

CYTOGENETIKA A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKA

HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT

Marie Jarošová

Centrum molekulární biologie a genové terapie
Interní hematoonkologická klinika FN a LF MU Brno



Genetika nádorů

- *Nádor je genetické onemocnění, které vzniká jako důsledek kumulace řady genetických změn*
- *Každý 3. člověk onemocní nádorovým onemocněním*
- *V ČR je diagnostikováno ročně více jak 70 tis. nových nádorů*
- *Charakteristickou vlastností nádorových buněk jsou chromosomové změny : početní změny chromosomů
strukturní změny chromosomů*



Genetické změny u hematologických malignit

90-95% nemocných s CML

60-80% nemocných s AML

60% nemocných s MDS

50-80% nemocných s CLL

60-90% nemocných s NHL

70-90% nemocných s MM

70-90% nemocných s ALL



Cytogenetika

- Klinická cytogenetika

Vrozené chromosomové změny (Germline alterations)

- Postižené jsou všechny buňky
- Změny jsou stabilní

- Nádorová cytogenetika

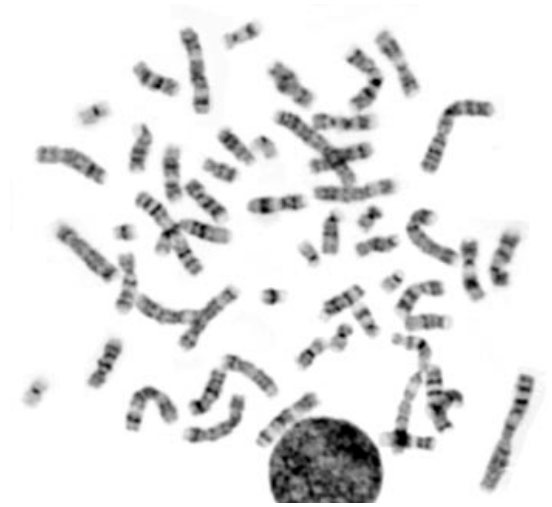
Získané chromosomové změny (Acquired alterations)

- Postižena jen část buněk- buňky nádoru
- Klonální vývoj nebo regrese
- Významná role citlivosti použité metody



Nádorová cytogenetika (onkocytogenetika)

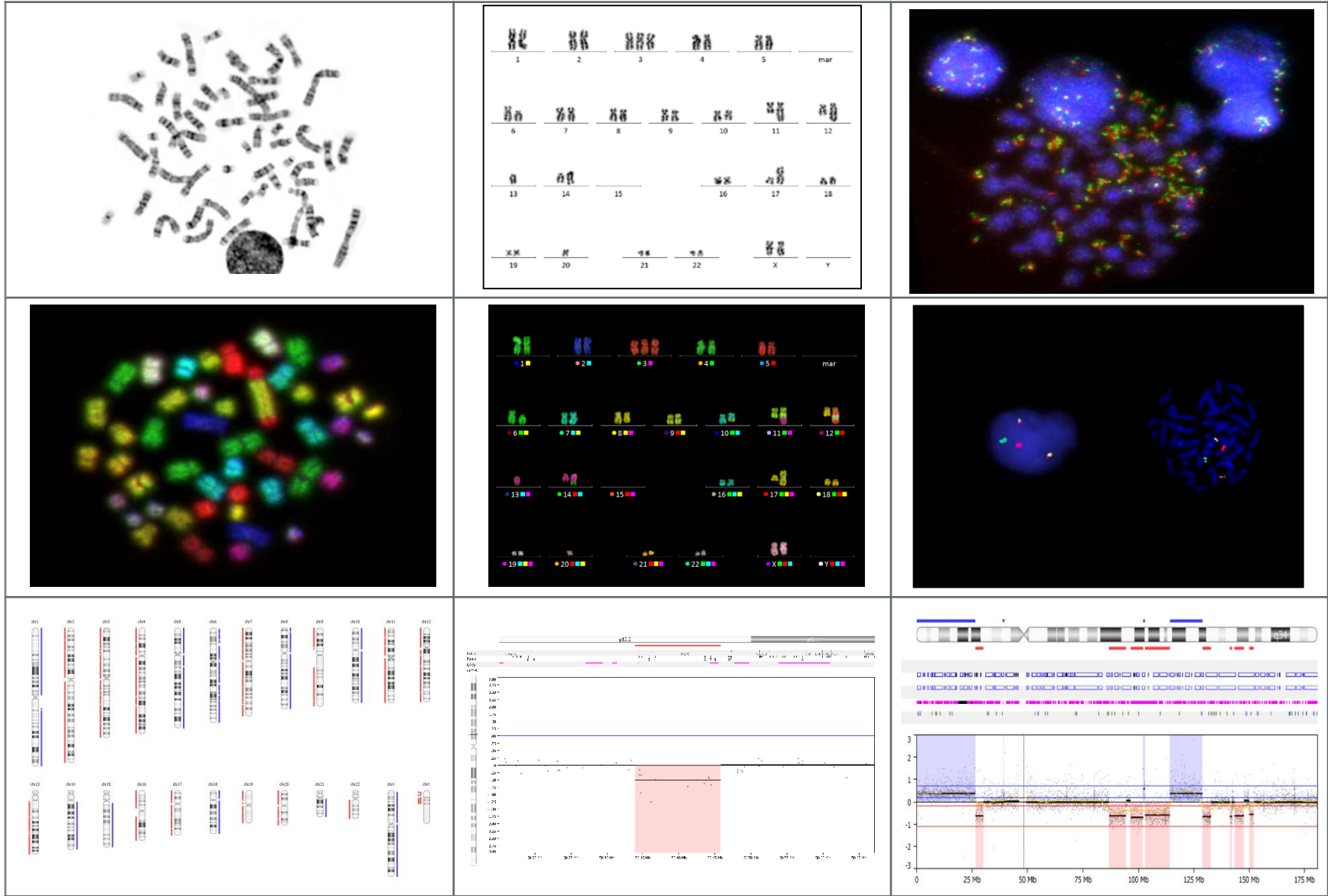
- Zkoumá získané chromosomové změny nádorových buněk
- Hodnotí početní a strukturní změny chromosomů
- Základní metoda – (G)
-pruhovací technika
(rozlišení kolem 3-5Mb)
- V jednom vyšetření analyzuje celý genom



Cytogenetické metody

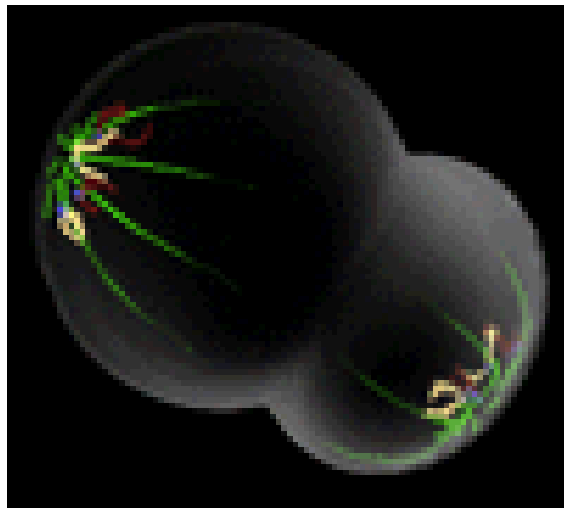
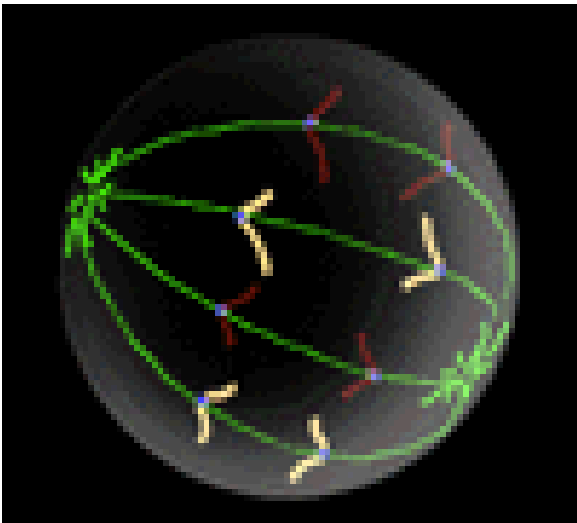
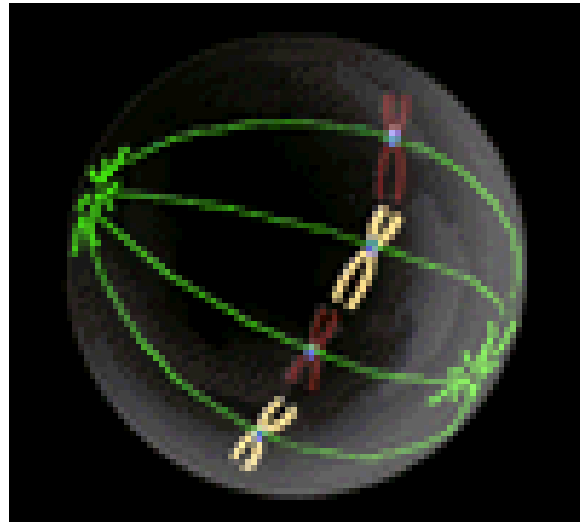
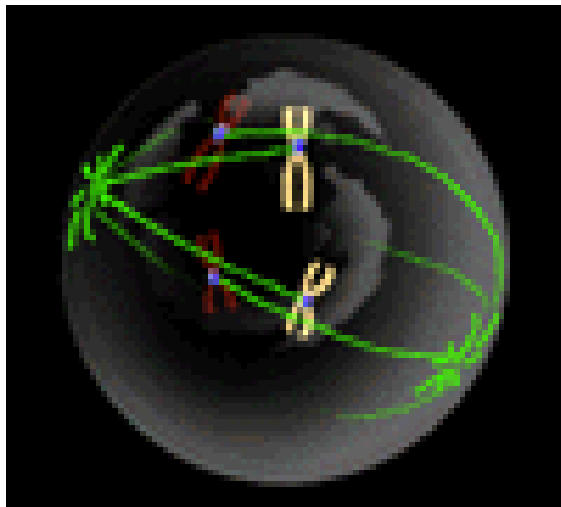
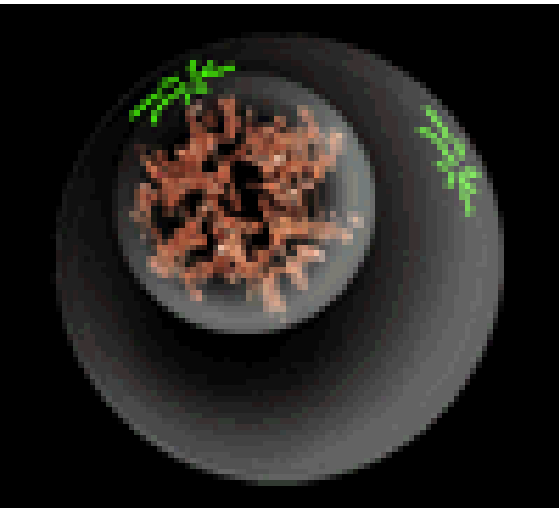
Cytogenetika

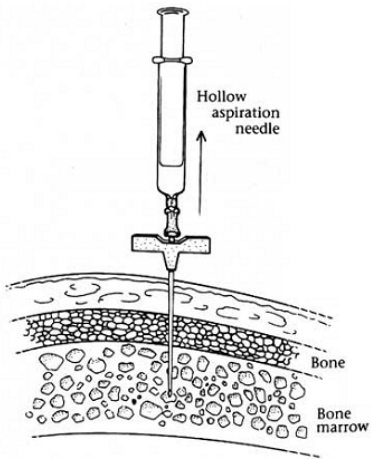
FISH



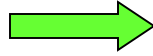
arrayCGH/SNP array

Metafase



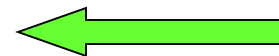
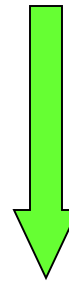


1-2ml



+

colcemide



Kultivace
2/24/72 hod



- ✓ kostní dřeň
- ✓ periferní krev
- ✓ uzlina

COLCEMIDE BLOKUJE MITÓZY V METAFÁZI

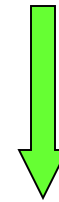
ZPRACOVÁNÍ BUNĚČNÉ KULTURY



www.shutterstock.com · 58307962

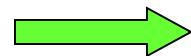
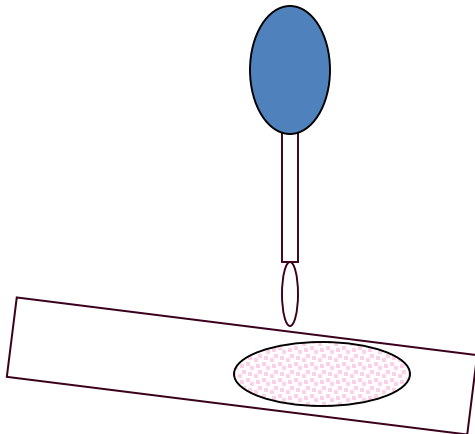


→ **HYPOTONIZACE
0,075M KCl**

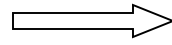
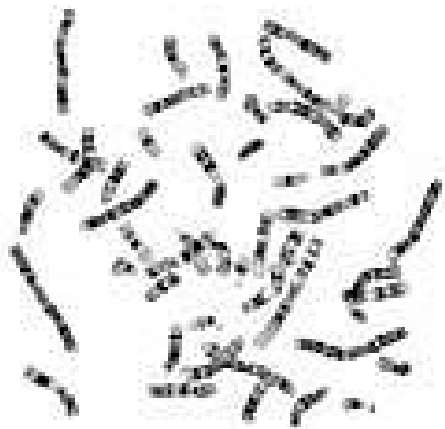
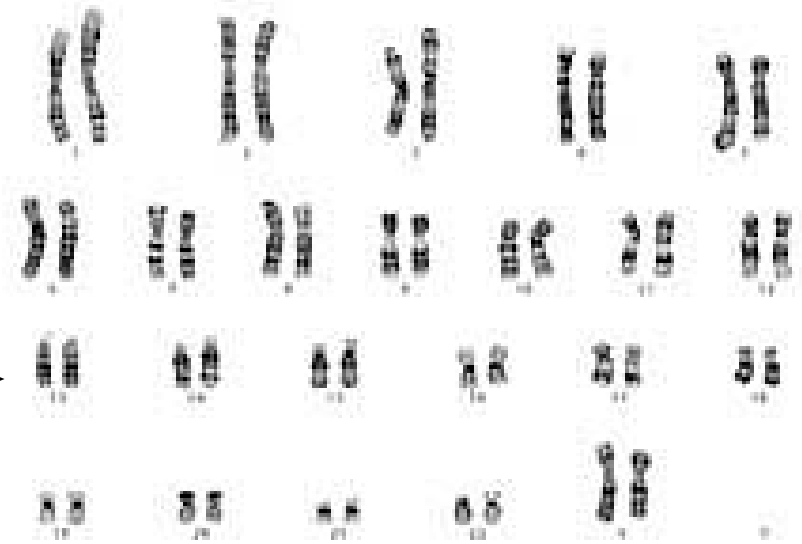
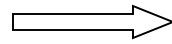
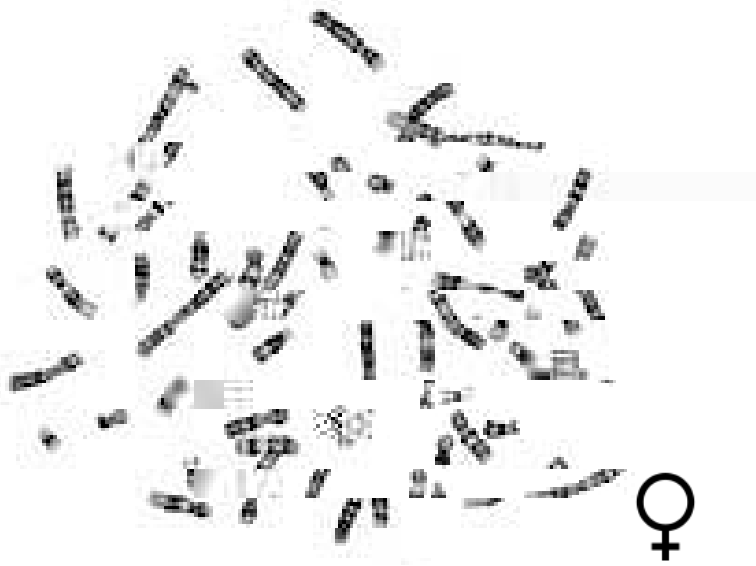


**PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ
KAPÁNÍM BB SUSPENZE
NA SKLO**

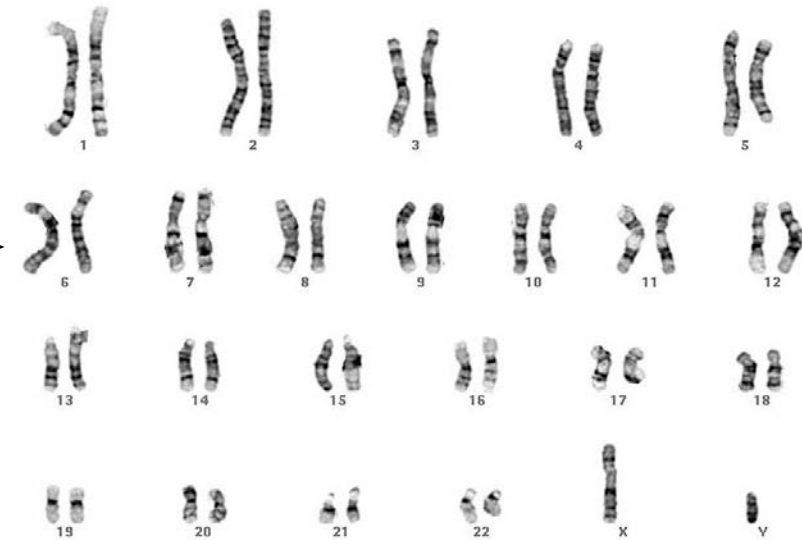
← **FIXACE ROZTOKEM
KYS.OCTOVÉ A METANOLU
1:3**



**BARVENÍ A HODNOCENÍ
V MIKROSKOPU**



Human male
G-bands



ABBOTT Laboratories, s.r.o.
Diagnostic Division

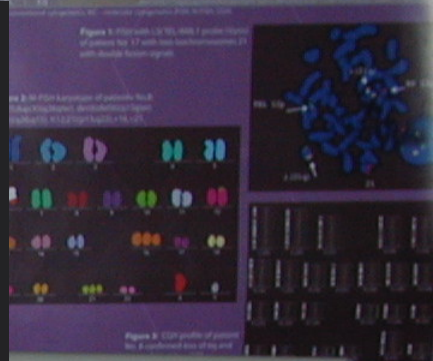
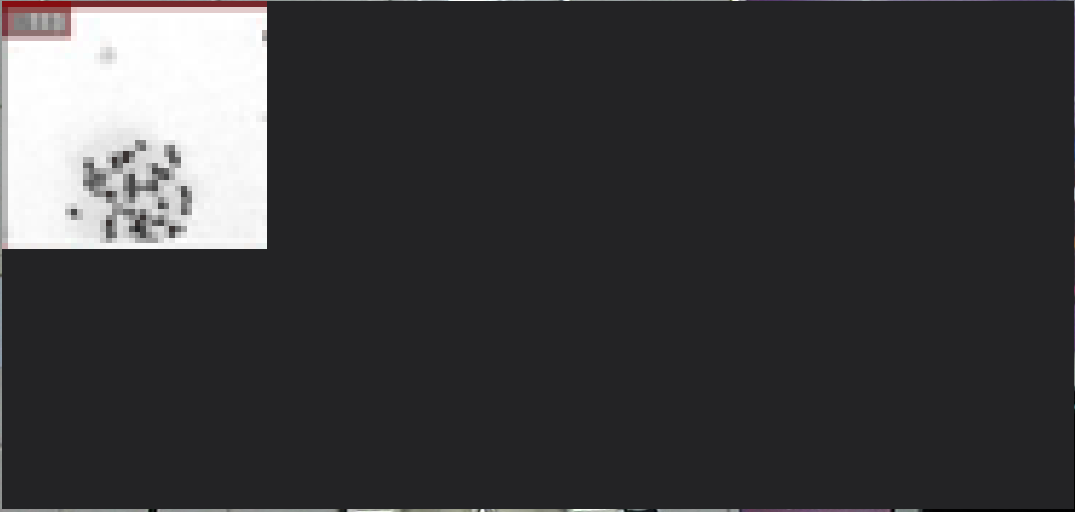


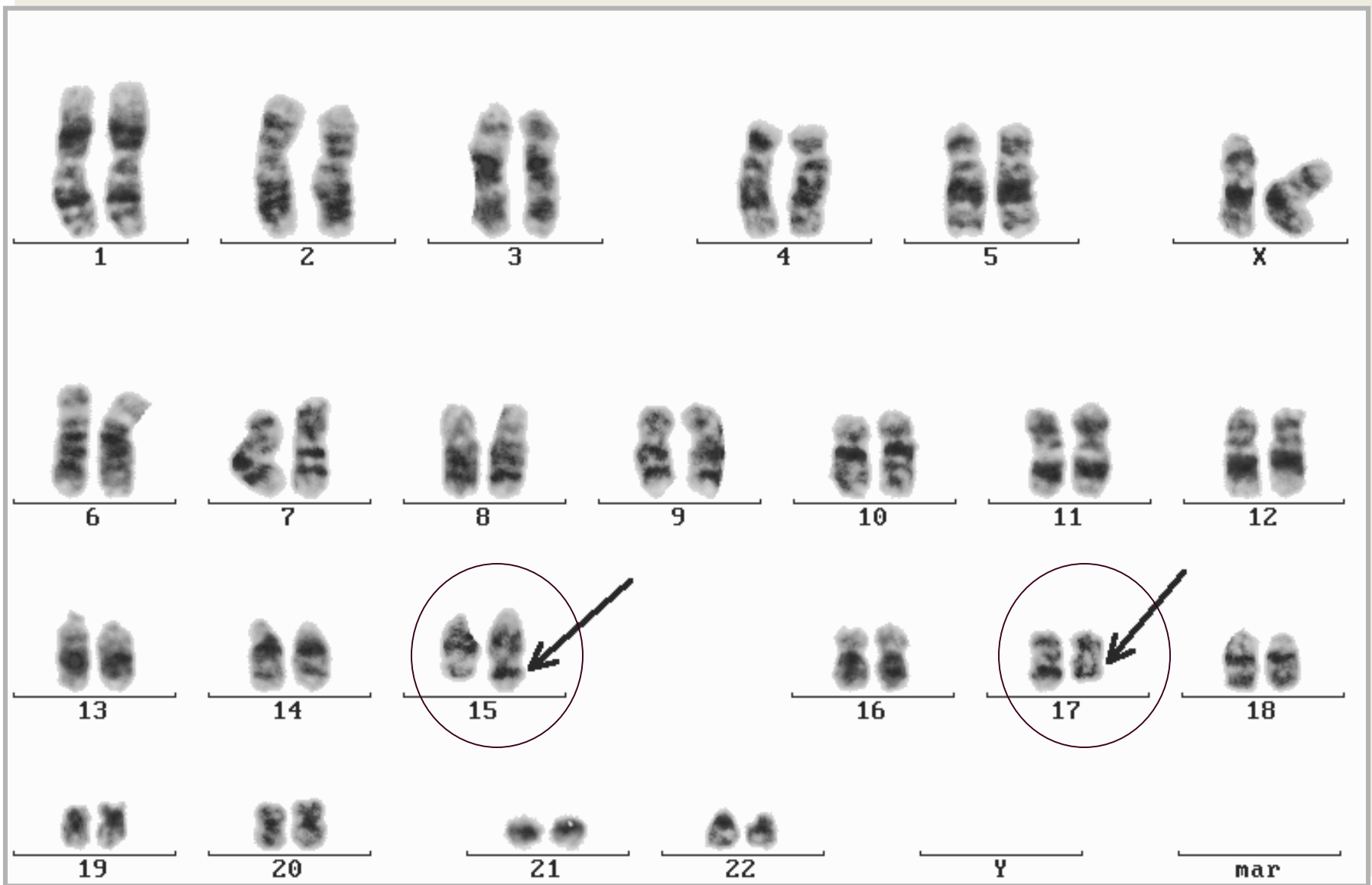
INFC

1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30	31				



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----



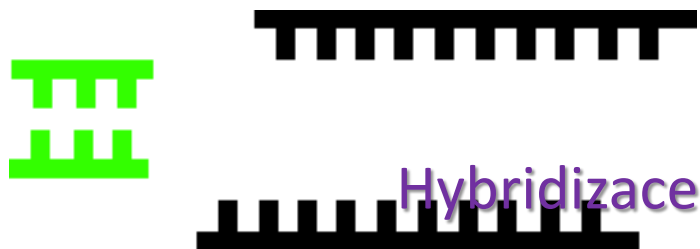


G-banding; rozlišení 5-10Mb, např. chr 8 : 146Mb; ~500 genů, cMYC ~600kb,



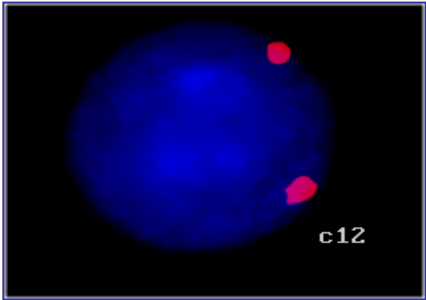
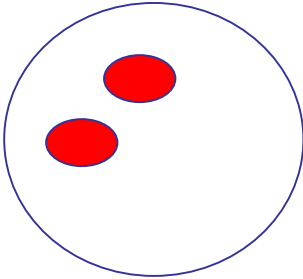
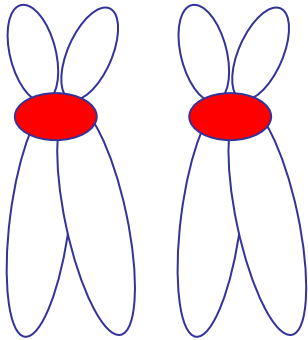
Molekulární cytogenetika

Denaturace

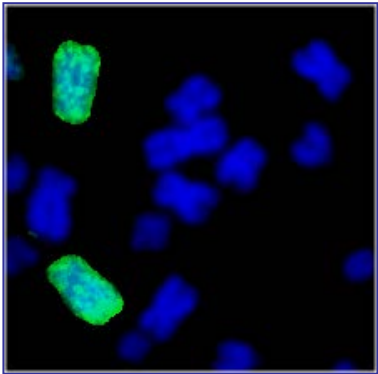
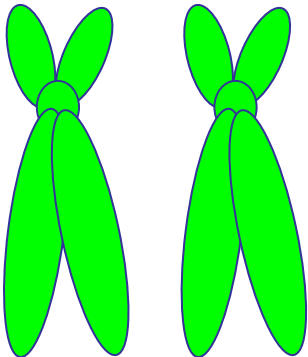


- Metody založené na fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) vytváří spojení mezi metodami molekulární genetiky a klasické cytogenetiky
- Metody využívající základní vlastnosti jednořetězcové DNA vzájemně se vázat na základě komplementarity bází

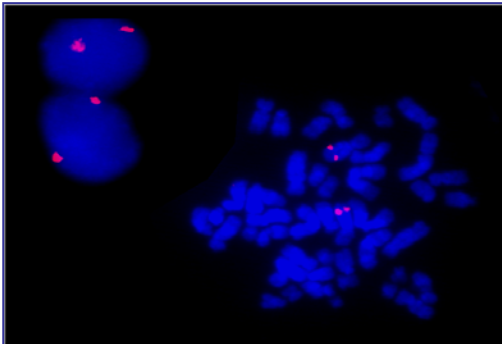
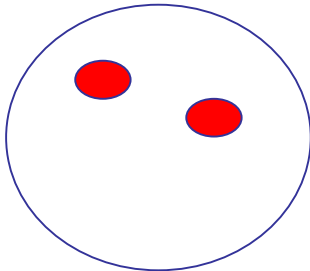
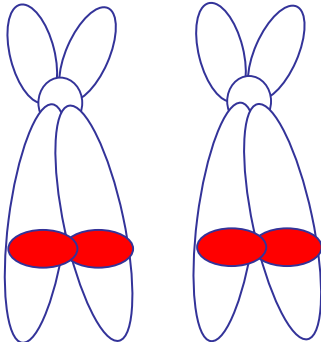
Typy sond



centromerické



celochromosomové



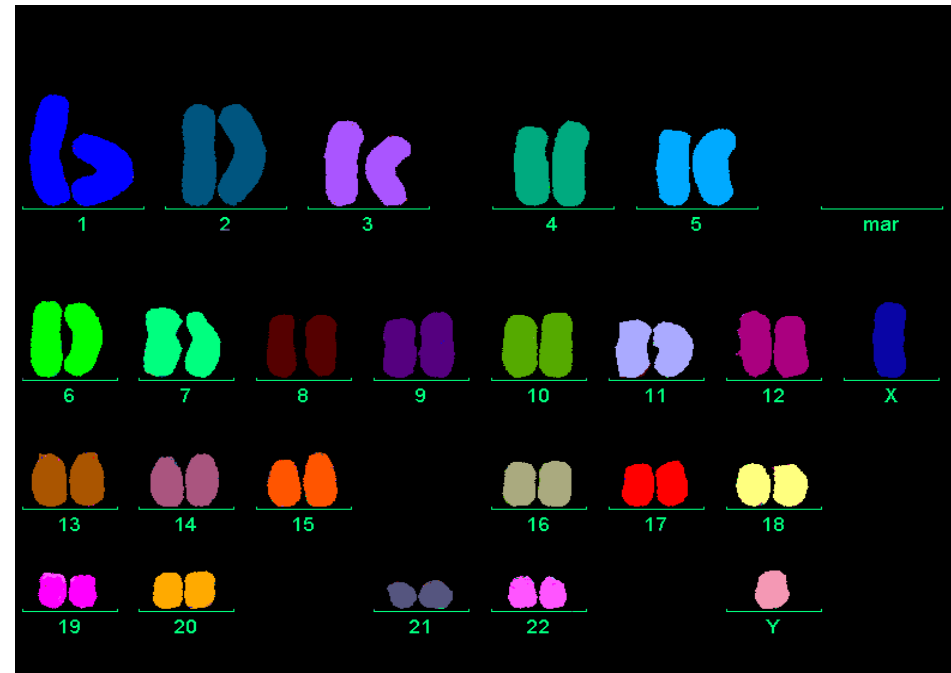
genové

Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace (M-FISH)

Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace (M-FISH) je molekulárně cytogenetická metoda založená na hybridizaci 24 fluorescenčně značených celochromosomových sond, které dovolují současně obarvení všech chromosomových párů odlišnými barvami.

