

SKRÍNING GENETICKÝCH PROGNOSTICKÝCH FAKTOROV U PACIENTOV S CHRONICKOU LYMFOCYTOVOU LEUKÉMIOU

M. Leitnerová, D. Ilenčíková

Oddelenie onkologickej genetiky, NOÚ Bratislava

Chronická lymfocytová leukémia B-typu

- **B-CLL**

- heterogenita

- klinických prejavov
 - priebehu
 - progresie ochorenia

- heterogenita na genetickej úrovni

- štruktúrne a numerické chromozómové aberácie s rôznou prognostickou relevanciou

Familiárny vs. sporadický typ CLL

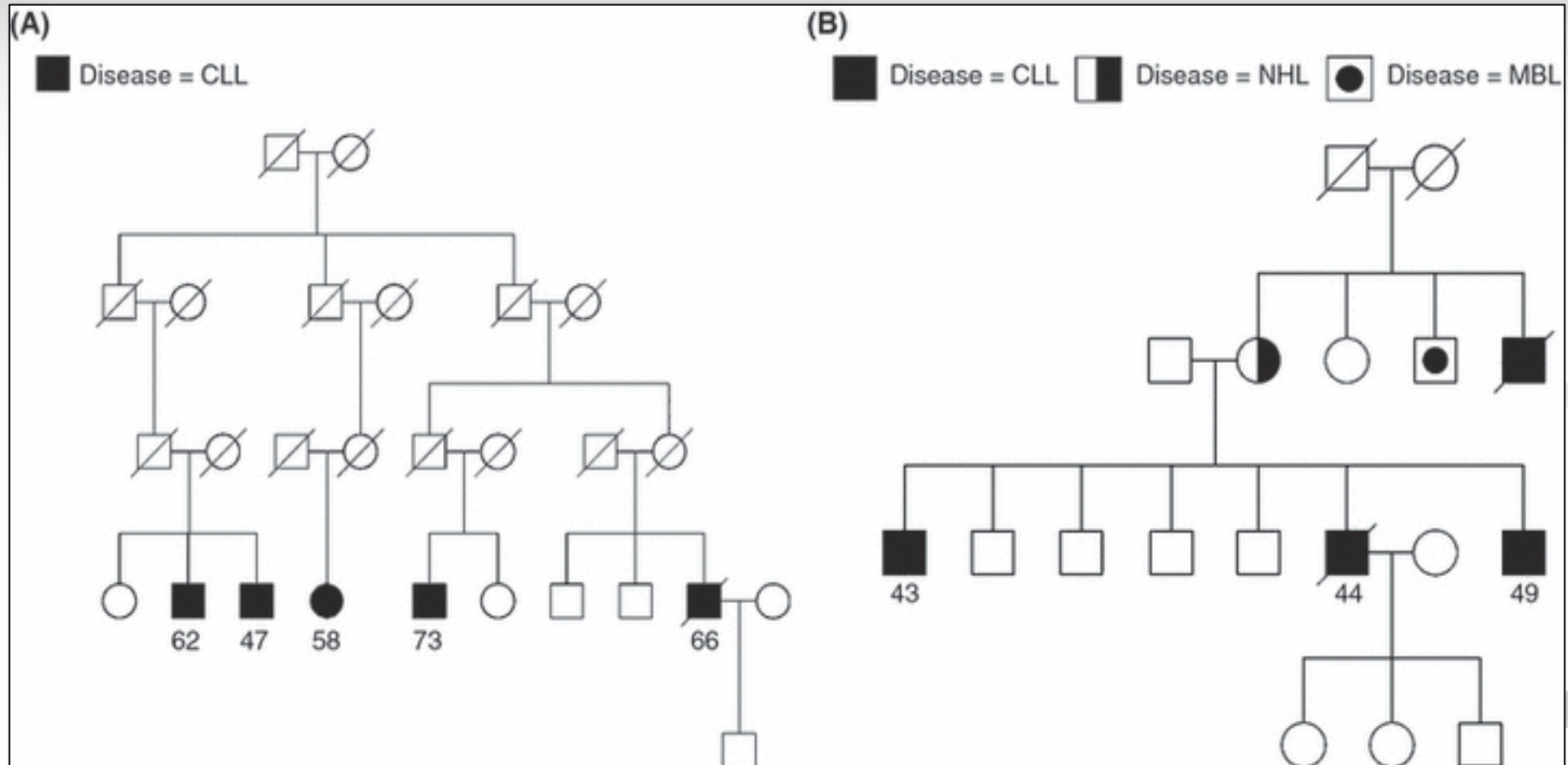
■ Familiárny

- 2 a viac pacienti s CLL v 1.st. príbuzenstve
- vek v čase dg: $57,9 \pm 12,1$
- sekundárne primárne TU:
 - 19% (močový mechúr a skvamocelulárny Ca kože)
 - 25% do 4 r. po CLL
- **transformácia do NHL – bez rozdielu**

■ Sporadický

- ojedinelý výskyt CLL v RA
- vek v čase dg: $70,1 \pm 11,9$
- Sekundárne primárne TU:
 - 8,8%
 - **75% do 4 r. po CLL**
- **transformácia do NHL – bez rozdielu**

Familiárny vs. sporadický typ CLL



Prognostické markery

- Konvenčná cytogenetika

- r. 1978 – žiadna špecifická aberácia u CLL (Mitelman and Levan)
- r. 1990 – pridanie B-bunkových mitogénov, u 40-50% pacientov detekované klonálne chromozómové zmeny
- r. 2000 – mitogén Pokeweed, antiCD40, TPA, cytochalasin B, 80% aberácií (Dohner et al)
- r. 2006 - pridanie IL-4, CpG oligodeoxynukleotidy a IL-2 (Haserlach et.al,2007)

