

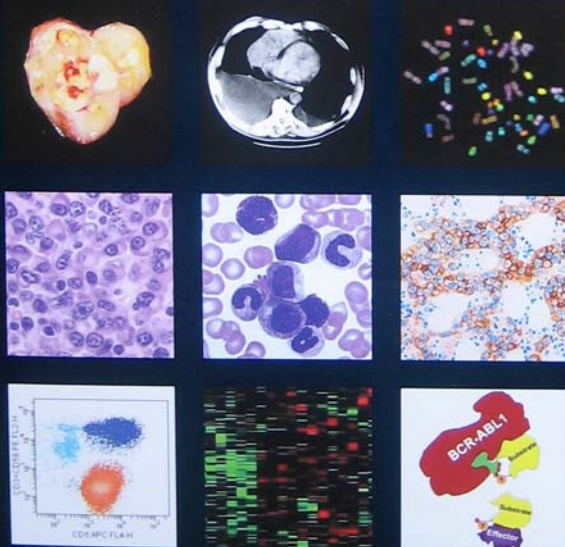
Genetika vybraných indolentných B-NHL

Denisa Ilenčíková

2008 SZO – zvyšujúce úsilie zohľadňovať cytogenetické a molekulové nálezy

WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues

Edited by Steven H. Swerdlow, Elias Campo, Nancy Lee Harris, Elaine S. Jaffe,
Stefano A. Pileri, Harald Stein, Jurgen Thiele, James W. Vardiman.



WHO

**Nodálny lymfóm z B-buniek marginálnej zóny
(+/- monocytoidné B-buniek)**

**Splenický lymfóm z B-buniek marginálnej zóny
(+/- vilózne lymfocyty)**

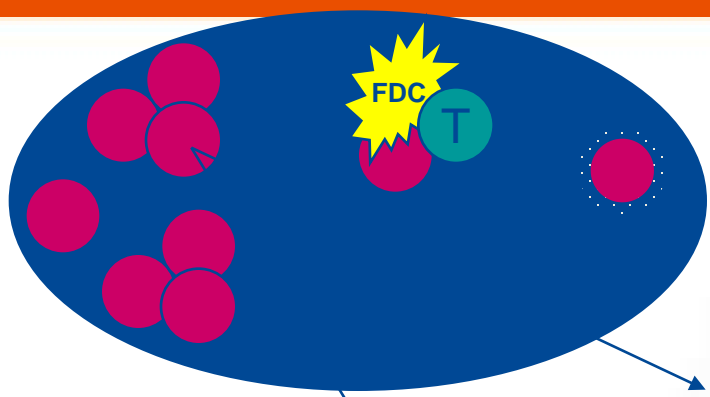
Detský nodálny lymfóm z B-buniek marginálnej zóny

Lymfoplazmocytový lymfóm

Vlasatobunková leukémia

Lsk

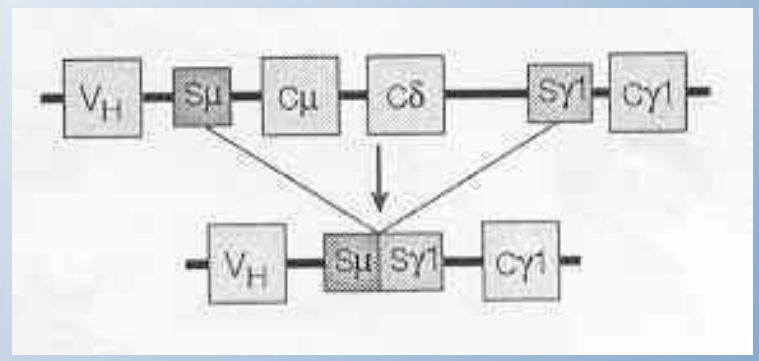
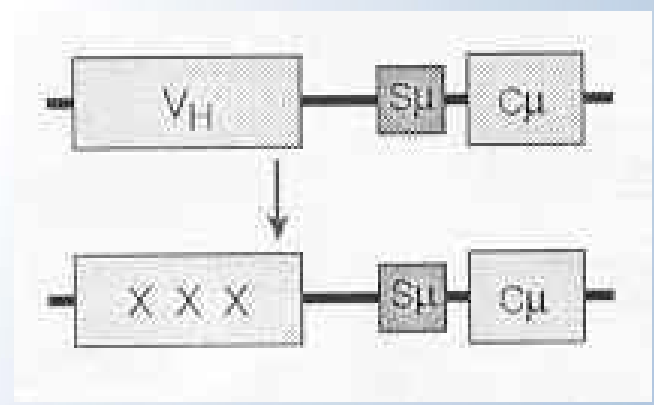
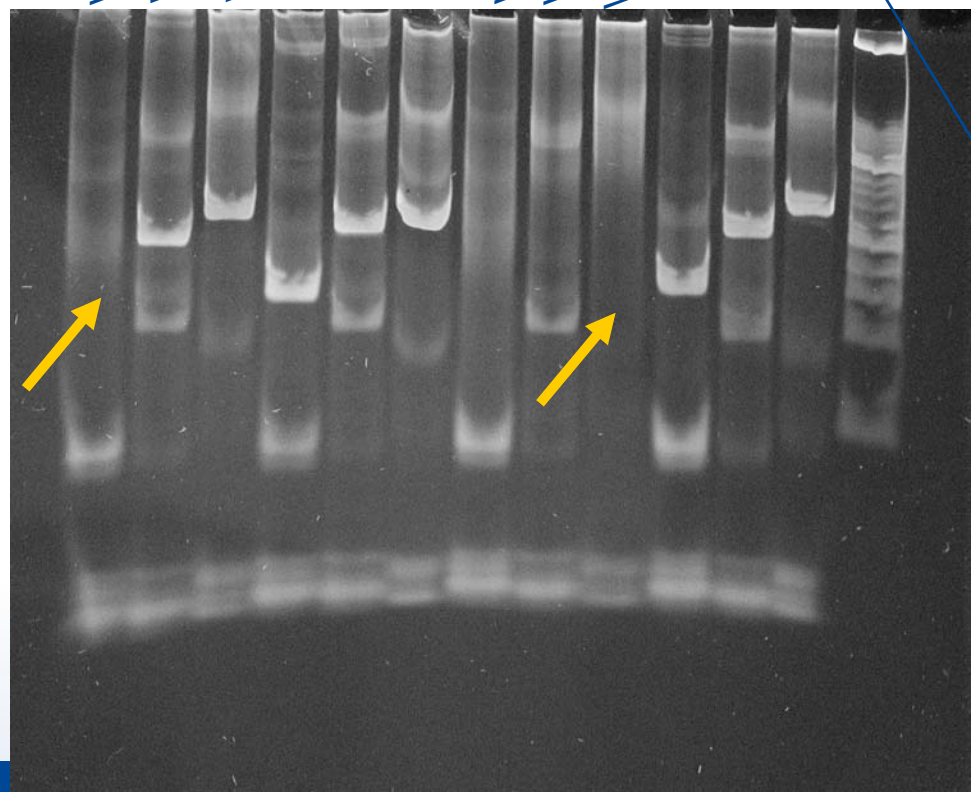
naivná



