

# Molekularno-genetska diagnostika akutne limfoblastne levkemije pri otrocih

## *Genetic diagnostics of acute lymphoblastic leukemia in children*

Gašper Marinšek<sup>1</sup>, Klementina Črepinšek<sup>1</sup>, Maruša Debeljak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

Avtor za korespondenco:

doc. dr. Maruša Debeljak, univ. dipl. biol., spec. lab. med. gen.

Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana,

e-pošta: marusa.debeljak@kclj.si

### POVZETEK

Akutna limfoblastna (limfocitna) levkemija (ALL) je najpogostejše maligno obolenje pri otrocih. Z boljšim razumevanjem bolezni in novimi pristopi zdravljenja se je preživetje teh bolnikov dvignilo nad 80 %. Genetska diagnostika ALL je ključna pri postavljanju diagnoze, ocenjevanju tveganja in izbiri ustreznega zdravljenja. Citogenetske preiskave (kariotip in FISH (fluorescenčna hibridizacija *in situ*)) in RT-PCR (obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo) nam omogočajo prepoznavo aneuploidij in prisotnosti nekaterih najpogostejših translokacij. Z metodo MLPA (angl. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) lahko odkrijemo večje delecije in duplikacije v posameznih genih in z njimi povezane nove prognostične profile, kot je IKZF1<sup>plus</sup>. V ospredje pa zdaj prihajajo predvsem metode sekvenciranja nove generacije, ki omogočajo boljši vpogled v patogenezo bolezni, opredelitev novih genetskih podtipov, prepoznavo novih prognostičnih dejavnikov in morebitnih terapevtskih tarč. Prav tako lahko z njimi spremljamo klonalno dinamiko med zdravljenjem in ob ponovitvi bolezni, kar odpira nove možnosti za boljšo obravnavo teh bolnikov.

**Ključne besede:** akutna limfoblastna levkemija, otroci, genetika, IKZF1<sup>plus</sup>

### ABSTRACT

Acute lymphoblastic (lymphocytic) leukemia (ALL) is the most common malignancy of childhood. Due to major advances in the understanding of disease biology and the development of new intensified treatment protocols, the overall survival rates have risen above 80 %. Comprehensive laboratory diagnostics are crucial for risk stratification and treatment selection. Chromosomal karyotyping, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) are used to identify aneuploidies and the most common chromosomal translocations. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) enables the discovery of large-scale deletions and duplications in individual genes. Using this method, a new prognostic profile with a poor prognosis, IKZF1<sup>plus</sup>, was identified. At the forefront now are the next-generation sequencing methods that give us a better insight into the disease pathogenesis, enable the identification of novel genetic subtypes, new prognostic factors, and genetic lesions which could serve as new potential therapeutic targets. NGS also allows the monitoring of clonal dynamics during therapy and at relapse, which opens up new possibilities for better treatment of patients with relapsed ALL.

**Key words:** acute lymphoblastic leukemia, children, genetics, IKZF1<sup>plus</sup>

## UVOD

Levkemija je rak krvnih celic in kostnega mozga. Gre za heterogeno skupino bolezni, ki jih delimo glede na vrsto prizadetih celic (mieloblastne (mieloične) ali limfoblastne (limfatične)) in hitrost napredovanja bolezni (akutne ali kronične) (1). Akutna limfoblastna (limfocitna) levkemija (ALL) je najpogostejša rakava bolezen pri otrocih: predstavlja približno 25 % vseh rakavih bolezni pri otrocih (2). Pri ALL gre za maligno transformacijo nezrelih predniških celic limfatičnih celic B in T (limfoblastov), kar vodi v pretirano namnožitev blastov v kostnem mozgu. Ti izpodrinejo zdrave celice kostnega mozga, s čimer je ovirana normalna hematopoeza. Pri bolnikih se to kaže kot anemija in z njo povezani bledica ter utrujenost, nagnjenost h krvavitvam in zmanjšan imunski odziv (1, 3). ALL se glede na izvor blastov deli na B- in T-celično. ALL je primarno bolezen otroške dobe. Najpogostejša je pri otrocih, starih 2–5 let, pogostejša je pri dečkih (2, 4). Drugi vrh pojavnosti je pri odraslih, starejših od 60 let (4). V Sloveniji za ALL zbolijo povprečno 13 otrok letno (5). Več kot dve tretjini ALL predstavlja B-celična (4). ALL predstavlja skupino genetskih bolezni, ki so posledica strukturnih sprememb kromosomov, sprememb njihovega števila in nukleotidnih sprememb v genih, ki kodirajo zapise za transkripcijske faktorje, odgovorne za diferenciacijo in proliferacijo limfocitov, tumorsupresorje, proteine, ki regulirajo celični cikel, in epigenetske faktorje. Uspešnost zdravljenja ALL pri

