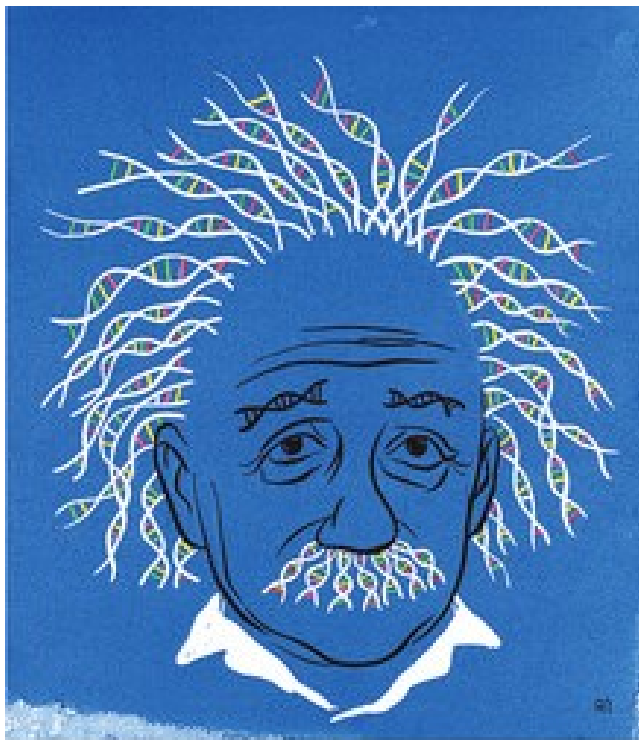


NGS analýza u MGUS a MM

Aneta Mikulášová

**Brian A. Walker, Christopher P. Wardell, Markéta Wayhelová,
Petr Kuglík, Roman Hájek, Gareth J. Morgan**

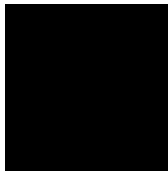


*XII. Workshop mnohočetný myelom a Roční setkání
České myelomové skupiny*

Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, ČR

BMS, Ústav patologické fyziologie
Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, ČR

Division of Molecular Pathology
Institute of Cancer Research, London, UK



Babak Myeloma Group
Dept. of Pathological Physiology
Faculty of Medicine, Masaryk University



Monoklonální gamapatie (MG)

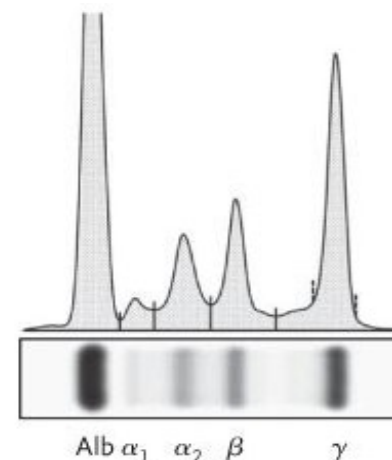
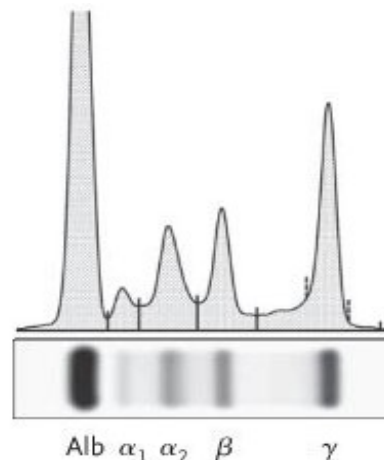
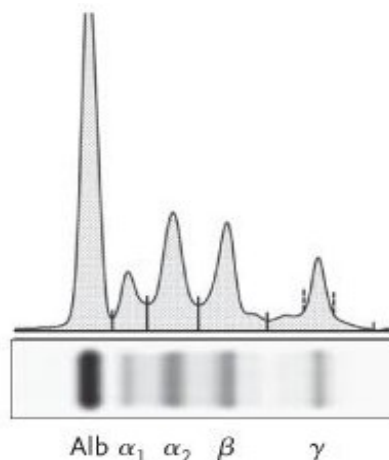
MGUS → SMM → MM

