Aberácie chromozómu 11 u pacientky s akútnou myeloidnou leukémiou – kazuistika

RNDr. Andrea Blahová
Medirex, a. s., Bratislava

Úvod: Akútna myeloidná leukémia (AML) je fenotypovo a geneticky heterogénne klonálne ochorenie krvotvorných progenitorových buniek, pri ktorej dochádza k rýchlej a nekontrolovanej proliferácii patologickej bunkovej populácie. Bolo identifikovaných mnoho štruktúrových a numerických aberácií asociovaných s AML a mnohé z nich sú predikciou klinických znakov ochorenia a terapeutického výsledku. K častým nálezom patria prestavby *KMT2A* génu lokalizovaného na chromozóme 11 v oblasti q23.
Kazuistika: V prezentovanom prípade mladej pacientky s AML typu M2 sme v čase diagnózy cytogenetickou analýzou detegovali zriedkavú translokáciu t(11;17)(q23;q25).
Výsledky: Translokácia bola potvrdená aj metódou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH), pomocou celochromozómových sond. Pacientka neskôr podstúpila nepríbuzenskú alogénnu transplantáciu, po dvoch rokoch nastal relaps a k primárnej aberácii pribudla sekundárna – delécia dlhého ramena druhého chromozómu 11.
Diskusia: Prognóza pacientov s prestavbou *KMT2* génu je rôzna, závisí od translokačného partnera. Translokácia t(11;17)(q23;q25) sa spája so zlou prognózou. V literatúre sú opísané rôzne sekundárne aberácie, avšak delécia druhého chromozómu 11, a teda neprítomnosť žiadneho funkčného *KMT2* génu opísaná nebola.
Záver: Cytogenetická analýza zohráva dôležitú úlohu v diagnostike hematologických malignít. V kombinácii s FISH analýzou a molekulovou metódou sa metódy navzájom dopĺňajú, umožňujú detegovať široké spektrum aberácií a majú dôležitú úlohu v stanovení prognózy, klasifikácii a manažmente pacienta.

Kľúčové slová: AML, *KMT2* gén, translokácia, cytogenetika, FISH, molekulová analýza

Aberrations of chromosome 11 in patient with acute myeloid leukemia – case report

Introduction: Acute leukemia is phenotypically and genetically heterogenous clonal disease of hematopoietic stem cells which is characterized by the rapid growth and uncontrolled proliferation of patological cell population. Many recurrent structural and numerical abnormalities associated with AML have been identified and many of them are predictive of clinical features and therapeutic outcome. Recurrent genetic alterations are rearrangements of *KMT2A* gene that is localised at chromosome 11 band q23.
Case report: We report here a rare case of translocation t(11;17)(q23;q25) on cytogenetic level in young patient with AML type M2.
Results: The translocation was also confirmed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using whole chromosome painting probes. Patient underwent allogeneic stem cell transplantation, after two years relapsed and to primary aberration gained secondary one – deletion of long arms of the second chromosome 11.
Discussion: Prognosis for patient with aberration of *KMT2* gene varies and depends on a translocation partner. Translocation t(11;17)(q23q25) is connected with a poor prognosis. Variety of secondary aberrations are described in literature but none deletion of second chromosome 11 (consequently no functional *KMT2* gene present).
Conclusion: Cytogenetic analysis plays important role in diagnostic of hematological malignancy. In combination with FISH and molecular methods complement each other and thus allow detection of wide spectrum of aberration. Cytogenetic analysis has still an important role in prediction of prognosis, classification and patient management.

Key words: AML, *KMT2A* gene, translocation, cytogenetics, FISH, molecular analyse

Newslab, 2016; roč. 7(2): 117–120

Úvod

Akútne myeloidné leukémie (AML) predstavujú heterogénnu skupinu malígnych ochorení charakterizovaných nekontrolovanou proliferáciou a akumuláciou nezrelých hematopoetických buniek v kostnej dreni (KD) a následným vyplavovaním do periférnej krvi (PK). Dochádza ku klonálnej expanzii myeloblastov, ktoré tvoria ≥ 20 % buniek v kostnej dreni alebo v periférnej krvi. AML predstavuje 2 – 4 % všetkých malígnych nádorov a incidencia ochorenia je 2 – 3 prípady na 100 000 obyvateľov/rok. AML sa vyskytuje sa vo všetkých vekových skupinách, avšak s vekom výskyt ochorenia stúpa a incidencia nad 65 rokov je 12 – 15 prípadov na 100 000 obyvateľov a je mierne vyššia u mužov ako u žien (1).

