

توصيف حالة جديدة للانتقال الكروموسومي المتغاير (9;22)t في ابيضاض الدم النخاعي المزمن CML بواسطة التهجين الموضعي التآلقي FISH

ا.م.د انتصار حسين احمد
كلية التربية -جامعة واسط

ا.م.د ظافر حسن غالي
كلية التربية -جامعة واسط

الخلاصة

يعد ابيضاض الدم النخاعي المزمن " Chronic Myeloid Leukemia (CML) " ورم نخاعي تكاثري ويصيب 1-2 شخص لكل 100000 بالغ. الامراضية الرئيسة للمرض هي تكوين اندماج جيني للجين " Abelson murine leukemia (*ABL1*) " على كروموسوم 9 مع الجين breakpoint cluster region " (*BCR*) على كروموسوم 22. وهذا يؤدي الى التعبير عن بروتين ورمي يدعى "BCR-ABL1". في هذه الدراسة، سجلت حالة جديدة متغايرة لابييضاض الدم النخاعي المزمن تحمل الانتقال الكروموسومي فلادلفيا "Philadelphia(Ph) translocation" الذي تضمن الكروموسومين 9 و22 فضلا عن كروموسوم 3. انجز التوصيف الوراثي الخلوي الجزيئي بتقنية التهجين الموضعي التآلقي "fluorescence *in situ* hybridization (FISH)" الذي اظهر وجود الاندماج الجيني $5'BCR/3'ABL1$ على كروموسوم فلادلفيا، في حين لم يشخص الاندماج الجيني $5'ABL1/3'BCR$ على مشتقة كروموسوم 9 derivative chromosome بسبب انتقال $3'BCR$ الى الكروموسوم المشارك رقم 3. تقدم هذه الدراسة تحليل وراثي خلوي جزيئي دقيق لحالة جديدة متغايرة من ابيضاض الدم النخاعي المزمن المتضمن كروموسوم فلادلفيا المعقد (9;22)t. وتؤكد الدراسة ايضا دور تحليل التهجين الموضعي التآلقي في تفسير هذه الانتقالات الكروموسومية التي هي خارج نطاق الوراثة الخلوية التقليدية.



Characterization of a new case of variant translocation t(9;22) in chronic myeloid leukemia by fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Abstract

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm with an occurrence of 1-2 cases per 100,000 subjects . Central to the pathogenesis of CML is the fusion of the "Abelson murine leukemia (*ABL1*) gene" on chromosome 9 with "the breakpoint cluster region (*BCR*) gene" on chromosome 22. This leads to expression of an oncoprotein called "BCR-ABL1". In this study a new CML case carrying variant Philadelphia(Ph) translocation involving both chromosomes 9 and 22 as well as chromosomes 3 has been reported. A detailed molecular cytogenetic characterization was performed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH), which displayed the presence of the "5'*BCR*/3'*ABL1*" fusion gene was localized on the " Ph chromosome", while the " 5'*ABL1*/3'*BCR* gene "was not detected on the derivative(9) chromosome (der9) because 3'*BCR* translocated onto partner chromosomes 3.In conclusion, a precise molecular cytogenetic characterization of one Ph CML case bearing complex t(9;22)has been analyzed . The study also stress the crucial role of FISH analysis in explanation these translocations, which is beyond the resolution power of conventional cytogenetics.

