

Received: 2013.10.31
Accepted: 2014.10.24
Published: 2014.12.29

Nowotwory układu krwiotwórczego przebiegające z pierwotną hipereozynofilią i ich diagnostyka*

The hematological malignancies related to primary hypereosinophilia and their diagnostics

Katarzyna Skonieczka¹, Karolina Matiakowska¹, Olga Haus^{1,2}

¹Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu

²Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku UM we Wrocławiu

Streszczenie

Opracowana w 2008 r., przez ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia, nowa klasyfikacja nowotworów układu krwiotwórczego wymogła zmianę spojrzenia na aberracje chromosomowe i mutacje genowe, które pełnią ważną rolę w ustalaniu rozpoznania i rokowania u chorych z tymi nowotworami. W klasyfikacji uwzględniono nową kategorię nowotworów przebiegających z hipereozynofilią. Ze względu na różnorodność przyczyn hipereozynofili i zmian genetycznych, które mogą leżeć u podłoża tych nowotworów, ich diagnostyka różnicowa jest oparta na stosowaniu metod cytogenetyki klasycznej, techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) i metod molekularnych. Diagnostyka cytogenetyczna komórek szpiku pozwala na stwierdzenie, iż większość przypadków hipereozynofilii cechuje się obecnością prawidłowego kariotypu. Dlatego rutynowa diagnostyka cytogenetyczna musi być uzupełniana techniką FISH z użyciem sond break-apart dla genów, które ulegają rearanżacji (np. *CBFB*, *ETV6*) oraz sond dla genów fuzyjnych (np. *FIP1L1-PDGFR*), swoistych dla chorób przebiegających z hipereozynofilią (zespół hipereozynofilowy, HES, przewlekła białaczka hipereozynofilowa, CEL). W diagnostyce różnicowej wykorzystuje się ponadto analizę mutacji genowych charakterystycznych dla chorób przebiegających z hipereozynofilią, np. mutacji genu *c-KIT* lub obecności genu fuzyjnego *ETV6-PDGFRB*.

Słowa kluczowe:

hipereozynofilia • HES • CEL • *FIP1L1-PDGFR* • *PDGFRB* • *FGFR1* • *inv(16)*

Summary

Published in 2008, by experts of the World Health Organization, the new classification of hematological malignancies forced a change of look at chromosomal aberrations and gene mutations, which are important in establishing the diagnosis and prognosis for patients with these malignancies. The new classification includes a new category of neoplasms – hematological malignancies with hypereosinophilia. Due to the high diversity of causes of hypereosinophilia and underlying genetic changes, their differential diagnosis is based on classical cytogenetics, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and genetic molecular techniques. Cytogenetic analysis of bone marrow cells showed that the majority of hypereosinophilia cases can be characterized by the presence of normal karyotype. Therefore, routine cytogenetic diagnostics should be complemented by FISH with break-apart probes for potentially rearranged genes (e.g. *CBFB*, *ETV6*) and unique probes for fusion genes (e.g. *FIP1L1-PDGFR*), specific for hypereosinophilia-associated diseases. In differential diagnosis of hypereosinophilia, the analysis of characteristic gene mutations (e.g. *cKIT*) and gene fusions (e.g. *ETV6-PDGFRB*) is also applied, using molecular genetic methods.

Keywords:

hypereosinophilia • HES • CEL • *FIP1L1-PDGFR* • *PDGFRB* • *FGFR1* • *inv(16)*.

*Praca finansowana z projektu badawczego NN 402 460537 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1134167>

Word count: 2453

Tables: 1

Figures: 6

References: 33

Adres autorki: prof. dr hab. Olga Haus, Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej CM UMK, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz; e-mail: haus@cm.umk.pl

WSTĘP

Opracowana w 2008 r. przez ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) nowa klasyfikacja nowotworów układu krwiotwórczego wymogła zmianę spojrzenia na aberracje chromosomowe i mutacje genowe, które pełnią ważną rolę w ustalaniu rozpoznania i rokowania u chorych z tymi nowotworami [3].

Jedną z grup nowotworów układu krwiotwórczego, która w ostatnich latach zyskała duże zainteresowanie, dzięki odkryciu w 2003 r. fuzji genowej *FIP1L1-PDGFR*, są nowotwory przebiegające z eozynofilią [7,9]. Trwają badania, których głównym celem jest wyjaśnienie patogenety tej grupy nowotworów, za pomocą zarówno metod cytogenetyki klasycznej i techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, FISH, jak i metod genetyki molekularnej.

CHARAKTERYSTYKA GRANULOCYTÓW KWASOCHEŁONNYCH I ZABURZEŃ ICH LICZBY

Eozynofile, których podwyższony odsetek w puli leukocytów obserwuje się w omawianej grupie nowotworów, powstają w szpiku kostnym. Dojrzałe eozynofile stanowią 2-4% ogólnej liczby krwinek białych krwi obwodowej, ich jądro komórkowe jest przeważnie dwupłatowe, a cytoplazma zawiera liczne ziarnistości kwasochłonne. Prawidłowy odsetek eozynofili jest zależny od wytwarzania cytokin, IL-5, -3 i -4 oraz czynnika wzrostu kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Interleukina 5 jest dostarczana głównie przez limfocyty Th2, które biorą udział w odpowiedzi immunologicznej w przebiegu choroby pasożytniczej i w reakcji alergicznej. Niewielkie ilości IL-5 wytwarzane są przez mastocyty, bazofile i eozynofile [1,26,31].

Zaburzenia liczby eozynofili mogą wywołać: 1) eozynopenia, czyli odsetek eozynofili poniżej 1% całej puli leukocytów, może występować we wczesnych chorobach i stanach patologicznych o różnej etiologii i patomechanizmie: we wstrząsie, chorobie Cushinga, po kortykoterapii, w durze brzusznej, posocznicy, w śpiączce cukrzycowej, mocznicowej i wątrobowej oraz ostrej hemolizie; 2) hipereozynofilia, czyli odsetek eozynofili powyżej 4% we wzorze odsetkowym leukocytów. Niektóre z przyczyn reaktywnej hipereozynofilii przedstawiono w tabeli 1 [1,10,15,20,29,32].