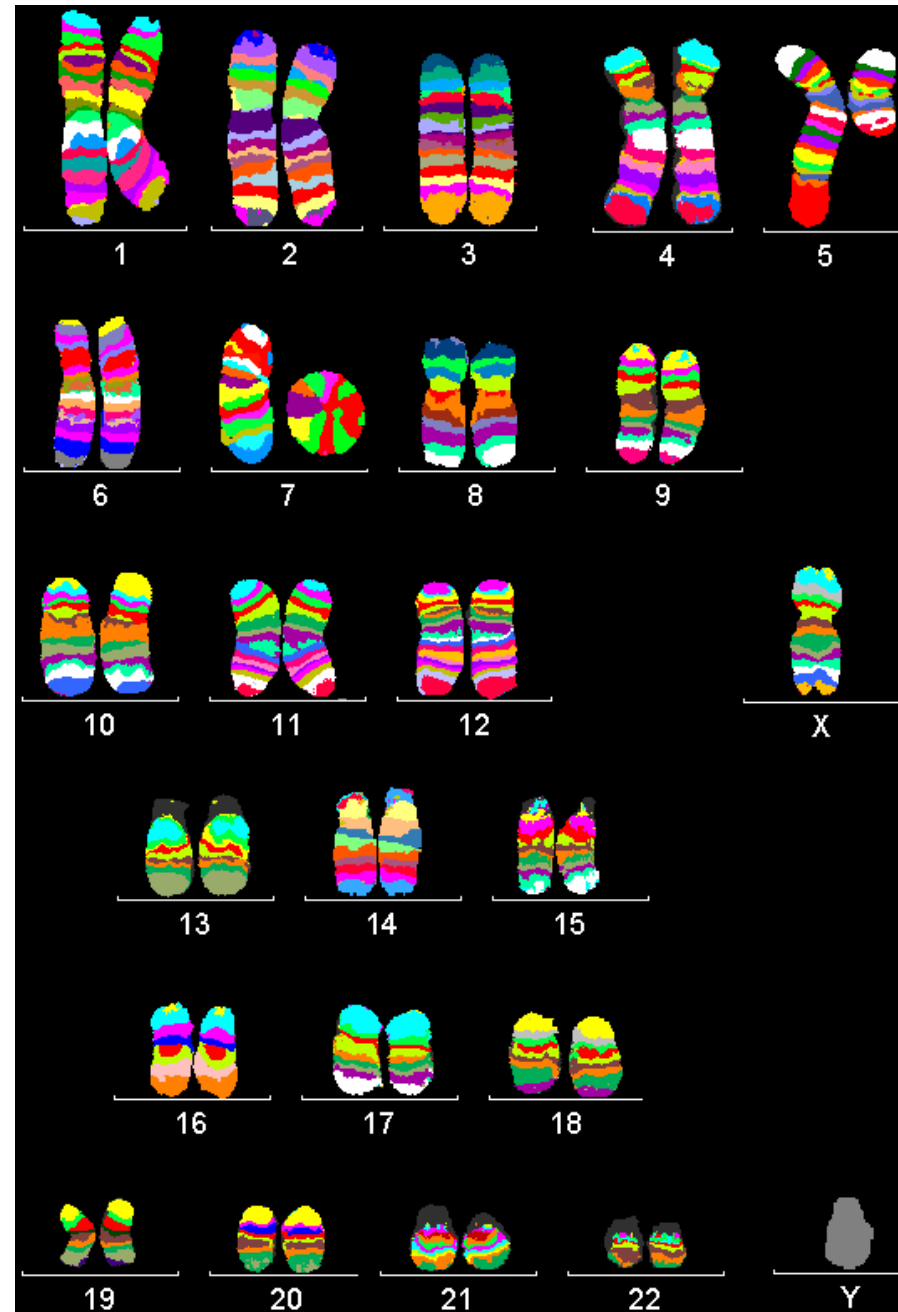
24 color karyotyping hybridization and detection kit

Chr.	FITC	Spectrum Orange	Texas Red	Cy5	DEAC
1				■	
2					■
3			■		
4	■				
5	■	■			
6	■			■	
7				■	■
8			■	■	
9		■		■	
10	■				■
11	■		■		
12	■	■			
13			■		■
14		■			■
15		■	■		
16	■			■	■
17	■		■	■	
18	■	■		■	
19			■	■	■
20		■		■	■
21	■	■	■	■	■
22	■		■		■
X	■	■			■
Y		■	■		■



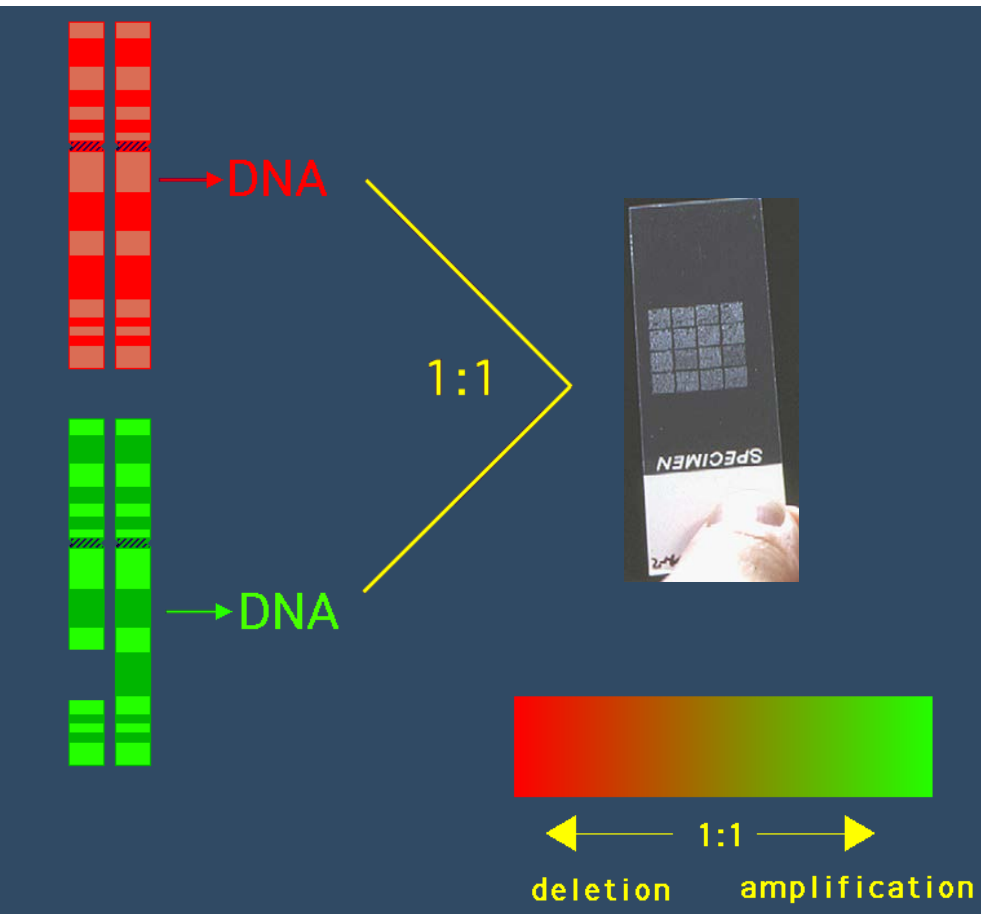
Mband FISH

- Kombinuje paintingové proby specifické pro danou oblast chromosomu
- Sondy připravené mikrodisekcí chromosomových oblastí
- Pruhoání pokrývá celý chromosom



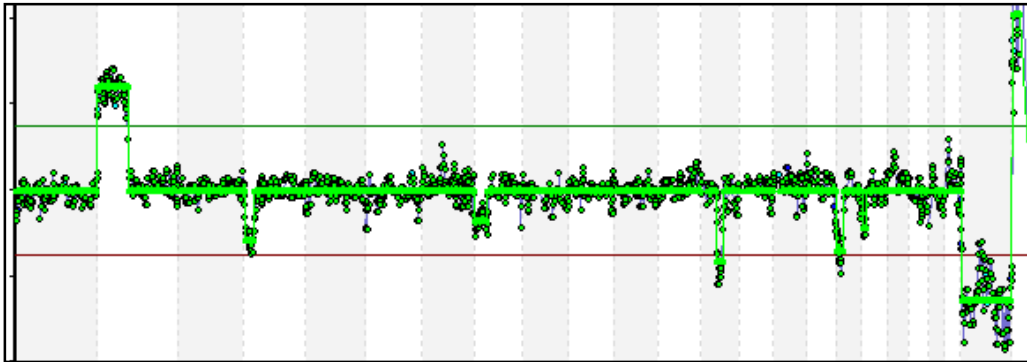


arrayCGH – komparativní genomová hybridizace

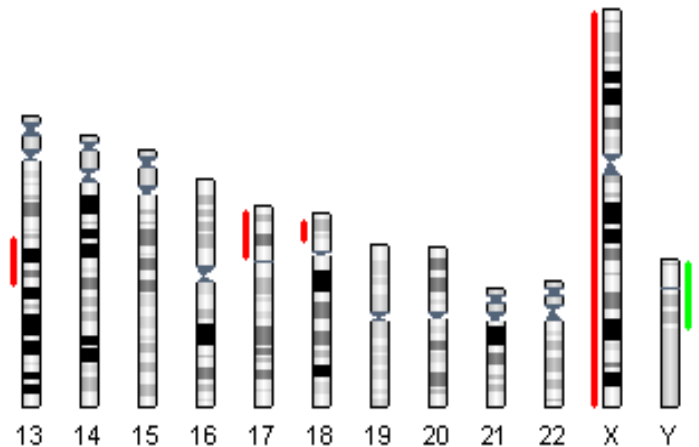
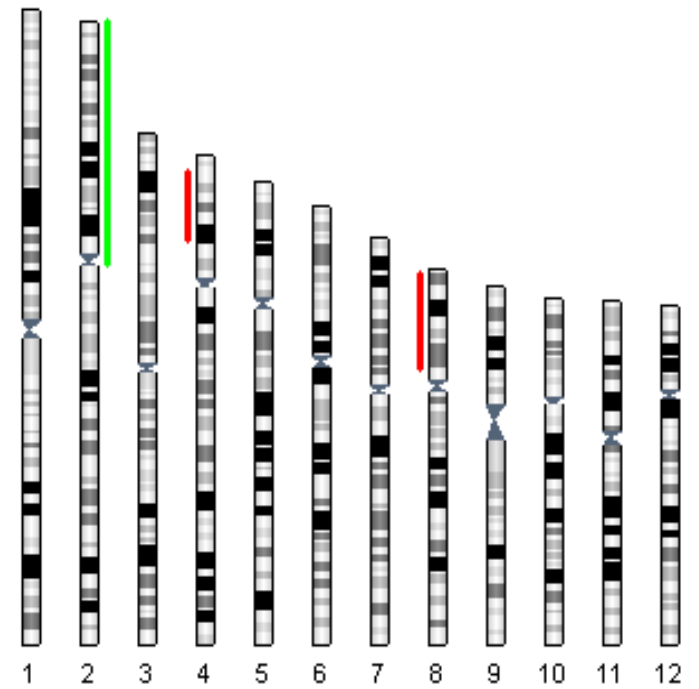


Nádorová DNA je hybridizována společně s kontrolní DNA k hybridizačnímu sklu, na kterém jsou fragmenty genomické DNA/oligonukleotidy

Gains: 2p25.3q11.2



Losses: 4p16.2p14
8p23.2p11.21
13q14.3q21.32
17p13.2p11.2





Cytogenetika v hematologii

1.Diagnosa

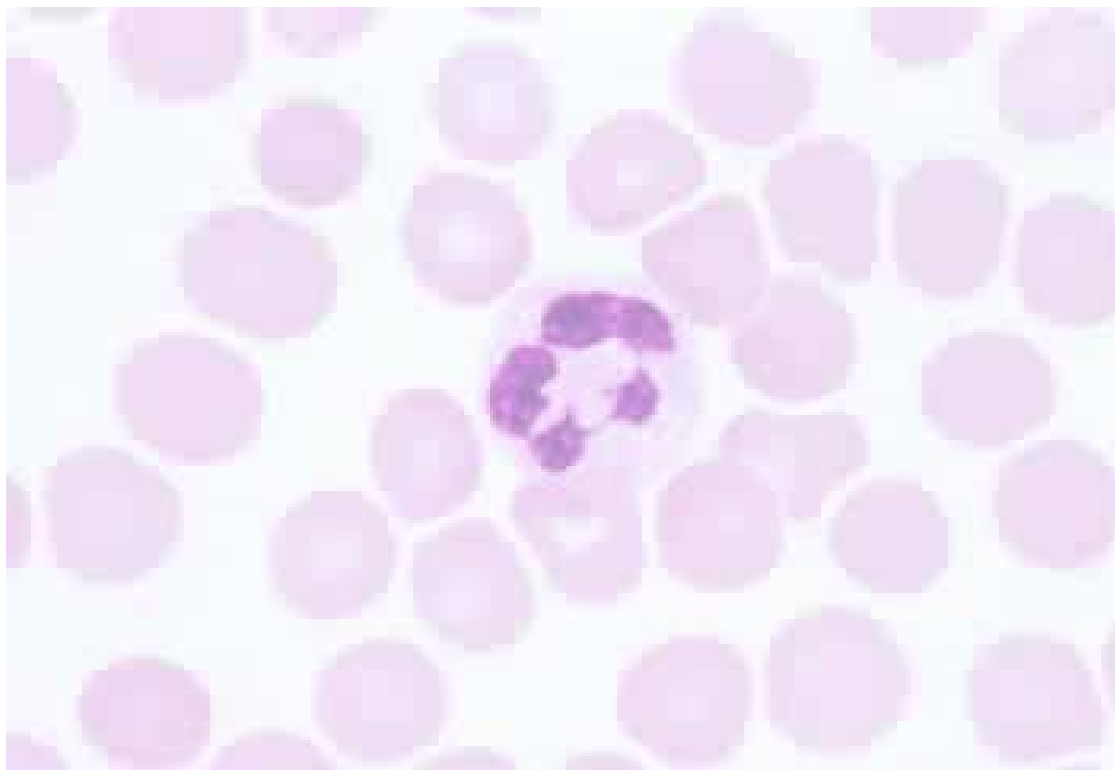
2.Prognosa

3.Léčebné rozhodování



Filadelfský chromosom (Ph)

