH. Different FISH panels are proposed to obtain comprehensive cytogenetic information.

**Methods:** Recurrent chromosomal abnormalities were detected using commercially available FISH DNA probes.

**Results:** In 85 % of pediatric AL patients conventional cytogenetics was successfully completed, revealing chromosomal rearrangements in half of them. We introduce an algorithm for inclusion of FISH DNA probes into panel, which is based on cytomorphology and immunophenotype of leukemic blasts. Using these panels, a particular cytogenetic marker was determined in 70 % of tested samples. The difference is even more prominent in B-ALL where conventional cytogenetics is less efficient. The frequency of a particular recurrent aberration is comparable with literature data in general, although some discrepancies were observed. Besides the detection of targeted rearrangements, FISH panels frequently show additional chromosomal changes with defined diagnostic and prognostic significance.

**Conclusions:** The proposed algorithm for inclusion of DNA-probes into FISH panels is particularly efficient in children with B-ALL. In addition, presented results confirm this approach as an appropriate in different leukemias.

## Uvod

Pri natančni opredelitvi akutne levkemije (AL) se opiramo na klasifikacijo Svetovne zdravstvene organizacije (SZO).<sup>1</sup> Ta ne razlikuje podtipov akutnih levkemij glede na starost bolnika. Vendar pa se potek in izid bolezni bistveno razlikujeta prav po tem merilu. Glede na citogenetski profil sta namreč celo akutni limfoblastni levkemiji (ALL) otrok in adolescentov dve različni biološki entiteti.<sup>2</sup> Zato je tudi pristop k citogenetski preiskavi otrok in odraslih z akutno levkemijo nekoliko različen.

Citogenetika kot zlati standard v diagnostični obravnavi bolnika z akutno levkemijo je že v začetku osemdesetih let prejšnjega stoletja prepoznala translokacijo t(9;22), siceršnji označevalec kronične mieloične levkemije, kot ponavljajočo se tudi pri ALL.<sup>3</sup> V zadnji izdaji klasifikacije SZO smo sedem let za akutno mieloično levkemijo (AML) dočakali tudi delitev ALL na 7 podskupin glede na prisotne kromosomske spremembe.<sup>1</sup>

Ko gre za nizek mitotski indeks, slabo morfologijo kromosomov in kompleksen ali normalen kariotip (tudi nezaznavne kromosomske spremembe), pride do izraza učinkovitost fluorescenčne »in situ« hibridizacije (FISH).<sup>4</sup> Prav nizek mitotski indeks in slaba morfologija kromosomov pa sta poleg pomanjkanja materiala izrazita za ALL in še posebej za otroške ALL.<sup>5</sup> Obenem pa so označevalci, določeni s preiskavo FISH, zaradi večje občutljivosti in lažje izvedljivosti uporabni pri sledenju bolezni med zdravljenjem in po njem.

Uporaba panelov FISH je že zelo uveljavljena pri diagnostiki AML, diseminiranega plazmocitoma, kronične limfatične levkemije in mielodisplastičnega sindroma,<sup>3</sup> pri ALL pa splošno uveljavljenih panelov ni. Statistični podatki obenem potrjujejo, da so klonske spremembe prisotne pri 70 % bolnikov z ALL, po nekaterih raziskavah pa kar pri 90 % otrok.<sup>6</sup> Najpogostejša kromosomska sprememba, določena pri otroških (in praktično izključno otroških) ALL (približno 22 %) je kriptična translokacija t(12;21)(p13;q22), ki vodi v tvorbo fuzijskega gena ETV6-RUNX1.<sup>2</sup> Spremembo so v začetku devetdesetih let razkrili s preiskavo FISH,

njeno prisotnost pa danes preverjamo pri vseh otrocih z ALL.

V naši preiskavi smo želeli ovrednotiti algoritme, ki jih uporabljamo pri sestavi panelov DNA-sond za preiskavo FISH, ter določiti pojavnost posameznih citogenetskih sprememb.

## Metode

Preiskovanci: Citogenetsko preiskavo smo izvedli pri 60 otrocih z AL med marcem 2006 in januarjem 2010. Vključili smo le bolnike, pri katerih smo diagnozo potrdili s citomorfološko preiskavo in pretočno citometrijo. Pri vseh bolnikih smo izvedli preiskavo FISH z naborom sond po uveljavljenem algoritmu (Slika 1), prav tako pa tudi standardno citogenetsko preiskavo, katere uspešnost je navedena v Tabeli 1. Starost bolnikov je bila od 5 mesecev do 18 let. Glede na imunofenotip smo preiskali 45 bolnikov z ALL, od tega 40 bolnikov z B-ALL in 12 bolnikov z AML. Pri treh bolnikih je šlo za neopredeljene AL (Tabela 1).