Jak przedstawiono w tabeli 1, niektóre nowotwory, w tym również nowotwory układu krwiotwórczego, mogą przebiegać z wtórną hipereozynofilią. Na przykład Cogan i wsp. wykazali obecność hipereozynofili u chorego z klonalnym rozrostem linii limfocytów T (limfocyty T helper typu 2). Nieprawidłowy klon limfocytów T o fenotypie CD3⁺CD4⁺ wytwarzał nadmiar IL-5, która pobudza proliferację eozynofili. Była to eozynofilia wtórna, wtórny zespół hipereozynofilowy, zespół hipereozynofilowy (HES=hypereosinophilic syndrome), niemający związku ze zmianami klonalnymi szeregu limfocytarnego, ani klonalnego szeregu eozynofili. Są jednak i takie nowotwory, w których eozynofile są elementem klonu komórek nowotworowych, a hipereozynofilia zjawiskiem pierwotnym wynikającym z rozrastania się klonu nowotworowego [6]. Ich podział, podłoże genetyczne i diagnostyka omówiono w następnych rozdziałach.

Ze względu na istniejące niezgodności nomenklatury w używaniu nazwy „HES” międzynarodowa grupa International Cooperative Working Group on Eosinophil Disorders (ICOG-EO), składająca się z przedstawicieli różnych działów medycyny, w tym hematologa, opublikowała w 2012 r. wyniki ustaleń dotyczących definicji zespołu hipereozynofilowego (HES). HES został zdefiniowany jako każda z postaci hipereozynofilii, skojarzona z uszkodzeniem narządów. HES może być podzielony na pierwotny (nowotworowy), wtórny (reaktywny) oraz idiopatyczny. ICOG-EO stwierdziła, że termin HES powinien być używany do określania tych zaburzeń klinicznych, a nie jedynie do określenia nowotworów lub chorób autoimmunologicznych przebiegających z hipereozynofilią. Nazwa HES nie może być stosowana jako synonim nowotworów zdefiniowanych przez WHO, natomiast zalecane jest używanie sformułowania „nowotwory przebiegające z HES”, np. przewlekła białaczka eozynofilowa przebiegająca z pierwotnym HES [2,3,29].

RYS HISTORYCZNY ORAZ DEFINICJA I KLASYFIKACJA NOWOTWORÓW UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO PRZEBIEGAJĄCYCH Z HIPEREOZYNOFILIĄ

W 1968 r. Hardy i Anderson po raz pierwszy użyli sformułowania „zespół hipereozynofilowy” (HES), a w 1975 r. Chusid i wsp. zaproponowali kryteria diagnostyczne określające ten zespół: hipereozynofilia >1,5 G/l, czas trwania >6 miesięcy, nieznana przyczyna hipereozynofilii, wykluczenie wtórnej eozynofilii, uszkodzenie i dysfunkcja róż-

Tabela 1. Wybrane przyczyny reaktywnej hipereozynofilii

Grupy chorób przebiegających z hipereozynofilią reaktywną
Choroby alergiczne: astma, zapalenie zatok, alergiczne zapalenie jelit, reakcje alergiczne, aspergiloza płucna
Zakażenie: pasożytnicze, bakteryjne, grzybicze, wirusowe, riketsjowe
Choroby płuc: rozstrzenie oskrzeli, mukowiscydoza, zespół Loefflera, ziarniniak kwasochłonny płuc
Choroby serca: włóknienie tropikalne wsierdza, eozynofilowe zapalenie mięśnia sercowego
Choroby przewodu pokarmowego: choroba trzewna (celiakia), eozynofilowe zapalenie żołądka i jelit
Choroby skóry: atopowe zapalenie skóry, pokrzywka, pęcherzyca, opryszczkowe zapalenie skóry, zespół Gleicha
Choroby tkanki łącznej: zespół Churga-Straussa, ziarniniak Wegenera, reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń układowy, guzkowe zapalenie tętnic, twardzina układowa, eozynofilowe zapalenie powięzi i mięśni
Choroby układu immunologicznego: zespół Wiskotta-Aldricha, zespół Hioba (Joba), zespół hiper-IgM, niedobór IgA
Nowotwory: chłoniaki ziarnnicze i niezziarnnicze, ostra białaczka limfoblastyczna, choroba Kimura, guzy lite (rak nerki, płuc, piersi, narządów rodnych)
Zaburzenia metaboliczne
Niewydolność nadnerczy

[według 1,10,15,20,29,32]

nych narządów (serca, płuc, wątroby, ośrodkowego układu nerwowego, skóry, nerek, śledziony) na skutek naciekania eozynofilami i uwalniania enzymów zawartych w ich ziarnistościach cytoplazmatycznych [5,16].

Według Gotliba i wsp., po wykluczeniu wszystkich przyczyn nienowotworowej hipereozynofilii wtórnej, chorób nowotworowych przebiegających z wtórną hipereozynofilią, chorób nowotworowych, w których eozynofile stanowią część klonu nowotworowego oraz obecności populacji limfocytów T z nieprawidłowym wytwarzaniem cytokin, można u chorego podejrzewać pierwotny zespół hipereozynofilowy (pierwotny HES) i szukać zaburzeń cytotenetycznych i/lub molekularnych, leżących u podłoża nowotworu przebiegającego z HES [13,14,15].

W 1987 r. Keene i wsp. wykazali u 2 pacjentów z Ph-ujemną przewlekłą białaczką szpikową (CML), jednego z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) oraz jednego z białaczką eozynofilową obecność hipereozynofilii i zaburzeń w obrębie regionu chromosomowego 12p13 (*locus* genu *TEL(ETV6)*) [19]. Kilka lat później Golub i wsp. opisali w grupie pacjentów z przewlekłą białaczką mielomonocytozą (CMML) zmianę molekularną związaną z hipereozynofilią, w postaci fuzji genowej *TEL(ETV6)-PDGFRB*, powstającej w wyniku zrównoważonej translokacji wzajemnej między chromosomami 5 i 12: t(5;12)(q33;p13). Eozynofilia i monocytoza były wspólnymi cechami u tych pacjentów [12].

W wyniku translokacji t(5;12) kodujący czynnik transkrypcyjny gen *TEL(ETV6)*, umiejscowiony w 12p13 oraz kodujący receptor β płytkopochodnego czynnika wzrostu gen *PDGFRB*, zlokalizowany w 5q33, tworzą gen fuzyjny kodujący białko o aktywności kinazy tyrozynowej, która nasila tendencję do transformacji CMML w AML.