otrocih je v zadnjih letih narasla zahvaljujoč usmerjenemu zdravljenju in izboljšanju pri podpornem zdravljenju. Petletno preživetje otrok v razvitih državah se giblje med 76 in 86 %, vendar je še vedno vsaj 10 % bolnikov, ki so na zdravljenje neodzivni ali imajo ponovitev bolezni (2). ALL pri otrocih z genetskega vidika že dolgo sodijo med najbolje raziskane maligne bolezni. Kljub velikemu napredku v znanju o molekularnih spremembah je naše razumevanje o tem, kako te spremembe med seboj sodelujejo pri nastanku levkemije ali odpornosti na zdravljenje, še vedno pomanjkljivo. Novejše genetske raziskave so pomembno prispevale k razumevanju levkemogeneze in prognoze ter v nekaterih primerih omogočile razvoj tarčnega zdravljenja. Še posebej se usmerja raziskave v zdravljenje in opredelitev molekularnogenetskih sprememb pri bolnikih s ponovitvijo bolezni. Pri razvoju ALL ima pomembno vlogo kombinacija dejavnikov, med katere štejemo podedovane genetske spremembe, iniciacijske lezije (translokacije) in sekundarne spremembe. Podedovane genetske spremembe predstavljajo predispozicijo za razvoj bolezni, iniciacijske lezije in sekundarne spremembe pa vodijo do zaustavitve normalnega razvoja limfatičnih celic in motenj v številnih celičnih poteh, kar se odraža kot levkemija. Do ponovitve bolezni pride zaradi selekcije levkemičnih subklonov ali pridobitve novih genetskih sprememb, ki zagotavljajo odpornost na zdravljenje (6).

## GENETSKE ZNAČILNOSTI AKUTNE LIMFATIČNE LEVKEMIJE CELIC B (B-ALL) PRI OTROCIH

### Hiper- in hipodiploidnost

Anevplodije delimo na hiperdiploidije (več kot 46 kromosomov) in hipodiploidije (manj kot 46 kromosomov). Visoka hiperdiploidnost (več kot 50 kromosomov) je pri otrocih z B-ALL pogosta (25–30 %) in je povezana z dobro prognozo. Hipodiploidnost je redkejša; pojavlja se pri 6 % otrok z B-ALL, prognoza pa je odvisna od števila kromosomov. V splošnem velja, da imajo bolniki s 45 kromosomi srednje dobro prognozo, tisti z manj kot 45 kromosomi pa slabo (6).

### Translokacije

Pri translokacijah pride do fuzije dveh genov in s tem nastanka himernega proteina, ki ima drugačne lastnosti kot izhodna proteina. Translokacije so lahko uravnotežene ali neuravnotežene, pri B-ALL gre v večini primerov za neuravnotežene translokacije. V to skupino spadajo značilne translokacije, kot so t(12;21) [*ETV6-RUNX1*], t(1;19) [*TCF3-PBX1*], t(9;22) [*BCR-ABL1*] in preureditve gena *KMT2A*, ki so podrobneje opisane v nadaljevanju. »

Translokacija t(12;21) je najpogostejša pri otrocih z ALL; pri otrocih z B-ALL se pojavlja pri 15–25 % (7). Pri tej translokaciji pride do fuzije gena *ETV6* (*TEL*) na kromosomu 12p13.2 z genom *RUNX1* (*AML*) na 21q22.1. Rezultat je fuzijski protein ETV6-RUNX1, sestavljen iz 5'-HLH domene (vijačnica-zanka-vijačnica) proteina ETV6 in 3'-DNA-vezavne in aktivacijske domene proteina RUNX1 (8). Fuzijski protein zavira aktivacijo izražanja genov, ki so običajno pod nadzorom transkripcijskega faktorja RUNX1. Translokacija t(12;21) je povezana z dobro prognozo (9).