Kratkotrajno gojene celice kostnega mozga (92 %) ali venske krvi (8 %) smo osamili po ustaljenih protokolih za standardno citogenetsko preiskavo.

Preiskavo FISH smo opravili s komercialno dostopnimi DNA-sondami (Abbot in Kreotech). Panel FISH sestavimo na osnovi algoritma, ki temelji na izsledkih citomorfološke in pretočne citometrije (Slika 1). Preparate sta pregledala dva analitika, ki sta preštela najmanj 200 celic. Rezultat je povprečje dveh štetij.

## Rezultati

Pri vseh 60 preiskovancih smo uspešno izvedli preiskavo FISH. Pri treh bolnikih (vsi z B-ALL) je bilo materiala premalo, da bi lahko nadaljevali s standardno citogenetsko preiskavo, pri šestih (5 B-ALL, ena T-ALL) pa je nismo mogli izvesti zaradi premajhnega mitotskega indeksa oziroma slabe morfologije kromosomov. Celokupna uspešnost standardne citogenetske preiskave je 85 %, pri ALL je nekoliko manjša, medtem ko smo jo uspešno izvedli pri vseh bolnikih z AML (Tabela 1).

**Tabela 1:** Rezultati citogenetskih preiskav pri slovenskih otrocih z AL.

	Število bolnikov (%)				
	B-ALL	T-ALL	AML	Druge <sup>c</sup>	All
Akutna levkemija					
Vsi	40 (67)	5 (8)	12 (20)	3 (5)	60
Kariotip	32 (80)	4 (80)	12 (100)	3 (100)	51 (85)
Normalen	16 <sup>a</sup> (40)	3 (60)	1 (8)	1(33)	21 (35)
Preurejen kariotip	16 (40)	1 (20)	11 (92)	2 (67)	30 (50)
Kompleksne preureditve <sup>b</sup>	3 (8)	0	1	0	4 (7)
Ponavljajoče se preureditve	11 (28)	1	10 (83)	2 (67)	24 (40)
Ugodne	6		4	1	11
Vmesne	2	1	3		6
Neugodne	3		3	1	7
Neponavljajoče se preureditve	2		1		3
Preurejen kariotip skupaj s FISH	27 (68)	3 (60)	11 (92)	2 (67)	42 (70)

<sup>a</sup> 2 bolnika s prirojenimi preureditvami

<sup>b</sup> brez hiperdiploidnih kariotipov

<sup>c</sup> bifnotipska ali nejasne linije

Pri polovici otrok z levkemijo s standardno citogenetsko preiskavo ugotovimo preurejen kariotip (Tabela 1), ki je bistveno pogostejši pri AML (92 %), medtem ko pri T-ALL redko najdemo kromosomske preureditve. Pri otrocih redko najdemo tudi kompleksno preurejen kariotip. Glede na različne podvrste levkemij pa so velike razlike v deležu otrok s ponavljajočimi se preureditvami. Medtem ko smo jih našli skoraj pri vseh bolnikih z AML, so pri ALL redkejši. Delež bolnikov z ugotovljenimi ponavljajočimi se preureditvami se z uporabo panelov FISH izrazito poveča pri ALL. Tako celokupno opredelimo spremembe pri 70 % otrok z levkemijo. Pri otrocih z AML določimo spremembe pri več kot 90 % otrok, delež je tudi tu najmanjši pri T-ALL.

Tabela 2 prikazuje pogostost ponavljajočih se sprememb, ki jih določamo s FISH paneli, sestavljenimi po prikazanem algoritmu (Slika 1). Med ponavljajočimi se kromosomskimi spremembami, ki jih neposredno določamo z DNA-sondami, je pri bolnikih z B-ALL najpogostejša posamezna sprememba translokacija t(12;21). Z uporabo sonde za to preureditev smo ugotovili povečano število signalov za gen RUNX1 na kromosomu 21 pri 12 otrocih, od tega enkrat v obliki klastrov, kar ustreza amplifikaciji RUNX1. Drugi del sonde ustreza genu ETV6 na kro-

mosomu 12, ki je bil pri slovenskih otrocih preurejen štirikrat. Preureditev gena MLL smo potrdili sedemkrat. S standardno citogenetsko preiskavo smo pri petih bolnikih uspeli tudi določiti, za katero od preureditev tega gena gre.