- cytogenetické metodiky – in vitro stimulácia CLL lymfocytov mitogénmi

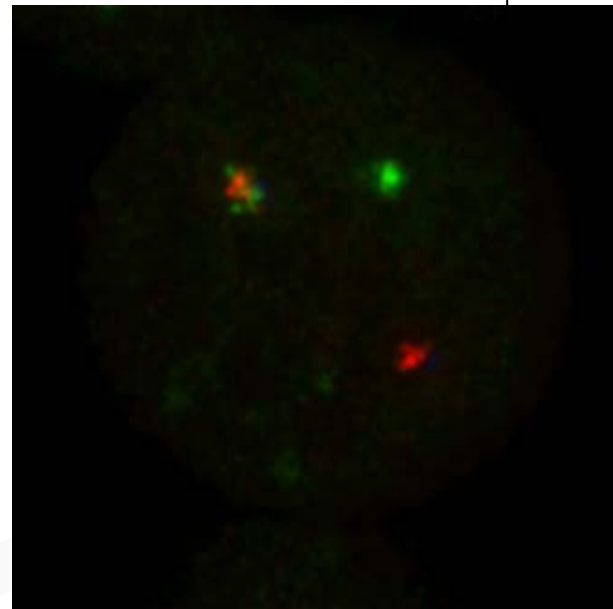
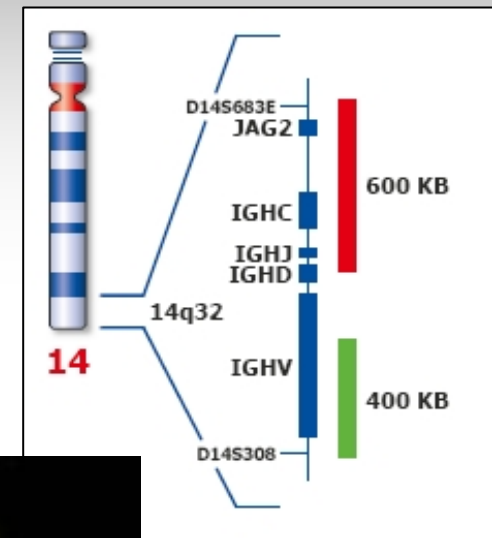
- dôkaz prítomnosti translokácií
 - nové prognostické markery
 - nepriaznivá prognóza

- Molekulárne prognostické markery

- DNA úroveň – mutácie, polymorfizmy (IgH mutačný status)
- RNA úroveň – génová expresia (ZAP70, CLLU1, LPL)

Identifikácia prestavby IgH FISH

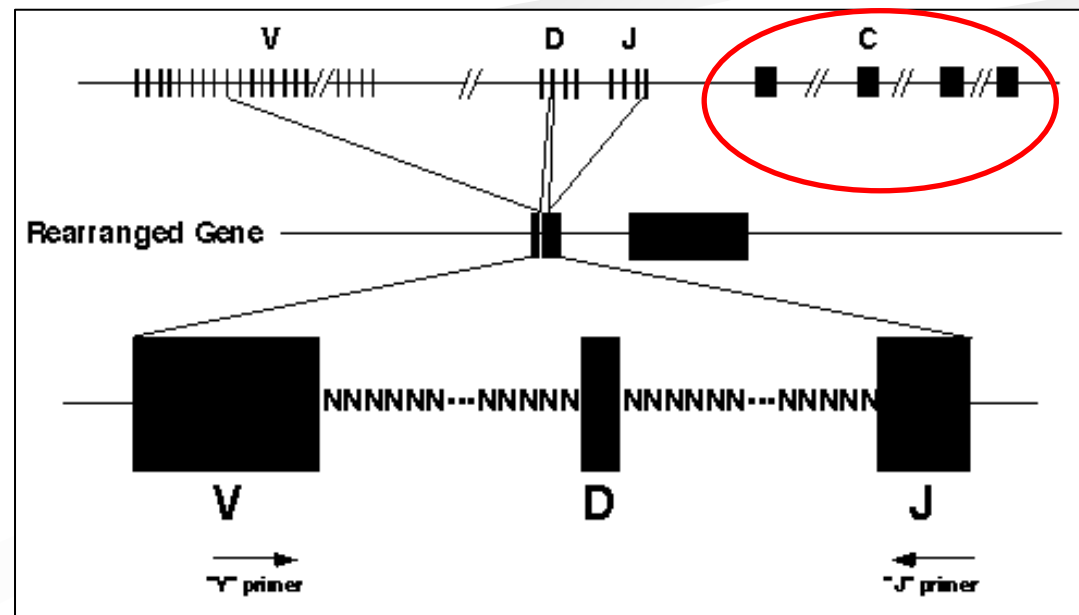
- translokácia IgH génu – nepriaznivý prognostický faktor
- identifikácia fúzneho partnera
napr. t(14;18) – Bcl2-IgH, t(8;14) – MYC-IgH,
- identifikácia delécie varibilnej oblasti IgH génu



Delécie IgH konštantnej oblasti

del(14)(q24.1q32.33)

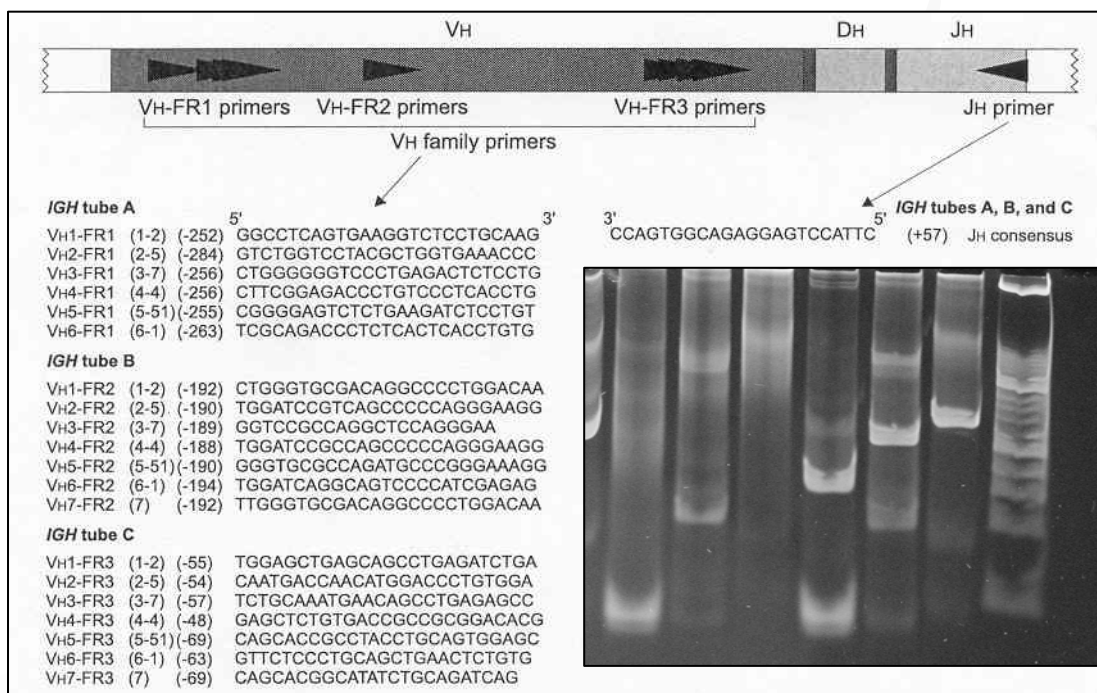
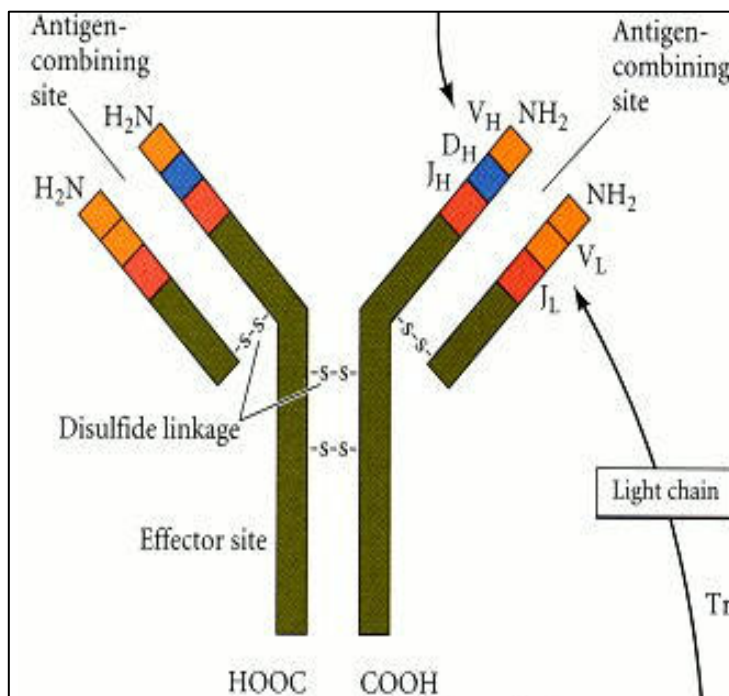
- častejší výskyt u atypických CLL (kratším prežívaním pacientov)
- s trizómiou 12, del p53, del ATM a rôznymi genetickými aberáciami
- častejšie s nemutovaným IgH(V)
- delécie IgH(C) predpoklad intersticiálnych delécií – v klonových populáciách CLL veľkostne heterogénne
- výskyt izolovanej del(14)(q24.1q32.33) bol asociovaný s dobrým prežívaním (nezavisle od veku, klinického štádia a IgH(V) statusu)
- participácia na rozvoji ochorenia



