

Strokovni prispevek/Professional article

PREPOZNAVANJE ZNAČILNIH KROMOSOMSKIH PREUREDITEV Z REAGENČNIM KOMPLETOM mD_x HemaVision PRI BOLNIKI Z LEVKEMIJO

DETECTION OF SPECIFIC CHROMOSOMAL REARRANGEMENT IN LEUKEMIA PATIENTS
BY mD_x HEMAVISION KIT

Tadej Pajič, Elvira Ljutić, Peter Černelč

Enota za diagnostiko, Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Njegoševa 4, 1525 Ljubljana, Slovenija

Prispelo 2004-03-01, sprejeto 2004-03-23; ZDRAV VESTN 2004; 73: Suppl. I: 9-12

Ključne besede: levkemija; obratno prepisovanje; hkratna verižna reakcija s polimerazo; kromosomske preureditve; združeni geni

Izvleček – Izhodišča. Reagenčni komplet mD_x HemaVision je namenjen za kvalitativno ugotavljanje 28 različnih kromosomskih preureditev, značilnih za posamezne podvrste levkemij, z načinom obratnega prepisovanja, hkratne in vgnedene verižne reakcije s polimerazo. S to reakcijo lahko določimo prisotnost ali odsotnost specifičnih mRNK prepisov oziroma cDNK segmentov po obratnem prepisovanju združenih ali okvarjenih genov, ki nastanejo zaradi kromosomskih preureditev.

Bolniki in metode. Uporabnost reagenčnega kompleta smo preverili v 26 vzorcih RNK bolnikov z akutno levkemijo in 7 s kronično mieloproliferativno boleznijo ter primerjali izsledke med reagenčnim kompletom mD_x Hema Vision in usklajenim protokolom RT-PCR pri ugotavljanju značilnih prepisov mRNK t(9;22)(q34;q11), t(8;21)(q22;q22), inv16(p13;q22), t(15;17)(q21;q21) in t(4;11)(q21;q23). RNK smo pridobili iz enojedrnih celic kostnega mozga po gostotnem gradientnem centrifugiranju preko fikola in z uporabo reagenčnega kompleta High Pure RNA Isolation. Sintezo komplementarne DNK in verižno reakcijo s polimerazo smo izvedli, kot je opisano v protokolu reagenčnega kompleta ali mD_x HemaVision v usklajenem protokolu RT-PCR. Pridelke PCR reakcij smo ocenjevali z agarozno gelsko elektroforezo, barvanjem gelov z etidijevim bromidom in detekcijo pod UV lučjo.

Rezultati. Dobili smo 100-odstotno ujemanje izsledkov za preiskave, ki so skupne obema postopkoma. Značilen BCR-ABL mRNA prepis t(9;22)(q34;q11) smo dokazali pri bolniku z B-ALL, bolniku z bifenotipsko levkemijo in pri štirih bolnikih s KML. AML1-ETO mRNA prepis t(8;21)(q22;q22) smo ugotovili pri dveh bolnikih z AML. Pri enem bolniku z AML z nenormalnimi eozinofili v kostnem mozgu smo dokazali CBFβ/MYH 11 mRNA prepis inv16(p13;q22). MLL/AF4 mRNA prepis t(4;11)(q21;q23) smo ugotovili pri deklici z B-ALL in bolniku z B-ALL po zdravljenju s citostatiki. Pri enem bolniku smo z reagenčnim kompletom mD_x HemaVision ugotovili segment MLL/AF10 cDNK, značilen za t(10;11)(p12;q23).

Key words: leukemia; reverse transcription; polymerase chain reaction; chromosomal rearrangement; fusion genes

Abstract – Background. The mD_x HemaVision kit is a qualitative multiplex and nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) test designed to detect 28 different translocations or chromosomal rearrangement, found to be specific for particular subtypes of leukemia. The presence or absence of the specific mRNA transcripts or cDNA segments after the reverse transcription of the fusion or abnormal genes, appeared after chromosomal rearrangements, could be determined by the kit.