Translokacijo t(9;22), ki je pri otrocih redka, smo našli le enkrat, smo pa z uporabo iste DNA-sonde opazili še dve preureditvi gena ABL1 na kromosomu 9.

Pri enem otroku smo potrdili za ALL-L3 (Burkittovo levkemijo) značilno translokacijo t(8;14).

Pri otrocih z AML je najpogostejša translokacija t(8;21), kar se je potrdilo tudi pri nas, saj smo jo našli kar trikrat. V preteklih štirih letih smo z določitvijo translokacije t(15;17) potrdili eno promielocitno levkemijo (APL), medtem ko inverzije inv(16), ki je ena od treh napovedno ugodnih preureditev pri AML, pri slovenskih otrocih še nismo našli.

## Razpravljanje

Ko se odločamo za uporabo nabora DNA-sond pri preiskavi FISH, se osredotočamo zlasti na tiste ponavljajoče se spremembe, ki so ključne za klinične odločitve. Obenem pa moramo ohraniti ceno preiskave v razumnih mejah. Gre namreč za dra-

**Tabela 2:** Število bolnikov s ponavljajočimi se kromosomskimi preureditvami, določenimi z uporabo panelov FISH.

DNA-sonda <sup>a</sup>	Preureditev	Tip levkemije	FISH	Standardna citogenetika
<i>RUNX1/ETV6</i> <sup>c</sup>	t(12;21)	B-ALL	5	0
	<i>RUNX1+</i>	B-ALL, AML (1)	11	7
	amp( <i>RUNX1</i> )	s-AML	1	/
	<i>ETV6+</i>	B-ALL	1	/
	<i>ETV6-</i>	B-ALL, T-ALL	3	1
	Skupaj /All		21	8
<i>MLL</i>	Neopredeljena preureditev <i>MLL</i>		2	/
	t(11;19) <sup>b</sup>	B-ALL	1	1
	t(6;11)	AML	1	1
	t(9;11)	AML	2	2
	ins(10;11)	Druge	1	1
	Skupaj		7	5
<i>BCR/ABL1</i>	t(9;22)	B-ALL	1	/
	9q34 (ABL1x3)	B-ALL	2	1
	Skupaj		3	1
<i>IGH/MYH</i>	t(8;14)	B-ALL	1	1
<i>RUNX1/RUNX1T1</i>	t(8;21)	AML	3	3
<i>PML/RARA</i>	t(15;17)	AML	1	1
<i>TCRα/δ</i>	TCRα/δ	T-ALL	3	/

<sup>a</sup> vse navedene sonde so proizvajalca Abbott

<sup>b</sup> variantna translokacija t(7;11;19)

