

Analýza variantních nálezů počtu signálů při určení translokace t(4;14)(p16.3;q32.3) metodou FICTION u nemocných s mnohočetným myelomem

Balcárková J.¹, Mlynářčiková M.¹, Mičková P.¹, Ščudla V.^{1,2}, Pika T.¹, Bačovský J.¹, Minařík J.¹, Jarošová M.¹

¹Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

²III. interní klinika – NRE, LF UP a FN Olomouc

Transfuzní Hematol. dnes, 22, 2016, No. 3, p. 182–188

SOUHRN

Mnohočetný myelom (MM) je charakterizován četnými chromozomovými změnami prognostického významu. Jednou z nich je translokace t(4;14)(p16.3;q32.3), která je spojena s nepříznivou prognózou. Jejím důsledkem je deregulace genů *MMSET* a *FGFR3*.

Cílem práce bylo analyzovat geny *IgH*, *FGFR3* a *MMSET* metodou FICTION v souboru nemocných s MM, určit frekvenci t(4;14) a variantních nálezů počtu signálů této translokace, u opakovaně vyšetřených nemocných studovat klonální vývoj a vyhodnotit význam variantních nálezů.

V souboru 533 nemocných s MM byla t(4;14) potvrzena u 66 nemocných (12,4 %), z toho u 21 nemocných (32 %) byla zjištěna abnormalita v počtu signálů. Abnormalita v počtu signálů při vyšetření přestavby *IgH* genu byla zjištěna u 15 z 21 nemocných (71 %), zatímco analýza genů *FGFR3* a *MMSET* potvrdila variantní nález u 12/21 nemocných (57 %). Současně s variantním nálezem t(4;14) byly u všech nemocných nalezeny další přídatné chromozomové změny, nejčastěji delece 13q a zmnožení oblasti 1q21. U 3 z 9 opakovaně vyšetřených nemocných byl pozorován klonální vývoj. Naše výsledky upozorňují na existující heterogenitu FICTION nálezů při určení t(4;14) a na skutečnost, že změny v počtu signálů při vyšetření přestavby genu *IgH*, způsobené především delecí, mohou maskovat translokaci, a proto je nutné pro určení translokací u MM používat specifické translokační sondy. Přestože nález variantních počtů signálů při určení translokace nepotvrdil statisticky významný vliv na celkové přežití nemocných, vzhledem k prognostické významnosti translokace t(4;14) neurčení změny může také významně ovlivnit terapeutický přístup.

KLÍČOVÁ SLOVA

mnohočetný myelom – chromozomové změny – translokace t(4;14)(p16.3;q32.3) – FICTION

SUMMARY

Balcárková J., Mlynářčiková M., Mičková P., Ščudla V., Pika T., Bačovský J., Minařík J., Jarošová M.

Analysis of variant number of signals in the determination of translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) using FICTION method in patients with multiple myeloma

Multiple myeloma (MM) is characterized by numerous chromosomal changes of prognostic importance. One of them, associated with adverse prognosis, is translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) resulting in deregulation of the genes *MMSET* and *FGFR3*.

The aims of the present study were to analyse *IGH*, *FGFR3* and *MMSET* genes using the FICTION method in cohort of MM patients, to evaluate the frequency of translocation t(4;14) and its variant findings, clonal evolution assessment in repeatedly examined patients and assess the prognostic importance of our findings.

Using the FICTION method, we detected t(4;14) in 66 out of 533 (12.4%) patients; in 21 patients (32%) we detected variant number of t(4;14) signals (already detected in 15 out of 21 (71%) patients during standard examination of *IgH* gene rearrangement). *FGFR3* and *MMSET* genes analysis proved the variant findings in 12/21 patients (57%). Additional cytogenetic abnormalities were detected in all patients with variant number of t(4;14) signals, the most frequent being 13q deletion and 1q21 gain. Nine patients were repeatedly examined and clonal evolution was observed in 3 patients. Our results suggest prevailing heterogeneity of FICTION findings of t(4;14) and that the changes in the number of signals of *IgH* gene, primarily caused by deletions, can mask translocation. Therefore, we believe it as necessary to

use the specific translocation probe. Although the variant translocation findings do not confirm the statistical significance of the results in terms of overall patient survival, our results show that given the prognostic significance of translocation t(4;14) overlooked changes can have a significant bearing on the therapeutic approach.

