

Homogénne sa farbiace oblasti u pacientov s leukémiou (kazuistiky)

Andrea Blahová, Alexandra Oravcová, Kristína Lengyelová, Alena Žákovičová, Kristína Horváthová, Lucia Žideková, Renata Lukačková

Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

Úvod: Homogénne sa farbiace oblasti (hsr) podobne ako dmin predstavujú cytogeneticky viditeľný znak génovej amplifikácie. Je známe, že obsahujú kópie amplifikovaných DNA segmentov. Ich výskyt je častý v rôznych ľudských nádoroch, v hematologických malignitách ich však detegujeme zriedkavo. Ich úloha v leukemogéneze nie je jasná, sú však asociované s rýchlou progresiou ochorenia a krátkym prežívaním. Mechanizmus vzniku nie presne opísaný. Na cytogenetickej úrovni sa hsr deteguje ako veľká časť difúzne zafarbeného chromatinu včleneného do normálneho chromozómu.

Kazuistiky: Predstavujeme troch pacientov s de novo AML a MDS, ktorí boli v čase diagnózy vyšetrení na našom oddelení genetiky. U všetkých troch bola uskutočnená cytogenetická analýza, FISH a molekulová analýza metódou MLPA. Cytogenetická analýza G-prúžkovaných chromozómov po 24-hodinovej kultivácii buniek kostnej drene odhalila komplexný karyotyp s deléciou dlhého ramena chromozómu 5, prítomnosť hsr oblastí a mnohé ďalšie numerické a štruktúrne zmeny. FISH metóda pomohla odhaliť a špecifikovať aberácie a amplifikácie a stanoviť ich percentuálne zastúpenie.

Výsledky: Všetci prezentovaní pacienti majú spoločné znaky: starší vek, de novo ochorenie AML alebo MDS s komplexným karyotypom, ktorý obsahoval deléciu 5q oblasti, zlú prognózu a krátke prežívanie.

Kľúčové slová: homogénne sa farbiace oblasti, cytogenetická analýza, FISH, komplexný karyotyp

The homogeneously staining regions in patients with leukaemia (case reports)

Introduction: The homogeneously staining regions (hsr) just as the dmin represent cytogenetically visible signs of gene amplification. They contain copies of an amplified DNA segment. Although found in the variety of human cancer cells, their presence in hematologic malignancies is rare. Their role in leukemogenesis is not clear, but they have been reported to be associated with rapid progression and short survival time. The mechanism of their origination is not known exactly. Characteristically, hsr can be detected after chromosome banding in metaphase preparations as a large chunk of diffusely staining chromatin somewhere inside an ordinary chromosome.

Case reports: We report three patients with de novo AML and MDS who were examined by the cytogenetic analysis, FISH and MLPA method in our laboratory at the time of diagnosis. After 24-hour cultivation of bone marrow cells, the analysis of G-banded chromosomes revealed complex karyotype including deletion of the long arm of chromosome 5, the presence of hsr and other numerical and structural changes. The use of FISH method enabled the identification of chromosome aberrations and genes amplified in hsr and the determination of their percentage.

Results: All three patients shared the same characteristics: they were old, *de-novo* diagnosis AML or MDS with complex karyotype including deletion of 5q, bad prognosis and short survival time.

Keywords: homogeneously staining regions, cytogenetic analysis, FISH, complex karyotype

Newsrab, 2020; roč. 11 (1): 63 – 68

Úvod

Leukémia je malígne ochorenie krvotvorných buniek, pri ktorom dochádza k zmnoženiu a hromadeniu nezrelých foriem bielych krviniek a tie postupne obsadzujú priestory v kostnej dreni a potláčajú normálnu krvotvorbu. S leukémiou sa spájajú rôzne štruktúrne chromozómové zmeny, ako sú translokácie, delécie, inverzie, adície, alebo numerické zmeny, ako sú aneuploidie, polyploidie chromozómov⁽¹⁾. Zriedkavo sa však (~ 1 %) stretávame s cytogeneticky viditeľným znakom amplifikácie DNA. Toto mnohonásobné zmnoženie DNA sa môže vyskytovať extrachromozómovo ako tzv. double minute (dmin), malé párové chromatinové telieska bez centroméry alebo intrachromozómovo, známe ako homogénne sa farbiace oblasti (hsr- homogeneously staining region), keď je zmnoženie integrované do chromozómu (**obrázok 1**). Mechanizmus vzniku nie je úplne objasnený. Prvýkrát

boli opísané v roku 1962 u pacientov s bronchogénnym karcinómom⁽²⁾. Následkom amplifikácie DNA dochádza k zvýšenej expresii génov obsiahnutých v amplikóne, dochádza k modifikácii normálneho bunkového delenia a prežívania buniek. Zmnoženie má potenciálny leukemogénny účinok a je asociované s rýchlou progresiou ochorenia a krátkym časom prežívania. Najčastejšie amplifikovanými génmi sú *MYC*, *MYCN* (neuroblastóm), *HER2/neu* (nádory prsníka), *KMT2A*⁽³⁾.

