

MOLEKULÁRNÍ DEFINICE RIZIKA JAKO NOVÝ PROGNOSTICKÝ NÁSTROJ PRO MNOHOČETNÝ MYELOM

MOLECULAR DEFINITION OF RISK AS A NEW PROGNOSTIC TOOL FOR MULTIPLE MYELOMA

ŠVÁCHOVÁ H.^{1,2}, HÁJEK R.^{1,3}

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

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

³ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO

⁴ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

Souhrn

Heterogenní podstata mnohočetného myelomu a nedostatečnost současných klasifikačních systémů a laboratorních parametrů neumožňuje přesné stanovení vysoce rizikových případů s MM (high-risk, HR). Potřeba nových prognostických nástrojů vedla k vytvoření řady klasifikačních schémat definujících jednotlivé varianty MM na základě genetických/cytogenetických markerů získaných analýzou expresních profilů a pomocí cytogenetických technik.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, microarrays, profilování genetické exprese.

Summary

Heterogeneity of multiple myeloma and insufficiency of current classification systems and laboratory parameters do not facilitate definition of patients with high-risk outcome. The need of new prognostic tools lead to the range (in creation of plenty) of classification scheme describing variants of MM based on detection of genetics/cytogenetics markers by gene expression profiling and cytogenetics.

Keywords: multiple myeloma, microarrays, gene expression profiling.

Úvod

Nástup „high-density“ oligonukleotidových DNA microarrays umožnil simultánní analýzu exprese tisíce různých genů, jež jsou vztaženy k rozličným biologickým funkcím. Kombinací GEP a cytogenetických technik (FISH, aCGH) bylo možné identifikovat skupiny genů, jejichž aktivita může předpovědět vysoce rizikové případy s variabilním klinickým výstupem, který lze pouze obtížně předpovědět pomocí současných laboratorních parametrů. Ohodnocení hladiny exprese těchto genů může potenciálně poskytnout jednoduchý a přitom efektivní molekulárně-prognostický test. Na základě molekulární definice rizika bude možné zpřesnit výběr nejvhodnějšího terapeutického zásahu, např. u 85% pacientů s nízkým rizikem (low-risk; LR) MM může být zvolena méně intenzivní terapie, naopak u pacientů s vysokým rizikem (high-risk; HR) MM zajistíme včasné zahájení vhodné léčby (5, 4).

Pomocí GEP a „unsupervised“ hierarchického shlukování byl vytvořen 70-genový klasifikační model, který prokázal existenci 7 molekulárních podskupin MM se silnou korelací s hyperdiploidii a opakujícími se translokacemi (6).

Metodika a soubor nemocných

Microarray analýzy byly provedeny pomocí Affymetrix U133Plus2.0 microarrays na CD 138⁺ myelomových buňkách získaných separací mononukleární frakce kostní dřeně (viz. metodika) Buňky pocházely ze 414 nově diagnostikovaných pacientů s MM léčených dle dvou samostatných protokolů (6).

Výsledky

Analýza více než 54 000 genů odhalila 70 genů spojených s časným úmrtím, z nichž 30% bylo lokalizováno na chromozomu 1 (Tabulka č.1). Většina genů se zvýšenou expresí se vyskytovala na chromozomu 1q. Amplifikace 1q genů byla pozorována především u high-risk PR (proliferative) a MS (MMSET) skupiny (Tabulka č.2). Geny se sníženou expresí byly lokalizovány na 1p (5). Na základě molekulární klasifikace bylo popsáno 7 podskupin, které korelovaly se známými aktivačními translokacemi – c-MAF, MAFB, CCND1 a CCND2 a hyperdiploidii. (Tabulka č.3) (6).