Monoklonální gamapatie
nejasného významu

Doutnající mnohočetný
myelom

Mnohočetný myelom

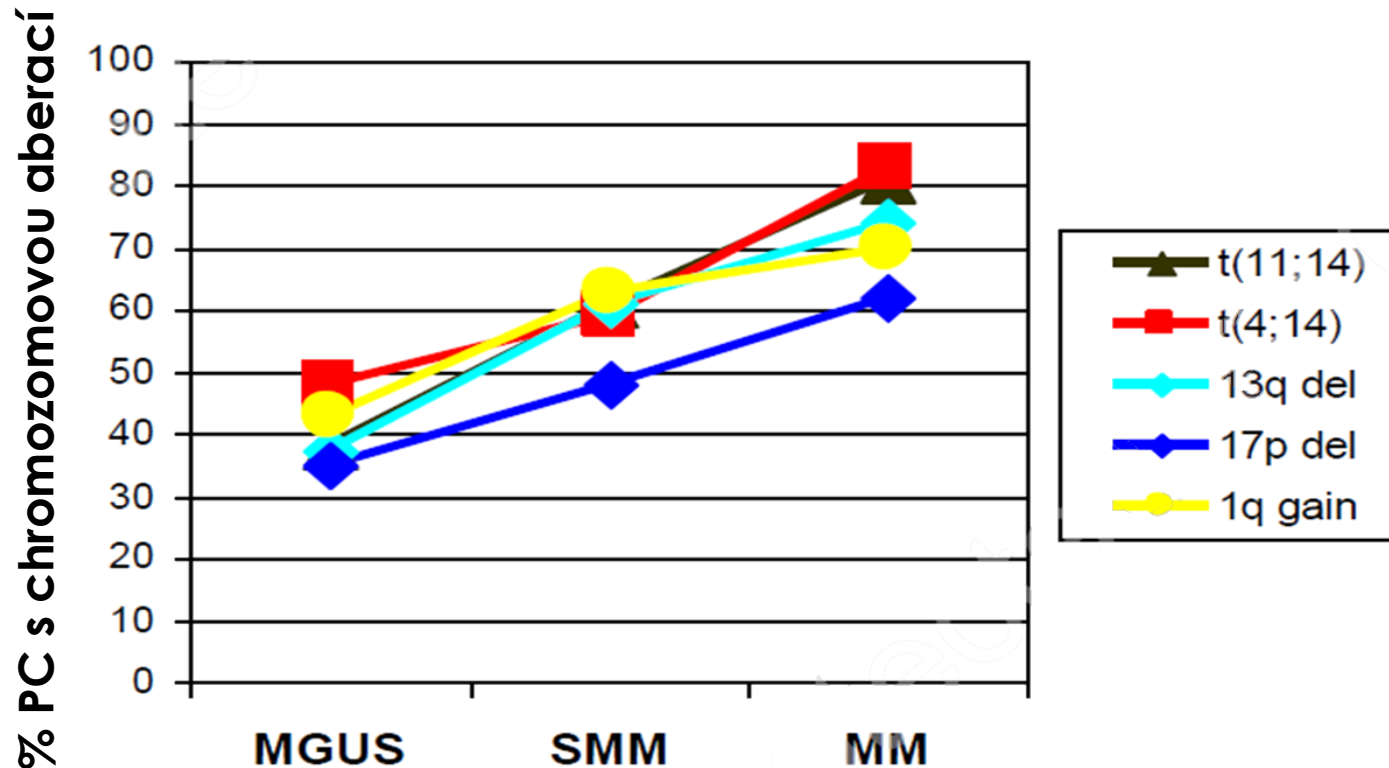
Elektroforéza
proteinů séra



Charakteristika	MGUS	SMM	MM
% PC v kostní dřeni	<10	≥10	≥10
Sérový M-Ig (g/dL)	<3	≥3	≥3
Klinická manifestace	Není přítomna	Není přítomna	Přítomna