Dôležitými determinantmi AML sú cytogenetické zmeny. V čase diagnózy sa vyskytujú klonálne chromozómové aberácie približne u 50 až 60 % pacientov. Pacientov môžeme na základe klinických a genetických znakov rozdeliť do troch prognostických skupín (2):

Obrázok 1. Translokácia t(11;17)(q23;q25)

- **s priaznivou prognózou** – t(8;21), t(15;17), inv(16),
- **so strednou prognózou** – normálny karyotyp, t(9;11), del(11q), del(7q), del(9q), del(20q), +8,+11,+13,+21,
- **s nepriaznivou prognózou** – komplexný karyotyp, prestavby 11q23, inv(3)/t(3;3).

Častým cieľom prestavieb v hematologických malignitách je gén *KMT2A* (starší názov *MLL*) lokalizovaný na chromozóme 11 v oblasti 11q23. Je to protoonkogén s dĺžkou 89 kb, pozostávajúci z 36 exónov. Kóduje jadrový proteín s 430 kDa, ktorý má dôležitú úlohu v regulácii transkripcie *HOX* génov, ktoré participujú na kontrole embryonálneho vývoja a na diferenciácii hematopoetických buniek (3, 4).

Reciproké translokácie predstavujú najčastejšiu formu prestavby *KMT2A* génu u pacientov s AML. 11q23 lokus je vysoko promiskuitný a v súčasnosti je identifikovaných viac ako 70 rôznych fúznych partnerov, s ktorými sa vyskytuje v prestavbe. Fúzny gén vzniká fúziou 5´-konca *KMT2A* génu a 3´-konca partnerského génu. Výsledný fúzny proteín spôsobuje zmenu fyziologických vlastností MLL proteínu, čo má za následok leukemickú transformáciu prekurzorových hematopoetických buniek (5). Prognóza translokácie závisí od fúzneho partnera, avšak pri väčšine prestavieb je nepriaznivá (4, 6).

Delécie dlhého ramena chromozómu 11 patria k zriedkavejším cytogenetickým zmenám (~ 1 %) a predstavujú intermediárnu prognózu. Dochádza k nim v rôznych oblastiach, ale všetkým pacientom chýba *KMT2A* gén.

K ďalším, zriedkavo detegovaným prestavbám *KMT2A* génu, patria nebalansované translokácie, adície, duplikácie, amplifikácie, inverzie a inzercie (7).

Kazuistika

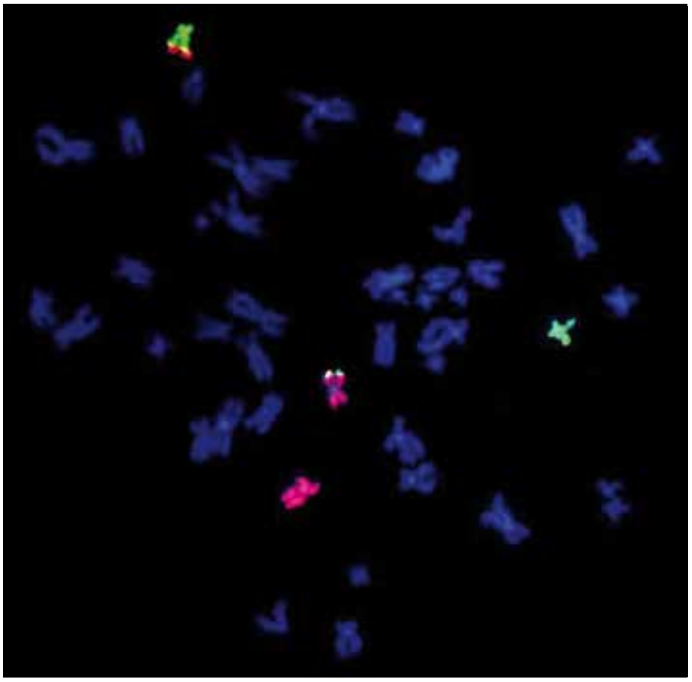
Predstavujeme zaujímavý prípad mladej 34-ročnej pacientky, ktorej bola v júni 2014 stanovená diagnóza AML-M2 podľa FAB klasifikácie. V čase diagnózy mala pacientka v KD prítomných 85 % blastov a zo vzorky KD sme uskutočnili vstupné genetické vyšetrenie.

