

Czy warto wykonywać badania cytogenetyczne i molekularne w szpiczaku mnogim ?



Jan Maciej Zaucha

Gdański Uniwersytet Medyczny

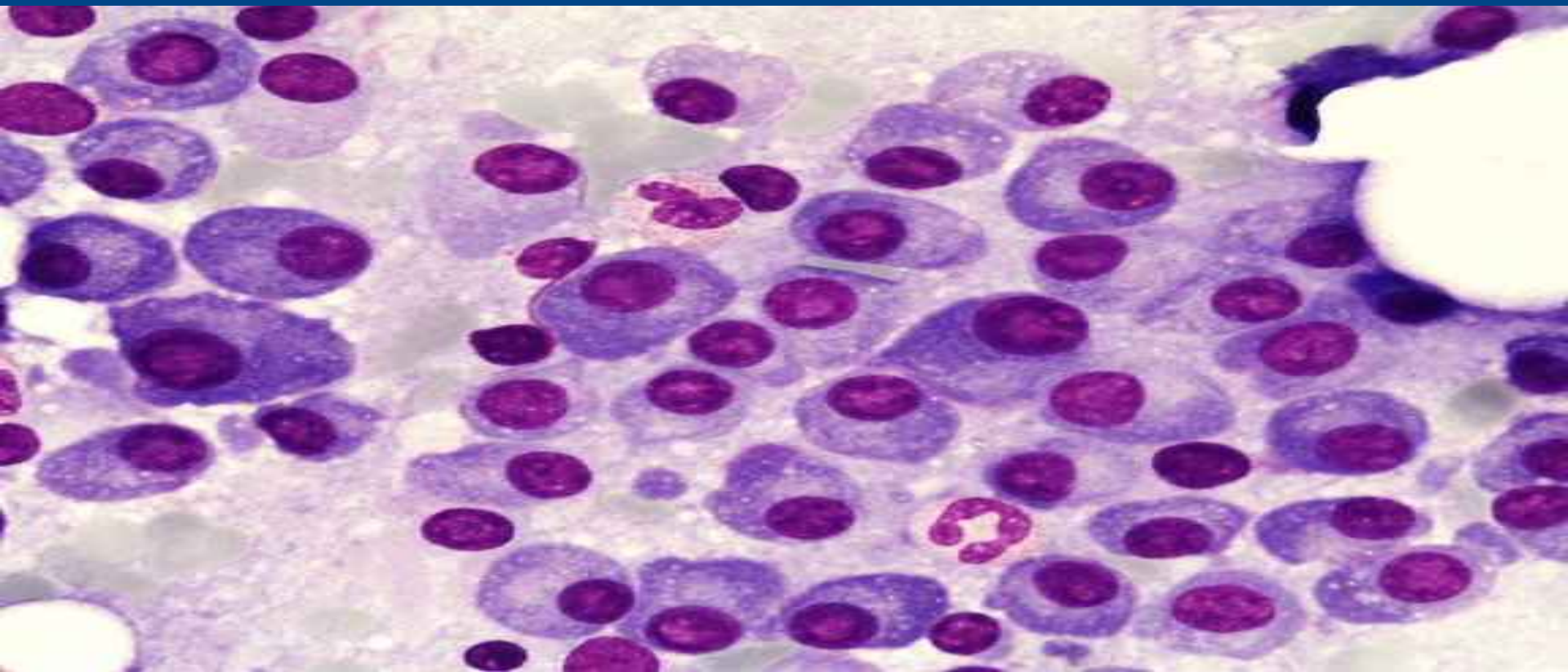
Gdyńskie Centrum Onkologii

Kraków 19.04.2010



TAK WARTO

Dziękuję za uwagę !



Rola badań cytogenetycznych w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego

- **Poznanie biologii choroby**
- **Pomoc w ustaleniu rozpoznania**
- **Rokowanie, określenie czynników ryzyka**
- **Monitorowanie przebiegu choroby (transformacja)**
- **Planowanie interwencji terapeutycznych (leczenie celowane)**

Cytogenetyka szpiczaka mnogiego w „tyle” za innymi chorobami bo:

- konwencjonalne badanie cytogenetyczne – często z komórek układu granulocytarnego (prawidłowy kariotyp)
- szereg zmian cytogenetycznych nie widocznych w konwencjonalnym badaniu cytogenetycznym
- Heterogenność stwierdzanych zmian

Historia odkryć cytogenetycznych w szpiczaku

Liang W, Hopper JE, Rowley JD.

1979 **Liang** (M-cytogenetics)
Abnormal in advanced MM
t(11;14), 14q abn common
Gain chr 1, 5, 9, 11
Cancer. 1979;44:
630-44.

1995 **Drach** (FISH)
Aneuploidy, usually manifest by chr
gain, is common by FISH

Tricot (M-cytogenetics)
Δ13, Δ13q or 11q abnormalities prognostic

Sawyer (M-cytogenetics)
Hyperdiploidy: trisomies 3, 5, 7, 11, 15, 19, 21
Δ13/13q present in 43%*
Structural abn of chr 1 in 48%*
Breakpoint 14q32 common,
with chr 11q13 and 8q24 partners

2000 **Konisberg** (FISH)
17p13 → poor prognosis
Jumping translocations of 1q common

2002 **Avet-Loiseau** (FISH)
t(4;14) ort (14;16) associated 13

2006 **Hanamura** (GEP)
Increasing copy number of 1 q with
disease progression

1985 **Dewald** (M-cytogenetics)
Poor prognosis if any abnormality

1994 **Dao**
Δ Rb-1 in > 50% by FISH
Δ in only 17% by M-cytogenetics

1997 **Chesi**
Fibroblast growth factor receptor 3
is 14q partner in t(4;14)