Nadměrná aktivace CCND1/CCND2 byla pozorována v 95% případů, zvýšená exprese CCND2 byla patrná u PR, LB (low bone disease) a MS skupiny, nízká exprese CCND1 byla v HY (hyperdiploid). Exprese CCND1/

příklady využití

CCND3 byla typická pro CD-1 a CD-2 třídu. Skupiny PR, MS a MF (MAF/MAFB) charakterizovaly nemocné s nepříznivou prognózou, ale s delším celkovým přežitím (overall survival; OS), skupiny HY, CD-1, CD-2, LB vykazovaly delší dobu přežití bez významné události (event-free survival; EFS) a příznivější prognózu (Graf č.1) (6). Další validační analýzy zredukovaly počet genů na 17. Ve srovnání se 70-genovým modelem byl 17-genový model schopný předpovídat high-risk s 97,7 % přesností (Tabulka č. 4) (5).

1q geny	Symbol genu
1q22	<i>AIM2</i>
1q43	<i>OPN3</i>
1q31.3	<i>ASPM</i>
1q21.2	<i>CKS1B</i>
1q22	<i>IFI16</i>
1q23.3	<i>TAGLN2</i>
1q43	<i>NA</i>
1q21.2	<i>PSMD4</i>
1q32.1	<i>KIF14</i>
1p geny	Symbol genu
1p36.33	<i>FLJ13052</i>
1p11	<i>MGC57827</i>
1p36.13	<i>ENO1</i>
1p13	<i>NA</i>
1p13.2	<i>AHCYL1</i>
1p13.3	<i>MCLC</i>
1p22	<i>EVI5</i>
1p13.3	<i>AD-020</i>
1p13.1	<i>TRIM33</i>
1p34	<i>FUCA1</i>
1p22.1	<i>PARG1</i>
1p22	<i>CTBS</i>

Tabulka č. 1: Geny spojené s časným úmrtím lokalizované na chromozomu 1q a 1p. Tabulka byla převzata a upravena z citace Zhan *et al.* (2006).

Chromozom	Počet genů								P
	Celkem	PR	LB	MS	HY	CD-1	CD-2	MF	
1q	2003	178	52	162	22	21	37	38	<.001
1p	2453	39	20	69	67	38	132	46	<.001

Tabulka č. 2: Výskyt 1q a 1p genů se zvýšenou expresí v 7 molekulárních podskupinách. Tabulka byla převzata a upravena z citace Zhan *et al.* (2006).

Molekulární klasifikace MM							
Název skupiny	1	2	3	4	5	6	7
Chrom. aberace	PR	LB	MS	HY	CD1	CD2	MF
			t(4;14)	trizomie 3,5,7,9,11,15,19,21	t(11;14)	t(11;14) t(6;14)	t(14;16) t(14;20)
EXPRES	↑ •bun.cykly •proliferace •MAGE •GAGE	•EDN1	•FGFR3 •MMSET •kaderin •WNT receptor •PBI1	•GNG11 •TRAIL •FRZB •DKK1 •CCRS •IFI geny	•Kelch-like 4 •INHBE •FYN •NF-IL6 •EVER1,2	•CD20 •VPREB •PAX5	•MAF geny •MAFB geny •SFRP2
		•DKK1 •IFI geny •FRZB	•ICAM4 •N-kaderin •kaderin 7 •PAX5	•CD52 •1q geny	•není CD 59 •NOTCH2NL •HES1		•TNFAIP8 •DKK1

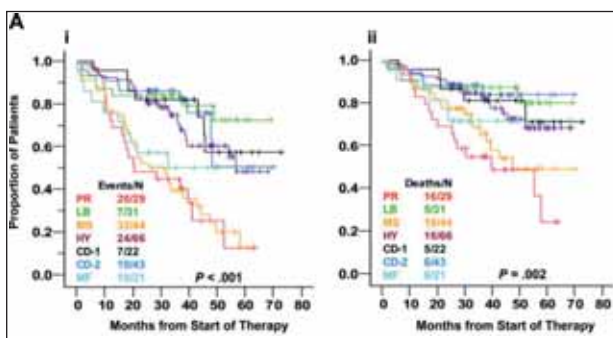
Tabulka č. 3: Molekulární klasifikace MM definující 7 molekulárních podskupin (Zhan *et al.*, 2006).