Materiál a metódy

V článku predstavujeme troch pacientov, u ktorých sme cytogenetickou analýzou detegovali homogénne sa farbiace oblasti a pomocou FISH metódy sme odhalili ich pôvod.

Na cytogenetickú analýzu boli použité vzorky kostnej drene kultivované 24 hodín v kompletnom kultivačnom médiu

pri 37 °C a následne spracované podľa štandardných cytogenetických postupov. Preparáty boli farbené Wrightovým roztokom a u každého pacienta bolo hodnotených 20 G-prúžkových metafáz. Karyotyp bol zapísaný podľa International System of Chromosome Nomenclature (ISCN)⁽⁴⁾.

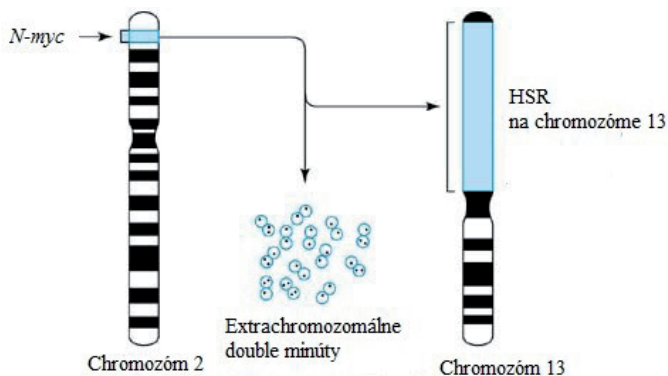
Na FISH analýzu boli použité suspenzie pripravené spojeným postupom. Boli použité nasledovné sondy od firmy Metasystems XL Del(5)(q31), XL 7q22/7q36, XL TP53/17cen, XCE 8 Blue, XL 22q11 IGL BA, XL 20q12/20qter, XL Iso(17q), XCE 12 Orange, XL MLL plus, sonda ZytoLight® SPEC BCL2 DC BA od Zytovision a sonda LSI 21 SO od firmy Abbott. Preparáty a sondy boli denaturované, následne prebehla hybridizácia a hodnotenie 200 interfázových jadier pod fluorescenčným mikroskopom.

Na molekulovej úrovni sa u pacientov po izolácii DNA z kostnej drene alebo periférnej krvi realizovala MLPA analýza pomocou kitu MDS P414-A1. Technika deteguje len numerické zmeny, delécie a amplifikácie. Obsahuje 46 sond pre niekoľko chromozómov, ktoré majú diagnostický alebo prognostický význam pre pacientov s myelodysplastickým syndrómom (MDS) (chromozómy 3, 5q, 7q, 8q, 11q, 12p, 17, 19, 20q, Y).

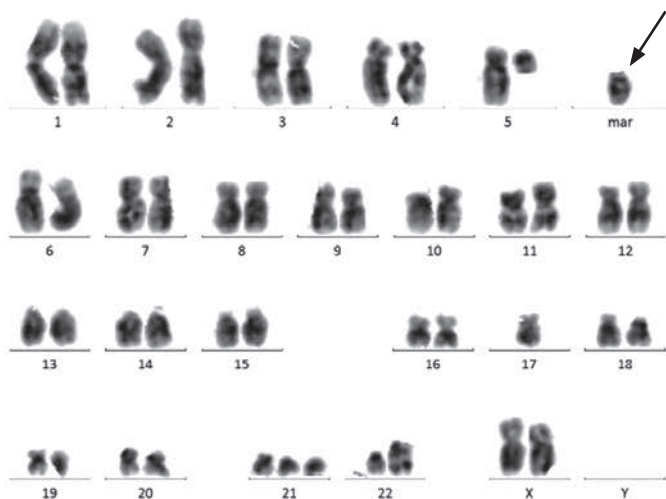
Kazuistika č. 1

V júni 2016 sme na naše oddelenie prijali vzorku kostnej drene 78-ročnej pacientky s diagnózou akútna myeloblastová leukémia (AML) bližšie neurčeného typu. Na cytogenetickej úrovni sme analyzovali 20 G-bandovaných metafáz

Obrázok 1. Vizualne formy amplifikácie DNA



Obrázok 2. Karyotyp pacientky, šípka naznačuje hsr(22)(q11)



a stanovili sme komplexný karyotyp (**obrázok 2**): 47,XX,-der(5)t(5;21)(p11;q21),-17,+21,der(22)t(17;22)(q21;q10),+hsr(22)(q11)[20].