1998 **Sawyer** (SKY)
Jumping translocations of 1q common

Chesi
t(4;14) c-maf is 14q partner

Avet-Loiseau (FISH)
Illegitimate 14q recombinations in 57%

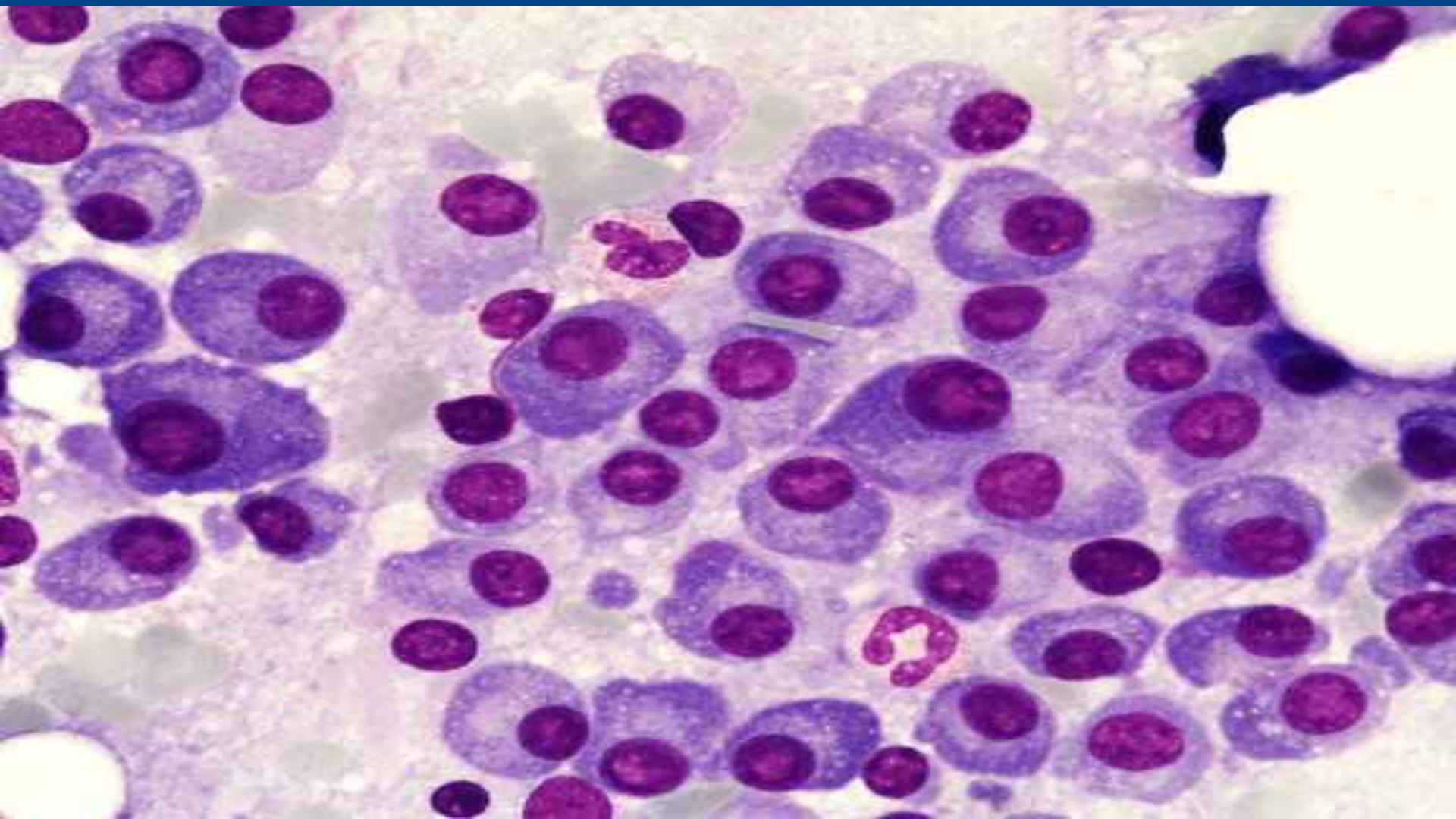
Smadja (M-cytogenetics)
Hyperdiploid vs non-hyperdiploid MM
Hyperdiploid → better prognosis

2001 **Avva** (M-cytogenetics)
Discordant cytogenetics between iliac crest
and other focal lesion biopsy

Smadja (M-cytogenetics)
Hypodiploidy is more important than Δ13

2003 **Fonseca** (FISH)
Association between hypodiploidy &
14q32 translocations

Biologia-rozpoznanie



Dychotomia kariotypu szpiczaka określa drogę ekspansji klonalnej

Hyperdiploidalny (H-MM) kariotyp (48 do 74, mediana 53, chromosomów) z powtarzającymi się trisomiami chromosomów 3, 5, 7, 9, 11, 15 i 19 - klon nabywa i traci chromosomy netto uzyskując większą liczbę chromosomów ważnych dla ekspansji

Nie-Hyperdiploidalny: hypodiploidalny (< 48 chromosomów), pseudodiploidalny (czyli o prawidłowej liczbie chromosomów, ale z aberracjami strukturalnymi), lub prawie tetraploidalny kariotyp (>74 chromosomów). – klon toleruje utratę pewnych chromosomów bo posiada inną/e nieznaną zmianę podtrzymująca jego proliferację

Implikacje biologiczne dychotomii cytogenetycznej szpiczaka mnogiego

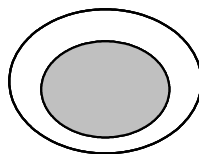
Widoczna od etapu MGUS, utrzymuje się przez cały okres trwania choroby, również w okresie progresji

Klony hyperdiploidalne- bardziej zależne od mikrośrodowiska szpiku – brak linii komórkowych

Klony nie-hyperdiploidalne- zgrupowanie translokacji obejmujących lokus łańcuchów ciężkich immunoglobulin w chromosomie 14 (14q32)