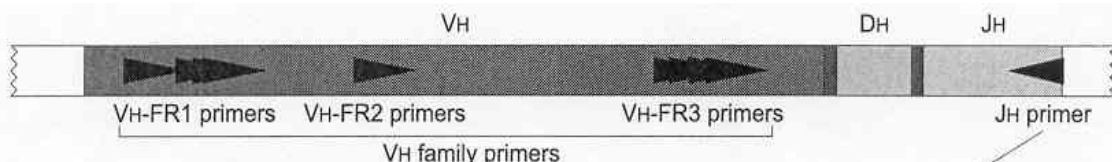
- plazmatická
- pamäťová

VDJ/FRI
VDJ/FRII
VDJ/FRIII

VDJ/FRI
VDJ/FRII
VDJ/FRIII



Vyšetrenie klonálnej prestavby IgH génu



IGH tube A

	5'		3'		5'		3'
VH1-FR1 (1-2)	(-252)	GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG		CCAGTGCCAGAGGAGTCCATTC	(+57)	JH consensus	
VH2-FR1 (2-5)	(-284)	GTCTGGTCCCTACGCTGGTGAAACCC					
VH3-FR1 (3-7)	(-256)	CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG					
VH4-FR1 (4-4)	(-256)	CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG					
VH5-FR1 (5-51)	(-255)	CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT					
VH6-FR1 (6-1)	(-263)	TGCGAGACCCTCTCACTCACCTGTG					

IGH tube B

VH1-FR2 (1-2)	(-192)	CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
VH2-FR2 (2-5)	(-190)	TGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGG
VH3-FR2 (3-7)	(-189)	GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
VH4-FR2 (4-4)	(-188)	TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG
VH5-FR2 (5-51)	(-190)	GGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGG
VH6-FR2 (6-1)	(-194)	TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG
VH7-FR2 (7)	(-192)	TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA

IGH tube C

VH1-FR3 (1-2)	(-55)	TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA
VH2-FR3 (2-5)	(-54)	CAATGACCAACATGGACCCTGTGGA
VH3-FR3 (3-7)	(-57)	TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
VH4-FR3 (4-4)	(-48)	GAGCTCTGTGACCGCCGGGACACG
VH5-FR3 (5-51)	(-69)	CAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGC
VH6-FR3 (6-1)	(-63)	GTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTG
VH7-FR3 (7)	(-69)	CAGCACGGCATATCTGCAGATCAG

Multiplex PCR assays:

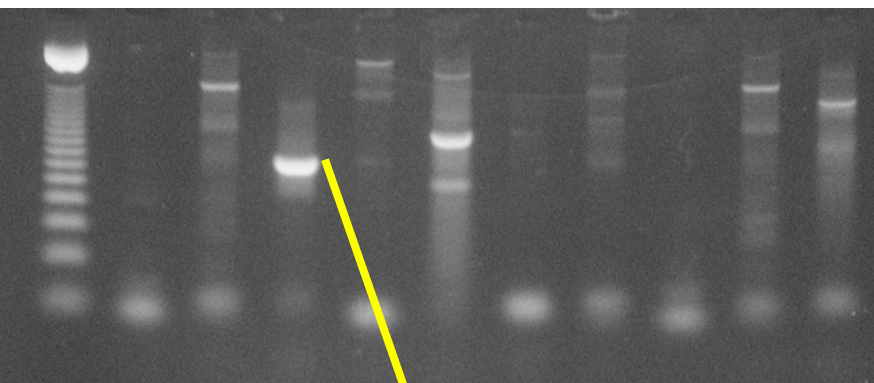
1. Vyšetrenie klonality
2. Identifikácia mutácie – pacient špecifického markera

Kombinovaná aplikácia IGH (VH-JH a DH-JH) and IGK oblastí

Je schopná detekcie všetkých klonálnych B-bunkových proliferácií aj vtedy, keď B- bunkové malignity majú vysokú hladinu somatických mutácií

Mutácia V(H) Ig génov

PCR a heteroduplexná analýza
Na identifikáciu klonálnej prestavby



Izolácia DNA z gélu a sekvenácia

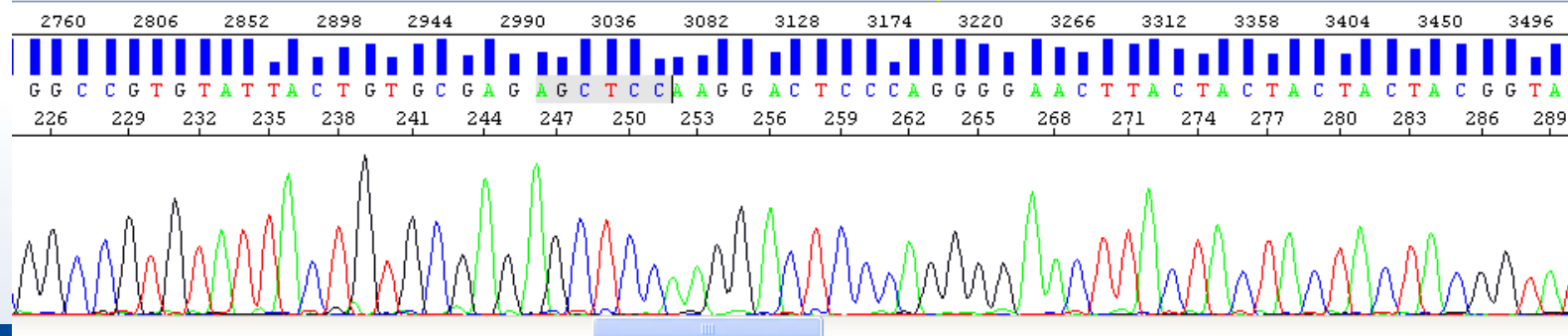
Mutovaný V(H)

5'-AGCTCCAAGGACTCCCAG-3'

