

Diferenciálna molekulová diagnostika mnohopočetného myelómu a Waldenströmovej makroglobulinémie

Mgr. Lucia Tatayová¹, prof. MUDr. Beata Mladosičová, CSc.², RNDr. Renata Lukačková¹

¹Medirex, a. s., Bratislava

²Oddelenie klinickej patofyziológie LF UK, Bratislava

Mnohopočetný myelóm (MM) je lymfoproliferatívne ochorenie zasahujúce plazmatické B-lymfocyty. Je zaradený medzi monoklonálne gamapatie, pretože medzi jeho hlavné príznaky patrí produkcia monoklonálnych protilátok, ktoré značne znižujú variabilitu imunitného systému. Charakteristické symptómy tiež zahŕňajú osteolytické lézie, najmä v oblasti axiálneho skeletu, hyperkalciémiu a postupné zlyhávanie renálneho systému. Priebeh ochorenia je variabilný, môže sa začať ako indolentná monoklonálna gamapatia nejasného významu (MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance), ktorá sa postupne transformuje do plne rozvinutého patologického stavu. Podobnou hematoonkologickou malignitou je Waldenströmova makroglobulinémia (WM), ktorá tiež patrí medzi monoklonálne gamapatie a tvorí podskupinu non-Hodgkinových lymfómov. Symptómy a výsledky laboratórných vyšetrení sú v oboch prípadoch takmer identické. Pre začatie vhodnej liečby je nevyhnutná diferenciálna diagnostika na molekulovej úrovni.

KLúčové slová: mnohopočetný myelóm, Waldenströmova makroglobulinémia, diferenciálna diagnostika

Differential molecular diagnostics of multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia

Multiple myeloma (MM) is a lymphoproliferative disease affecting plasma B-cells. It ranks to monoclonal gammopathies with the typical presence of monoclonal antibodies which significantly reduce the variability of the immune system. Typical symptoms also include osteolytic bone lesions mainly in the axial skeleton, hypercalcemia and progressive renal failure. The approach to the disease is variable, may start as indolent monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), which progresses into fully developed condition. Similar hemato-oncological malignity is Waldenström's macroglobulinemia (WM). As well as MM, WM is also monoclonal gammopathy and is one of the subtypes of non-Hodgkin's lymphomas. Symptoms and results of laboratory examinations are relatively similar in both cases. For initiation of appropriate the treatment differential diagnostic at a molecular level is needed.

Keywords: multiple myeloma, Waldenström's macroglobulinemia, differential diagnostic

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 34 – 37

Úvod

Mnohopočetný myelóm (MM) patrí medzi hematoonkologické ochorenia plazmatických B-buniek. Vo väčšine prípadov prevláda výskyt nádorových buniek typu zrelých plazmocytov s nízkou proliferačnou aktivitou. Lokalizácia uvedených patologických foriem je striktne viazaná na mikroprostredie kostnej drene, kde prebieha ich proliferácia a diferenciácia⁽¹⁾. MM sa radí do skupiny monoklonálnych gamapatií, pretože jedným z jeho základných znakov je produkcia monoklonálnych protilátok. Za fyziologických podmienok sa v sére zdravého jedinca vyskytujú polyklonálne imunoglobulíny, ktoré sú schopné podliehať rekombináciám a vytvárať tak široké spektrum väzbových miest pre rôzne antigény. Pri monoklonálnych gamapatiách vrátane MM dochádza v organizme k produkcii jedného antigénne i štruktúrne konzistentného antigénu, prípadne jeho fragmentu, čím je značne znížená efektívnosť imunitného systému. Monoklonálne imunoglobulíny postupne infiltrujú kostnú dreň, kde nahrádzajú funkčné plazmocyty⁽²⁾.