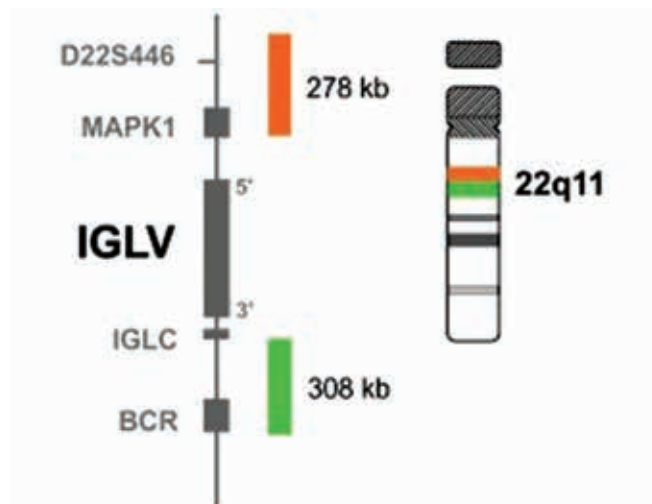
Na preparátoch sme uskutočnili aj FISH analýzu pomocou sond používaných pri diagnóze MDS a zachytili sme zmeny zhrnuté v **tabuľke 1**.

Vyšetrovanie IGL génu lokalizovaného na chromozóme 22 bolo uskutočnené pomocou sondy XL IGL BA z Metasystems (**obrázok 3**). Detegovali sme amplifikáciu len zelenej 3' oblasti (**obrázok 4**), v ktorej sa nachádza gén BCR. Napriek tomu, že

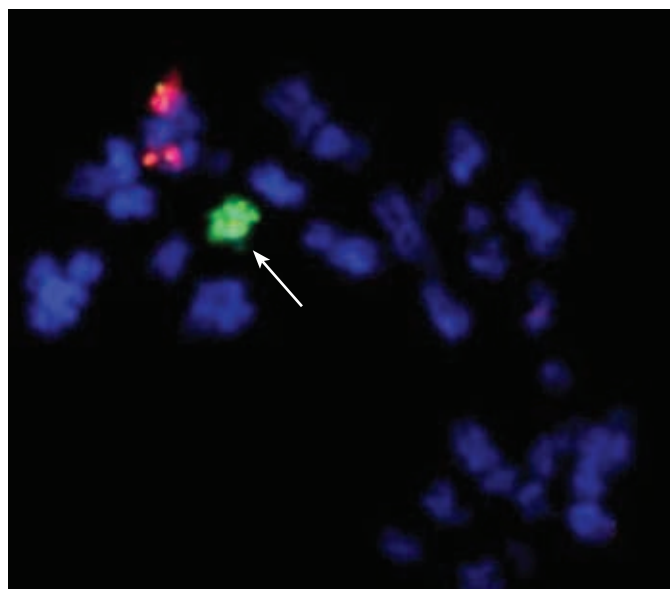
Tabuľka 1. Použité FISH sondy a výsledky analýz

Sondy	Výsledky
5p15/5q31	Pozitívne delécia 5q31: 84%
CEP8	Negatívne
7/7q22/7q36	Negatívne
TP53(17p13)	Pozitívne -17: 93%
17q22	Negatívne
20q12	Negatívne
+21	Pozitívne zisky 21q22: 97%
IGL(22q11)	Pozitívne +IGL/amplif. IGLC, BCR: 97%

