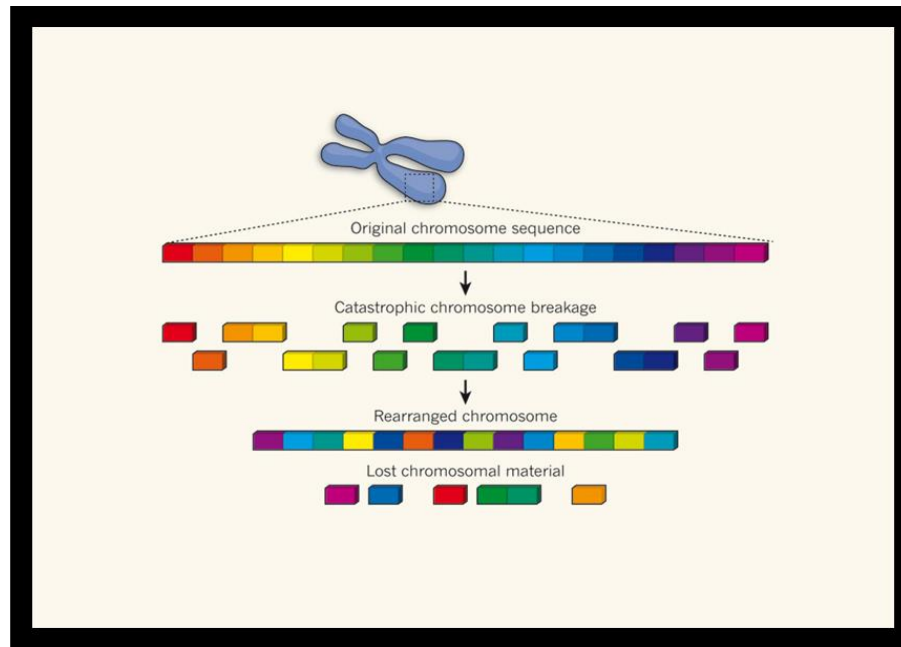


# Chromothripsis aneb chromozomy v krizi



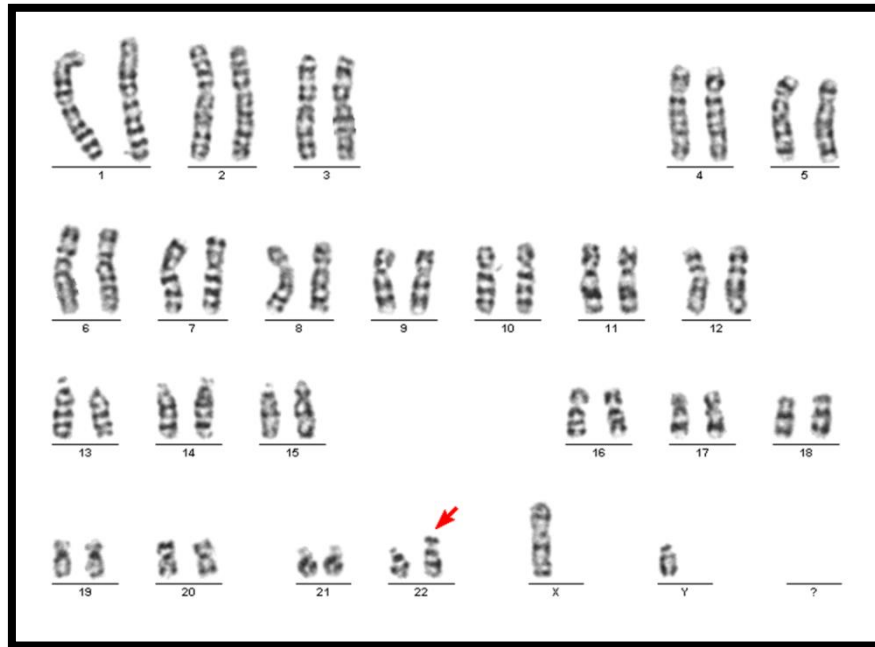
*Petr Kuglík*

*Oddělení genetiky a molekulární biologie, ÚEB  
Přírodovědecká fakulta MU, Brno*

# Klinická cytogenetika v roce 2018



?



5-10 Mb

**Celogenomové metody**

DNA čipy

Masivně paralelní sekvenování



1 pb

# Chromozomové aberace u člověka – zdravotní důsledky

**A) vrozené CHA:** 50 – 60 % abortů v I. trimestru...

- poškození chromozomů se vyskytuje u 0,56 % živě rozených dětí →

VVV, psychomotorická retardace, stigmata, obezita, sterilita, hypoplázie varlat, amenorhea, sterilita...

**CHROMOZOMOVÉ SYNDROMY** (mikrodelece, mikroduplikace)

**B) získané CHA:**

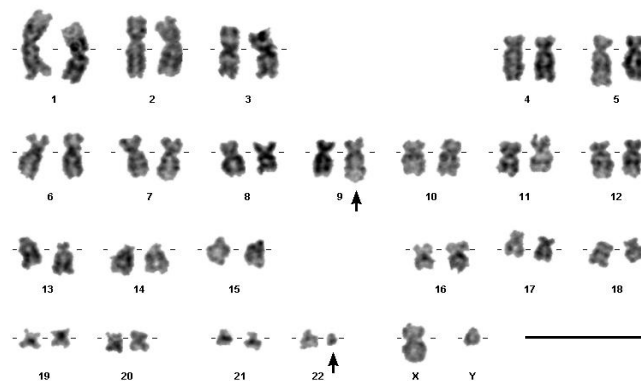
- genetická toxikologie (2 – 5 % AB.B. normál)
- **ONKOCYTOGENETIKA** → studium získaných chromozomových změn v buňkách nádorů (leukémie, solidní nádory)

# Vývoj nádorové cytogenetiky (klasická cytogenetika)

David Hanseman (1890)  
Theodor Boveri (1914)



Nowell a Hungerford (1960)

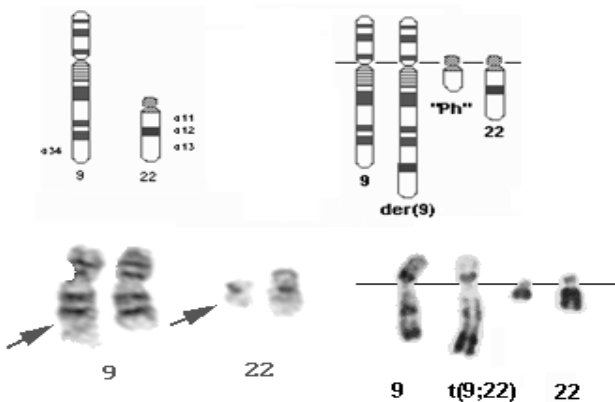


*Ph* chromozom

Tjio a Levan (1956)



Rowleyová (1973)





***A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 132, 1960, 1497.***

**PC Nowell, DA Hungerford,  
University of Pennsylvania in  
Philadelphia**

#### **A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia**

In seven cases thus far investigated (five males, two females), a minute chromosome has been observed replacing one of the four smallest autosomes in the chromosome complement of cells of chronic granulocytic leukemia cultured from peripheral blood. No abnormality was observed in the cells of four cases of acute granulocytic leukemia in adults or of six cases of acute leukemia in children. There have been several recent reports of chromosome abnormalities in a number of cases of human leukemia [including two of the seven cases reported here: Nowell and Hungerford, *J. Natl. Cancer Inst.* 25, 85 (1960)], but no series has appeared in which there was a consistent change typical of a particular type of leukemia.

Cells of the five new cases were obtained from peripheral blood (and bone marrow in one instance), grown in culture for 24-72 hours, and processed for cytological examination by a recently developed air-drying technique (Moorhead, *et al.*, *Exptl. Cell Research*, in press). The patients varied from asymptomatic untreated cases to extensively treated

cases of several years duration in terminal myeloblastic crisis. All seven individuals showed a similar minute chromosome, and none showed any other frequent or regular chromosome change. In most of the cases, cells with normal chromosomes were also observed. Thus, the minute is not a part of the normal chromosome constitution of such individuals.

The findings suggest a causal relationship between the chromosome abnormality observed and chronic granulocytic leukemia.

PETER C. NOWELL

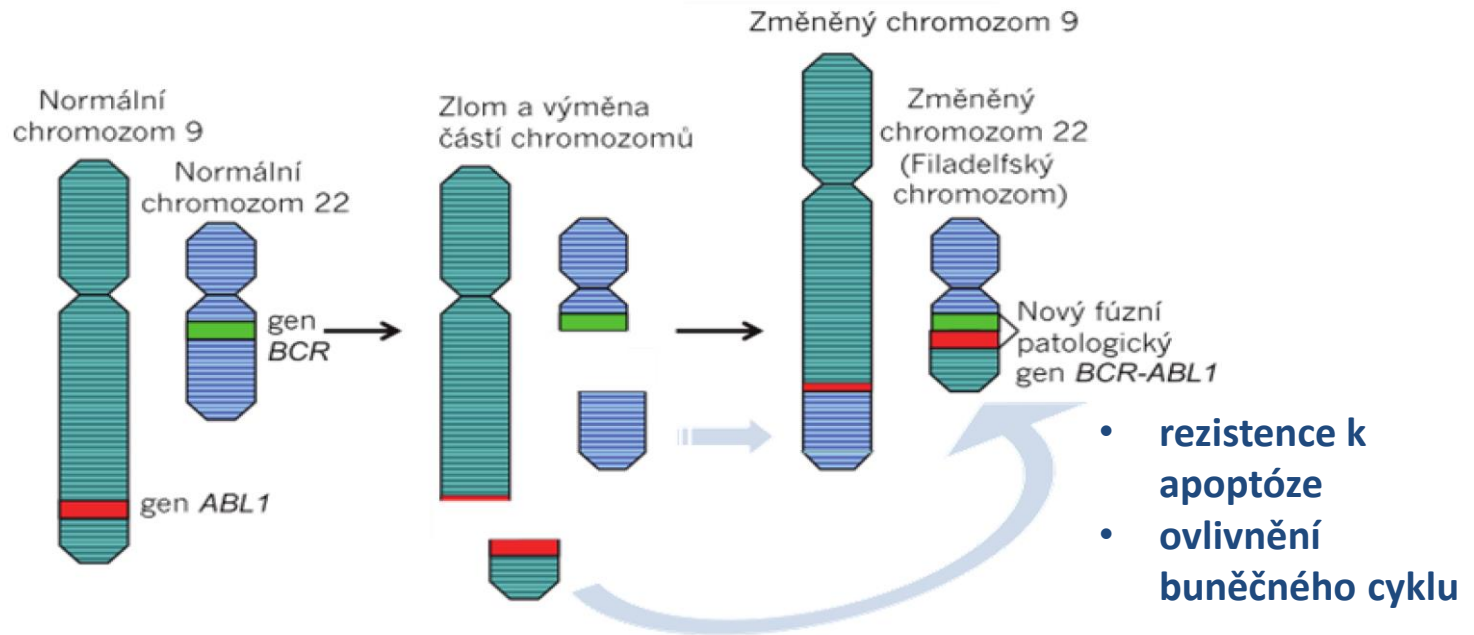
*School of Medicine,  
University of Pennsylvania*