Výsledky

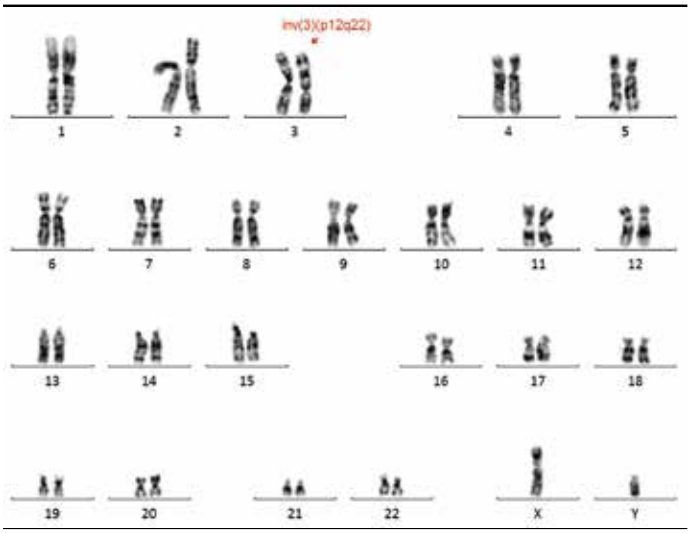
Cytogenetické a FISH vyšetrenie

Cytogenetickou analýzou metafáz pripravených 24-hodinovou kultiváciou buniek KD sme odhalili drobnú translokáciu t(11;17)(q23;q25) (obrázok 1) a stanovili karyotyp 46,XX,t(11;17)(q23;q25). Translokáciu sme potvrdili aj použitím celochromozómových sond 11a 17 (obrázok 2) a zároveň sme pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) potvrdili aj prestavbu *KMT2A* génu v 88 % vyšetrených interfázových jadrách za použitia sondy XL MLL plus (Metasystems).

Obrázok 2. Potvrdenie translokácie FISH analýzou za použitia celochromozómových sond – 11 (zelená farba) a 17 (červená farba)

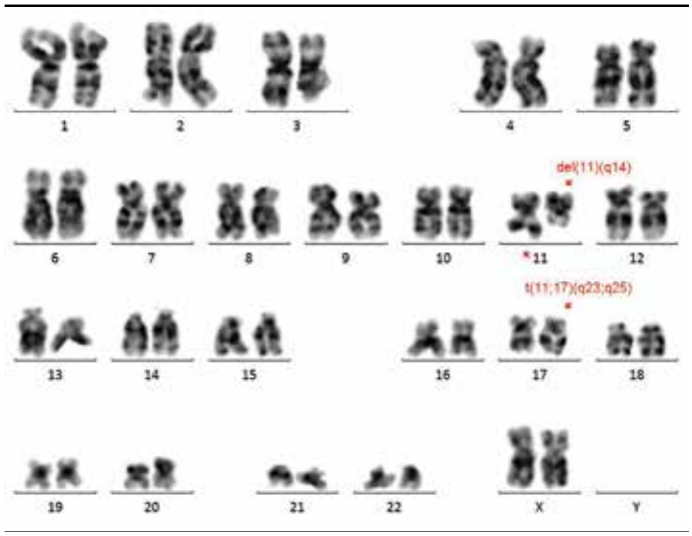


Obrázok 3. Karyotyp pacientky po transplantácii //46,XY,inv(3)(p12q22)