Dotąd poznano ponad 30 partnerów genowych translokacji genu *ETV6*, odpowiedzialnych za genezę różnych typów nowotworów układu krwiotwórczego, nie zawsze połączonych z hipereozynofilią. Poznano również ponad 15 partnerów genowych w translokacjach genu *PDGFRB*, umiejscowionych m.in. w następujących regionach: 1q21(*TPM3*), 7q11(*HIP1*), 10q21(*CCDC6*), 14q24(*NIN*), 14q32(*TRIP11*), 15q15(*TP53BP1*), 17p11(*SPECC1*) i 17p13(*RABEP1*). Produktem każdej fuzji genowej, wynikającej z tych translokacji jest swoista kinaza tyrozynowa, podatna na działanie inhibitorów kinaz tyrozynowych, TKI [22].

Gen *PDGFRB* koduje przezbłonowe białko o wielkości 190 kDa, którego ekspresja występuje w fibroblastach, komórkach mięśni gładkich, endotelium, prekursorach linii erytroidalnej, mieloidalnej i megakariocytowej komórek szpiku, limfocytach T i B i komórkach NK. Białko *PDGFRB* odgrywa istotną rolę w procesie naprawy DNA, w mitozie, chemotaksji oraz w rekonstrukcji cytoskieletu komórek [19,22].

Inną skojarzoną z hipereozynofilią zmianą, którą odkryto w nowotworach mieloproliferacyjnych (MPN=mieloproliferative neoplasms), była rearanżacja *locus* genu *FGFR1* (8p11.2), kodującego receptor 1 czynnika wzrostu fibroblastów. Receptor ten jest białkiem przezbłonowym, którego cytoplazmatyczna domena ma aktywność kinazy tyrozynowej. Najczęściej gen ten uczestniczy w translokacji t(8;13)(p11.2;q12), tworząc gen fuzyjny *ZNF198-FGFR1*, znajdujący w MPN i w chłoniakach wywodzących się z linii T komórkowej. Inni partnerzy genu *FGFR1* są umiejscowieni w następujących regionach chromosomowych: 6q27, 7q34, 9q33, 12p11, 17q11 i 19q13 [16,23].

Genem, którego rearanżacje kojarzą się z hipereozynofilią, jest gen receptora alfa płytkopochodnego czynnika wzrostu, *PDGFRA*. Jego fuzję z genem *BCR* opisali w 2002 r.

Baxter i wsp. u 2 chorych z atypową CML i hipereozynofilią oraz translokacją t(4;22)(q12;q11). Analiza molekularna przeprowadzona u tych chorych wykazała obecność genu fuzyjnego *BCR-PDGFR* [4].

Przełomem w poszukiwaniu klonalnych zmian genetycznych skojarzonych z HES, było wykrycie w 2003 r. przez Coorsa i wsp. fuzji genowej *FIP1L1-PDGFR*, która powstaje w wyniku interstycjalnej mikrodelecji fragmentu regionu 4q12, o wielkości około 800 kpz, niewidocznej w rutynowym badaniu cytogenetycznym komórek szpiku [7]. Zmiana może występować w przewlekłej białaczce eozynofilowej (CEL=chronic eosinophilic leukemia), należącej do nowotworów mieloproliferacyjnych i uwzględnionej w nowej klasyfikacji WHO jako białaczka przebiegająca ze zwiększonym odsetkiem eozynofili w szpiku i krwi obwodowej [2,18,28,29].

Dowodem na udział ww. genów fuzyjnych w patogenezie nowotworów przebiegających z pierwotnym HES były doświadczenia z transfekcją ludzkich komórek macierzystych i progenitorowych CD34⁺ genami *ETV6-PDGFRB* lub *FIP1L1-PDGFR*. Transfekcja powodowała autonomiczną proliferację tych komórek i ich różnicowanie w kierunku szeregu eozynofilowego, przez aktywację czynników transkrypcyjnych STAT 1, 3, 5 oraz czynnika jądrowego NF-κB. Zahamowanie działania NF-κB hamowało ten proces, co może stanowić wskazówkę w poszukiwaniu

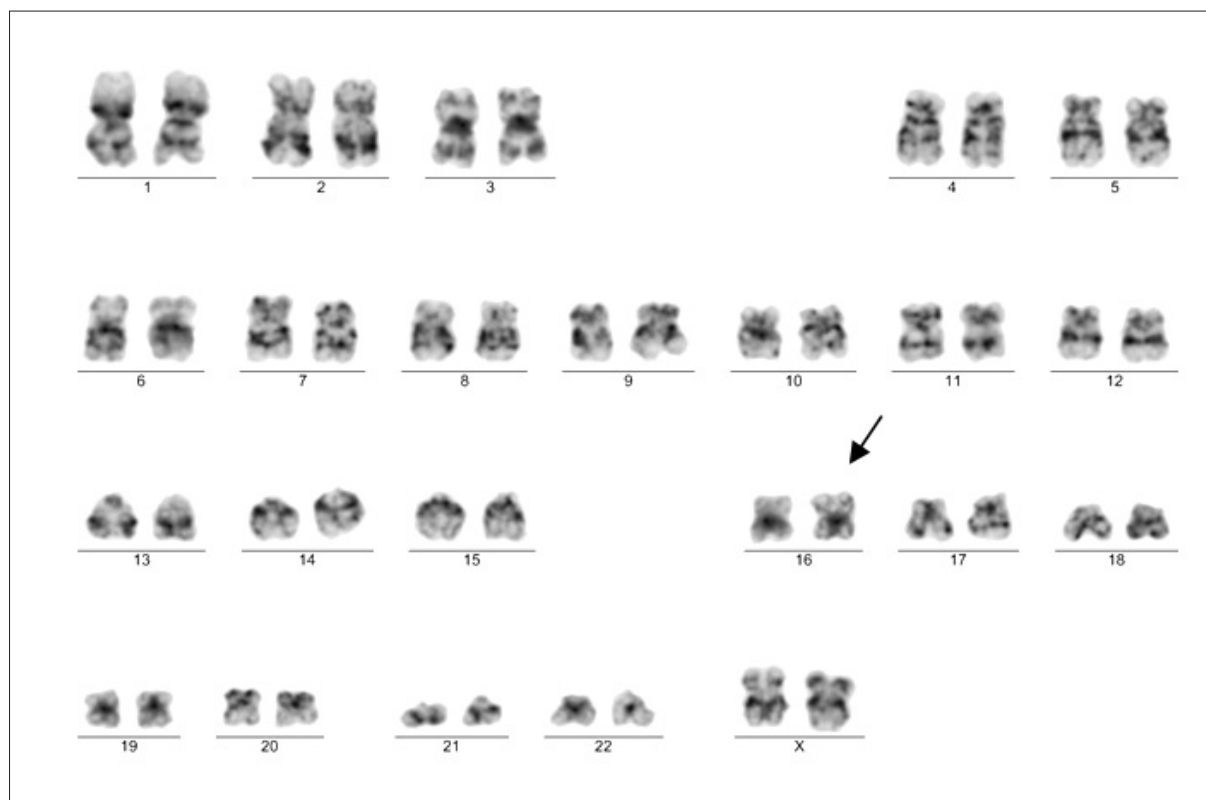
terapii ukierunkowanej na ten czynnik [24].