V skupini translokacij, ki vključujejo gen *KMT2A* (*MLL*), je najpogostejša translokacija t(4;11), za katero je značilna fuzija gena *KMT2A* (*MLL*) na kromosomu 11q23.3 z genom *AFF1* (*AF4*) na 4q21.3 (10). *KMT2A* je DNA-vezavni protein z metilazno aktivnostjo (H3K4), ki pozitivno regulira izražanje genov z vezavo na promotorje različnih genov. Mednje sodijo številni geni *HOX*, ki imajo pomembno vlogo v hematopoezi in razvoju limfatičnih celic. Prognoza otrok s t(4;11) je slaba (11).

Translokacijo t(9;22), ki privede do skrajšanega kromosoma 22, označujemo tudi z imenom Philadelphia kromosom (Ph). Pojavlja se pri približno 5 % otrok z ALL (12). Pri tej translokaciji nastane ena od oblik fuzijskega proteina BCR-ABL1, ki deluje kot konstitutivno aktivna tirozin kinaza. BCR-ABL1 vpliva na signalne poti, ki vodijo v povečano proliferacijo, motnje v diferenciaciji in odpornost na apoptozo. Prognoza otrok s Ph-pozitivno ALL, zdravljenih s standardno kemoterapijo, je slaba. Kombinacija kemoterapije in zaviralcev tirozin kinaze (TKI) izboljša celokupno preživetje (13).

Translokacija t(1;19) vključuje gen *TCF3* (*E2A*) na kromosomu 19p13 in gen *PBX1* na kromosomu 1q23. Gen *TCF3* zapisuje več transkripcijskih faktorjev, kamor spadata E12 in E47. Ta se vežeta na ojačevalne in regulatorne elemente tarčnih genov. *PBX1* prav tako deluje kot transkripcijski faktor. Fuzijski protein TCF3-PBX1 je sestavljen iz transkripcijsko aktivacijske domene E12/E47 in DNA-vezavne domene PBX. Deluje kot transkripcijski aktivator, ki povzroča levkemogenezo (11).

## Genetske nepravilnosti pri normalnem kariotipu

V nekaterih primerih B-ALL ni nobenih kromosomskih nepravilnosti, so pa prisotne genetske nepravilnosti, ki vodijo v spremenjeno izražanje genov ali nastanek novih fu-

zijskih proteinov. Z genomskimi analizami so določili, da gre pri tem za gene, ki regulirajo razvoj limfocitov (14), in gene celičnega cikla (15). V raziskavi 242 bolnikov z ALL so ugotovili, da ima skupno 40 % bolnikov z B-ALL prisotne delecije, amplifikacije, točkovne spremembe ali strukturne spremembe v genih, ki regulirajo razvoj B-limfocitov. Najpogostejša tarča je bil gen *PAX5*, ki je bil spremenjen pri več kot 30 % bolnikov (14).

## Gen IKZF1

Gen *IKZF1* kodira IKAROS, transkripcijski faktor z motivi cinkovega prsta, ki je nujen za diferenciacijo hematopoetskih celic v limfatične. Tvorba dimerov poveča afiniteto vezave na DNA (16). Zaradi alternativnega spajanja eksenov obstaja vsaj osem različnih izooblik *IKZF1* (IK1-8).

Osvetlitev vloge *IKZF1* je omogočila identifikacija genov v predniških celicah limfocitov B, na katere se ta veže in jih regulira. Ferreiros in sod. so z genomskim kartiranjem ugotovili, da tarče *IKZF1* predstavljajo polovico vseh genov, ki se povečano izražajo med diferenciacijo celic B. Geni, ki jih regulira *IKZF1*, so udeleženi pri ključnih procesih diferenciacije, kot so signaliziranje, regulacija celičnega cikla in preurejanje genov za imunoglobuline (17).

Raziskave so pokazale, da so delecije gena *IKZF1* prisotne pri približno 15 % otrok z B-ALL (18,19); najvišja incidenca delecij je pri otrocih s translokacijo *BCR-ABL1* (70 %). Najpogosteje gre za delecijo celotnega gena ( $\Delta 1-8$ ) ali delno delecijo eksenov 4–7. Druge delecije so redkejšje in vključujejo delecije eksenov 2–3, 2–7, 4–8 in 2–8 (18, 19).