Patogenéza MM

MM prebieha ako viacúrovňový proces, ktorý sa začína ako premaligné štádium, resp. monoklonálna gamapatia nejasného významu (MGUS) s variabilnou dĺžkou trvania. Od plne rozvinutého patologického stavu sa líši nižšou hodnotou paraproteínu M, kostná dreň obsahuje menej ako 10 % mononukleárných buniek a nie sú prítomné ďalšie symptómy a poškodenia orgánov⁽³⁾. „Smoldering“ myelóm (SMM) je heterogénna prechodná forma medzi MGUS a plne rozvinutým ochorením. Odlíšenie SMM a MGUS je možné len na základe hodnotenia laboratórných výsledkov. Hlavným diferenciálnym faktorom je prítomnosť vyššej hladiny paraproteínu (nad 30 g/l) a plazmatických buniek (nad 10 %) v kostnej dreni, ale zároveň nesmú byť u pacienta prítomné žiadne ďalšie príznaky ako hyperkalciémia, poškodenie obličiek alebo anémia⁽⁴⁾. Dôsledkom progresie nádorovej masy je tiež potlačenie hostiteľskej imunity, preto počas transformácie SMM na myelóm dochádza k vzniku prídavných deficiencií celulórných aj humorálnych zložiek imunity. Nastáva postupné

zhoršenie orgánových funkcií s možnosťou rozšírenia tumorových buniek do extramedulárnych oblastí, najčastejšie do pečene a sleziny⁽⁵⁾.

Molekulová cytogenetika MM

Ako primárne mutácie sa pri MM označujú translokácie zahŕňajúce lokus pre ťažký (*IgH*) imunoglobulínový reťazec alebo jeden z lokusov pre ľahký Ig reťazec (*IgL* – kappa/lambda).

Uvedené mutácie sú prítomné u viac ako polovice pacientov. Vznikajú ako dôsledok nesprávnej „cross-switch“ rekombinácie a somatickej hypermutácie protilátok. *IgH* translokácie zahŕňajú pri MM tri cieľové skupiny onkogénov, uvedené v *tabuľke 1*. Zvyčajne ide o vyvážené translokácie, počas ktorých sa onkogény dostanú pod kontrolu silného Ig intrónového enhanceru Emu a/alebo *IgH* alfa⁽⁶⁾. V rámci sekundárnych aberácií dochádza pri MM najčastejšie k mutáciám zahŕňajúcim chromozómy 1, 13, 17 a výnimkou nie sú ani translokácie chromozómov 4, 11 a 14. Tumory plazmatických buniek s t(11;14)(q13;q32) sú pri MM a MGUS asociované s nadprodukciami cyklínu D1 (*CCND1*), ale paradoxne sú pri zavedení vhodnej liečby spojené s dlhším prežívaním pacientov⁽⁷⁾.

Waldenströмова makroglobulinémia a gén *MYD88*

Waldenströмова makroglobulinémia (WM) je lymfoproliferatívne ochorenie B-lymfocytov a zároveň jeden z podtypov non-Hodgkinových lymfómov. Primárnou črtou je infiltrácia kostnej drene patologickými plazmocytárnymi bunkami a prítomnosť Ig monoklonálnej gamapatie. K najčastejším sprievodným javom patrí anémia, hyperviskóznny syndróm, hepatosplenomegália či lymfadenopatie. Histologická transformácia buniek býva príčinou progresie ochorenia do štádia difúznej B-bunkovej leukémie (DLBCL), keď dochádza ku komplexnému zhoršeniu symptómov s extramedulárnym postihnutím⁽⁸⁾. Kandidátnym génom pri WM je *MYD88* (myeloid differentiation primary response 88) lokalizovaný na chromozóme 3p22. Kóduje 31 – 33 kDa adaptorový proteín, ktorý obsahuje N-terminálnu „death“ doménu (DD) a C-terminálnu TIR doménu (Toll/interleukín-1 receptor). Funkciou proteínu je ukotvenie signálnych molekúl na TIR doménu a na receptory pre interferón- γ (IFN- γ) na zabezpečenie správneho fungovania vrodenných imunitných reakcií. Deregulácia génu *MYD88* má v prevažnej väčšine prípadov negatívny dôsledok na signálne dráhy NF- κ B, PI3K/Akt/mTOR či JAK/STAT⁽⁹⁾.