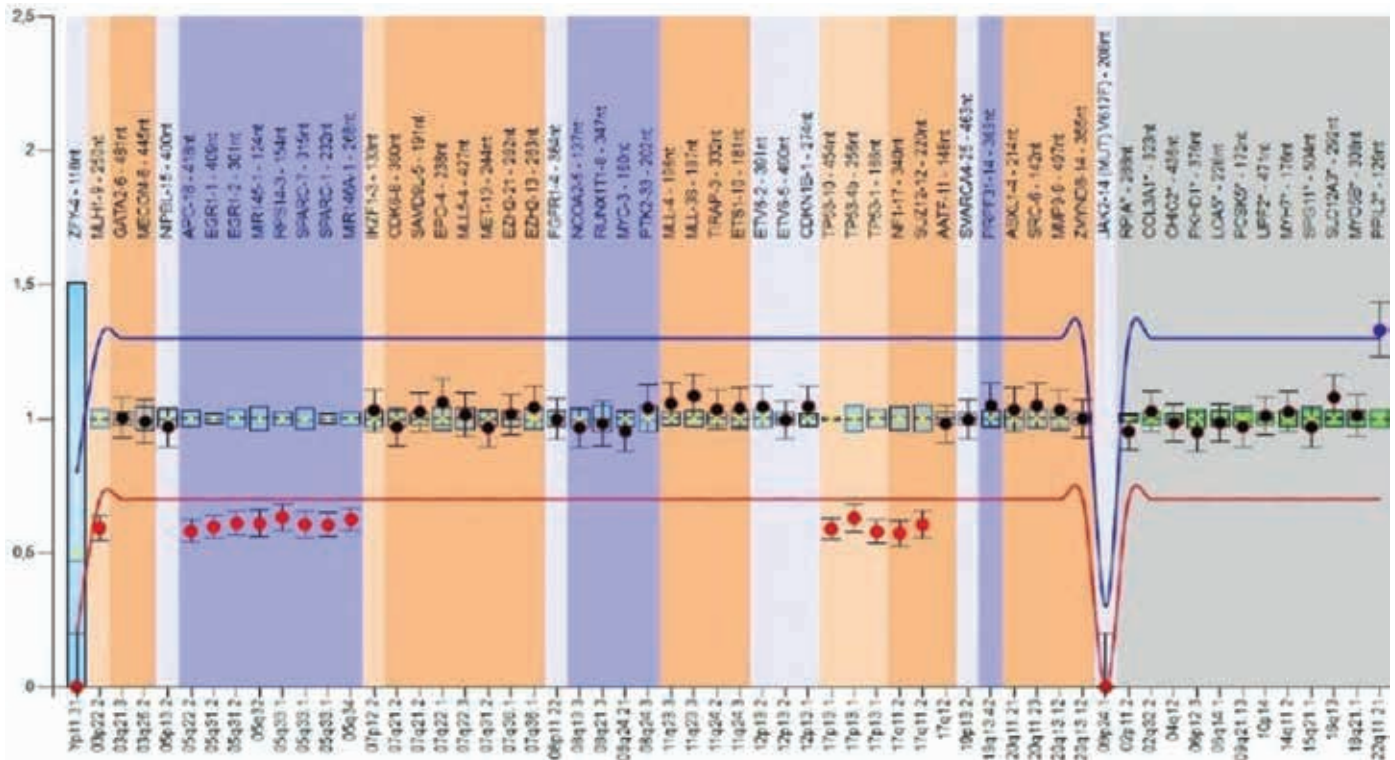
Obrázok 3. Schéma sondy XL IGL BA



Obrázok 4. Amplifikácia 3' oblasti IGL génu (zelený signál)



Obrázok 5. MLPA analýza u pacientky



Tabuľka 2. Použité FISH sondy a výsledky analýz

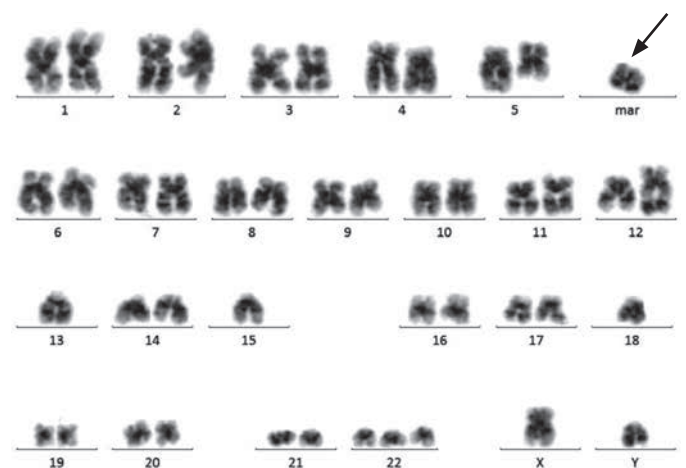
Sonda	Výsledok
MLL (11q23)	Pozitívne zisky MLL: 80%
5p15/5q31	Pozitívne delécia 5q31: 83%
BCL2(18q22)	Pozitívne -18q22: 89%
IGL(22q11)	Pozitívne zisky IGL: 42%
CEP12	Pozitívne na metafázach der(12)t(11;12;?)

fúzny proteín bcr/abl patrí k veľmi skúmaným, nie je funkcia normálneho BCR génu úplne objasnená. Predpokladá sa, že má GTP-ázovú aktivitu a reguluje signálne dráhy v bunke⁽⁵⁾. Zároveň sme pacientke detegovali stratu centroméry a krátkych ramien chromozómu 17, na ktorých je lokalizovaný tumorsupresorový gén *TP53*. Býva tiež označovaný ako strážca genómu. Jeho úlohou je udržiavať genómovú stabilitu a integritu, regulovať expresiu mnohých génov s dôležitou úlohou pri bunkovom raste, delení, apoptóze, angiogenéze a má kľúčovú úlohu v ochrane pred tvorbou nádoru^(6,7). MLPA analýza potvrdila amplifikáciu 22q11.21, delécia 5q22-q34, 17p13.1, 17q11.2 a odhalila delécia krátkych ramien chromozómu 3 (3p22.2) (obrázok 5). Pacientka exitovala ešte toho mesiaca.

