

A HAGYOMÁNYOS CITOGENETIKA ÉS A FISH EGYMÁST JÓL KIEGÉSZÍTŐ VIZSGÁLATOK GYERMEKKORI AKUT LIMFOID LEUKÉMIÁBAN

Haltrich Irén, Csóka Monika, Kovács Gábor, Fekete György

Semmelweis Egyetem, II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest

Gyermekkori akut limfoid leukémiában a citogenetikai vizsgálat eredménye független prognosztikai tényező, különböző rizikócsoportokba történő besorolási szempont; a terápiás szerekl szembeni érzékenységet vagy rezisztenciát is befolyásolhatja. Jelen tanulmányunkban 30 újonnan diagnosztizált vagy recidivált leukémiás gyermek G-sávós kariotípusát valamint a TEL/AML1 és az ABL/BCR fúziós gén, a p16 (9p21) tumorszuppresszor gén és az MLL gén interfázis-fluoreszcens in situ hibridizáció (I-FISH) vizsgálatát értékeljük. G-sávós kariotípus-analízissel az esetek felében találtunk klonális kromoszóma-eltérést. Az előbbi módszert I-FISH technikával kiegészítve, a betegek 70%-ában azonosítottunk kórhelyi szempontból jelentős számbeli vagy szerkezeti ALL-specifikus eltérést. Hét betegnél (19%) a hagyományos citogenetikai vizsgálat tárt fel olyan komplex szerkezeti eltérést, mely a célzott I-FISH vizsgálat nem volt kimutatható. Az AML1 gén emelkedett kópiaszáma (30%) összhangban volt a G-sávval azonosított hiperdiploid kariotípusok 21-es kromoszómát érintő számbeli eltéréseivel. Egy betegnél az AML1 gén 5–6 kópiáját azonosítottuk, egy másiknál a der(21)-esen volt látható az AML1 gén amplifikációja, miközben a homológ kromoszóma AML1 génje a TEL/AML1 fúzióban vett részt. A gyermekkori B-sejtes ALL jó prognosztikai értékű rejtett transzlokációját, a t(12;21)(p13;q22)-et négy betegnél azonosítottuk, egnél a TEL gén deléciójával társult. Egy másik betegnél a TEL deléciója volt az egyedüli anomália. A 9p21 tumorszuppresszor régió mikrodelécióját 8 betegnél (23%) azonosítottuk, a G-sávós kariotípusban csak két betegnél volt detektálható a deléció. Egy betegnél a 9p21-deléció mellett Philadelphia kromoszómát és a 17-es kromoszóma monoszómiáját azonosítottuk. Az I-FISH és a hagyományos citogenetikai módszer együttes alkalmazása lehetőséget nyújt a citogenetikai kép részletesebb azonosítására, a gyermekkori leukémiák prognózisának pontosabb megítélésére és így az egyénre szabott és hatásosabb terápia kiválasztására. Magyar Onkológia 52: 283–291, 2008

Kulcsszavak: akut limfoid leukémia, citogenetika, I-FISH

Primary genetic abnormalities of leukemia cells have important prognostic significance in childhood acute leukemia. In the last two years 30 newly diagnosed or recurrent childhood ALL bone marrow samples were analyzed for chromosomal abnormalities with conventional G-banding and interphase-fluorescence in situ hybridization (I-FISH) using probes to detect BCR/ABL fusions, cryptic TEL/AML1 and MLL rearrangements and p16(9p21) tumor suppressor gene deletions. G-banded karyotype analysis found clonal chromosomal aberrations in 50% of cases. With the use of complementary I-FISH techniques, ALL-specific structural and numerical changes could be identified in 70% of the patients. Nine cases (30%) had subtle chromosomal aberrations with prognostic importance that had not been detected in G-banded analysis. Conventional G-banding yielded additional information (rare and complex structural aberrations) in 19% of patients. The most common aberration (30%) was AML1 copy number increase present in G-banded hyperdiploid karyotype as a chromosome 21 tetrasomy in the majority of cases; one case displayed 5–6 copies and in another case amplification of AML1 gene on der(21) was combined with TEL/AML1 fusion of the homologue AML1 gene and deletion of the remaining TEL allele. High hiperdiploidy was detected in 6 cases, in one patient with normal G-banding karyotype. TEL/AML1 fusion signals were identified in four patients. Deletion of p16 locus was found in eight cases (23%), of which only two had cytogenetically visible rearrangements. G-banding in combination with I-FISH has produced major improvements in the sensitivity and accuracy of cytogenetic analysis of ALL patients and this method helps to achieve a more precise identification of different risk categories in order to choose the optimal treatment. Haltrich I, Csóka M, Kovács G, Fekete G. Cytogenetic and FISH findings are complementary in childhood ALL. Hungarian Oncology 52: 283–291, 2008

Keywords: acut lymphoblastic leukemia, cytogenetics, I-FISH

Közlésre érkezett:
2007. november 20.

Elfogadva:
2008. augusztus 26.

Levelezési cím:
Dr. Haltrich Irén
Semmelweis Egyetem,
II. sz. Gyermek-
gyógyászati Klinika
1094 Budapest
Tűzoltó utca 7–9.
Telefon: (06-1) 215-1380
Fax: (06-1) 217-5770
E-mail:
haltrich@gyer2.sote.hu

A jelen közlemény
a GVOP 3.2.1-2004 -04-
0381/3.0 műszerpályázat
támogatásával készült.

BEVEZETÉS

A pontos kockázatbecslés egyre nagyobb szerephez jut a gyermek- és serdülőkori akut limfoid leukémia (ALL) kezelésében, a rizikótényezőkön alapuló terápiás protokollok 5 éves eseménymentes túlélésre vonatkoztatott átlagos sikeressége a 80%-ot is meghaladta (32, 40). A különböző rizikócsoporthoz (alacsony – LR, közepes – MR, magas – HR) történő besorolás a klinikai adatok (immunfenotípus, életkor, nem, kezdeti fehérvérsejtszám), a prednisolon-válasz, valamint a leukémiás sejtek genetikai elváltozásai alapján történik (41). Ez utóbbi kivételes jelentőségű, mivel a citogenetikai eltérés független prognosztikai tényező és a különböző terápiás szerekek szembeni érzékenységet vagy rezisztenciát is befolyásolhatja (31).

Az ALL-specifikus genetikai aberrációk több mint fele standard citogenetikai vizsgálattal kimutatható. A rejtett rendellenességek feltárásában a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) (30) alapú molekuláris citogenetikai technikák bevezetése jelentett áttörést, mely lehetővé tette az alacsony sávszámú kromoszómák vagy az osztódásra nem bírható leukémiás sejtek rendellenességeinek célzott feltárását.

A Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika Citogenetikai Laboratóriumában, ALL iránydiagnózis esetén a WHO ajánlása alapján a gyermekek csontvelővizsgálatát – a hagyományos citogenetika mellett – FISH technikával is elvégezzük. Jelen tanulmányunkban 30 újonnan diagnosztizált vagy recidivált leukémiás gyermek G-sávós kariotípusát, valamint a TEL/AML1 és az ABL/BCR fúziós gén, a p16 (9p21) tumorsuppresszor gén és az MLL gén interfázis-fluoreszcens in situ hibridizációs (I-FISH) vizsgálatát értékeljük.

VIZSGÁLT BETEGEK
ÉS ALKALMAZOTT MÓDSZEREK*Vizsgált betegek*

A 27 új és három recidivált ALL-es beteget a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján diagnosztizáltuk a klinikai, morfológiai, immunológiai és citogenetikai adatok alapján 2005 és 2006 között. A betegek a következő FAB (4) besorolást kapták: ALL-L1 (23 beteg), ALL-L2 (3 beteg), ALL-L1,2 (3 beteg), ALL-L3 (1 beteg) és ALL-recidíva (3 beteg). A 14 lány és 16 fiú ALL-es beteg életkora 2-től 16 éves korig terjedt, 7,4 év átlagéletkorral. Hat beteg T-sejtes, 24 B-sejtes (22 pre-B-ALL és két érett B-ALL) immunfenotípusú volt. A betegek legfontosabb klinikai adatait az 1. táblázatban foglaltuk össze.

Hagyományos citogenetika

A diagnózis idején 24 órás stimulálatlan tenyésztést végeztünk a csontvelői sejtekből standard technikával (8). GTG sávozás (Giemsa-sáv tripszinemészttel és

Giemsa-festéssel) után az értékelést Cohu CCD kamerával (Herrsching, Németország) felszerelt mikroszkóppal (Axioskop 2 Mot Plus, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Németország) végeztük. A metafázis képeket PSI Cytovision 3.6 (Scientific Systems, UK) szoftverrel dolgoztuk fel. A kariotípust a nemzetközileg elfogadott ISCN 2005-ös nomenklátúra (25) alapján írtuk le 20–25 metafázis alapján.

FISH vizsgálatok

A FISH vizsgálatokat csontvelői sejtszuszpenzióból a diagnóziskor végeztük el. Az LSI TEL/AML1 ES, DC (extra szignálú dupla color), az LSI BCR/ABL DC, DF (dupla color és fúzió) transzlokációs próbákat, az LSI p16 (9p21) SpectrumOrange/CEP9 SpectrumGreen delecíós próbát valamint az LSI MLL DC, BAR „hasadt gén” próbát a Vysis cégtől (Abbot GmbH and Company, KG, Németország) szereztük be. A TEL/AML1 és a BCR/ABL fúziós próbák alkalmasak a 12p13, a 21q22-es, illetve a 22q11 és 9q34 régiók kópiaszámának azonosítására, valamint következtetni lehet az érintett kromoszómák aneuploidijára is. Az LSI p16 (9p21)/CEP9-es próba 9p-delecíót és a 9-es kromoszóma számbeli eltéréseit identifikálja. Az LSI MLL szonda a „mixed lineage leukémia” gén hasadását azonosítja. Egyes betegeknél kiegészítő FISH vizsgálatokat végeztünk Iso 17q (MPO/p53), X kromoszóma Alpha satellite DXZ1, MYC/IGH t(8;14) (QBI)Ogene, Franciaország) és CEP12 (D12Z3) Spectrum Green (Vysis) próbákkal. A FISH vizsgálatokat kisebb módosításokkal (9) a cég ajánlása alapján végeztük el.

Az eredményeket Hamamatsu C 4800 CCD kamerával (Herrsching, Németország) felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal (Axioskop 2 Mot Plus, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Németország) értékeltük. A FISH képeket Cytovision 3.6 (Applied Imaging, UK) szoftverrel dolgoztuk fel. A FISH jeleket 100–200 interfázisos sejtmagban számoltuk meg, metafázisok értékelésére csak akkor került sor, ha azok rendelkezésre álltak a hibridizációs területen.

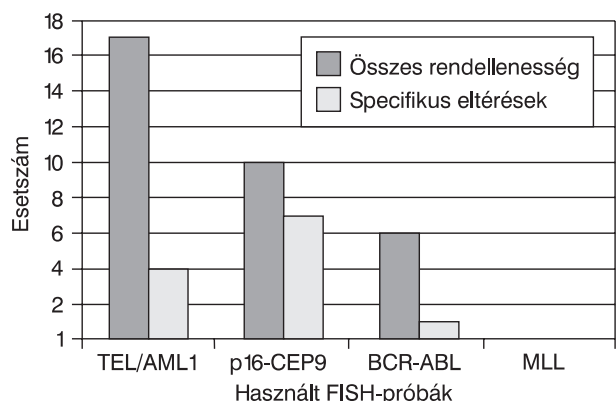
EREDMÉNYEK

Az 1. táblázatban a vizsgált 30 gyermekkori ALL-es beteg citogenetikai és FISH vizsgálati eredményét foglaltuk össze. Az esetek 93%-ában értékelhető metafázisokat nyertünk. Rutin citogenetikai (G-sávós módszer) vizsgálat során a betegek felében, ezt molekuláris citogenetikai vizsgálattal kiegészítve a gyermekek 70%-ában azonosítottunk klonális aberrációt.

A 15 kóros kariotípusú esetből 6 hiperdiploid, 5 pseudodiploid, egy közel tetraploid és egy hipodiploid volt. Gyermekkori ALL-re jellemző specifikus hiperdiploid B kariotípust 4 esetben (1. táblázat, 11., 17., 20. és 29. beteg) azonosítottunk hagyományos citogenetikával. A hiperdiploid B betegek kromoszómamintázata nem volt egységes, de mindegyikben három vagy háromnál

1. táblázat. A vizsgált ALL-es betegek klinikai adatai, citogenetikai és interfázis-FISH eredményei.
A FISH vizsgálatokat a TEL/AML1 fúziós génre, a 9-es centromérára, a p16 (9p21) régióra,
a Philadelphia kromoszómára és az MLL génre vonatkozóan összesítettük.