DIAGNOSTYKA NOWOTWORÓW PRZEBIEGAJĄCYCH Z HIPEREZOZYNOFILIĄ

W celu przeprowadzenia kompleksowej diagnostyki różnicowej u chorych, których nowotwory układu krwiotwórczego są klasyfikowane do grupy zespołów przebiegających z pierwotnym HES, można wykorzystać metody cytogenetyki klasycznej (prążkowanie GTG), badanie techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z użyciem unikalnej sondy molekularnej, komplementarnej do poszukiwanej sekwencji DNA i metody molekularne, takie jak łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR).

DIAGNOSTYKA CYTOGENETYCZNA

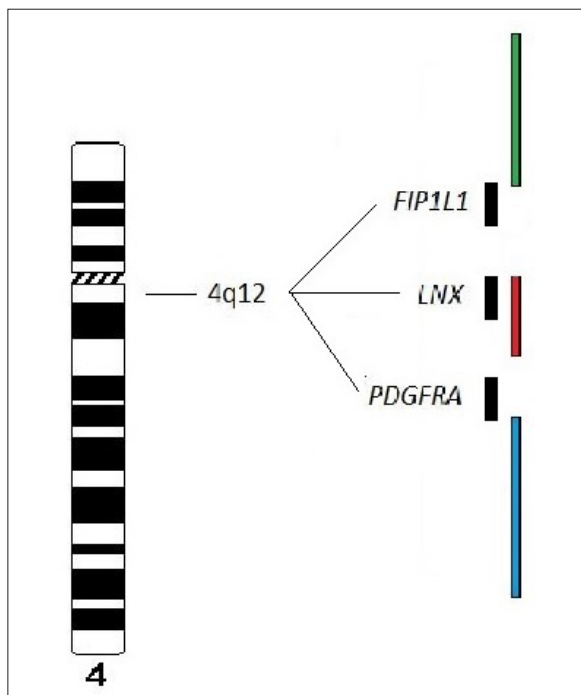
Metoda prążków GTG, której rozdzielczość na preparatach cytogenetycznych komórek szpiku kostnego wynosi średnio około 400 prążków w haploidalnym zestawie chromosomów, umożliwia ocenę liczby chromosomów oraz dużych aberracji strukturalnych, o wielkości co najmniej 3 Mbp (mega par zasad). Z aberracji strukturalnych kojarzących się z hipereozynofilią można dzięki niej wykryć translokację t(5;12)(q33;p13), charakterystyczną dla CMML oraz inwersję pericentryczną – inv(16)(p13q22) lub translokację t(16;16)(p13;q22), charakterystyczne dla ostrej białaczki szpikowej z zaburzeniami eozynocytopeny, AML-M4Eo (ryc. 1). Niestety,



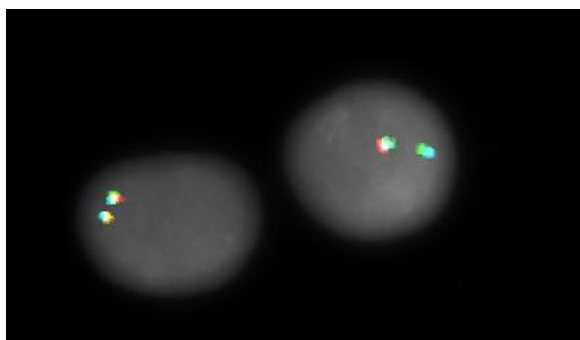
Ryc. 1. Kariogram chorej z AML-M4Eo. Strzałką wskazano chromosom 16 z inwersją: 46,XX,inv(16)(p13q22) [materiał własny]

większość przypadków hipereozynofilii może się cechować obecnością kariotypu prawidłowego [15,17,33].

Znalezienie podczas cytogenetycznej diagnostyki różnicowej hipereozynofilii, aberracji angażujących region 16q22 (*locus CFBF*) i region 16p13 (*locus MYH11*), wskazuje na AML-M4Eo. W tym typie białaczki produkt genu fuzyjnego *CBFB-MYH11* znosi aktywność genu *RUNX1(AML1)*, powodując zablokowanie różnicowania i dojrzewania



Ryc. 2. Budowa sondy specyficznej Vysis 4q12 Tri-Color Rearrangement FISH Probe. Kolorowymi prostokątami oznaczono: ■ – geny, ■ – obszar flankujący część proksymalną genu *FIP1L1*, ■ – obszar komplementarny do genu *LNX* i flankujący część dystalną tego genu, ■ – obszar flankujący część dystalną genu *PDGFRA* [rycina własna]



Ryc. 3. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* do jąder komórek interfazalnych z zastosowaniem sondy specyficznej Vysis 4q12 Tri-Color Rearrangement FISH Probe. Po stronie lewej jądro komórki interfazalnej z prawidłowym rozkładem sygnałów fluorescencyjnych (2 x czerwony/zielony/błękitny). Po stronie prawej jądro komórki interfazalnej z delecją sygnału czerwonego, tożsamego z fragmentem komplementarnym do *LNX* i utworzeniem zielono-błękitnej fuzji *FIP1L1-PDGFR* w obrębie jednej kopii regionu 4q12 (1 x czerwony/zielony/błękitny, 1 x zielony/błękitny) [materiał własny]

komórek progenitorowych. Hipereozynofilia w AML-M4Eo dotyczy komórek na etapie promielocyta i mielocyta szeregu eozynofilowego [17].