Patients and methods. The usefulness of the kit was tested on the 26 RNA samples of patients with acute leukemia and seven patients with chronic myeloproliferative diseases and by comparison of the results between mD_x HemaVision kit and standardized RT-PCR protocol for the specific mRNA transcripts of the t(9;22)(q34;q11), t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q21;q21) and t(4;11)(q21;q23). The RNA samples were isolated from mononuclear cells of the bone marrow after Ficoll-Paque density gradient centrifugation and with a High Pure RNA isolation kit. The cDNA synthesis and Polymerase Chain Reaction were performed as described in mD_x HemaVision's or standardized RT-PCR's protocols. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis, by staining with etidium bromide and by visualization under UV light.

Results. We obtained 100% concordance of the results by both methods. Specific BCR-ABL mRNA transcripts were found in four chronic myeloid leukemia patients, one in B acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) and one with bifenotypic leukemia (BAL) patient. AML1-ETO mRNA transcript of the t(8;21)(q22;q22) was identified in two patients with acute myeloid leukemia (AML). The CBFβ/MYH11 mRNA transcript specific for inv16(p13;q22) was obtained in AML patient with abnormal eosinophils in bone marrow. MLL/AF4 mRNA transcript of the t(4;11)(q21;q23) was found in the girl with B-ALL and in patient with B-ALL after treatment. In patients with B-ALL we found MLL/AF10 cDNA segment specific for t(10;11)(p12;q23) by the mD_x HemaVision kit.

Zaključki. Na osnovi skladnosti dobljenih rezultatov sklepa-mo, da je metoda primerna za molekularnogenetično prepoznavanje levkemij, saj omogoča ugotovitev velikega števila specifičnih prepisov mRNA oz. segmentov cDNK pri kromosomskih nepravilnostih hkrati. S tem pridobimo več informacij v krajšem času in tako znatno zmanjšamo stroške preiskav.

Uvod

V zadnjih letih se je izkazalo, da raziskava kromosomov prispeva k natančni diagnozi in oceni napovedi izida zdravljenja mieločnih in limfatičnih novotvorb. Pri večini lahko odkrijemo v klonu malignih celic kromosomske nepravilnosti oz. preureditve. Pomen teh se kaže v razvrstitvi Svetovne zdravstvene organizacije za maligne novotvorbe krvotvornega sistema, ki obsega razvrstitev limfatičnih, mieločnih in histiocitnih novotvorb ter novotvorb mastocitov. Posamezne bolezni so opredeljene glede na morfološke, imunološke, genetične in klinične značilnosti. Diagnostična vrednost posameznih značilnosti je različna pri različnih novotvorbah. Pri tem je treba razlikovati značilnosti, ki opredeljujejo posamezno bolezen, od značilnosti, ki imajo napovedni pomen. Tako lahko nekatere genetične nenormalnosti opredeljujejo določeno bolezen, druge pa so napovedni dejavniki pri tej bolezni (1).

Običajni način za ugotavljanje kromosomskih preureditev in za ugotavljanje kakovosti remisije bolnikov po zdravljenju je citogenetska preiskava metafaz v celicah kostnega mozga (1). Dopolnjuje jo način fluorescenčne hibridizacije (FISH) *in situ*, ki je občutljivejši, omogoča oceno celic v interfazi in zaznavo sprememb na kromosomu oziroma v genu, ki jih z običajno citogenetsko preiskavo ne ugotovimo. Najobčutljivejša med vsemi je verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction - PCR), ki omogoča hitro in specifično pomnoževanje segmenta genomske ali komplementarne DNK *in vitro* s termostabilno polimerazo DNK v pufru, ki ima ustrezen pH, koncentracijo oligonukleotidov, deoksinukleotid trifosfatov in soli. Z njo lahko zaznamo eno maligno celico z značilno kromosomsko nepravilnostjo med 10^5 do 10^6 normalnimi celicami. Ugotavljanje strukturnih kromosomskih nepravilnosti, translokacij, delecij in inverzij oziroma iz njih nastalih združenih ali okvarjenih genov z verižno reakcijo s polimerazo temelji na oblikovanju oligokonukleotidov, ki so komplementarni zaporedju DNK poleg prelomnega mesta kromosoma. Mesta se od bolnika do bolnika razlikujejo, vendar so združena znotraj določene regije ali regij. Pri levkemijah so regije v genu lahko široke tudi nekaj 10 kilobaznih parov, tako da ni mogoče uporabiti PCR na osnovi genomske DNK. Zato pri večini levkemij uporabimo himerično specifično informacijsko RNK (messenger RNA, mRNA). To prepisemo v komplementarno DNK z uporabo naključnih ali specifičnih oligonukleotidov in encimov - reverzних transkriptaz. Komplementarna DNK je osnova za verižno reakcijo s polimerazo (angl. RT-PCR Reverse Transcriptase and Polymerase Chain Reaction). Specifičnost in občutljivost reakcije PCR lahko povečamo z vgnezdanim PCR (angl. nested PCR). Pridelek PCR iz prve reakcije pomnožimo v drugi reakciji z oligonukleotidi, ki se prilagajajo znotraj prvega pridelka PCR (2 in reference v njej). Pomembna oblika PCR je hkratni PCR (angl. multiplex PCR). Ta način omogoča, da lahko v eni reakciji s pomočjo več parov oligonukleotidov ugotavljamo več iskanih cDNK segmentov, značilnih za posamezne kromosomske nepravilnosti (3).