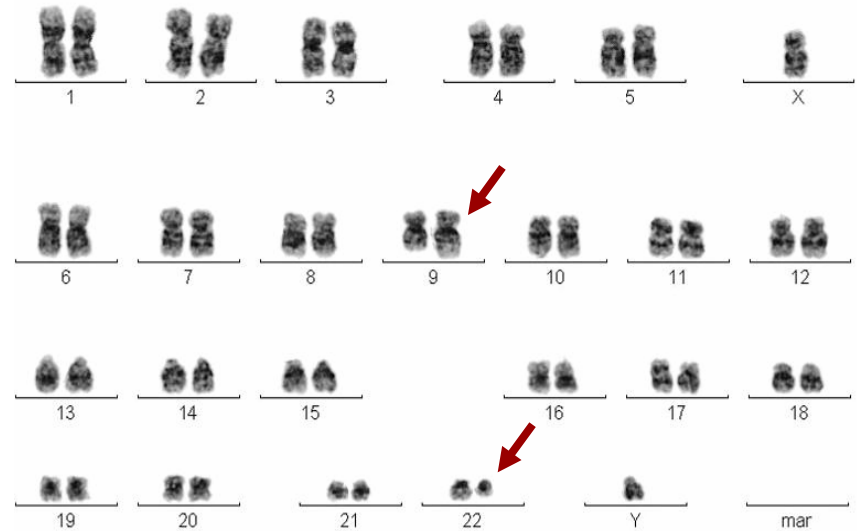
První specifická chromosomová změna u nádoru člověka



Cytogenetika CML

Diagnóza

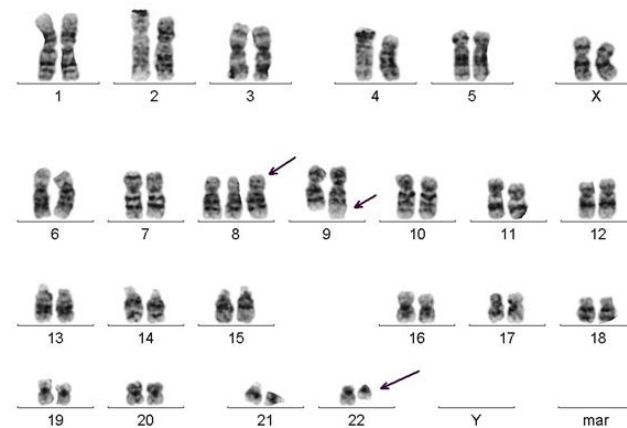
90-95% Ph1 výsledek translokace
 $t(9;22)(q34;q21)$



Prognóza

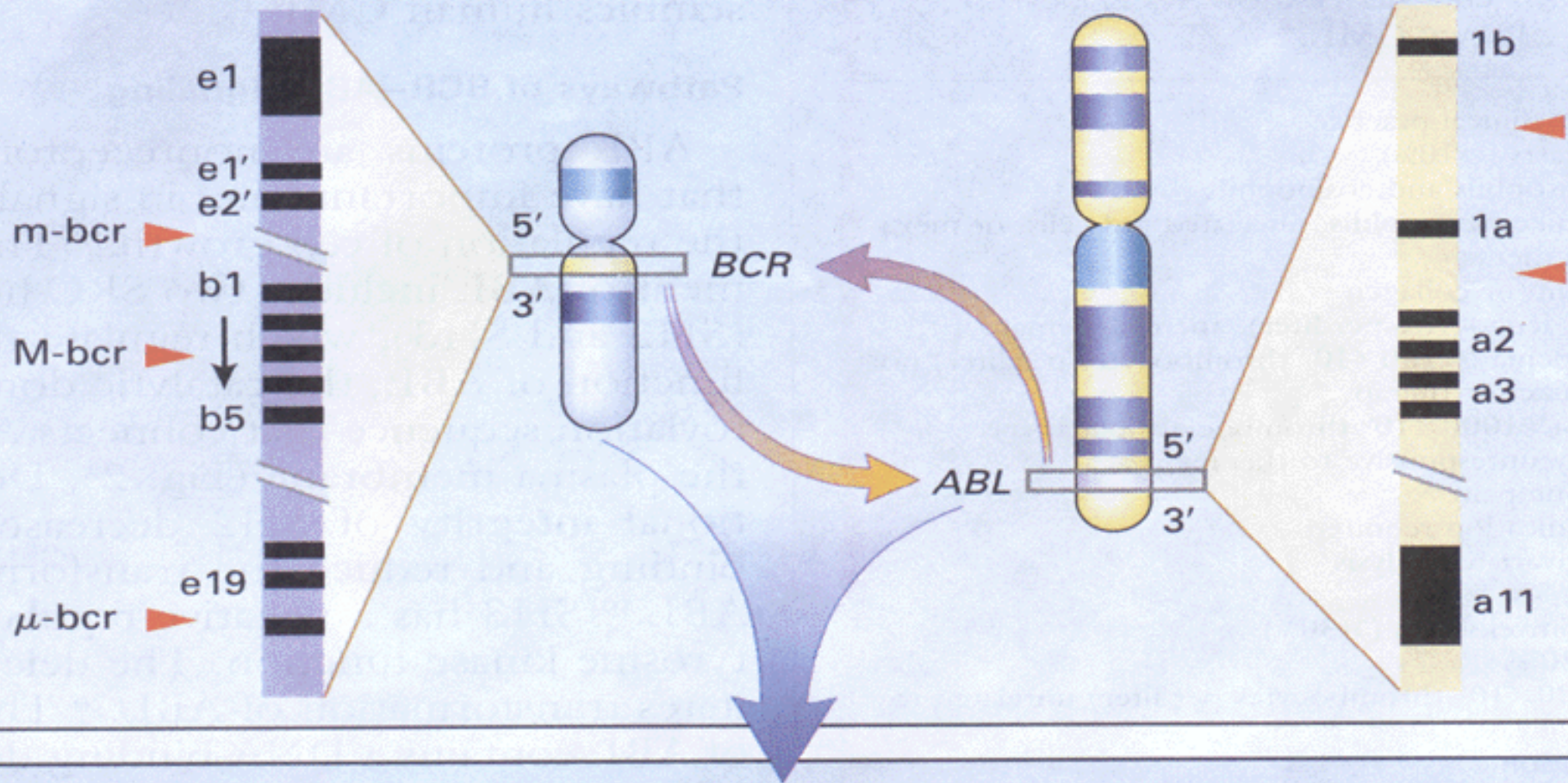
Přídavné chromosomové změny

Diagnosa CHF: ~12%
Akcelerovaná fáze: ~30%
Blastická zvrát : ~70%



Chromosome 22

Chromosome 9



e1a2 \rightarrow p190^{BCR-ABL}

b2a2 \rightarrow p210^{BCR-ABL}

b3a2 \rightarrow p210^{BCR-ABL}

e19a2 \rightarrow p230^{BCR-ABL}

Glivec





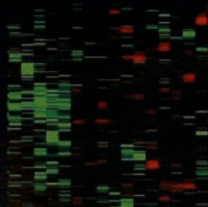
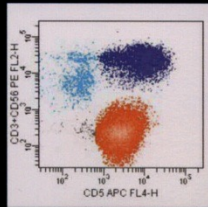
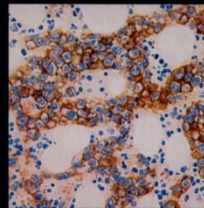
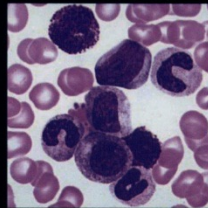
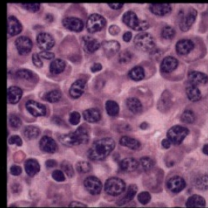
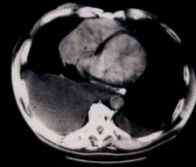
ELN sledování MRN CML cytogenetika

	Type of Response	Definition
CHR	Complete Hematologic Response	Normal differential, WBC & platelets \leq ULN
MCyR	Major cytogenetic Response	0–35% Ph+marrow metaphases
CCyR	Complete Cytogenetic Response	0% Ph+marrow metaphases
MMR	Major Molecular Response	BCR-ABL/ABL \leq 0.1% (International Scale)
MR ^{4.0}		BCR-ABL/ABL \leq 0.001% (IS) “4-log reduction”
MR ^{4.5}		BCR-ABL/ABL \leq 0.003% (IS) “4.5-log reduction”
CMR	Complete Molecular Response	Undetectable BCR-ABL (test of sensitivity \geq 4.5 logs)

WHO Classification 2008

WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues

Edited by Steven H. Swerdlow, Elias Campo, Nancy Lee Harris, Elaine S. Jaffe, Stefano A. Pileri, Harald Stein, Jürgen Thiele, James W. Vardiman





WHO Classification

- Od roku 2008 je cytogenetika součástí diagnostiky a klasifikace řady hematologických malignit
 - Cytogenetika je součástí WHO klasifikace AML
 - Společně s cytomorfologií stratifikuje nemocné s MDS a MPN
 - Klasifikace lymfomů- histologie, cytogenetika a FISH potvrzují klasifikační zařazení
 - Je součástí prognostické stratifikace u MM

WHO klasifikace AML

The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia

Daniel A. Arber,¹ Attilio Orazi,² Robert Hasserjian,³ Jürgen Thiele,⁴ Michael J. Borowitz,⁵ Michelle M. Le Beau,⁶ Clara D. Bloomfield,⁷ Mario Cazzola,⁸ and James W. Vardiman⁹

Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms

AML with recurrent genetic abnormalities

AML with t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*

AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*

APL with *PML-RARA*

AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*

AML with t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*

AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*

AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*

Provisional entity: AML with BCR-ABL1

AML with mutated *NPM1*

AML with biallelic mutations of *CEBPA*

Provisional entity: AML with mutated RUNX1

AML with myelodysplasia-related changes

Therapy-related myeloid neoplasms

AML, NOS

AML with minimal differentiation

AML without maturation

AML with maturation

Acute myelomonocytic leukemia

Acute monoblastic/monocytic leukemia

Pure erythroid leukemia

Acute megakaryoblastic leukemia

Acute basophilic leukemia

Acute panmyelosis with myelofibrosis

Myeloid sarcoma

Myeloid proliferations related to Down syndrome

Transient abnormal myelopoiesis (TAM)

Myeloid leukemia associated with Down syndrome

WHO myeloid neoplasm and acute leukemia classification

Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm

Acute leukemias of ambiguous lineage

Acute undifferentiated leukemia

Mixed phenotype acute leukemia (MPAL) with t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*

MPAL with t(v;11q23.3); *KMT2A* rearranged

MPAL, B/myeloid, NOS

MPAL, T/myeloid, NOS

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23.3); *KMT2A* rearranged

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13.2;q22.1); *ETV6-RUNX1*

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31.1;q32.3) *IL3-IGH*

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3); *TCF3-PBX1*

Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, BCR-ABL1-like

Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with iAMP21

T-lymphoblastic leukemia/lymphoma

Provisional entity: Early T-cell precursor lymphoblastic leukemia

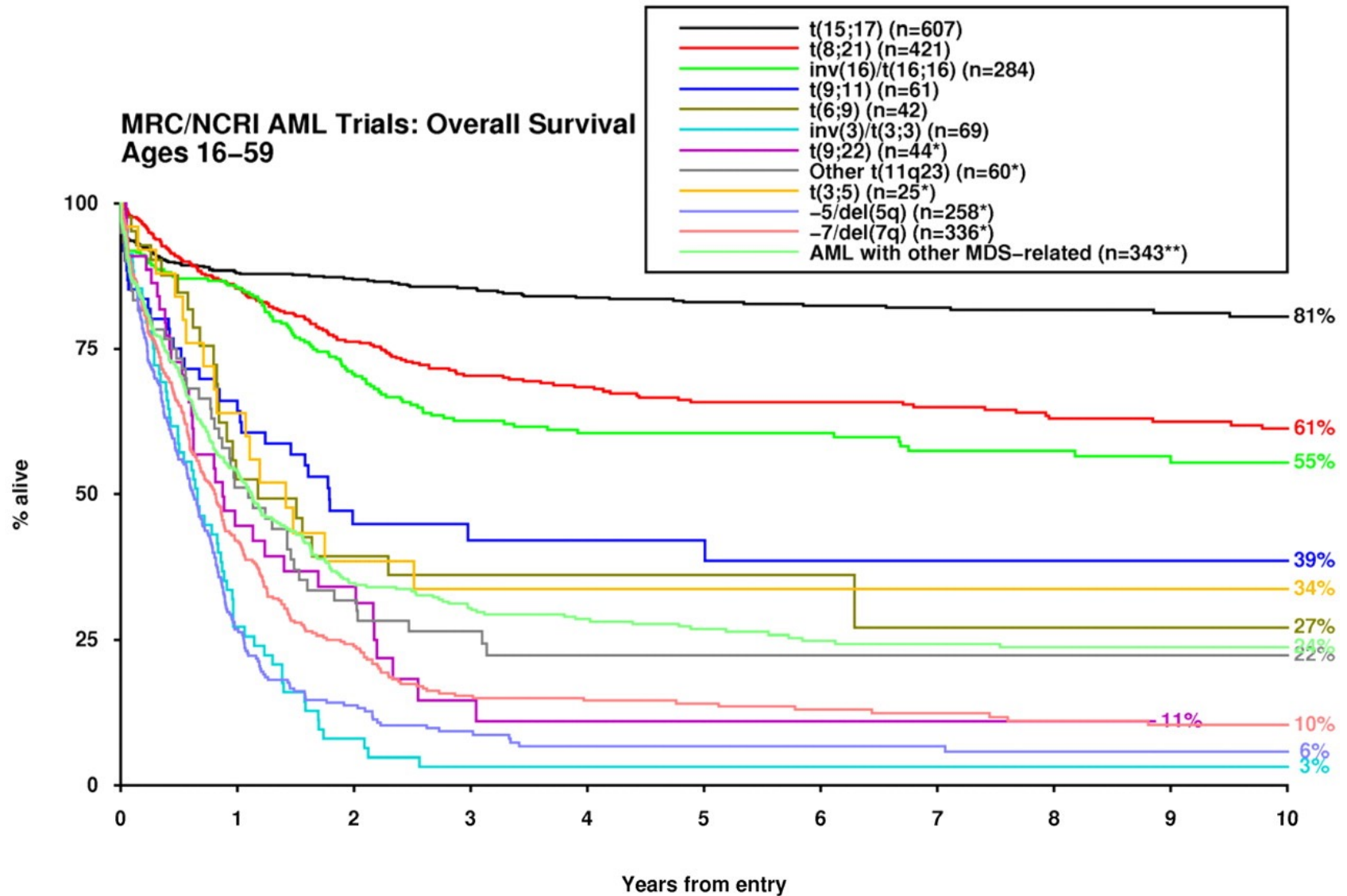
Provisional entity: Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