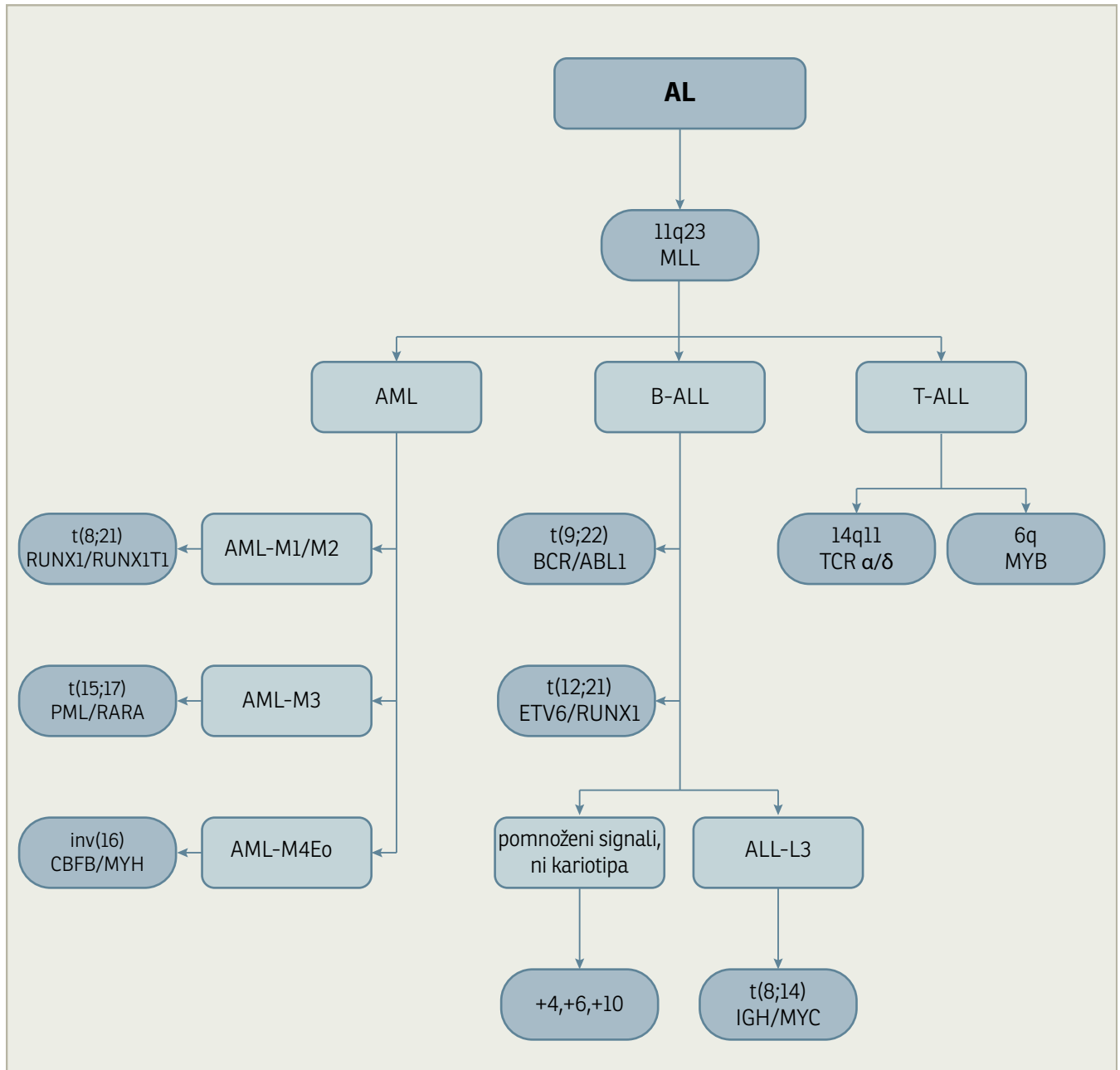
<sup>c</sup> +/- dodatni ali odsotni signal za tarčni gen, amp – pomnožitev gena

ge preiskave in vključitev vsake nadaljnje sonde bistveno zviša ceno. Vse naštetu nas je vodilo pri oblikovanju algoritmov za panele FISH (Slika 1). Ti se lahko med posameznimi diagnostičnimi centri nekoliko razlikujejo glede na finančne, tehnične in kadrovske možnosti. Z uporabo standardne citogenetske preiskave in panelov FISH smo določili citogenetske spremembe pri 70 % otrok z AL, kar je v skladu z navedbami iz literature.<sup>6</sup>

Preureditve *MLL* gena na kromosomu 11 (11q23) se pojavljajo pri vseh vrstah levkemij (Tabela 2), zato je DNA-sonda, specifična za ta gen, uvrščena v vse panele FISH pri AL. Ne le relativna pogostost preureditev *MLL*, tudi širok nabor partnerskih genov, s kateri-

mi se gen *MLL* preureja, je razlog, da testiramo prisotnost njegove preureditve. Veliko število preureditev *MLL* namreč s standardno citogenetsko preiskavo lahko spregledamo, nekatere pa so tudi kriптиčne. Ker gre za pogoste preureditve s pretežno neugodnim napovednim pomenom, je vključitev te sonde utemeljena.