KEY WORDS

multiple myeloma – chromosomal changes – translocation t(4;14)(p16.3;32.3) – FICTION

ÚVOD

Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné onemocnění plazmatických buněk charakterizované jejich proliferací, akumulací v kostní dřeni a produkcí monoklonálního imunoglobulinu. MM je geneticky heterogenní onemocnění, u kterého pozorujeme rekurentní cytogenetické změny v průběhu celého onemocnění od nemaligního stadia monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) přes doutnající myelom (SMM) až po konečné stadium MM [1, 2]. Některé změny se objevují v době transformace normální plazmatické buňky do stadia MGUS (primární), zatímco sekundární změny se objevují v pozdějším stadiu onemocnění [2, 4].

Na základě primárních změn je dnes MM rozdělován na hyperdiploidní a nonhyperdiploidní. Hyperdiploidní MM je spojen s trizomiemi lichých chromozomů, zejména chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21 [5]. Nonhyperdiploidní MM je charakterizován translokacemi zahrnujícími *IgH* gen. Delece *RB1* genu/monozomie chromozomu 13 je popisována jak u hyperdiploidních, tak nonhyperdiploidních MM stejně jako sekundární cytogenetické změny jako delece genu *TP53* (17p13), zmnožení oblasti 1q21 nebo delece oblasti 1p32 [6, 7].

U 30–40 % nemocných jsou zjištěny translokace zahrnující *IgH* gen (14q32) [6]. Tyto translokace jsou důsledkem nehomologní rekombinace *IgH* genu a vedou k deregulované expresi partnerských genů tím, že tyto geny jsou přemístěny do blízkosti zesilovačů transkripce *IgH* genu [8]. Mezi nejčastější translokace zahrnující *IgH* gen patří t(4;14)(p16;q32), t(11;14)(q13;q32), t(14;16)(q32;q23) a t(14;20)(q32;q12). V současné době je přítomnost t(11;14) spojena s příznivou prognózou, t(4;14) se středně nepříznivou prognózou, t(14;16) a t(14;20) s velmi nepříznivou prognózou [9].

Translokace t(4;14)(p16;q32) se vyskytuje u 15–20 % nemocných [10]. Touto translokací dochází k deregulaci dvou genů *MMSET* na derivovaném chromozomu 4 a *FGFR3* na derivovaném chromozomu 14. Gen *MMSET* (multiple myeloma SET domain) je také známý jako kandidátní gen 1 pro Wolf-Hirschhorn syndrom (*WHSC1*) nebo *NSD2* (nuclear receptor-binding SET domain 2). Protein *MMSET* je chromatin remodelující

protein s histon metyltransferázovou aktivitou [11]. Na tkáňových kulturách bylo prokázáno, že v buňkách, u kterých je zvýšená exprese proteinu *MMSET*, dochází ke snížení metylace histonu H3 a tím k umlčení exprese cílových genů. Ztráta exprese proteinu *MMSET* u buněčných linií s t(4;14) vede ke snížené adhezi buněk, zpomalení buněčného růstu a indukci apoptózy [10]. Histon metyltransferázová aktivita proteinu *MMSET* se stala vhodným cílem pro vytvoření molekul inhibitoru cílového substrátu proteinu *MMSET* nebo pro vytvoření malé siRNA (small interfering RNA), která vede k sekvencově specifickému umlčování genů [12].

Druhým genem zahrnutým v translokaci t(4;14) je gen *FGFR3* (gen pro receptor fibroblastového růstového faktoru 3). Následkem translokace dochází k ektopické expresi tyrozin kinázového receptoru zapojeného do přenosu signálů regulujících růst a diferenciaci buněk v mnoha tkáních, ale jeho role v patogenezi MM zůstává zatím neznámá [5]. Nedávno bylo zjištěno, že přibližně u 30 % nemocných s t(4;14) dochází ke ztrátě exprese genu *FGFR3*. Ztráta exprese *FGFR3* genu je spojena s různě velkými delecemi, které vznikají na derivovaném chromozomu 14, případně se ztrátou celého derivovaného chromozomu 14. Tyto poznatky ukazují, že zahrnutí genu *MMSET* má významnější podíl na maligním fenotypu nemocných s t(4;14), než je podíl genu *FGFR3* [13].

Středně nepříznivý prognostický dopad t(4;14) je shodný pro nemocné s klasickou t(4;14) stejně jako pro nemocné, u nichž došlo ke ztrátě exprese *FGFR3* genu. Uvádí se, že středně nepříznivý prognostický dopad t(4;14) může být překonán použitím léčebného přístupu s proteazomovým inhibitorem bortezomibem [14].