PR (proliferace); LB (low bone disease); MS (MMSET); HY (hyperdiploid); CD1 (CCND1/CCND3); CD2 (CCND1/CCND3); MF (MAF/MAFB)

Symbol genu	Lokalizace na chromozomu	70-genový kvartil
KIF14	1q32.1	Q4
SLC19A1	21q22.3	Q4
CKS1B	1q21.2	Q4
YWHAZ	8q23.1	Q4
MPHOSPH1	10q23.31	Q4
TMPO	12q22	Q4
NADK	1p36.21	Q4
LARS2	3p21.3	Q4
TBRG4	7p14-p13	Q4
AIM2	1q22	Q4
NA	1q43	Q4
ASPM	1q31	Q4
AHCYL1	1p13.2	Q1
CTBS	1p22	Q1
MCLC	1p13.3	Q1
LTBP1	2p22-p21	Q1
NA	6p21	Q1

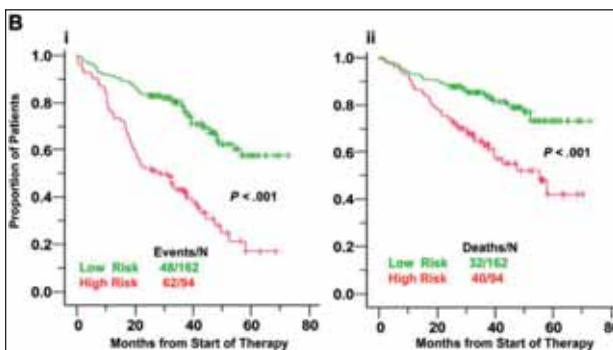
Tabulka č. 4: 17-genový model odvozený ze 70-genové UAMS klasifikace.

Tabulka byla převzata a upravena z citace Shaughnessy *et al.* (2007).



Graf č. 1: Kaplan-Meierovy křivky přežívání nemocných s mnohočetným myelomem (MM)

(A) Kaplan-Meierovy křivky EFS a OS v 7 skupinách prokázal pravděpodobnost 3-letého EFS v 84% LB; 72% HY; 82% v CD-1; a 86% v CD-2. Vysoké riziko bylo spojené s PR, MS a MF skupinou; tříletý odhad EFS byl 44% u PR, 39% u MS a 50% u MF. Pravděpodobnost 3-letého OS byla 55% v PR, 69% v MS, 71% v MF, 81% v CD1, 84% v HY, 87% v LB a 88% v CD2. Graf byl převzat a upraven z citace Zhan *et al.* (2006).



Graf č. 2: Kaplan-Meierovy křivky přežívání nemocných s mnohočetným myelomem (MM).

(B) EFS a OS analýza LR (low-risk) v HY, CD1, CD2, LB a HR (high-risk) v PR, MF, MS skupinách. Graf byl převzat a upraven z citace Zhan *et al.* (2006).

Diskuze

High-risk onemocnění definované na základě tohoto modelu představuje nezávislou a významnou prognostickou proměnou, která však vyžaduje ohodnocení ve spojení s dalšími léčebnými přístupy. Klinický potenciál, který tento model má, je ve schopnosti kvantitativně analyzovat riziko. Pomocí tohoto modelu bylo možné rozpoznat high-risk onemocnění u 13 % pacientů, u nemocných v relapsu toto číslo vzrostlo na 76 % a jasně identifikovalo pacienty s krátkým klidovým obdobím. Agresivnější myelomový fenotyp, vznikající *de novo* nebo druhotně získaný a charakterizovaný zvýšenou expresí proliferačních genů, je pravděpodobně vyžadován pro přechod do více agresivnějších stadií. Snahou je vyvinout nová léčiva cíleně zaměřená na signální dráhy typické pro tuto rizikovou skupinu, a prodloužit tak přežití nemocných s high-risk MM (5, 6).