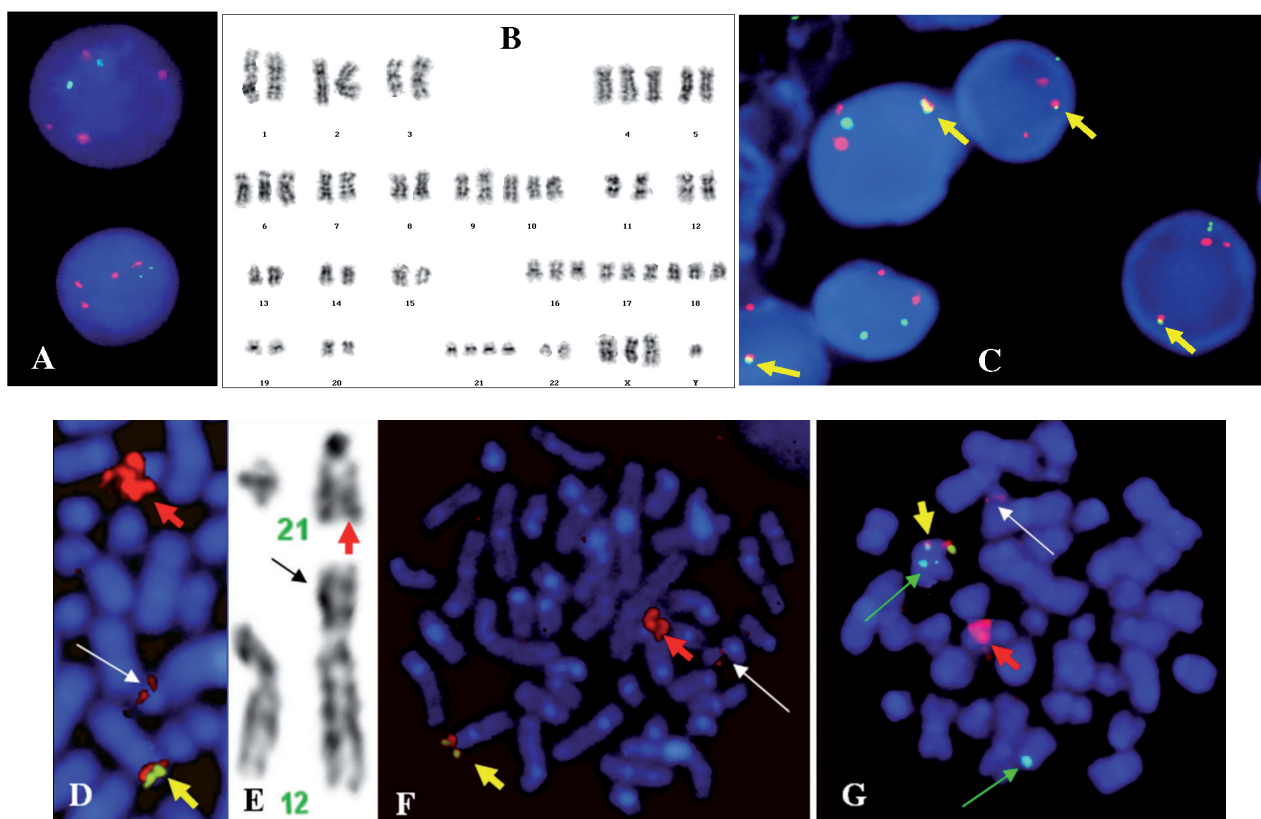
Eset	Kor/nem	FAB csoport	Immun-fenotípus	Fvs. szám x109L	Citogenetikai vizsgálat eredménye	TEL/AML1	p16 (9p21)/CEP9	ABL/BCR	MLL
1.	4/M	L1,2-LR	PreB	3,6	sikertelen	AML1++++	-	-	-
2.	5/M	L1-LR	PreB	69,9	47,XY,del(9)(p13),+21[10]/46,XY[10]	AML1+++	del(9p21)	-	-
3.	14/M	L1-HR	T-ALL	35,6	46,XY,del(9)(p11)[10]/46,XY[12]	normális	del(9p21)	-	-
4.	2/F	L2-MR	PreB	44,5	46,XX[20]	normális	del(9p21)	-	-
5.	16/F	L1-HR	T-ALL	72	46,XX,t(8;14)(q24;q11)[12]/46,XX[8]	normális	normális	neg	-
6.	3/F	L1-MR	PreB	46	46,XX[21]	normális	normális	-	-
7.	3/F	L1-MR	PreB	64,2	46,XX[19],48,XX,+ mar1, mar2[2]	fúzió	normális	-	-
8.	6/M	L1-HR	T-ALL	37,1	46,XY[25]	normális	normális	neg	neg
9.	4/F	L1-SR	PreB	12,4	46,XX[20]	fúzió	normális	-	-
10.	9/M	ALL-rec L1	PreB	7,8	46,XY[23]	AML1+++ /++++	normális	neg	neg
11.	10/M	L1--MR	PreB	24,1	51-52,XY,+X,+6,i(10)(q10),+14,+15+21,+21,+mar [cp5]/46,XY[18]	AML1++++ [80/100]	normális	neg	neg
12.	2/M	L3	Érett B		46,XY,t(8;14)(q24;q32)[23]/46,XY[2]	normális	normális	-	-
13.	10/F	L1-HR	T-ALL	298,2	46,XX[20]	normális	normális	neg	neg
14.	9/F	L1-MR	PreB	29,1	46,XX[22]	fúzió	del(9p21)	neg	neg
15.	6/M	L1-MR	PreB	2,6	47,XY,t(1;19)(q23;p13),+5[19]/46,XY[5]	normális	normális	neg	neg
16.	10/F	L1-MR	PreB	1,66	1p34,4q21,8q24,12q13,14q32 töréspontokat érintő komplex átrendeződés,del(3)(q21),del(17)p(13)	normális	normális	neg	neg
17.	3/M	L1-MR	PreB	37,7	55,XY,+X,+6,+10,+13,+14,+17,+18,+21,+21[10]/46,XY[10]	AML1++++	normális	ABL++++	neg
18.	4/M	L1-MR	PreB	40,7	46,XY[26]	normális	normális	neg	neg
19.	13/M	L1-HR	T-ALL	395	46,XY[20]/47,XY,+mar[2]	normális	del(9p21)	neg	neg
20.	3/F	L1-SR	PreB	20	57,XX,+X,+4,+6,+9,+14,+17,+18,+19,+21,+21[10]/46,XY[10]	AML1++++	CEP9/p16+++	ABL+++	neg
21.	7/M	ALL-rec L1,2	PreB	34,2-	46,XY,der(21)add(21)(q22)	fúzió; TEL deléció AML1++++	normális	neg	neg
22.	4/M	L1,2-SR	T-ALL	5,6	46,XY[21]	normális	normális	neg	neg
23.	7/F	L1-MR	PreB	6,1	sikertelen	normális	normális	neg	neg
24.	7/M	L1-HR	PreB	49,1	45,XY,inv(9)(p11q23)c,t(9;22)(q34;q11),-17[21]	normális	del(9p21)	fúzió	neg
25.	11/F	ALL-rec L1	PreB	4,1	46,XX,[21]	normális	normális	neg	neg
26.	11/F	L1-HR	PreB	49,1	46,XX[20]	TEL deléció	normális	neg	neg
27.	11/F	L1-MR	PreB	20,6	46,XX[21]	normális	normális	neg	neg
28.	10/F	L1-MR	PreB	10,5	46,XX[25]	normális	normális	neg	neg
29.	6/M	L2-SR	PreB	3,6	56-58,XY,+X,+4,+5,+6,+8,+10,+12,+15,+17,+18,+21,+21,+22[cp7]/46,XY[14]	AML1++++ TEL+++	del(9p21)	BCR+++	neg
30.	11/M	L2-MR	PreB	2,7	Közel tetraploid, szerkezeti elváltozással (iso(9q). Modális kromoszómaszám 84	AML1++++++ / TEL+++	del(9p21)	BCR+++ ABL+++	neg