Dôkaz prestavby IgH-klonality

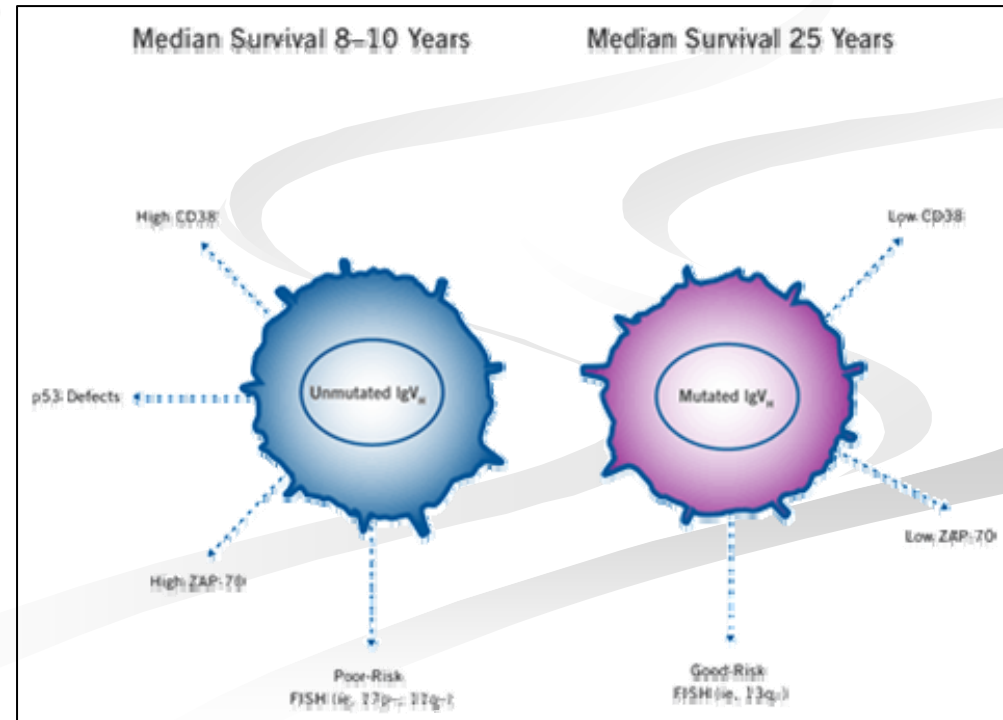


- identifikácia klonálnej B bunkovej populácie
- výsledok je potrebné interpretovať v kontexte klinických, histologických a imunofenotypových dát



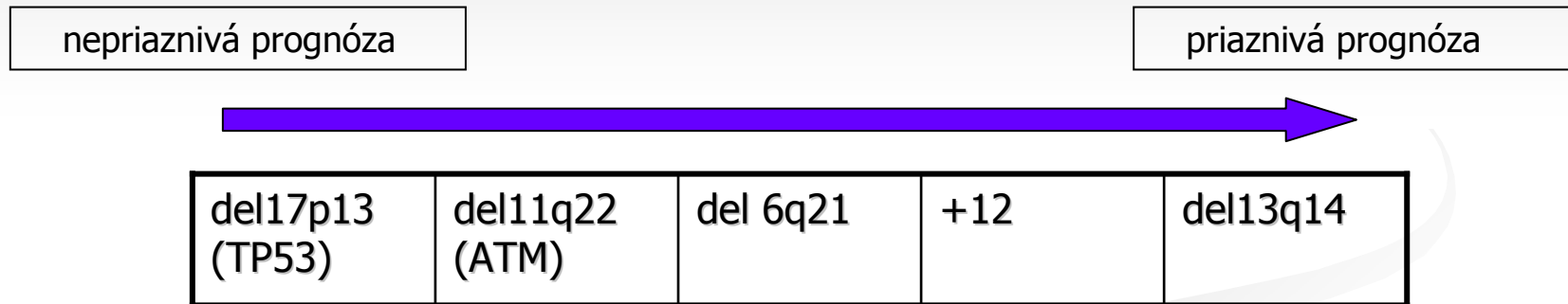
Mutačný status IgH_V

- nezávislý prognostický faktor
- u 40-50% pacientov - expresia IgH_V génového regiónu odlišného od sekvencie zárodočnej línie (2%)
- homológia 98% – nepriaznivá prognóza
- prítomnosť somatických mutácií priaznivá prognóza (s výnimkou regiónu VH3-21)



B-CLL: chromozómové aberácie

frekventované – významné prognostické faktory predikujúce progresiu ochorenia a prežívanie pacienta