Kazuistika č. 2

V apríli 2017 sme na naše oddelenie prvýkrát prijali vzorku periférnej krvi 73-ročného pacienta s diagnózou myelodysplastický syndróm (MDS). Na molekulovej úrovni bola realizovaná MLPA analýza, ktorá preukázala prítomnosť amplifikácie chromozómu 11 v oblasti q23.3-q24.3. O mesiac neskôr, v máji, sme prijali vzorku kostnej drene a vyšetrenie bolo doplnené o cytogenetiku a FISH analýzu. Po cytogenetickej analýze sme v 13 metafázach identifikovali komplexný karyotyp s marker chromozómom (obrázok 6): 45,XY,-5,der(11)t(5;11)(p13;q22),+hsr(11)(q23),der(12)t(11;12;?)

Obrázok 6. Karyotyp pacienta so šípkou na hsr(11)(q23)



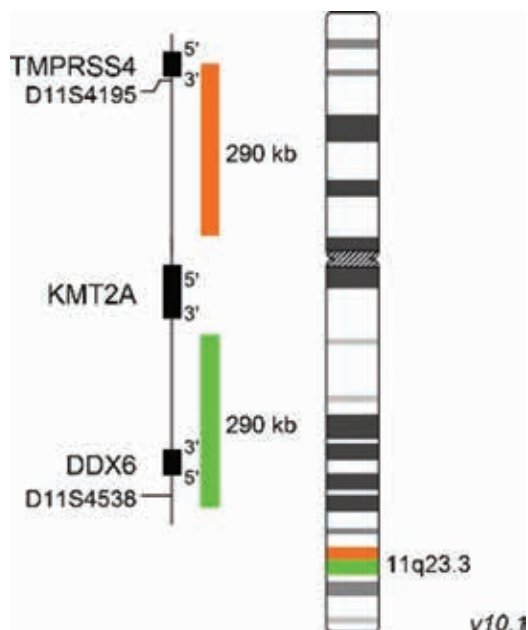
(q23;q11;?),-18[6]/46,idem,+22[7]/46,XY[7]. Výsledky FISH analýz sú uvedené v tabuľke 2.

Pomocou sondy MLL plus dc (obrázok 7) sme odhalili, že marker chromozóm je celý tvorený namnoženým génom *KMT2A* (starší názov *MLL*) a zároveň na chromozóme 11 sa tiež vyskytuje *KMT2A* gén dvakrát za sebou (obrázok 8). *KMT2A* gén kóduje transkripčný koaktívator, ktorý má dôležitú úlohu v regulácii génovej expresie počas včasného vývoja a hematopoézy⁽⁸⁾.

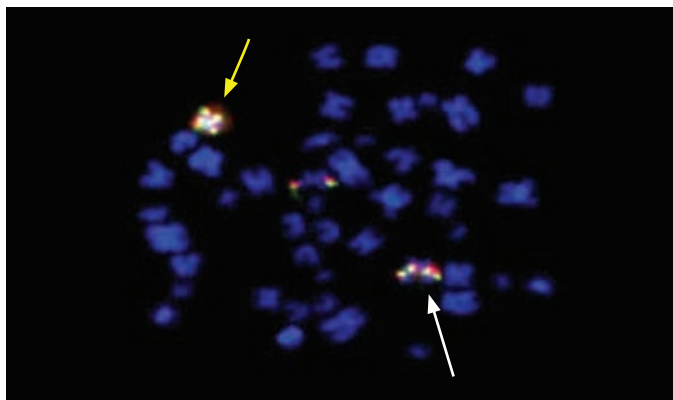
Na obrázku 9 je odhalená delécia oblasti 5q31, ktorá spôsobuje, že nezrelé krvné bunky nie sú schopné dodiferencovať sa normálne a výsledkom je veľa nezrelých foriem buniek a málo zreých. Najčastejšie deletovaný región DNA obsahuje 40 génov.

Na obrázku 10 je potvrdená trizómia chromozómu 22 pomocou FISH metódy. Pacient koncom júna 2017 exitoval.