DIAGNOSTYKA Z ZASTOSOWANIEM FLUORESCENCYJNEJ HYBRYDYZACJI *IN SITU* (FISH)

W celu wykluczenia albo wykrycia obecności mikroaberracji bądź rearanżacji genów, badanie GTG należy uzupełnić techniką FISH z użyciem sondy specyficznej względem badanego *locus*.

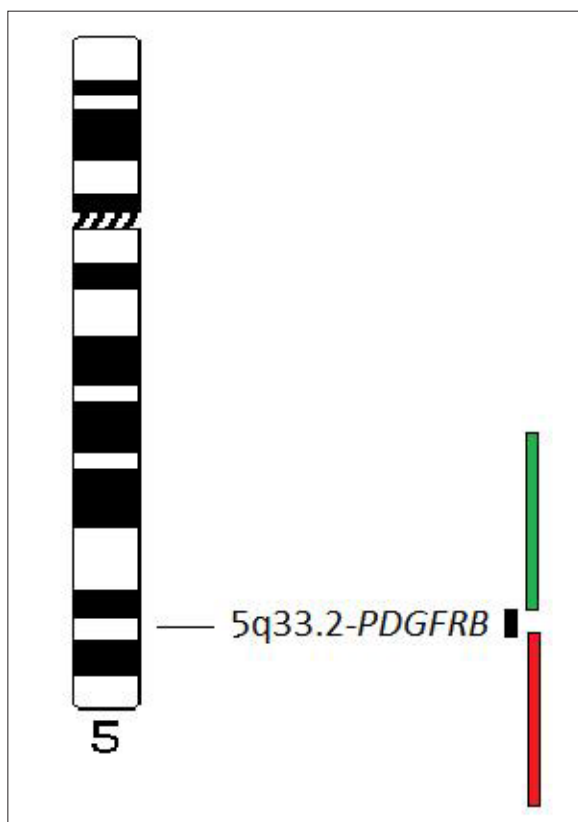
Technika FISH umożliwia ocenę obecności pojedynczych genów lub rearanżacji tych genów na skutek translokacji lub inwersji z partnerskimi *loci*, czy też delecji regionów istotnych w patogenezie HES. W zależności od rodzaju użytej sondy molekularnej wielkość zmiany wykrywanej tą techniką może wynosić poniżej 3 Mpz, a w niektórych przypadkach nawet poniżej 1 Mpz [17].

W celu pełnej identyfikacji zmiany swoistej dla CEL, niewidocznej w rutynowym badaniu cytogenetycznym mikrodelecji *del(4)(q12q12)* oraz fuzji genowej *FIP1L1-PDGFR*, stosuje się sondę specyficzną dla tego regionu, trójkolorową, której każdy fragment, wybarwiony innym kolorem, jest komplementarny do określonej struktury regionu 4q12: (1) obszarów flankujących część proksymalną genu *FIP1L1* (zielony), (2) genu *LNX* lub genu *CHIC2* oraz obszarów flankujących część dystalną tych genów (czerwony) oraz (3) obszarów flankujących część dystalną genu *PDGFRA* (błękitny) (ryc. 2). Użycie tak zbudowanej sondy umożliwia wykrycie delecji znakowanego na czerwono fragmentu regionu 4q12, obejmującego geny *LNX* i *CHIC2*, leżące między genami *FIP1L1* i *PDGFRA*. Wówczas w mikroskopie fluorescencyjnym widoczny jest tylko sygnał zielono-błękitny, pochodzący z powstałej fuzji genowej *FIP1L1-PDGFR* (ryc. 3) [21,25,30].

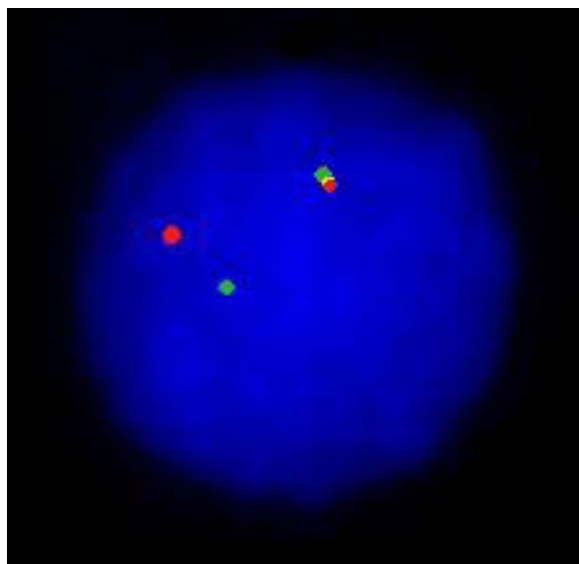
W diagnostyce różnicowej HES zastosowanie znajdują również sondy typu break-apart dla *loci* genów *PDGFRB* i *FGFR1*. Sondy break-apart są znakowane w taki sposób, aby część proksymalna badanego *locus*, miała sygnał fluorescencyjny innego koloru niż jego część dystalna, co pozwala nie tylko na określenie liczby badanych *loci*, ale i wykrycie delecji całego genu (brak jednego sygnału zielono-czerwonego) lub jego części proksymalnej albo dystalnej (brak jednego sygnału zielonego albo jednego czerwonego) oraz jego rearanżacje z genami partnerskimi (rozszczepienie sygnału zielono-czerwonego na skutek translokacji fragmentu badanego genu, najczęściej dystalnego – ryc. 5). Sposób znakowania sondy break-apart dla *locus* genu *PDGFRB* przedstawiono na ryc. 4.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA

Najczęściej skojarzonym z pierwotnym HES genem fuzyjnym jest *FIP1L1-PDGFR*. Wykrywany jest u 10-20% chorych z tym zespołem [15]. Diagnostyka molekularna *FIP1L1-PDGFR* opiera się na protokole opracowanym przez Coolsa i wsp., w którym materiałem wyjściowym



Ryc. 4. Budowa sondy specyficznej typu break-apart dla locus genu *PDGFRB* (5q33.2) firmy Kreotech. Kolorowymi prostokątami oznaczono:
 — gen, — obszar flankujący część proksymalną genu *PDGFRB*,
 — obszar flankujący część dystalną genu *PDGFRB* [rycina własna]