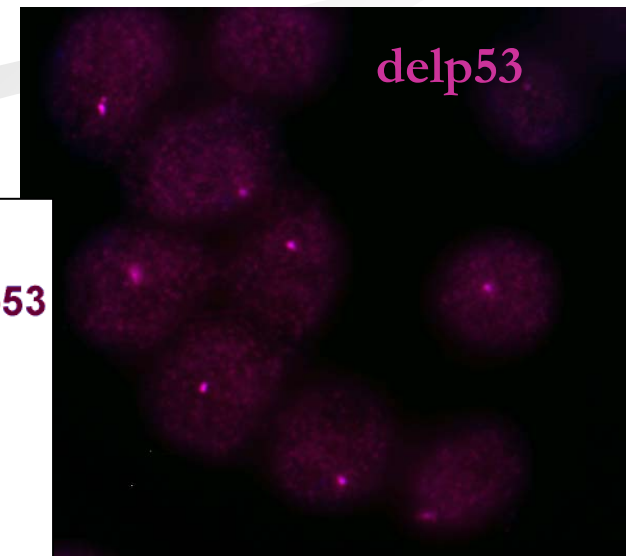
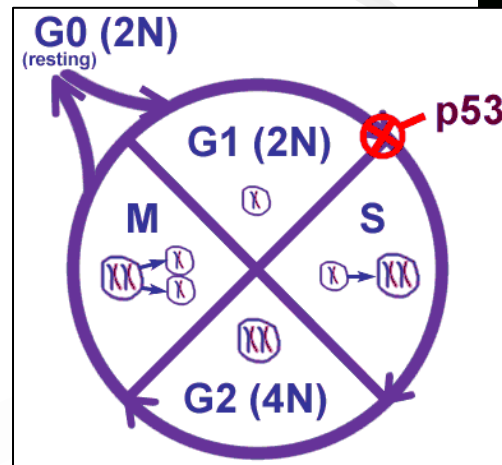


sporadické – prognosticky význam neznámy

del9p21 (CDKN2A/B) p15,p16	+2p24 (MYCN)	+8q24 (MYC)	del10q23 (PTEN)	+19	+18q21 (BCL2)	+3q
----------------------------------	-----------------	----------------	--------------------	-----	------------------	-----	------

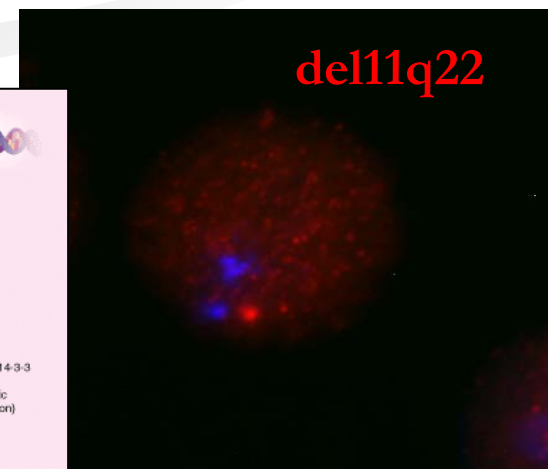
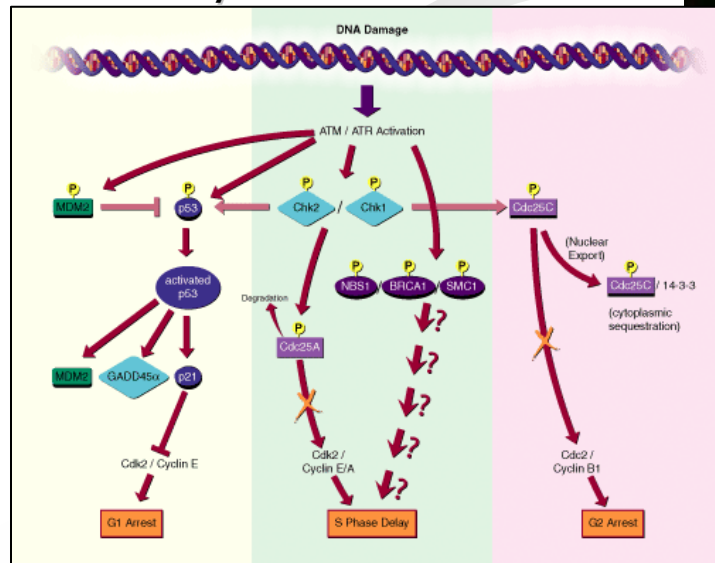
Prognosticky významné chromozómové aberácie

- delp53 – *TP53* (tumor protein p53)
 - p53; LFS1; TRP53; FLJ92943; TP53
- proteín p53 - tumorsupresorový proteín
 - odpoveď bunky na rôznorodý stres reguláciou cieľových génov (indukcia zastavenia bunkového cyklu, apoptóza, senescencia, DNA opravy, metabolické zmeny)
 - vysoká expresia prítomná v transformovaných bunkových líniách
 - mutácie p53 nastávajú v množstve rôznych typoch rakoviny (aj u CLL)



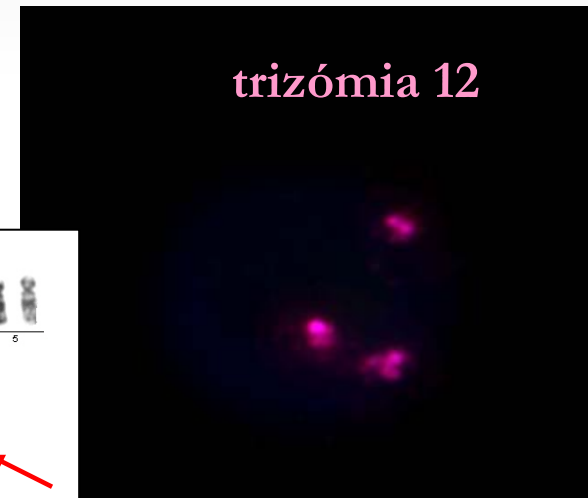
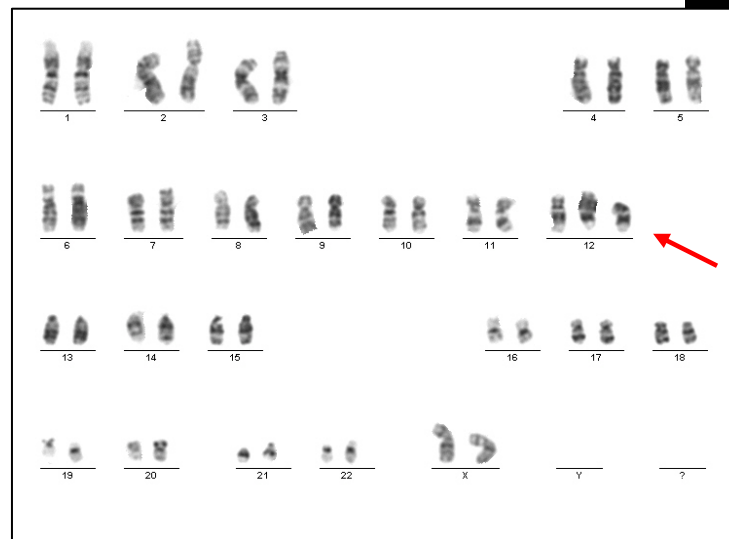
Prognosticky významné chromozómové aberácie

