# التهجين الجينى المقارن كأداه لتشخيص سرطانات الدم

**رسالة مقدمة**

**توطئة للحصول على درجة الماجستير فى**
**الباثولوجيا الأكلينيكية**

**من**
**الطبيبة/ نسرين حمدى محمود**
بكالوريوس الطب و الجر حة
كلية الطب- جامعة عين شمس

**تحت اشراف**
**أ.د/ زينب محمد توفيق**
أستاذ الباثولوجيا الأكلينيكية و الكميائية
كلية الطب- جامعةعين شمس

**د/ أمال عبد الحميد محمد**
أستاذ مساعد الباثولوجيا الأكلينيكية و الكميائية
كليه الطب- جامعة عين شمس

**كليه الطب**
**جامعة عين شمس**
**٢٠٠٧**

# *Acknowledgments*

*First of all I thank ALLAH for granting me the power to proceed and accomplish this work*

*I would like to express my endless gratitude and appreciation to* ***Prof. Dr. Zeinab Mohamed Tawfik.*** *Professor of clinical and chemical pathology, Faculty of Medicine, Ain Shams University. For giving me the honor of working under her supervision and providing me a lot of encouragement through out this work and always.*

*I would like to express my profound gratitude* **to Dr. Amal Abdel Hamid Mohamed,** *Assistant Professor of clinical and chemical pathology, Faculty of Medicine, Ain Shams University for her helpful guidance and Kind instructions during all the work in order to come in this form.*

*I cannot find adequate words to express my sincere gratitude to* ***my family****, Mum, Sherif, Hanan, Hatem and Noha, for their continuous help, support and loving encouragement throughout my study. I really am grateful to* ***my Husband*** *for his concern, patience and encouragement.*

# L I ST OF TABLES

# LIST OF ABBREVIATIONS

| | |
|---|---|
| aCML: | Atypical Chronic Myelogenous Leukemia**.** |
| ABL: | Acute Biphenotypic Leukemia. |
| ALK: | Anaplastic Lymphoma kinase. |
| ALL: | Acute Lymphoblastic Leukemia. |
| AML: | Acute Myeloid Leukemia. |
| AML: | Acute Myeloid Leukemia. |
| APL: | Acute Promyelocytic Leukemia. |
| ARF: | Alternative Reading Frame |
| ATL: | Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. |
| ATM: | Ataxia Telangiectasia mutated. |
| BM: | Bone marrow. |
| BCL: | B cell CLL/ Lymphoma. |
| CBF: | Core binding factor. |
| CBT: | Chromosome Banding Technique. |
| CC: | Conventional cytogenetics. |
| CCD: | Cooled charged coupled device camera. |
| CD: | Cluster of Differentiation. |
| CDK: | Cyclin dependant kinase. |
| cDNA: | Complementary DNA |
| CGH: | Comparative Genomic Hybridization. |
| Cy٣: | Cyanine-٣. |
| CLL: | Chronic Lymphocytic Leukemia. |
| CML: | Chronic Myelogenous leukemia. |
| CMML: | Chronic Myelomonocytic Leukemia. |
| DAPI: | Diamino-phenyl Indole. |
| DF: | Double Fusion Test. |
| DLBCL: | Diffuse large B-cell Lymphoma. |
| DNA: | Deoxyribonucleic acid. |
| DRC: | Drug response curve. |
| ET: | Essential thrombocythemia. |
| ETO: | Eight Twenty One. |
| FAB: | French-American-British. |
| FACS: | Fluorescence Activated Cell Sorter. |