DAVID A. HUNGERFORD  
*Institute for Cancer Research*

# 1960

**...the findings suggest a  
causal relationship  
between the chromosome  
abnormality observed  
and chronic granulocytic  
leukemia...**

# Vznik Filadelfského chromozomu a fúzního genu BCR – ABL po translokaci



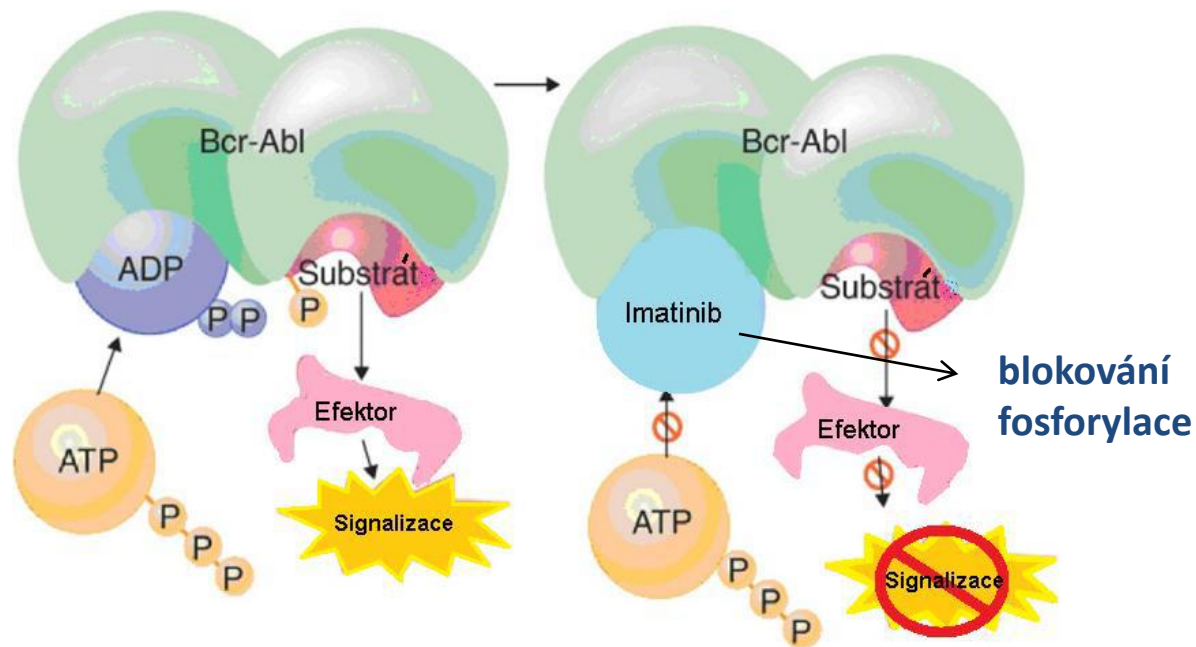
Chronická myeloidní leukémie (CML) - 25% všech leukémií dospělého věku s incidencí 1-2 případy na 100 000 obyvatel

**Ph chromozom - 95 % pacientů s CML**

# 1998 - klinické zkoušky léku STI 571 (Glivec – Novartis) - inhibitor TK



*Ph* chromozom

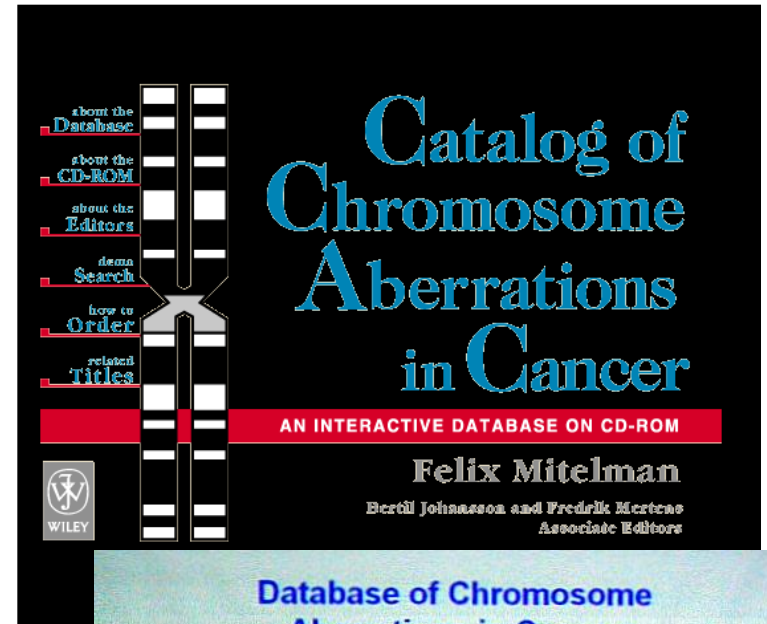
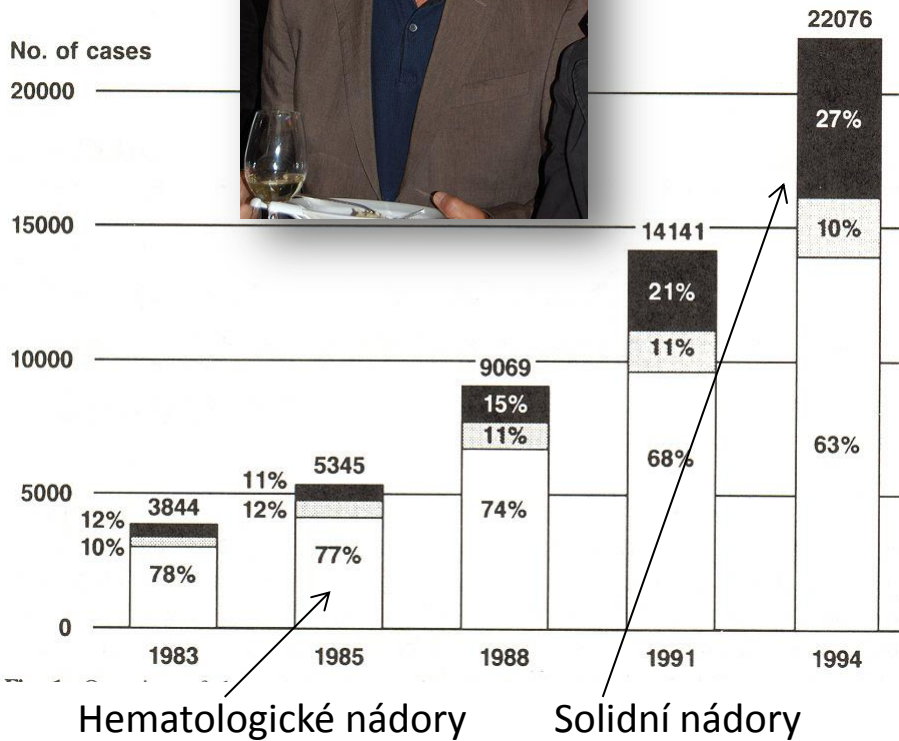


CML t(9;22)

**Tyrozinkinázové inhibitory - imatinib, dasatinib a nilotinib -  
model moderní ne cytostatické léčby maligních chorob !**

**Personalizovaná medicína !!!**

# Vývoj nádorové cytogenetiky – rychleji se rozvíjela cytogenetika hematologických malignit !



Database of Chromosome Aberrations in Cancer (July 1, 2009)

Hematological disorders	42,193	(74%)
Mesenchymal tumors	9,277	(16%)
Epithelial tumors	5,545	(10%)
<b>Total</b>	<b>57,016</b>	

**Felix Mitelman: „Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer“ popsáno více než 30 000 případů a 100 000 aberací !!!**



# Úloha cytogenetického vyšetření v onkologii

- nedílná součást určitých onkologických vyšetření (vstupní vyšetření) u vyšetření u hematologických i některých solidních nádorů
- cytogenetické a molekulárně genetické metody používané v onkologii jsou součástí diagnostiky a léčby mnoha malignit ve smyslu:
  - upřesnění diagnózy, stanovení prognózy
  - stratifikace pacientů, stanovení léčebné strategie
  - diferenciální diagnostiky
  - monitorování léčby (predikce citlivosti na léčbu)
  - sledování reziduální choroby po transplantaci
  - předpověď pravděpodobného vývoje onemocnění
  - sledování klonálního vývoje
- význam cytogenetického a molekulárně genetického vyšetření u hematologických malignit je zdůrazněn i v klasifikaci myeloidních některých nádorových chorob, kde jsou vyčleněny samostatné jednotky se specifickými genetickými změnami

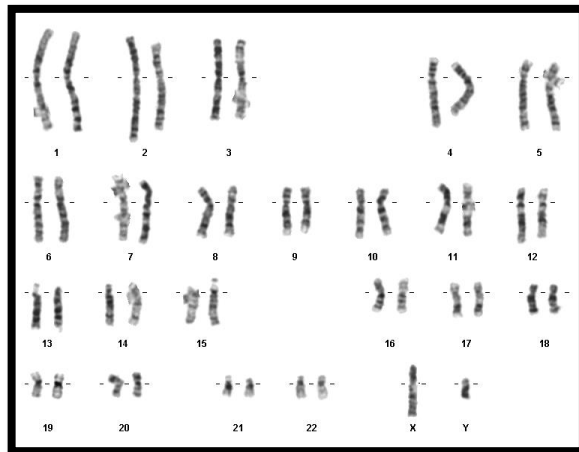
# Příklady chromozomových aberací vyšetřovaných u některých nádorů

