

Letter to the Editor / Editöre Mektup

Hematolojik Neoplazilerin Karmaşık Genetik Yapısını Aydınlatmada Yeni Nesil Bir Sitogenetik Yaklaşım: Optik Genom Haritalama

A Next Generation Cytogenetic Approach to Elucidate the Complex Genetic Structure of Hematologic Neoplasms: Optical Genome Mapping

Ayşe Gül Bayrak Tokaç

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı,
İstanbul, Türkiye

Özet: Hematolojik neoplazilerin tanısında ve tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde genetik anomalilerin rolü, konvansiyonel sitogenetik yöntemlerin gelişmesiyle birlikte paralel giden bir araştırma alanı olmuştur. Bu süreç moleküler sitogenetik ve moleküler genetik yöntemler ile farklı bir boyuta taşınmıştır. Bu teknikler çoğu zaman konvansiyonel sitogenetiğin eksik kalan yanlarını tamamlamış ancak yerini alamamıştır. Günümüze geldiğimizde ise Optik Genom Haritalama (OGH), konvansiyonel sitogenetiğin yerini alabilecek en muhtemel aday olarak görünmektedir. OGH, teorik olarak karyotip, FISH ve kromozomal mikroarray yöntemlerini aynı platformda buluşturan yeni nesil bir sitogenetik yaklaşım sergiler. Hücre kültürü gereksinimi ve amplifikasyon gerektirmemesi, hedefe spesifik bir yöntem olmaması en önemli artılarıdır. Klasik yöntemler ile saptanan tüm sayısal ve yapısal anomalileri saptayabilirken aynı zamanda kompleks karyotiplerin yapısını doğru bir şekilde aydınlatılabilir. Ayrıca daha önce tanımlanmamış yeni anomaliler de tespit edebilir ki bu durum hematolojik neoplazilerde minimal rezidual hastalık takibinde yeni belirteçlerin bulunmasına olanak tanır. Tüm bunlar hematolojik neoplazili hastaların klinik yönetimine rehberlik edecek önemli unsurlardır. Ancak OGH, kırık noktaları tekrarlayan bölgeleri veya sentromer ve telomer bölgelerini ve psödoautosomal bölgeleri içeren anomalileri tespit edemez. Bu yöntemin önemli bir dezavantajıdır. Yine de hematolojik neoplazilerin heterojen genetik yapısını tespit etmede genomaya yeni bir sitogenetik yaklaşım sunar. Sonuç olarak sitogenetik açıdan baktığımızda hematolojik neoplazilerde tek başına yıllarca en önemli bilgi aracı olan kromozom analizi, gerekli teknik ve analitik iyileştirmelerin ardından belki de gelecekte yerini OGH'ye bırakacaktır.

Anahtar Kelimeler: Hematolojik Neoplaziler, konvansiyonel sitogenetik, Optik Genom Haritalama

Abstract: The role of genetic abnormalities in the diagnosis and treatment of hematologic neoplasms has been an advancing area of research with the development of conventional cytogenetic methods. This process has moved to a different dimension with molecular cytogenetics and molecular genetic methods. These techniques have often complemented but not replaced conventional cytogenetics. Today, Optical Genome Mapping (OGM) appears to be the most likely candidate to replace conventional cytogenetics. OGM represents a next-generation cytogenetic approach that theoretically combines karyotype, FISH, and chromosomal microarray on the same platform. The most important advantages are that it does not require cell culture and amplification and is not a target-specific method. While it can detect all numerical and structural abnormalities detected by classical methods, it can also accurately elucidate the structure of complex karyotypes. It can also detect new abnormalities, which allows the discovery of new markers for minimal residual disease monitoring in hematologic neoplasms. These are all important elements to guide the clinical management of patients with hematologic neoplasms. However, OGM is not able to detect abnormalities involving regions of repeating breakpoints or centromere and telomere regions and pseudoautosomal regions. This is a significant disadvantage of this method. Nevertheless, it offers a new cytogenetic approach to the genome in detecting the heterogeneous genetic makeup of hematologic neoplasms. In conclusion, from a cytogenetic point of view, chromosome analysis, which has been the most important information tool in hematologic neoplasms for years, will probably be replaced by OGM in the future after the necessary technical and analytical improvements.