Cílem této práce bylo analyzovat geny *IgH*, *FGFR3* a *MMSET* metodou FICTION v souboru nemocných s MM, určit frekvenci variantních nálezů a jejich význam a u opakovaně vyšetřených nemocných studovat klonální vývoj.

SOUBOR NEMOCNÝCH A METODIKA

Soubor nemocných

V souboru 533 nemocných diagnostikovaných a léčených na III. interní klinice a Hemato-onkologické

klinice FN a LF UP v Olomouci v období let 2003–2015 byla u 66 nemocných (12,4 %) zjištěna t(4;14). Další klinická data jsou uvedena v tabulce 1.

Metody

U všech nemocných byl vyšetřen vzorek kostní dřeně (1–2 ml) s minimálním zastoupením 10 % plazmatických buněk. Vzorokly kostní dřeně byly zpracovány podle standardních cytogenetických postupů [15].

K detekci cytogenetických změn byla použita metoda fluorescenční in situ hybridizace v kombinaci s imunofluorescenčním značením plazmatických buněk (FICTION) [16–18]. U všech pacientů byl použit základní panel sond LSI RB1, LSI IgH, ON IgH nebo XL IGH plus, LSI TP53, CEP 15, CEP 17, ON 1q21/1p36 nebo XL 1q21/1q32, (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA; Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Nizozemsko; MetaSystems Althusheim, Německo). Pro určení translokace t(4;14) a dalších změn v oblasti

Tab. 1 Charakteristika souboru 66 nemocných s t(4;14)

Počet pacientů	66
Muži	30
Ženy	36
Typ M-Ig: IgG	37
IgA	23
BJ	6
Typ lehkého řetězce M-Ig:	Kappa 40 Lambda 26
Nová diagnóza	53
Relaps/progrese	13
Opakovaně vyšetřeno	20

4p16.3 byly použity sondy LSI IGH/FGFR3 DF (Abbott Molecular), LSI Wolf-Hirschhorn region WHS/CEP4 SGN (Abbott Molecular) nebo MD Wolf-Hirschhorn WHSC1(4p16)/SE 4 (Kreatech Diagnostics) a BAC sonda RP11 241P10 (Illumina, San Diego,

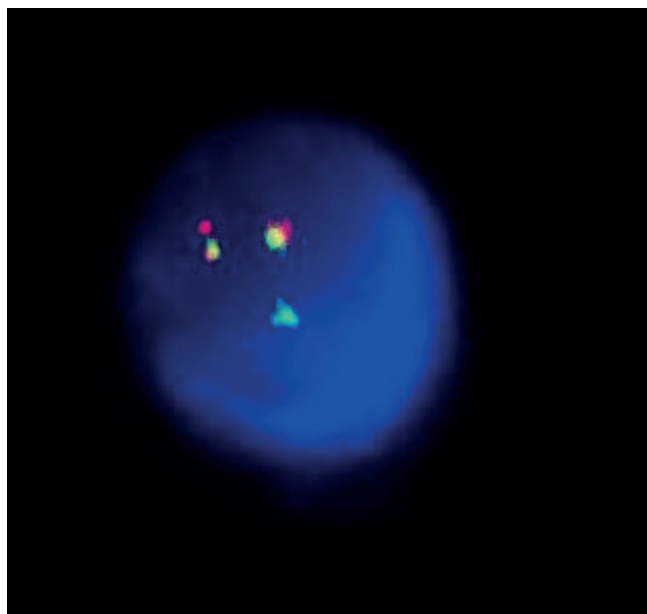
Tab. 2 Klinická data, výsledky přestavby IgH genu, typ variantního nálezu signálů t(4;14) a změny v genech FGFR3 a MMSET u nemocných v době prvního vyšetření