Dalším klinicky významným rysem vyplývajícím z tohoto modelu je, že zisk/amplifikace 1q21 může být klíčovou genetickou událostí v patogenezi a progresi MM (6). Ze 70 definovaných genů spojených s časným úmrtím bylo 30 % lokalizováno na chromozomu 1. Většina genů se zvýšenou expresí se vyskytovala na dlouhém rameni 1q. Podobné poznatky byly získány i pomocí high-resolution aCGH (array comparative genomic hybridisation). Na základě této analýzy byla identifikována skupina pacientů s hyperdiploidním MM, která vykazovala zvýšenou expresi genů lokalizovaných na 1q21-q23 a horší prognózu (2, 5). Navíc se potvrdilo, že progresi onemocnění není závislá pouze na zvýšeném počtu kopií, ale také na procentu buněk nesoících 1q21 amplifikaci (3).

Kombinací microarray analýz a high resolution aCGH bylo identifikováno 47 „minimal common regions“ (MCRs) a bylo zjištěno, že pouze geny na MCRs v místech 1q21, 1q22 a 1q43-q44 měly významně zvýšenou expresi u HR MM (2, 5).

Ačkoliv UAMS klasifikace definuje geny lokalizované na chromozomu 1 jako klíčové v progresi onemocnění, výskyt

dalších 4 genů, FABP5, YWHAZ, EXOSC4 a EIFC2 na 8q21-8q24 předpokládá, že zisk 8q také přispívá k vývoji HR MM. Tyto geny zahrnují nedávno popsané zisky/amplifikace v 8q24.12-8q24.13 a 8q24.2-8q24.3 na MCRs (2; 5). S horší prognózou u MM byla spojena i ztráta jediné kopie genu lokalizovaného na chromozomu 13q14, RFP2, který byl již dříve popsán jako kandidátní nádorově-supresorový gen u B-CLL (B-cell chronic lymphocytic leukemia) s významnou homologií k BRCA1. RFP2 také vykazuje v MM expresi citlivou na počtu kopií (copy number-sensitive expression) (5).

Prognostický význam častých změn na chromozomu 1 podporuje jejich výskyt i v dalších typech nádorů, jako je např. 1q21 amplifikace v non-Hodgkinském lymfomu, Wilmsově nádoru, Ewingově sarkomu a u rakoviny prsu a vaječníků (5).

Závěr

Přestože je málo pravděpodobné, že bude UAMS klasifikace v blízké době využita v klinické praxi, může sloužit jako vhodný „orientační bod“ v klinických studiích, které srovnávají vysoce rizikové případy (1). Předpokládá se také vytvoření a ověření kvantitativní RT-PCR assay, která bude kombinovat geny spojené se stadiem/ rizikem a geny spojené s molekulárními subtypy/etiologií, odvozené z tohoto modelu. Hodnocení hladiny exprese těchto genů může sloužit jako jednoduchý, ale citlivý molekulárně-prognostický test. Test bude eliminovat potřebu hodnotit řadu v současnosti používaných standardních prognostických proměnných s limitovaným vlivem na přežití. Použití PCR metodiky umožňuje také dramatické snížení času a úsilí vynakládaného ve FISH analýzách a navíc i významné snížení množství materiálu potřebného pro analýzu (5).

Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

Literatura

1. Fonseca R.: Clinical and pathological implications form myeloma subtypes. In Haematologica. Vyd. Vol. 92(s2). Pavia (Italy) : Ferrata-Storti foundation, 2007. ISBN 0390-6078, s.4-5. 25.7.2007, Kos Island, Greece.
2. Carrasco D, Tonon G, Huang Y, et al. High-resolution genomic profiles define distinct clinicopathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. Cancer Cell. 2006;9:313-325.
3. Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem cell transplantation. Blood. 2006 Sep 1;108(5):1724-32.
4. www.medscape.com (Medscape Medical News 2007. © 2007 Medscape)
5. Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE et al.: A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. Blood. 2007 Mar 15;109(6):2276-84.
6. Zhan R, Juany Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gusta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, et al. The molecular classification of multiple myeloma. Blood. Sep 2006;15;108(6):2020-8. Epub 2006 May 25.