Delecije gena *IKZF1* so v več raziskavah povezali s slabo prognozo. Mullighan in sod. so analizirali kohorto 221 bolnikov z B-ALL in jih poimenovali *BCR-ABL1*-podobni (izključili so bolnike s translokacijo t(9;22)) ter ugotovili, da delecije oz. druge spremembe v genu *IKZF1* povečajo verjetnost za ponovitev bolezni. Dodatna analiza bolnikov, razvrščenih v skupino brez visokega tveganja, je pokazala, da je bilo relativno tveganje za ponovitev bolezni pri bolnikih z delecijo *IKZF1* skoraj 12-krat večje kot pri bolnikih brez delecije. Delecija gena *IKZF1* ob diagnozi je eden najpomembnejših napovednih dejavnikov za ponovitev bolezni (20). Tudi petletno preživetje brez dogodka je bilo bistveno nižje pri bolnikih z delecijo *IKZF1* kot pri bolnikih brez nje (69 % proti 85 %) (19).

Avtorji omenjenih raziskav zato predlagajo uvedbo določanja statusa gena *IKZF1* v protokole zdravljenja, kar bo pomagalo prepoznati tiste bolnike, ki potrebujejo intenzivnejše ali alternativno zdravljenje (npr. podaljšanje vzdrževalnega zdravljenja).

## IKZF1<sup>plus</sup>

Stanulla in sod. so v raziskavi iz leta 2018 definirali nov, od minimalne preostale bolezni (angl. minimal residual disease; MRD) odvisen prognostični profil z zelo slabo prognozo, ki so ga poimenovali *IKZF1<sup>plus</sup>* (21). V raziskavo so vključili 991 pediatričnih bolnikov z B-ALL, za katere so imeli podatke o številu kopij naslednjih genov: *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6*, *RBI*, *BTG1*, *EBF1*, *CDKN2A*, *CDKN2B* in *ERG* ter *CRLF2*, *CSFR2A* in *IL3RA*, ki so del regije PAR1 na spolnih kromosomih.

Na podlagi rezultatov so opredelili profil *IKZF1<sup>plus</sup>*, ki zajema tiste bolnike z B-ALL, ki imajo poleg delecije v genu *IKZF1* vsaj še eno dodatno delecijo v genih *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5* ali v regiji PAR1 in hkrati nimajo delecije gena *ERG*. Delecije genov so glede na ugotovitve avtorjev lahko homozigotne ali heterozigotne, razen v primeru *CDKN2B*, pri katerem mora biti delecija homozigotna, da se bolnika uvrsti v skupino *IKZF1<sup>plus</sup>*. Delecijo regije PAR1 so opredelili kot hkratno delecijo genov *CSF2RA* in *IL3RA* ter ohranitev gena *CRLF2*, kar vodi v povečano izražanje slednjega (21). Za skupino *IKZF1<sup>plus</sup>* so ugotovili, da je bilo preživetje brez dogodka v primerjavi s skupinama z delecijo *IKZF1* in brez delecije *IKZF1* bistveno slabše (53 %, 79 % in 87 %). Genetsko sliko bolnikov so povezali z MRD, pri čemer se je pokazalo, da je verjetnost za dogodek izrazito večja pri tistih bolnikih *IKZF1<sup>plus</sup>*, ki so glede na MRD razvrščeni v srednje (MRD-IR) ali visoko tveganje (MRD-HR) (21).

## DIAGNOSTIČNE METODE

Najbolj optimalno diagnosticiranje ALL danes vključuje citomorfologijo, imunofenotipizacijo, citogenetiko (analiza kariotipa in FISH) in RT-PCR za opredelitev najpogostejših translokacij, MLPA za ugotavljanje večjih delecij in duplikacij v posameznih genih (*IKZF1<sup>plus</sup>*) in na koncu še transkriptomске analize (RNA-seq).

Otroku, pri katerem na podlagi anamneze in kliničnih znakov posumimo, da gre za ALL, naredimo v laboratoriju hemogram in diferencialno krvno sliko. Da sum potrdimo, je potrebna še biopsija kostnega mozga in analiza razmaza.

Za dokončno postavitev diagnoze B-ALL je treba določiti imunofenotip limfoblastov iz periferne krvi ali kostnega mozga. Določitev poteka s pretočno citometrijo (angl. Flow Citometry; FC) oz. imunohistokemijo. Pri tem je ključno, da dokažemo prisotnost B-celičnih antigenov in hkratno odsotnost T-celičnih antigenov. Pri ugotavljanju odzivnosti na zdravljenje ugotavljamo preostanek bolezni (MRD), pri čemer ugotavljamo prisotnost blastnih celic z metodo pretočne citometrije v vzorcu kostnega mozga na 15. in 33. dan zdravljenja.