Keywords: Hematologic Neoplasms, conventional cytogenetic, Optical Genome Mapping

ORCID ID of the authors: [AGBT.0000-0003-2228-0632](https://orcid.org/AGBT.0000-0003-2228-0632)

Received 08.12.2023

Accepted 18.01.2024

Online published 02.01.2024

Correspondence- Ayşe Gül BAYRAK TOKAÇ- İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları ABD., Tıbbi Genetik Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye.
e-mail: abayrak@istanbul.edu.tr

1. Giriş

Hematolojik neoplazilerin genetik anomaliler ile tanımlanmaya başlaması ve tedavi yaklaşımlarının bu anomaliler ışığında değişmesi konvansiyonel sitogenetiğin gelişmesiyle birlikte paralel giden bir araştırma alanı olmuştur. 1960 yılında Philadelphia (Ph) kromozomunun tanımlanmasıyla başlayan bu süreç konvansiyonel sitogenetiğin yanında Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH), Multikolor FISH, Kromozomal Mikroarray (KMA), Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT-PZR), Yeni Nesil Dizileme (YND) gibi moleküler sitogenetik tablo ve moleküler genetik yeni yöntemler ile farklı bir boyuta taşınmıştır. Bu yeni teknikler çoğu zaman konvansiyonel sitogenetiğin eksik kalan yanlarını tamamlamış ancak hiçbiri konvansiyonel sitogenetiğin tahtını yerinden sarsamamıştır. Günümüze geldiğimizde ise Optik Genom Haritalama (OGH), bu tahtın yakınlarında dolaşmaya, tahta ortak olmaya hatta konvansiyonel sitogenetiğin yerini alabilecek en muhtemel aday olarak gelişmeye devam etmektedir. Bu durum ile konvansiyonel sitogenetiğin sonu mu geliyor sorusu yeniden aklımızın bir köşesini meşgul etmeye başlamıştır.

Teknik açıdan bakıldığında OGH, çalışma örneklerinden izole edilen ultra yüksek moleküler ağırlıklı DNA'nın Saphyr® cihazında (Bionano Genomics, San Diego, CA, USA) çalışılmasıyla elde edilen dataların analizini içeren bir yöntemdir. Yeterli DNA için minimum 1,5 milyon hücreye ihtiyaç vardır. Elde edilen sonuçlar bir referans genomla (hg38) karşılaştırılarak özel bir yazılım ile analiz edilir (1).

OGH, teorik olarak karyotip, FISH ve kromozomal mikroarray tekniklerini aynı platformda buluşturan yeni nesil bir sitogenetik yaklaşım sergiler. Teknikte ultra yüksek moleküler ağırlıklı DNA'nın kullanılması, 500 bp'den 1 Mbp'ye kadar yapısal anomalilerin tespit edilebilmesine olanak sağlar. Karyotip çalışmasında olduğu gibi kazanım ve kayıpları, translokasyon, inversiyon, delesyon gibi değişimleri, tanımlanmamış yeni anomalileri saptayabilir.

Karmaşık yeniden düzenlenmelerin olduğu kompleks karyotip durumlarında FISH testinde olduğu gibi translokasyona karışan kromozomların doğru tespitini sağlayabilir, marker kromozomların kaynağını tespit edebilir. Kromozomal mikroarray de olduğu gibi kayıp ve kazanımları belirleyebilir. Ayrıca OGH, kromozom analizindeki gibi kültür yapılmasını ya da PZR'deki gibi amplifikasyon gerektirmez. Hedefe spesifik analiz yapan FISH ya da PZR yöntemleri gibi spesifik bir bölgeyi incelemeyebilir. Tüm genom dizilimi (WGS) ile karşılaştırıldığında, %5 varyant allel frekansı (VAF) tespiti ve 300x kapsama ile oldukça bilgi vericidir. Kullanıcı dostu data analizi ile kolay analiz imkânı sağlar. Tüm bu özellikleri ile özellikle genetik anomaliler açısından heterojen olan hematolojik neoplazilerin genetik analizlerinde önemli bir rol oynayacağı kesindir. Tüm bunların yanında yöntemin mevcut kısıtlarını da atlamamak gerekir. OGH, kromozomların kırık noktaları tekrarlayan bölgeleri veya sentromer ve telomer bölgelerini içeriyorsa (Robertsonian tipi translokasyonlar, telomer füzyonları, izodisentrik kromozomlar) bu yapısal anomalileri tespit edemez. Ayrıca psödootozomal bölge PAR1'i içeren anomaliler, X ve Y kromozomlarındaki dizilerin benzerliğinden dolayı tespit edilemez. OGH, konvansiyonel sitogenetik ve FISH ile tespit edilebilen düşük orandaki klonal anomalileri de (<%10-15) belirlemede yetersiz kalır. Oysa hematolojik neoplazilerde prognostik açıdan önemli farklı anomalilere sahip hücre klonlarına sıklıkla rastlanır. Ayrıca OGH ile poliploidi klonları da tespit edilemez. Bu durum özellikle hiperdiploidi ve hipodiploidinin sıklıkla görüldüğü Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) veya Multipl Miyeloma (MM)'nin tanı ve prognostik sınıflandırmasında önemlidir. Böyle durumlar için konvansiyonel sitogenetik ya da KMA hala başvurulacak en doğru yöntemlerdir (2,3). Tablo 1'de OGH ile sitogenetik ve sitogenetik temelli tekniklerin avantaj ve dezavantajları verilmiştir.