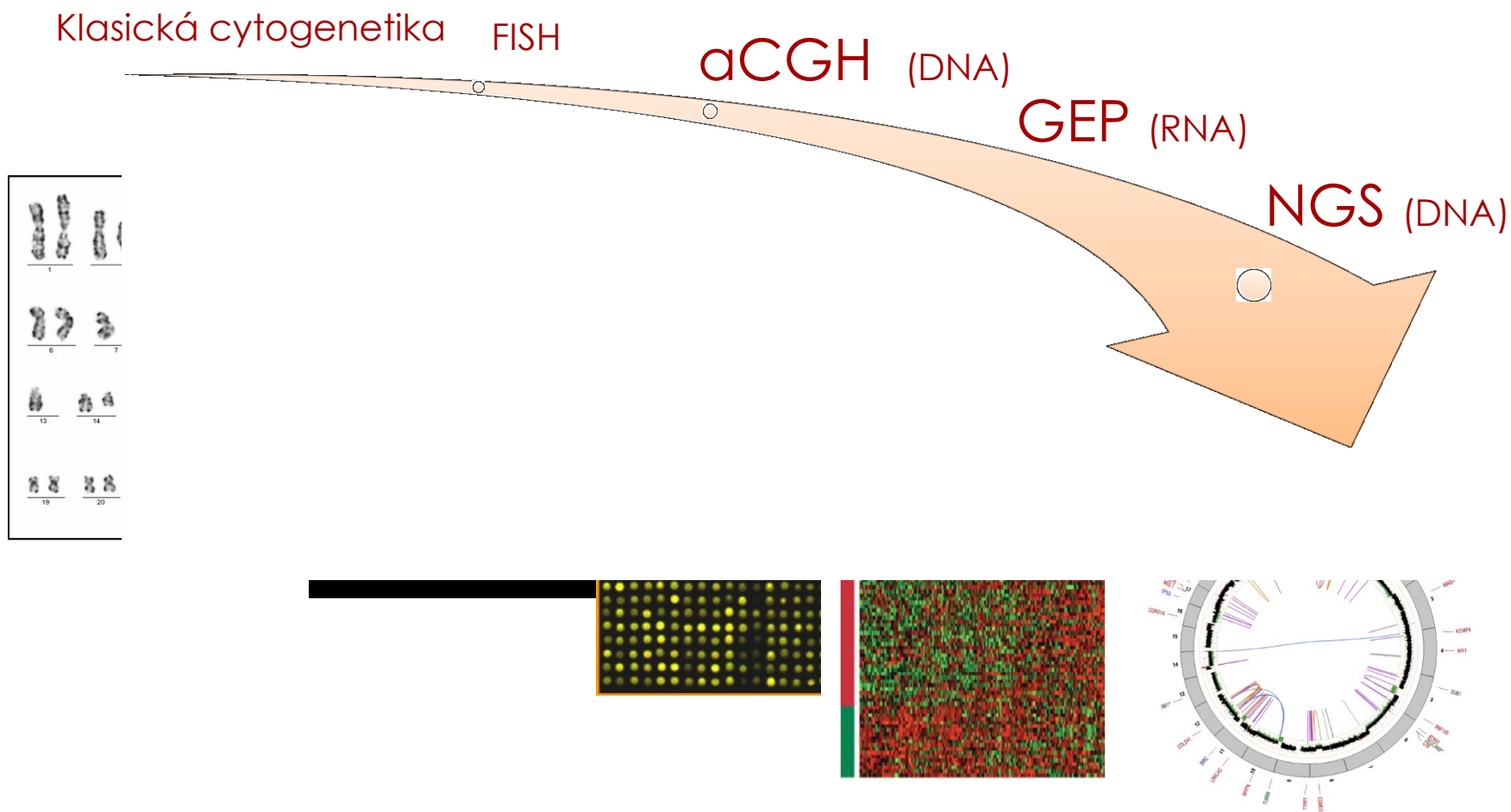
Chromozomové aberace u MGUS

Medián procenta PC nesoucích chromozomové aberace u MGUS, SMM a MM



Klonální expanze geneticky abnormálních PC během maligní transformace z MGUS do MM.

Molekulárně-genetické metody u MG



Cíl studie

Analýza **somatických genových mutací (SNVs)** pomocí NGS a **nebalancovaných chromozomových abnormalit (CNAs)** pomocí aCGH s cílem popsat komplexní genetickou instabilitu na genové a chromozomové úrovni.