Pacient číslo	Pohlaví/věk	Typ MM	Stadium (D-S)	IgH (1F1R1G)	t(4;14) (2F1R1G)	MMSET/c4 (2R2G)	FGFR3 (2R)
1	F/61 ⁺	BJ-L	III.B	1R1G	2F1R	1R2G	1R
2	M/65	BJ-L	III.B	2G1R	3F1R	3R3G	3R
3	M/62	IgG-K	I.A	1F1R1G/1F2R1G	2F1R1G/2F1R2G	2R2G	2R
4	F/66	IgG-L	III.A	1F1R1G/ 1F3R2G/1F3R1G	2F1R1G/4F2R2G/ 4F1R1G	3R2G	3R/4R
5	M/58	IgA-K	II.A	1R2G	3F 1R/2F1R	3R2G	2R
6	F/72	IgG-L	II.A	1F1R1G	1F1R3G/1F1R2G	3R2G	3R
7	F/61	IgG-L	III.A	1F1G	1F1R1G	1R2G	1R
8	F/79 ⁺	IgA-K	III.B	2F1G	2F1R2G/2F1G	2R2G/1R2G	1R/2R
9	F/59	IgA-K	II.A	2F1R	1F2G2R	2R2G/3R2G	2R
10	F/68	IgA-K	II.A	1F1R	1F2R1G	2R2G	2R
11	F/58 ⁺	IgG-K	III.B	1F2R1G	1F1R2G	2R2G	2R
12	F/53 ⁺	IgA-K	III.A	1F1R1G	2F1R1G/1F1G2R	2R2G	2R
13	F/64 ⁺	IgG-K	II.A	1F1G	1F1R1G	2R2G	1R
14	M/70 ⁺	IgG-K	II.A	1F1R1G	1F1G2R	2R2G	2R
15	F/64 ⁺	IgG-L	II.A	1F1R2G	1F1G2R	2R2G	2R
16	F/71 ⁺	IgG-K	III.A	1F1R1G	1F1G2R	2R2G	2R
17	M/67 ⁺	IgA-K	II.A	2R1G	1F1G2R	2R2G	2R
18	F/72 ⁺	IgA-K	II.A	1F1R1G	2F1R1G/2F1G	1R2G	1R
19	M/50 ⁺	IgG-L	III.A	1F1G	1F1G1R	2R2G	1R
20	M/85	BJ-K	III.B	2F1R1G/1F2R2G	2F2R2G/1F2G1R	3R3G/4R4G	3R/4R
21	F/39	IgG-K	II.A	1F1R1G	2F1R1G *	2R2G	2R

*Nemocná s klonálním vývojem a objevením variantního nálezu v progresi MM.

*Nemocný zemřel.

V záhlaví tabulky jsou v závorce uvedené standardní nálezy pro jednotlivé sondy, R-červená, G-zelená, F-fúze. Nemocní 8, 12, 13 byli poprvé vyšetřeni v relapsu/progresi MM.



Obr. 1 Translokace t(4;14)
A - standardní nález (2F1R1G), B - variantní nález (1F1R1G)

California, USA), která pokrývá geny *FGFR3*, *TMEN19*, *TACC3* a *LETM1*.

Hybridizace byla provedena podle návodu doporučeného výrobcí jednotlivých sond. U každého nemocného bylo hodnoceno 100 imunofluorescenčně značených plazmatických buněk. Hraniční hodnota pozitivity použitých sond (cut-off level) byla stanovena na 10 %.

VÝSLEDKY

Z celkem 66 nemocných s t(4;14) byl u 45 nemocných prokázán standardní nález t(4;14) a u 21 nemocných (32 %) s t(4;14) byl pozorován variantní nález počtu signálů při vyšetření translokace metodou FICTION. Ze 45 nemocných se standardní translokací t(4;14) žije 17 nemocných a zemřelo 28 nemocných. Z 21 nemocných s variantním nálezem signálů t(4;14) žije 10 nemocných, 11 nemocných zemřelo.

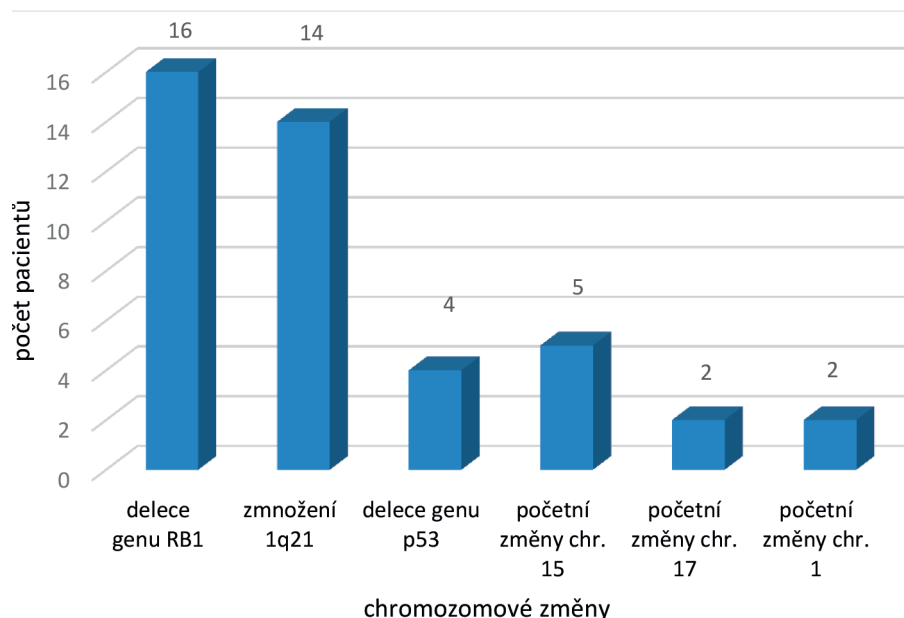
Všichni nemocní byly vyšetřeny nejprve sondou pro určení přestavby genu *IgH*, dále pak specifickou sondou pro určení translokace t(4;14) a specifickými sondami pro určení změn genů *FGFR3* a *MMSET*.