DYCHOTOMIA SZPICZAKA MNOGIEGO

Limfocyt B z ośrodków rozmnażania



MGUS

Nie-hiperdiploidalny

Hiperdiploidalny

MGUS

IgH tx

Del 13

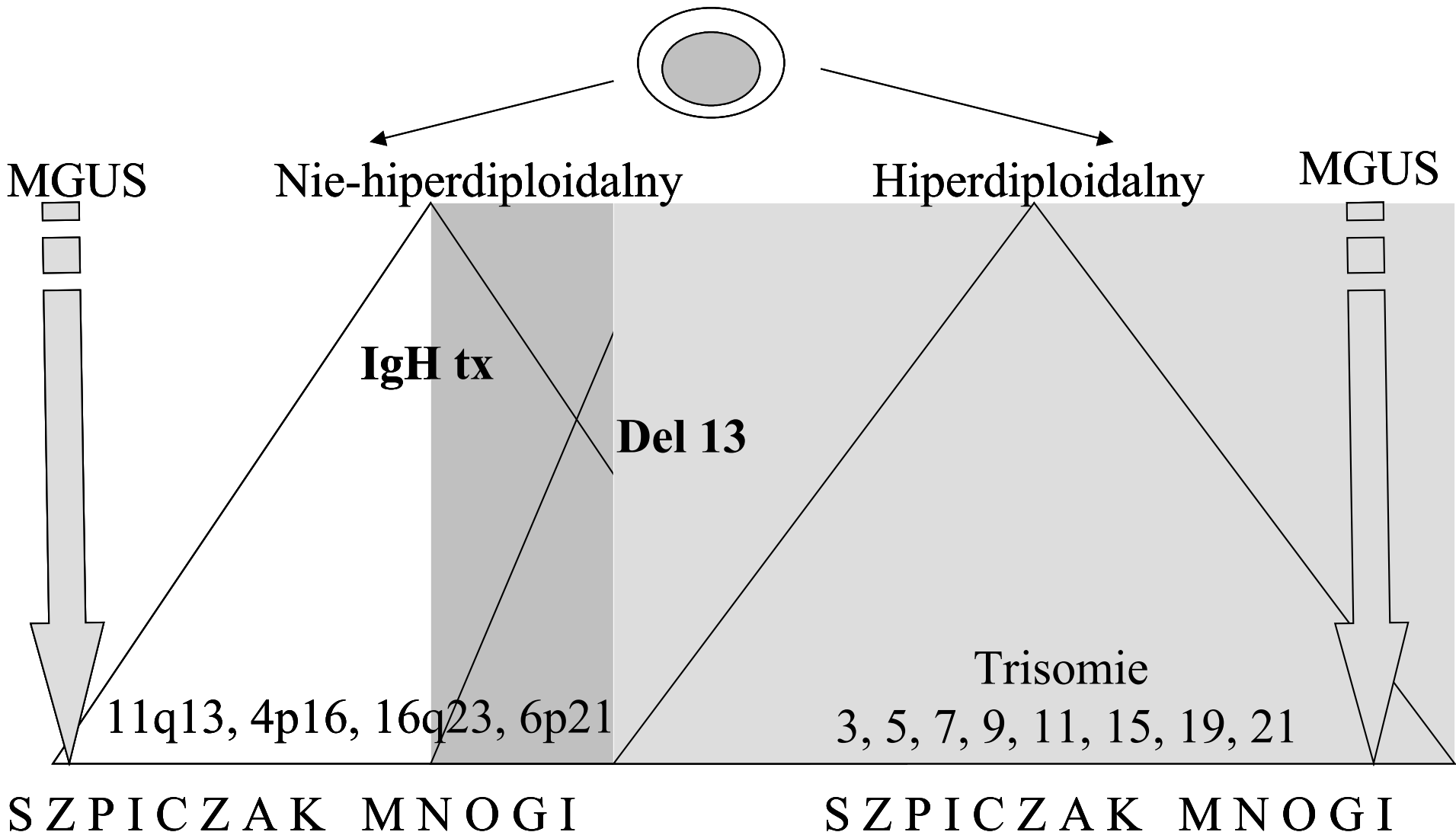
Trisomie

11q13, 4p16, 16q23, 6p21

3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21

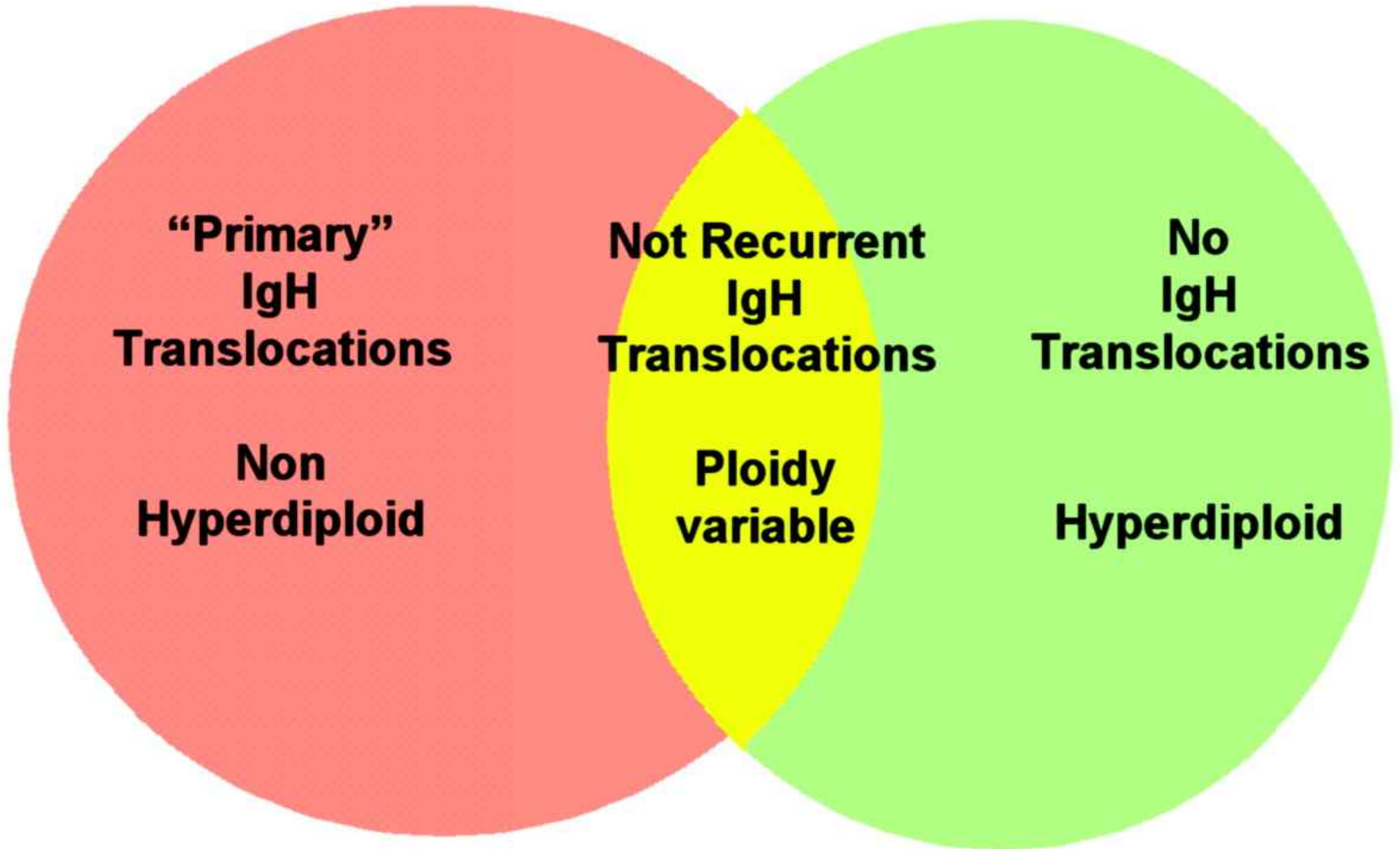
SZPICZAK MNOGI

SZPICZAK MNOGI

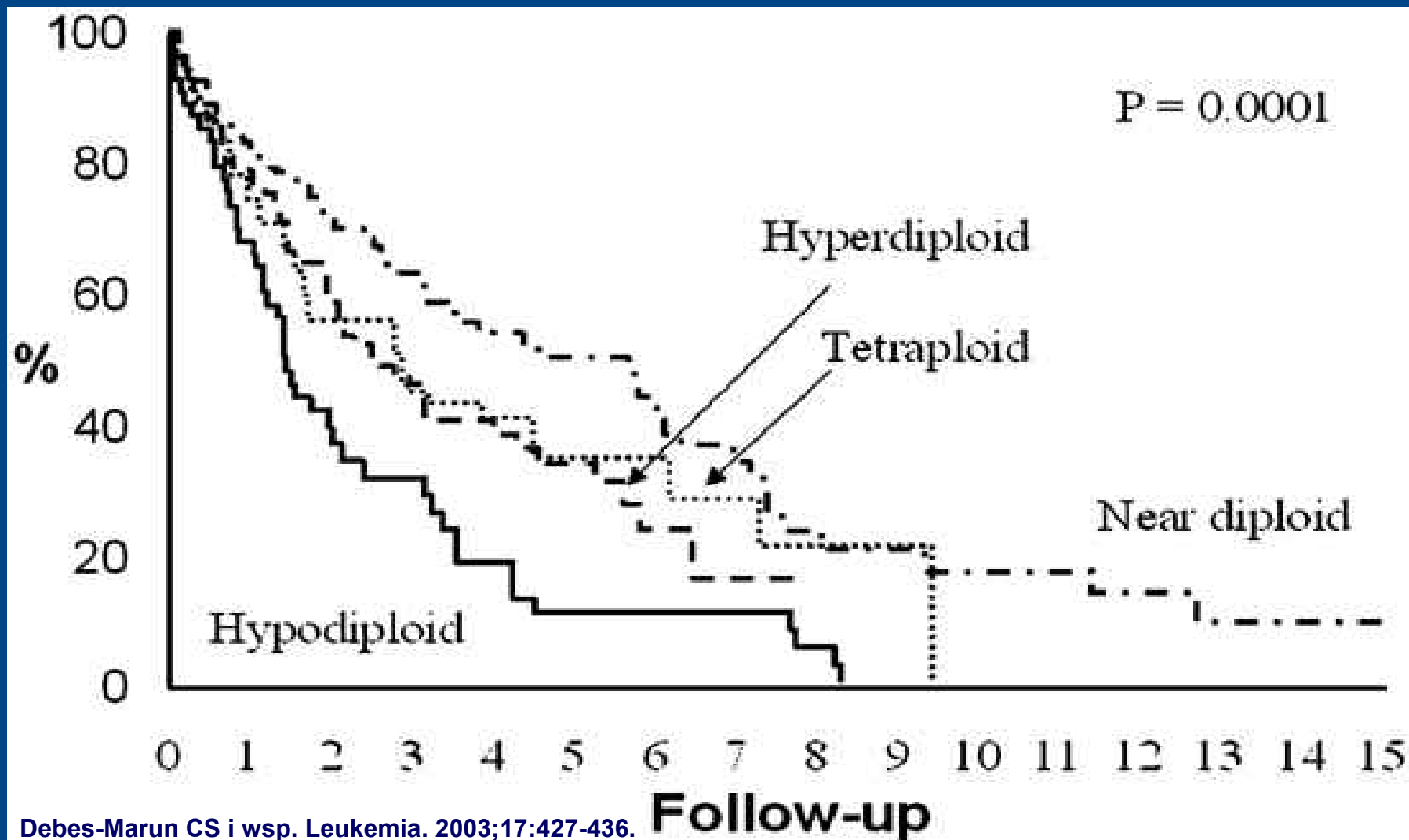


Non-hyperdiploid MM/MGUS

Hyperdiploid MM/MGUS



Implikacje kliniczne dychotomii cytogenetycznej szpiczaka mnogiego grupa hiperdiploidalna (H-MM)



Translokacje obejmujące lokus genów łańcuchów ciężkich immunoglobulin (14q32) grupa nie-hyperdiploidalna (NH-MM)

Translokacja t(11;**14**)(q13;**q32**) dotycząca cykliny D1

Translokacja t(6;**14**)(p21;**q32**) dotycząca cykliny D3

Translokacja t(4;**14**)(p16;**q32**)

Translokacja t(**14**;16)(**q32**;q23)

Translokacja t(11;14)(q13;q32) dotycząca cykliny D1

Częsta translokacja-15-18% chorych
zwiększenie aktywności cykliny D1 (CCND1)
wzrost aktywności genu MYEOV (*myeloma
overexpressed gene in a subset of t[11;14]-
positive multiple myelomas*), konsekwencje
nie są poznane
podobna częstość u chorych z MGUS

Translokacja t(11;14)(q13;q32) dotycząca cykliny D1

klinicznie limfoplasmocytoidalna
morfologia, szpiczak Bence-Jones'a,
powierzchniowa ekspresja CD20 oraz
zaangażowanie genów łańcucha
lekkiego lambda