Srovnávací soubory pacientů s MM:

91 MM analyzováno pomocí aCGH
(Smetana *et al.* 2014)

463 MM analyzováno pomocí NGS
(Walker *et al.* 2014)



Metody

Periferní krev

Kostní dřeň

Abnormální PC - separace

CD138⁺CD19⁻CD56^{+/-}

FACSAria (BD Biosciences)

izolace DNA

izolace DNA, **celogenomová amplifikace**

Exomové sekvenování

SNP arrays

SureSelect Human All Exom V5 (Agilent)
obohaceno geny: *IGH*, *IGK*, *IGL* and *MYC*
HiSeq 2000 (Illumina), 4 vzorky současně,
fragmenty čteny oboustranně v délce 76-bp

SurePrint G3 CGH+SNP, 4x180K (Agilent)
Microarray Scanner (Agilent)

Analýza dat

SNP array – analýza dat: Feature Extraction Software, Genomic Workbench (both Agilent)

Exom data – prohlížení: Integrative Genomics Viewer (Broad Institute)

Exom data – nástroje a algoritmy: FastQC, BWA/Stampy, GATK, Picard (Broad Institute)

Exom data – analýza dat: MuTect, Indelocator, SnpEff, MutSigCV (Broad Institute)

Základní statistika: Statistica (StatSoft), MedCalc (MedCalc Software)

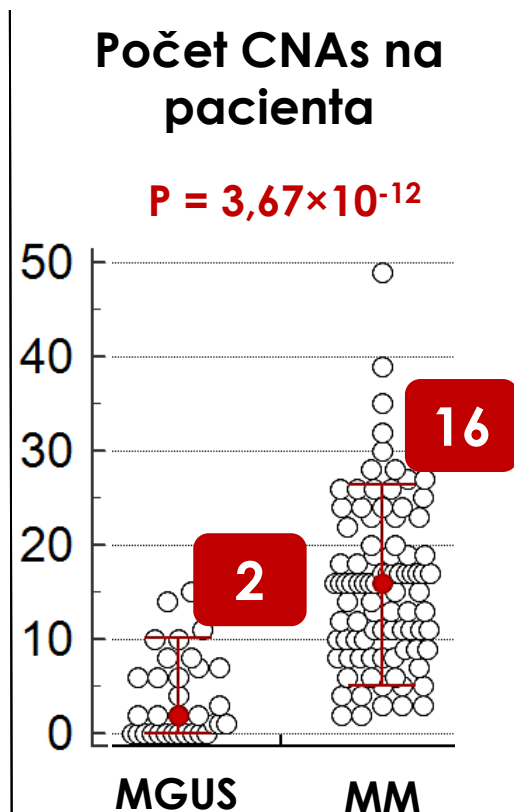
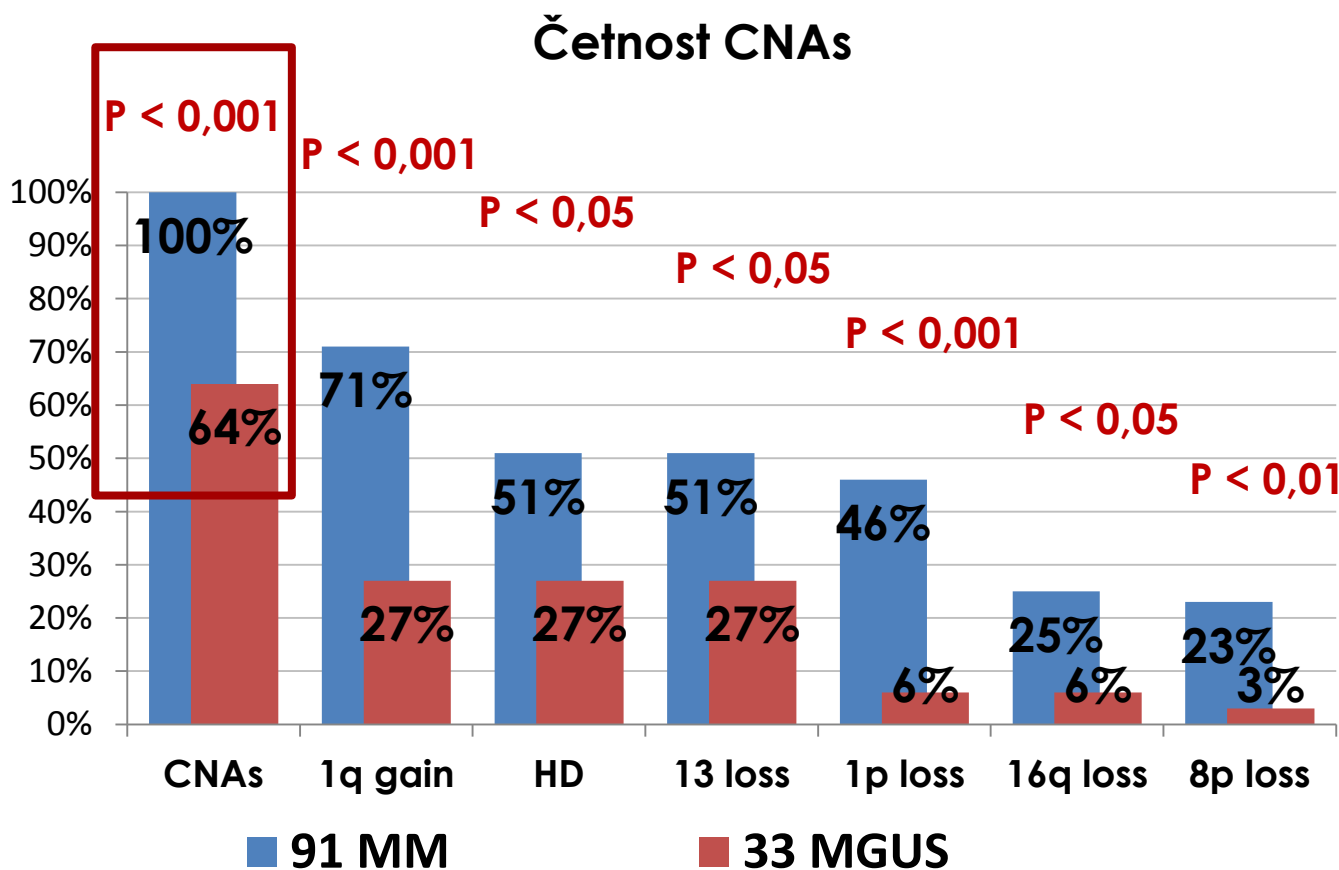
33 pacientů s MGUS