- del11q22 – *ATM* (ataxia telangiectasia mutated)
 - AT1; ATA; ATC; ATD; ATE; ATDC; TEL1; TELO1; MGC74674; DKFZp781A0353; ATM
- proteín - člen rodiny PI3/PI4 kináz
 - regulátor množstva „downstream“ proteínov (p53, BRCA1, CHK2, RAD17, RAD9, BS1)
 - ATM proteín/ATRkinázy – „kontrolóry“ hlavných bodov bunkového cyklu potrebných pre bunkovú odpoveď na DNA poškodenie a pre genómovú stabilitu
- asociovaný s ochorením ataxia teleangiectasia a s niektorými autozomálne recesívnymi ochoreniami



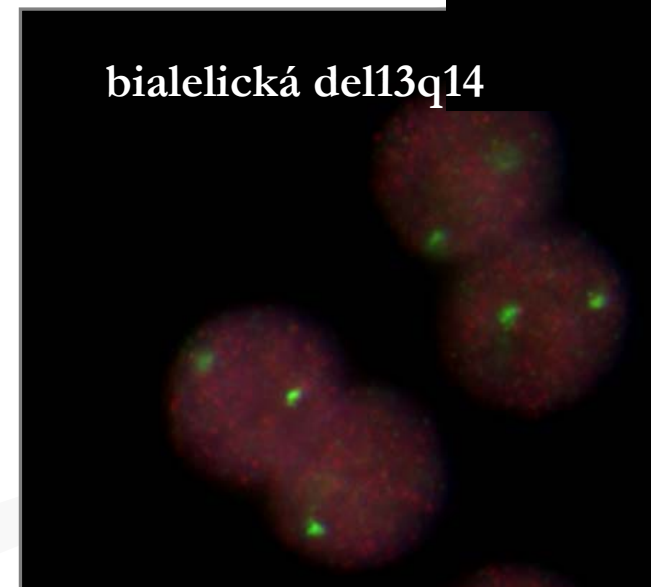
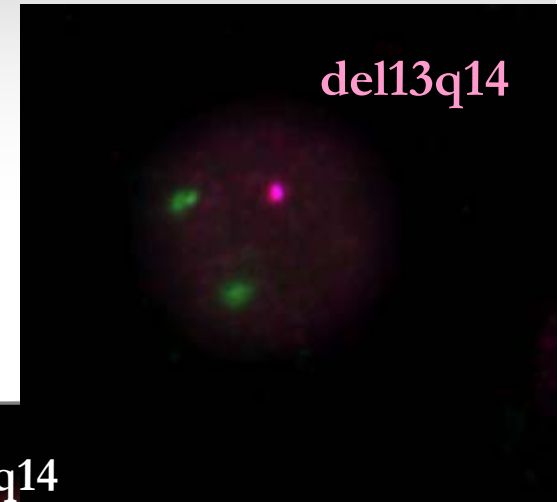
Prognosticky významné chromozómové aberácie

- trizómia chromozómu 12
- 15-20% (cytogeneticky) alebo 16-25 % (FISH)
- obsahuje viac ako 1400 proteín-kódujúcich génov
- 487 lokusov možno spojiť s ochorením u ľudí