Tablo 1. OGH ile sitogenetik ve sitogenetik temelli tekniklerin karşılaştırılması.

<i>OGM</i>	<i>Sitogenetik ve sitogenetik temelli teknikler (KA, FISH, KMA)*</i>
Tek bir testte sitogenetik ve sitogenetik temelli teknikleri içeren bilgiye sahip olunabilir. Hücre bölünmesinden bağımsız bir uygulama olduğu için kültüre gerek duyulmaz Yapısal varyantlar 500 bp–1 Mbp ; aralığında; Kopya sayısı varyantları >0,5 Mb (VAF > %5–10'da) ise saptanabilir. Kompleks karyotipleri daha iyi tanımlar Tek bir testte tüm genom hakkında bilgi verir	Gerekli görüldüğünde anomaliyi doğrulamak için farklı testler uygulamak gerekebilir. KA için hücre kültürü gerekli, Sitogenetik temelli tekniklerde kültür gerekli değil KA >5-10 Mb anomalileri, FISH >100 kb anomalileri, KMA, 100-500 kb aralığındaki kromozomal delesyon ve duplikasyonları saptar KA, kompleks karyotipleri tanımlamada yetersiz FISH, hedefe spesifik, tanıya bağımlı çalışılmalı KMA, inversiyon, resiprokal translokasyonlar gibi dengeli kromozomal anomalileri tespit edemez
Robertsonian translokasyonlar, telomer füzyonları, izodisentrik kromozomlar ve cinsiyet kromozomlarını içeren translokasyonları, Poliploidi veya tek nükleotid varyasyonlarını (SNV) tespit edemez Subklonların tespitinde yetersiz	KA ve FISH poliploidileri tanımlamada etkin KA, tek hücre düzeyinde analiz yapma avantajına sahiptir ve klonalite hakkında bilgi sağlar FISH ile düşük orandaki klonal anomaliler tespit edilebilir Hematolojik neoplazilerde KA ve FISH teknikleri rutin olarak kullanılır, KMA rutin amaçlı kullanılmamaktadır

*KA, kromozom analizi; KMA, kromozomal mikroaray; VAF, varyant allel frekansı

Literatürdeki birçok çalışmada, anomali içeren klonlar >%5 allelik fraksiyonda ise OGH'nin hematolojik neoplazilerde, klasik sitogenetik yöntemlerle tespit edilen sayısal ve yapısal varyantları, tanımlanması zor kompleks karyotipleri, normal tespit edilen karyotiplerde saptanamamış kriptik translokasyonları tespit ettiği ve konvansiyonel sitogenetik ile yeterli sayıda metafazın elde edilemediği durumlarda bile anlamlı bilgiler sağladığı bildirilmiştir. Böylece hastaların klinik yönetimini değiştirdiği ve sitogenetik testlerle karşılaştırıldığında anomali tespitini üst düzeye çıkardığı ifade edilmiştir (4). Ayrıca OGH ile saptanan yeni anomalilerin tanımlanması, hastaya özel minimal rezidüel hastalık (MRD) belirteçlerinin bulunmasına olanak tanır. Bu da klinik yönetime rehberlik edecek önemli bir unsurdur (5).

Olumlu sonuçların dışında literatürde OGH tekniğinin kısıtlarını bildiren yayınlar da mevcuttur. ALL'de OGH ile kromozom analizi, FISH, tek nükleotid polimorfizm (SNP) array ve multipleks ligasyona bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA) sonuçlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada anomalilerin %90 oranında OGH ile tespit edildiği; %10'luk tutarsızlığın %5'inin, filtreleme sorunları, düşük allel frekansı ya da bazı

bölgelerin düşük kapsama alanı nedeniyle, %5'inin ise kelimenin tam anlamıyla gözden kaçırıldığı bildirilmiştir. Bunun yanında standart tekniklerle tespit edilemeyen 12 ilave anomalinin OGH tarafından bulunduğu ancak bunların sadece 7'sinin doğrulanabildiği ifade edilmiştir (6).

ALL'de yapılan diğer bir çalışmada ise 41 hastanın sadece birinde konvansiyonel sitogenetik ile tespit edilen düşük orandaki hipodiploidinin OGH ile saptanamadığı bildirilmiştir (7).

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)'de yapılan bir çalışmada ise OGH ile karyotip, FISH ve KMA sonuçlarının karşılaştırılmasında, perisentromer veya telomer bölgelerinde kırılmaların olduğu translokasyonların, Y kromozomunu içeren kazanımların ve kromotripsise dahil olan 138 Kb'lik küçük bir delesyonun saptanamadığı bildirilmiştir (8).