Charakteristika	N = 33
Medián věku (rozsah)	61 (35-86)
Pohlaví - poměr (M:F)	1,5:3
Izotyp	
IgG	70 % (N = 23)
IgA	18 % (N = 6)
IgM	6 % (N = 2)
Biklonální	3 % (N = 1)
Pouze lehké řetězce	3 % (N = 1)
Sérový M-Ig	
< 15 g/l	88 % (N = 29)
≥ 15 g/l	12 % (N = 4)
% PC v kostní dřeni	
< 5 %	85 % (N = 28)
≥ 5 %	15 % (N = 5)
Poměr kappa/lambda (FLC) v séru	
Normální	51,5 % (N = 17)
Abnormální	45,5 % (N = 15)
nd	3 % (N = 1)



Výsledky 1: Celogenomová profilace CNAs

Srovnání 33 MGUS a 91 MM vyšetřených pomocí aCGH (Smetana et al. 2014)



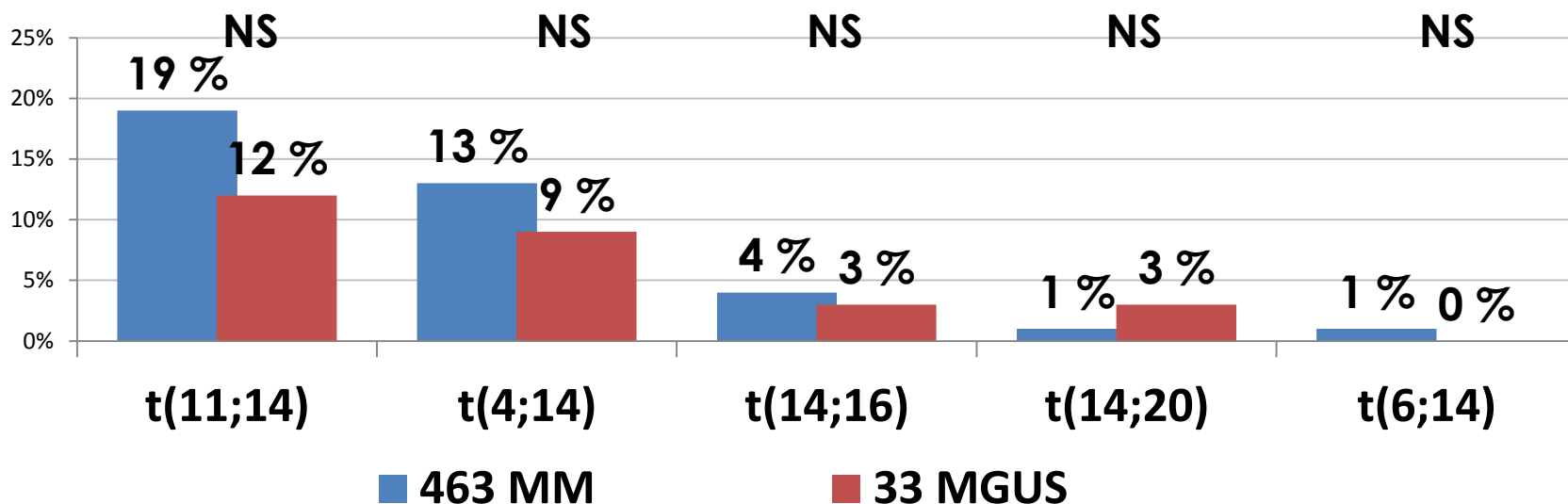
U MGUS nalezena vysoká heterogenita, podobné nálezy jako u MM, avšak CNAs přítomny v menší četnosti

Výsledky 2: Chromozomové translokace

Srovnání 33 MGUS a 463 MM vyšetřených pomocí NGS (Walker et al. 2014)

Translokace zahrnující gen *IGH* (14q32.33) jsou přítomny v podobné frekvenci u MGUS jako u MM

=> PRIMÁRNÍ GENETICKÁ UDÁLOST



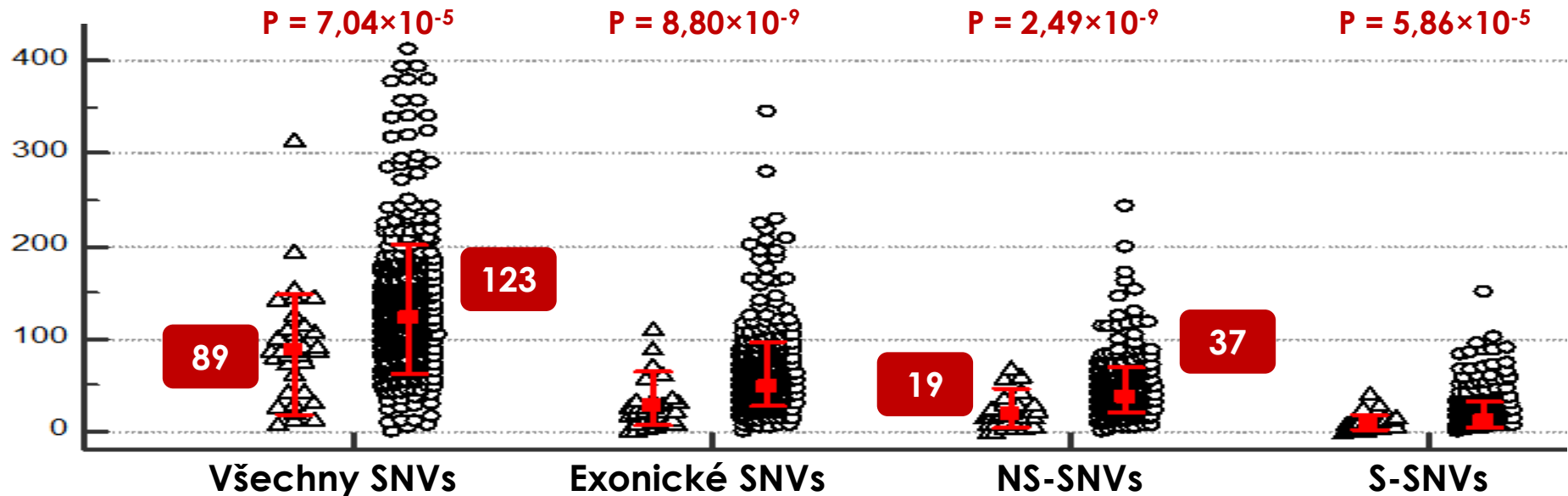
Žádný případ MGUS s translokací zahrnující geny *MYC* (8q24.21), *IGK* (2p12) a *IGL* (22q11.2)

