

DETEKCE NEBALANCOVANÝCH CHROMOZÓMOVÝCH ZMĚN U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM POMOCÍ TECHNIKY KOMPARATIVNÍ GENOMOVÉ HYBRIDIZACE

DETECTION OF IMBALANCED CHROMOSOMAL CHANGES IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS USING COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (CGH)

ZAORALOVÁ R.^{1,2}, KUGLÍK P.², VRÁNOVÁ V.², HÁJEK R.^{1,2,3}

¹ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUINA – UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM (URC-CMG), LF MU, BRNO

²ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

³INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

Souhrn

Uvádíme příklad využití techniky klasické komparativní hybridizace (CGH) a komparativní hybridizace s vyšším rozlišením (HR-CGH) u pěti pacientů s diagnózou mnohočetného myelomu. Cílem experimentů bylo doplnit výsledky cytogenetických analýz prováděných pomocí techniky FISH o další nebalancované abnormality chromozómů a porovnat účinnost obou metod při vyšetření kostní dřeně s rozdílným stupněm infiltrace nádorovými plazmocyty.

Klíčová slova: Mnohočetný myelom, cytogenetika, chromozómové aberace, FISH, komparativní genomová hybridizace.

Summary

We show an example of the use classic CGH (comparative genomic hybridization) and HR-CGH (comparative genomic hybridization with higher resolution) in five multiple myeloma patients. The aim of the experiments was to combine the results of FISH with the analysis of imbalanced chromosomal abnormalities by CGH. Our other aim was to compare the use of these methods to detect chromosomal changes in samples with different infiltration by malignant plasma cells.

Keywords: Multiple myeloma, cytogenetics, chromosomal aberrations, FISH, comparative genomic hybridization.

Úvod

Molekulárně cytogenetické vyšetření pomocí techniky komparativní genomové hybridizace (CGH) patří k metodám komplexního genomového screeningu genetických abnormalit nádorových buněk. Tato metoda nevyžaduje metafázní chromozómy, a proto je vhodná zejména k vyšetřování solidních nádorů nebo hematologických malignit s nízkou mitotickou aktivitou nádorových buněk. Technika CGH umožňuje odhalit nebalancované přestavby vedoucí ke ztrátě nebo zmožení genetického materiálu a je proto často využívána k diagnostice a prognostické klasifikaci jednotlivých maligních onemocnění či jejich subtypů. Také celkové počty zisků a ztrát DNA sekvencí lze použít jako prediktivní a prognostický marker vývoje nádorů (1).

Využití techniky CGH je omezeno svou relativně nízkou citlivostí. Dosavadní výsledky ukazují, že minimální délka sekvence DNA, jejíž delecí či amplifikací lze pomocí klasické CGH zachytit, je přibližně 5 až 10 Mb, v nádorovém materiálu musí být přítomno alespoň 50 % buněk s danou aberací. V roce 1997 byla na pracovišti dr. Kirchhoffové proto vyvinuta metoda CGH s vysokým rozlišením (tzv. HR-CGH), která je již schopna zachytit drobné delecí či zisky DNA sekvencí o velikosti 3 Mb (5). V našich předchozích experimentech jsme využili techniku HR-CGH

při detekci chromozómových abnormalit u dětí s akutní leukémií (7) a prokázali jsme, že tato metoda umožňuje zachytit přítomnost aberantních klonů již s 20 až 30 % zastoupením nádorových buněk v analyzovaném vzorku (6). V této práci uvádíme příklad využití techniky klasické CGH a HR-CGH u 5 pacientů s diagnózou mnohočetného myelomu. Cílem experimentů bylo doplnit výsledky cytogenetických analýz prováděných pomocí techniky FISH o další nebalancované abnormality chromozómů a porovnat účinnost obou metod při vyšetření kostní dřeně s rozdílným stupněm infiltrace nádorovými plazmocyty.

Metodika a soubor nemocných

K vyšetření byly použity vzorky kostní dřeně od 5 pacientů s MM, u kterých byla naměřena infiltrace myelomových buněk v kostní dřeně v rozsahu 18,4 - 81 % (Tabulka č.1). V naší práci byla jako sonda použita DNA (3 µg) izolovaná ze zamražené plné kostní dřeně metodou chloroformové extrakce. Techniku CGH/HR-CGH jsme prováděli dle dříve publikovaného protokolu (6). Fluorescenční signály byly snímány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX61 vybaveného digitální kamerou Vosskuhler 1300D a analyzovány pomocí počítačové analýzy obrazu LUCIA-CGH ADVANCED STATISTICS (Laboratory Imaging, s. r.o. Praha).