Ryc. 5. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* do jądra komórki interfazalnej z zastosowaniem sondy specyficznej typu break-apart dla locus genu *PDGFRB* (5q33.2) firmy Kreotech. Widoczne jest rozszczępienie lewego sygnału zielono-czerwonego, co świadczy o rearanżacji genu *PDGFRB*. Sygnał połączony, zielono-czerwony (po prawej), wskazuje na prawidłową budowę drugiego allele wv. genu [materiał własny]

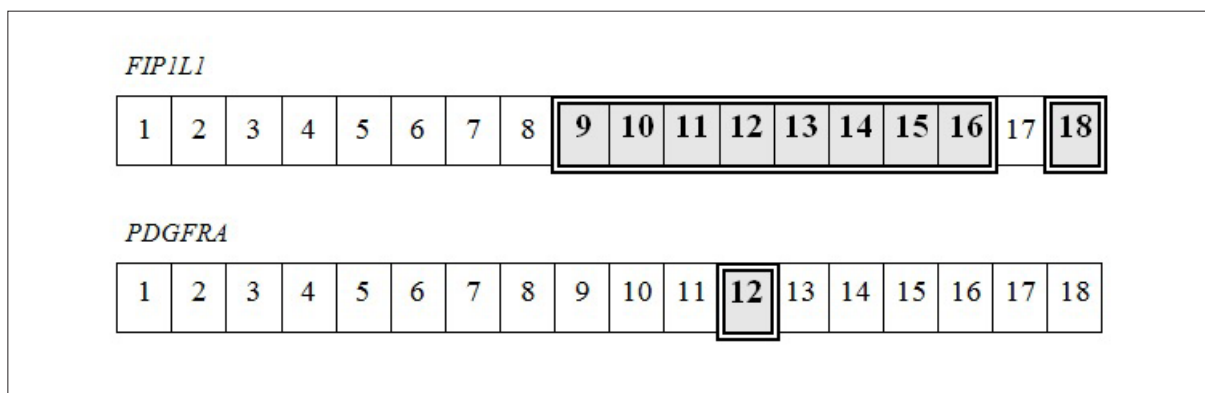
jest RNA. Startery komplementarne do eksonów genów *FIP1L1* i *PDGFRA* amplifikują gen fuzyjny w reakcji nested RT-PCR [7]. Niestety, stosowana metodyka niesie ze sobą wiele ograniczeń. Jednym z nich jest problem z wykryciem genu fuzyjnego w I rundzie reakcji. Może to być spowodowane często niewielkimi rozmiarami klonu nowotworowego oraz – niezależnie – dużą różnorodnością rearanżacji genów *FIP1L1* i *PDGFRA* [11].

Zazwyczaj RNA jest izolowany z całej puli leukocytów, w której eozynofile stanowią zaledwie 1-3%, a w nowotworach z hipereozynofilią – 3-5% komórek. Score i wsp. zmodyfikowali metodę, przeprowadzając cały test na genomowym DNA zamiast na RNA. Gen fuzyjny wykrywany był już w I rundzie reakcji u wszystkich pacjentów. Natomiast gdy materiałem wyjściowym był RNA w I rundzie wykryto ten gen zaledwie u 51%. Ponadto, analizując RNA otrzymano u dwóch chorych wyniki fałszywie ujemne, podczas gdy w analizie DNA u wszystkich chorych z HES otrzymano wyniki dodatnie [27].

W ilościowym badaniu DNA *FIP1L1*-*PDGFRA* stwierdzono, że liczba kopii tego genu stanowi niewielki odsetek liczby kopii genu kontrolnego *ALB*, zastosowanego w tych badaniach. Przekłada się to na medianę 13% komórek z obecnością genu fuzyjnego w całej puli leukocytów.

Powyższe wyniki analizy molekularnej próbowano porównać z wynikami FISH z zastosowaniem sondy specyficznej dla genu fuzyjnego. Niestety, materiał umożliwiający analizę sondami FISH był dostępny zaledwie u połowy badanych (6/13). U dwóch z nich procent komórek *FIP1L1*-*PDGFRA*(+) wahał się na poziomie błędu metody (4 i 6%, przy progu błędu metody wynoszącym 5%), byli to pacjenci *FIP1L1*-*PDGFRA*-dodatni w badaniu PCR). Miarodajny wynik, wskazujący na obecność genu fuzyjnego w znacznym odsetku komórek (14-63%) uzyskano jedynie u 4 chorych. Wyniki te mogą wskazywać na konieczność diagnostyki *FIP1L1*-*PDGFRA* metodami biologii molekularnej, które bardziej wiarygodnie i precyzyjnie mogą ocenić obecność tego genu fuzyjnego [27].

Innym problemem diagnostycznym jest znaczne zróżnicowanie lokalizacji punktów złamań obu genów u różnych pacjentów. *PDGFRA* pęka w różnych miejscach eksonu 12, natomiast *FIP1L1* w obrębie eksonów 9-16 oraz w eksonie 18 (ryc. 6). Prowadzi to do powstawania różnych transkryptów genu fuzyjnego, co powoduje, że interpretacja wyników reakcji jest trudna. Walz i wsp. wyodrębnili trzy główne typy transkryptów: A (46%), B (43%) i C (11%) [29]. W typie A między nienaruszonym eksonem *FIP1L1* (ekson 9-16 lub 18) a eksonem 12 genu *PDGFRA* znajduje się insercja zawierająca 2-76 pary zasad, pochodząca z fragmentu sekwencji intronu znajdującego się tuż przed eksonem *FIP1L1* biorącym udział w fuzji genowej. W typie B składanie eksonów przebiega bez dodatkowych insercji/delekcji, a więc w transkrypcie genu *FIP1L1*-*PDGFRA* znajdują się tylko całe eksony obu genów. Natomiast w typie C miejsca pęknięć obu genów są umiejscowione w sekwencjach kodujących.



Ryc. 6. Schemat genów *FIP1L1* i *PDGFRA*. W podwójnym obramowaniu, na szarym tle, wskazano eksony, w których może nastąpić pęknięcie genów

Każdy test w kierunku *FIP1L1*-*PDGFRA* powinien być przeprowadzany wraz z kontrolą dodatnią, którą może być materiał wyizolowany z linii komórkowej ludzkiej białaczki eozynofilowej *FIP1L1*-*PDGFRA*-dodatniej, EOL1, dostępnej w Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) [8].