1. ábra. Az I-FISH vizsgálati eredmények grafikus ábrázolása. A sötét színű oszlopok a nevezett próbákkal végzett hibridizációval feltárt rendellenességek számát, a világos színű oszlopok a keresett specifikus eltérések számát jelölik

több 21-es kromoszómát, számfeletti X és 6-os kromoszómát azonosítottunk. A hiperdiploid A betegeknél (2. és 15. eset) a 21-es, az 5-ös volt a számfeletti kromoszóma. Egy betegnél (30.) a modális kromoszómaszám 84 volt, amely a leukémiákban ritkán előforduló, közel tetraploid kariotípusnak felel meg. A hipodiploiditást a 17-es monoszómia okozta (24. beteg). A G-sávós kromoszómákon látható ALL-specifikus transzlokációk (5., 12., 15. és 24. beteg) a következők voltak: t(8;14)(q24;q11), t(8;14)(q24;q32), t(1;19)(q23;p13) és a t(9;22)(q34;q11). Több kromoszómát érintő komplex átrendeződést három betegnél azonosítottunk (11., 16. és 30. eset).

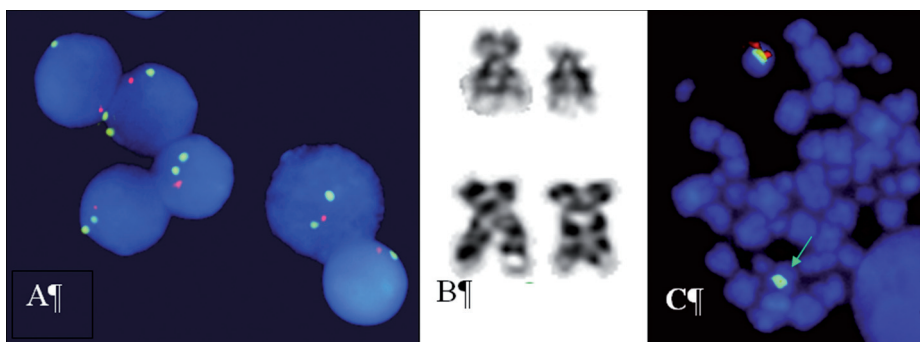
A FISH-próbákkal végzett vizsgálati eredmények az 1. ábrán láthatók. A vizsgált betegeknél az AML1 gén emelkedett kópiaszáma volt a leggyakoribb rendellenesség (30%) (2.A ábra), mely összhangban volt a



2. ábra. A TEL/AML1 FISH-próbával feltárt rendellenességek illusztrálása. A. Az interfázisos magok 25%-ában látható AML1 gén 4 különálló kópiája (piros jelek) irányított a 23 G-sávós metafázis alapján meghatározott normális kariotípus átértékelésére (10. beteg). Nagyobb számú osztódó sejt analízisével és a káros metafázisok célzott keresésével igazolódott a hiperdiploid B kariotípus (B) klonális jelenléte az 5 év után recidivált betegnél. C. A TEL/AML1 fúziós gén zöld-piros FISH-mintázatát sárga nyíllal jelöltük. A normális vad típusú AML1 allélt egy nagyobb, a reziduálisat egy kisebb piros jel azonosítja. A szabad zöld jel az ép 12-es kromoszóma TEL génjét identifikálja. A képen egy normális mintázatú (nyíl nélküli) sejtmag is látható (9. beteg). A 21. betegnél (D,E,F,G) a G-sávós 21-es kromoszómán látható többlet (E ábra, fenn) a FISH vizsgálat az AML1 gén amplifikációjaként azonosította (piros nyíl). A sárga nyíllal a TEL/AML1 fúziós gént jelöltük (zöld-piros jel). A derivátum 21-esen (fehér nyíl) a transzlokációban résztvevő piros AML1 gén „maradéka” látható. A transzlokációban részt nem vevő, homológ 12-es kromoszóma TEL génje elveszett (a metafázis FISH-mintázatából hiányzik a második zöld jel). A G ábrán a 12-es kromoszóma zöld színű centroméra-specifikus (CEP12) és a TEL/AML1 próba együttes hibridizációja szokatlan FISH-mintázatot igazol: a fúziós gén nem a 21-es kromoszómán látható, hanem a zöld nyíllal jelölt 12-es kromoszóma egyikén

G-sávós kariotípus 21-es kromoszóma tri-, tetra-, illetve pentaszómiájával. A 10. betegnél 23 metafázis értékelése normális kariotípust eredményezett és csak az interfázisos magok 25%-ában látható 3–5 különálló AML1 szignál vezetett a célzottan keresett hiperdip-

loid B metafázisok utólagos azonosításához (2.B ábra). A betegség diagnosizálkor hiperdiploid B kariotípust azonosítottunk. Az öt évvel későbbi relapszus idején a hiperdiploid B kariotípusban szerkezeti elváltozás is látható volt. A 30. betegnél az AML1 gén hat kópiája



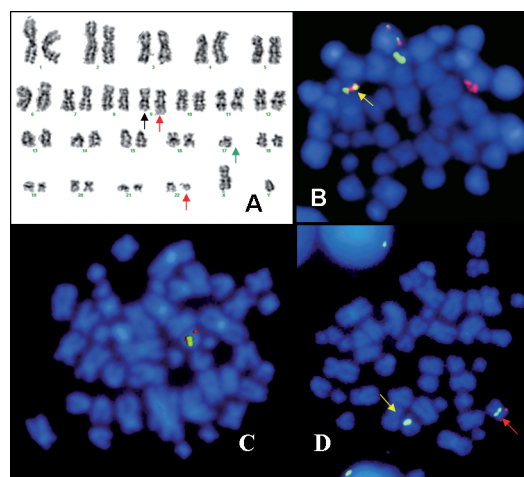
3. ábra. A 9p21 tumorsuppresszor deléciós régió vizsgálatának illusztrációja. A. A p16/CEP9 dual color próbával végzett FISH vizsgálat normális 9-es kromoszóma centromérát (2 zöld jel) és a p16 tumorsuppresszor régió delécióját (1 piros jel) azonosította az interfázisos magokon a normális kariotípusú 14. betegnél. A p16 tumorsuppresszor régió vesztése G-sávval csak akkor volt detektálható, ha a 9-es kromoszóma rövid karjának egy nagyobb szegmense hiányzott (B fent, 3. beteg). A 4. beteg G-sávós 9-es kromoszómáin (B lent) nem érzékelhető a delécio, a 9p21-régióvesztést csak a célzott FISH vizsgálat mutatta ki (C, zöld nyíl)

közel tetraploid kariotípussal társult. A gyermekkori ALL-re jellemző leggyakoribb rejtett rendellenességet, a t(12;21)-es transzlokációt 4 betegnél azonosítottuk (7., 9., 14. és 21.) (2.C ábra). A 12-es kromoszóma egyik TEL génjének delécióját két betegnél detektáltuk (21. és 26.), egyiknél ez az egyedüli anomália volt. A 21. betegnél az AML1 gén amplifikációját detektáltuk a derivátum 21-es kromoszómán, a homológ AML1 gén a t(12;21)-es transzlokációban vett részt és a homológ 12-es kromoszóma TEL génje deletálódott (2.D–F ábra).