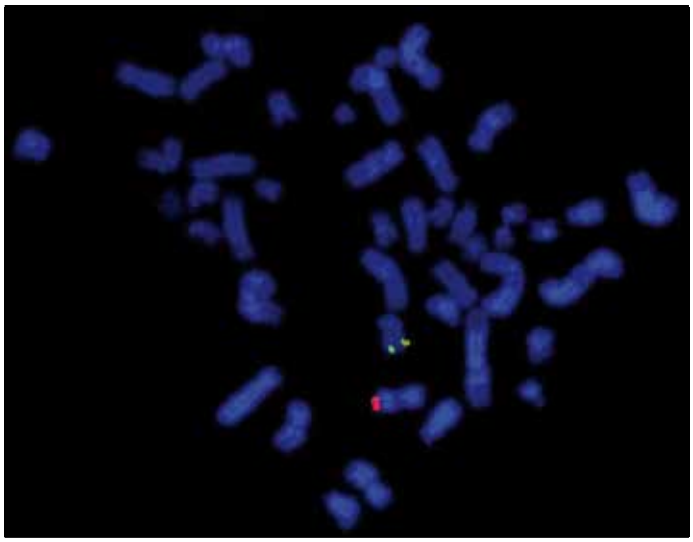


Tri mesiace po stanovení diagnózy (9/2014) a dosiahnutí remisie podstúpila pacientka nepríbuzenskú alogénnu transplantáciu krvotvorných buniek (TKB). Darcom bol muž, ktorý bol nositeľom fyziologickej pericentrickej inverzie chromozómu 3 (obrázok 3). Počas nasledujúceho roka chodila pacientka na pravidelné kontrolné vyšetrenia, ktoré boli negatívne. Až vyšetrenie z januára 2016 odhalilo relaps ochorenia a k primárnej cytogenetickej zmene – translokácii t(11;17)(q23;q25), pribudla sekundárna zmena – delécia dlhého ramena druhého chromozómu 11-del(11)(q14)

Obrázok 4. Karyotyp pacientky v čase relapsu ochorenia 46,XX,del(11)(q14),t(11;17)(q23;q25). (Okrem translokácie je prítomná aj delécia dlhého ramena druhého chromozómu 11.)



Obrázok 5. FISH analýza použitím dual color sondy XL MLL plus (Metasystems). (Je prítomný len jeden červený a jeden zelený signál v prestavbe. Ďalšie signály nie sú kvôli delécii 11q14 prítomné.)



(obrázok 4). Sondou XL MLL plus (Metasystems) sme potvrdili prítomnosť len jedného *KMT2A* génu v prestavbe, druhý signál v dôsledku delécie chýbal (obrázok 5). Posledné vyšetrenia sme uskutočnili v marci 2016, keď sme na cytogenetickej úrovni detegovali len metafázy donora, avšak na FISH úrovni bola ešte v 23 % prítomná prestavba *KMT2A* génu.

Molekulová analýza

Na molekulovej úrovni sme v čase diagnózy uskutočnili multiplexovú analýzu PCR AMLplex (Mentype), ktorá umožňuje analýzu 11 základných fúznych transkriptov pri AML (*AML1-ETO, BCR-ABL, CALM-AF10, CBFB-MYH11, DEK-CAN, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-PTD, NPM1-MLF1, PML-RARA*) s 31 transkripčnými variantmi. Výsledok bol negatívny, nebola dokázaná žiadna zo spomenutých translokácií. V čase diagnózy a počas kontrol sa analyzoval aj *WT1* gén, ktorého nadexpresia bola pozorovaná u 90 % pacientov s AML. V leukocytoch kostnej drene zdravých jedincov sa hladina expresie *WT1* génu pohybuje rádovo 10^{-2} NCN (normalizovaný počet kópií). V čase diagnózy a počas relapsu sme vo vzorkách KD pacientky zaznamenali zvýšenú hladinu expresie *WT1* génu, ktorá koreluje s klinickým priebehom ochorenia (8). Výsledky všetkých vyšetrení sú zhrnuté v tabuľke 1.

Chimérizmus – monitorovanie stavu krvotvorby po transplantácii krvotvorných buniek

Pacientka podstúpila v septembri 2014 alogénnu nepríbuzenskú transplantáciu krvotvorných buniek a v súčasnosti je 611 dní po transplantácii. Chimérizmus bol na molekulovej úrovni v pravidelných intervaloch monitorovaný (Mentype). V 12/2014 bola potvrdená 100 % krvotvorba darcu (kompletný chimérizmus). Tá však bola postupne, ako je uvedené v grafe 1, vytláčaná hematopoézou pacientky (zmiešaný chimérizmus). Percentuálne zastúpenia krvotvorby darcu a recipienta – pacientky, v kostnej dreni (KD) a periférnej krvi (PK) sú z druhého roku po transplantácii.