WHO prognostická stratifikace AML

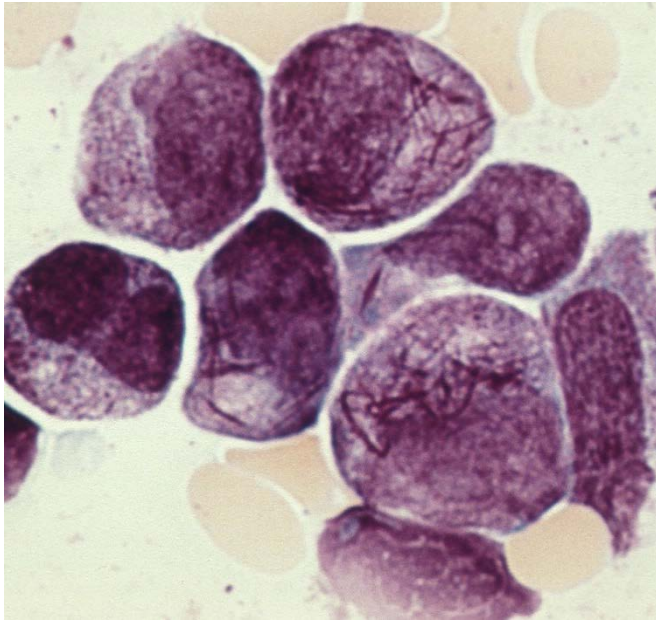
Genetic group	Subsets
Favorable	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> (normal karyotype) Mutated <i>CEBPA</i> (normal karyotype)
Intermediate-I*	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> (normal karyotype) Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> (normal karyotype) Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> (normal karyotype)
Intermediate-II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i> Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse†
Adverse	inv(3)(q21;q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> rearranged -5 or del(5q); -7; abn(17p); complex karyotype‡

Döhner H. et al. for the ELN, Blood 2010

Stratifikace podle cytogenetických nálezů



APL $t(15;17)(q22;q12)$ / PML-RARA

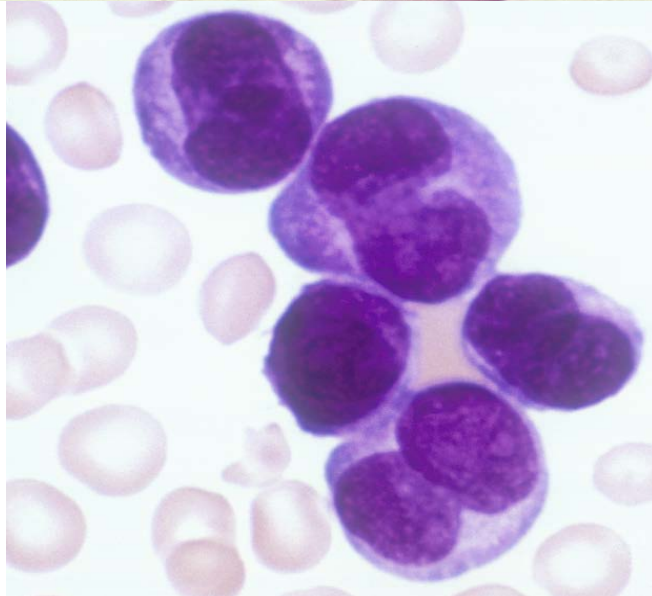


15/17 TRANSLOCATION, A CONSISTENT CHROMOSOMAL CHANGE IN ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKAEMIA

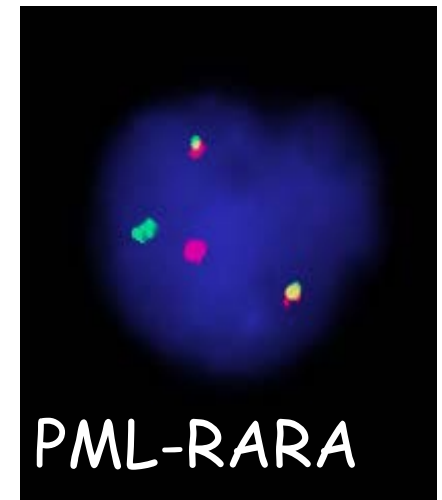
SIR,—We have described a similar chromosomal abnormality in two patients with acute promyelocytic leukaemia

Department of Medicine,
Franklin McLean Memorial
Research Institute,
University of Chicago,
Chicago, Illinois 60637, U.S.A.

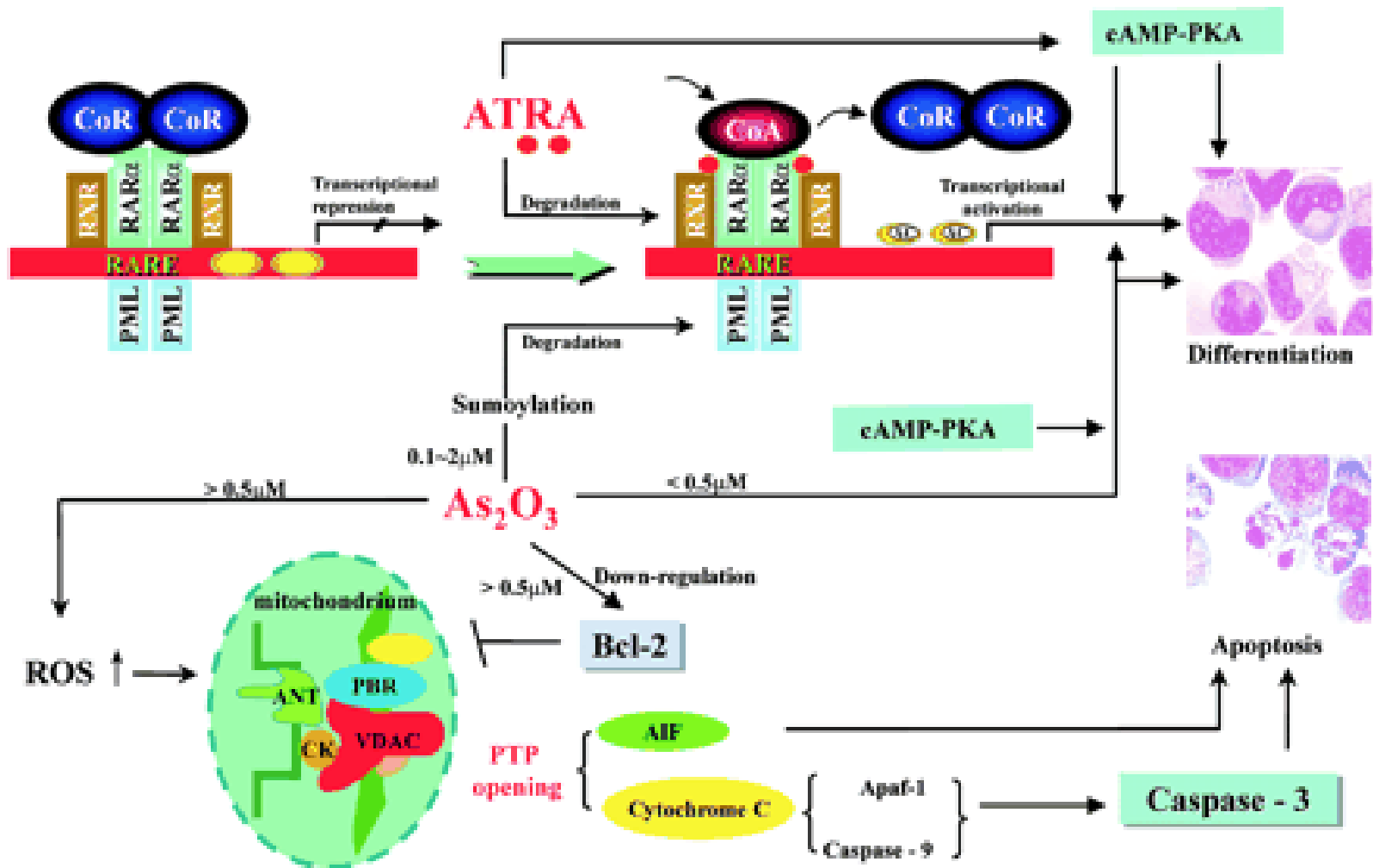
JANET D. ROWLEY
HARVEY M. GOLOMB
CHARLOTTE DOUGHERTY



$t(15;17)(q22;q12)$



Cílená léčba nemocných s APL



AKUTNÍ LYMFOBLASTICKÁ LEUKEMIE (ALL)

ALL – heterogenní onemocnění s monoklonální proliferací a expanzí nezralých lymfoidních buněk v KD, PK a dalších orgánech

- Cytogenetika má prognostický význam
- Diagnostický význam - imunofenotyp

TABLE 2: WHO 2008 classification of acute lymphoblastic leukemia (ALL)

Precursor lymphoid neoplasms

B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma, not otherwise specified

B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities

B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*

B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23); *MLL* rearranged

B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13;q22);

TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)

B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperploidy

B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy (hypodiploid ALL)

B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31;q32); *IL3-IGH*

B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3);

E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)

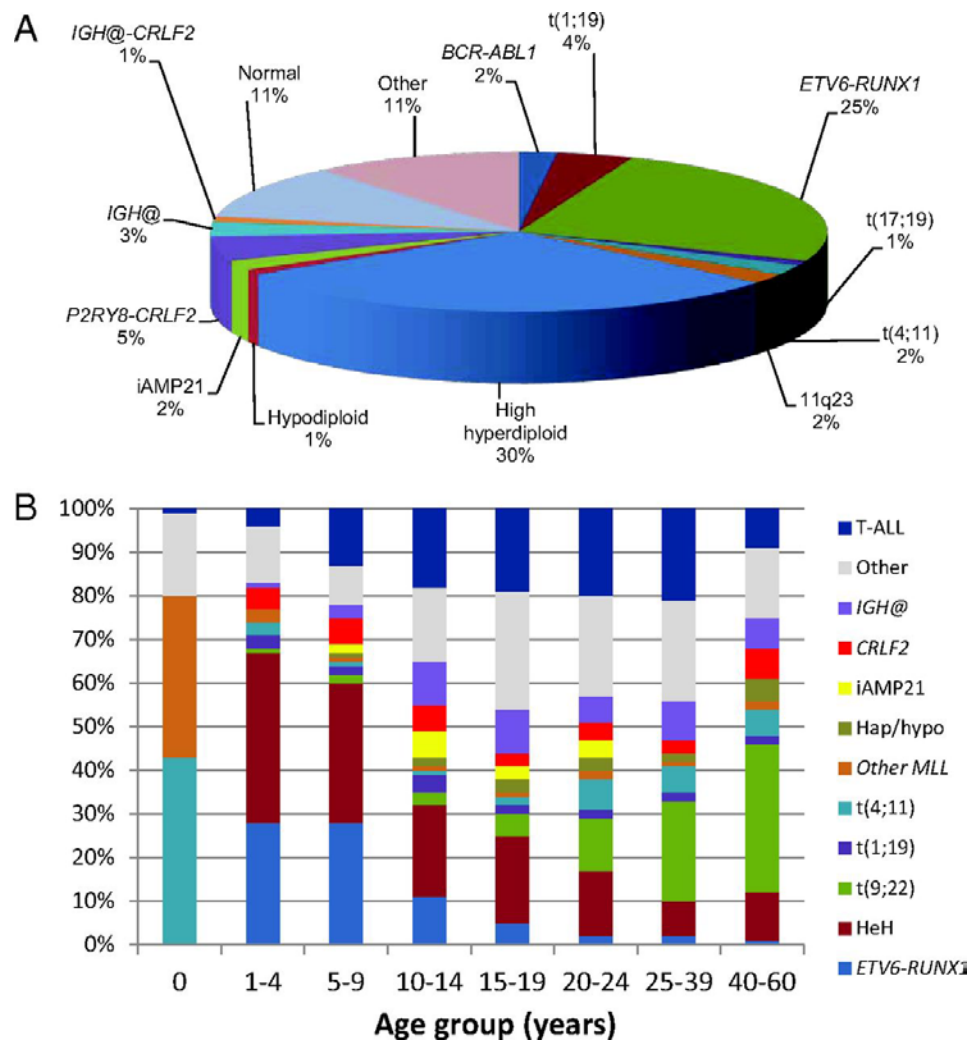
T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

WHO = World Health Organization

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (eds): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press; 109-138, 2009.

Dětské ALL

Tvoří 30% všech dětských nádorů

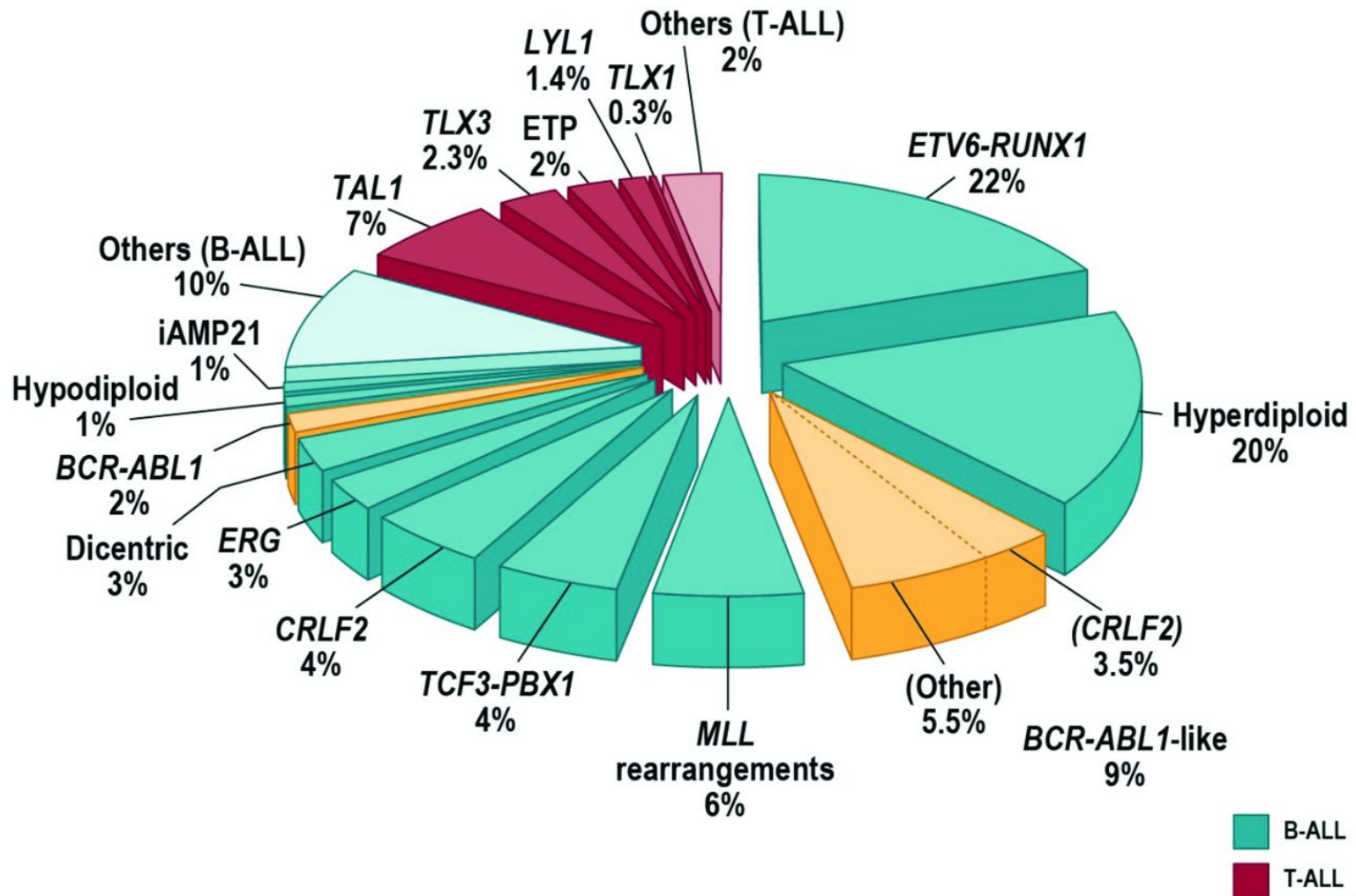


Christine J. Harrison Hematology 2013;2013:118-125

Distribution of cytogenetic abnormalities from data collected from UK childhood ALL treatment trials.