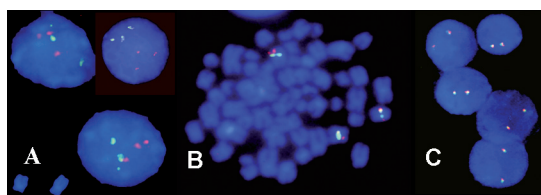
Említésre méltó, hogy a TEL/AML1 fúziós termék nem a megszokott helyén, a derivátum 21-esen volt látható, hanem a derivátum 12-es kromoszómára transzlokálódott, melyet 12-es centroméra és TEL/AML1 fúziós próba együttes hibridizációjával igazoltunk (2.G ábra). A G-sávós derivátum 21-es nagy akrocentrikus kromoszómaformát mutatott (2.E ábrán piros nyíllal jelölve), csak a specifikus FISH-próba azonosította az AML1 gén tandem jellegű ismétlődését, sejtenként változó, nehezen meghatározható kópiaszámmal (2.D,F,G ábrán piros nyíllal jelölve).

G-sávval azonosítható, INK4 lókuszt érintő 9p-delécio két betegnél fordult elő, a másik 6 esetben csak a FISH vizsgálat identifikálta a rejtett deléciót (3. ábra). Két betegnél (3. és 4.) volt egyedüli anomália, kettőnél (2. és 29.) hiperdiploid, egynél (30. eset) közel tetraploid kariotípussal, illetve egynél (14.) a TEL/AML1 fúziós génnel társult. A 24. betegnél a konstitucionális pericentrikus inverziós 9-es kromoszóma 9p21-delécióját azonosítottuk, a homológ 9-es pedig a t(9;22)-transzlokációban vett részt. Ennél a betegnél a Philadelphia kromoszómához a 17-es kromoszóma monoszómiája is társult (4. ábra).

A FISH-próbákkal végzett hibridizáció 9 betegnél azonosított egy vagy több szám feletti kromoszómát. Az 1. betegnél nem sikerült a citogenetikai véleményhez elegendő metafázist összegyűjteni. A talált négy metafázisból egy 58-as kromoszómaszámú volt. Ennél a fiú betegnél az interfázis-FISH vizsgálattal azonosított négy különálló AML1-kópia valószínűsítette a hiperdiploid kariotípust, melyet az X-centroméra-próbával elvégzett kiegészítő FISH vizsgálat (két X-centroméra jelenléte) is megerősített. A 10. betegnél a G-sávós ka-



4. ábra. A 24. beteg komplex citogenetikai eltéréseinek vizsgálata. A G-sávós kariotípzálás (A) a 9;22-es transzlokáció (piros nyíl) mellett a 17-es monoszómiát (zöld nyíl) és a 9-es kromoszóma inverzióját (fekete nyíl) azonosította. A célzott FISH vizsgálat igazolta a Philadelphia kromoszómát (B, sárga nyíl), a p53 tumorsuppresszor régió vesztését (C, egy zöld 17p12-p13 lókuszt jel) és azonosította a p16 rejtett delécióját (D, két zöld centroméra és egy piros p16 lókuszt jel, a deletált 9-es sárga, a normális piros nyíllal jelölve)



5. ábra. A lókuszt-specifikus próbákkal végzett hibridizáció a kevés számú vagy rossz minőségű metafázisok esetén is egyértelművé tette a jó prognózisú hiperdiploid kariotípust vagy metafázisok hiányában kizárta a rossz prognózisú MLL gén érintettségét. A 20. betegnél 3 piros ABL-, 3 zöld BCR-jel (A), 3 zöld 9-es centroméra, 3 piros p16 (B) 9-es és 22-es triszómiát igazol. A 23. beteg esetében (C) az interfázisos magokban ép MLL gén látható

riotípus normálisnak bizonyult és csak a nagyobb számú interfázisban lévő magok FISH vizsgálata hívta fel a figyelmet a visszatérő hiperdiploiditásra. A vizsgált betegek MLL gént érintő rendellenességet nem találtunk (5. ábra).

MEGBESZÉLÉS

Célunk a vizsgált 30 leukémiás gyermeknél a kezelés és a prognózis szempontjából kulcsfontosságú specifikus citogenetikai eltérések kimutatása volt. A sikeres tenyésztések ellenére a hagyományos citogenetikai módszerrel csak a betegek felében sikerült kromoszómaaberrációt kimutatni. Ennek egyik oka az lehet, hogy az akut limfoid leukémiás csontvelőtenyészet általában nehezen sávozható, szegényes morfológiájú kromoszómákat eredményez. Különösen a hiperdiploid metafázisokra jellemző az átlag alatti technikai minőség. Előfordulhat, hogy „in vitro” környezetben csak a normális sejtek osztódnak, esetleg csak a szép, „megbízható” metafázisok „vadászásával” éppen a kóros osztódások kimaradnak az értékelésből. Másik ok az, hogy a hagyományos citogenetika nem elég érzékeny módszer bizonyos rejtett rendellenességek kimutatására. A G-sávós technikával nem azonosítható aberráció például a t(12;21)-es transzlokáció, melynél közel azonos nagyságú és mintázatú kromoszómaszegmensek cserélődnek ki az érintett kromoszómák között, a 9p21-es mikrodélécio vagy az MLL gén bizonyos kromoszómapartnerekkel történő fúziója. A hagyományos és a molekuláris citogenetika kombinálásával a betegek csaknem háromnegyedénél sikerült ALL-specifikus eltérést azonosítani. Az I-FISH vizsgálat a betegek 30%-ában tárt fel a prognózis szempontjából jelentős rejtett kromoszóma-rendellenességet. A G-sávós kariotipizálással a betegek 19%-ában jutottunk többletinformációhoz. Az I-FISH gyors és érzékeny módszer, mely lehetővé teszi az osztódó és nem osztódó sejtek egyidejű értékelését és ezáltal a normális és kóros sejtfракciók arányainak feltérképezését. A G-sávós kariotípus az összkép mellett kiindulópontot nyújtott a célzott FISH vizsgálatokhoz is.