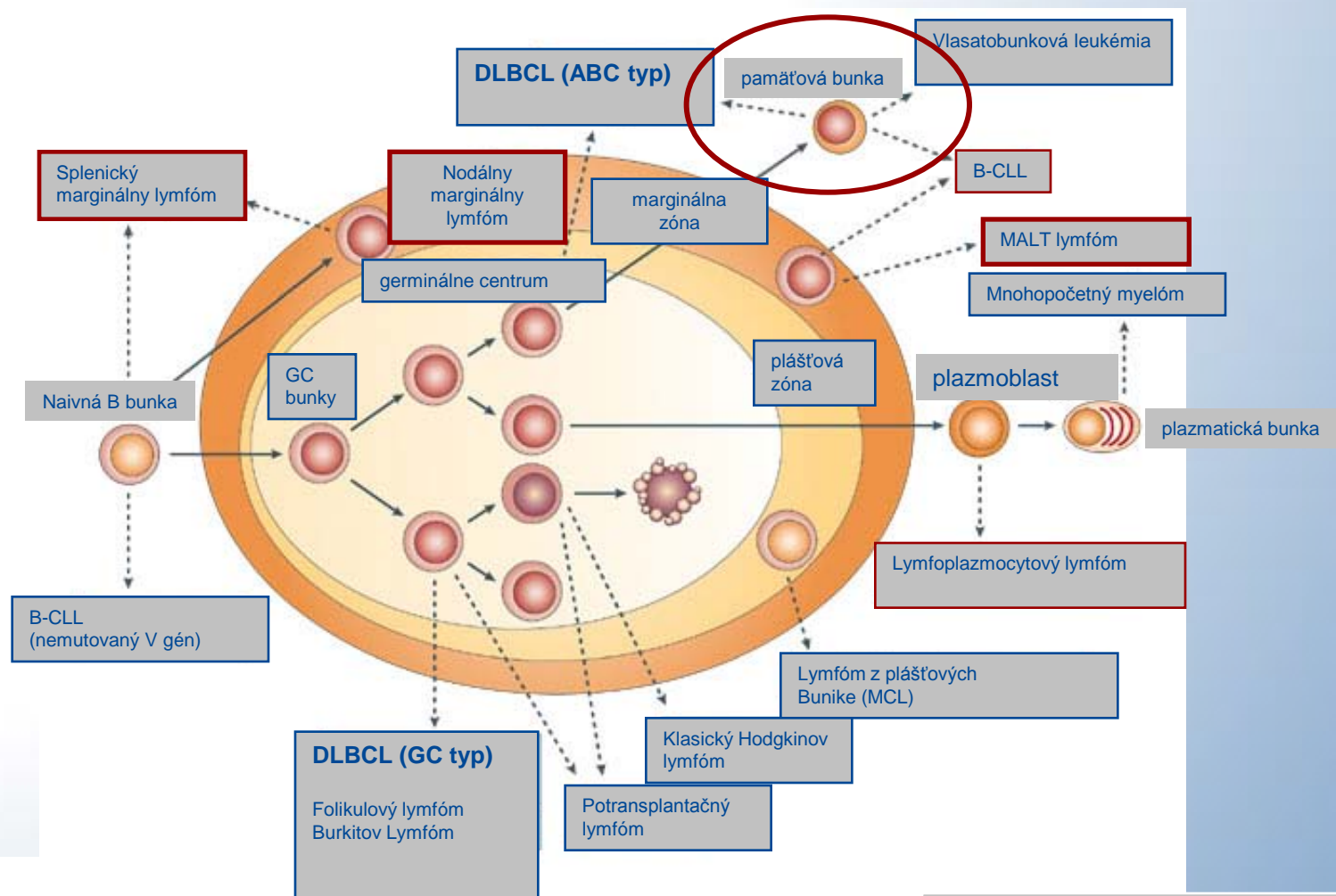
Dizajnovanie, objednanie a verifikácia próby

VH4-61 | 15 | D1-26 | 0 | JH6

Analýza dát a identifikácia prestavby



Patogenéza





B-bunky MZL – mutácie v V(H) Ig génoch

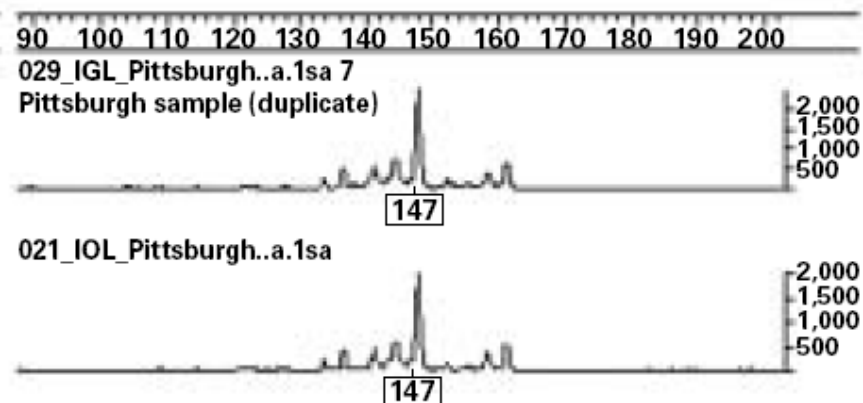
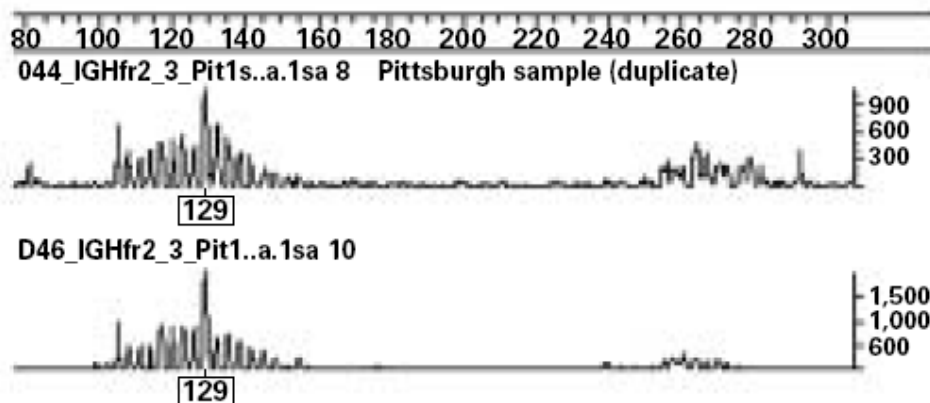
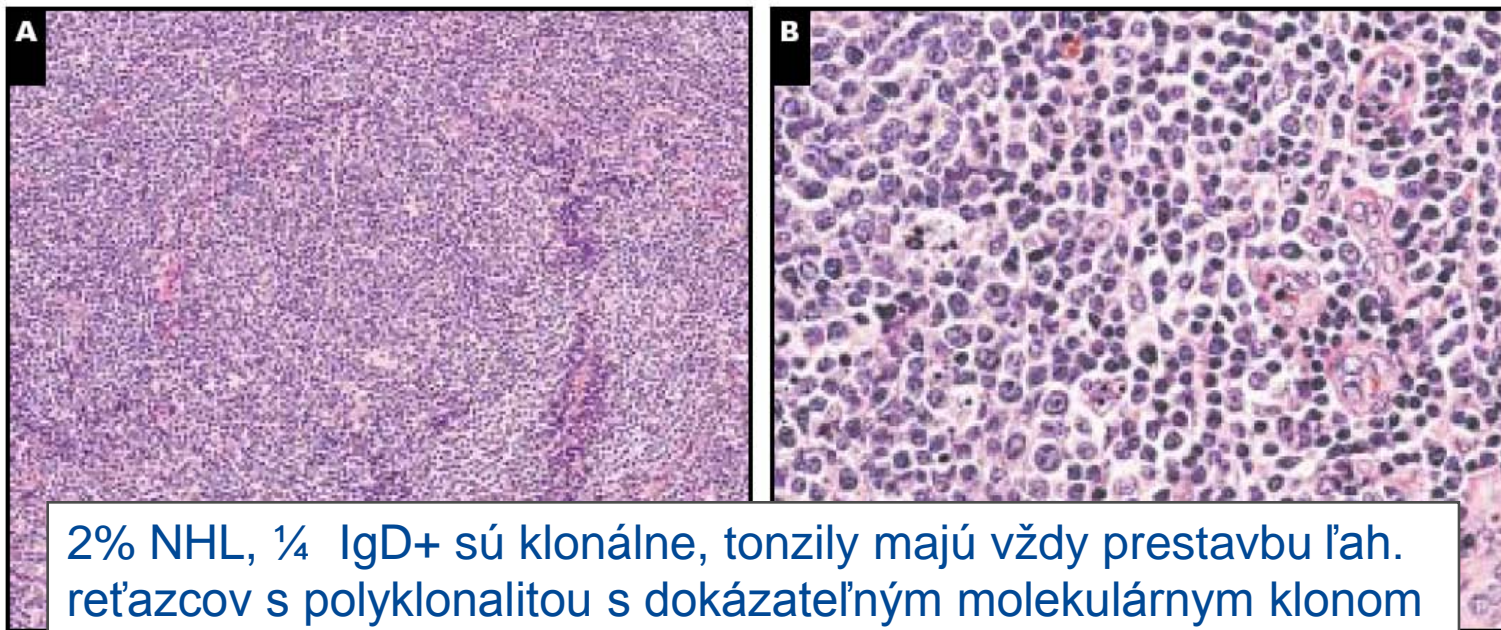
	Nodálny	Splenický
extranodálny	50% V(H)4-34 bez HCV	V(H) 1 (30%) V(H) 3 (56%)
pamäťové B-bunky (extenzívne hypermutácie)	Pamäťové bunky so somatickou mutáciou bez intraklonálnej variability B-bunky GC V(H)1-69 génoch s HCV pozit. 14-25% nemutovaný u naivných B-buniek	25% nemutovaných V(H) s IgM+/D+ (naivné bunky) <i>pacienti s vysokým a stredným rizikom prežívania</i> 75% mutovaných V(H) s IgM+/D- (pamäťové B-bunky)