Obe obliki sta združeni v reagenčnem kompletu mD_x HemaVision, ki je namenjen za kvalitativno ugotavljanje 28 različnih kromosomskih preureditev (Razpr. 1), značilnih za posamezne podvrste levkemij, z načinom obratnega prepisovanja, hkratne in vgnezdene PCR. Razdeljen je v preiskovalni in iz-

Conclusions. On the basis of the concordance of the results it could be concluded that the method is suitable for the molecular genetic recognitions of leukemia. It offers the detection of many specific mRNA transcripts or cDNA segments of the chromosomal rearrangements simultaneously. We can obtain more information in shorter time and therefore reduce the costs of the test.

ključitveni preskus. Z izključitvenim preskusom določimo kromosomsko nepravilnost (3).

Uporabnost reagenčnega kompleta mD_x HemaVision smo se odločili preveriti v 26 vzorcih RNK bolnikov z akutno levkemijo in 7 s kronično mieloproliferativno boleznijo ter s primerjavo izsledkov med reagenčnim kompletom mD_x Hema Vision (3) in usklajenim protokolom RT-PCR (2) pri ugotavljanju značilnih mRNA prepisov t(9;22)(q34;q11), t(8;21)(q22;q22), inv16(p13;q22), t(15;17)(q21;q21) in t(4;11)(q21;q23). Preiskave usklajenega protokola RT-PCR so bile že uvedene v Enoti za diagnostiko Kliničnega oddelka za hematologijo Kliničnega centra Ljubljana. Protokol je bil preizkušen v različnih laboratorijih, ki so sodelovali pri njegovi pripravi in usklajevanju. Namenjen je ugotavljanju in spremljanju najpogostejših kromosomskih nepravilnosti, ki se pojavljajo pri akutnih levkemijah (2).

Preiskovanci in načini dela

Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 32 vzorcev bolnikov s Kliničnega oddelka za hematologijo Interne klinike Kliničnega centra Ljubljana in enega iz Službe za onkologijo in hematologijo Pediatrične klinike Kliničnega centra Ljubljana. Izmed 33 preiskovanih oseb je bilo osemnajst vzorcev bolnikov z akutno mieloblastno levkemijo (AML), šest z akutno B-limfoblastno levkemijo (B-ALL), enem z akutno T-limfoblastno levkemijo (T-ALL), enem z bifenotipsko levkemijo (BAL), štiri s kronično mieločno levkemijo (KML), tri s sumom na kronično mieloproliferativno bolezen. 32 bolnikom smo ugotavljali kromosomske preureditve ob pojavu bolezni, enemu po zdravljenju s citostatiki. Od preiskovanih oseb je bilo 19 moških, 13 žensk in ena deklica. Mediana starosti moških je bila 51 let, razpon od 18 do 91 let. Mediana starosti žensk je bila 49 let, razpon od 36 do 70 let. Deklica je bila stara 5 let. Diagnoza bolezni je temeljila na značilnih kliničnih znakih, citološkem pregledu razmaza krvi in punktata kostnega mozga ter določitvi imunoloških označevalcev.