Výsledky 3: Somatické genové mutace

Srovnání 33 MGUS a 463 MM vyšetřených pomocí NGS (Walker et al. 2014)

	MGUS	MM
Všechny SNVs	100 % (33/33)	100 % (463/463)
NS-SNVs	97,0 % (32/33)	98,8 % (462/463)

△ MGUS
○ MM



Somatické mutace jsou přítomny u všech pacientů s MGUS, ale ve významně nižším množství v porovnání s pacienty s MM

Výsledky 3: Somatické genové mutace

Srovnání **33 MGUS** a **463 MM** vyšetřených pomocí NGS (Walker et al. 2014)

6 genů, které jsou významně mutovány u MM

MGUS	Gen	Mutace
1	<i>EGR1</i> <i>LTB</i>	c.85A>C (p.M29L) c.167C>T (p.T56M)
2	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i>	c.182A>T (p.Q61) c.37G>C (p.G13R)
3	<i>HIST1H1E</i> <i>HIST1H1E</i> <i>PRKD2</i>	c.169G>C (p.V57L) c.266G>C (p.S89T) c.1697A>G (p.Y566C)
4	<i>KRAS</i>	c.436G>A (p.A146T)
5	<i>HIST1H1E</i> <i>DIS3</i>	c.193G>C (p.A65P) c.1462G>A (p.D488N)

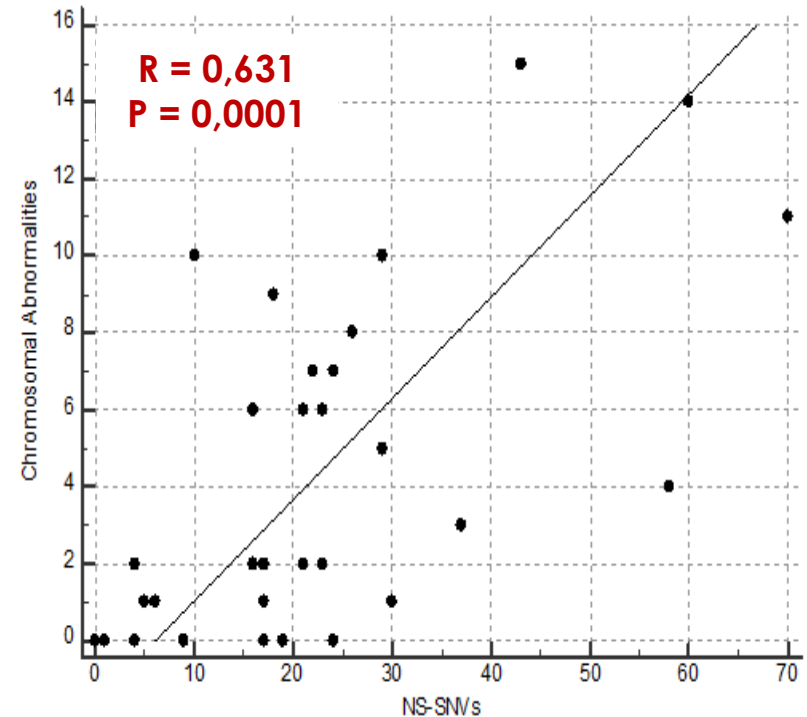
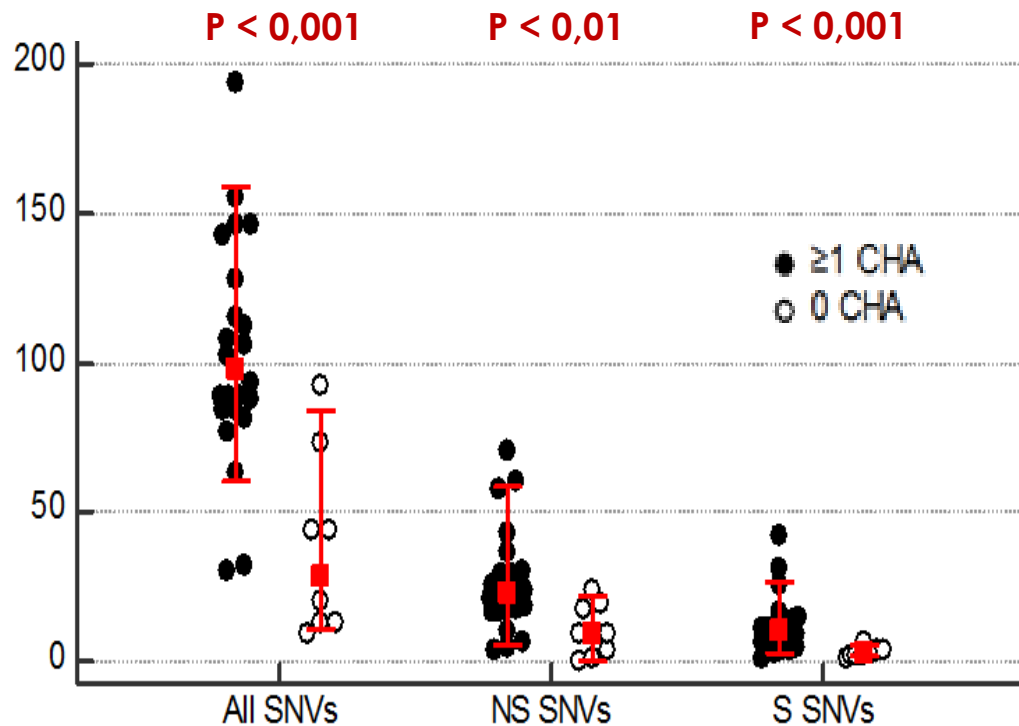
KRAS
NRAS
HIST1H1E
DIS3
EGR1
LTB