Frequency of cytogenetic subtypes of pediatric ALL.

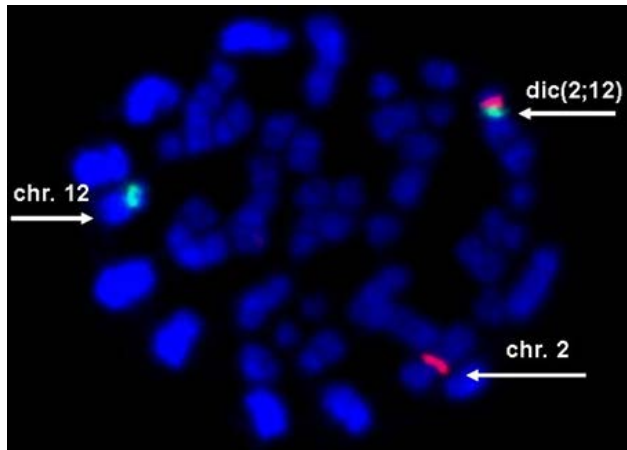
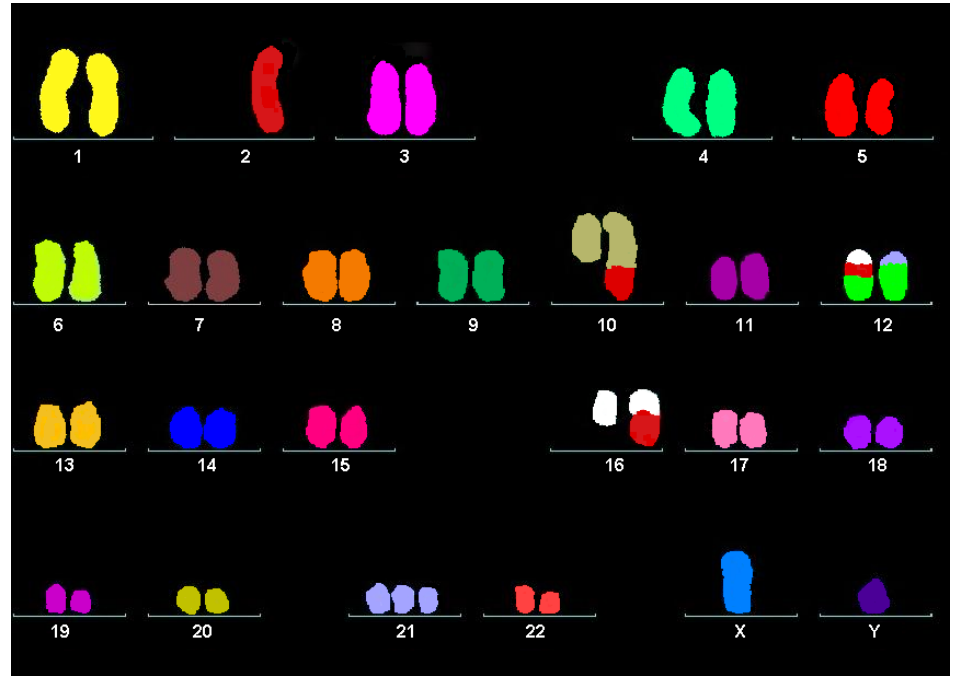
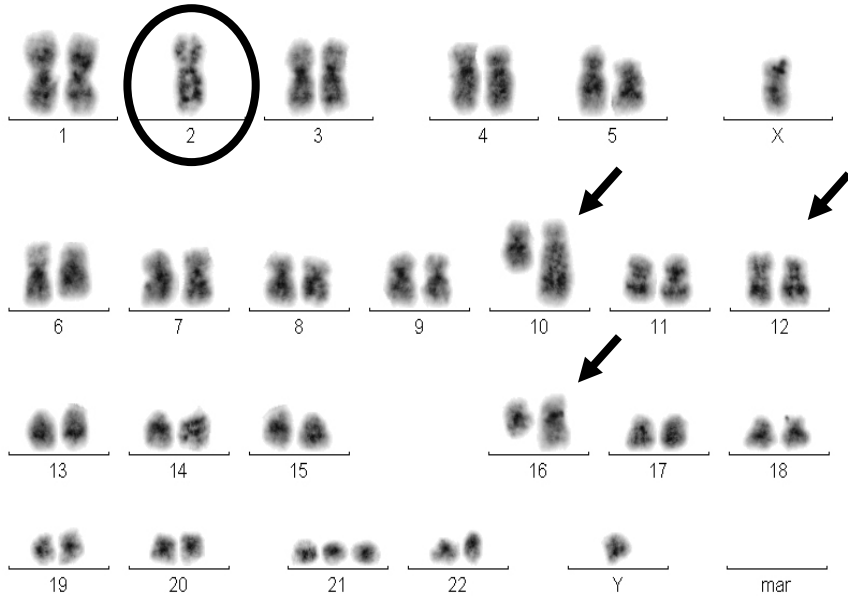


Charles G. Mullighan Hematology 2012;2012:389-396



Chlapec, nar. 1998, dg. BCP-ALL 2003, Léčen protokolem ALL BFM95, K

46,XY,dic(2;12)(?;p?12)t(2;16)(?;q?),der(10)t(2;10)(q?12;q?12),t(12;21)(p13;q22),+21



Myelodysplastický syndrom (MDS)

WHO klasifikace

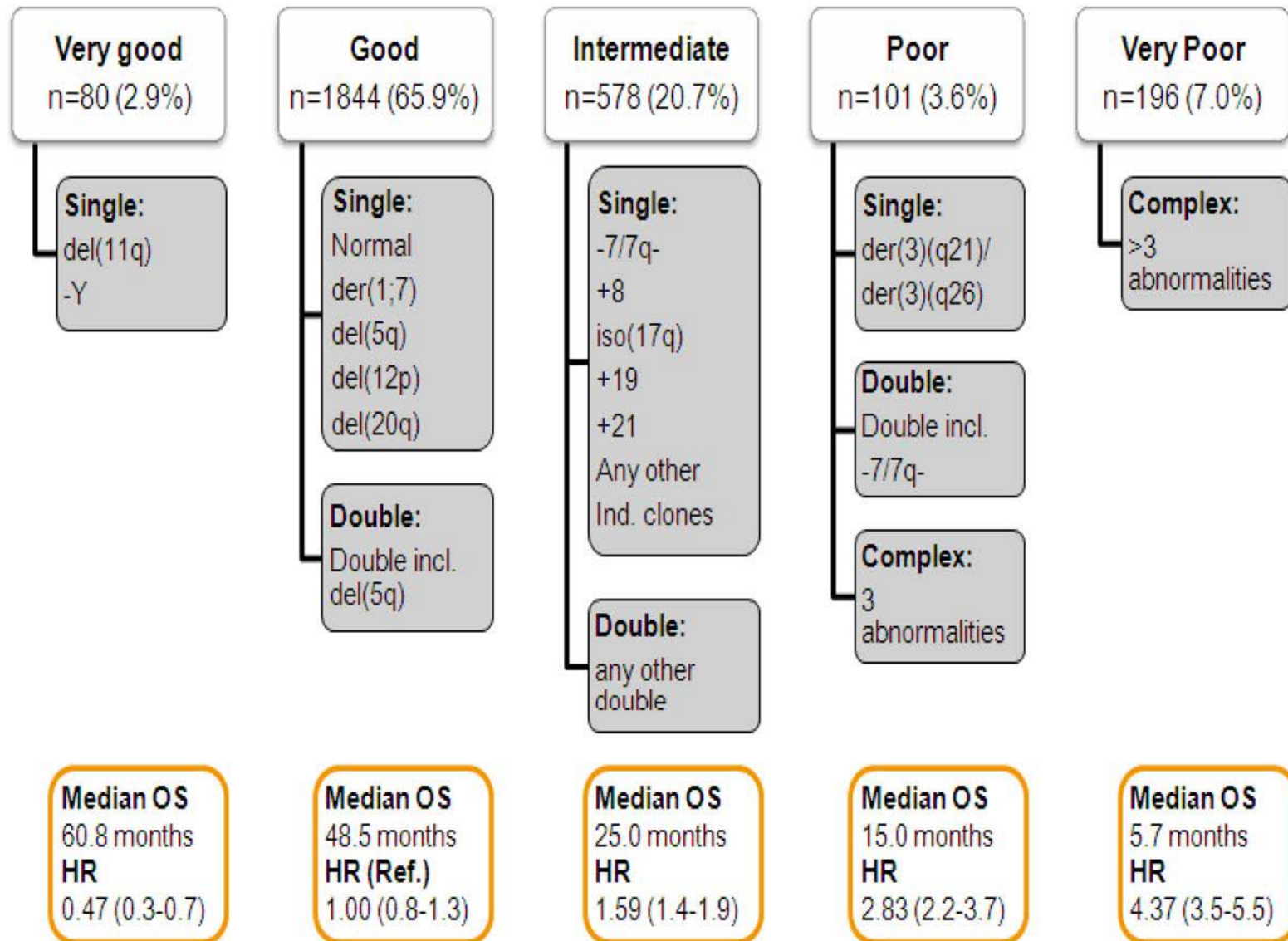
- Refractory cytopenia with unilineage dysplasia (RCUD)
- Refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS)
- Refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD)
- Refractory anemia with excess blasts-1 (RAEB-1)
- Refractory anemia with excess blasts-2 (RAEB-2)
- Myelodysplastic syndrome, unclassified (MDS-U)
- Myelodysplastic syndrome associated with isolated del(5q)

Klinická heterogenita MDS je odrazem heterogenity získaných somatických genetických změn

Chromosomové změny u MDS

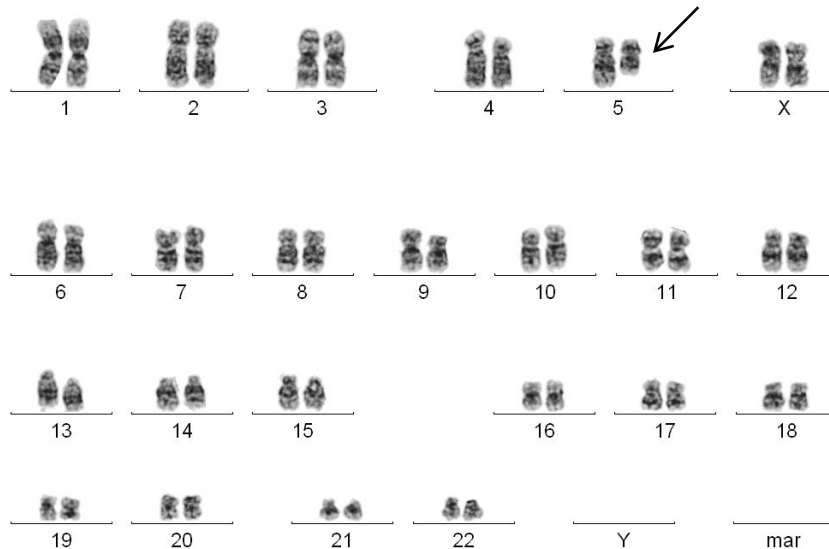
- de novo MDS 40-60%
- t-MDS nebo sekundární MDS 90%
- SNPs+arrayCGH 70%

Prognostická stratifikace MDS



5q- SYNDROM

46,XX,del(5)(q31)



- 10 % nemocných
- dobrá prognóza
(5-16 % progrese do AML)
- intersticiální delece, 5q31,
5q32-5q33
- Cílená léčba: lenalidomid
azacytidin