يعد ابيضاض الدم النخاعي المزمن " Chronic Myeloid Leukemia (CML) " ورم نخاعي تكاثري ويصيب 1-2 شخص لكل 100000 بالغ. ويؤلف حوالي 15% من حالات ابيضاض الدم التي تم تشخيصها حديثا [1]. بلغت حالات ابيضاض الدم النخاعي المزمن التي جرى تشخيصها في الولايات المتحدة عام 2015 حوالي 7000 حالة جديدة، وسجلت 1100 حالة وفاة بالمرض. ومنذ عام 2000 وهو العام الذي قدم فيه الدواء "Imatinib" انخفض معدل الفئائية الناجم عن المرض من 10-20 % الى 1-2 % [2]. تتعلق الامراضية الرئيسية للمرض بتكوين اندماج جيني للجين Abelson murine leukemia (ABL1) "على كروموسوم 9 مع الجين" Breakpoint cluster region (BCR) "على كروموسوم 22. وهذا يؤدي الى التعبير عن بروتين ورمي يدعى " BCR-ABL1 " [3]. . ويعد هذا البروتين BCR-ABL1 تاروسين كايينيز فعال Active tyrosine kinase الذي يسهم في النمو والتضاعف بشكل مؤثر خلال مسالك الكايينيز مثل RAS, RAF, JUN فضلا عن مسالك MYC و STAT [4-10]. وهذا يؤثر على عملية تكوين ابيضاض الدم Leukemogenesis بتكوين Cytokine-independent cell cycle التي يصاحبها اشارت موت الخلية المبرمج المعيبة التي تحدث استجابة الى سحب السايبتوكين . يدعى ابيضاض الدم من الناحية الوراثية الخلوية بكروموسوم فلادلفيا Philadelphia-chromosome (Ph chromosome) t(9;22)(q34;q11). يوصف مرض ابيضاض الدم النخاعي المزمن بكونه ثنائي الطور الذي يمتاز بطور مزمن حميد Benign chronic phase يتبعه اما طور متسارع او طور ارومي Blastic phase والذي يكون مميتا للمرضى [11-12]. وتلاحظ المتغيرات الوراثية الخلوية المعقدة لكروموسوم فلادلفيا في 5-8 % من حالات ابيضاض الدم النخاعي التي تم تشخيصها حديثا [13]. تنتقل في بعض الحالات المتغيرة للانتقال الكورموسومي t(9;22) مادة اضافية الى كروموسوم فلادلفيا ويؤدي ذلك الى تكوين كروموسوم فلادلفيا المقنع "Masked" Ph ، في حين يبدي مرضى ابيضاض الدم النخاعي المزمن الاخرون كروموسوم فلادلفيا التقليدي ومشتقة كروموسوم Derivative chromosome 9 (der 9) الشاذة نتيجة اعادة التنظيم بين مشتقة كروموسوم 9 والانتقال الكورموسومي t(9;22) وكروموسوم اخر [15-14]. من الصعب تحديد اليات حدوث اعادة التنظيم الكورموسومي تلك ، ويمكن تفسيرها على اساس حدوث انتقالات كروموسومية متسلسلة او انتقال كروموسومي مفرد [16]. ان الموقع الاكثر شيوعا للاندماج الجيني BCR/ABL في اعادة التنظيم الكورموسومي المعقد هو 22q11.2 [17] ، ولكن في حالات نادرة

ينتقل الاندماج الجيني "BCR/ABL" الى مواقع اخرى. وصفت 21 حالة متغايرة في المراجع 18 - 20 وظهر فيها الاندماج الجيني في الموقع 9q34. وشخصت اربع حالات لابيضاض الدم النخاعي المزمن ذات مواقع شاذة للجين " BCR/ABL " بتقنيات الوراثة الخلوية التقليدية والجزيئية وتمركز الاندماج الجيني عند الموقع 9q34 في ثلاث حالات التي ابدت اضافات كروموسومية شاذة ، بينما اظهرت الحالة الرابعة تحليل غريب ومعقد للنمط النووي Karyotype وتمركز الاندماج الجيني " BCR/ABL " على الموقع 5q13 [21]. تغير سير تقدم مرض Prognosis ابيضاض الدم النخاعي المزمن في اقل من عشر سنوات من كونه مرض مميت الى اضطراب حساس الى العقاقير الفموية بشكل واضح وجاء هذا التغير نتيجة الفهم العميق للأمراضية الجزيئية للمرض واسهم ذلك في اختيار ادوية متخصصة ومنقاة [22]. في هذه الدراسة ، بحثت حالة جديدة لابيضاض الدم النخاعي المزمن التي تحمل انتقال كروموسومي متغاير t(9;22) بوساطة تقنية التهجين الموضعي التآلقي "Fluorescence in situ hybridization (FISH)".

المواد وطرائق العمل

التحليل الوراثي الخلوي Cytogenetic analysis

اجري تحليل النمط النووي Karyotype analysis على خلايا نخاع العظم وفق الطريقة القياسية وانجز التحليل الوراثي الخلوي التقليدي على خلايا نخاع العظم التي زرعت لمدة 24-48 ساعة بالتقنية القياسية وقيمت بطريقة Giemsa -trypsin Giemsa banding على مستوى 400 حزمة وفق النظام الدولي للتسمية في الوراثة الخلوية للانسان "International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2009)" وتم عد عشرين طور استوائي [23].