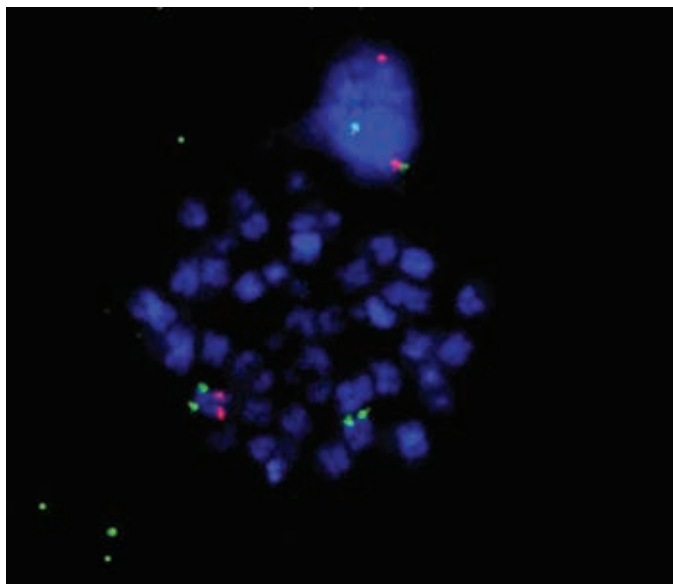
Obrázok 7. Schéma sondy XL MLL Plus



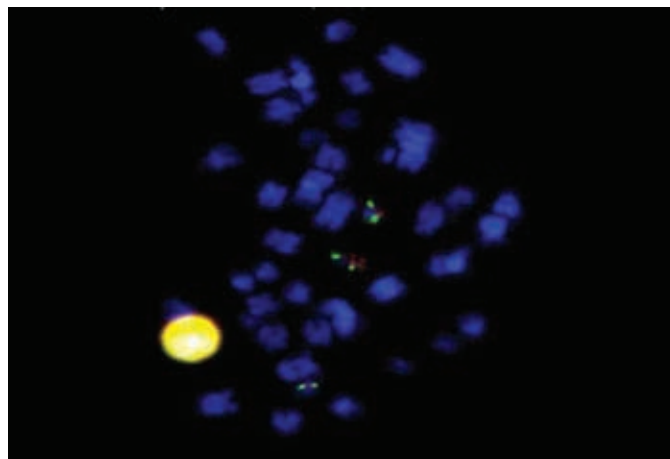
Obrázok 8. FISH vyšetrenie pomocou sondy XL MLL plus so žltou šípkou na *hsr(11)(q23)* a bielou na chromozóm 11 s duplikáciou *KMT2A* génu



Obrázok 9. Strata 5q31 znázornená na chromozóme



Obrázok 10. Trizómia chromozómu 22



Kazuistika č. 3

Vzorka kostnej drene 68-ročného pacienta bola v našom laboratóriu prvýkrát vyšetrená v januári 2017. Diagnóza bola myelodysplastický syndróm. V 10-tich metafázach sme určili nasledovný komplexný karyotyp (**obrázok 11**): 47,XY,del(5)(q15q33),der(7)del(7)(q11)t(3;7)(q13;q11),+hsr(21)(q22)[10]/46,XY[10]. Vyšetrenie kostnej drene bolo doplnené o FISH analýzu a výsledky sú zhrnuté v **tabuľke 3**.

V oblasti 21q22, ktorá bola vyšetrená sondou LSI 21 SO (**obrázok 12**) a bola detegovaná amplifikácia (**obrázok 13**), sa nachádza gén *RUNX1* (starší názov *AML1*). Tento gén kóduje transkripčný faktor zodpovedný za reguláciu diferenciácie hematopoetických buniek na zrelé bunky⁽⁹⁾. Pomocou sondy XL 7q22/7q36 bola potvrdená strata dlhých ramien chromozómu 7, keď ostali v karyotype len krátke ramená a centroméra chromozómu 7 (modrá farba, **obrázok 14**).

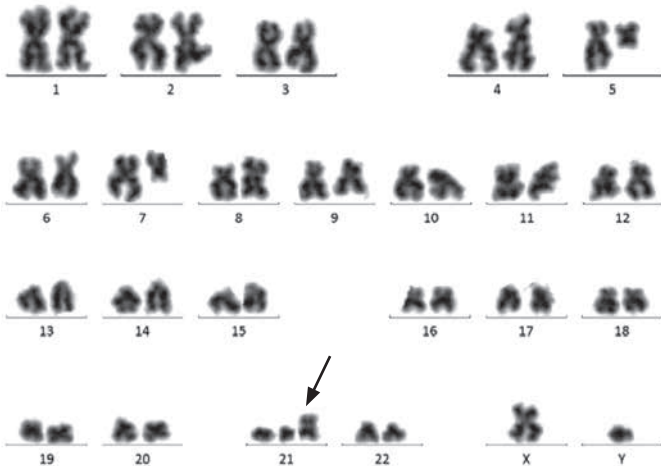
MLPA analýza potvrdila deléciu 5q22.2-q33.1 a 7q22.3-q36.1 a odhalila deléciu 3p22.2, nezachytenú na cytogenetickej úrovni.

Pacient v marci 2017 exitoval.