Načini dela

Priprava vzorcev kostnega mozga in osamitev RNK

RNK smo pridobili iz vzorcev kostnega mozga. Odvzeli smo 1-2 mL kostnega mozga v epruveto Vacutainer z EDTA anti-koagulantom in 2 ml puferirane fiziološke raztopine. Enojedrne celice smo pridobili z gostotnim gradientnim centrifugiranjem preko fikola. Postopek osamitve RNK molekule smo izvedli iz 5×10^6 celic s kolonami in po protokolu reagenčnega kompleta High Pure RNK Isolation (ROCHE, Nemčija). Kolone so izdelane in oblikovane izključno za osamitev celotne molekule RNK, po načinu adsorpcije na steklenih vlaknih (5).

Sinteza komplementarne DNK

Obratno prepisovanje 1 mg RNK smo izvedli po protokolu paketa mD_x HemaVision (BIO RAD, Velika Britanija) (3) in po usklajenem RT-PCR protokolu (2). Reakcije so potekale v napravi znamke Perkin-Elmer GeneAmp 9600 (Applied Biosystem, ZDA).

Razpr. 1. Prikaz 28 kromosomskih preureditev, ki jih lahko ugotovimo z uporabo reagenčnega kompleta mD_x HemaVision (BIO RAD).Table 1. The table shows 28 chromosomal rearrangements that could be detected by mD_x HemaVision kit (BIO RAD).

Kromosomske nepravilnosti	Vpleteni geni	Bolezen	Kromosomske nepravilnosti	Sodelujoči geni	Bolezen
t(x;11)(q13;q23)	MLL1(11q23) AFX1(x;q13)	AML in ALL, MDS, tAL (Preureditve MLL gena na 11q23)	t(8;21)(q22;q22)	AML1(21q22) MGT8(8q22)	AML (10%;AML M2 40%, pogosta pri otroški AML); 9% tAML in t-MDS
t(6;11)(q27;q23)	MLL1(11q23) AF6(6q27)		t(15;17)(q21;q22)	PML(15q22) RARα(17q21)	APL (98%;9% tAML in t-MDS)
t(11;17)(q23;q21)	MLL1(11q23) AF-17(17q21)		t(5;17)(q35;q21)	NPM(5q35) RARα(17q21)	APL (redka)
t(11;19)(q23;p13.1)	MLL1(11q23) ELL(19p13.1)		t(11;17)(q23;q21)	PLZF(11q23) RARα(17q21)	APL (<1%)
t(9;11)(q22;q23)	MLL1(11q23) AF9(9q22)		inv(16)(p13;q22)	CBFB(16q22) MYH11(16p13)	AML(5-10%;20% M4;100% M4eo; redko M2.M5, KML v BP z M4eo tipom, MDS)
t(10;11)(p12;q23)	MLL1(11q23) AF10(10p12)		t(16;21)(p11;q22)	TLS(16p11) ERG(21q22)	AML (redka)
t(1;11)(q21;q23)	MLL1(11q23) AF1q(1q21)		t(9;9)	SET(9q34) CAN(9q34)	AML
t(1;11)(p32;q23)	MLL1(11q23) AF-1p(1p32)		t(6;9)(p23;q34)	DEK(6p23) CAN(9q34)	AML in MDS (1%)
t(4;11)(q21;q23)	MLL1(11q23) AF4(4q21)		t(1;19)(q23;p13)	E2A(19p13) PBX1(1q23)	B-ALL (5%)
t(11;19)(q23;p13.3)	MLL1(11q23) ENL(19p13.3)		t(17;19)(q22;p13)	E2A(19p13) HLF(17q22)	B-ALL (1%)
t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22) MDS1(3q26)	KML v BP mieloične vrste (1%), AML (> 1%) in tMDS	t(12;21)(p13;q22)	TEL(12p13) AML1(21q22)	B-ALL (otroška 15-35%, odrasli redko)
t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22) EVII(3q26)/MDS1(3q26)		TAL1(40kb deletion)	SIL1(1p34) TALI(1p34)	T-ALL (10-30%)
t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22) EAP(3q26)		t(9;22)(q34;q11)	BCR(22q11) ABL(9q34)	KML (večina), ALL (20% odraslih; 25% otroških), AML (3% odrasli, 1% otroška)
t(3;5)(q25.1;q34)	NPM(5q34) MLF1(3q25.1)	AML, MDS in KML v BP	t(12;22)(p13;q11)	TEL(12p13) MN1(22q11)	MPS, AML, atipična KML (redka)
t(9;12)(q34;p13)	TEL(12p13) ABL(9q34)	Redko - KML, ALL in AML	t(5;12)(q33;p13)	TEL(12p13) PDGFRb(5q33)	KEL, KMMoL z eozinofilijo, MDS/MPS (redka)