Lenalidomid - imunimodulační
látka

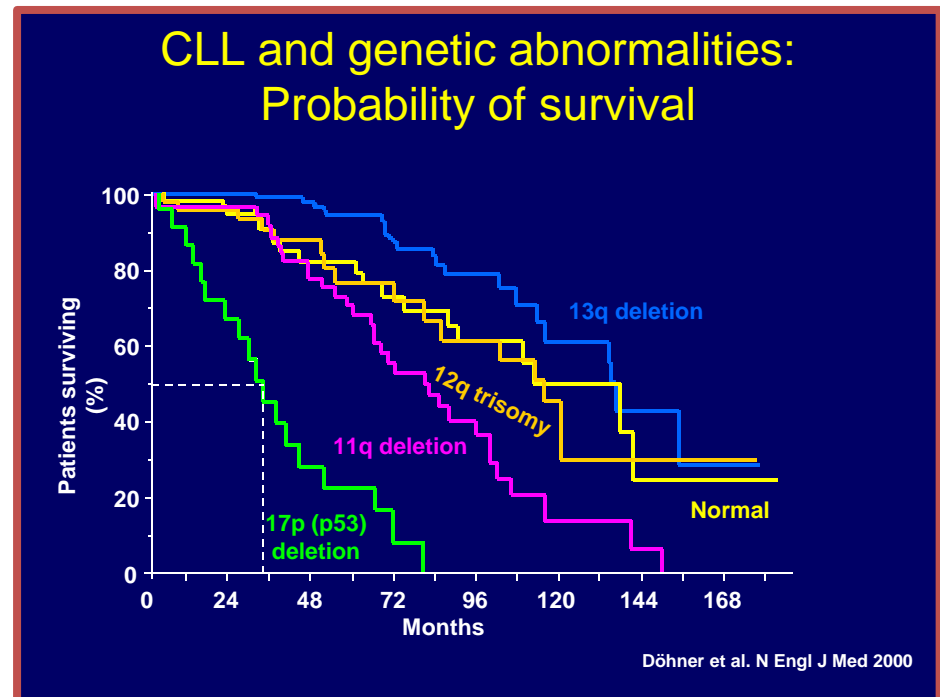
Azacytidin (vidaza)- hypometylace
DNA

CYTOGENETIKA CLL

Prognostický význam chromosomových změn u CLL

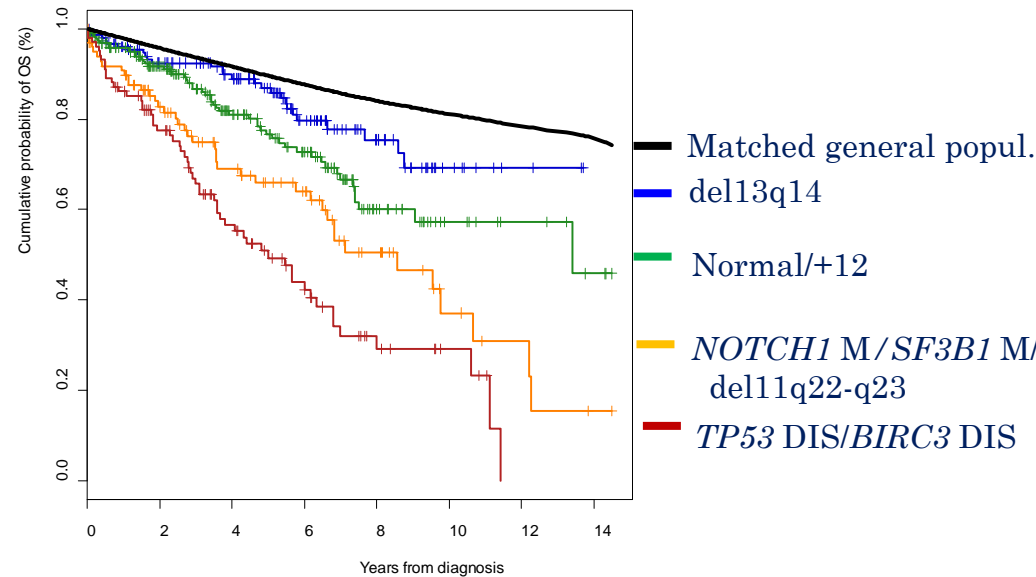
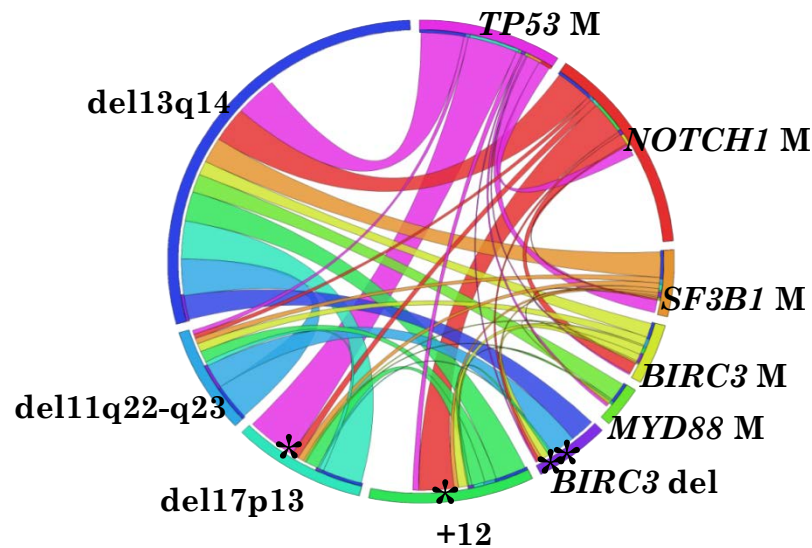
Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia.

N Engl J Med 2000; 343:1910-1916.



Chronická lymfocytární leukemie (CLL)

Mutační a cytogenetický model



CLL – prognostická a léčebná stratifikace

Category	Associated genetic factors	Therapeutic strategies
Very high risk	del(17p) [*] / <i>TP53</i> mutation and/or <i>BIRC3</i> mutation	p53-independent drugs, BTK inhibitors, allogeneic stem cell transplantation
High risk	del(11q) [*] / <i>ATM</i> mutation and/or <i>NOTCH1</i> mutation and/or <i>SF3B1</i> mutation	FCR
Intermediate risk	Trisomy 12 Normal karyotype and FISH	Not recommended
Low risk	Isolated del(13q) [*]	Not recommended

Nehodgkinské lymfomy - NHL

- Maligní lymfomy jsou heterogenní skupina nádorů lymfatické tkáně
- Vznikají na základě genetických změn v původně normálních buňkách
- Klasifikace lymfomů- histopatologie - WHO klasifikace lymfomů 2008
- Cytogenetika a FISH potvrzují klasifikační zařazení

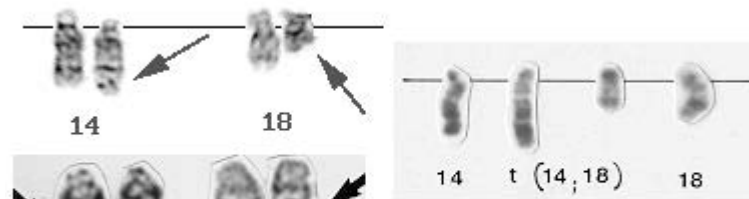
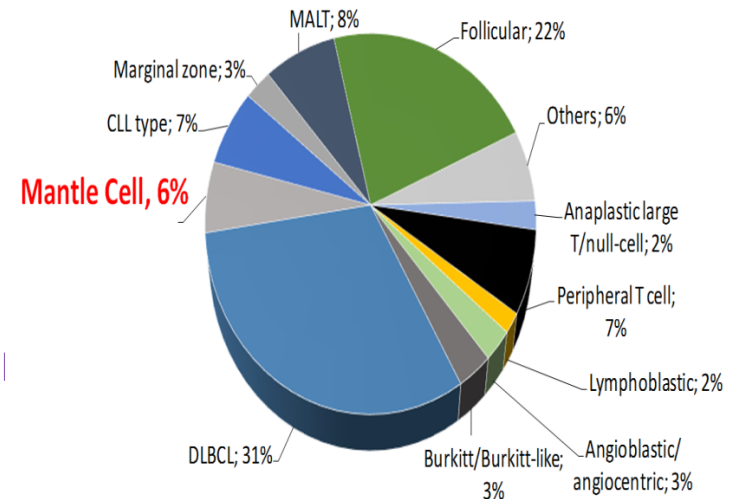
Folikulární lymfom (FL)

indolentní B buněčný lymfom

~20 % všech lymfomů

heterogenní klinický průběh , os několik roků až 20 |

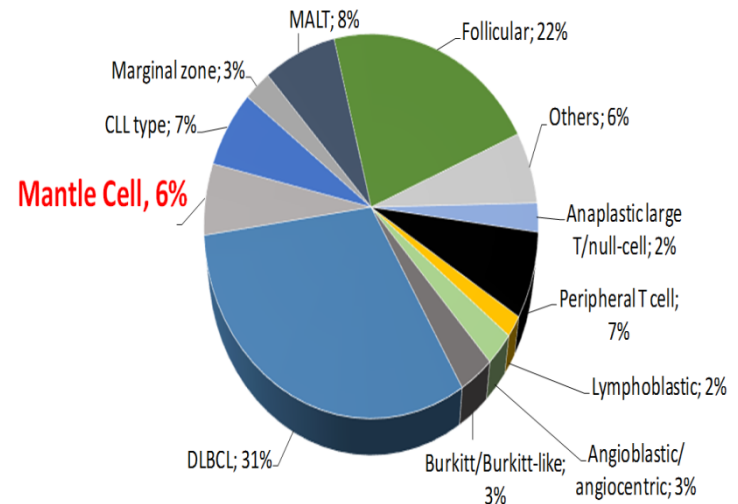
90% nemocných má translokaci $t(14;18)(q32;q21)$



Fúze *IGH/BCL2*

MCL (mantle cell lymphoma) lymfom plášťových buněk

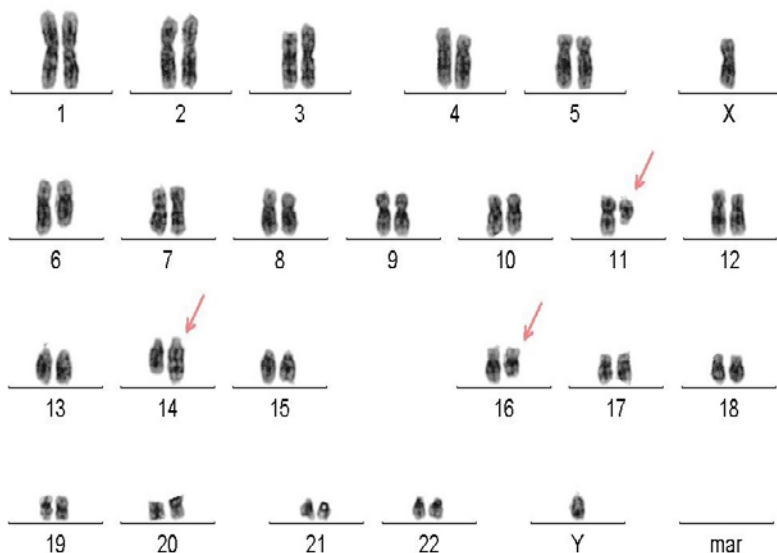
- Agresivní onemocnění (OS 3-5 let)
- ~ 6 % všech NHL
- Diagnostika:
 - Morfologie
 - Imunohistochemie
 - Imunofenotypizace
 - Genetika:
 - cytogenetika
 - FISH
 - molekulární genetika - PCR



MCL (mantle cell lymphoma) lymfom pláštových buněk

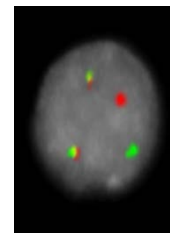
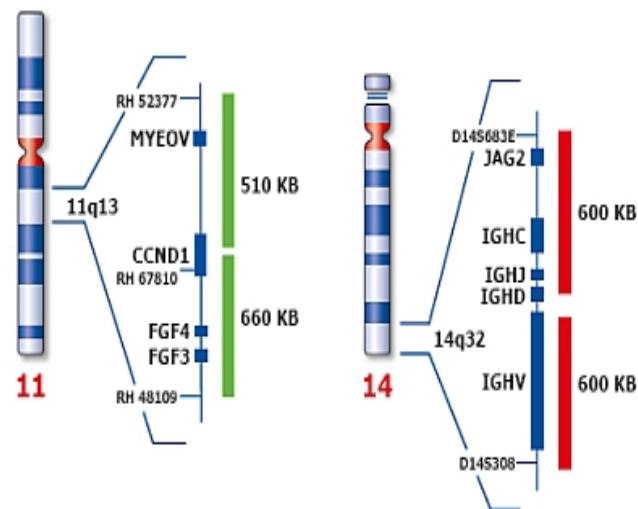
- Konvenční cytogenetika

t(11;14)



- FISH

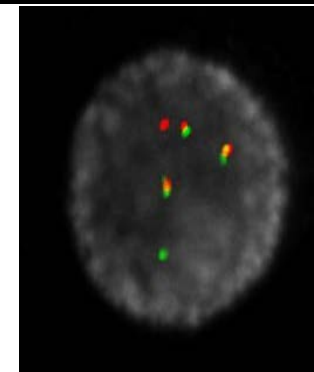
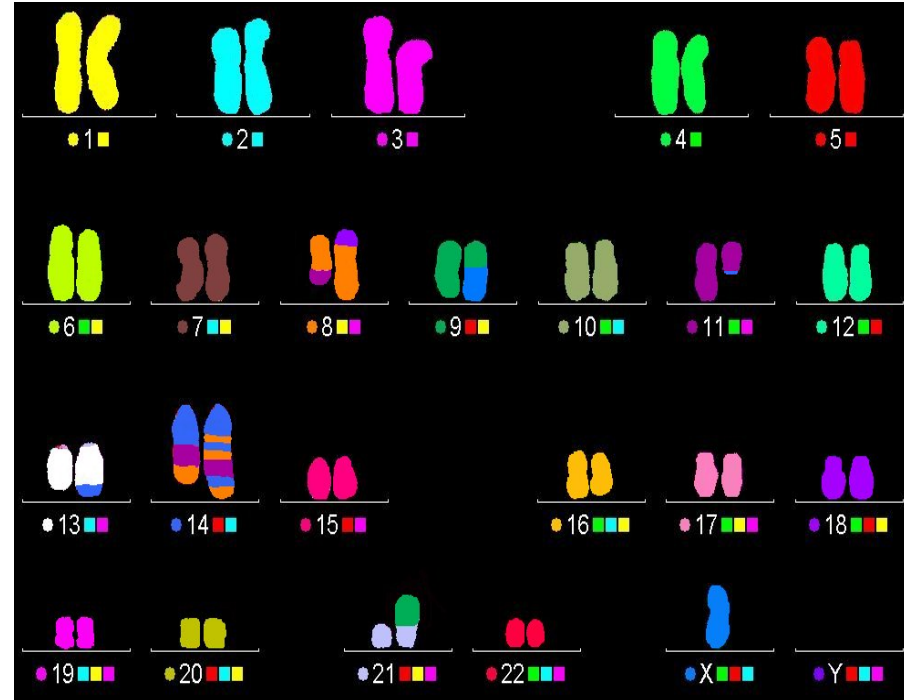
dual color dual fusion probes