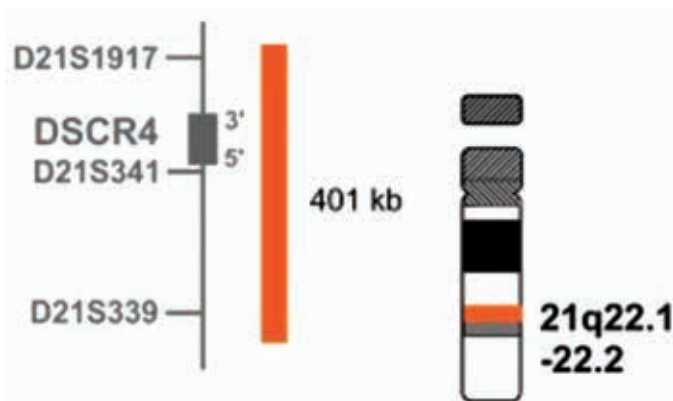
Diskusia

Homogénne sa farbiace oblasti sú chromozómové miesta s mnohonásobným opakovaním (~20 – 100) segmentov DNA. Sú charakteristickým znakom malígneho procesu a zvyčajne sú detegované v pokročilých štádiách malígneho procesu spojené so zlou prognózou. Následkom zmoženia sa môžu vytvárať rôzne veľké markery vyskytujúce sa samostatne alebo sa môžu včleniť do chromozómu. Keďže sa farbja rovnomerne, ich identifikácia pomocou G-bandu je veľmi náročná. Na odhalenie pôvodu zmoženia sa preto najčastejšie využíva FISH metóda.

Hoci boli opísané amplifikácie rôznych génov, najčastejšie amplifikované sú gény z malej génovej rodiny *MYC* (*MYC*, *MYCN*, and *MYCL*). Sú identifikované v mnohých solídnych nádoroch, ako sú nádory mozgu, prsníka, pankreasu, neuroblastóm. V hematologických malignitách sa vyskytujú zriedka, okolo 1 %⁽¹⁰⁾. Tu často amplifikovaným génom býva *KMT2A*, ktorého amplifikáciu sme detegovali u nášho jedného pacienta. *KMT2A* gén je lokalizovaný v lokuse 11q23 a v leukémiách sa vyskytuje hlavne v translokáciách, doteraz bolo identifikovaných viac ako 80 jeho fúznych partnerov⁽¹¹⁾.

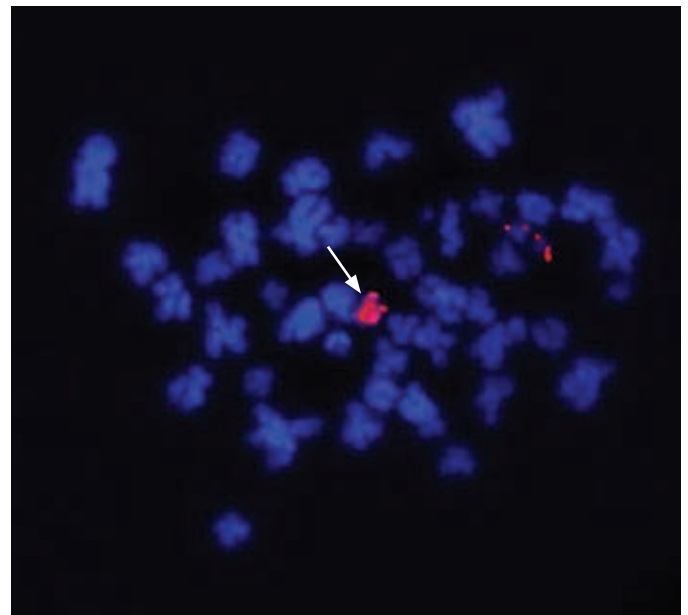
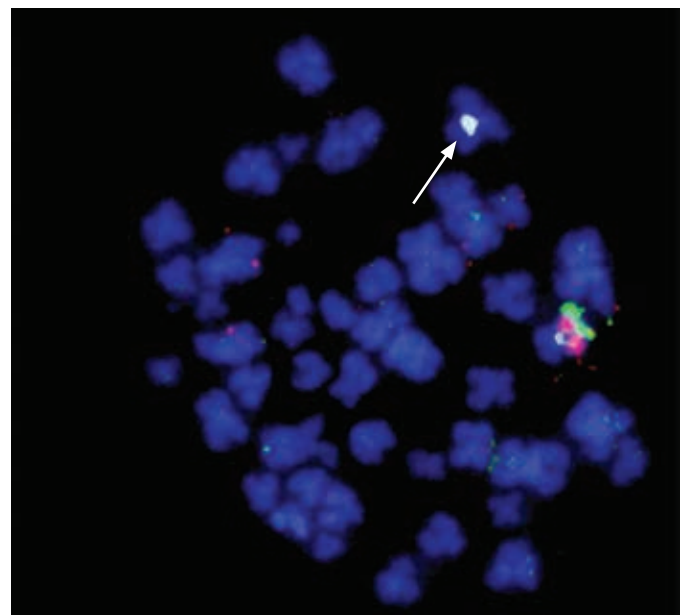
Obrázok 11. Karyotyp pacienta, šípka znázorňuje hsr(21)(q22)**Tabuľka 3.** Použité FISH sondy a výsledky analýz