Przebieg kliniczny jest jednak
zróżnicowany, u większości chorych
mało agresywny, u części gwałtowny,

Translokacja t(6;**14**)(p21;**q32**) dotycząca cykliny D3

u 5% chorych

zwiększenie aktywności cykliny D3

konsekwencje kliniczne podobne jak
przy t(11;14)(q13;q32) ze względu na
niemal identyczny profil ekspresji genów

Translokacja t(4;**14**)(p16;**q32**)

po raz pierwszy wykryta w liniach komórkowych

nie jest widoczna w klasycznym badaniu cytogenetycznym

zwiększona ekspresja 2 genów: receptora 3 czynnika wzrostu fibroblastów (Fibroblast Growth Factor Receptor 3, FGFR3) oraz genu MMSET (Multiple Myeloma SET domain) o aktywności metylotransferazy histonów

Translokacja t(4;**14**)(p16;**q32**)

stwierdza się u około 15% chorych z MM,
często o fenotypie IgA

agresywny przebieg choroby

**nie ma korzyści z leczenia melfalanem w
wysokich dawkach**

Wznowa w ciągu roku od pojedynczej
transplantacji, zwykle oporna na sterydy i leki
alkilujące

często towarzyszy delecja/monosomia
chromosomu 13 = marker t(4;14**)(p16;**q32**)**

Translokacja t(**14**;16)(**q32**;q23)

partnerami są geny z rodziny **MAF** (Musculo aponeurotic fibrosarcoma oncogene family) kodujące czynniki transkrypcyjne

nie jest widoczna w klasycznym badaniu cytogenetycznym

częste występowanie fenotypu IgA λ oraz współwystępowanie **delecji chromosomu 13**