LPL/imunocytóm – mutácie v V(H) Ig génoch

V(H) mutované gény sú bez intraklonálnej variácie a izotypového svičového transkriptu, zriedkavo nemutované prípady, chýbanie IgH translokácií v porovnaní s MM

HCL/vlasatobunková – mutácie v V(H) Ig génoch 80% V(H) mutovaná, V(H) 4-34 a nemutované - kratšie prežívanie

Detský nodálny marginálny lymfóm



Somatické mutácie v génoch – 50-90% u lymfómov

V normálnej B-
bunkovej proliferácii

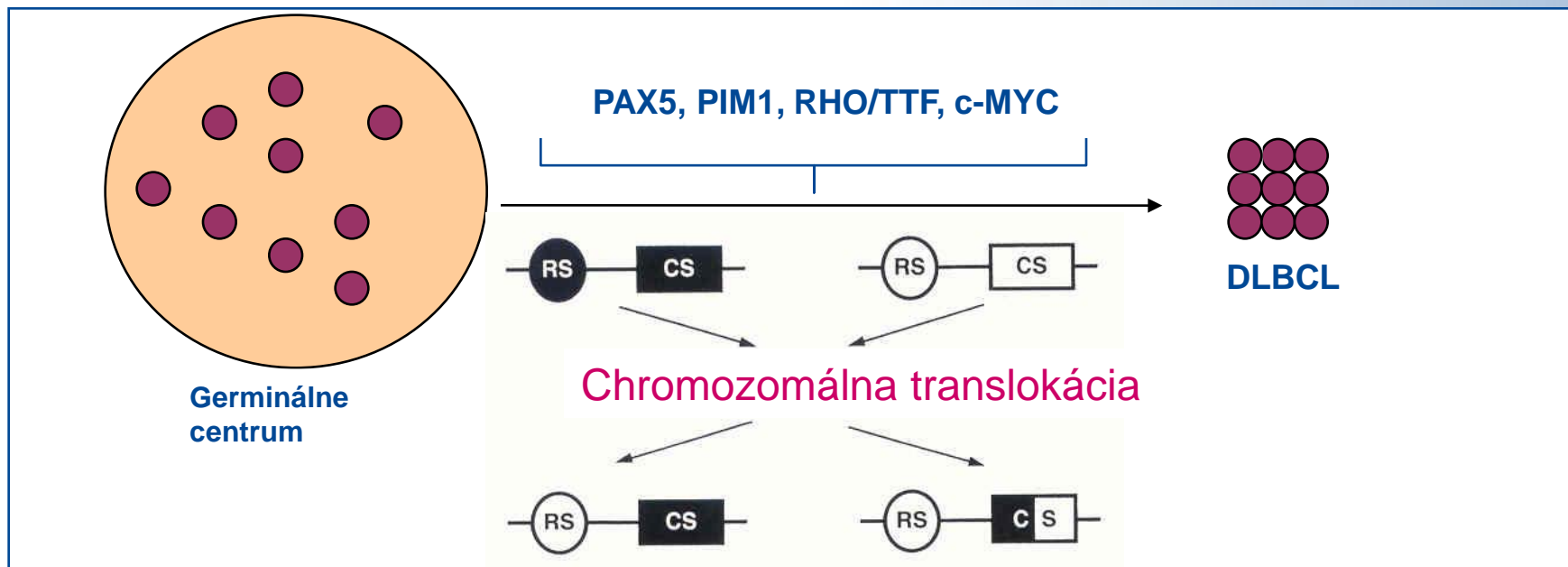
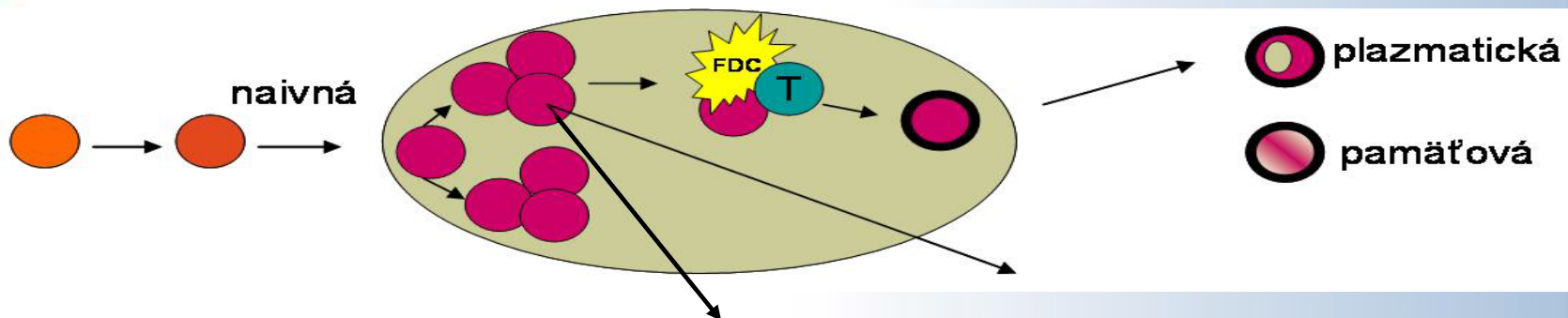
Gene (accession number)	Primer sequences	PCR product size (bp)
BCL6 (AY189709)	GGGTTCTTAGAAGTGGTG CTCTCGTTAGGAAGATCACG	959
CD95 exon 8 (al157394)	CCTTCTTAATCACTTAATCTAGC CTACCTGATAAATGCTTATGCTG	336
CD95 exon 9 (m67454)	TGGGAATTTTCATTTAGAAAACA TACTCAGAACTGAATTTGTTGT	413
PAX5 (af386791)	AGGGACCTCAGAAGCATCGAGGCC TGAAAAAGGCGCCATCGGAGTAG	932
PIM1 (af386792)	TTCTCCGGCGTCATTAGGC CGTTTGTTAGGTTAAGCCGC	1025
RhoH/TTF (af386789)	CTTTTACTCTAGGCCAAACATCG CTTCTACCGACACTTCGCATTCTT	875