| | |
|---|---|
| FISH: | Fluorescence In Situ Hybridization. |
| FITC: | Fluorescein isothiocyanate |
| GTP: | Guanine nucleotide binding protein. |
| HD: | Hodgikin's disease. |
| HLS: | Haematopoietic-lymphoid system. |
| HMF: | Hyper Metaphase FISH. |
| Hox: | Orphan homeobox gene |
| Ig: | Immunoglobulin. |
| IL: | Interleukin. |
| INK٤a: | Inhibitor of kinase ٤ |
| JMML: | Juvenile Myelomonocytic Leukemia. |
| MCL: | Mantle Cell Lymphoma. |
| MDS: | Myelodysplastic syndromes. |
| M-FISH: | Multiple Fluorescent In Situ Hybridization. |
| MLL: | Myeloid Lymphoid Leukemia. |
| MM: | Multiple Myeloma. |
| MPD: | Myeloproliferative Diseases. |
| MRD: | Minimal residual disease. |
| MYC: | Myelocytoma Gene. |
| ng: | Nanogram. |
| NF-kB | Nuclear Factor kappa B |
| NPM: | Nucleoplasmin. |
| PCR: | Polymerase Chain Reaction. |
| PDGF: | Platelet derived growth factor. |
| Pg: | Pictogram. |
| PHA: | Phytohaemagglutinin. |
| PLL: | Prolymphpcytic Leukemia. |
| PLZF: | Promyelocytic Leukemia zinc finger. |
| PRINs: | Primed In Situ Labeling. |
| PV: | Polycythemia vera. |
| P٥٣: | Protein with molecular weight ٥٣. |
| RA: | Refractory anemia. |
| RAEB: | Refractory anemia with excess blasts. |
| RAEBT: | Refractory anemia with excess blasts in transformation. |
| RARS: | Refractory anemia with ringed sideroblasts. |

| | |
|---|---|
| Rb: | Retinoblastoma. |
| RCMD: | Refractory cytopenia with multilineage dysplasia. |
| RNA: | Ribonucleic acid. |
| RQPCR: | Real time Quantitative PCR. |
| RT-PCR: | Reverse Transcriptase PCR. |
| RXR: | Retinoic X receptor. |
| SKY: | Spectral Karyotyping. |
| SMM: | Smoldring Multiple Myeloma. |
| SMZL: | Splenic marginal zone lymphoma. |
| SSC: | Standared saline citrate. |
| TGF: | Transforming growth factor. |
| TNF: | Tumor necrosis factor. |
| TRITC: | Tetramethyl rhodamine isothiocyanate |
| TSG: | Tumor Suppressor Gene. |
| WHO: | World Health Organization. |
| WT: | Wilms' Tumor. |

# LIST OF CONTENTS

# LIST OF FIGURES

**Figure** **Page**

# AIM OF THE WORK

To overview the role of molecular techniques in diagnosis of haematological malignancies laying stress on comparative genomic hybridization.

## Introduction:

Cytogenetics has contributed significantly to the understanding of the genetics of leukemia and lymphoma over the last ٤٠ years. Chromosomal rearrangements result in the movement of a gene to a new chromosomal location, thus bringing it under the influence of another gene, which may control its expression ***(Grimwade, ٢٠٠١).***

Chromosomal findings are important for the classification and diagnosis of haematological disorders, even the outcome of bone marrow transplantation can be determined by cytogenetics ***(Harrison and Foroni, ٢٠٠٢).***

Chromosomal banding techniques are useful for identifying chromosomal aberrations and imbalances but are less helpful for recognizing potentially amplified regions. Furthermore, this technique requires analysis of metaphases after cell culture, which is time–consuming and may select subclones that had a growth advantages in vitro. Comparative genomic hybridization (CGH) allows rapid analysis of chromosomal imbalances without the requirement of cell culturing and is more reliable than cytogenetic studies for recognizing potentially amplified regions ***(Tsukasaki et al., ٢٠٠١).***

Comparative genomic hybridization (CGH) is especially useful in scanning for deletions and duplications of chromosome material in cancer cells, where detection of such

alternations may help to predict the severity of the cancer ***(Jarosova et al., ٢٠٠٦).***

However, its utility is limited by its resolution and technical difficulty. Current limits of resolution are ١٠ mega bases (١٠Mb) for losses and ٢ Mb for gains, which provides a starting point for positional cloning but not precise localization of genes involved in tumor development ***(Woolf, ٢٠٠٥).***

The application of microarray comparative genomic hybridization has extended from cancer cytogenetics to the detection of any type of gain/ loss, including the detection of subtelomeric deletion in patients with unexplained mental retardation. A further development is array painting, which extends the concept of reverse painting ***(Staal et al., ٢٠٠٦).***

**Aim of the study:**

To overview the role of molecular techniques in diagnosis of haematological malignancies laying stress on comparative Genomic hybridization.