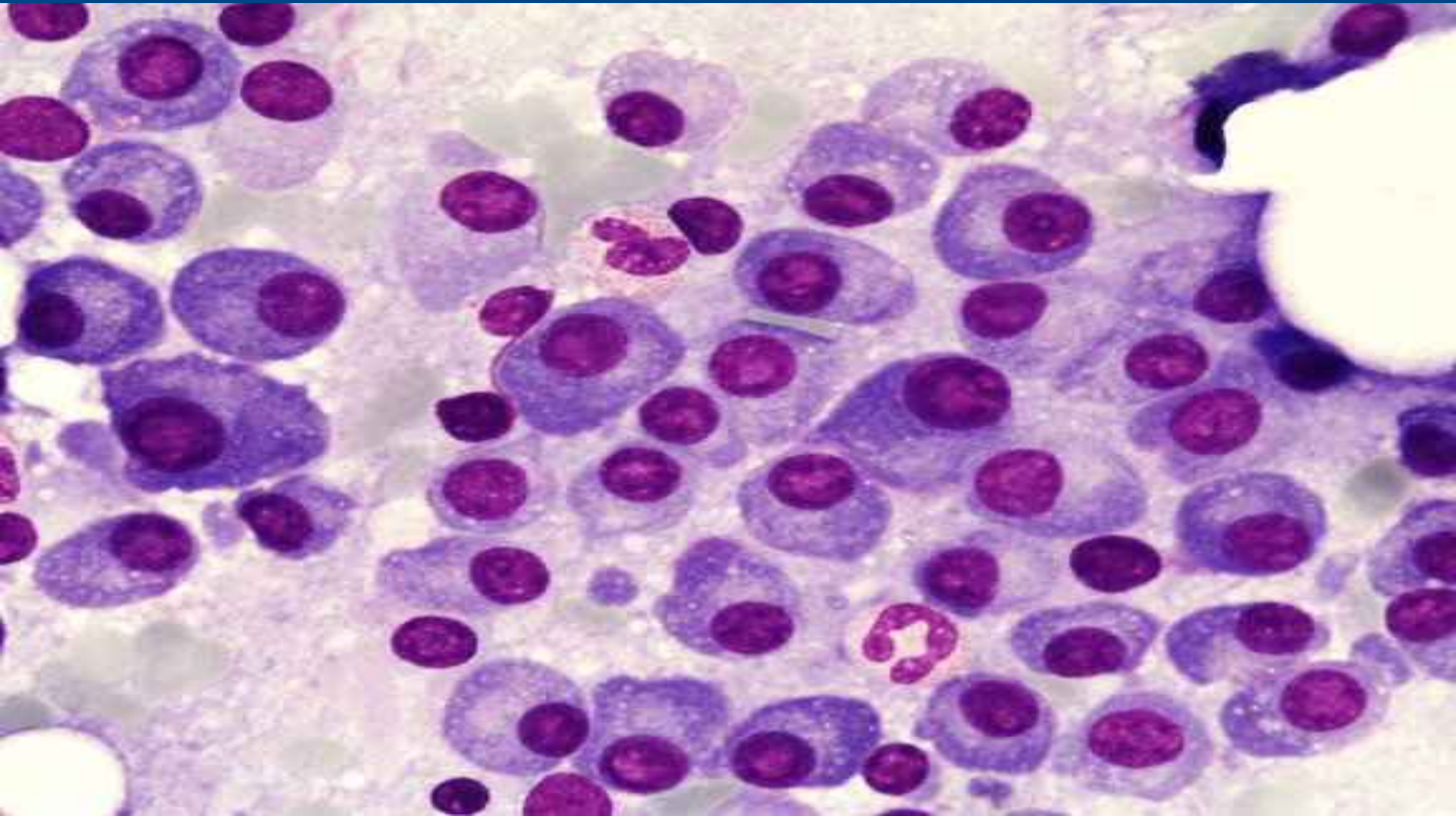
agresywny przebieg choroby

Trisomie

grupa Hyperdiploidalna (H-MM)

szereg **nieparzystych** chromosomów, w szczególności chromosomu 9, 11 i 15
ale trisomia chromosomu 13 bardzo rzadko
Przyczyna tworzenia się trisomii i ich roli w ewolucji klonalnej- nie jasna
niedawne doniesienie: lepsze rokowanie w grupie H-MM wynika z amplifikacji 5q31.3.
(Avet-Loiseau, *et al* 2009)

Biologia-progresja



Czynniki warunkujące progresję

Muszą być obecne we wszystkich genetycznych podtypach szpiczaka, zarówno H-MM i NH-MM, choć z różną częstością

Delecje chromosomu 13

Delecje 17p13 i inaktywacja białka p53

Zaburzenia chromosomu 1

Zaburzenia NF-κB

Zaburzenia genu MYC

Zaburzenia p16 i p18

Delecje 12p i zaburzenia 16q

Delecje chromosomu 13

Występują niemal u połowy chorych z MM, głównie w grupie NH-MM ale też w H-MM, w 85% delecje pierwsze zidentyfikowane aberracje o niekorzystnym znaczeniu rokowniczym

Bezpośredni niekorzystny wpływ nie potwierdzony-
współwystępowanie z innymi niekorzystnymi
aberracjami $t(4;14)(p16;q32)$

istnienie genu supresorowego (antyonkogenu)-brak trisomii 13-delecja akcelerowałaby wzrost komórki.

Niektórzy za taki gen uważają gen Rb gen wrażliwości na siatkówcza (13q14.1-q14.2)

Delecje 17p13 i inaktywacja białka p53

niekorzystne rokowanie, 10% chorych
w obrazie klinicznym często hyperkalcemia, guzy
plazmocytarne, zajęcie ośrodkowego układu
nerwowego oraz krążące plazmocyty we krwi
obwodowej

inaktywację p53 stwierdza się niemal we wszystkich
przypadkach białaczki plazmatycznej

Alo-HCT nie zmniejsza niekorzystnego wpływu
delecji 17p13 (7% vs 56% odpowiedzi)