Jen u 6 z 21 nemocných byla zjištěna klasická přestavba *IgH* genu (označeno 1F1R1G), u 15 nemocných (71 %) byla zjištěna abnormalita v počtu signálů při základním vyšetření přestavby *IgH* genu. Současně s přestavbou *IgH* genu byly u 9 nemocných zjištěny další změny: parciální duplikace (4 nemocní), parciální delece (3 nemocní) nadbytečná přestavěná kopie (1 nemocný), ztráta druhé kopie *IgH* genu (1 nemocný).

U 6 nemocných nebyla prokázána klasická přestavba *IgH* genu, ale byly zjištěny jiné abnormality tohoto genu: parciální delece u 4 nemocných, parciální duplikace u 2 nemocných (tab. 2).

U všech nemocných byla zjištěna abnormalita v počtu signálů se specifickou sondou pro t(4;14). Na obrázku 1 je ukázán standardní (označeno 2F1R1G) a variantní nález t(4;14) metodou FICTION. Jednotlivé variantní nálezy jsou ukázány v tabulce 2. U 7 nemocných byl prokázán výskyt dvou klonů: standardní/variantní u 3 nemocných, variantní/variantní u 4 nemocných. U jedné nemocné byla zjištěna přítomnost 3 klonů (standardní/variantní/variantní). U 12 nemocných byla prokázána přítomnost jen variantního klonu buněk. Jedna nemocná v době diagnózy měla standardní t(4;14), ale v progresi již byla zjištěna přítomnost i variantního klonu. Detailně jsou jednotlivé klony s variantním nálezem signálů při určení translokace t(4;14) popsány v tabulce 2.

U všech nemocných byla provedena analýza genů *FGFR3* a *MMSET*. Nalezené změny v těchto genech a varianta t(4;14) v době prvního vyšetření jsou uvedeny v tabulce 2. Změny v těchto genech byly nalezeny u 12 nemocných. Delece genu *FGFR3* byla prokázána u 6 nemocných (u 3 nemocných v kombinaci s delecí genu *MMSET*). Zmnožení genu *MMSET* bylo zjištěno u 3 nemocných; u 1 nemocné společně se zmnožením genu *FGFR3*. Početní změny chromozomu 4 byly prokázány u 3 nemocných. Normální nálezy v genech *FGFR3* a *MMSET* byly prokázány u 9 nemocných.



Graf 1. Přídavné chromozomové změny u nemocných s variantním nálezem signálů t(4;14)

Současně s t(4;14) byly u všech nemocných nalezeny metodou FICTION další abnormality. Nejčastěji se jednalo o delecii RB1 genu (16 nemocných) a zmnožení oblasti 1q21 (14 nemocných). Dále byla prokázána delece genu TP53 u 4 nemocných a početní změny chromozomu 15 (5 nemocných), chromozomu 17 (2 nemocní) a chromozomu 1 (2 nemocní). Přehled dalších chromozomálních abnormalit zjištěných metodou FICTION je shrnutý v grafu 1.

Opakovaně bylo v relapsu/progresi MM vyšetřeno 9/21 nemocných. U 6 nemocných byly nalezené změny v relapsu/progresi shodné se změnami v době prvního vyšetření. Jeden variantní klon byl prokázán u 3 nemocných, u dalších 3 nemocných byly v době diagnózy i v době relapsu/progrese nalezeny 2 klony: variantní a standardní.