Primer sequences were used for PCR amplification of genomic DNA. Additional primers were used for sequencing (not shown).

len v leukemickej
populácii

Table 2 Distribution of oncogene mutations in NMZL and SMZL cases

	Case number	VH homology	VH gene segments	BCL-6	RhoH	PIM	PAX5
SMZL (n = 34)	3	94.5%	V _H 1-3*01	0	528 C/A	0	0
	5	91%	V _H 3-15*01	1028 T/A	0	0	0
	34	96%	V _H 3-30*18	0	0	0	812G/T
NMZL (n = 21)	41	93%	V _H 3-23	555 T/G 606T/G	0	del 2527-2530	0
	51	99.2%	V _H 2-5*10	0	390 C/T	0	0
	52	99%	V _H 3-21*01	0	0	2178G/A	0
	54	98%	V _H 4-34*02	728 C/T	0	0	0
DLBCL (n = 6)	56	ND	ND	0	0	0	1435G/A
	57	ND	ND	479 G/C	0	0	0
	58	ND	ND	Multiple sites (16)*	0	0	921 C/T
	59	ND	ND	0	694 G/C	0	0
	61	ND	ND	Multiple sites (6)**	988T/C	0	0



u NZML a SZML
zriedkavý výskyt špecifických translokácií



Primárne cytogenetické zmeny

Extranodálny

t(11;18)(q21 ;q21) u 35%
žalúdka a pľúc

t(1;14)(p22 ;q32) u
žalúdka akt. Chron.
infekciou

t(14;18)(q32 ;q21) u
očných adnex, orbite,
koži a slinných
žľazách

trizómia 3 a 18 –
intestinálny a slinné
žľazy

Nodálny

Žiadne špecifické
genetické zmeny

lymfoplazmocyto

t(9;14)(p13;q32) - zriedkavá
Hum Pathol. 2004 Apr;35(4):447-54

Splenický

Veľa komplexných karyotypov
Mnoho rôznych translokácií
t(11;14)(q13;q32)- 10% dere-
gulácia Cyclin D1 (indolentný
pribeh)

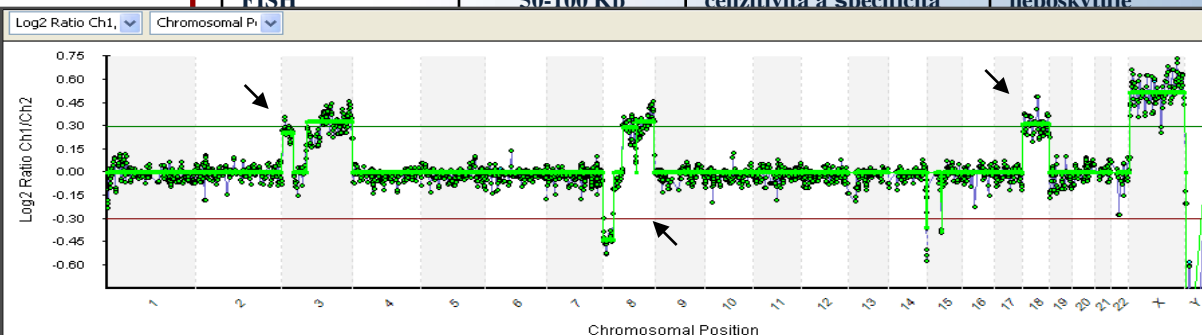
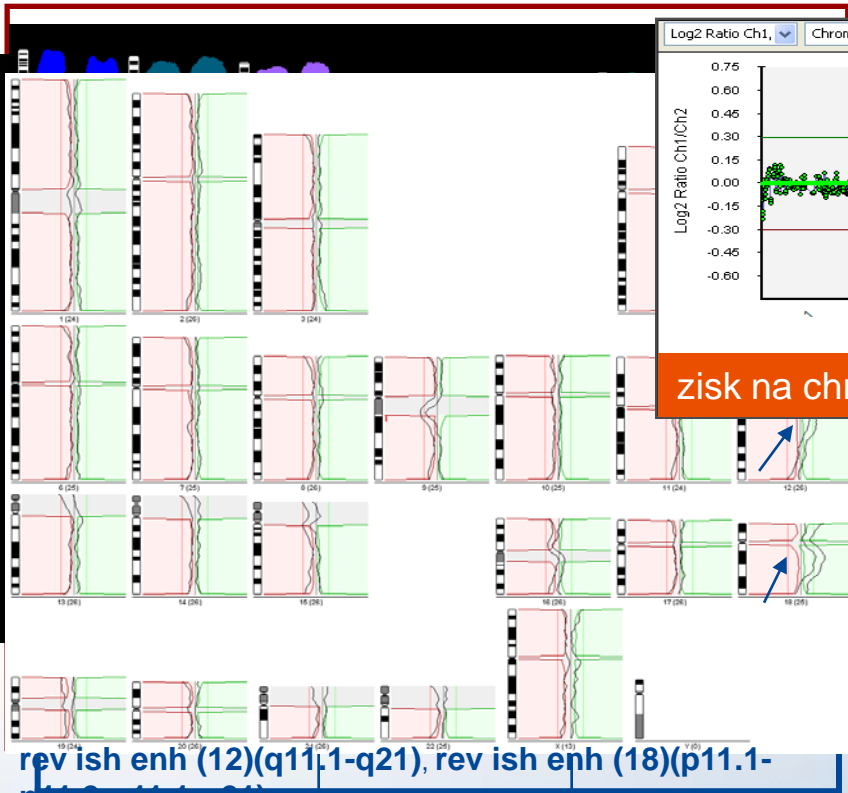
vlasatobunková

t(11;20)(q13;q11) v 10%
s nadexpresiou Cyclin D1

Algoritmus genetickej analýzy

Čerstvý \leftarrow TUMOR \rightarrow parafinový PK/KD

Metóda	Rozlíšenie	Výhody	Limitácie
Konvenčná cytogenetika	10 Mb	celogenómový skrining	Príprava metafáz
FISH	50-100 Kb	senzitivita a špecifickosť	nenoskvitne