Pri B-ALL, ki je najpogostejša AL pri otrocih, preiskavo FISH izvedemo z naborem treh sond. Translokacija t(12;21) je kriптиčna in tako razpoznavna le z molekularnimi preiskavami, obenem pa tudi najpogostejša posamezna preureditev pri pediatričnih ALL. Pri slovenskih otrocih z B-ALL smo jo sicer zasledili le pri 13 %, kar je skoraj 10 % manj od navedb v literaturi.<sup>2</sup> Vključitev



**Slika 1:** Algoritem vključitve DNA-sond (temneje osenčena polja) v panele FISH za preiskavo pri otrocih z akutno levkemijo.

te sonde v B-ALL panel je smiselna še zaradi dveh razlogov. Sonda, ki je specifična za gen ETV6 na kratkem kraku kromosoma 12, zazna namreč tudi delecije in preureditve tega gena, ki so relativno pogoste (5–7%).<sup>7</sup> Pri naših bolnikih smo takšne preureditve opazili štirikrat. Drugi del sonde ustreza genu RUNX1 na kromosomu 21. Tako lahko zaznamo vse spremembe kromosomskega področja 21q22, posledično tudi vse spremembe števila kromosoma 21. Trisomija kromosoma 21 je sploh najpogostejša med trisomijami pri akutnih levkemijah (do 15 % ALL), pa najsi gre za izolirano trisomijo ali

visoko hiperdiploidni kariotip, v vsakem primeru pa je napovedno pomembna. Tako smo pomnožene signale za gen RUNX1 opazili pri kar 18 % bolnikov (11 od 60), pri večini smo kasneje potrdili visoko hiperdiploidni kariotip (več kot 50 kromosomov). Ta se pojavlja skoraj pri tretjini otrok z ALL in je napovedno ugoden. Raziskave so pokazale, da trisomija specifičnih kromosomov napoveduje še ugodnejši potek bolezni, zato takrat, ko opazimo pomnožene signale za gene na kromosomu 21, standardne citogenetike pa ne moremo izvesti, uporabimo dodatne DNA-sonde za kromosome 4, 6 in 10.

Če dobimo pomnožene še te signale, lahko z veliko gotovostjo napovemo ugoden hiperdiploidni kariotip. Dodatno lahko izključimo izokromosom kromosom 17 (sestavljen iz obeh dolgih krakov), ki je pri hiperdiploidnem kariotipu napovedno manj ugoden.<sup>8</sup> Skupno smo hiperdiploidni kariotip našli pri šestih bolnikih z B-ALL (15 %). Nismo pa še opazili hipodiploidnega kariotipa (< 45 kromosomov), ki je napovedno neugoden. Med novejšie spremembe, ki jih zaradi neugodnega napovednega pomena načrtno iščemo, je tudi pomnožitev gena RUNX1, t.i. amplifikacija RUNX1.<sup>9</sup> To je sprememba, ki jo zaenkrat določimo izključno s preiskavo FISH z uporabo DNA-sond, specifičnih za gen RUNX1. Sprememba je napovedno neugodna, zato so otroci s to spremembo v Veliki Britaniji vključeni v intenzivne protokole zdravljenja.<sup>2</sup> Kljub redkosti pa smo jo našli pri eni od naših bolnic.<sup>10</sup>

Tretja sonda v naboru je specifična za translokacijo t(9;22), ki je najbolj poznana zaradi t. i. kromosoma Ph. Preureditev je pri otrocih sicer bistveno redkejša (približno 2 %) kot pri odraslih bolnikih z B-ALL (približno 30 %). Ker pa je napovedno neugodna, obenem pa pri bolniku določimo tarčni fuzijski gen BCR/ABL1 za zdravljenje z inhibitorji tirozin kinaz, je njegova določitev nujna. Tudi to translokacijo smo našli pri enem bolniku, kar ustreza podatkom iz literature.<sup>7</sup> Pri dveh bolnikih pa smo z uporabo te sonde zaznali preureditev gena ABL1 na kromosomu 9 (9q34).

Pri T-ALL najdemo preurejeni kariotip redkeje kot pri B-ALL. S preiskavo FISH so določili preureditve področij klastrov genov T-celičnega receptorja pri 35 % bolnikov (14q11, 7q34, 7p14). Večina teh preureditev je kriptičnih, zato jih preizkušamo s preiskavo FISH.<sup>2</sup> Mi smo preureditev TCR  $\alpha/\delta$  našli pri treh bolnikih s T-ALL. Gre za spremembo, ki ima bolj diagnostični kot napovedni pomen. Lahko pa služi tudi kot označevalec za kasnejše spremljanje. Kot pogostejše (približno 8 %) so se z uporabo komparativne genomske hibridizacije (CGH) pokazale pomnožitve gena MYB na kromosomu 6 (6q32). DNA-sondo za to preureditev smo zato uvrstili v panel za T-ALL nedavno, spremembe pa še nismo našli.