Tabuľka 1. Cieľové skupiny onkogénov pri MM (reprodukované podľa Chesi M, Bergsagel PL, 2011)

skupiny cieľových onkogénov		lokalizácia	výskyt
1. cyklín	CCND1	11q13	15 %
	CCND2	12p13	<1 %
	CCND3	6p21	2 %
2. MAF	MAF	16q23	5 %
	MAFA	20q12	2 %
	MAFB	8q24.3	<1 %
3. MMSET/FGFR3		4q16	15%

CCND – cyklín D; **MAF** – muskuloaponeurotický fibrosarkómový onkogénny homológ; **MMSET** – chromatin remodelačný faktor; **FGFR** – receptor fibroblastového rastového faktora

Somatická mutácia L265P

Somatický variant (T→C) v chromozómovej oblasti 3p22.2 je jednoznačným diagnostickým markerom WM. Mutácia zapríčiňuje aminokyselinovú zmenu leucínu za prolín (L265P) v géne *MYD88*, čoho následkom je abnormálne vysoká aktivita uvedených signálnych dráh. Výsledkom komplexného patologického procesu je tak malígna proliferácia a supresia apoptózy B-lymfocytov^(10,11).

Diferenciálna diagnostika monoklonálnych gamapatií

Potvrdenie diagnózy monoklonálnych gamapatií zahŕňa sériu biochemických vyšetrení, predovšetkým elektroforézu sérových bielkovín (SPEP) a elektroforézu bielkovín v moči (UPEP). Separácia na klasickej agaróze v kombinácii s imunofixáciou sa využíva ako skriningová metóda na detekciu prítomnosti M-proteínu a jeho ťažkých Ig reťazcov a determináciu ľahkých Ig reťazcov. Pretože uvedené metódy sú relatívne neinvasívne, je vhodné vykonať ich u všetkých pacientov. Pri UPEP je nevyhnutný 24-hodinový odber moču, pretože množstvo M-proteínu v ňom je nepriamym meradlom rozsahu tumorovej masy⁽¹²⁾. Metódy fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) sa rutinne využívajú na analýzu chromozómových aberácií, najčastejšie t(11,14), ktorá priamo súvisí so zvýšenou expresiou *CCND1* a je typická práve pre MM. Významným markerom monoklonálnych gamapatií sú tiež prestavby *IgH* lokusu a časté sú aj delécie 17p13 (*TP53*) a 13q14 (*RBI*). Na molekulovej úrovni možno potvrdiť prítomnosť najfrekvencovanejších genomických delécií a duplikácií metódou MLPA (multiple ligation-dependent probe amplification). Využitím kvantitatívnej real-time PCR možno sledovať hladinu exprese *CCND1*, ktorá u pacientov koreluje s mierou liečebnej odpovede.

Problémom v rutinej praxi je skutočnosť, že výsledky uvedených laboratórných testov sú pri WM a MM do značnej miery rovnaké, čo môže viesť k nepresnej diagnostike daného ochorenia, a tým aj k podaniu nešpecifickej liečby. U pacientov s MM sa využíva kombinácia cytostatík a kortikosteroidov, prípadne imunomodulačné látky. Medzi najnovšie liečivá z oblasti cielej terapie MM patrí talidomid, inhibitory VEGF (vascular endothelial growth factor) alebo proteazómové inhibitory⁽¹³⁾. U pacientov s WM je pomerne častý výskyt neuropatií a hemolytickej anémie. V danom prípade je prvou voľbou rituximab, ktorý zabezpečuje elimináciu malígnych B-lymfocytov prezentujúcich povrchový antigén CD20. Pri progresii ochorenia sa využíva trojkombinácia DRC (dexametazón, rituximab, cyklofosfamid)⁽¹⁴⁾. Pre aplikáciu vhodného liečebného algoritmu je teda nevyhnutná spoľahlivá diferenciálna diagnostika, ktorou možno odlišiť uvedené monoklonálne gamapatie na molekulovej úrovni.