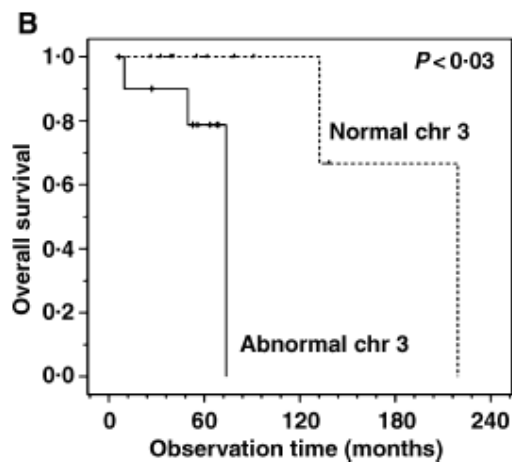
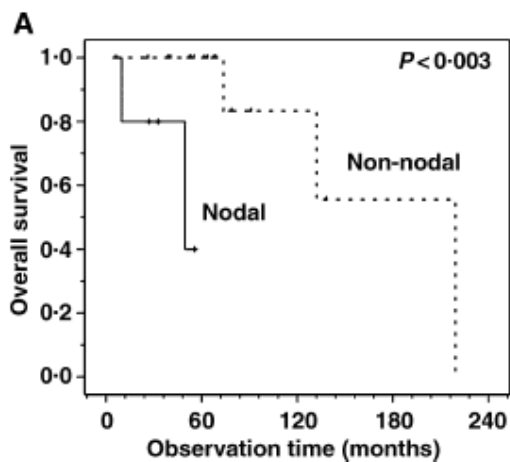
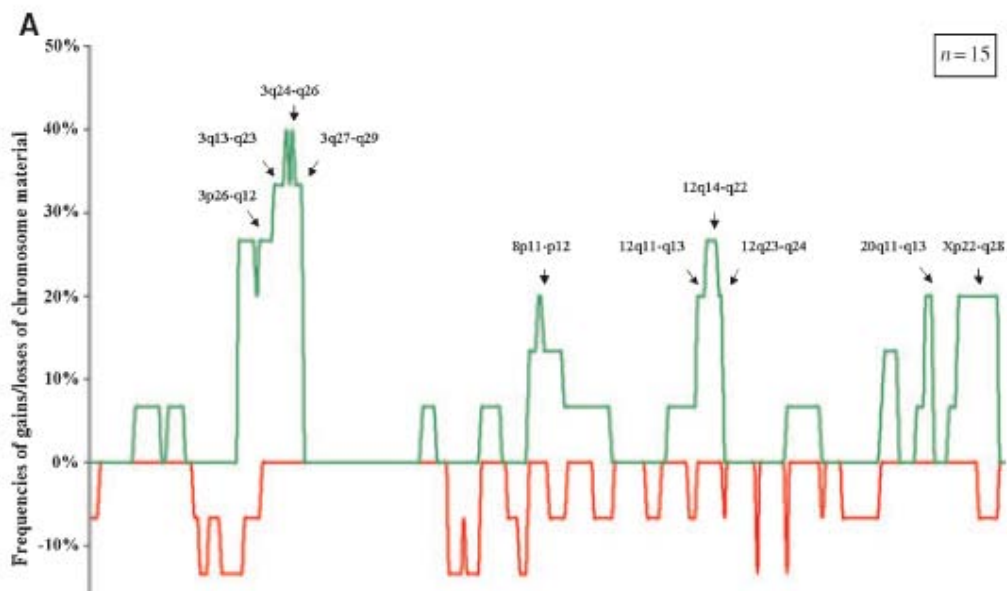


zisk na chr. 3, delécie na ch. 8, zisk chr. 18

Array CGH	40-100 Kb (vysoká denzita) 3-4 Mb (nízka denzita)	vyššie rozlíšenie a senzitivita ako klasická CGH celogenómový skrining nevyžaduje metafázy	technicky náročné cena vysoká kvalita testovanej a referenčnej DNA
-----------	--	--	--

rev ish enh (12)(q11.1-q21), rev ish enh (18)(p11.1-11.2)

U MZL – profil strát a získok metódou CC a CGH



Chromosomal change	Ocular	Pulmonary	Nodal
Array CGH			
Loss			
6q23.3	9/24(38)	0/11(0)	0/7
7q36.3	2/24(8)	0/11(0)	0/7
13q34	2/24(8)	2/11(19)	0/7
18q21	0/24(0)	2/11(19)	0/7
Gain			
3	9/24(38)	0/11(0)	0/7
6p	2/24(8)	1/11(9)	0/7
15q/15	4/24(17)	0/11(0)	0/7
18q/18	4/24(17)	1/11(9)	0/7
FISH			
t(11;18) or <i>MALT1</i> rearrangement	0/18(0)	5/8(63)	0/6
Extra copy of <i>MALT-1</i>	3/18(17)	0/8(0)	0/6

*Extranodálny
vs.
Nodálny MZL*

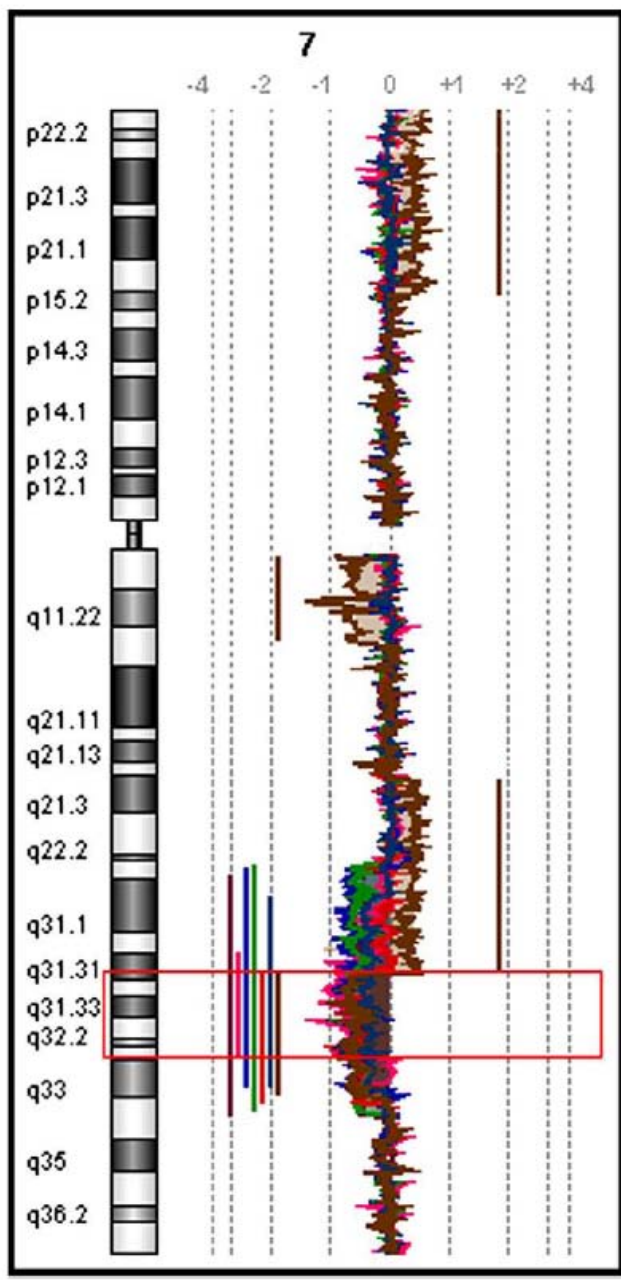
TABLE 3. Chromosomal Imbalances Detected in 7 Patients with Nodal Marginal Zone B Cell Lymphomas