Onemocnění	Chromozómová změna	Místa zlomu nebo delece
<b>LEUKÉMIE</b>		
Chronická myeloidní leukemie	t(9;22)	9q34;22q11
Akutní myeloidní leukemie M1	t(9;22)	9q34;22q11
M2	t(8;21)	8q22;21q22
M3	t(15;17)	15q22;17q11
M4	inv(16)	16p13q22
M4, M5	t(9;11)	9p22;11q23
M1, M2, M4, M5, M6	del(5q)	del(5)(q13q33)
	+8	
Chronická lymfocytární leukemie	+12, 13q-, 17p-	
	t(11;14)	11q13;14q32
Akutní lymfocytární leukemie		
L1 - L2	t(9;22)	9q34;22q11
L2	t(4;11)	4q21;11q23
L3	t(8;14)	8q24;14q32
	t(8;22)	8q24;22q11
<b>LYMFOMY</b>		
Burkittův lymfom	t(8;14)	8q24;14q32
<b>SOLIDNÍ NÁDORY</b>		
Diseminovaný neuroblastom	del(1p)	1p31p36
Malobuněčný karcinom plic	del(3p)	3p14p23
Retinoblastom, familiární, sporadický	del(13q)	13q14
Aniridie-Wilmsův tumor	del(11p)	11p13

# Cytogenetické a molekulárně-cytogenetické metody používané v onkocytogenetice

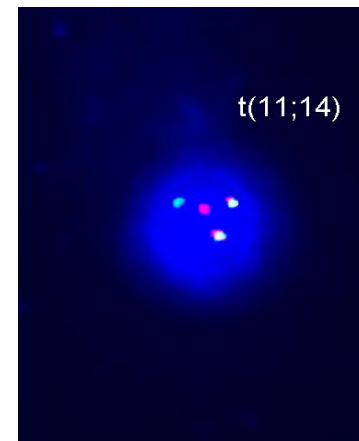
## Metafázní cytogenetika

G-pruhování 5-10 Mb

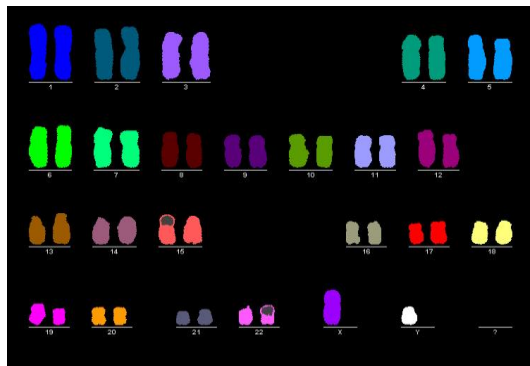


## Interfázní cytogenetika

I-FISH 100 kb (LSI Probe)



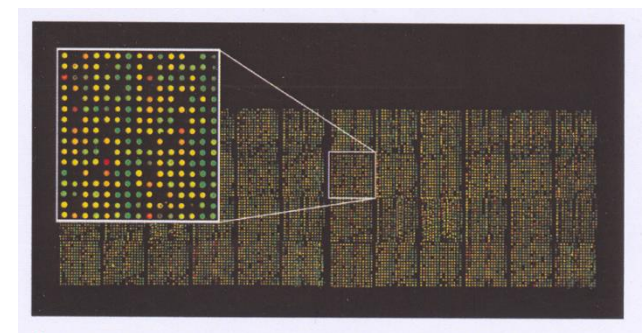
M-FISH 0,5-1,5 Mb



M-BAND



Array-CGH  
cca 100 kb



# Příklad - vyšetření karyotypu - krátkodobá kultivace buněk kostní dřeně

sterilní odběr kostní dřeně do odběrového média nebo PBS



nasazení vzorku do kultivačního média obohaceného sérem



zpracování po 2 hodinách nebo kultivace 24 až 48 hodin



zastavení dělení buněk kolchicinem



zpracování kultivace

↓ hypotonie (0,075 M KCl)

↓ fixace (metanol:kys. octová 3:1)

↓ opakování fixace



příprava preparátů



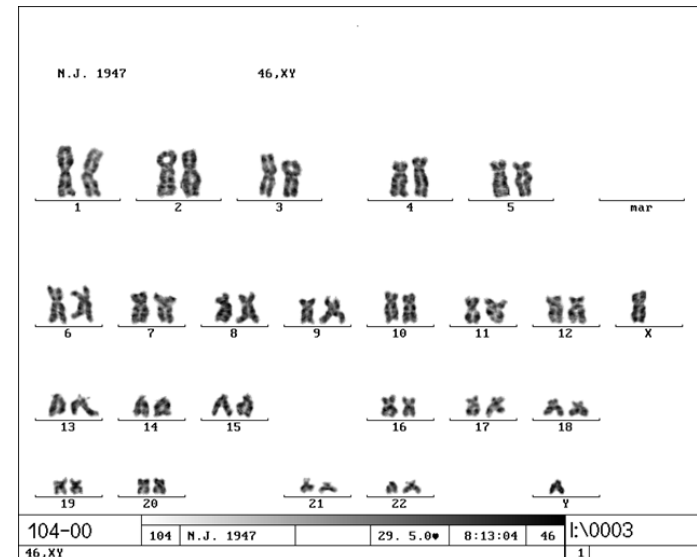
barvení preparátů (G- pruhování)



hodnocení nejméně **20 G -pruhovaných mitóz**

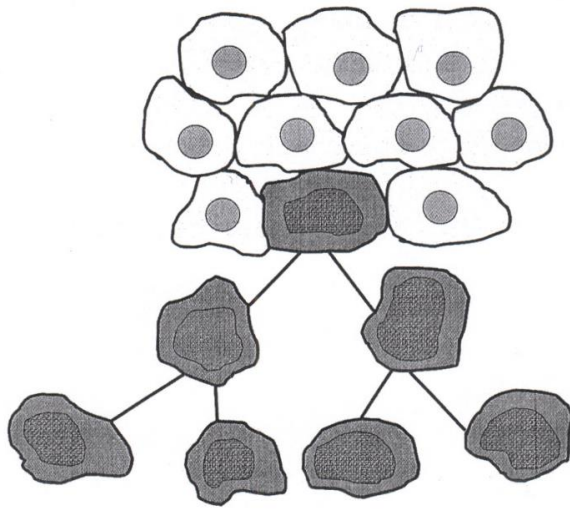


Minimum 0,5 ml kostní dřeně



# Chromozomové aberace u nádorů jsou klonální...

Vznik patologického buněčného klonu (převzato od F. Mitelmana, Bertinoro, 2004).



## Definice klonu

- ve 3 mitózách **chybí stejný chromozom**
- ve 2 mitózách **je stejný nadpočetný chromozom nebo stejná strukturální aberace**

- buněčné populace nádorů jsou sestaveny z **heterogenních** buněk...
- většina změn jsou **klonální**, často ale nacházíme i buňky s **normálním karyotypem**
- karyotyp nádoru se vyvíjí **postupně**
- nalézáme několik klonů – **selekční výhoda !!!**
- **klonální heterogenita** – příčina relapsu – léčba - eliminace všech klonů !

Zápis karyotypu s klony

46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[3]/47,idem,+8[10]/48,idem,+8,+der(22)t(9;22)[4]/47,idem+19[3]

# Destabilizace genomu a proces vzniku nádoru – podílet se mohou i chromozomové změny

Vznik nádoru je důsledek mutací postihující geny:

- stárnutí buněk (telomeráza)
- **buněčné protoonkogeny** - např. *MYC, ERBBB, MYB, INT1, RAS, NEU, ABL* (aktivace inzerční mutagenézou, bodovou mutací, translokací, genovou amplifikací) chovají se dominantně
- **tumor supresorové geny** (mutace, ztráta genu či celého chromozomu) – LOH, např. gen *p53, Rb1*
- chovají se recesivně
- 1 % nádorů – gametické mutace
- 99 % nádorů – somatické mutace



LOH -ztráta konstituční heterozygosity

# Chromozomové aberace u nádorů - rozdělení

<b>primární</b>	základní při vzniku nádorů, jediná změna, spouští mnohastupňový proces karcinogeneze – např. t(9;22)
<b>sekundární</b>	objevují se v průběhu onemocnění, obraz stadia choroby, výraz progresu tumoru, někdy prognostický faktor progresu onemocnění
<b><u>specifické</u></b>	pravidelně u určitého typu nádoru, stejné chromozomy představují specifický nádorový marker, v místech zlomu byly identifikovány geny, které jsou zúčastněné v nádorovém procesu – vliv na prognózu !!!
<b>náhodné</b>	vyskytují se náhodně, postihují různé chromozomy

# Chromozomové změny u nádorů - rozdělení

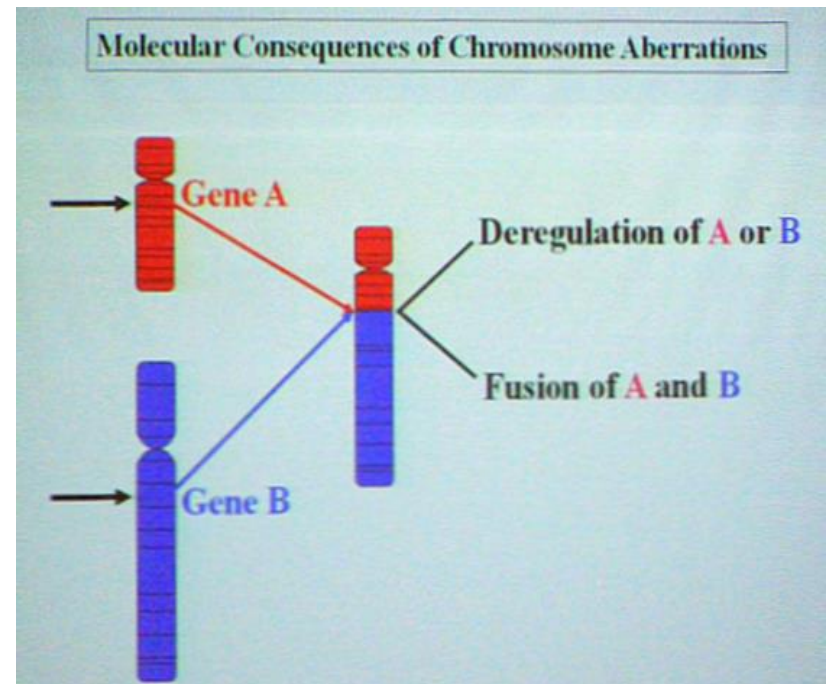
- **přemístění bez ztráty materiálu**  
(translokace, inverze, inzerce)
- **ztráta genetického materiálu**  
(delece, monozomie)
- **zmnožení genetického materiálu**  
(duplikace, amplifikace, aneuploidie, polyploidie)



# Translokace a nádory

Existují dva principiální důsledky translokací a inverzí:

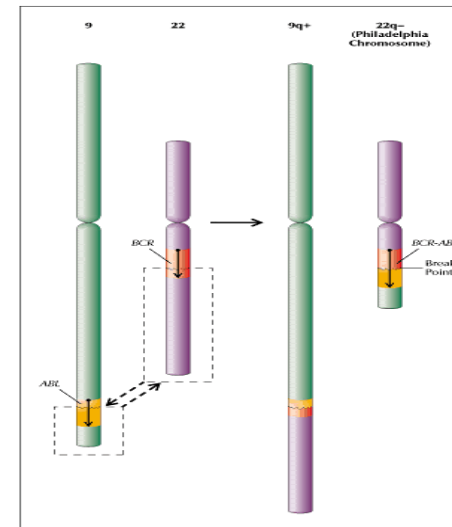
- místo zlomu uvnitř genů na každém chromozomu, přeskupením se vytvoří fúzní gen, kódující chimérický protein, zapojený do maligního procesu
- deregulace exprese genu translokací do oblasti silného promotoru (gen pro T-cell receptor nebo imunoglobulinový protein v blízkosti protoonkogenu) ...často transkripční faktory



# Translokace spojené se vznikem chimerického proteinu - příklady

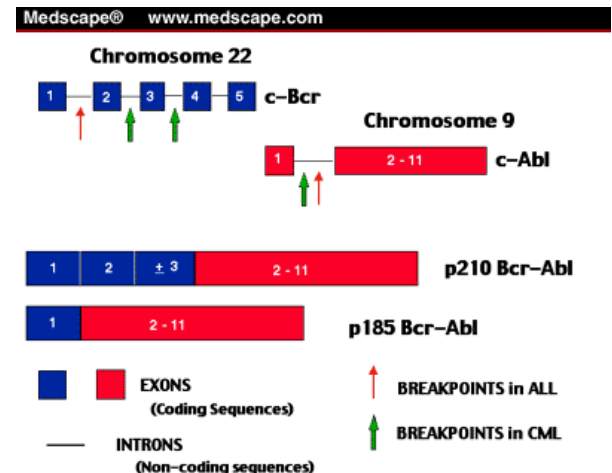
## t(9;22)

- u CML, vzniká Ph chromozom
- na chromozomu 9q34 je lokalizován buněčný protoonkogen ABL, na chromozomu 22q11 gen BCR, při translokaci vzájemná výměna částí obou chromozomů
- na chromozomu 22 se vytvoří fúzní gen BCR/ABL, který kóduje hybridní protein p210, který je iniciátorem maligního procesu...několik míst zlomu



## t(15;17)

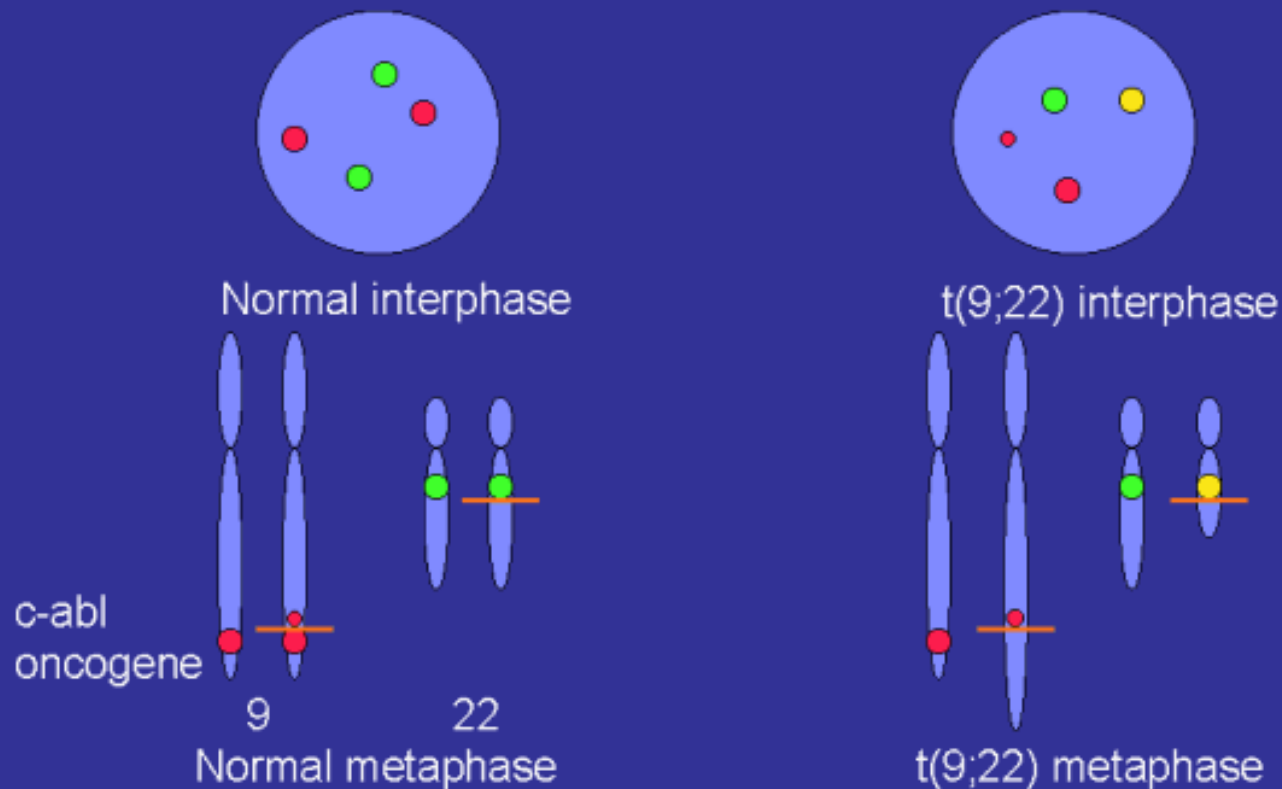
- AML M3, fúzní protein PML/RARA je pravděpodobně cílovým proteinem při terapii trans retinovou kyselinou
- přímý vztah léčby genetického defektu a maligního onemocnění



# Detekce fúzného genu pomocí techniky FISH

## Two colour (ES) FISH for CML

Larger probe – spanning the breakpoint



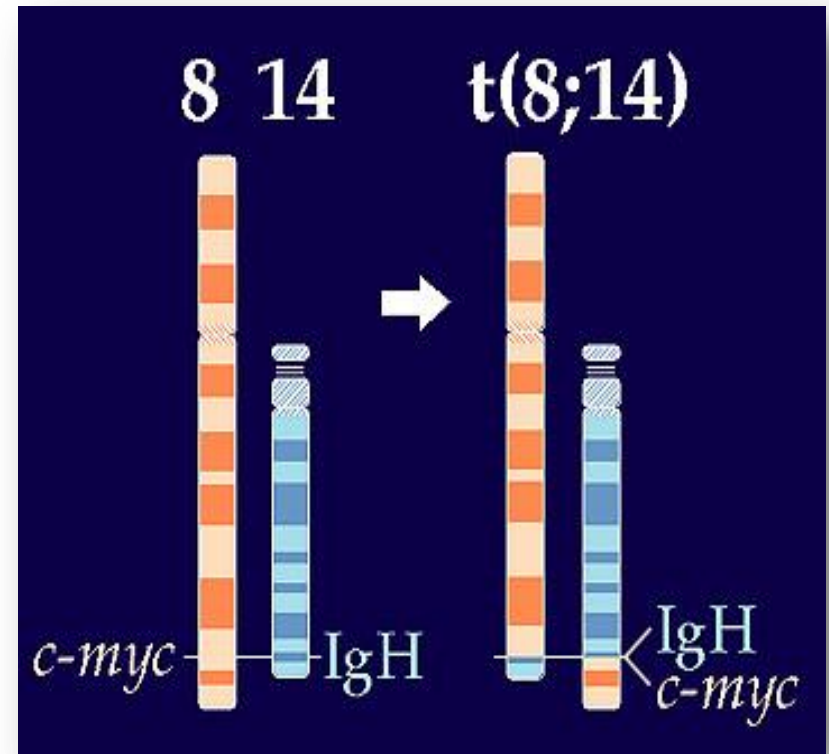
# Translokace spojené s aktivací protoonkogenů

## t(8;14)

- u ALL a lymfomů
- c-MYC onkogen z 8q24 přesunut do oblasti genu pro těžký řetězec imunoglobulinu na 14q32
- přemístěním dochází k deregulaci exprese c-MYC protoonkogenu
- deregulace spouští proces karcinogeneze

## t(2;8), t(8;22)

variantní translokace s místem zlomu v c-MYC genu ...oblasti genů pro lehké řetězce kappa (2p11) a lambda (22q11)



# Delece a nádory

- ztráta části chromozomu, často postiženy nádorové-supresorové geny (RB1, p53) nebo geny pro stimulační a růstové faktory
- LOH- ztráta heterozygoty v důsledku delece genu
- u hematologických malignit specifické změny

## del 5q

- u akutní myeloidní leukémie (AML) a myelodysplastického syndromu (MDS), delece je intersticiální, rozsah velmi variabilní, vždy je postižen pruh 5q31-kritická oblast, v oblasti zmapováno více genů řídících normální hematopoézu, předpokládá se přítomnost nádorového- supresorového genu

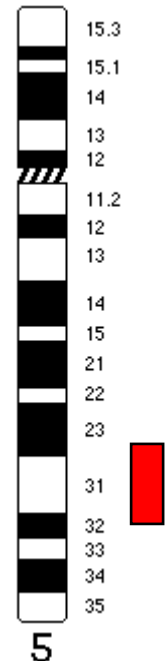
## del 11q23

- u AML a ALL, v oblasti 11q23 mapován MLL gen, mimo delecí zúčastněn v početných translokacích (6q27, 9p21, 10p15, 17q11, 19p13)