Materiál a metodika

Vzorky

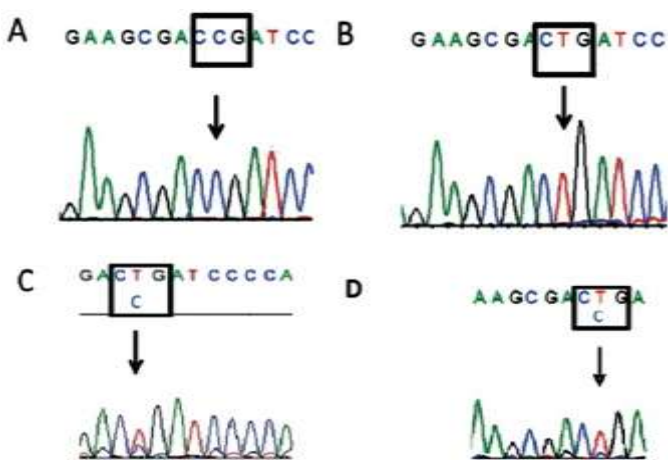
Do súboru pacientov s podozrením na Waldenströmovu makroglobulinémiu boli zahrnuté vzorky kostnej drene spracované na oddelení lekárskej genetiky v Medirexe, a. s., v časovom rozmedzí od októbra 2015 do marca 2016. Súbor bol zostavený z 29 vzoriek. DNA na analýzy bola izolovaná kitom QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) podľa priloženého protokolu. Koncentrácia a kvalita vzoriek bola

meraná na Implen nanofotometri (Implen GmbH, Munchen, Germany). Ako negatívne kontroly boli použité vzorky od pacientov bez onkologických diagnóz.

Alelovo špecifická PCR (AS-PCR)

Pri optimalizácii vhodnej AS-PCR boli použité komerčne dostupné primery od firmy Sigma-Aldrich pre wild-type a mutovaný typ alel. Reakčné mixy boli pripravené s viacerými druhmi polymeráz vrátane Pfu Turbo Cx Hotstart, AmpliTaq Gold a Phu. Ideálny priebeh reakcie bol dosiahnutý iba v prípade poslednej Phu polymerázy. Genomická DNA bola nariadená na 10 ng a teplotný program bol nastavený podľa článku Varettoni et al., 2013⁽¹²⁾. Veľkosť získaných PCR produktov bola približne 300 bp.

Obrázok 1. Genotypy WM



A) mutovaný typ alely, tranzícia T > C; B) Wt typ alely – bez tranzície T > C; C) D) – heterozygotný typ alel