A vizsgált betegcsoportban a gyermekkori ALL-re jellemző, jó prognosztikai értékű masszív hiperdiploiditás a nemzetközi adatokkal megegyező arányban (27%) fordult elő (31), és egy beteg kivételével diagnosztizálható volt hagyományos citogenetikai vizsgálattal. A hiperdiploid B-re jellemző 8 kromoszóma non-random triszómiája, melyek gyakorisági sorrendben a következők: 21, X, 14, 6, 18, 4, 17, 10 (16). A hiperdiploid B betegek kariotípusa összhangban volt ezzel a sajátságos kromoszóma-mintázattal. A hiperdiploid B kariotípushoz „prekursor” B immunfenotípus, a CD10 common ALL antigén expressziója, kettőtől tíz évig terjedő életkor, alacsony fehérvérsejtszám és alacsony szérum-laktátdehidrogenáz-szint társul. Nagyszámú B-sejtes, hiperdiploid B kariotípusú gyermekkori ALL eset statisztikai értékelése alapján a jó prognosztikai hatás inkább bizonyos „jó” triszómiákkal áll összefüggésben (27, 46), mint önmagában az emelkedett kromoszómaszámmal. Bizonyos munkacsoportok a 4-es, 10-es, 17-es (12, 47) triszómia együttes előfordulásánál számoltak be kiemelkedően jó terápiás sikerről, a legpozitívabb prediktív értéket (15) a 10-es triszómia esetében figyelték meg.

A 47 és 51 közötti hiperdiploid A kariotípusnak közepes a prognosztikai értéke, nincsenek jellegzetesen társuló „jó” klinikai értékei és a kromoszómatöbblet-mintázat sem annyira jellemző, mint a hiperdiploid B kariotípusnál. A 15. betegnél ALL-ben rendkívül ritka, rossz prognosztikai értékű 5-ös triszómiát (13) a t(1;19)-es transzlokációt hordozó klónban azonosítottuk.

Mindkét hiperdiploid csoportra jellemző a 21-es kromoszóma kópiaszám-növekedése, mely az általunk vizsgált hiperdiploid betegek 90%-ában is megfigyelhető volt. Éppen ezért a 21-es kromoszóma AML1 génjének kópiaszáma révén a t(12;21)-es transzlokációs próba kiválóan alkalmas a hiperdiploiditás azonosítására, mivel nagyszámú interfázisos magban történő megszámlálásával lehetőséget nyújt az in vitro körülmények között nem osztódó populációk feltérképezésére.

A hiperdiploid kariotípus átlagosnál jobb prognózist a 21-es kromoszómán lévő, methotrexat-transzportert kódoló gén emelkedett dózisával is összefüggésbe hozták (31). A fokozott génexpresszió lehetővé teszi nagyobb mennyiségű methotrexat felhalmozódását a leukémiás blasztokban.

Klinikánkon a hiperdiploid betegcsoport alacsony vagy közepes rizikójú besorolásnak megfelelő terápiában részesült, valamennyien remisszióban vannak. A 10. beteg a recidíva utáni első remisszióban sikeres testvér-donoros transzplantáción esett át.

A több mint 80 kromoszómával jellemezhető „közel tetraploid” kariotípus a gyermekkori ALL-ek 1%-ában fordul elő. Rutin citogenetikával nehéz diagnosztizálni, mivel a mitózisok a rövid sejtenyészetekben gyakran előforduló, gyenge morfológiájú poliploid osztódásokra emlékeztetnek, tenyésztési „műtermékeknek” tűnhetnek. A 30. betegnél az I-FISH vizsgálat a magok 75%-ában igazolta a TEL, BCR, ABL és AML1 gének emelkedett kópiaszámát, ami összhangban volt a metafázisokban látható kromoszómaszámmal. Bár biológiailag a közel-tetraploiditás különbözik a hiperdiploiditástól, a retrospektív tanulmányok alapján (34) úgy tűnik, hogy a B-immunfenotípusú betegek hozzájuk hasonlóan jó prognózisúak és az alacsony rizikócsoportnak megfelelő kezeléssel gyógyíthatók. A közel-tetraploid kariotípusú beteg klinikai értékei a hiperdiploid B betegcsoportnál rosszabbak voltak (2,7×10⁹ L fehérvérsejtszám, magasabb életkor), a G-sávós kariotípusban klonális szerkezetváltozás is látható volt, az I-FISH vizsgálat 9p21-deléciót azonosított. A beteg közepes rizikójú csoportnak megfelelő terápiával jelenleg remisszióban van.

A gyermekkori B-sejtes ALL leggyakoribb rejtett transzlokációját, a t(12;21)-et a betegek 13%-ában azonosítottuk. Ez az arány megegyezik néhány nagy eset-számot átfogó tanulmányéval (1), de a 20–25%-os előfordulási gyakoriság az általánosabb (10, 17, 22, 39). A transzlokációban a 21q22 régióban térképezett a Core binding factor α (CBFA2) néven is ismert akut myeloid leukemia1 (AML1) nevű gén, valamint a 12p22 régióban azonosított „ETS-like gene” (ETV6) vagy TEL gén

vesz részt. A keletkező hibrid génben a TEL promotor régió és helix-loop-helix domén kapcsolódik az AML1 gén DNS-kötő és transzaktivációs doménjéhez. A TEL transzkripció modulátor, az AML1 gén a CBF α -CBF β transzkripció komplex „ α ” alegységét kódolja és számos vérképzéssel kapcsolatos gén transzkripció aktivátora. A fúziós protein az AML1-target gének rendellenes szabályozásával váltja ki a leukémiás folyamatot. Ez a nemrég azonosított (38) transzlokáció általában kedvező életkorral és klinikai jellemzőkkel társuló, jó prognosztikai értékű elváltozás (45). Az első tanulmányok a TEL/AML1-pozitív betegek tartósabb komplett remissziójáról (56 vs. 26 hónap), de a késői relapszus veszélyéről számoltak be (42, 43). Hosszabb követésről szóló átfogó tanulmányok azonban csak az utóbbi években születtek. A retrospektív tanulmányok alapján a TEL/AML1-pozitív gyermekek relapszusmentes túlélése függ a rizikócsoportokba történő besorolási szempontoktól és az alkalmazott terápiás protokolltól (21). A TEL/AML1-pozitív limfoblasztok rendkívül érzékenyek az L-aszparaginázra, de jól reagálnak a szteroidokra és a vincristinre is (19, 36). Azok a TEL/AML1-pozitív gyermekek, akiket olyan terápiás protokoll szerint kezeltek, mely az intenzifikációs kezelés alatt több L-aszparagináz tartalmazott, elérték a 97%-os ötéves ösztülési rátát (20). A transzlokációhoz gyakran társul a homológ TEL gén deléciója, melynek funkcióvesztése a leukémiás transzformáció folyamatában játszhat szerepet (48), a terápia sikerességét lényegesen nem befolyásolja (33). A TEL-deléció egy betegnél – aki jelenleg remisszióban van – egyedüli anomália volt, a másik betegnél negatív prognosztikai hatású elváltozásokkal társult (a 26., illetve a 21. betegnél).

Egy TEL/AML1 fúziós gént hordozó betegnél p16-deléciót is azonosítottunk (14. eset), eddig három ilyen esetről jelent meg irodalmi közlés (1, 2, 29). A p16 tumorsuppresszor gén hiánya apoptózisgátló és kemorezisztenciát kiváltó hatásával mindenképpen csökkenti a TEL/AML1-transzlokáció pozitív prognosztikai hatását (29).