Case	Age/sex	Loss	Gain	FISH (<i>MALT1</i>)
1	77/M	4,21	No gain	–
2a	68/M	No loss	No gain	–
2b	Recurrent tumor (3 yrs later)	13q34	No gain	–
2c	Recurrent tumor (8 yrs later)	1p36.1, 7q36.3, 13q34	No gain	–
3	46/M	No loss	No gain	–
4a	22/F	8p23.3	No gain	–
4b	Recurrent tumor (1yr later)	8p23.3, 13q34	1q23-q24.2	ND
5	16/M	No loss	No gain	ND
6	35/M	No loss	No gain	–
7	43/M	No loss	No gain	–

Aberácie u splenickeho MZL - mFISH

FISH analysis to study the aberrations defined by SKY

Case	Tissue sample	Anomaly	FISH probes	Results and comments
1	PB	t(2;12)(p12;q24)	<i>KAPPA</i>	Not rearranged
	PB	del(17)(p13)	<i>P53</i>	65% deletion
2	Spleen	der(17)t(5;17)(?:p13)	<i>P53</i>	78% deletion
3	PB	t(9;14)(p13;q32)	<i>PAX-5/IGH</i>	66.5% reciprocal translocation
4	PB	+3, der(3)t(3;8)(q27;q24)	<i>BCL-6</i>	46% three signals/no translocation
	PB	dic(17;18)(q10;q10)	<i>P53</i>	Normal
	PB	der(3)t(3;8)(q27;q24)	<i>MYC</i>	55% four signals/no translocation
5	PB	der(18)t(3;18)(q11;p11)	<i>BCL-6</i>	27% three signals
8	BM	der(13)t(3;13)(q21;q14)	<i>RB1</i>	Not rearranged
		der(13)t(3;13)(q21;q14)	<i>BCL-6</i>	32% three signals
9	PB	der(19)t(12;19)(q11;q13)	<i>BCL-3</i>	Not rearranged
		der(6)t(3;6)(q11;q11)	<i>BCL-6</i>	64% three signals/no translocation
10	BM	dup(3)(q11q27)	<i>BCL-6</i>	Normal
11	Spleen	t(9;14)(p13;q32)	<i>PAX-5/IGH</i>	61.5% reciprocal translocation
13	Spleen	t(9;14)(p13;q32)	<i>PAX-5/IGH</i>	18.6% reciprocal translocation
		t(14;19)(q32;q13)	<i>BCL-3/IGH</i>	38% reciprocal translocation
	PB	+3, der(8)t(3;8)	<i>BCL-6</i>	37% three signals/no translocation
	PB	der(3)t(3;8)	<i>MYC</i>	Signal on 3p chromosome
14	PB	add(17)(p13)	17 paint	i(17)(q10)
	PB	i(17)(p13)	<i>P53</i>	52% deletion
	PB	der(6)t(3;6)(q13;p25)	<i>BCL-6</i>	59% three signals/no translocation
15	PB	+3, del(3)(q27)	<i>BCL-6</i>	75% three signals/no deletion
17	PB	t(14;19)(q32;q13)	<i>BCL-3/IGH</i>	58% reciprocal translocation
		der(12)t(8;12)(q24;p13)	<i>MYC</i>	59% three signals/no translocation
18	PB	i(17)(q10)	<i>P53</i>	34% deletion
	PB	der(2)t(2;21)(p12;q11)	<i>KAPPA</i>	Not rearranged
	PB	dic(8;15)(q24;q26)	<i>MYC</i>	17% three copies/not rearranged
20	PB	inv(3)(p13q26)	<i>BCL-6</i>	Normal
21	PB	der(17)t(5;17)(q22;p13)	<i>P53</i>	65% deletion
		del(13)(q14), der(7)t(7;9;13)	<i>RB1</i>	34.5% deletion
22	BM	der(13)t(13;18)(q10;q10)	<i>RB1</i>	Not rearranged
		der(17)t(9;17)(?:p13)	<i>P53</i>	73% deletion
23	PB	t(2;7)(p12;q22)	<i>KAPPA</i>	68.5% translocation
			<i>CDK6</i>	63% translocation



arrayCGH (100kb) u 34 SMZL (12 s HCV)

Del 7q u SMZL a prognóza

26-40% - metódou CC

40-79% - metódou array CGH

Vysokoriziková skupina:

del 7q (p= 0.01)

del 17p (p= 0.02)

s nemutovaným V(H) bola asociovaná
del 7q (p P= 0.02) a dup 12p (p= 0.02)



SMZL a HCV +

žiadne špecifické genetických zmenách

Table 2 CNAs detected by array-CGH in ≥ 2 patients with SMZL

CNAs	Common minimal region			HCV+	HCV-
	Chromosome band	Localization (Mb)	Size (Mb)		
del1	p36.21-p35.3	14.679-29.454	14.7	–	3
del7	q31.1-q32.3	119.981-131.212	11.2	2	5
del8	p21.3-p12	22.355-31.150	8.7	2	4
del13	q14.2-q14.3	47.832-50.678	2.8	2	4
del14	q32.12-q32.13	91.032-94.998	3.9	1	2
del17	pter-p12	0-16.334	16	3	5
dup3	q21.1-q29	123.997-197.718	73	1	4
dup12	q13.1-q21.31	51.854-82.820	30.9	1	4
dup17	q24.1-qter	59.435-78.586	19.1	2	2
dup18	q11-qter	16.793-76.083	59.3	2	1
dupX	pter-p11.23	0-48.073	48	3	1



Rekurentné cytogenetické zmeny

Extranodálny

t(11;18)(q21;q21) u 35%
žalúdka a pľúc

t(1;14)(p22;q32) u
žalúdka akt. Chron.
infekciou

t(14;18)(q32;q21) u
očných adnex, orbite,
koži a slinných
žľazách

trizómia 3 a 18 –
intestinálny a slinné
žľazy

t(3;14)(p14;q32)