U 3 nemocných byl zaznamenán klonální vývoj (nemocní č. 4, 11 a 21). U nemocné č. 4 byly nalezeny v době diagnózy 3 různé klony (tab. 3) a v době relapsu

byla zjištěna přítomnost jen dvou variantních klonů s přídavnými změnami. U nemocné č. 11 byl zjištěn vývoj jednoho nového klonu s variantní t(4;14) – tabulka 4. U nemocné č. 21 se v první progresi objevil k původnímu standardnímu klonu i klon variantní, který byl detekován i v druhé progresi onemocnění (tab. 4).

DISKUSE

Translokace zahrnující IgH gen patří k prvním identifikovaným prognostickým změnám u MM. Jedna z nejčastějších translokací je t(4;14), která je spojována s horší prognózou [9] a s nižší frekvencí se vyskytuje u nemocných MGUS než u nemocných s MM. Tento rozdíl ve frekvenci výskytu t(4;14) u MM a MGUS je zdůvodňován nestabilitou genomu plazmatických buněk

s t(4;14), kdy tato nestabilita vede k rychlejšímu vývoji MM z MGUS a časnějším relapsům [11]. U nemocných s t(4;14) byla dále zjištěna klonální heterogenita a bylo pozorováno, že k relapsu může docházet následkem pomnožení minoritního klonu [19].

V našem souboru nemocných jsme zjistili t(4;14) u 12,4 % nemocných (66 z 533 vyšetřených nemocných). Výsledky uvedené v této práci jsou ve shodě s výsledky dalších autorů, kteří detekovali t(4;14) u 11–20 % nemocných s MM [10, 20]. Z 66 nemocných jsme potvrdili variantní počet signálů t(4;14) u 21 nemocných (32 %).

U 88 % našich nemocných byla zjištěna abnormalita v počtu signálů již při vyšetření přestavby IgH genu. Nejčastěji se jednalo o parciální delece nebo duplikace 3' a 5' konce tohoto genu. Delece v IgH genu jsou často pozorované změny nejen u MM, ale i chronické lymfatické leukemie (CLL) a lymfomů [21, 22]. Delece v IgH genu mohou mít různý rozsah co do velikosti, ale mo-

Tab. 3 Přehled klonálního vývoje a dalších cytogenetických změn u nemocné č. 4.

	1. klon	2. klon	3. klon
	t(4;14) 2FIRIG	t(4;14) 4FIRIG	t(4;14) 4F2R2G
Diagnóza	60 % bez dalších změn	14 % tetrazomie chromozomu 1, trizomie chromozomu 15 a 17	17 % tetrazomie chromozomu 1, 15 a 17
Relaps	0 % klon nenalezen	62 % delece 2 kopií 1p32 delece 1 kopie TP 53	38 % delece 2 kopií 1p32 delece 2 kopií TP 53

Tab. 4 Přehled klonálního vývoje u nemocných č. 11 a č. 21

Nemocný číslo	Diagnóza	1. relaps/ progrese	2. relaps/ progrese
11	1F1R2G 100 %	1F1R2G 54 % 1F1R3G 46%	x
21	2F1R1G 100 %	2F1R1G 79 % 2F1R 19 %	2F1R1G 82 % 2F1R 18 %

hou být jak monoalelické s delecí celého genu *IgH* přes monoalelické a bialelické s delecí pouze 3' a 5' konce až po kombinované delece. Biologický význam *IgH* delecí zůstává stále nejasný, ale předpokládá se, že se jedná o časnou událost při vzniku MM [23].

Delece v *IgH* genu se mohou vyskytovat samostatně nebo mohou být spojeny s výskytem translokací, zejména jejich variantních forem. Někteří autoři uvádějí korelaci delecí v *IgH* genu s delecí *RBI* genu a t(11;14), ale nebyla potvrzena korelace s t(4;14) [23]. V našem souboru jsme pozorovali, že změny v *IgH* genu byly spojeny s variantní t(4;14) a u 73 % nemocných jsme prokázali delecí *RBI* genu společně se změnou v *IgH* genu. Odlišné výsledky mohou být způsobeny odlišným hodnocením změn v *IgH* genu, kdy jsme do změn zahrnuli jak delece, tak také různé formy duplikace části nebo celého *IgH* genu. Na těchto výsledcích jsme potvrdili, že nálezy abnormálních signálů *IgH* genu často maskují přítomnost translokace, často s variantním počtem signálů, proto je nutné, aby kromě vyšetření genu *IgH* byla použita i translokační sonda (např. pro t(4;14)) k odhalení maskovaných translokací s variantním počtem signálů.