S citogenetsko kariotipizacijo v celici lahko ugotavljamo spremenjeno število ali strukturo kromosomov. Te nepravilnosti lahko ugotovimo s pregledom kromosomov pod svetlobnim mikroskopom. S fluorescenčno in situ hibridizacijo (FISH) lahko s pomočjo fluorescenčnih sond natančno označimo posamezne dele kromosomov in jih na ta način prepoznamo ter tako ugotovimo, kakšna je kromosomska preureditev v blastnih celicah. Izolaciji RNA sledi prepisovanje v komplementarne DNA z reverzno transkriptazo (RT-PCR). Za reakcijo PCR izberemo pare oligonukleotidnih začetnikov in na cDNA, ki smo jo pridobili iz RNA, izolirane iz kostnega mozga bolnikov z B-ALL, pomnožimo samo dele fuzijskih genov, ki so nastali kot posledica kromosomske preureditve (npr. translokacije) (23). Citogenetska kariotipizacija je v kombinaciji z metodama FISH in RT-PCR najpomembnejši prognostični parameter, njegova določitev po tem postopku pa je pomembna tudi za klasifikacijo po Svetovni zdravstveni organizaciji (SZO) (22).

MLPA (angl. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) je od ligacije odvisno hkratno pomnoževanje sond, s katerim določamo spremembe v številu kopij (angl. copy number variation; CNV) genomske DNA. Med te spadajo delecije in amplifikacije posameznih genov. MLPA temelji »

na pomnoževanju sond, pri čemer vsaka sonda detektira specifično zaporedje DNA, dolgo okoli 60 nt. Končni rezultat je množica amplikonov PCR (dolgih pribl. 64–500 nt), ki jih ločimo s kapilarno elektroforezo. S to metodo opredelimo prisotnost delecij in duplikacij genov, ki imajo vpliv na prognozo (npr. *PAX5*, *IKZF*, *RB*, ...).

Sekvenciranje RNA nam omogoča pregled transkriptoma po alternativnem izrezovanju, posttranskripcijskih modifikacij, fuzijskih genov in manjših enonukleotidnih genetskih sprememb (SNP; angl. Single Nucleotide Polymorphisms). V živih celicah se geni stalno prepisujejo in po alternativnem izrezovanju nastane zrela molekula mRNA. Glavni koraki pri sekvenciranju naslednje generacije so izolacija DNA ali RNA iz izhodnega vzorca, priprava knjižnice, sekvenciranje, na koncu sledi še bioinformatična obdelava podatkov. Za analiziranje sprememb pri ALL DNA oz. RNA izoliramo iz celic kostnega mozga, lahko tudi iz pe-

riferne krvi. Priprava knjižnice se začne s fragmentacijo nukleinskih kislin. Če želimo analizirati RNA, moramo v naslednjem koraku z reakcijo obratnega prepisovanja sintetizirati komplementarno DNA (cDNA). Sledi poravnavanje visečih koncev ter dodajanje adapterskih in indeksnih sekvenc na DNA. V nadaljevanju sledi čiščenje in izolacija fragmentov določene dolžine, nato se ti fragmenti DNA preko adapterjev vežejo na pretočno celico, kjer se z reakcijo PCR knjižnica DNA pomnoži. Sledi sekvenciranje in obdelava podatkov. Obstaja več različnih platform sekvenciranja naslednje generacije (NGS, angl.: Next generation sequencing), ki uporabljajo različne tehnologije sekvenciranja. Za obdelavo podatkov je na voljo ogromno različnih programov in metod, glavni koraki v postopku pa so procesiranje slike in generiranje odčitkov zaporedja, ocena kakovosti odčitkov, poravnava odčitkov na referenčni genom, identifikacija različic, anotacija različic in vizualizacija (23, 24)

## ZAKLJUČEK

Hiter napredek znanosti in medicine na področju bolezni ALL je omogočil natančnejšo opredelitev bolezni, ki temelji na genetskih in genomskih značilnosti rakavo spremenjene limfatične celice B ali T in je skupaj z usmerjeno terapijo in izboljšanjem podporne terapije omogočila porast uspešnosti zdravljenja bolnikov z ALL. Izziv za prihodnost, v smislu izboljšanja diagnostičnih in napove-

dnih dejavnikov, predstavljajo bolniki z B-ALL, ki jih uvrščamo v skupino s standardnim tveganjem za relaps, pri katerih pride do ponovitve bolezni, ter tisti, pri katerih s standardnimi diagnostičnimi metodami ne najdemo genetskih sprememb, s pomočjo katerih bi lahko bolje opredelili napoved bolezni.