příklady využití

Pacient č.	věk	pohlaví	infiltrace KD	FISH	CGH		HR-CGH	
					zisky	ztráty	zisky	ztráty
1	57	M	20	monozomie 13: 71 % t(4;14)(p16;q32): 100 %	0	0	9q34-qter, 19	13q21-q32
2	82	F	37,8	nehodnoceno	1q12-q42 16q22-qter	1p36.1-pter 3p21 14q24 X	1q12-qter 16q13-qter 17q23-qter	1p13-p31 3p21-p24 14q22-q24 X
3	60	M	81	monozomie 13: 98 % zlom IgH: 100 % delece p53: 23 % zisk 1q21: 100 %	1q 6p21-pter	11q14-qter 13	1q 6p21-pter	11q14-qter 13
4	50	M	18,4	delece 14q32 (IgH)	0	0	19p13-pter	13q21-q23
5	67	M	26,4	monozomie 13: 80 % zlom IgH: 100 % zisk 1q21: 99 %	1q12-q42	1p36.1-pter 22q12-qter	1q12-q42 4q12-q28	1p36.1-pter 20q 22q12-qter susp. 17p

Tabulka č. 1: Souhrn cytogenetických abnormalit zachycených u pacientů s MM pomocí techniky FISH, CGH a HR-CGH

Výsledky

Pomocí klasické CGH bylo u 5 pacientů s MM nalezeno celkově 13 různých chromozómových změn (medián 3; rozptyl 0-6 v každém vzorku), zatímco technika HR-CGH zachytila u těchto pacientů 22 chromozómových změn (2-7 na vzorek, medián 4, rozptyl 2-7 v každém vzorku). Počet nalezených ztrát genetického materiálu (CGH - 8, HR-CGH -12) byl mírně vyšší než počet zisků (CGH 5, HR-CGH 10) - viz Tabulka č.1. Nejčastější chromozómovou změnou byl zisk v oblasti dlouhého raménka chromozómu 1 (1q). Celkově technika HR-CGH u nemocných s MM odhalila v genomu nádorových buněk o 40 % víc chromozómových abnormalit než klasická CGH.

Diskuze a závěr

Pomocí metod CGH/HR-CGH jsme ve vzorcích kostní dřeně nemocných s MM nejen potvrdili přítomnost chromozómových abnormalit nalezených dříve metodou FISH (delece 13q, duplikace 1q), u ale navíc jsme zachytili i další nebalancované chromozómové abnormality (např. zisky 9q, 19p), které bývají opakovaně popisovány v karyotypu těchto nemocných (2).

Prokázali jsme, že technika HR-CGH je mnohem citlivější než metoda CGH. Ve vybrané skupině vzorků byly naměřeny hodnoty infiltrace kostní dřeně myelomovými buňkami ve velmi širokém rozsahu. Z Tabulky č.1 je patrné, že zatímco záchyt chromozómových abnormalit u vzorků kostní dřeně s infiltrací nádorovými plazmocytů nižší než 30 % klasickou CGH je velmi obtížný, technika HR-CGH zachytila spolehlivě přítomné chromozómové abnormality ve vzorcích s infiltrací nádorovými buňkami již kolem 20 %. Na základě těchto výsledků lze usuzovat, že techniky CGH a zejména HR-CGH představují vhodné technologie, které umožňují blíže analyzovat v rámci jediné hybridizační reakce celý genom a odhalovat další prognosticky významné chromozómové abnormality u nemocných s MM. Se zavedením analýzy genomu pomocí array-CGH se citlivost těchto vyšetření dále výrazně zvýší.

Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434, VZ MŠM002162245 a IGA MZ ČR (NR9317).

Literatura:

- Gebhart, E.: Comparative genomic hybridization (CGH): ten years of substantial progress in human solid tumor molecular cytogenetics. *Cytogenet Genome Res.* 2004;104(1-4):352-8.
- Largo C, Saez B, Alvarez S, et al.: Multiple myeloma primary cells show a highly rearranged unbalanced genome with amplifications and homozygous deletions irrespective of the presence of immunoglobulin-related chromosome translocation. *Haematologica/the hematology journal.* 2007; 92: 795-802.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar et al.: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992;258(2583): 818-821.
- Karhu R.: Improved methodology and potential clinical applications of comparative genomic hybridization. 1998;University of Tampere.
- Kirchhoff, M., Gerdes T., Rose H. et al.: Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry.* 1998;31:163-173.
- Vranová, V., Nečaslová, E., Kuglík, P. et al.: Screening of genomic imbalances in glioblastoma multiforme using high-resolution comparative genomic hybridization. *Oncology Reports.* 2007;17, 2, p. 457-464.
- Vranová, V., Mentzlová, D., Oltová, A. et al: Efficacy of high resolution comparative genomic hybridization (HR-CGH) in detection of chromosomal abnormalities in children with acute leukemia. *Neoplasma.* 2008;55, 23-30.