Nodálny

del 1p36
del 19q13.2
trizómia 12 v 24%
6q23 v 5%

**+7 a del 6q21-25 –
klinická progresia**

Splenický

trizómia 3 (15-36%)
gain of 3q (30%)
5q (28%)
12q a 20q (po 24%)
9q (21%)
4q (17%)

**del 7q a t(7q21;N) – nad
expresia CDK6 (40%)**

del17p < 5%

**del 6q a del 17p – klinická
progresia**

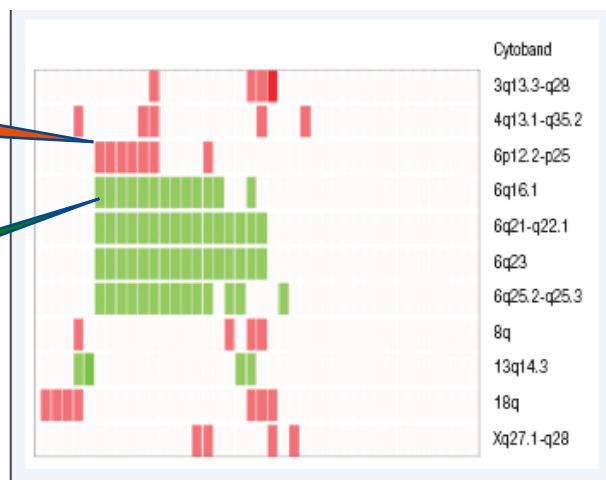
LPL/imunocytóm/WM

- Genetické údaje sú limitované a kontroverzné
- LPL/WM diploidné bunky, komplexné karyotypy sú len v čase progresie
- Translokácia $t(9;14)(p13;q32)$ zriedkavá
- trizómia 3 len zriedkavo
- $del6q21-23$ v 50% LPL/WM (pokiaľ je primárna – hrá úlohu v patogenéze)
- $del6q$ je však skôr znak progresie (najmä u FL, DLBCL a B-CLL)

genetické zmeny LPL vs. MZL

zisky

straty



Genetic Abnormalities	Cytoband	Number of Patients (%)	Chromosome Position (bp)	Size (Mb)	Number of Genes and MIRs	Candidate Targets
Gains	3q13.3-q28	3 (10)	chr3: 121238508-199379625	78.1	506	-
	4q13.1-q35.2	4 (12)	chr4: 65598026-191173837	125.6	580	-
	6p12.2-p25	7 (17)	chr6: 1-39874314	39.8	562	-
	8q	3 (10)	chr8: 76726872-136133311	59.4	249	-
	18q	7 (17)	chr18: 16793910-58926021	42.1	174	-
	Xq27.1-q28	3 (10)	chrX: 149024400-154582473	5.6	123	<i>BGN, IRAK1, FLNA, F8, MTCP1, BRCC3</i>
Losses	6q16.1	14 (33)	chr6: 93266833-97766491	4.5	12	<i>MANEA</i>
	6q21-q22.1	16 (38)	chr6: 105811723-107183767	1.4	5	<i>PROM1, AIM1</i>
	6q23	16 (38)	chr6: 138093510-141518652	3.4	15	<i>TNFAIP3</i>
	6q25.2-q25.3	14 (33)	chr6: 155012960-159967461	4.9	22	-
	13q14	3 (10)	chr13: 49414571-50454033	1	11	<i>MIRN15a, MIRN16-1</i>

Iné ako
MZLako u
MZL

In regions smaller than 20 Mb were listed the CIG (cancer implicated genes) expressed in $\geq 50\%$ of patients with Waldenström's macroglobulinemia.



	hlavná genetická zmena	Iné	IgH prestavba	Mutácie IgH (V)
Extranodálny MZL	MALT1(18q21) t(11;18)(q21;q21) u 35%	+3 t(1;14)(p22;q32) t(14;18)(q32;q21) trizómia 3 a 18 t(3;14)(p14;q32)	časté	časté V (H) 1-4
Nodálny MZL	nie je	+12 (24%) del 1q36 del 19q13.2 del 6q23 (5%) +7 a del 6q21-25 klinická progresia	zriedkavé	V (H) 4-34 bez HCV (50%) V (H) 1-69 s HCV (pamäťové bb a B-bunky GC) nemutované (25%) (naivné bunky)
Splenický MZL	del 7q (26-40% CC) del 7q31.-32. (40-79%) (array CGH)	+3 (15-36%) gain 3q (30%) 5q (28%) 12q a 20q (24%) 9q (21%) 4q (17%) del 6q q del 17p- klinická progresia	t(9;14) (p13;q32) t(14;19) (q32;q13) t(2;7) (p12;q22) súčasťou komplexných karyotypov	V (H) 1 (30%) V (H) 3 (56%) 75% mutovaných s IgH+/D- (pamäťové bunky) 25% nemutovaných V (H) s IgH+/D+ (naivná bunka)
LPL	del 6q21-23 (7-55%)	+3	t(9;14) PAX5 (IgH) zriedkavá IgH - časté	V (H) mutované zriedka nemutované
WM	del 6q21-q23 (50%)	13q- 17p- gain 7 t(11;18)	t(8;14) t(14;18) zriedkavé	V (H) často mutované
MM	t(4;14) t(14;16) t(6;14) t(14;20) t(11;14)	13q- (50%) 1p36/q21 17p-	MGUS 50% medulárny MM 55-73% PCL 85% MMCL > 90%	V (H) často mutované
HCL HCL variantná	del 6q (10% HCL)	17p-	časté	V (H) 3-4 mutované (väščina 80%) V (H) 4-34+ mutované
CLL	del 13q del17p del11q del 6q +12	del 2p24.1 del 8q24 del 9p21 del18q21 19q-	časté	Mutovaný (50%) Nemutovaný (50%) V (H) 3-21 nezávisle od mut. Stav
MCL	t(11;14)	6q-		

Nadexpresia Cyklin D1 (50%)

FL

t(11;18)

t(3;14)

ZÁVERY:

Na identifikáciu genetických aberácií je vhodná kombinácia viacerých metód

S nepriaznivou prognózou:

Komplexné karyotypy

Delécie 17p13, mutácia p53

Del 7q31, del 6q, +7

Nemutovaný status V(H) a V(H)3-34

Pod'akovanie



**Oddelenie onkologickej genetiky a patológie NOÚ,
Bratislava**

**Ústavom patologickej anatómie MFN a JLF UK v Martine
Ústavom patologickej anatómie LFUK v Bratislave**

Klinika hematológie a transfuziológie, NOÚ, Bratislava
Klinika hematológie a onkohematológie LF UPJŠ a FN L. Pasteura
Interné oddelenie OÚSA v Bratislave
Medirex, Milosrdní bratia v Bratislave
Detským onkologickým oddeleniam Slovenska

Všetkým hematologickým a patologickým pracoviskám Slovenska