## LITERATURA

1. Karas Kuželčki N. Novi pristopi k zdravljenju akutne limfoblastne levkemije pri otrocih. *Farm Vestn.* 2014;368–77.
2. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(2):83–103.
3. Volavšek M. Akutna limfoblastna levkemija. In: *Klinično-patološki primeri: vaje iz patologije za študente medicine in dentalne medicine.* Ljubljana: Katedra za patologijo Medicinske fakultete; 2012. p. 106–7.
4. Does GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001–2007. *Blood.* 2012;119(1):34–43.
5. Jazbec J, Rajič V, Karas Kuželčki N. Levkemije otroške dobe. *Zdr Vestn.* 2008;77(1):25–30.
6. Mrózek K, Harper DP, Aplan PD. Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(5):991–1010.
7. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor M a, Mauchauffé M, Jonveaux P, et al. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1995;86(11):4263–9.
8. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92:4917–21.
9. Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH, Shurtleff SA. TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. *J Clin Oncol.* 1997;15(3):1150–7.

10. Cimino G, Elia L, Rapanotti MC, Sprovieri T, Mancini M, Cuneo A, et al. A prospective study of residual-disease monitoring of the ALL1/AF4 transcript in patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95(1):96-101.
11. Moorman A V., Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(5):429-38.
12. Ribeiro RC, Abromowitch M, Raimondi SC, Murphy SB, Behm F, William DL. Clinical and Biologic Hallmarks of the Philadelphia Chromosome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 1987;70(4):948-53.
13. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, Long ZJ, Huang D, Yang Y, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer*. 2016;35(1):1-15.
14. Mullighan C, Goorha S, Radtke I, Miller C, Coustan-Smith E, Dalton J, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007;446:758-64.
15. Stock W, Tsai T, Golden C, Rankin C, Sher D, Slovak ML, et al. Cell cycle regulatory gene abnormalities are important determinants of leukemogenesis and disease biology in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95(7):2364-71.
16. Sun L, Liu A, Georgopoulos K. Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J*. 1996;15(19):5358-69.
17. Ferreiros-Vidal I, Carroll T, Taylor B, Terry A, Liang Z, Bruno L, et al. Genome-wide identification of Ikaros targets elucidates its contribution to mouse B-cell lineage specification and pre-B-cell differentiation. *Blood*. 2013;121(10):1769-82.
18. van der Veer A, Waanders E, Pieters R, Willemse ME, Van Reijmersdal S V., Russell LJ, et al. Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood*. 2013;122(15):2622-30.
19. Dörge P, Meissner B, Zimmermann M, Mörcke A, Schrauder A, Bouquin JP, et al. IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Haematologica*. 2013;98(3):428-32.
20. Kuiper RP, Waanders E, Van Der Velden VHJ, Van Reijmersdal S V., Venkatachalam R, Scheijen B, et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia*. 2010;24(7):1258-64.
21. Stanulla M, Dagdan E, Zaliouva M, Anja M, Palmi C, Cazzaniga G, et al. IKZF1 plus Defines a New Minimal Residual Disease - Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2018;36(12):1240-9.
22. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. [Internet]. [cited 2020 Dec 1]. Available from: <https://reference.medscape.com/medline/abstract/27069254>
23. Van Dongen, J.; Macintyre, E.; Gabert, J.; Delabesse, E.; Rossi, V.; Saglio, G.; Gottardi, E.; Rambaldi, A.; Dotti, G.; Griesinger, F. et al. Standardized RT-PCR Analysis of Fusion Gene Transcripts from Chromosome Aberrations in Acute Leukemia for Detection of Minimal Residual Disease: Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia. *Leukemia* 1999, 13, 1901-1928
24. Qin D. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biol Med*. 2019;16(1):4-10.
25. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2016;17(6):333-51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.49>