AML, akutna mieloična levkemija; ALL, akutna limfatična levkemija linije B ali T; KEL, kronična eozinofilna levkemija in hipereozinofilni sindrom; KML, kronična mieloična levkemija; KMMoL, kronična mielomonocitna levkemija, MDS, mielodisplastični sindrom; MPS, mieloproliferativna bolezen; BP, blastna preobrazba, tAML, tMDS, tAL; AML, mielodisplastični sindrom in akutna levkemija zaradi predhodnega zdravljenja. Podatki so povzeti iz (4).

Verižna reakcija s polimerazo (PCR), gelska elektroforeza in ocena velikosti PCR pridelkov

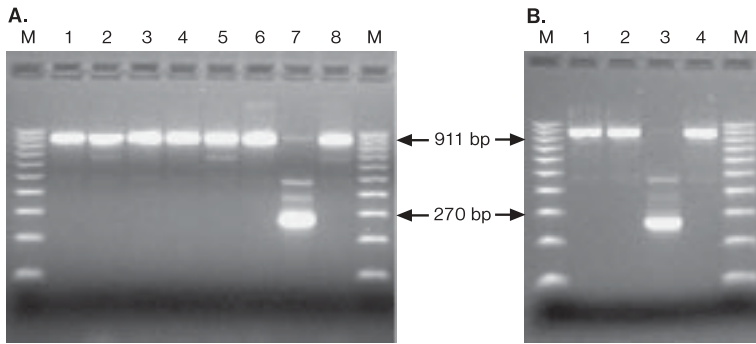
Priprava, izvedba in pogoji prve in druge verižne reakcije s polimerazo preiskovalnega in izključitvenega preskusa so bili takšni, kot so opisani v protokolu paketa mD_x HemaVision (BIO RAD, Velika Britanija) (5). Pri preiskovalnem preskusu smo izvedli osem vzporednih prvih verižnih reakcij s polimerazo (PCR) in nato, zaradi večje občutljivosti reakcije, naredili še osem vzporednih drugih reakcij. Vsaka reakcija pokriva različne skupine kromosomskih nepravilnosti. Prisotnost specifičnega madeža po agarozni gelski elektroforezi v eni izmed osmih reakcij je pomenila pozitiven izsledok in je določil, katero od osmih skupin reakcij PCR izključitvenega preskusa bo mo izvajali naprej. Vsaka skupina reakcij PCR izključitvenega preskusa omogoča pomnožitev natančno določenih cDNK segmentov kromosomskih preureditev. Po agarozni gelski elektroforezi smo ocenili velikost drugega pridelka PCR pozitivne reakcije in sklepali na določen mRNK prepis, značilen za translokacijo. Velikost PCR pridelkov za določene kromosomske nepravilnosti je znana (2).

Priprava, izvedba in pogoji prve in druge verižne reakcije s polimerazo usklajenega protokola RT-PCR so bili takšni, kot so opisani v navodilu postopka (2). Kontrolni PCR ugotavljanja kakovosti cDNK smo izvedli v ločeni reakciji po protokolu, opisanem v (6). Reakcije so potekale v napravi Perkin-Elmer GeneAmp 9600 (Applied Biosystem, ZDA).