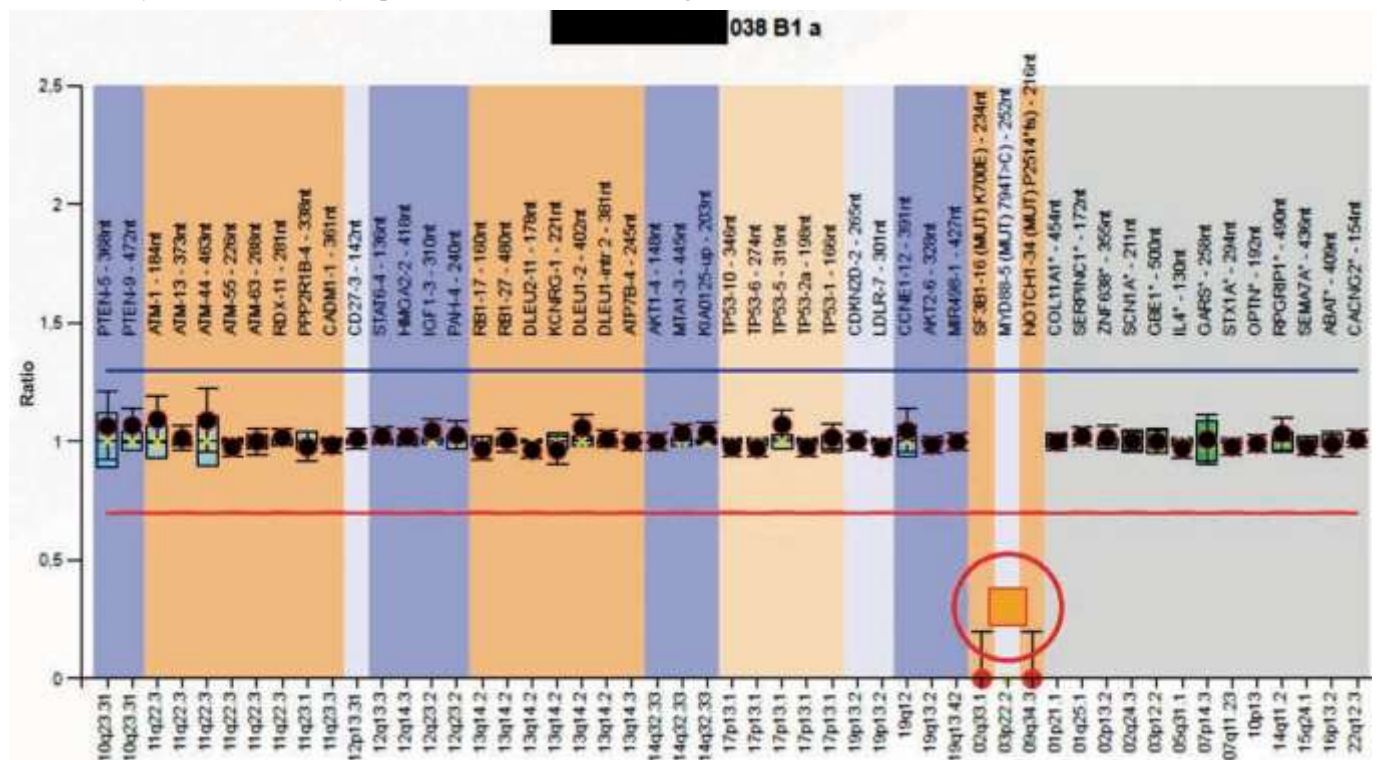
Sekvenovanie a MLPA analýza

Získané PCR produkty boli enzymaticky purifikované pomocou Exo Sap (Applied Biosystems, Foster City, USA), ktorý zo zmesi odstráni nezainkorporované primery a dNTP. Na prípravu sekvenačnej reakcie bol použitý BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) a na finálnu purifikáciu DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden, Germany) so živicovými kolónkami. Vzorky sme sekvenovali na genetickom analyzátoře ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, USA) a vyhodnotili pomocou softvéru SeqScape. Výsledky sme overili vložení sekvencií do BLAST-u a tiež pomocou MLPA analýzy (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands). Použitý probemix SALA MLPA P038 B1 obsahuje 51 špecifických prôb pre B-bunkové aberácie vrátane somatickej mutácie L265P v géne MYD88.

Výsledky

Kombináciou komerčne dostupných primerov, Phu polymerázy a protokolu podľa Varettoni et al., 2013 sme zostavili vhodnú AS-PCR, ktorej produkty možno použiť na ďalšie sekvenovanie a detekciu mutácie v géne MYD88. V našom súbore analyzovaných pacientov sme pozitívitu výsledkov hodnotili na základe zámény tymínu za cytozín na 978 nukleotide (obrázok 1). Získané výsledky sme potvrdili aj MLPA analýzou (obrázok 2). Uvedenými metódami sa nám podarilo zostaviť diagnostický algoritmus vhodný na detekciu pacientov s WM a odlišiť ich tak od ostatných prípadov MM či iných monoklonálnych gamapatií. Počas analýzy pacientov sme detegovali aj ďalších 11 polymorfizmov v géne MYD88, ktoré však nemali žiadny fenotypový prejav.