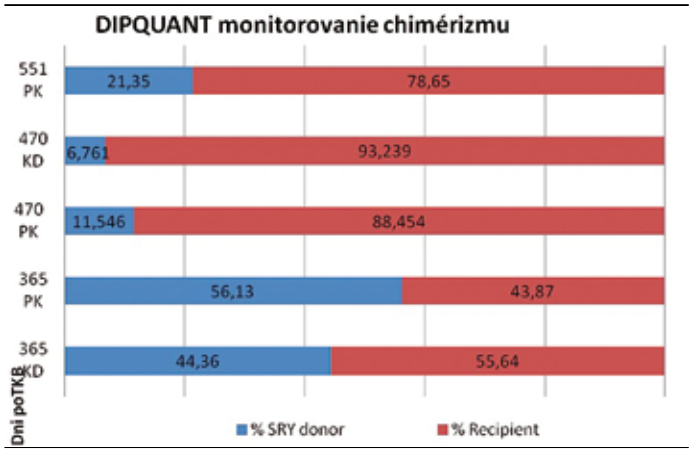
Diskusia

Približne 10 % všetkých leukémií a 3 – 4 % všetkých AML prípadov má prestavbu *KMT2A* génu, ktorá sa častejšie vyskytuje u mladších pacientov s AML *de novo* ako u starších pacientov, čo sa potvrdilo aj u našej pacientky (3). Prognóza pacientov s translokáciou je rôzna, závisí od translokačného partnera. Dodnes bolo klonovaných a charakterizova-

Tabuľka 1. Zhrnutie výsledkov genetických vyšetrení

Dátum	Cytogenetické vyšetrenie	FISH vyšetrenie	Molekulová analýza
Jún 2014 Čas diagnózy	46,XX,t(11;17)(q23;q25)	88 % prestavba *MLL* génu	*WT1* pozitívny (NCN = 0,965) AML plex negatívny
Júl 2014	46,XX	2 % prestavba *MLL* génu	*WT1* negatívny
Október 2014 Po nepríbuzenskej TKB	//46,XY,inv(3)(p12q22)	*MLL* gén negatívny XY 100 %	*WT1* negatívny
September 2015	//46,XY,inv(3)(p12q22)	*MLL* gén negatívny XY 100 %	–
Január 2016 Relaps ochorenia	46,XX,del(11)(q14),t(11;17)(q23;q25) [7]//46,XY,inv(3)(p12q22)[13]	43 % prestavba *MLL* génu XX 33 % // 67 % XY	–
Marec 2016	//46,XY,inv(3)(p12q22)	23 % prestavba *MLL* génu	*WT1* pozitívny (NCN = 0,29)

Graf 1. Zastúpenie krvotvorby v KD a PK uvedené v percentách



ných na molekulovej úrovni viac ako 70 rôznych partnerských génov a nové sú stále objavované a opisované (9). K najčastejšie vyskytujúcim sa translokáciám patria t(11;19)(q23;p13), t(9;11)(22;q23) a t(10;11)(p12;q23). Translokácie s lokusom 11q23 patria do nepriaznivej prognostickej skupiny okrem t(9;11)(p22;q23), ktorá má signifikantne dlhšie prežívanie a spája sa so strednou prognózou. V našej práci opisujeme zriedkavú translokáciu t(11;17)(q23;q25) detegovanú na cytogenetickej úrovni v čase diagnózy. Translokácie sa zúčastňuje z chromozómu 11 gén *KMT2A* a z chromozómu 17 pravdepodobne gén *SEPT9*. Gén *SEPT9* je členom septínovej rodiny, ktorú tvorí 5 génov. Septíny sú GTP-viažuce proteíny a majú dôležitú úlohu v procesoch bunkového delenia a zachovania bunkovej integrity. Translokácia t(11;17)(q23;q25) bola okrem pacientov s AML opísaná aj u pacientov so sekundárnou AML, akútnou lymfoblastovou leukémiou (ALL) a veľmi zriedkavo u pacientov s myelodysplastickým syndrómom (MDS) a ako väčšina prestavieb s *KMT2A* je spojená so zlou prognózou (10). Chen et al. (11) vo svojej práci uvádzajú ako najčastejšie sa vyskytujúce sekundárne aberácie k prestavbe *KMT2A* génu deléciu chromozómov 5, 7, komplexný karyotyp a trizómiu chromozómu 8. Deléciu chromozómu 11, akú sme detegovali u našej pacientky, nezaznamenali. Strata funkcie oboch génov *KMT2A* súčasne je veľmi ojedinelý jav a zatiaľ nie sú žiadne literárne údaje o výskyte a prognóze.