Za oceno velikosti PCR pridelkov smo pripravili 1,5-odstotni agarozni gel v 0,5XTris-borat-EDTA (TBE) pufru. V gel smo dodali etidijev bromid, ki nam omogoča zaznavo pridelkov PCR pod ultravijolično (UV) lučjo. 5 µl pufra za nanašanje z barvilom (Gel Loading Buffer; Abgene, Velika Britanija) smo previdno zmešali z 10 µl vzorca in vzorce nanesti v gel. Za oceno velikosti DNK smo v gel nanesti tudi 2 µl DNK označevalca velikosti (Superladder-Low; od 100 do 1000 bp; Abgene, Velika Britanija). Elektroforeza je potekala v 0,5XTBE pufru pri napetosti 80 V dve uri. Rezultate smo prikazali z UV lučjo sistema BIO RAD Gel Doc 1000, ki omogoča prenos slike s pomočjo kamere CCD v računalniški program.

Izsledki

Z načinom obratnega prepisovanja in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) reagenčnega kompleta (BIO RAD) mD_x Hema Vision smo ocenili osemnajst vzorcev bolnikov z akutno mieloblastno levkemijo (AML), šest z akutno B-limfoblastno levkemijo (B-ALL), enim z akutno T-limfoblastno levkemijo (T-ALL), enim z bifenotipko levkemijo (BAL), štirim s kronično mieloično levkemijo (KML), tremi s sumom na kronično mieloproliferativno bolezen. Vzoredno smo po usklajenem protokolu RT-PCR ugotavljali specifične kromosomske nepravilnosti, ki so bile že določane v Enoti za diagnostiko Kliničnega oddelka za hematologijo Kliničnega centra Ljubljana. Pri bol-



Sl. 1. Prikaz primera agarozne gelske elektroforeze za preiskovalni (A) in izključitveni (B) preskus reagenčnega kompleta mD_x HemaVision za preiskovanca K.M. z $inv16(p13;q22)$; A. Madež v vrstici 7 pri 270 bp pomeni pozitiven izsledok za skupino reakcij določenih kromosomskih nepravilnosti. B. Madež v vrstici 3 pri 270 bp pomeni pozitiven izsledok za $inv16(p13;q22)$, tip A mRNA prepis. Madeži pri 911 bp pomenijo uspešno pomnoženo interno kontrolo; M, označevalec DNA velikosti od 100 do 1000 bp.

Figure 1. The example of the agarose gel electrophoresis for screen (A) and split-out (B) tests of mD_x HemaVision kit for K.M. patient with the $inv16(p13;q22)$; A. The band in the lane 7 (270 bp) is a positive result for a group of reactions of the certain chromosomal's abnormalities. B. The band in the lane 3 (270 bp) is a positive result for mRNA transcript, type A of the $inv16(p13;q22)$. Bands in 911 bp show a successfully amplified internal control; M, DNA size ladder (from 100 to 1000 bp).

nikih z akutno levkemijo smo izvedli preiskave za ugotavljanje mRNK oziroma cDNK segmentov, značilnih za t(9;22) (q34;q11), t(8;21)(q22;q22), $inv16(p13;q22)$, t(15;17) (q21;q21) in t(4;11)(q21;q23). Dobili smo 100-odstotno ujemanje izsledkov za preiskave, ki so skupne obema postopkoma. Značilen BCR-ABL mRNA prepis t(9;22)(q34;q11) smo dokazali pri bolniku z B-ALL, bolniku z BAL in pri štirih bolnikih s KML. AML1-ETO mRNA prepis t(8;21)(q22;q22) smo ugotovili pri dveh bolnikih z AML. Pri enem bolniku z AML z nenormalnimi eozinofilci v kostnem mozgu smo dokazali prepis CBF β /MYH 11 mRNA $inv16(p13;q22)$. MLL/AF4 mRNA prepis t(4;11)(q21;q23) smo ugotovili pri deklici z B-ALL in bolniku z B-ALL po zdravljenju s citostatiki. Pri bolniku z B-ALL smo z uporabo reagenčnega kompleta mD_x HemaVision ugotovili MLL/AF10 mRNA prepis značilen za t(10;11)(p12;q23). Pri drugih nismo ugotovili značilnih kromosomskih preureditev, ki jih s preiskavami lahko zaznamo.