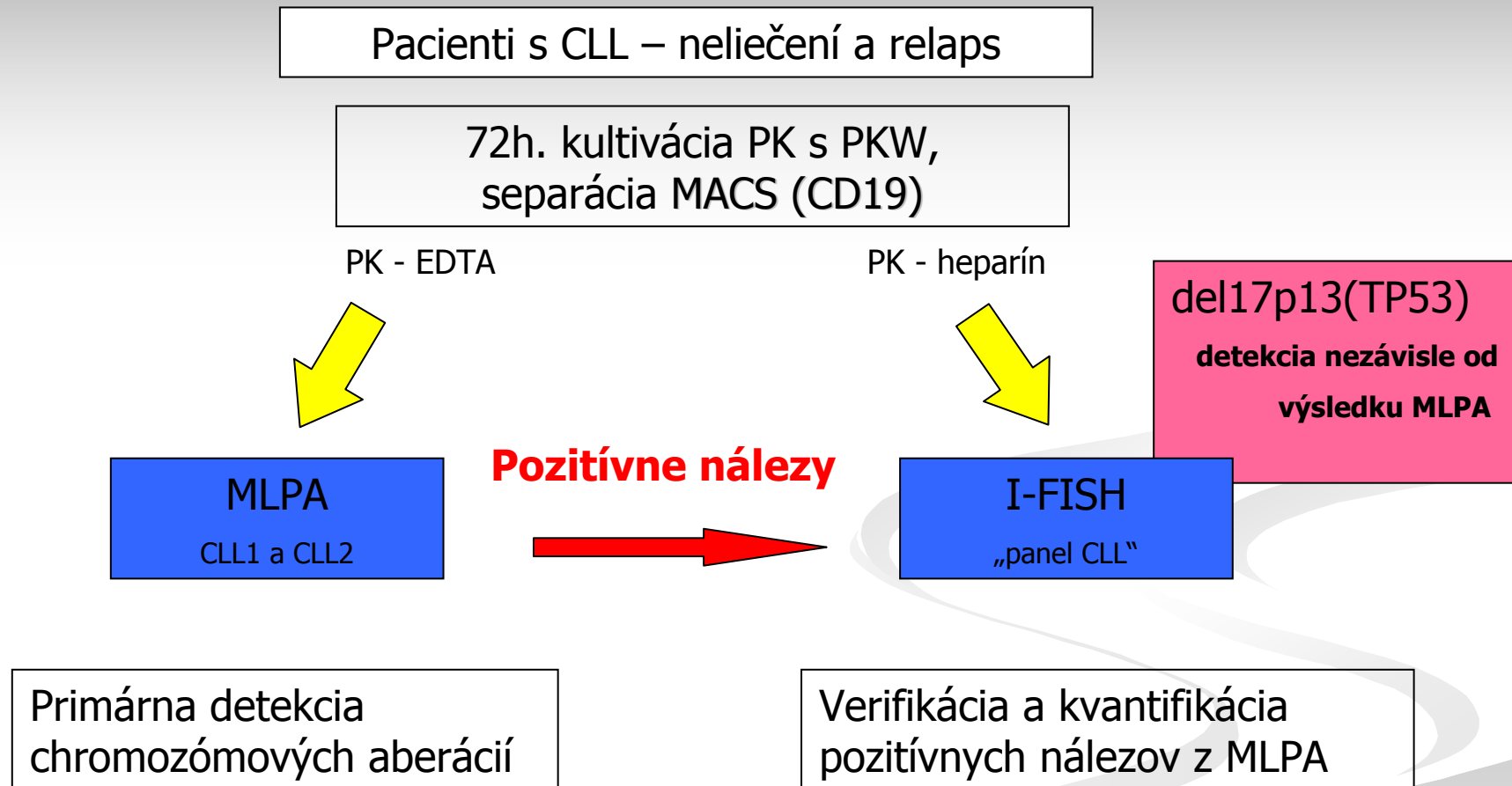


Prognosticky významné chromozómové aberácie

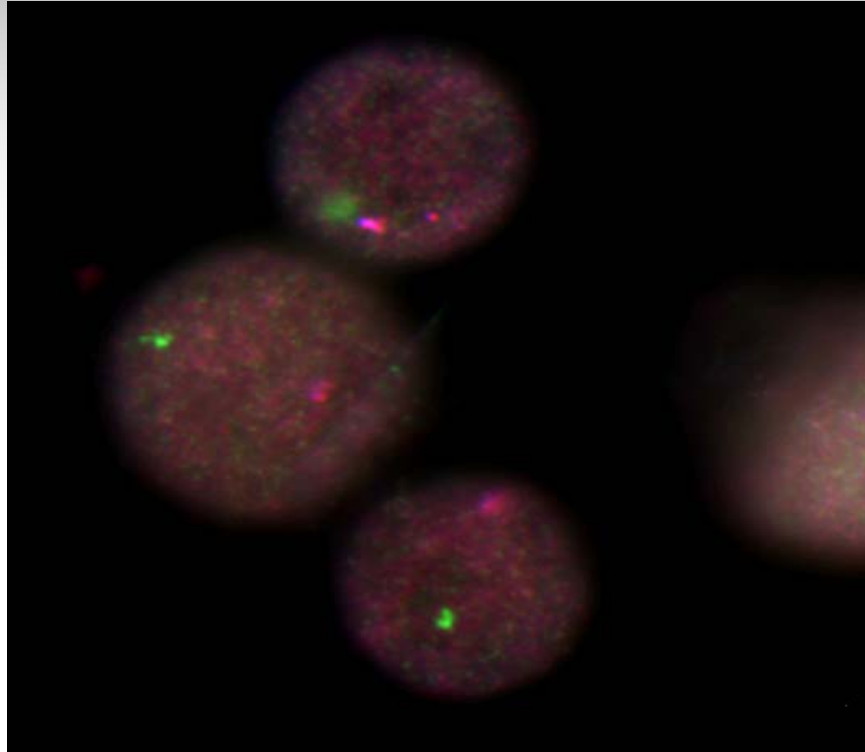
- del13q14
 - často prítomný primárny genetický marker
 - priaznivá prognóza (pokiaľ jediná abnormalita)
 - zahŕňa netranskribovaný gén a 2 microRNA gény
 - marker indukuje prerušenie retinoblastómovej signálnej dráhy



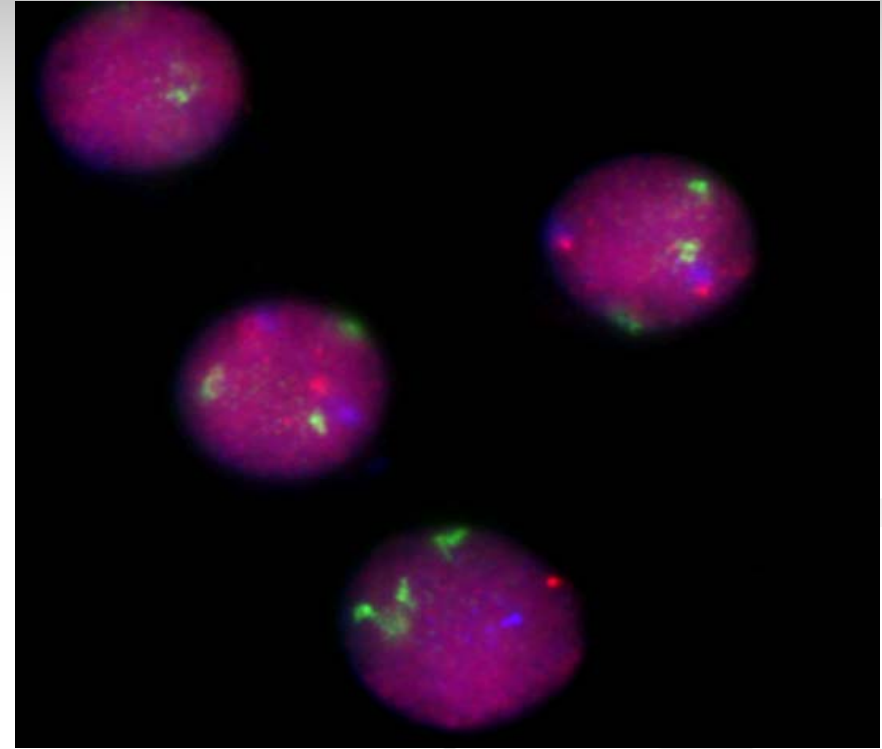
Stratégia genetického vyšetrenia pacientov s B-CLL v NOÚ