Gen fuzyjny *FIP1L1*-*PDGFRA* może występować nie tylko w CEL z pierwotnym HES, lecz również w mastocytozie z eozynofilią; w tych jej postaciach, w których nie jest obecna typowa dla tej choroby mutacja *cKIT* D816V [13].

Komórki nowotworowe z *FIP1L1*-*PDGFRA*, niezależnie od tego, w jakim typie nowotworu występują, są podatne na działanie imatinibu, już w małych dawkach tego leku (100 mg/doba). W czasie leczenia może się jednak pojawić wtórna oporność na leczenie, spowodowana mutacją T647I w genie *PDGFRA*, która jest analogiczna do mutacji T315I w domenie kinazowej genu *BCR-ABL* w przewlekłej białaczce szpikowej [13].

Innymi, znalezionymi w pojedynczych przypadkach nowotworów skojarzonych z pierwotnym HES rearanżacjami, były m.in. translokacje t(3;4)(p13;q12), t(4;7)(q11;q32) i t(4;7)(q11;p13), obejmujące loci genów *PDGFRA* lub *KIT*. Ich produkty białkowe, mające charakter kinaz tyrozynowych, sprawiają, że nowotwory skojarzone z nimi są podatne na leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych, analogicznie do nowotworów *FIP1L1*-*PDGFRA*(+) [15].

W razie niestwierdzenia żadnych z wcześniej wymienionych zmian należy przeprowadzić dalszą diagnostykę w celu wykluczenia bądź potwierdzenia rozpoznania chorób nieprzebiegających z pierwotnym HES, a jedynie z reaktywną hipereozynofilią lub hipereozynofilią stanowiącą jedynie część klonu nowotworowego. Zwiększona liczba eozynofiliów może występować, jak wspomniano, m.in. w mastocytozie, wówczas należy sprawdzić obecność mutacji *cKIT* D816V, w przewlekłej białaczce szpikowej, jej charakterystycznym genem jest *BCR-ABL*, w ostrej białaczce szpikowej – AML-M4Eo, markerem jest gen fuzyjny *CBFB-MYH11* lub w AML-M2, w której typowy jest gen fuzyjny *AML1-ETO*. Hipereozynofilię stwierdza się również jako część klonu nowotworowego, w ostrej białaczce szpikowej z monosomią chromosomu 7, trisomią 1 oraz translokacjami: t(5;16), t(10;11), t(16;21). Natomiast hipereozynofilia stwierdzana w zespołach mielodysplastycznych i ostrej białaczce limfoblastycznej T-komórkowej jest przykładem hipereozynofilii reaktywnej, niebędącej składową procesu rozrostowego [15].

Przedstawione uwagi dotyczące diagnostyki, różnicowania i nomenklatury hipereozynofilii i nowotworów z nią przebiegających wskazują jak wiele jest różnych nowotworów układu krwiotwórczego przebiegających z pierwotnym i wtórnym HES i jak istotna jest ich diagnostyka różnicowa w celu zidentyfikowania tych, które pozwolą chorym na skorzystanie z leczenia inhibitorami kinaz tyrozynowych, dającego szansę na długie, wolne od objawów choroby życie.

PIŚMIENICTWO

[1] Ackerman S.J., Bochner B.S.: Mechanisms of eosinophilia in the pathogenesis of hypereosinophilic disorders. *Immunol. Allergy Clin. North. Am.*, 2007; 27: 357-375

[2] Bain B.J., Gilliland D.G., Horny H.P., Vardiman J.W.: Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of *PDGFRA*, *PDGFRB* or *FGFR1*. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, eds.: S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, J.W. Vardiman. International Agency for Research on Cancer, Lyon 2008, 68-73

[3] Bain B.J., Gilliland D.G., Vardiman J.W., Horny H.P.: Chronic eosinophilic leukaemia, not otherwise specified. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, eds.: S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, J.W. Vardiman. International Agency for Research on Cancer, Lyon 2008, 51-53

[4] Baxter E.J., Hochhaus A., Bolufer P., Reiter A., Fernandez J.M., Senent L., Cervera J., Moscardo F., Sanz M.A., Cross N.C.: The t(4;22)(q12;q11) in atypical chronic myeloid leukaemia fuses *BCR* to *PDGFRA*. *Hum. Mol. Genet.*, 2002; 11: 1391-1397