Hem sitogenetik hem de moleküler tekniklerdeki gelişmeler hematolojik neoplazilerin heterojen genetik çeşitliliğini tespit etmede uzun bir yol katedilmesini sağlamıştır. Gelecekte sitogenetik anomalilerin tanımlanması için OGH'nin ve nokta mutasyonları (SNV) ile küçük yapısal varyantların tespit edilmesinde YND'nin bir arada kullanımı tam ve kapsamlı bir genomik

analiz için mükemmel bir birliktelik sunabilir (3).

Sonuç olarak sitogenetik açıdan baktığımızda hematolojik malignitelerde tek başına yıllarca

en önemli bilgi aracı olan kromozom analizi, gerekli teknik ve analitik iyileştirmelerin ardından belki de gelecekte yerini OGH'ye bırakacaktır.

KAYNAKLAR

1. Nilius-Eliliwi V, Gerding WM, Schroers R, Nguyen HP, Vangala DB. Optical Genome Mapping for Cytogenetic Diagnostics in AML. *Cancers (Basel)*. 2023;15(6):1684. Published 2023 Mar 9.
2. Smith AC, Neveling K, Kanagal-Shamanna R. Optical genome mapping for structural variation analysis in hematologic malignancies. *Am J Hematol*. 2022;97(7):975-982.
3. Coccaro, N., Anelli, L., Zagaria, A., Tarantini, F., Cumbo, C., Tota, G., Minervini, C. F., Minervini, A., Conserva, M. R., Redavid, I., Paciante, E., Macchia, M. G., Specchia, G., Musto, P., & Albano, F. Feasibility of Optical Genome Mapping in Cytogenetic Diagnostics of Hematological Neoplasms: A New Way to Look at DNA. *Diagnostics (Basel)*. 2023;13(11):1841. Published 2023 May 24.
4. Levy, B., Baughn, L. B., Akkari, Y., Chartrand, S., LaBarge, B., Claxton, D., Lennon, P. A., Cujar, C., Kolhe, R., Kroeger, K., Pitel, B., Sahajpal, N., Sathanoori, M., Vlad, G., Zhang, L., Fang, M., Kanagal-Shamanna, R., & Broach, J. R. Optical genome mapping in acute myeloid leukemia: a multicenter evaluation. *Blood advances*, 2023; 7(7), 1297–1307.
5. Suttorp, J., Lüthmann, J. L., Behrens, Y. L., Göhring, G., Steinemann, D., Reinhardt, D., Neuhoff, N. V., & Schneider, M. Optical Genome Mapping as a Diagnostic Tool in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Cancers*, 2022; 14(9), 2058.
6. Lestringant, V., Duployez, N., Penther, D., Luquet, I., Derrieux, C., Lutun, A., Preudhomme, C., West, M., Ouled-Haddou, H., Devoldere, C., Marolleau, J. P., Garçon, L., Jedraszak, G., & Ferret, Y. Optical genome mapping, a promising alternative to gold standard cytogenetic approaches in a series of acute lymphoblastic leukemias. *Genes, chromosomes & cancer*, 2021; 60(10), 657–667.
7. Rack, K., De Bie, J., Ameye, G., Gielen, O., Demeyer, S., Cools, J., De Keersmaecker, K., Vermeesch, J. R., Maertens, J., Segers, H., Michaux, L., & Dewaele, B. Optimizing the diagnostic workflow for acute lymphoblastic leukemia by optical genome mapping. *American journal of hematology*, 2022; 97(5), 548–561.
8. Puiggros, A., Ramos-Campoy, S., Kamaso, J., de la Rosa, M., Salido, M., Melero, C., Rodríguez-Rivera, M., Bougeon, S., Collado, R., Gimeno, E., García-Serra, R., Alonso, S., Moro-García, M. A., García-Malo, M. D., Calvo, X., Arenillas, L., Ferrer, A., Mantere, T., Hoischen, A., Schoumans, J., ... Espinet, B. Optical Genome Mapping: A Promising New Tool to Assess Genomic Complexity in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Cancers*, 2022; 14(14), 3376.

Etik Bilgiler

Etik Bilgiler Etik Kurul Onayı: Bu makale bir derleme yazısı olduğu için Etik Kurul Onayı alınmasına gerek yoktur.

Telif Hakkı Devir Formu: Yazar tarafından Telif Hakkı Devir Formu imzalanmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Hakem değerlendirmesinden geçmiştir.

Yazar Katkı Oranları: Cerrahi ve Tıbbi Uygulamalar: AGBT. Konsept: AGBT. Tasarım: AGBT. Veri Toplama veya İşleme: AGBT. Analiz veya Yorum: AGBT. Literatür Taraması: AGBT. Yazma: AGBT.

Çıkar Çatışması Bildirimi: Yazar çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

Destek ve Teşekkür Beyanı: Yazar bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.