Analýza genů *FGFR3* a *MMSET* potvrdila změny u 12/21 nemocných s variantním nálezem počtu signálů při vyšetření t(4;14). Jednalo se o samostatnou delecí genu *FGFR3* (3 nemocní), delecí genu *FGFR3* i delecí genu *MMSET* (3 nemocní), zmnožení počtu signálů genu *MMSET* i *FGFR3* (1 nemocný) nebo zmnožení počtu signálů jen samostatného genu *MMSET* (2 nemocní), z toho u jedné nemocné byla prokázána duplikace 3' konce *IgH* genu a zmnožení genu *MMSET*. Tento nálezy odpovídá inserci 3' konce *IgH* genu do genu *MMSET* a tím vzniku t(4;14) s variantním počtem signálů. U 3 nemocných byly pozorovány početní změny chromozomu 4 společně se zvýšením počtu fúzních signálů potvrzující t(4;14). Současné literární údaje v souvislosti se změnami genů *FGFR3* a *MMSET* nejčastěji zmiňují delecí genu *FGFR3*, která je důsledkem různě velkých delecí až monozomií derivovaného chromozomu 14, která je pozorována až u 30 % nemocných [24, 25]. Naopak u všech nemocných s t(4;14) je popisována zvýšená exprese genu *MMSET*, a proto se předpokládá klíčová role genu *MMSET* v patogenezi tohoto subtypu MM [24]. Normální nálezy v ge-

nech *FGFR3* a *MMSET* byly pozorovány u 9 nemocných, u těchto nemocných je vznik variantní t(4;14) je spojen s delecí v *IgH* genu, zejména jeho 5' konce.

U 3 z 9 nemocných vyšetřených opakovaně v době relapsu/progrese onemocnění byl pozorován klonální vývoj. U dvou nemocných došlo ke klonálnímu vývoji z původního variantního nebo standardního klonu s t(4;14). U těchto nemocných lze považovat tento vývoj za lineární vývoj původního klonu nalezeného v době diagnózy, stejně jako je uvedeno v literatuře [26, 27]. Naopak u poslední nemocné s klonálním vývojem se jedná o intraklonální heterogenitu [28, 29].

Vzhledem k velikosti souboru pacientů s variantním nálezem translokace t(4;14) a délce sledování souboru není možné se jednoznačně vyjádřit ke klinickému významu variantních nálezů translokace t(4;14). Na základě literárních údajů je přítomnost více klonů odrazem nestability genomu, která je spojena s nepříznivou prognózou [11, 26].

ZÁVĚR

V souboru 533 nemocných s MM byla t(4;14) potvrzena u 66 (12,4 %) nemocných, z toho u 21 (32 %) nemocných byla zjištěna abnormalita v počtu signálů. Naše výsledky souboru 21 nemocných s MM s variantním nálezem počtu signálů při určení prognosticky středně nepříznivé translokace t(4;14) upozorňují na existující heterogenitu nálezů při použití interfázní metody FICTION. Translokace t(4;14) je spojena nejen se změnami počtu signálů, které jsou odrazem i parciálních delecí genu *IgH*, ale i se změnami, jako jsou delece nebo zmnožení genů *FGFR3* i *MMSET* při vzniku translokace. Práce upozorňuje na úskalí vyšetření pouze sondou pro určení přestavby genu *IgH*, kde delece nebo parciální delece mohou maskovat přítomnost translokace a tím její určení. Přesný klinický význam variantních nálezů zůstává nejasný, ale upozorňuje na genetickou heterogenitu, která může přispívat ke klinické heterogenitě nemocných. Ukázali jsme, že v našem souboru měli všichni nemocní přídatné chromozomové změny, nejčastěji delecí *RBI* genu (76 % nemocných). Další analýzy velkých souborů nemocných mohou přispět k přesnému učení biologického i klinického významu těchto změn.

LITERATURA

- Fonseca R. Many and multiple myeloma(s). *Leukemia* 2003; 17: 1943–1944.
- Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 2004; 64: 1546–1558.
- Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A, et al. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined

significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. Cancer Res 1999; 59: 4546–4550.

4. Bergsagel PL, Mateos MV, Gutierrez NC, Rajkumar SV, San Miguel JF. Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma. Blood 2013; 121: 884–892.