Sonda	Výsledok
5p15/5q31	Pozitívne delécia 5q31: 68%
CEP8	Negatívne
7/7q22/7q36	Pozitívne delécia 7q: 44%
TP53 (17p13)	Negatívne
20q12	Negatívne
BCL6 (3q27)	Pozitívne na metafázach t(3;7)
+21	Pozitívne zisky 21: 45%

Obrázok 12. Schéma sondy LSI 21 SO

Pacienti s amplifikáciou 11q23 sa vyskytujú pomerne zriedkavo, majú však niektoré črty veľmi podobné: sú to pacienti staršieho veku, s de novo ochorením AML/MDS, s komplexným karyotypom a krátkym prežívaním. U 90 % pacientov je tiež prítomná delécia dlhých ramien chromozómu 5, ktorej veľkosť varíruje, ale všetkým pacientom chýba oblasť 5q31⁽¹²⁾.

Druhým najmenším chromozómom v karyotype, ktorý obsahuje ~ 600 génov, je chromozóm 22. Pomocou FISH metódy sme detegovali amplifikáciu jeho 3' oblasti q11, v ktorej sa nachádzajú gény *IGLC* a *BCR*. *IGLC* kóduje imunoglobulínový lambda reťazec, ktorého prestavba je prítomná hlavne v lymfómoch. Pri hematologických malignitách je amplifikácia génu *BCR* zriedkavá, najčastejšie je gén opisovaný v translokácii t(9;22)(q34;q11), na molekulovej úrovni fúzia *bcr/abl*.

Obrázok 13. FISH analýza pomocou sondy LSI 21 SO znázorňujúca amplifikáciu 21q22**Obrázok 14.** FISH vyšetrenie pomocou sondy XL 7q22/7q36, šípka je znázornený deletovaný chromozóm

Gén *BCR* kóduje proteín so serín/treonínkinázovou aktivitou zahrnutý v signálnej transdukcii, jeho presná úloha však nie je odhalená⁽⁵⁾.

Tretím chromozómom, na ktorom sme potvrdili amplifikáciu, bol chromozóm 21. Použitá sonda LSI 21 SO hybridizuje k oblasti 21q22. Ktorý gén z danej oblasti je presne amplifikovaný, nevieme, ale kandidátnym génom je gén *RUNX1* (21q22.1). *RUNX1* gén zohráva významnú úlohu pri hematopoetickej diferenciácii a v mnohých iných bunkových funkciách. Patrí ku génom, ktoré sú pri leukémiách častým cieľovým miestom translokácií. S amplifikáciou génu *RUNX1* sa stretávame hlavne pri detských akútnych leukémiách, no môže sa vyskytovať aj u dospelých s komplexným karyotypom a je spojená so zlou prognózou^(13,14).

Záver

Hsr/dm sa vyskytujú prevažne u starších pacientov s diagnózou AML alebo MDS. U pacientov je prítomný komplexný karyotyp s deléciou dlhých ramien 5. chromozómu so spo-

ločnou deletovanou oblasťou 5q31. S komplexnými zmenami sa tiež spája strata génu *TP53* z chromozómu 17. Pacienti s hsr/dm majú zlú prognózu a krátke prežívanie, čo sa potvrdilo u všetkých nami prezentovaných pacientov.

LITERATÚRA

1. Juliusson, G., & Hough, R., 2016. Leukemia. Tumors in Adolescents and Young Adults, 87-100.
2. Schwab M. Oncogene amplification in solid tumors. Cancer Biology 1999; 9: 319-325.
3. Levan G in Encyclopedia of Genetics. Elsevier Science Inc. Thomas L, 2001; p. 963.
4. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. ISCN An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. Paris: Karger 2016.
5. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BCR>
6. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53>
7. <https://en.wikipedia.org/wiki/P53>
8. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KMT2A>
9. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/RUNX1>
10. Movafagh A. Homogeneously Staining Regions or Double Minute Chromosomes in Leukemia. Iranian journal of blood and cancer 2012; 2: 101-102.
11. Nguyen D, Haley L, Pallavajjala A, et al. Identification of a novel KM-T2A-SEPT14 fusion in acute myeloid leukemia. Leukemia and Lymphoma 2018; 59(1): 265-267.
12. Herry A, Douet-Guilbert N, Guéganic N, et al. Del(5q) and MLL amplification in homogeneously staining region in acute myeloblastic leukemia: a recurrent cytogenetic association. Annals of Hematology 2006; 85: 244-249.
13. Baldus C, Liyanarachchi S, Mrózek K, et al. Acute myeloid leukemia with complex karyotype and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2 and REG genes. PNAS 2004; 101(11): 3915-3920.
14. Mikhail FM, Sinha KK, Sauntharajah Y, et al. Normal and transforming functions of RUNX1: A perspective. Journal of cellular Physiology 2006; 207(3): 582-593.



RNDr. Andrea Blahová

Lekárska genetika, Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
e-mail: andrea.blahova@medirex.sk