تحليل التهجين الموضعي التآلقي FISH

اجريت دراسات التهجين الموضعي التآلقي على عينات خلايا نخاع العظم وهي بأيجاز: 500 نانوغرام من مجس التعلیم Labeled probe، واجريت تجارب التهجين بدرجة حرارة 37 درجة مئوية في محلول السترات الملحي القياسي (2XSSC) و 50% حجم/حجم من الفورمامايد Formamaide و 10% وزن/حجم من كبريتات الدكستران Dextran sulphate و 5 مايكروغرام من الـ Cot1 DNA (Bethesda Research

Sonicated salmon sperm DNA من مايكروغرام 3 Laboratories, Gaithersburg, MD), وأجري الغسل لما بعد التهجين في محلول (2XSSC - 50% فورامايد) ثلاث مرات ثم غسل بمحلول 0.1X SSC ثلاث مرات بدرجة حرارة 60 درجة مئوية. وتم التحري عن الدنا المعلم بالبايوتين بال-DEACconjugated streptavidin. في تجارب التهجين الاخرى تم تعليم المجسات الاخرى مباشرة بـ Cy5 وFluorX. وشخصت الكروموسومات بصبغة الدابي 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). وتم الحصول على الصور الرقمية بأستعمال Leica DMRXA epifluorescence microscope equipped with a cooled CCD camera (Princeton Instruments, Boston, MA). Cy3 (red; New England Nuclear, NJ), FluorX (green; Amersham, Arlington Heights, IL), Cy5 (IR; New England Nuclear), and DAPI (blue) fluorescence signals[24].

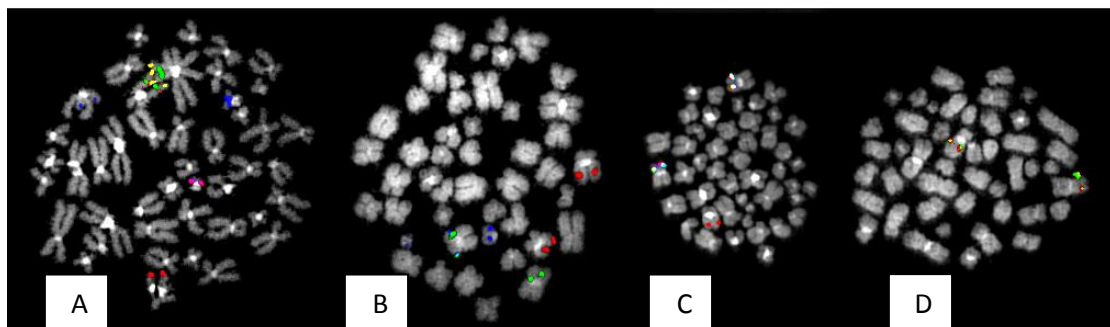
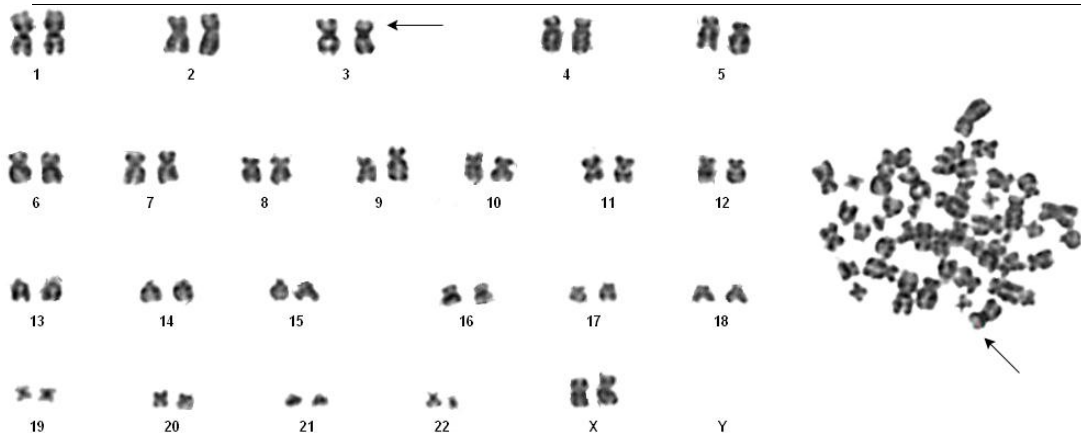
شخص الجين *ABL1* بطريقة FISH بأستعمال خليط من كروموسوم العائلي الصناعي Phage artificial *ABL1* (PAC) RP5-835J22:chromosome و RP5-1132H12 (الاحمر) الذي يتعدى منطقة تقدر بـ 40 كيلو قاعدة امام اكسون 1b الى 20 كيلو قاعدة خلف اكسون 11. استعمل كروموسوم البكتيريا الصناعي Bacterial artificial chromosome (BAC) وهو RP11-164N13 (الاخضر) لتشخيص الجين *BCR*. ان تجارب التهجين المساعد مع هذه النسيلات على الطور الاستوائي اظهر الانتقال الكروموسومي التقليدي t(9;22)(q34;q11) الذي ادى الى اشارة حمراء على الكروموسوم الطبيعي 9 و اشارة خضراء على الكروموسوم الطبيعي 22 فضلا عن اندماج للاشارتين على كل من مشتقة كروموسوم 9 وكروموسوم 22. فلادلفيا شكل 1 .