5. Prideaux SM, Conway O'Brien E, Chevassut TJ. The genetic architecture of multiple myeloma. Adv Hematol 2014; 2014: 864058.

6. Boyle EM, Proszek PZ, Kaiser MF, et al. A molecular diagnostic approach able to detect the recurrent genetic prognostic factors typical of presenting myeloma. Genes Chromosomes Cancer 2014; 54: 91–98.

7. Rajan AM, Rajkumar SV. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. Blood Cancer J 2015; 5: e365.

8. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. Blood 2004; 104: 607–618.

9. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. Mayo Clin Proc 2013; 88: 360–376.

10. Martinez-Garcia E, Popovic R, Min DJ, et al. The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. Blood 2011; 117: 211–220.

11. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, et al. Intraclonal heterogeneity and distinct molecular mechanisms characterize the development of t(4;14) and t(11;14) myeloma. Blood 2012; 120: 1077–1086.

12. Xie Z, Chng WJ. MMSET: role and therapeutic opportunities in multiple myeloma. Biomed Res Int; 2014: 636514.

13. Kalff A, Spencer A. The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies. Blood Cancer J 2012; 2: e89.

14. Avet-Loiseau H. Ultra high-risk myeloma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program; 2010: 489–493.

15. Jarosova M, Holzerova M, Mihal V, et al. Complex karyotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: cytogenetic and molecular cytogenetic study of 21 cases. Cancer Genet Cytogenet 2003; 145: 161–168.

16. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. Blood 2002; 100: 1417–1424.

17. Ahmann GJ, Jalal SM, Juneau AL, et al. A novel three-color, clone-specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. Cancer Genet Cytogenet 1998; 101: 7–11.

18. Balcárková J, Procházková K, Ščudla V, et al. Molekulární cytogenetická analýza plazmatických buněk u pacientů s mnohočetným myelomem. Tranfúze a Hematologie dnes 2007; 4: 176–182.

19. Hebraud B, Caillot D, Corre J, et al. The translocation t(4;14) can be present only in minor subclones in multiple myeloma. Clin Cancer Res 2013; 19: 4634–4637.

20. Neben K, Jauch A, Bertsch U, et al. Combining information regarding chromosomal aberrations t(4;14) and del(17p13) with the International Staging System classification allows stratification of myeloma patients

undergoing autologous stem cell transplantation. Haematologica 2009; 95: 1150–1157.

21. Wlodarska I, Matthews C, Veyt E, et al. Telomeric IGH losses detectable by fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia reflect somatic VH recombination events. J Mol Diagn 2007; 9: 47–54.

22. Pospisilova H, Baens M, Michaux L, et al. Interstitial del(14)(q) involving IGH: a novel recurrent aberration in B-NHL. Leukemia 2007; 21: 2079–2083.

23. He H, Fu W, Jiang H, et al. The clinical characteristics and prognosis of IGH deletion in multiple myeloma. Leuk Res 2015; 39: 515–519.

24. Mirabella F, Wu P, Wardell CP, et al. MMSET is the key molecular target in t(4;14) myeloma. Blood Cancer J 2013; 3: e114.

25. Nahi H, Sutlu T, Jansson M, Alici E, Gahrton G. Clinical impact of chromosomal aberrations in multiple myeloma. J Intern Med 2011; 269: 137–147.

26. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. Blood 2012; 120: 1067–1076.

27. Bianchi G, Munshi NC. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. Blood 2015; 125: 3049–3058.

28. Brioli A, Melchor L, Cavo M, Morgan GJ. The impact of intra-clonal heterogeneity on the treatment of multiple myeloma. Br J Haematol 2014; 165: 441–454.

29. Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Gouraud W, et al. Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. Leukemia 2013; 27: 473–481.

Podíl autorů na rukopisu

J. Balcárková a MJ – napsání rukopisu.

J. Balcárková, MM a PM – provádění vyšetření.

VŠ, JM, TP a J. Bačovský – diagnostika, léčba a odběry materiálu.

Poděkování

Práce byla podporovaná grantem IGA MZČR NT/14400-3, IGA_LF_2016_001.

Čestné prohlášení autorů

Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

Doručeno do redakce dne 16. 3. 2016.

Přijato po recenzi dne 14. 7. 2016.

Mgr. Jana Balcárková, Ph.D.

Hemato-onkologická klinika
Fakultní nemocnice Olomouc
I. P. Pavlova 185/6
779 00 Olomouc
e-mail: jana.balcarkova@fnol.cz