Zaburzenia chromosomu 1

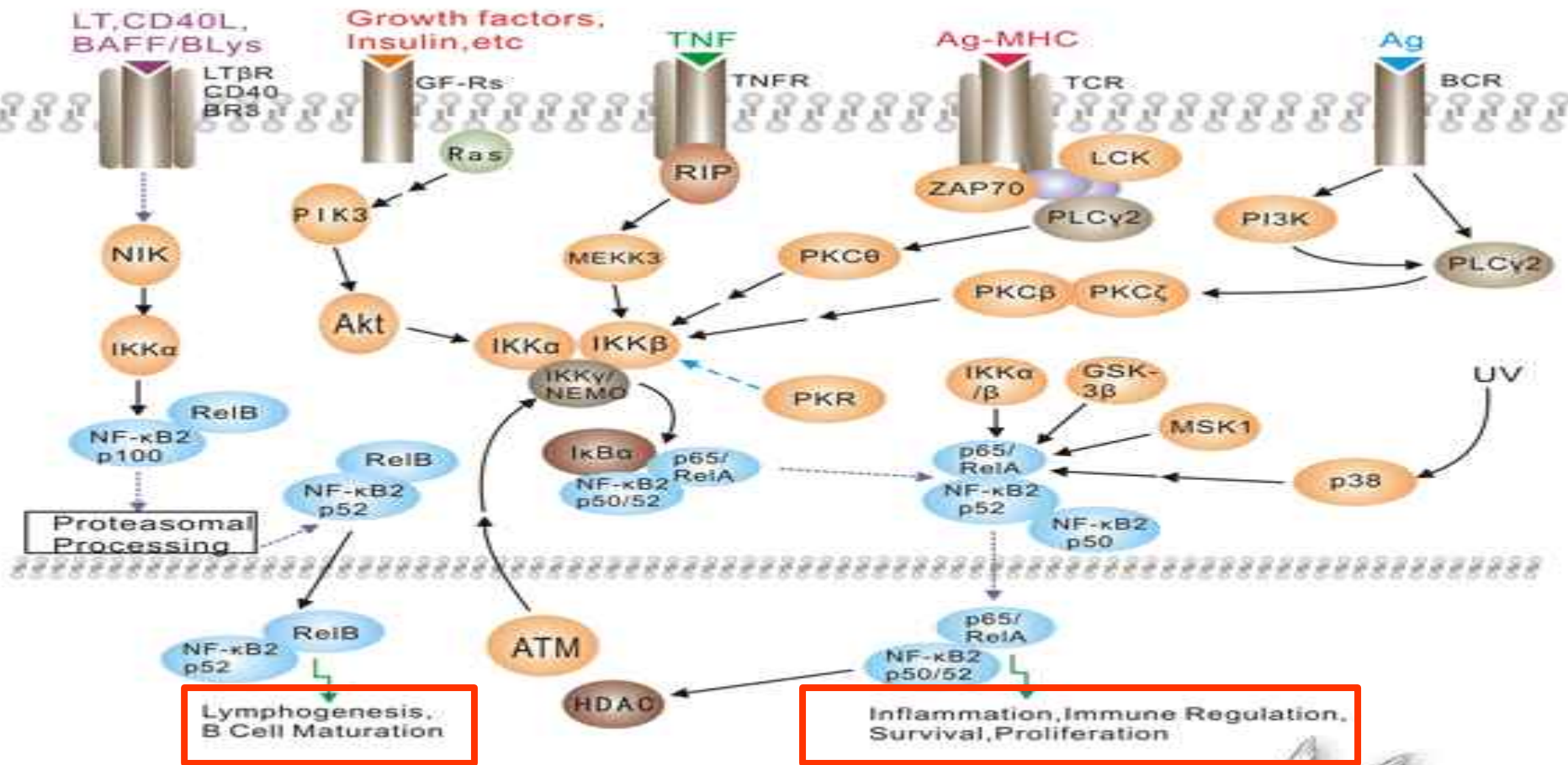
przybytki sekwencji i korespondujący im wzrost aktywności w locus 1q21 w 20-30% chorych z MM

Obejmują okolicę centromeru pod postacią skaczących translokacji- przybytki 1q i delecje 1p są bardzo blisko ze sobą związane

głównie obserwowano w klonach z **t(4;14)** i **t(14;16)** lub o wysokim indeksie proliferacyjnym

amplifikacja chromosomu 1 jest tylko wyrazem bardziej zaawansowanej i genetycznie mniej stabilnej choroby, negatywne rokowanie bo związek tego zaburzenia z translokacjami o złym rokowaniu

Zaburzenia drogi sygnałowej NF-κB



Zaburzenia NF-κB

u około 50% chorych z MM dochodzi do konstytutywnej aktywacji sygnału przenoszonego przez czynnik jądrowy κB

Rozkład zaburzeń prowadzących do zwiększonej aktywności NF-κB- równomierny we wszystkich głównych genetycznych podtypach szpiczaka - wtórny charakter tych zaburzeń

aktywności NF-κB znaczenie(?) w przewidywaniu odpowiedzi na zastosowanie inhibitorów proteasomów - u chorych z niskim poziomem TRAF3, (wykładnik konstytutywnej aktywacji NF-κB) 90% odpowiedzi na bortezomib, natomiast u chorych z prawidłowym poziomem TRAF3 tylko 35% odpowiedzi.(Keats, *et al* 2007)

Zaburzenia p16 i p18

Białko p16INK4A - inhibitor cykliny CDK4/6 aktywującej białko Rb . Brak białka p16 prowadzi do nadmiernej proliferacji

Inaktywacje genu p16 (9p21) przez metylacje obserwowano u 50% chorych z MM (rola w rodzinnym występowanie szpiczaka ?)

Ale, metylacja genu p16 wydaje się nie mieć znaczenia prognostycznego- stąd rola w progresji MM niejasna

Białko p18INK4C- inhibitor cykliny, brak tego białka – zwiększona proliferacja

Bialleliczna delecja p18 u 10% chorych z MM

Ale u innych chorych z wysoką proliferacją – zwiększone stężenie p18- mechanizmy utraty wrażliwości na p18 nie poznane

Delecja 12p i zaburzenia 16q

u 12% chorych z MM (analiza polimorfizmu pojedynczych nukleotydów , SNP)

krótszy czas przeżycia całkowitego i wolnego od zdarzeń (Avet-Loiseau, *et al* 2009)

zaburzenia 16q ważne i powtarzalnych aberracje genetyczne (20% badanych chorych) (Walker, *et al* 2006)

często dochodzi do utraty obydwu regionów 16q=
przypuszczenie, że gen WWOX zlokalizowany w regionie 16q pełni rolę antyonkogenu w MM

Utrata genu WWOX wiąże się ze złym rokowaniem.
(Jenner, *et al* 2007)