CLL1 a CLL2 FISH panel



CLL1 panel
del ATM, del p53

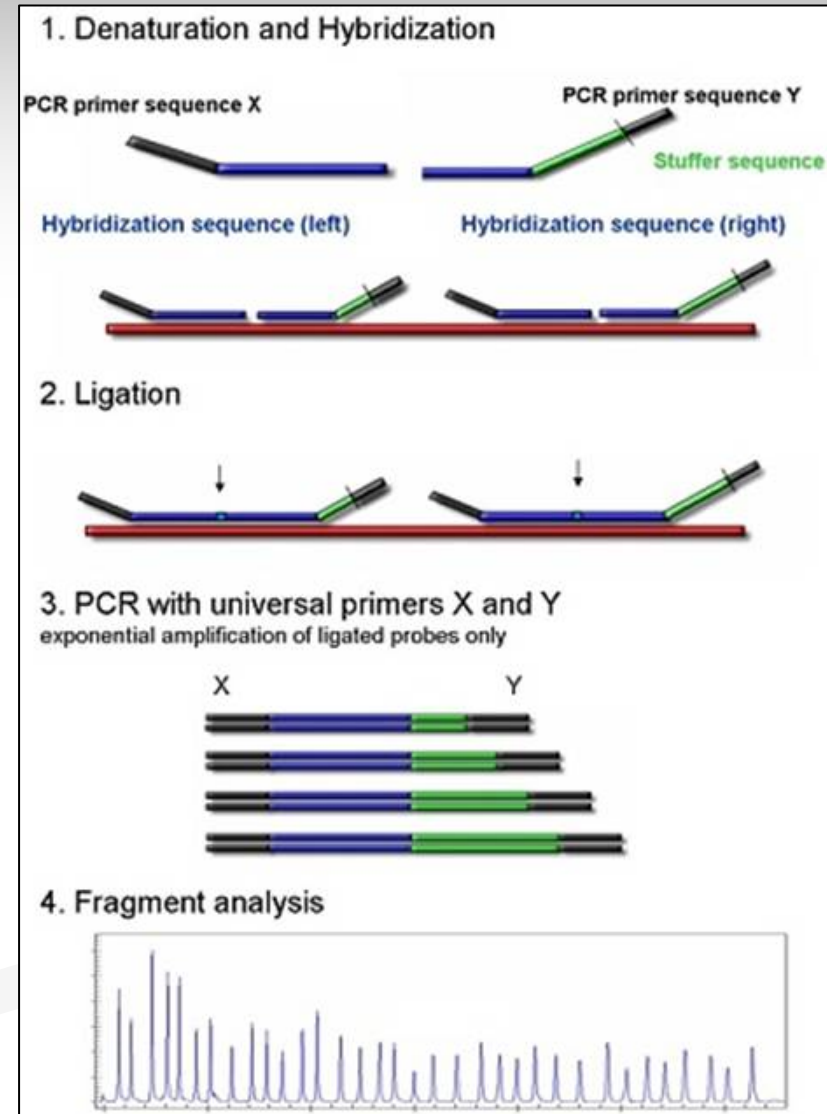


CLL2 panel
del13q14/13q34/+12

MLPA

multiplex ligation-dependent probe amplification

- detekcia genómových alterácií
- identifikácia delécií a duplikácií
- analýza 40 odlišných (50bp dlhých) DNA sekvencií (FISH – 20-50kb)
- multiplexná semikvantitatívna PCR



Analýza metódou MLPA

Frekventované aberácie

Sporadické aberácie

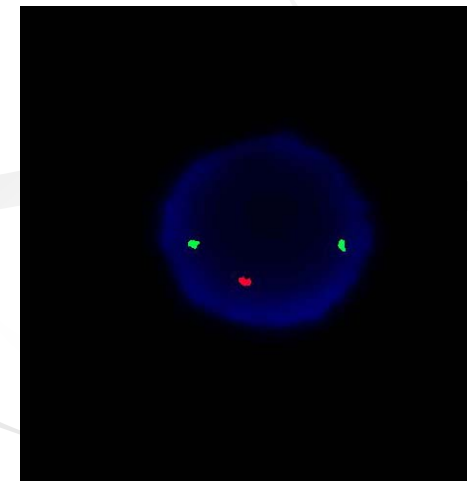
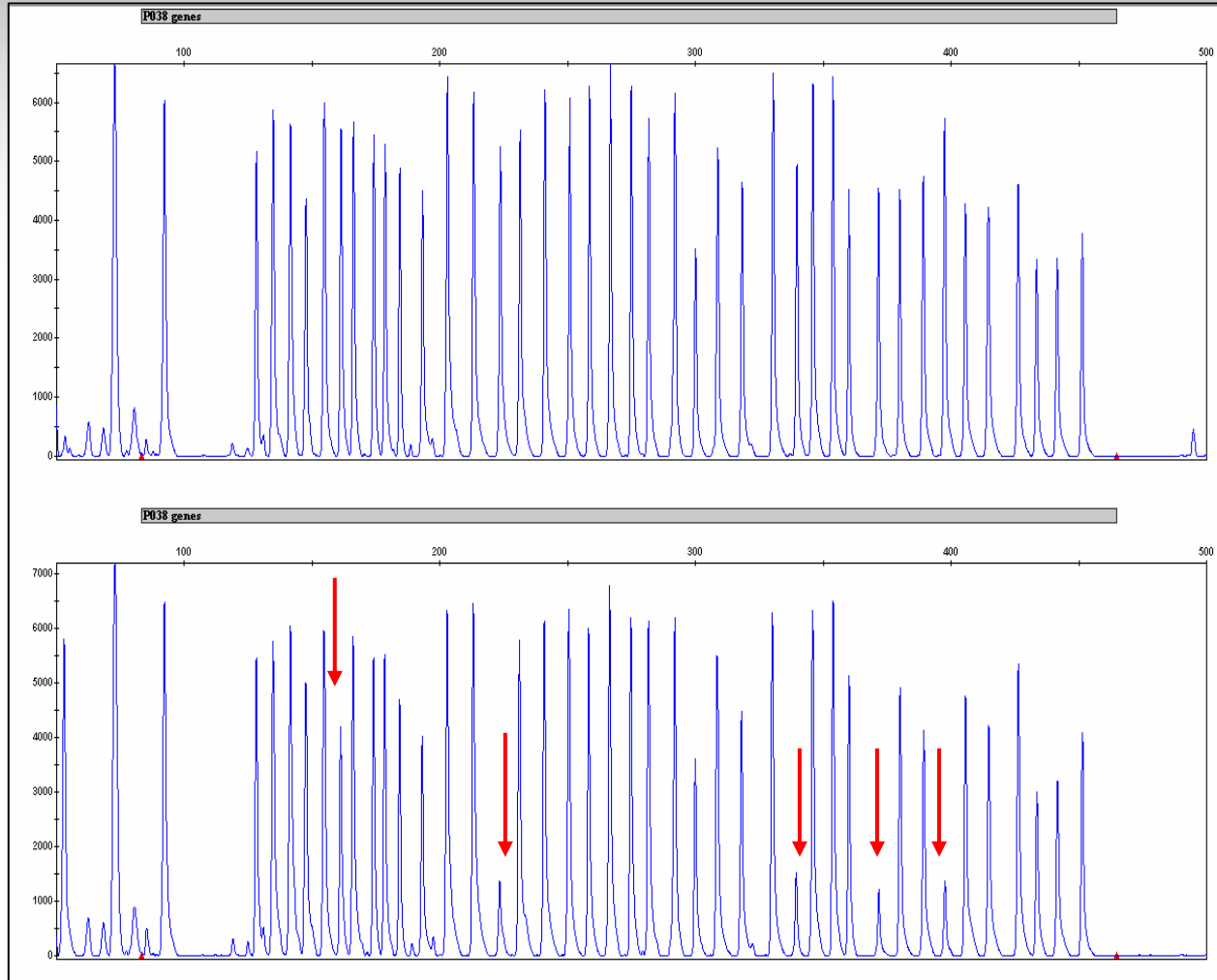
Locus	Number of probes
13q14 (RB1, DLEU, MIR15,-16, KCNRG)	12
11q23 (ATM)	7
+12	10
17p13 (TP53)	8
6q25-26	3
+19	5
2p24 (MYCN)	3
8q24 (MYC)	3
9p21 (CDKN2A/B)	2
10q23 (PTEN)	2
18q21 (MADH4, BCL2)	1