Razpravljanje

Uspešno smo vpeljali način obratnega prepisovanja in hkratne verižne reakcije s polimerazo kompleta mD_x HemaVision (3) na vzorcih bolnikov in izvedli sočasne preiskave po usklajenem protokolu RT-PCR (2). Za skupine bolezni, pri katerih je kromosomska nepravilnost prisotna v velikem odstotku, in je za bolezen značilna, smo dobili pričakovane izsledke preiskav (glej Izsledke). Po podatkih iz literature (1) je pri več kot 95% bolnikov s KML prisoten BCR-ABL mRNA prepis t(9;22) (q34;q11). V 98% je PML-RAR α mRNA prepis t(15;17) (q21;q21) značilna za akutno promielocitno levkemijo, podvrsto AML. Pri večini bolnikov je pri podvrsti AML z eozinofilijo značilen prepis CBF β /MYH 11 mRNA $inv16(p13;q22)$ (1).

Zato smo tem bolnikom po usklajenem protokolu RT-PCR izvedli le preiskavo, značilno za bolezen. Dobili smo 100-odstotno ujemanje rezultatov preiskav, ki so skupne obema postopkoma. Pri treh bolnikih z akutno levkemijo smo ugotovili preureditev gena MLL. Ta se pojavlja pri AML, B-ALL, mielodisplastičnih sindromih, včasih pri T-ALL in pri sekundarnih levkemijah. Pri AML sodi preureditev v podskupino AML s ponavljajočimi se kromosomskimi nepravilnostmi in s slabo prognozo. Pri ALL ne predstavlja posebnih bolezenskih entitet, ampak večinoma pomeni slabo napoved (4).

Uporaba kompleta je enostavna in omogoča ugotavljanje značilnih cDNK segmentov kromosomskih nepravilnosti sočasno. Pri tem vključuje pomnožitev specifičnega cDNK segmenta, nastalega iz zaporedja RNK, ki je prisoten v vseh vzorcih (Sl. 1). Ta nam služi kot kontrola kakovosti vzorcev cDNK. Protokol usklajenega RT-PCR ne omogoča sočasnega pomnoževanja več iskanih cDNK segmentov v eni reakciji. Vse reakcije ugotavljanja kromosomskih preureditev in kontrolno pomnožitev izvedemo v ločenih reakcijah. Tako bi za vsako kromosomsko preureditev morali narediti več reakcij, kar bi podražilo in podaljšalo pridobitev izsledkov. Pri nekaterih podvrstah levkemij se kromosomske nepravilnosti pojavljajo v velikem odstotku. Pri teh se lahko na temelju značilnih kliničnih znakov bolezni, na osnovi citološkega pregleda krvnega razmaza in punktata kostnega mozga ter imunoloških označevalcih, odločimo opraviti preiskavo po usklajenem protokolu RT-PCR.

Zaključki

Na osnovi skladnosti dobljenih rezultatov med reagenčnim kompletom mD_x HemaVision in usklajenim protokolom RT-PCR sklepamo, da je preiskava z reagenčnim kompletom primerna za molekularno genetično prepoznavanje levkemij, ker omogoča ugotovitev velikega števila specifičnih prepisov mRNA pri kromosomskih nepravilnostih hkrati. Namenjena je za njihovo ugotavljanje ob pojavu bolezni in po zdravljenju s citostatiki, pri katerih lahko pride do pojava novih kromosomskih nepravilnosti. Z njim pridobimo več informacij v krajšem času. Uporablja se lahko kot pomembna redna preiskava pri diagnostiki levkemij.

Literatura

- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW eds. World Health Organization Classification of tumours, pathology and genetics, tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2001.
- van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901-28.
- Anon. mD_x HemaVision Multiplex RT-PCR System for Typing/Subtyping of leukemia, Instruction manual. Milano, München, Paris: BIO-RAD Diagnostics Group, 2001.
- <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/Anomliste.html>
- Anon. High Pure RNA Isolation kit, Instruction manual. Mannheim: ROCHE Diagnostics, 2000.
- Watzinger F, Lion T. Multiplex PCR for quality control of template RNA/cDNA in RT-PCR assays. *Leukemia*, 1998; 12: 1984-6.