IgH/CCND1 DC
DF Kreatech

Muž, 1938, dg. 11/2009

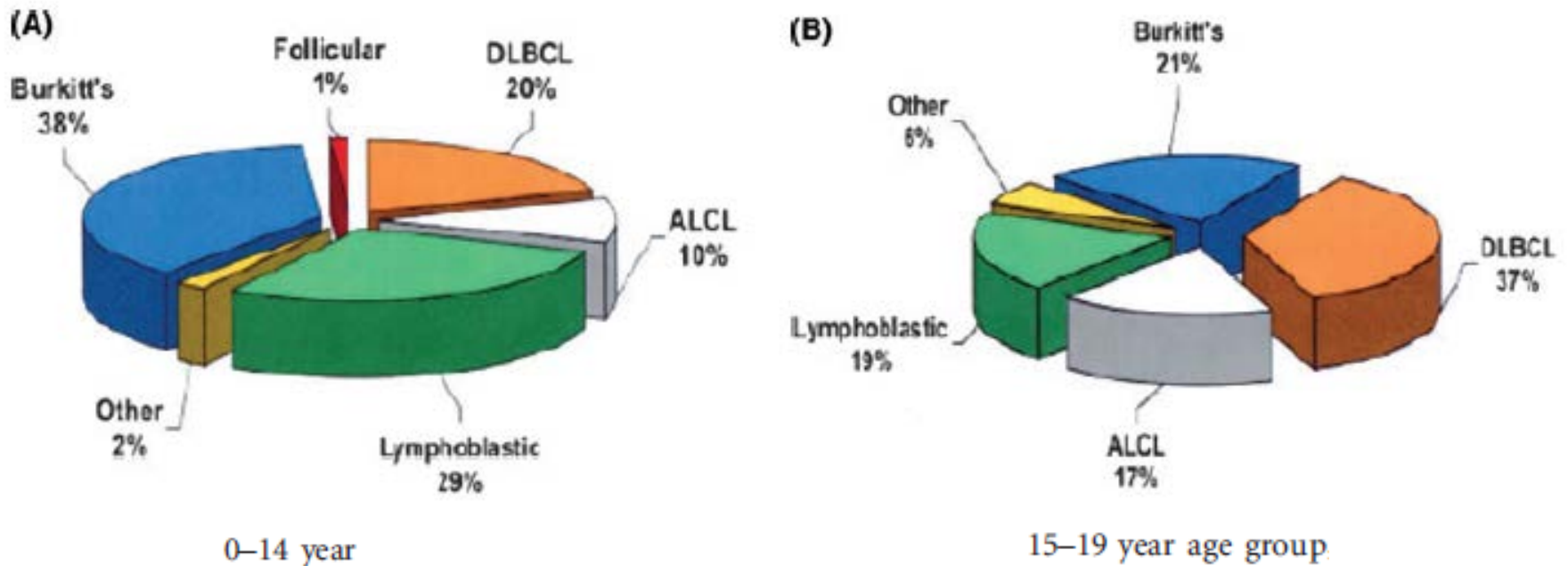
- Leukemizovaný lymfom
- Mol.biol:
 - negativní pro IgH/CCND1 v MTC
 - Potvrzena hyperexprese cyklinu D1
- Cytogenetika a FISH: Komplexní karyotyp
 - pozitivní t(11;14) – zmnožení signálů
 - Amplifikace genu MYC (8q24)
 - Delece ATM (11q22)
- chemoterapie: R-CAOD a 5xR-CHOP, PR
- 10/2010 relaps onemocnění, komorbidní
- 1/2011 další komplikace. Úmrtí 1/2011



IgH/CCND1
DC DF Abbott

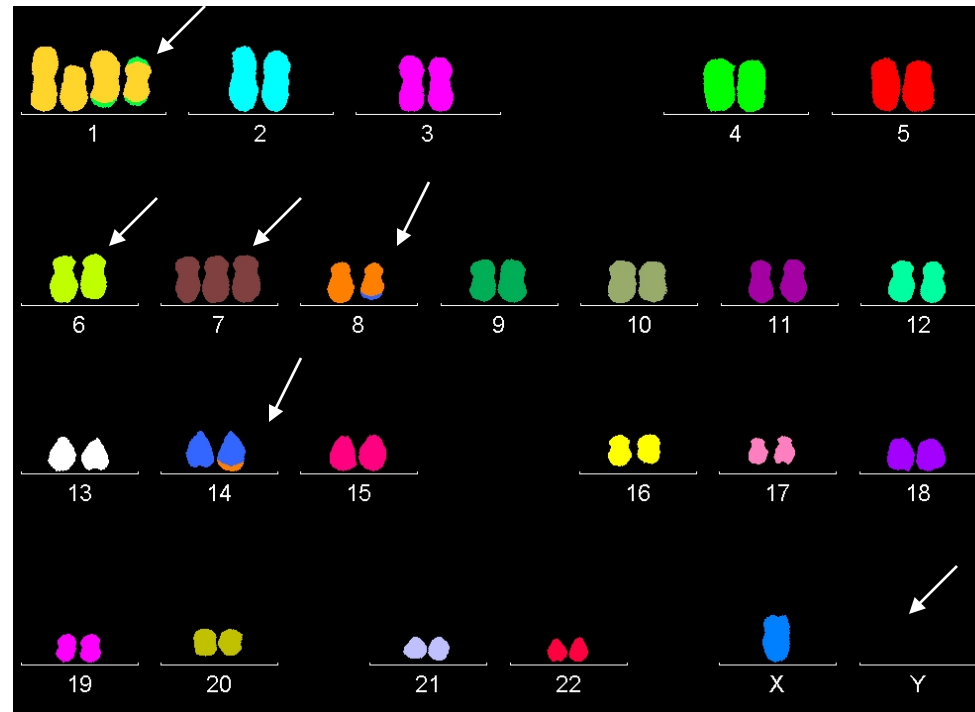
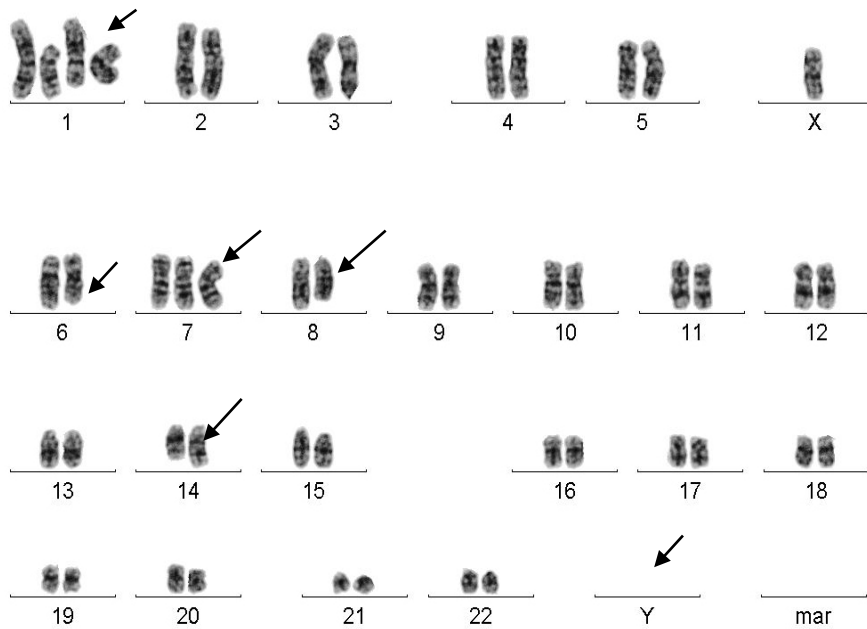
Nehodgkinské lymfomy (NHL) u dětí

- 4-7% nádorů u dětí a mladistvých
- incidence vzrůstá s věkem
- zvýšené riziko dětí s imunodeficitem (např. AT)
- WHO klasifikace 2008
- Frekvence histologických subtypů odlišná od dospělých



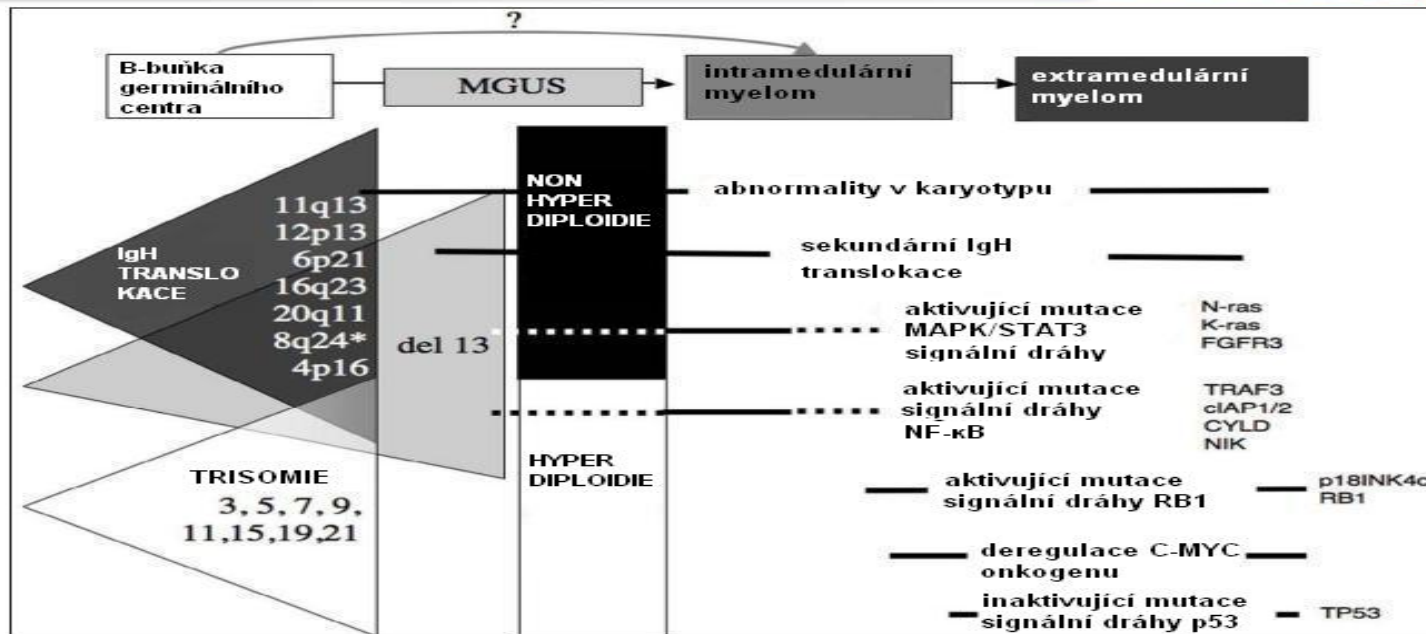
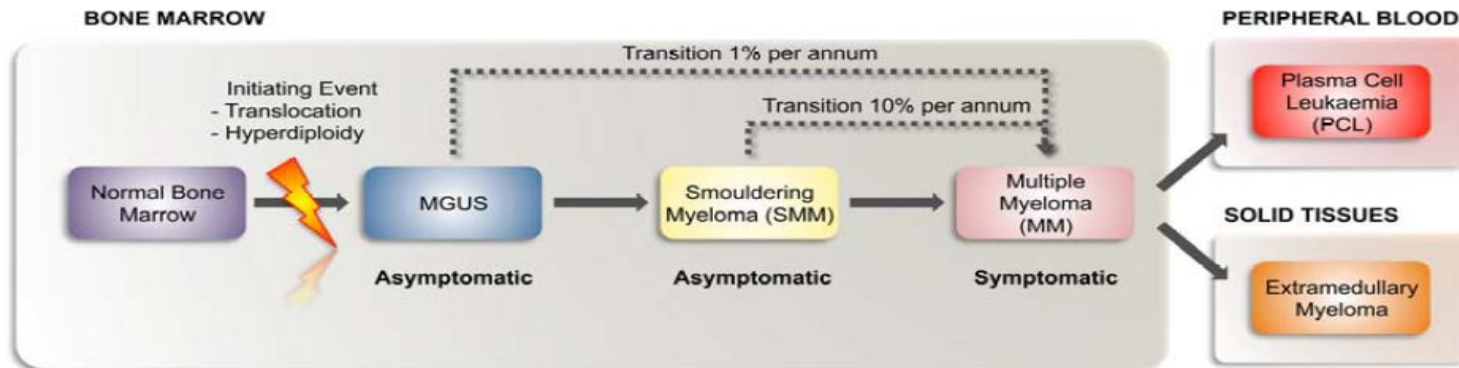
BURKITŮV LYMFOM (BL)

48,X,-Y,del(1)(p13pter),+der(1)del(1)(q?24q?ter)t(1;4)(q23;?q?),
+ider(1)(q11)del(1)(q?24q?ter)t(1;4)(q23;?q?),del(6)(q?15),+7,t(8;14)(q24;q32)(1.klon-56%)



MNOHOČETNÝ MYELOM

MM je B-buněčné nádorové onemocnění, charakterizované nekontrolovatelnou proliferací abnormálních plasmatických buněk v kostní dřeni.

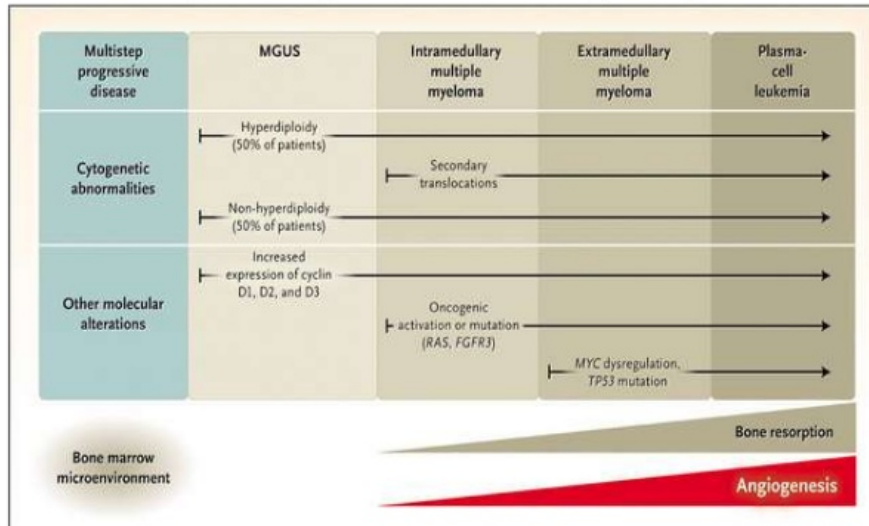


MNOHOČETNÝ MYELOM

Revised International Staging System for Multiple Myeloma:
A Report From International Myeloma Working Group

2015

Multistep Pathogenesis of Multiple Myeloma



N Engl J Med 2011; 364:1046-1060 March 17,2011

Table 1. Standard Risk Factors for MM and the R-ISS

Prognostic Factor	Criteria
ISS stage	
I	Serum β_2 -microglobulin < 3.5 mg/L, serum albumin \geq 3.5 g/dL
II	Not ISS stage I or III
III	Serum β_2 -microglobulin \geq 5.5 mg/L
CA by iFISH	
High risk	Presence of del(17p) and/or translocation t(4;14) and/or translocation t(14;16)
Standard risk	No high-risk CA
LDH	
Normal	Serum LDH < the upper limit of normal
High	Serum LDH > the upper limit of normal
A new model for risk stratification for MM	
R-ISS stage	
I	ISS stage I and standard-risk CA by iFISH and normal LDH
II	Not R-ISS stage I or III
III	ISS stage III and either high-risk CA by iFISH or high LDH

Abbreviations: CA, chromosomal abnormalities; iFISH, interphase fluorescent in situ hybridization; ISS, International Staging System; LDH, lactate dehydrogenase; MM, multiple myeloma; R-ISS, revised International Staging System.



ZÁVĚR

- Cytogenetika je nedílnou součástí diagnostických a prognostických stratifikací hematologických malignit
- V jednom vyšetření analyzuje celý genom
- Dovoluje potvrdit klinickou diagnosu nálezem specifických chromosomových změn
- Nenáhodné rekurentní změny určují prognosu onemocnění
- Určení změny dovoluje monitorovat účinnost léčby