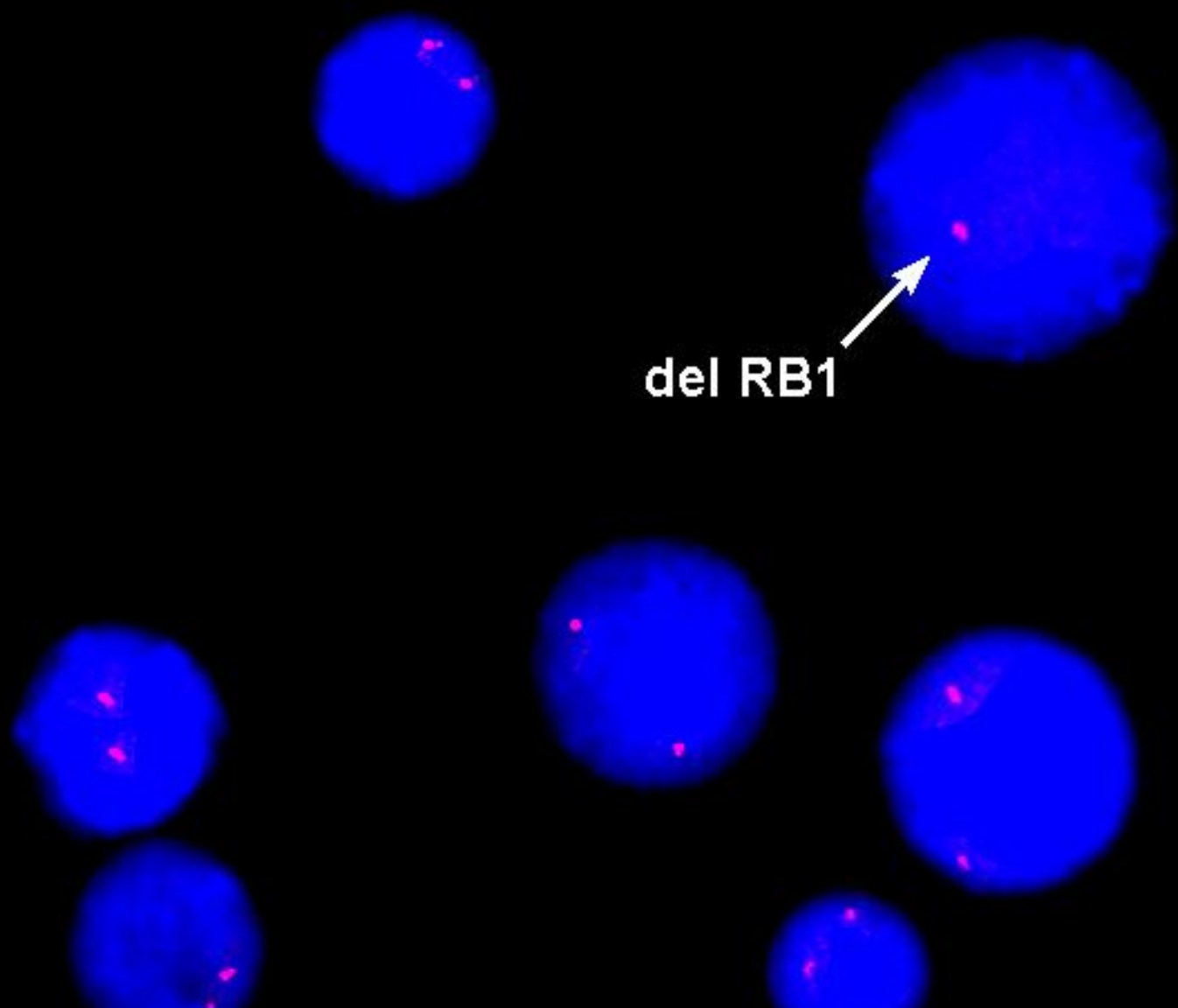
**delece genu p53** - mnoho nádorů

## monozomie

- ztráta celých chromozomů, změny jsou spíše sekundární, častá monozomie 5, 7 u MDS



# RB1 - kostní dřeň



del RB1

# Ztráta konstituční heterozygosity u retinoblastomu – LOH genu RB



## Teorie dvojího zásahu (Knutson)

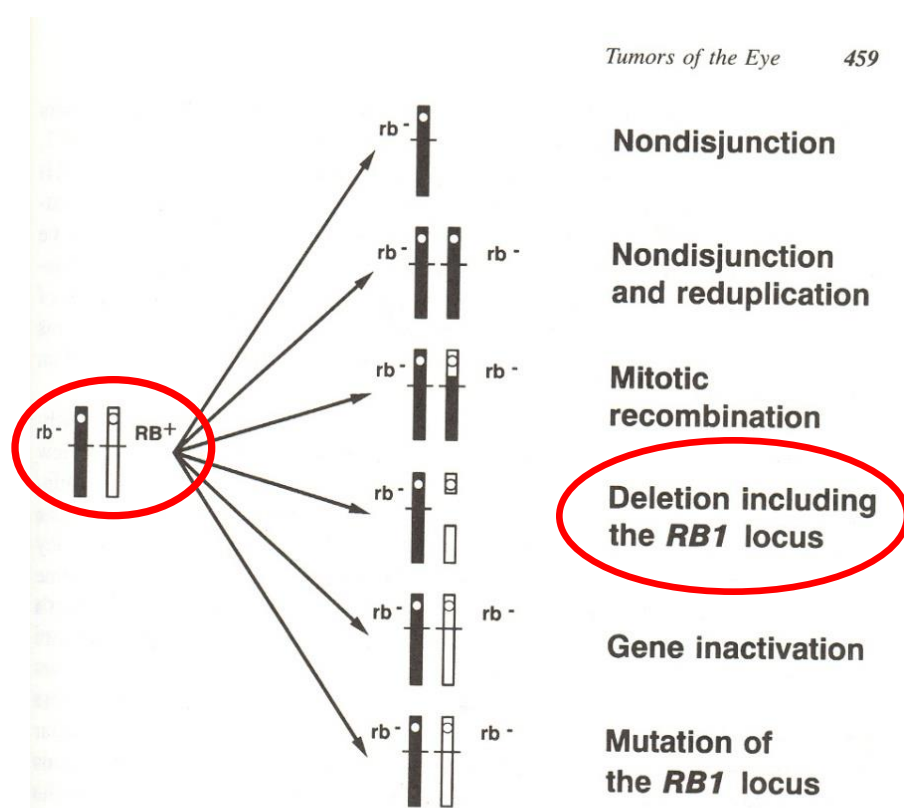
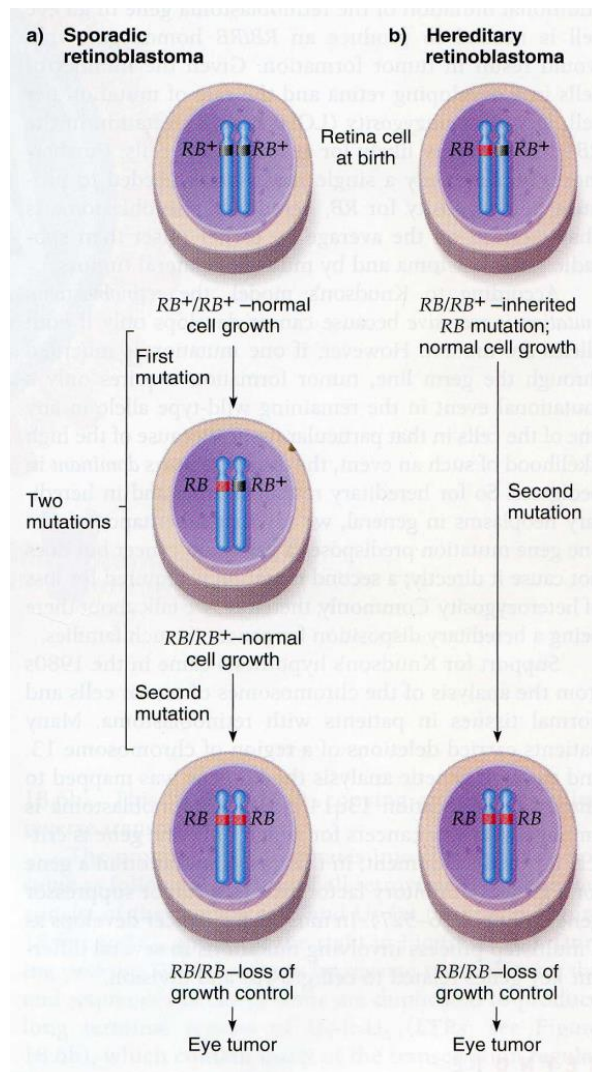


Fig. 3. Mechanisms whereby hemizygosity or homozygosity for a defect in the retinoblastoma locus (*RB1*) may be achieved. The wild-type allele is designated  $RB^+$ , the defective allele  $rb^-$ . Inactivation of the wild-type allele in retinoblastoma can be achieved through nondisjunction with or without subsequent reduplication of the abnormal homologue, deletion of the wild-type suppressor locus, gene inactivation, or a second mutation.

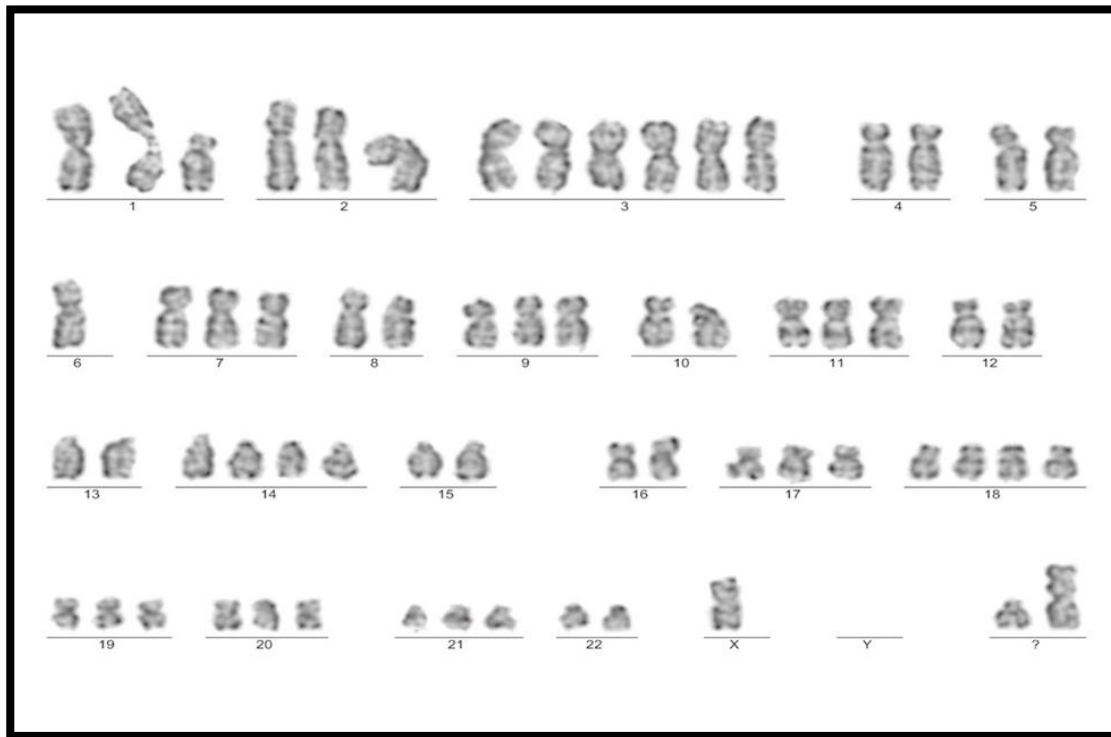
# Početní chromozomové aberace u nádorů a jejich důsledky