Jeden gen – mało informacji



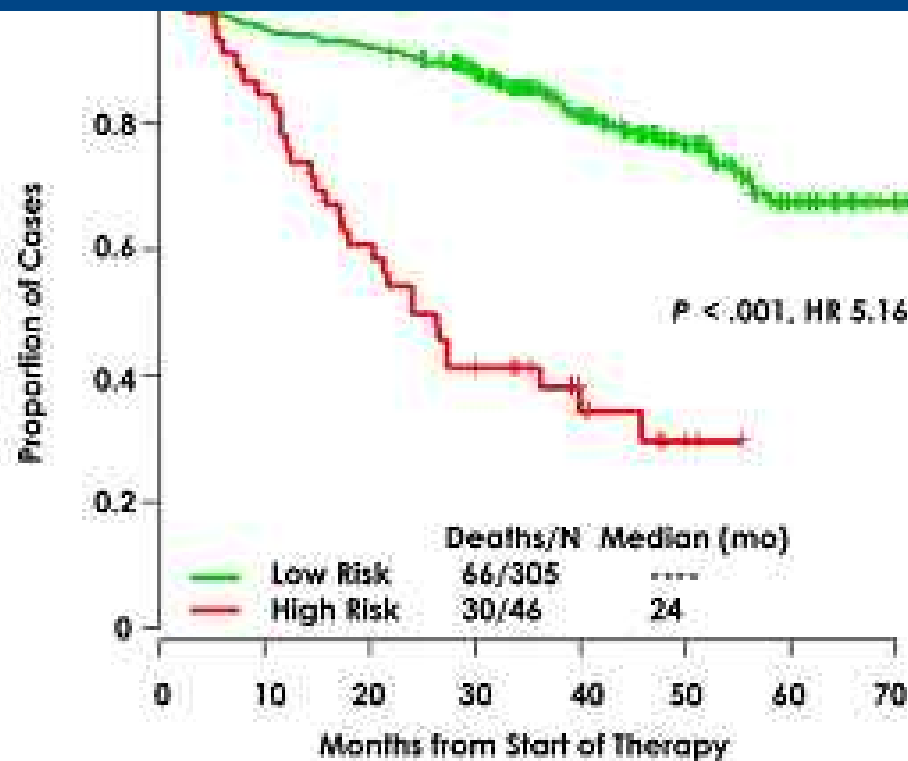
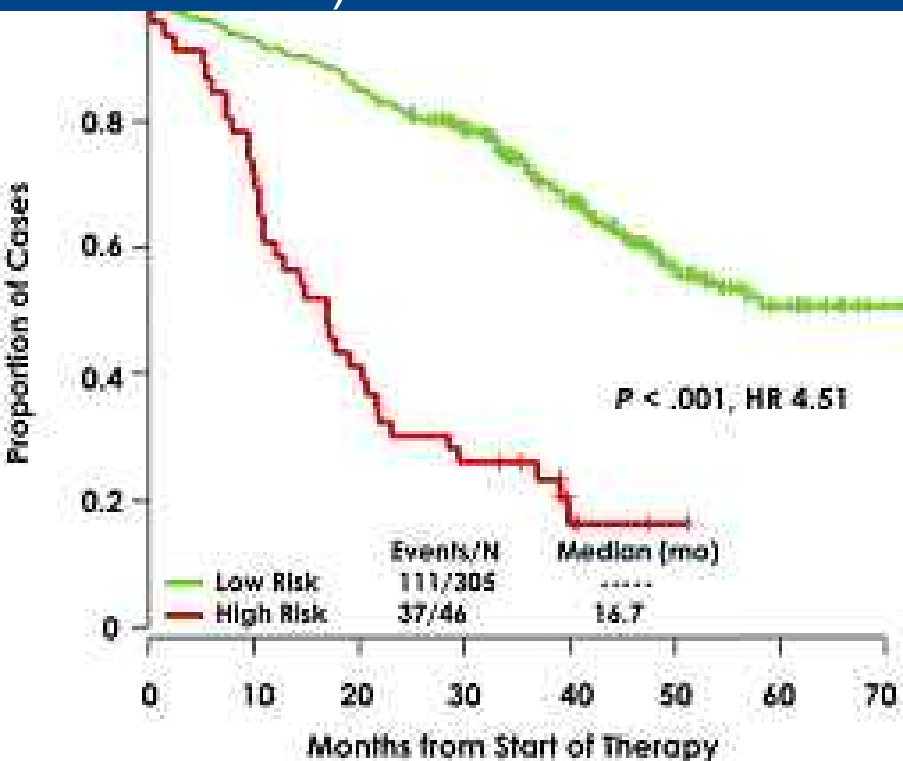
RNA,
profil ekspresji
genów

Kompletny zestaw genów – daje pełen obraz

Sygnatura genowa wysokiego ryzyka

technika mikromacierzy GEP (*gene expression profile*)-
jednoczasowy pomiar aktywności wielu genów

badanie ekspresji 70 genów ale liczbę te zredukowano do 17.
sygnaturę genowa wysokiego ryzyka występującą u około
15% chorych, o znacznie krótszym przeżyciu.(Shaughnessy, *et al* 2007)



Klasyfikacja molekularno-cytogenetyczna

Fonseca, et al/ Leukemia 2009

Podtyp	Procent	Cechy kliniczne i laboratoryjne
Hyperdiploidalny	45	Przebieg mniej agresywny, IgGκ, starsi chorzy
Nie-hyperdiploidalny	40	Przebieg bardziej agresywny, IgAλ, młodszy chorzy
Translokacje cyklin D t(11;14)(q13;q32)	18 16	Zwiększenie ekspresji CCND1, rokowanie lepsze, zmiany kostne, dwa typy GEP
t(6;14q)(p21;32)	2	Prawdopodobnie taki sam jak CCND1
t(12;14)(p13;q32)	<1	Rzadki
Translokacje MMSET t(4;14)(p16;q32)	15	Zwiększenie ekspresji MMSET, Zwiększenie ekspresji FGFR3 w 75%, złe rokowanie przy konwencjonalnym leczeniu, zmiany kostne rzadko
Translokacje MAF t(14;16)(q32;q23)	8 5	Choroba agresywna
t(14;20)(q32;q11)	2	Agresywny przebieg potwierdzony przez 2 badania
t(8;14)(q24;q32)	1	Jedno badanie wykazujące agresywny przebieg
		Wpływ na przebieg jeszcze nieudokumentowany, prawdopodobnie agresywny
Nieskasyfikowane	5	Różne podtypy, niektóre się nakładają

Rekomendacje badań molekularnych

WYKRYWANIE CHORYCH BARDZO WYSOKIEGO RYZYKA

panel FISH (Minimal FISH Panel) obejmujący $t(4;14)(p16;q32)$, $t(14;16)(q32;q23)$ i $-17p13$ wykonywany na oczyszczonych plazmocytach

WYKRYWANIE INNYCH CHORYCH O GORSZYM ROKOWANIU ORAZ CHORYCH O LEPSZYM ROKOWANIU

Szerszy panel powinien obejmować możliwość oznaczenia zaburzeń chromosomu 1, utraty 12p oraz przybytku 5q, określenia ploidii, a także wykrycia $t(11;14)(q13;q32)$ i innych translokacji IgH nie sprecyzowanych

Wartość prognostyczną rozpatrywać w połączeniu z parametrami klinicznymi. Przykładowo, stężenia $\beta 2$ mikroglobuliny moduluje znaczenie prognostyczne $t(4;14)(p16;q32)$ (Avet-Loiseau, *et al* 2007) czy amplifikacji 5q31.3. (Avet-Loiseau, *et al* 2009) oraz chromosomu 13 - choć sam przestał być uważany za silny czynnik prognostyczny

Stratyfikacja ryzyka szpiczaka wg Mayo Clinic. (Stewart, et al 2007)

Wysokie ryzyko (25%)**	Standardowe ryzyko (75%)*
Jakikolwiek czynnik z: t(4;14) w FISH t(14,16) lub t(14;20) w FISH Delecja 17q13 w FISH Delecja 13 lub aneuploidia w analizie metafaz Indeks znakowania plazmocytów >3.0	Hyperdiploidia i nieobecność czynników wysokiego t(11;14) w FISH t(6;14) w FISH

***chorzy „prawdziwie” z grupy niskiego ryzyka: genetycznym markerom niskiego ryzyka towarzyszą laboratoryjne i kliniczne cechy nieagresywnej choroby: $\beta 2$ mikroglobulina <5.5 mg/l, LDH<250 i/lub indeks znakowania plazmocytów <1.0.**

**** $\beta 2$ mikroglobulina<3.5 mg/l u chorych wysokiego ryzyka genetycznego może wskazywać na mniej agresywny przebieg choroby. Np. chorzy z t (4;14) i niską $\beta 2$ mikroglobuliną (<4mg/l) i HgB>10g/dl mają chorobę pośredniego ryzyka**

Czy warto w codziennej praktyce lekarskiej?