Pri otroških AML poleg MLL preureditev v skladu z izsledki citomorfologije in pretočne citometrije preverjamo le prisotnost napovedno ugodnih translokacij. Ker praktično pri vseh AML citogenetsko preiskavo tudi uspešno izvedemo, se odločamo za dodatne preiskave FISH šele po tem, ko zaključimo analizo proganih kromosomov. Uporaba panelov FISH pri AML prav zaradi uspešnosti standardne citogenetike ne poveča deleža zaznanih preureditev tako kot pri ALL (Tabela 1). Treba pa je poudariti, da samo uporaba sonde za preureditev gena MLL zmanjša možnost, da spregledamo te preureditve, ki so relativno pogoste (tretjina naših bolnikov z AML). Med zelo pogoste uvrščamo tudi translokacijo t(8;21), ki smo jo našli pri treh otrocih z AML (25 %), kar je primerljivo z navedbami v literaturi.<sup>8,11</sup> Čeprav lahko to preureditev razpoznamo s standardno citogenetsko preiskavo, je uporaba te sonde v panelih FISH za AML koristna tudi zaradi trisomije 8, ki je relativno pogosta aneuploidija. Našli smo jo pri enem otroku.

## Zaključki

Z uporabo panelov FISH povečamo delež pediatričnih bolnikov z ugotovljenimi kromosomskimi preureditvami za skupaj 20 %. Največja razlika je pri bolnikih z ALL, pri katerih delež povečamo celo do 40 %. Ker ima največ otrok prav B-ALL, je upravičenost uporabe panelov toliko večja. Pri AML zaradi uspešnosti standardne citogenetske preiskave in velikega deleža preurejenih kariotipov razlike ni. Ne glede na to pa ugotovljamo, da pri več kot dveh tretjinah otrok z AL določimo citogenetski označevalec za kasnejše spremljanje bolnika med zdravljenjem in po njem. Vsaj pri polovici otrok pa glede na izsledke citogenetskih preiskav lahko opredelimo tudi napovedni pomen, ki neposredno vpliva na klinične odločitve.

Glede na to, da imamo relativno majhno populacijo bolnikov, težko primerjamo pogostost posameznih preureditev s podatki iz literature, kar zlasti velja za redkejšie preureditve. Za večino vendarle lahko rečemo, da se pojavlja primerljivo z navedbami iz literature. Bistveno manjša od pričakovanj pa je

pojavnost translokacije t(12;21) pri B-ALL, vendar bo treba počakati na večje število bolnikov.

Nabor sond v panelih FISH bomo tudi v prihodnje usklajevali z novimi ugotovitvami mednarodnih raziskav in otrokom v Sloveniji z AL zagotavljali celovito citogenetsko obravnavo.

## Literatura:

1. Swerdlow S. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
2. Harrison C. Cytogenetics of pediatric and adolescent acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 2008; 144: 147-56.
3. Rowley JD. Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood* 2008; 112: 2183-89.
4. Sreekantaiah C. FISH panels for hematologic malignancies. *Cytogenet Genome Res* 2007; 118: 284-96.
5. Poppe B, Cauwelier B, Van Limbergen H, Yigit N, Philippé J, Verhasselt B, idr. Novel cryptic chromosomal rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by multiple color fluorescent in situ hybridization. *Haematologica* 2005; 90: 1179-85.
6. Chen Z, Sandberg AA. Molecular cytogenetic aspects of hematological malignancies: Clinical implications. *Am J Med Gen* 2002; 115: 130-41.
7. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Dosegljivo na: <http://atlasgeneticsoncology.org/>.
8. Meschini S, Areci RJ. Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia. *Oncologist* 2007; 12: 341-55.
9. Soulier J, Trakhtenbrot L, Najfeld V, Lipton JM, Mathew S, Avet-Loiseau H, idr. Amplification of band q22 of chromosome 21, including AML1, in older children with acute lymphoblastic leukemia: an emerging molecular cytogenetic subgroup. *Leukemia* 2003; 17: 1679-82.
10. Podgornik H, Debeljak M, Žontar D., Černelč P, Velenšek Prestor V, Jazbec J. RUNX1 amplification in lineage conversion of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia to acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 178: 77-81.
11. Gertjan, J, Kaspers L, Zwaan CM. Pediatric acute myeloid leukemia: toward high-quality cure of all patients. *Haematologica* 2007; 92: 1519-32.