- aneuploidie x polyploidie
- **hyperdiploidie** (více než 46 chromozomů) – často lepší prognóza (akutní lymfoblastická leukémie, mnohočetný myelom) ...více tumor supresorových genů?
- **hypodiploidie** – méně než 46 chromozomů – horší prognóza



# Ukázka hyperdiploidního karyotypu u pacientky s mnohočetným myelomem při stanovení diagnózy – 63 chromozomů

Mnohočetný myelom: hyperdiploidní podskupina – lepší prognóza  
non hyperdiploidní podskupina – horší prognóza

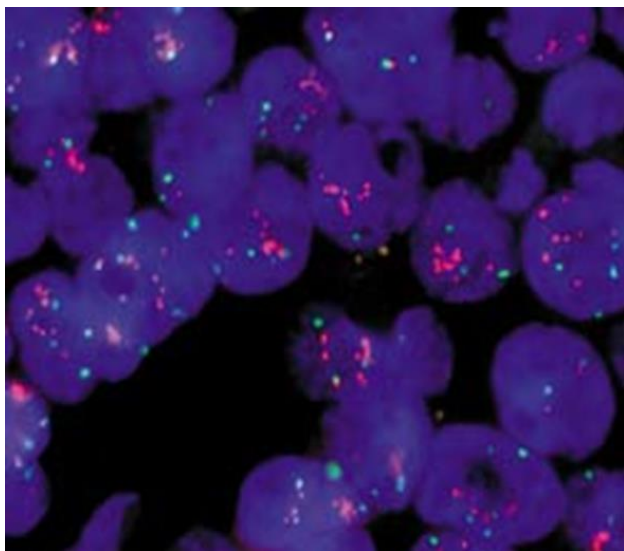
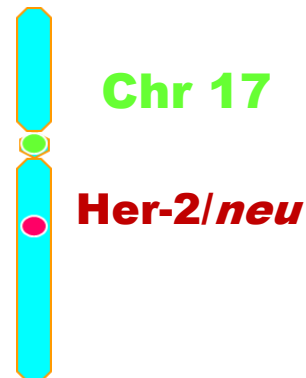


63,X,-X,-X,der(1),+3,+3,+3,-4,-5,-6,-6,-8,-10,-12,-13,+14,-15,-16,+18,-22,+mar,+mar

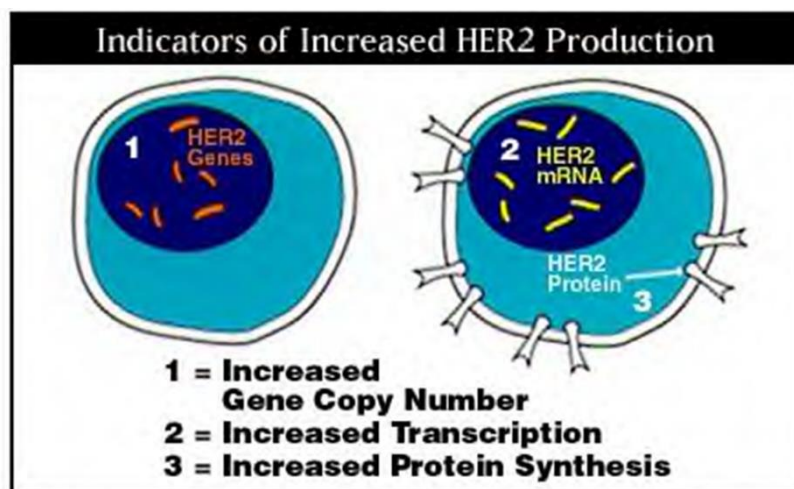
# Aberace se zmnoženým genetickým materiálem

## Amplifikace – zmnožení jednotlivých genů

- časté u solidních nádorů ale i u leukémií
- většinou zmnožení protoonkogenů (N-myc, c-myc), Her 2)
- vyšetření přítomnosti amplifikace má diagnostický a prognostický význam !!!



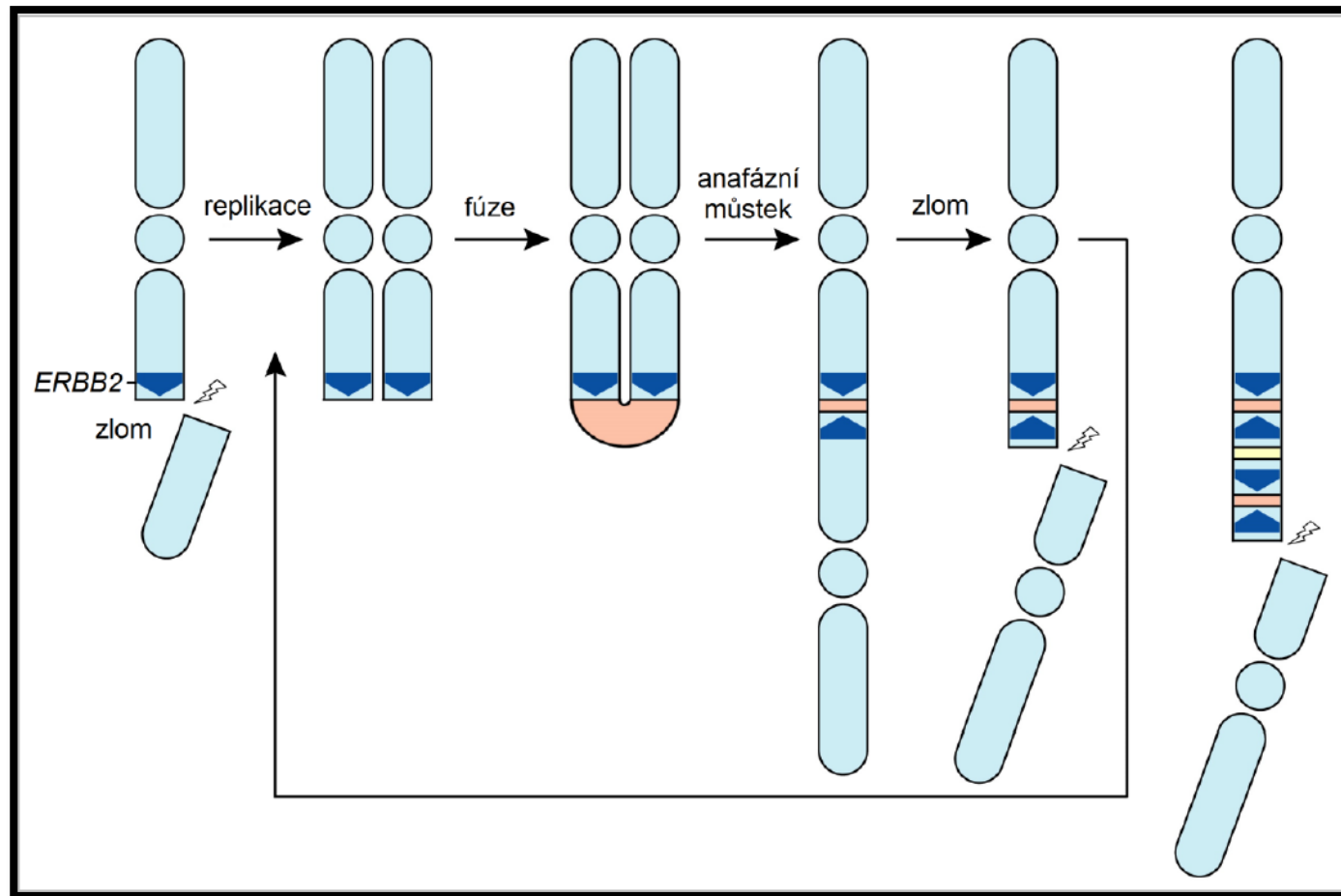
Amplifikace Her 2 (metoda FISH) 15 – 30 % pacientek s CA prsu



HER2 overexpression can be achieved by 1) gene alteration resulting in additional copies of the HER2 gene; 2) increased transcription of the HER2 gene, producing increased levels of HER2 mRNA; and/or 3) increased translation of HER2 mRNA. All three alterations can result in greater HER2 synthesis and expression on the cell surface as well as increased cell proliferation.

Her 2 gen - Human Epidermal Growth Factor Receptor-2  
nadměrná exprese receptoru HER 2

# Mechanismus amplifikace genu HER2 breakage-fusion-bridge

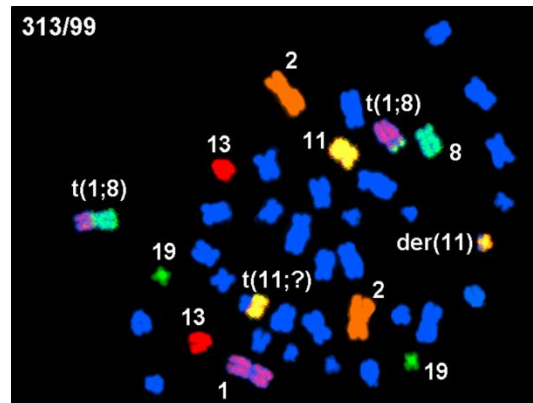


# Komplexní karyotyp u nádorů

Strukturní a numerické změny, které zahrnují tři a více chromosomů

a/nebo

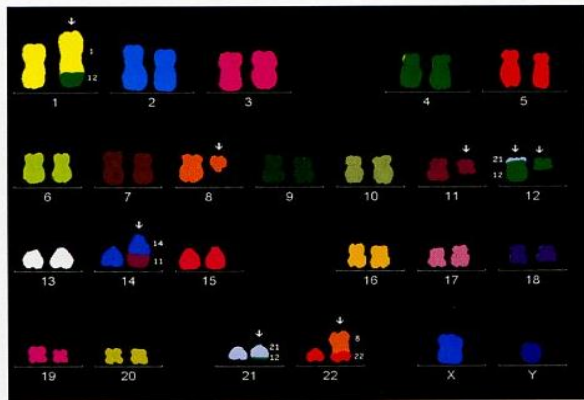
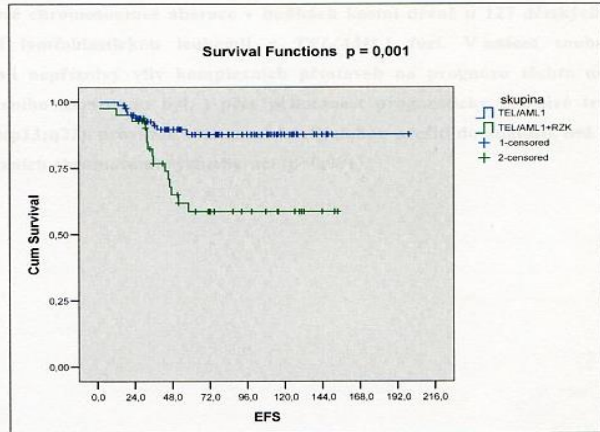
strukturní přestavby, při kterých dochází ke třem a více zlomům na chromosomech



*Příklad  
komplexního  
karyotypu*

# Význam komplexního karyotypu u ALL

Graf č. 2: Analýza EFS (event free survival) v měsících u dětí s a bez komplexních přestaveb a *TEL/AML1* fúzí



Obrázek č. 7: Analýza komplexních přestaveb karyotypu u pacienta s *TEL/AML1* fúzí metodou mFISH (MetaSystems):  
 46,XY,der(1)t(1;12)(q41;q14),del(8)(q11.2),del(11)(q23),(12;21)(p13;q22),del(12)(q14),der(14)t(14;11)(q23;q23),der(22)t(8;22)(q11.2;p11.1)

## Akutní lymfoblastická leukémie u dětí

Typ ALL podľa rekurentnej genetickej abnormality	Prognóza
t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL (Ph <sup>+</sup> )	Najhoršia (dnes zlepšená imatinibom)
t(v; 11q23); MLL (KMT2A) prestavba	Zlá
t(12;21)(p13;q22); ETV6-RUNX1	Veľmi priaznivá
S hyperdiploiditou	Priaznivá
S hypodiploiditou	Zlá
t(5;14)(q31;q32);IL3-IGH	Ako u ALL
t(1;19)(q23;p13); TCF3-PBX1	Skôr zlá

- komplexní změny (mnohonásobné translokace, delece)



**Špatná prognóza**

# 2011 – objev „Chromotripsis“u pacientky s CLL

Cell. 2011 Jan 7;144(1):27-40. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.055.

## Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development.

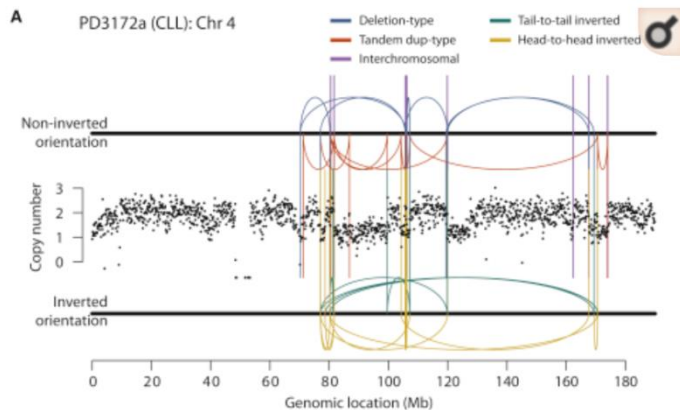
Stephens PJ<sup>1</sup>, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela J, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Jacobuzio-Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ.

### Author information

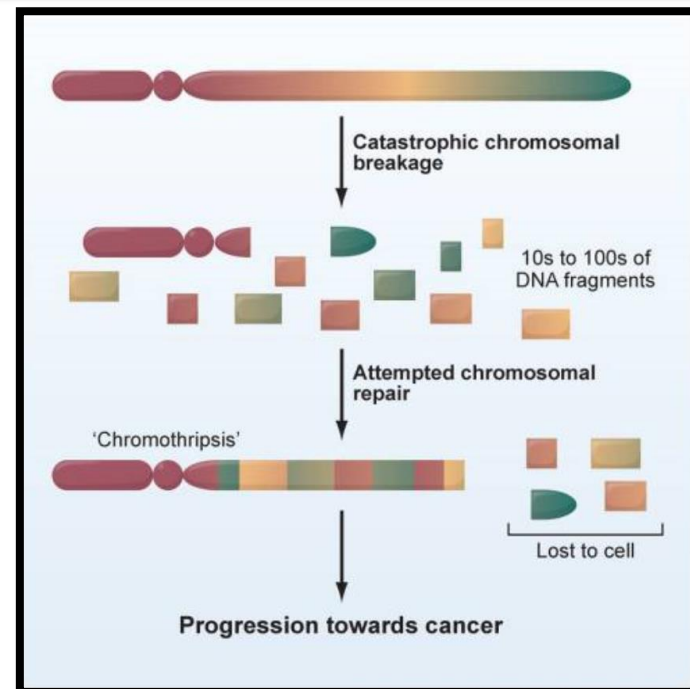
#### Abstract

Cancer is driven by somatically acquired point mutations and chromosomal rearrangements, conventionally thought to accumulate gradually over time. Using next-generation sequencing, we characterize a phenomenon, which we term chromothripsis, whereby tens to hundreds of genomic rearrangements occur in a one-off cellular crisis. Rearrangements involving one or a few chromosomes crisscross back and forth across involved regions, generating frequent oscillations between two copy number states. These genomic hallmarks are highly improbable if rearrangements accumulate over time and instead imply that nearly all occur during a single cellular catastrophe. The stamp of chromothripsis can be seen in at least 2%-3% of all cancers, across many subtypes, and is present in ~25% of bone cancers. We find that one, or indeed more than one, cancer-causing lesion can emerge out of the genomic crisis. This phenomenon has important implications for the origins of genomic remodeling and temporal emergence of cancer.

## NGS - 42 genomových přestaveb



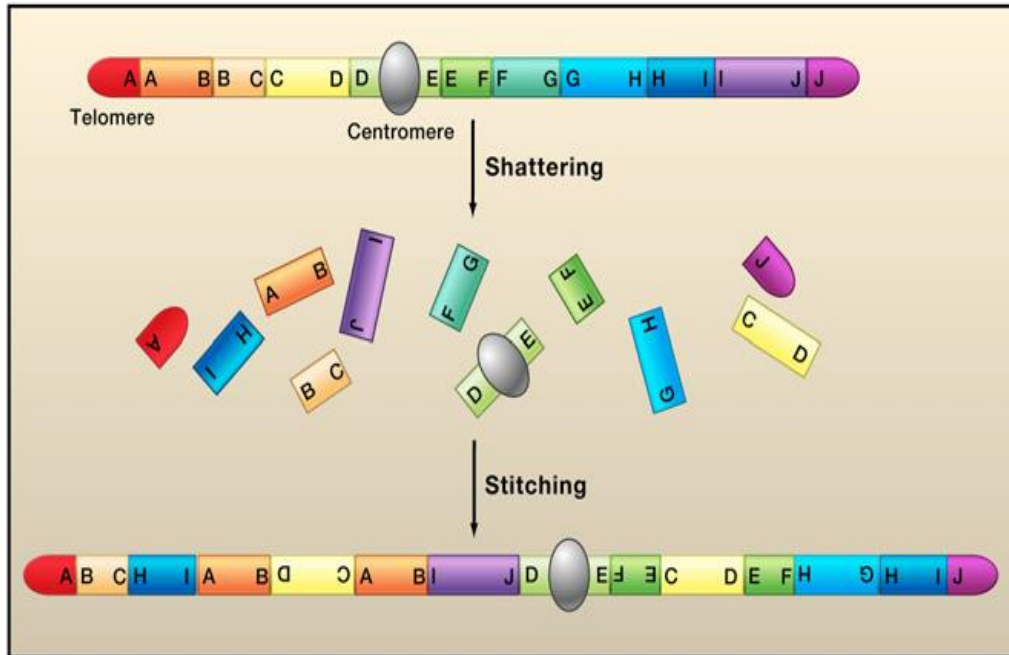
Rearrangements on Chromosome 4q in a Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia



# Chromothripsis aneb chromozomy v krizi

- cytogenetický jev poprvé popsán v roce 2011 *Stephenem et. al.* u pacientů s **chronickou lymfatickou leukémií**
- **chromothripsis** (z řeckého chromos – chromozom a thripsis – rozdělení na kousky)
- jedná se o desítky až stovky přestaveb na jednom či více chromozomech vzniklé **náhle** při jedné katastrofické události
- chromozom nebo jeho část je roztříštěn na malé kousky a ty jsou pak následně pomocí reparačních mechanismů náhodně poskládány zpět
- toto složení ovšem není úplně přesné, některé části mohou být sestaveny v jiném pořadí, mohou chybět či být duplikovány
- **chromothripsis prokázána u různých typů nádorů, ale též u vrozených genetických onemocnění**

# Chromothripsis – charakteristika



- desítky až stovky přestaveb
- postižen je pouze jeden nebo několik málo chromozomů
- místa zlomů vytváří shluky ve specifické oblasti chromozomu
- přestavěné chromozomy vykazují delece, duplikace či „copy-number“ neutrální přestavby (translokace, inverze)
- oscilace 1, 2 či 3 kopií – náhlý rozpad mitotických chromozomů?
- chromothripsis – 10 aberací /chromozom - definice

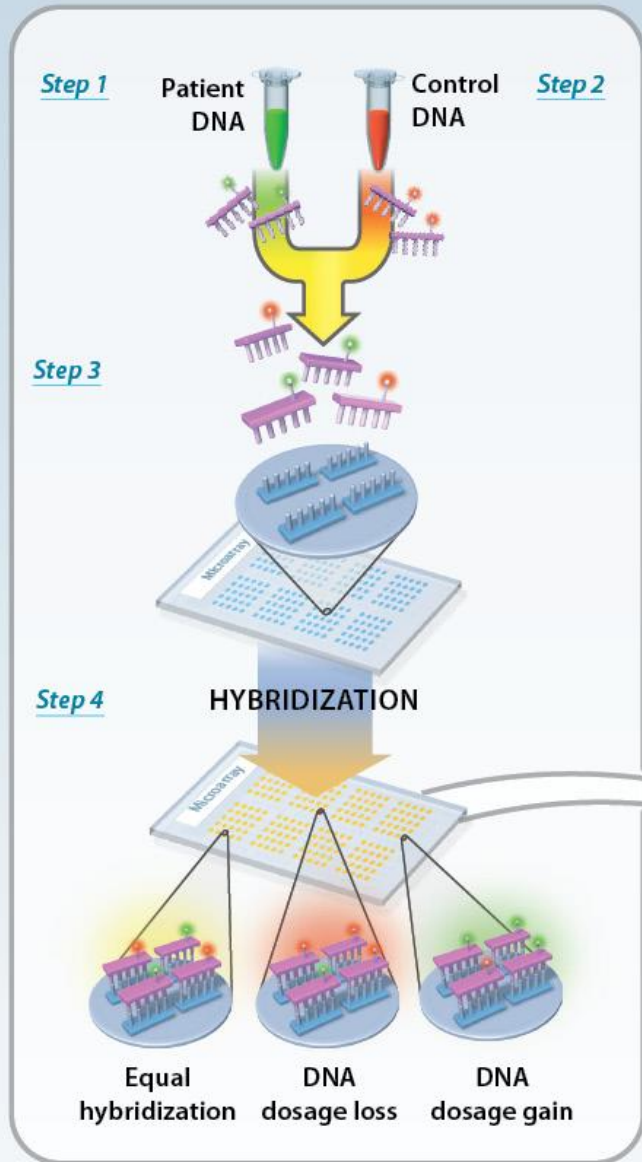
**Cytogenetické důsledky - komplexní přestavby**