Analýza metódou MLPA

- štandardný postup odporúčaný výrobcom
- vyšetrovaný materiál – priama izolácia DNA alebo izolácia DNA zo separovaných leukocytov (150 ng do reakcie)
- fragmentačná analýza – ABI 3130 a GeneMapper software (Applied Biosystems)

del 13q14 – MLPA vs. FISH

negatívna kontrola



==

pacient

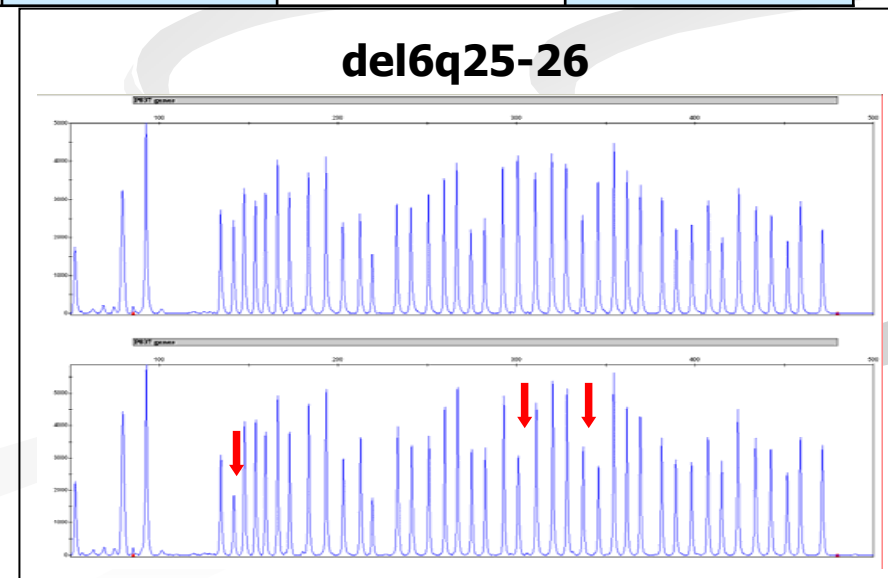
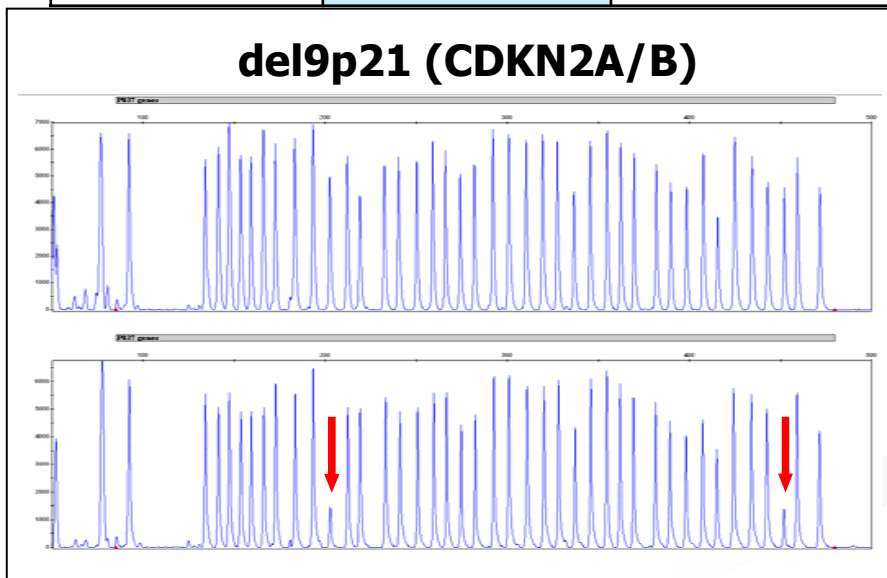
Pacienti s CLL – MLPA a FISH analýza 8/2007 – 4/2010

Počet pacientov				
442				
Pozit.		1 aberácia	2 aberácie	3 a viac aberácií
62% (n = 278)		60,5% (n = 168)	25,9% (n = 72)	7,5% (n = 21)
Döhner et al. (2000)				
del13q	55 %	del13q14	63,5% (n = 47) (single 34,2%)	
del11q	18 %	del11q23 (ATM)	22,3% (n = 62)	
+12	16 %	+12	15,1% (n = 42) (single 10,1%)	
del17p	7 %	del17p13 (TP53)	19,8% (n = 55)	
		sporadické aberácie	21,5% (n = 17)	

Döhner et al. (2000): Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N. Engl. J. Med. 343, 1910-1916.

Sporadické aberácie – MLPA a FISH analýza 8/2007 – 4/2010

Pozit.					
n = 42 (15,1%)					
del6q25-26	del9p21 (CDKN2A/B)	3 x 2p24 (MYCN)	3 x 8q24 (MYC)	del10q23 (PTEN)	+19
n = 10 (3,6%)	n = 6 (2,1%)	n = 13 (4,6%)	n = 5 (1,7%)	n = 4 (1,4%)	n = 7 (2,5%)



B-CLL: MLPA vs. FISH

Interfázová FISH (I-FISH):

- štandardná metóda detekcie chromozómových aberácií asociovaných s CLL

MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)

- nová metóda detekcie delécií a aplifikácií génov a chr. lokusov

Metodické limity MLPA:

- neschopnosť odlíšenia mono-alelickej od bi-alelickej delécie
- nemožnosť presnej kvantifikácie pozitívneho nálezu
- potrebná kombinácia s metódou FISH

Výhody MLPA oproti FISH:

- menšia časová a manuálna náročnosť
- multiplexná reakcia – finančne efektívne
- skríning širšieho spektra genetických markerov u CLL pacientov

Záver

- Metóda MLPA je menej časovo a manuálne náročnou metódou a poskytuje detekciu širšieho spektra patognomických oblastí asociovaných s B-CLL v porovnaní s rutinne vyšetrovaným „CLL – panelom“ metódou FISH.
- Budúce štúdie o CLL použijúc techniky molekulárnej biológie budú pokračovať v zlepšovaní nášho chápania biologickej podstaty a klinickej manifestácie ochorenia a budú identifikovať nové liečebné ciele.

ĎAKUJEM ZA POZORNOST