تقرير حالة

اظهر التحليل الوراثي الخلوي لحالة لابيضااض الدم النخاعي المزمن لانثى مصابة بالمرض حالة متغايرة للانتقال الكروموسومي : t(9;22)(q34;q11) (p21;q34;q11). شكل 1 .

النتائج

يوضح الشكل 1 التهجين المشترك للجين *ABL1* والجين *BCR* والذي اظهر اندماج للاشارات على كروموسوم فلادلفيا (مشتقة كروموسوم 22). فقد اظهر المجس النوعي Specific probe للجين *ABL1* اشارات تألقية على كروموسوم 9 ومشتقة الكروموسومين 9 و 22 بينما اظهر كروموسوم البكتيريا الصناعي Bacterial artificial chromosome (BAC) وهو RP11-164N13 (الاخضر) لتشخيص الجين *BCR* اشارة منفصلة على مشتقة الكروموسوم 22 و مشتقة كروموسوم 3 (نقطة الكسر الاولى على كروموسوم 22) شكل A1. وتمركزت نقطة الكسر الثانية على كروموسوم 22 داخل النسيلة RP11-248J22 التي اوضحت ثلاث اشارات على الكروموسوم الطبيعي 22 ومشتقة كروموسوم 22 ومشتقة كروموسوم 3 شكل B1. ولوحظت نقطة الكسر على كروموسوم 3 ضمن النسيلة RP11-454G10 التي اظهرت اشارات تألقية على كروموسوم 3 ومشتقة كروموسوم 3 ومشتقة كروموسوم 9 شكل C1. اما نسيلات ال-BAC: RP11-166F3 و RP11-379I8 و RP11-1029M24 و RP11-352L13 و RP11-419G15 و RP11-694I15 فقد اظهرت اشارات تألقية على مشتقة كروموسوم 9، في حين اقتصررت النسيلات: RP11-694I15 و RP11-949J7 و RP11-379L20 على اظهار اشارات تألقية على مشتقة كروموسوم 3 شكل D1.



RP5-1132H12	9, der(22), der(9)	RP11-17L7	9, der(9)	RP11-454G10	3, der(3), der(9)	RP11-1029M24	3, der(9)
PR5-835J22	9, der(22), der(9)	RP11-379L20	3, der(3)	RP11-694I15	3, der(3)	RP11-352L13	3, der(9)
RP11-164N13	22, der(22), der(3)	RP11-248J22	22, der(22), der(3)	RP11-949J7	3, der(3)	RP11-419G15	3, der(9)
RP11-379I8	3, der(9)						
RP11-166F3	3, der(9)						

شكل 1 (A - D). تحليل الـ FISH لتوصيف الانتقال الكروموسومي t(9;22) الذي شُخص في هذه الدراسة (A): PAC: RP5-835J22 و RP5-1132H12 (احمر) تظهر تشخيص الجين *ABL1* و RP11-164N13 BAC (اخضر) تشخص الجين *BCR*. (B): نقطة الكسر الثانية على الكروموسوم 22 والتي اظهرت بوساطة RP11-248J22 (كروموسوم 22 ومشتقة 22 ومشتقة 3) ومشتقة 3 (4). (C): اظهرت النسيلة RP11-454G10 ثلاث اشارات تألفية على كروموسوم 3 ومشتقة الكروموسومين 3 و 9. (D): الانتقال الكروموسومي على مشتقة كروموسوم 9 بوساطة النسيالات RP11-1029M24 و RP11-352L13 و RP11-419G15.