Záver

Cytogenetická analýza je nenahraditeľnou súčasťou vyšetrovacích metód v diagnostike hematologických malignít. Umožňuje získať celkový karyotypový obraz pacienta a odhaliť aj rôzne štruktúrové a numerické aberácie, ktoré sú inými metódami nedetegovateľné. Umožňuje ich sledovať v čase diagnózy, počas liečby alebo relapsu. S FISH analýzou a molekulovou metódou sa navzájom dopĺňajú, spolu umožňujú detegovať široké spektrum aberácií a majú dôležitú úlohu v stanovení prognózy, klasifikácii a manažmente pacienta. Prognóza našej pacientky je vzhľadom na danú translokáciu a neprítomnosť ani jedného „zdravého" a neporušeného *KMT2A* génu veľmi nepriaznivá. Pacientka je v súčasnosti v zlom stave, rezistentná na chemoterapiu, vo floridnej fáze ochorenia.

Poďakovanie: *Ďakujem všetkým kolegom, ktorí sa podieľali na príprave a vyšetrovaní vzoriek pacientky na cytogenetickej, FISH a molekulovej úrovni počas uplynulých dvoch rokov.*

Literatúra

1. Doubek M, Mayer J. Akútní myeloidní leukemie. In: Pospíšilová Š, Dvořáková D, Mayer J, et al. *Molekulární hematologie.* Praha, Czech Republic: Galén; 2013: 209–224.
2. Yohe S. Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med.* 2015;460–478.
3. Ilencikova D, Kolenova A. MLL Gene Alterations in Acute Myeloid Leukaemia (11q23/MLL+ AML), Oncogene and Cancer – From Bench to Clinic [online]. Dr. Yahwardiah Siregar, ed. *InTech.* 2013. DOI: 10.5772/55141. Available from: <http://www.intechopen.com/books/oncogene-and-cancer-from-bench-to-clinic/mll-gene-alterations-in-acute-myeloid-leukaemia-11q23-mll-aml>.
4. Launay E, Henry C, Meyer C, et al. MLL-SEPT5 fusion transcript in infant acute myeliod leukemia with t(11;22)(q23;q11). *Leukemia & Lymphoma.* 2014;55(3):662–667.
5. Mejstříková S, Dvořáková D. Akútní myeloidní leukémie s abnormalitami genu MLL. In: Pospíšilová Š, Dvořáková D, Mayer J, et al. *Molekulární hematologie.* Praha, Czech Republic: Galén; 2013: 220.
6. Saito H, Otsubo K, Kakimoto A, et al. Emergence of two unrelated clones in acute myeloid leukemia with MLL-SEPT9 fusion transcript. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;201:111–115.
7. Zhao X, Li S, Li N, et al. 11q23 abnormalities in adult Chinese patients with hematological malignancies. *Med Oncol.* 2014;31:115.
8. Ilenčíková D, Sýkora J, Mikulášová Z, et al. Identifikácia molekulárnych markerov u detí s akútnou myeloblastovou leukémiou (AML). *Klin Onkol.* 2015;25(1):26–35.
9. Zhang Y, Chen A, Yan X-M, et a. Disordered epigenetic regulation in MLL-related leukemia. *Int J Hematol.* 2012;96(4):428–37.
10. Lee SG, Park TS, Seung HO, et al. De novo Acue Myeloid Leukemia Associated with t(11;17)(q23;q25) and MLL-SEPT9 Rearrangement in an Elderly Patient: A Case Study and Review of the Literature. *Acta Haematol.* 2011;126:195–198.
11. Chen Y, Kantarjian H, Pierce S, et al. Prognostic significance of 11q23 aberrations in adult acute myeloid leukemia and the role of allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2013;27:836–842.

RNDr. Andrea Blahová
Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
andrea.blahova@medirex.sk