A TEL/AML1-pozitív betegek, egy kivételével, ez idáig teljes remisszióban vannak. A 21. beteget elvesztettük. Ennél a betegnél a t(12;21)-es transzlokáció sem volt szokványos, mivel a TEL/AML1 fúziós termék a 12-es kromoszóma rövid karjának terminális végére transzlokálódott és a transzlokációban résztvevő gének homológjai is érintettek voltak. Az egyik 12-es kromoszóma TEL génje és az egyik 21-es kromoszóma AML1 génje a TEL-AML1-fúzióban vett részt, miközben a homológ TEL gén deletálódott és a homológ 21-es AML1 gén amplifikálódott a derivátum 21-esen. A 21-es intrakromoszomális amplifikáció (iAMP21) azonosítása csak újabban, a FISH módszer alkalmazása óta vált lehetővé (11). A Mitelman adatbázisban (26) szereplő esetek zömét az utóbbi 2–3 évben írták le, és csak egyetlen olyan esetet regisztráltak, ahol az TEL-AML1 fúziós gén az AML1 gén amplifikációjával társul (24). Az amplifikáció a TEL-AML1 gyári próbával metafázisos

kromoszómákon biztonsággal kimutatható, azonosítása azért fontos, mert ez a citogenetikai elváltozás a többi klinikai értéktől független negatív prognosztikai mutató, magas rizikójú (HR) besorolás szerinti kezelést és lehetőleg az első remisszióban történő csontvelő-transzplantációt igényel (28). Mivel az iAMP21 az átlagosnál háromszor nagyobb relapszusokkockázattal és szignifikánsan alacsonyabb esemény nélküli túléléssel (EFS; 29%) jár, a gyermekkori B-sejtes ALL új különálló citogenetikai alcsoportjaként határozták meg (28, 36, 37). Betegünket a harmadik recidíva után vesztettük el a betegség progressziója miatt, transzplantációra alkalmas donora nem volt.

Az I-FISH optimális technikának bizonyult a 9p-mikrodeléció detektálására is (3. ábra). G-sávok karyotípus-elemzéssel a betegek 7%-ában, I-FISH vizsgálattal 20%-ában azonosítottuk a p16-deléciót. A 9p21 régióban kódolt INK4 fehérjék (p16INK4a, p16INK4b, p14ARF) a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó ciklinfüggő kinázgátló csoportba tartoznak. Funkcióvesztésük lehetővé teszi, hogy a retinoblastoma és a TP53 út ellenőrző pontjain a sejtek génhibával együtt akadálytalanul tovább jussanak és osztódjanak. A p16-deléció ismert humán tumorokban, leukémiákban viszonylag ritka, gyermekkori (elsősorban a T-sejtes) ALL-ben egyike a leggyakoribb rejtett rendellenességeknek. A vizsgált betegeknek a p16-deléció volt a második leggyakoribb rendellenesség, de egyelőre nem elég hosszú a követési idő ahhoz, hogy prognosztikai hatását értékeljük. Az a tény, hogy a deléció hétből öt betegnél más citogenetikai eltérésekkel társult, igazolja azt a feltevést, hogy a deléció olyan másodlagos elváltozás lehet, mely a betegség progressziójában játszik szerepet (18).

Az eddigi irodalmi adatok a deléció prognosztikai hatásával kapcsolatosan ellentmondásosak (23), ami azzal állhat összefüggésben, hogy a deléciós státusz a sejtek kemoterápiás szerekekkel szembeni érzékenységét is befolyásolja (6, 44). A deléció gyakran társul hátrányos klinikai adatokkal (magas fehérvérsejtszám, T-immunfenotípus, mediasztinális érintettség), ilyenkor az eseménymentes túlélési ráta az átlagosnál rövidebb (14). A leggyakoribb relapszust a bi-allélikus delécióknál figyelték meg. A deléciót hordozó és HR besorolású betegeknek az alternatív terápia (öszejt-transzplantáció) már az első remisszióban megfontolandó (5).

A gyermekkori leukémiákban viszonylag ritkán (3%) előforduló Philadelphia (Ph) kromoszóma negatív prognosztikai hatása a gyermekek esetében mérsékeltebb, mint a felnőtteknél. A közelmúltban bevezetett transzlokáció-specifikus kezelés (imatinib-mezilát) kemoterápiával kombinálva egyre hosszabb eseménymentes túlélést biztosít. A Philadelphia kromoszóma-pozitív hét éves gyermeknél a fokozott tirozinkináz-aktivitású BCR-ABL fúziós gén negatív prognosztikai hatását két, a normális vérsejtek képződésében kulcsszerepet játszó tumorsuppresszor gén, a p53 és p16 elvesztése súlyosbította, a beteg életkora pedig enyhítette. A Ph kromoszóma prognosztikai hatása életkorfüggő, a negatív ha-

tás az életkorral nő, legsikeresebb terápiás eredményt az 1–9 éves életkor közötti betegeknél érték el (3). E beteg ALL-BFM-IC-2002 protokoll HR szerinti kezelésben részesült, jelenleg remisszióban van.

Az interfázis-FISH vizsgálatot optimálisnak tartjuk a gyermekkori ALL citogenetikai vizsgálatának kiegészítésére. Az I-FISH a hagyományos citogenetikánál érzékenyebb módszer, kevés mintából, osztódó és nem osztódó sejtekből egyaránt lehetővé teszi a specifikus aberrációk azonosítását, alkalmas a G-sávok kariotípus megerősítésére és esetleges korrekciójára is. Más módszerek, mint például a CGH vagy a multicolor-FISH is célravezetőek a rejtett számbeli és szerkezeti rendellenességek feltárására. Csakhogy a multicolor-FISH a mitotikusan aktív sejtek értékelésére ad lehetőséget, a CGH elemzéssel a kisebb kóros populációt a nagyobb, normális populáció maszkírozhatja.

A gyermekkori ALL genetikai eltéréseinek azonosításához az alkalmazott FISH-próbák informatívak voltak. A TEL/AML1-próba segítségével identifikáltunk két jó prognózisú betegcsoportot, a 12;21-es transzlokációt hordozót és a hiperdiploidot, melyek a betegek közel felét érintették. A próba hasznosnak bizonyult egy közismerten jó prognózisú (TEL/AML1-fúzió) és egy negatív prediktív értékű elváltozás (iAMP21) szimultán előfordulásának azonosítására is. Az MLL- illetve a BCR/ABL-próbákkal a rossz prognózisú, hagyományostól eltérő terápiát igénylő genetikai eltéréseket tudtuk kizárni. A CEP9/p16-próbával 6 esetben azonosítottunk rejtett deléciót, a 9p21 tumorszuppresszor régió elvesztése volt a második leggyakoribb rendellenesség. Bár a prognosztikai hatására vonatkozó adatok nem egybehangzóak, a többi klinikai adat függvényében fontos kórjóslati tényező. Az I-FISH vizsgálat kiegészítette és megerősítette a G-sávok citogenetikai eredményeket, a kettő együttes alkalmazása a gyermekkori leukémiák genotípus-meghatározásának hatékony és korszerű eszköze. Ugyanakkor a FISH alkalmazásakor figyelembe kell venni a technika korlátait is: nem az egész kariotípusról kapunk információt, hanem csak célkérdésekre célválaszokat, a kromoszómák közti aberrációk azonosításához elméleti és/vagy előzetes kariotipizálásból származó információk szükségesek.