References:

١. Grimwade D. **(٢٠٠١)**: the clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia. Best practice and research in clinical Haematology; ١٤: ٤٩٧.

٢. Harrison C. and Foroni L. **(٢٠٠٢): ** Cytogenetics and Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. Rev Clin Eper Hematol.; ٦(٢): ٩١.

٣. Jarosova M., Pospisilova H., Plachy R., Koptikova J. and Indrak K. **(٢٠٠٦): ** principle and importance of using the array comparative genomic hybridization in haematology. Cas Lek Cesk; ١٤٥(١): ٩.

٤. Staal F.J., Cairo G., Cazzaniga G., Haferlach T., Heuser M., Hofman W.K., Mills K., Schrappe M., Stanulla M., Wingen L. U., Van Dongen J.J. and Schlegelberger B. **(٢٠٠٦): ** Consensus guidelines for microarry gene expression anaysis in leukemia from three European leukemia networks. Leukemia; ٢٠(٨): ١٣٨٥.

٥. Tsukasaki K., Krebs J., Nagai K., Tomonaga M., Koeffler H., Bartram C. and Jauch A. **(٢٠٠١): ** Comparative genomic hybridization analysis in adult T-cell Leukemia/lymphoma: correlation with clinical course. Blood; ٩٧: ٣٨٧٥.

**٦.** Woolf V. **(٢٠٠٥): ** Chromosomes and Cell division. In Emery's Elements of Medical Genrtics. Turnpenney P.D. and Ellard S., Twelfth edition, Philadelphia; ٣: ٣١.

ساهم علم الوراثة الخلوى بشكل فعال فى فهم التركيب الوراثى للوكميا و الأورام اللمفاوية خلال الأربعين سنة الماضية.

وقد وجد أن الخلل الكروموسومى قد يؤدى إلى نقل الجينات لتشغل أماكن جديدة على كروموسومات مختلفة مما يؤدى إلي وقوعها تحت تأثيرات مختلفة.

و تعد الدراسات الكروموسومية هامة فى تصنيف و تشخيص أمراض الدم و كذلك نتائج زرع النخاع من الممكن أن تتحدد بعلم الوراثة الخلوى.

وقد يفيد تحليل الكروموسومات بالطرق العادية فى إثبات إنحراف و إختلال التوازن الكروموسومى ولكنها أقل فائدة فى التعرف على المناطق الكامنة المكبرة، و علاوة على ذلك هذة التقنية تتطلب تحليل الإنقسام الميتافيزى بعد زرع الخلية و هذا يستغرق وقتاً طويلاً و قد يختار مجموعات متجانسة ثانوية لها مميزات فى النمو خارج الجسم.

و قد ساعد التهجين الجينى المقارن فى الفحص السريع لإختلال التوازن الكروموسومى بدون الإحتياج لزراعة الخلية و هو أكثر مصداقية من علم الوراثة الخلوى فى التعرف على المناطق الكامنة المكبرة و أيضاً هو مفيد فى فحص نقص أو تضاعف المادة الكروموسومية فى الخلايا السرطانية مما يساعد فى التنبؤ بشدة المرض السرطانى ، و مع ذلك فإن إستخدامه مقيد بعامل الدقة و الصعوبات التقنية، أما عامل الدقة فيقيد بعشره مليون قاعدة فى الفقد الكروموسومى و اثنان مليون قاعدة فى الإكتساب الكروموسومى و التى تعمل كنقطة بداية لعملية الإستنساخ الموضعى ولكنها لا تعطينا الموقع الفعلى للجين المسؤول عن نموالورم السرطانى.

و قد توسعت تطبيقات التهجين الجينى المقارن بإستخدام المصفوفة المجهرية من الوراثيات الخلوية السرطانية إلى أى نوع من الكسب أو الفقد الكروموسومى مشتملة على تحديد ما تحت القسيم الطرفى للكروموسوم فى المرضى الذين يعانون من التخلف العقلى غير المفسر، و يعتبر تلوين المصفوفة تطوراً إضافيًا حيث يتم فيه توسيع مفهوم التلوين العكسى.

الهدف من الدراسة:

تهدف الدراسة إلى استعراض دور المعالجة الجزيئية فى تشخيص سرطانات الدم مع التركيز على التهجين الجينى المقارن.