Obrázok 2. Výsledok MLPA analýzy, prítomnosť mutácie L265P v géne MYD88



Diskusia

Waldenströmova makroglobulinémia rovnako ako myelóm patrí medzi lymfoproliferatívne ochorenia B-buniek s výskytom monoklonálnych protilátok. Keďže je pomerne ťažké odlíšiť MM od WM na základe klinického obrazu a výsledkov laboratórných testov, bolo naším cieľom zaviesť do rutínnej diagnostiky molekulovú metódu, ktorá by spoľahlivo identifikovala konkrétny typ ochorenia. Publikácie z posledných rokov uvádzajú somatickú mutáciu L265P v géne *MYD88* ako diagnostický marker jedinečný pre WM, pretože pri MM sa nenachádza. WM je relatívne zriedkavé ochorenie v rámci hematologických malignít. Globálne je zaznamenaných približne 5 pacientov na 1 milión prípadov. Počas diagnostiky nových pacientov sme zaznamenali častý výskyt bodových

polymorfizmov, najmä 2856 A > R. Vo väčšine prípadov však išlo o silent mutácie a v žiadnom z prípadov sme nedetegovali fenotypový prejav.

Záver

Molekulové metódy majú v laboratórnej praxi nezastupiteľný význam, pretože prispievajú k presnej a relatívne rýchlejšej diagnostike mnohých ochorení. Pomocou vhodne zvoleného algoritmu je možný spoľahlivý manažment pacientov či samotné sledovanie liečebnej odpovede.

Pod'akovanie

Tento článok vznikol vďaka podpore projektu VEGA 1/0906/14.

LITERATÚRA

- Boyle EM, Davies FE, Leleu X, et al. Understanding the multiple biological aspect leading to myeloma. *Haematologica* 2014; 99(4): 605-612.
- Matsui W, Wang Q, Barber JP, et al. Clonogenic Multiple Myeloma Progenitors, Stem Cell Properties, and Drug Resistance. *Cancer Res* 2008; 68(1): 190-197.
- Chesi M, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int J Hematol* 2013; 97: 313-323.
- Korde N, Kristinsson SY, Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies. *Blood* 2011; 117(21): 5573-5581.
- Kristinsson SY, Goldin LR, Björkholm M, et al. Genetic and immune-related factors in the pathogenesis of lymphoproliferative and plasma cell malignancies. *Haematologica*, 2009 94: 1581-1589.
- Chesi M, Bergsagel PL. Many Multiple Myelomas: Making More of the Molecular Mayhem. *Hematology* 2011; 344-353.
- Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, et al. Multiple myeloma. *Lancet* 2009; 374: 324-329.
- Braggio E, Philipsborn C, Novak A, et al. Molecular Pathogenesis of Waldenström's Macroglobulinemia. *Haematologica* 2012; 97(9): 1281-1290.
- Olson A, Lee MS, Kissner TL, et al. Discovery of Small Molecule Inhibitors of MyD88-Dependent Signaling Pathways Using a Computational Screen. 2015; Online Available: www.nature.com/scientificreports.
- Treon SP, Hunter ZR. A New Era for Waldenström Macroglobulinemia: MYD88 L265P. *Blood* 2013; 121(22): 4434-4436.
- Hamadeh F, MacNamara SP, Aguilera NS, et al. *MYD88* L265P mutation analysis helps define nodal lymphoplasmacytic lymphoma. *Modern Pathology* 2015; 28: 564-574.
- Molle P. Current Trends in the Diagnosis, Therapy and Monitoring of the Monoclonal Gammopathies. *Clin Biochem Rev* 2009; 30: 93-103.
- Špička I, Bartůnková J, Campr V, et al. Mnohopočetný myelóm a ďalší monoklonální gamapatie. Praha: Galén 2005. 125p.
- Ansell SM, Kyle RA, Reeder CB, et al. Diagnosis and Management of Waldenström Macroglobulinemia: Mayo Stratification of Macroglobulinemia and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Guidelines. *Mayo Clin Proc* 2010; 85(9): 824-833.
- Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, et al. Prevalence and Clinical Significance of the MYD88 (L265P) Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia and Related Lymphoid Neoplasms. *Blood* 2013; 121(13): 2522-2528.



Mgr. Lucia Tatayová

Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16, Bratislava
e-mail: lucia.tatayova@medirex.sk