Geny s negativním dopadem na přežívání pacientů s MM:

TP53, ATM, ATR, ZFX4 = geny zapojené do reparace DNA – **nepřítomny**

CCND1 – 1 případ s **MGUS** s 2 mutacemi (p.K50T, p.E51D)

Výsledky 4: SNVs vs. chromozomové aberace



Genetická instabilita je formována současně na genové i chromozomové úrovni

Pozitivní korelace zvyšujícího se počtu CNAs a SNVs

Závěr

- Genetická instabilita je u pacientů s MGUS formována na obou úrovních (genové a chromozomové)
 - V porovnání s MM:
Kvalitativně: u MGUS se vyskytují podobné genetické události
Kvantitativně: četnost a množství CNAs/SNVs je u pacientů s MGUS významně menší
 - **SNVs u 100 % vs. CNAs u 64% pacientů s MGUS**
hypotéza: genové mutace předchází změnám na chromozomové úrovni
 - Pozitivní korelace zvyšujícího se počtu SNVs a CNAs
-
- Je prognóza na molekulární úrovni otázkou kvality nebo pouze kvantity genetické instability?

...pro získání odpovědi je nutné analyzovat větší soubor jedinců s MGUS

Babak Myeloma Group,
Dep. of Pathological
Physiology,
Faculty of Medicine, MU

Ševčíková Sabina

Bešše Lenka
Kubaczková Veronika
Sedlaříková Lenka
Gromesová Barbora
Stanková Monika
Kutálková Kateřina
Bollová Božena

Dep. of Clinical Hematology,
Faculty Hospital Brno
Penka Miroslav



Almáši Martina
Bezděková Renata
Hanáková Božena
Říhová Lucie
Sáblíková Barbora
Suská Renata
Štouračová Marcela
Všianská Pavla

The Institute of Cancer
Research
London, UK

Morgan Gareth J.
Wardell Christopher P.
Walker Brian A.
Kaiser Martin
Boyle Eileen M.

Dep. of Internal Medicine -
Hematooncology

Faculty Hospital Brno

Adam Zdeněk
Krejčí Marta
Pour Luděk



Dep. of Clinical Hematology
Faculty Hospital Ostrava

Hájek Roman

Jelínek Tomáš
Kryukov Fedor
Kryukova Elena
Kuřová Zuzana



Laboratory of molecu.
cytogenetics



Dep. of Experimental Biology,
Faculty of Science, MU

Kuglík Petr

Mikulášová Aneta
Smetana Jan
Wayhelová Markéta

Institute of biostatistics
and analysis

Jarkovský Jiří
Brožová Lucie
Budinská Eva
Ihnatová Ivana