IRODALOM

1. Andreasson P, Hoglund M, Bekassy AN, et al. Cytogenetic and FISH studies of a single center consecutive series of 152 childhood acute lymphoblastic leukemias. *Eur J Haematol* 65:40–51, 2000
2. Anguita E, Gonzalez FA, Lopez J, Villegas A. TEL/AML1 transcript and p16 gene deletion in a patient with childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 99:240–241, 1997
3. Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 342:998–1006, 2000
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33:451–458, 1976
5. Calero Moreno TM, Gustafsson G, Garwicz S, et al. Deletion of the Ink4-locus (the p16ink4a, p14ARF and p15ink4b genes) predicts relapse in children with ALL treated according to the Nordic protocols NOPHO-86 and NOPHO-92. *Leukemia* 16:2037–2045, 2002
6. Chen ZH, Zhang H, Savarese TM. Gene deletion chemoselectivity: codeletion of the genes for p16(INK4), methylthioadenosine phosphorylase, and the alpha- and beta-interferons in human pancreatic cell carcinoma lines and its implications for chemotherapy. *Cancer Res* 56:1083–1090, 1996
7. Graf Einsiedel H, Taube T, Hartmann R, et al. Prognostic value of p16(INK4a) gene deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 97:4002–4004, 2001
8. Haltrich I, Müller J, Szabó J, et al. Donor cell myelodysplastic syndrome developing 13 years after marrow grafting for aplastic anemia. *Cancer Genet Cytogenet* 142:124–128, 2003
9. Haltrich I, Kost-Alimova M, Fekete G, et al. Multipoint-FISH in childhood T-cell-lineage ALL detects subpopulations that carry 3q trisomies or deletions in the DUTT1/ROBO1 tumor suppressor gene region at 3p12-p13. *Cancer Genet Cytogenet* 172:54–60, 2007
10. Harbott J, Viehmann S, Borkhardt A, et al. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood* 90:4933–4937, 1997
11. Harewood L, Robinson H, Harris R, et al. Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. *Leukemia* 17:5475–5453, 2003
12. Harris MB, Shuster JJ, Carroll A, et al. Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 79:3316–3324, 1992
13. Harris RL, Harrison CJ, Martineau M, et al. Is trisomy 5 a distinct cytogenetic subgroup in acute lymphoblastic leukemia? *Cancer Genet Cytogenet* 148:159–162, 2004
14. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, et al. Association of chromosome arm 9p abnormalities with adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Cancer Group. *Blood* 94:1537–1544, 1999
15. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, et al. Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *J Clin Oncol* 18:1876–1887, 2000
16. Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, et al. Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 46:684–693, 2007
17. Hrusak O, Trka J, Zuna J, et al. Are we ready to curtail testing for TEL/AML1 fusion? Pediatric Hematology Working Group in the Czech Republic. *Leukemia* 13:981–983, 1999
18. Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Secondary chromosomal abnormalities in acute leukemias. *Leukemia* 8:953–962, 1994
19. Krishna Narla R, Navara C, Sarquis M, Uckun FM. Chemosensitivity of TEL-AML1 fusion transcript positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 41:6156–6123, 2001
20. Loh ML, Goldwasser MA, Silverman LB, et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. *Blood* 107:4508–4513, 2006
21. Loh ML, Rubnitz JE. TEL/AML1-positive pediatric leukemia: prognostic significance and therapeutic approaches. *Curr Opin Hematol* 9:345–352, 2002
22. McLean TW, Ringold S, Neuberger D, et al. TEL/AML1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 88:4252–4258, 1996
23. Mirebeau D, Acquaviva C, Suciu S, et al. The prognostic significance of CDKN2A, CDKN2B and MTAP inactivation in B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. Results of the EORTC studies 58881 and 58951. *Haematologica* 91:881–885, 2006
24. Mikhail FM, Serry KA, Hatem N, et al. AML1 gene over-expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 16:658–668, 2002

25. ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature. Eds. Shaffer LG, Tommerup N. Karger S, Basel 2005
26. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. Eds. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. „<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>”, 2007
27. Moorman AV, Richards SM, Martineau M, et al. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 102:2756–2762, 2003
28. Moorman AV, Richards SM, Robinson HM, et al. Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). *Blood* 109:2327–2330, 2007
29. Papadhimitriou SI, Polychronopoulou S, Tsakiridou AA, et al. p16 inactivation associated with aggressive clinical course and fatal outcome in TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 27:675–677, 2005
30. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2934–2938, 1986
31. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350:1535–1548, 2004
32. Pui CH, Evans EW. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 354:166–178, 2006
33. Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, et al. 12p abnormalities and the TEL gene (ETV6) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 90:4559–4566, 1997
34. Raimondi SC, Zhou Y, Shurtleff SA, et al. Near-triploidy and near-tetraploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia: association with B-lineage blast cells carrying the ETV6-RUNX1 fusion, T-lineage immunophenotype, and favorable outcome. *Cancer Genet Cytogenet* 169:50–57, 2006
35. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, et al. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96:1094–1099, 2000
36. Robinson HM, Broadfield ZJ, Cheung KL, et al. Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome. *Leukemia* 17:2249–2250, 2003
37. Robinson HM, Harrison CJ, Moorman AV, et al. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) may arise from a breakage-fusion-bridge cycle. *Genes Chromosomes Cancer* 46:318–326, 2007
38. Romana SP, Le Coniat M, Berger R. t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 9:186–191, 1994
39. Romana SP, Poirrel H, Leconiat M, et al. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 86:4263–4269, 1995
40. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children’s Cancer Group (CCG). *Blood* 109:926–935, 2007
41. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia* 14:2205–2222, 2000
42. Seeger K, Buchwald D, Peter A, et al. TEL-AML1 fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 94:374–376, 1999
43. Seeger K, von Stackelberg A, Taube T, et al. Relapse of TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia in childhood: a matched-pair analysis. *J Clin Oncol* 19:3188–3193, 2001
44. Shah SJ, Taub JW, Witt TL, et al. Relationship of p15 and p16 gene alterations to elevated dihydrofolate reductase in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 113:746–756, 2001
45. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* 9:1985–1989, 1995
46. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, et al. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 102:2756–2762, 2003
47. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, et al. High concordance from independent studies by the Children’s Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children’s Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia* 19:734–740, 2005
48. Takeuchi S, Seriu T, Bartram CR, et al. TEL is one of the targets for deletion on 12p in many cases of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 11:1220–1223, 1997