المناقشة

وصفت في الدراسة الحالية حالة جديدة لايبضاض الدم النخاعي المزمن التي تميزت بوجود انتقال كروموسومي متغاير معقد. يلاحظ في حالات نادرة للانتقال الكروموسومي المتغاير $t(9;22)$ تكوين الكروموسوم فلادلفيا الذي يحمل مواد كروموسومية اضافية على الموقع 22q11 [25]. ويبدو ان هذه الانتقالات الكروموسومية المتغايرة من الممكن ان تؤثر على اي كروموسوم اخر. في الحالة قيد الدراسة تمركز الاندماج الجيني $5'BCR/3'ABL1$ على كروموسوم فلادلفيا ، بينما لم يلاحظ الاندماج الجيني $5'ABL1/3'BCR$ على مشتقة كروموسوم 9 لانتقال $3'BCR$ الى كروموسومات شريكة (كروموسوم 3). ترتبط العديد من خصائص المحتوى الوراثي مثل "CpG islands" و "Alu repeats" و اعادة التشكيل الوراثي وتركيب الكروماتين وفعالية الاستنساخ مع ظهور نقاط الكسر في حالات الانتقال الكروموسومي المتغاير $t(9;22)$ [26-28]. في ضوء الاليات التي تشترك في تكوين اعادة تنظيم الانتقال الكروموسومي المتغاير $t(9;22)$ ، تشير الدراسات الى ان الالية الاكثر قبولا والتي افترضت في الحالات التي شخصت فيها مشتقة كروموسوم 9 المقنعة "Masked der(9)" هو حدث واحد يتضمن العديد من الكسور و اعادة الالتحام المتزامنة (نموذج الخطوة الواحدة One-step model). وجد انفصال الاشارة للاندماج الجيني $5'ABL1/3'BCR$ في غالبية الحالات التي جرى تحليلها بنسبة وصلت الى 75% (27 من اصل 36 حالة). اما الية الخطوتين (two-step mechanism) فقد افترضت في 11% من الحالات التي لوحظ فيها مشتقة كروموسوم 9 المقنعة "Masked der(9)" اذ ان وجود الجين $5'ABL1/3'BCR$ على مشتقة كروموسوم 9 يقترح حدوث كسر ثاني داخل تسلسل كروموسوم 22 الطرفي للجين BCR . وعلى العكس من ذلك، شخصت في 71.4% من الحالات التي اظهرت الكروموسوم فلادلفيا المقنع حدوث كسر ثاني تمركز قرب الجين BCR او بعيدا عن الجين $ABL1$ وهذا يقترح حصول الية الخطوتين في العدد الاكبر من حالات الـ CML في هذه المجموعة [29]. علاوة على ذلك، وجد Albano وجماعته حذفات جينومية واسعة على كروموسوم 3 ومشتقة كروموسوم 9 في 55% من مرضى الـ CML. وبأختصار فإن نتائج الدراسة الحالية توفر توصيف وراثي خلوي جزئي دقيق لحالة جديدة لايبضاض الدم النخاعي المزمن الفلادلفي "Ph CML" التي حصل فيها انتقال متغاير معقد للكروموسومين 9 و 22. ونؤكد الدور الحاسم لتقنية الـ FISH في تفسير هذه الانتقالات الكروموسومية التي هي خارج نطاق تقنيات الوراثة الخلوية التقليدية.

References:

1. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol*. 2016;91(2):252-65.
2. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015*. Atlanta: American Cancer Society; 2015.
3. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-293.
4. Mandanas RA, Leibowitz DS, Gharehbaghi K, et al. Role of p21 RAS in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells. *Blood* 1993;82:1838-1847.
5. Okuda K, Matulonis U, Salgia R. Factor independence of human myeloid leukemia cell lines is associated with increased phosphorylation of the proto-oncogene Raf-1. *Exp Hematol* 1994;22:1111-1117.
6. Raitano AB, Halpern JR, Hambuch TM. The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11746-11750.
7. Sawyers CL, Callahan W, Witte ON. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell* 1992;70:901-910.
8. Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 1996;13:247-254.
9. Carlesso N, Frank DA, Griffin JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med* 1996;183:811-820.
10. Ilaria RL Jr., Van Etten RA. P210 and P190 (BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 1996;271:31704-31710.