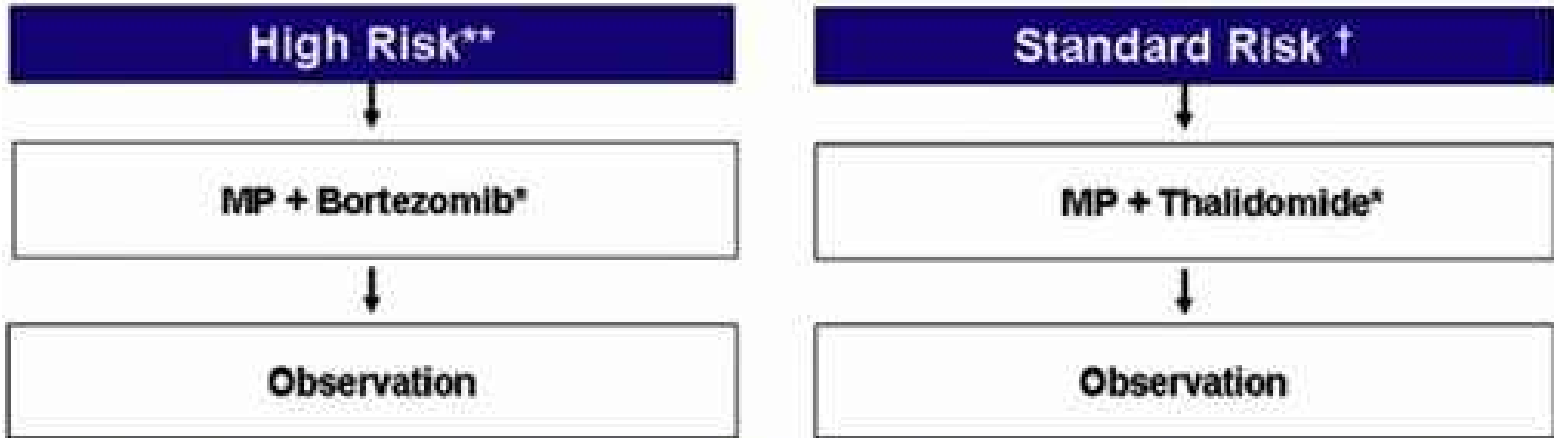
Stwarza możliwość „personalizacji” leczenia szczególnie wobec możliwości wyboru różnych strategii leczenia (młodzi chorzy)

Szybka identyfikacja chorych bardzo wysokiego ryzyka

pomocna w diagnostyce różnicowej: oznaczenie translokacji $t(11;14)(q13,q32)$ pozwala na odróżnienie rzadkich przypadków szpiczaka IgM od makroglobulinemii Waldenströma, (Avet-Loiseau, *et al* 2003)

PERSONALIZACJA LECZENIA

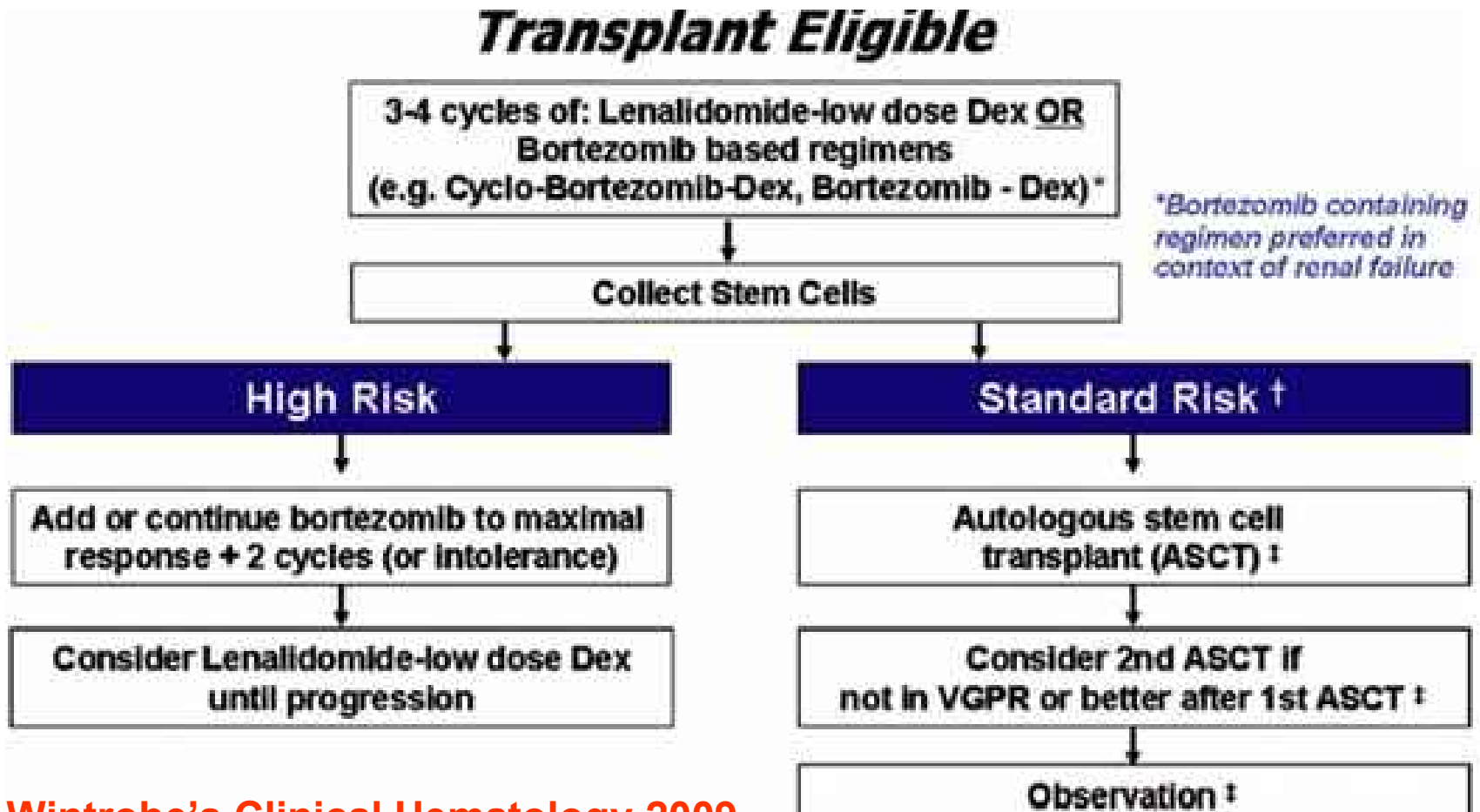
Transplant Ineligible



** In patients in whom administration of thalidomide or bortezomib is of concern, consider MP or Rd*

Wintrobe's Clinical Hematology 2009

PERSONALIZACJA LECZENIA



Wintrobe's Clinical Hematology 2009