- [5] Chusid M.J., Dale D.C., West B.C., Wolff S.M.: The hypereosinophilic syndrome: analysis of fourteen cases with review of the literature. *Medicine*, 1975; 54: 1-27
- [6] Cogan E., Schandené L., Crusiaux A., Cochaux P., Velu T., Goldman M.: Clonal proliferation of type 2 helper T cells in a man with the hypereosinophilic syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 1994; 330: 535-538
- [7] Cools J., DeAngelo D.J., Gotlib J., Stover E.H., Legare R.D., Cortes J., Kutok J., Clark J., Galinsky I., Griffin J.D., Cross N.C., Tefferi A., Malone J., Alam R., Schrier S.L. i wsp.: A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 2003; 348: 1201-1214
- [8] Cools J., Quentmeier H., Huntly B.J., Marynen P., Griffin J.D., Drexler H.G., Gilliland D.G.: The EOL-1 cell line as an *in vitro* model for the study of FIP1L1-PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood*, 2004; 103: 2802-2805
- [9] Crane M.M., Chang C.M., Kobayashi M.G., Weller P.F.: Incidence of myeloproliferative hypereosinophilic syndrome in the United States and an estimate of all hypereosinophilic syndrome incidence. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010; 126: 179-181
- [10] Dmeńska H.: Zespół Hiper-IgE. Część I. Postać dziedziczna autosomalnie recesywnie (AR-HIES). *Współcz. Alergol. Info.*, 2008; 3: 152-156
- [11] Erben P., Gosenca D., Müller M. C., Reinhard J., Score J., Del Valle F., Walz C., Mix J., Metzgeroth G., Ernst T., Haferlach C., Cross N.C., Hochhaus A., Reiter A.: Screening for diverse PDGFRA or PDGFRB fusion genes is facilitated by generic quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Haematologica*, 2010; 95: 738-744
- [12] Golub T.R., Barker G.F., Lovett M., Gilliland D.G.: Fusion of PDGF receptor β to a novel *ets*-like gene, *tel*, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*, 1994; 77: 307-316
- [13] Gotlib J.: Eosinophilic myeloid disorders: new classification and novel therapeutic strategies. *Curr. Opin. Hematol.*, 2010; 17: 117-124
- [14] Gotlib J., Cools J.: Five years since the discovery of FIP1L1-PDGFR α : what we have learned about the fusion and other molecularly defined eosinophilias. *Leukemia*, 2008; 22: 1999-2010
- [15] Gotlib J., Cools J., Malone J.M.^{3rd}, Schrier S.L., Gilliland D.G., Coutre S.E.: The FIP1L1-PDGFR α fusion tyrosine kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia: implications for diagnosis, classification, and management. *Blood*, 2004; 103: 2879-2891
- [16] Hardy W.R., Anderson R.E.: The hypereosinophilic syndromes. *Ann. Intern. Med.*, 1968; 68: 1220-1229
- [17] Haus O., Poluha A., Skonieczka K.: Cytogenetics in hematology. W: *Molecular aspects of hematologic malignancies*, red.: M. Witt, M. Dawidowska, T. Szczepański. Springer-Verlag, Berlin 2012, 161-181
- [18] Helbig G., Moskwa A., Hus M., Piszcz J., Swiderska A., Urbanowicz A., Całbecka M., Gajkowska J., Seferynska I., Hałas M., Woszczyk D., Markiewicz M., Krzemień S.: Clinical characteristics of patients with chronic eosinophilic leukaemia (CEL) harbouring FIP1L1-PDGFR α fusion transcript – results of Polish multicentre study. *Hematol. Oncol.*, 2010; 28: 93-97
- [19] Keene P., Mendelow B., Pinto M.R., Bezwoda W., MacDougall L., Falkson G., Ruff P., Bernstein R.: Abnormalities of chromosome 12p13 and malignant proliferation of eosinophils: a nonrandom association. *Br. J. Haematol.*, 1987; 67: 25-31
- [20] Kuziemski K.: Eozynofilia płucna. *Alergia*, 2008; 2: 24-27
- [21] La Starza R., Specchia G., Cuneo A., Beacci D., Nozzoli C., Luciano L., Aventin A., Sambani C., Testoni N., Foppoli M., Invernizzi R., Marynen P., Martelli M.F., Mecucci C.: The hypereosinophilic syndrome: fluorescence *in situ* hybridization detects the del(4)(q12) – FIP1L1/PDGFR α but not genomic rearrangements of other tyrosine kinases. *Haematologica*, 2005; 90: 596-601
- [22] Lierman E., Cools J.: ETV6 and PDGFRB: a license to fuse. *Haematologica*, 2007; 92: 145-147
- [23] Macdonald D., Reiter A., Cross N.C.: The 8p11 myeloproliferative syndrome: a distinct clinical entity caused by constitutive activation of FGFR1. *Acta Haematologica*, 2002; 107: 101-107
- [24] Montano-Almendras C.P., Essaghir A., Schoemans H., Varis I., Noël L.A., Velghe A.I., Latintine D., Knoops L., Demoulin J.B.: ETV6-PDGFRB and FIP1L1-PDGFR α stimulate human hematopoietic progenitor cell proliferation and differentiation into eosinophils: the role of nuclear factor- κ B. *Haematol.*, 2012; 97: 1064-1072
- [25] Pardanani A., Ketterling R.P., Brockman S.R., Flynn H.C., Paternoster S.F., Shearer B.M., Reeder T.L., Li C.Y., Cross N.C., Cools J., Gilliland D.G., Dewald G.W., Tefferi A.: CHIC2 deletion, a surrogate for FIP1L1-PDGFR α fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy. *Blood*, 2003; 102: 3093-3096
- [26] Poręba M., Rostoff P., Konduracka E., Pikul P., Rucińska M., Paśowicz M., Piwowarska W.: Choroba endomiokardialna jako pierwsza manifestacja zespołu hipereozynofilowego. *Kardiologia Pol.*, 2010; 68: 440-445
- [27] Score J., Walz C., Jovanovic J.V., Jones A.V., Waghorn K., Hidalgo-Curtis C., Lin F., Grimwade D., Grand F., Reiter A., Cross N.C.: Detection and molecular monitoring of FIP1L1-PDGFR α -positive disease by analysis of patient-specific genomic DNA fusion junctions. *Leukemia*, 2009; 23: 332-339
- [28] Simon H.U., Rothenberg M.E., Bochner B.S., Weller P.F., Wardlaw A.J., Wechsler M.E., Rosenwasser L.J., Roufosse F., Gleich G.J., Klion A.D.: Refining the definition of hypereosinophilic syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010; 126: 45-49
- [29] Valent P., Klion A.D., Rosenwasser L.J., Arock M., Bochner B.S., Butterfield J.H., Gotlib J., Haferlach T., Hellmann A., Horny H.P., Leiferman K.M., Metzgeroth G., Matsumoto K., Reiter A., Roufosse F. i wsp.: ICON: eosinophil disorders. *World Allergy Organ. J.*, 2012; 5: 174-181
- [30] Walz C., Score J., Mix J., Cillioni D., Roche-Lestienne C., Yeh R.F., Wiemels J.L., Ottaviani E., Erben P., Hochhaus A., Baccarani M., Grimwade D., Preudhomme C., Apperley J., Martinelli G. i wsp.: The molecular anatomy of the FIP1L1-PDGFR α fusion gene. *Leukemia*, 2009; 23: 271-278
- [31] Wilkins H.J., Crane M.M., Copeland K., Williams W.V.: Hypereosinophilic syndrome: an update. *Am. J. Hematol.*, 2005; 80: 148-157
- [32] Workman P., Aboagye E.O., Balkwill F., Balmain A., Bruder G., Chaplin D.J., Double J.A., Everitt J., Farningham D.A., Glennie M.J., Kelland L.R., Robinson V., Stratford I.J., Tozer G.M., Watson S. i wsp.: Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br. J. Cancer*, 2010; 102: 1555-1577
- [33] Zmorzyński S., Filip A.A., Koczkodaj D., Michalak M.: Molekularne i cytogenetyczne czynniki prognostyczne w ostrej białaczkę szpikowej (OBS). *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 158-166

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.