11. The Italian Cooperative Group on Chronic Myeloid Leukemia. Interferon alpha-2A as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 1994; 330: 820.
12. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, Queisser W, Loffler H, Hochhaus A, Heinze B. Randomized comparison of interferon with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994; 84: 4064-77.
13. Heim S, Billström R, Kristoffersson U, Mandahl N, Strömbeck B, Mitelman F. Variant Ph translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;18:215-27.
14. Gorusu M, Benn P, Li Z, Fang M. On the genesis and prognosis of variant translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2007, 173:97-106.
15. Virgili A, Brazma D, Reid AG, Howard-Reeves J, Valgañón M, Chanalaris A, De Melo VA, Marin D, Apperley JF, Grace C, Nacheva EP: FISH mapping of Philadelphia negative BCR/ABL1 positive CML. *Mol Cytogenet* 2008, 1:14.
16. Fitzgerald PH, Morris CM. Complex chromosomal translocations in the Philadelphia chromosome leukemias: serial translocations or a concerted genomic rearrangement? *Cancer Genet Cytogenet* 1991, 57:143-151.
17. Sessarego M, Fugazza G, Bruzzone R, Ballestrero A, Miglino M, Bacigalupo A . Complex chromosome rearrangements may locate the bcr/abl fusion gene sites other than 22q11. *Hematologica* 2000, 85: 35-39.
18. Storlazzi CT, Anelli L, Surace C, Lonoce A, Zagaria A, Nanni M, Curzi P, Rocchi M . Molecular cytogenetic characterization of a complex rearrangement involving chromosome9 and 22 in a case of Ph negative chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.*2002, 136: 141-145.
19. Wan TSK, Ma SK, Li CK, Chan LC. Atypical fluorescence in situ hybridization pattern in chronic myeloid leukemia due to cryptic insertion of BCR at 9q34. *Leukemia*2004, 18: 161-162.

20. Fugazza G, Garuti A, Marchelli S, Miglino M, Bruzzone R, Gatti AM, Castello S, Sessarego M . Masked Philadelphia chromosome due to atypical BCR/ABL localization on the 9q34 band and duplication of the der(9) in a case of chronic myogenous leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2005, 163: 173-175.
21. Bakshi SR, Patel BP, Brahmhatt MM, Trivedi PJ, Gajjar SB, Iyer RR, Parikh E H., Shukla SN, Shah PM. Complex karyotype with a masked Philadelphia translocation and variant BCR-ABL fusion in CML. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009, 189(2): 142-143.
22. Apperley, J.F. Chronic myeloid leukaemia 2015, [385\(9976\)](#): 1447–1459.
23. Shaffer L, Slovak M, Campbell L , editors. *ISCN 2009. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* Basel, Switzerland: Karger; 2009.
24. Ahmed IH. Analysis of variant translocation t(4;9;22) by a fluorescence in situ hybridization (FISH) in a case of chronic myelocytic leukemia *Case Study Case Rep.* 2012, 2(2): 46-52.
25. Hagemeijer A, de Klein A, Godde-Salz E, Turc-Carel C, Smit EM, van Agthoven AJ, Grosveld GC. Translocation of c-abl1 to “masked” Ph in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 18:95–104.
26. Fisher AM, Strike P, Scott C, Moorman AV: Breakpoints of variant 9;22 translocations in chronic myeloid leukemia locate preferentially in the CG-richest regions of the genome. *Genes Chromosomes Cancer* 2005, 43:383-389.
27. Bennour A, Sennana H, Laatiri MA, Elloumi M, Khelif A, Saad A: Molecular cytogenetic characterization of variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: genesis and deletion of derivative chromosome 9. *Cancer Genet Cytogenet* 2009, 194:30-37.
28. Jeffs AR, Wells E, Morris CM: Nonrandom distribution of interspersed repeat elements in the BCR and ABL1 genes and its relation to breakpoint cluster regions. *Genes Chromosomes Cancer* 2001, 32:144-154.



29. Albano F, Anelli L, Zagaria A, Cocco N, Casieri P, Rossi AR, Vicari L, Liso V, Rocchi M, Specchia G. Non random distribution of genomic features in breakpoint regions involved in chronic myeloid leukemia cases with variant t(9;22) or additional chromosomal rearrangements. . Molecular Cancer 2010, 9:120.