**delece tumor supresorových genů, amplifikace onkogenů, vznik fúzních genů**



# Array CGH: The Complete Process

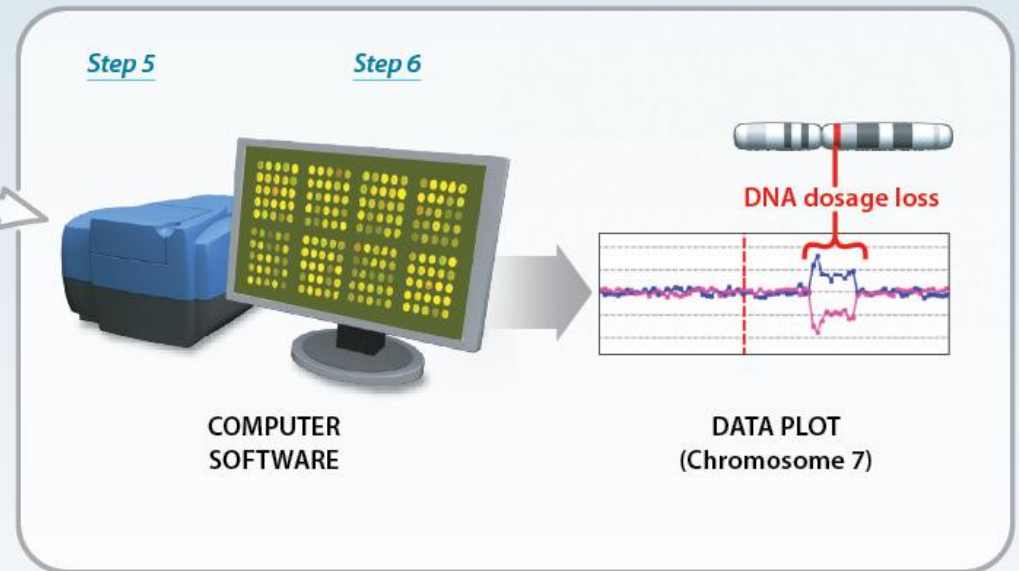


**Steps 1-3** Patient and control DNA are labeled with fluorescent dyes and applied to the microarray.

**Step 4** Patient and control DNA compete to attach, or hybridize, to the microarray.

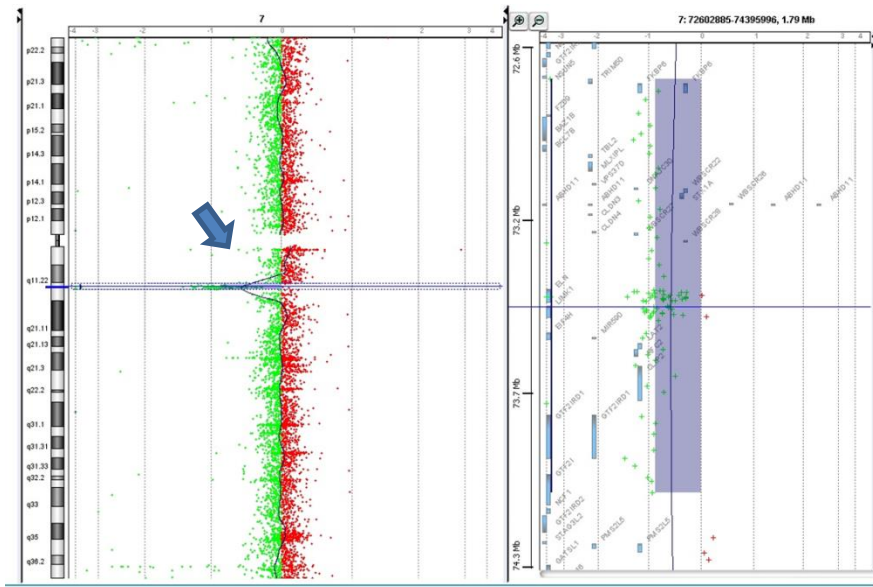
**Step 5** The microarray scanner measures fluorescent signal intensity.

**Step 6** Computer software gathers the data and generates a plot.



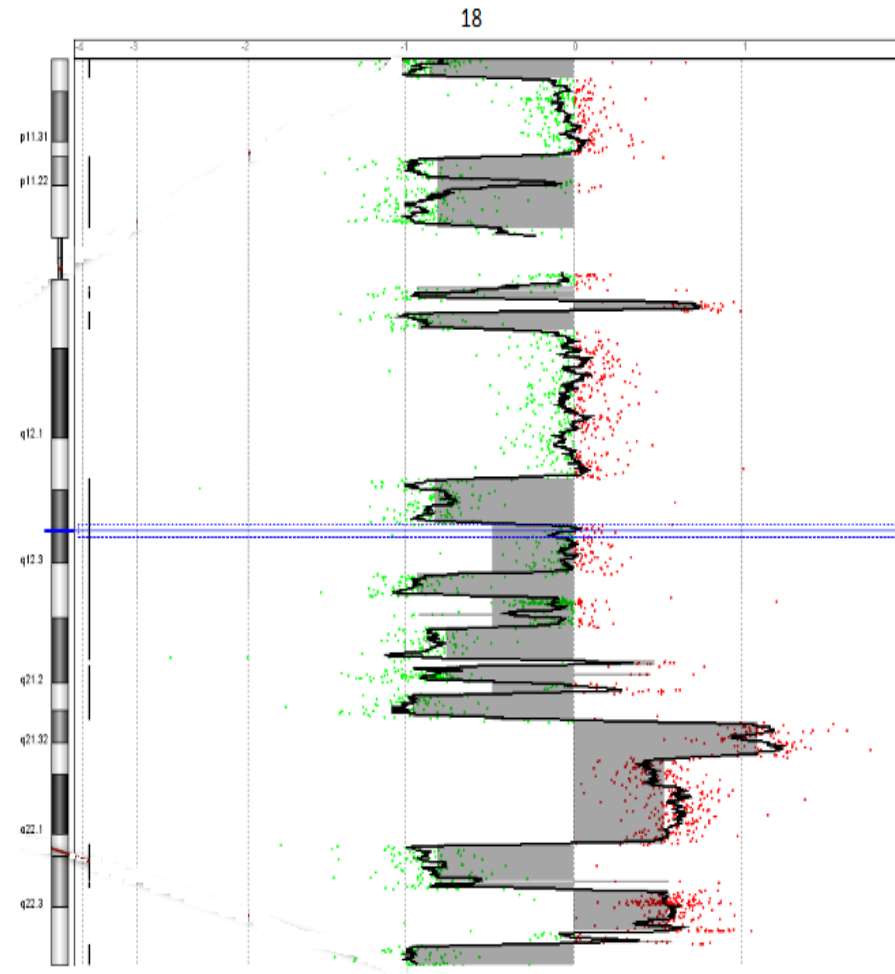
**Metody používané při detekci chromothripsis – array CGH, NGS**

# Array- CGH profil chromozomu s mikrolepci v oblasti 7q11 (Williams-Beurenův syndrom) a s chromothripsis (pacient s myelomem)



delece 7q11

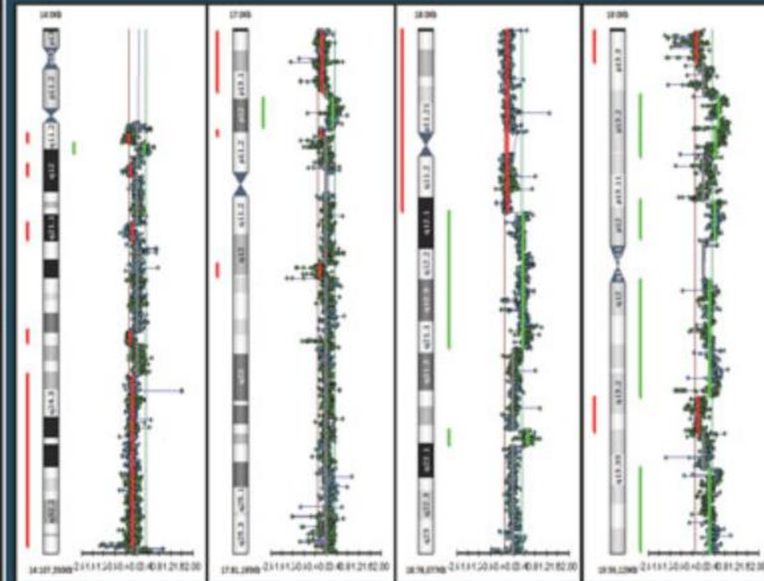
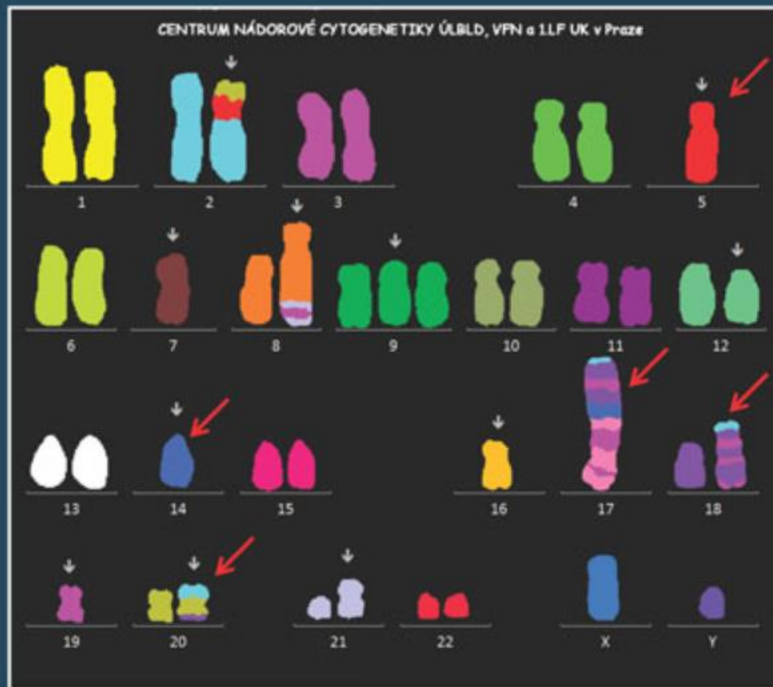
## Chromothripsis 18



delece

duplikace

# Důsledky chromothripsis: komplexní aberace



14

17

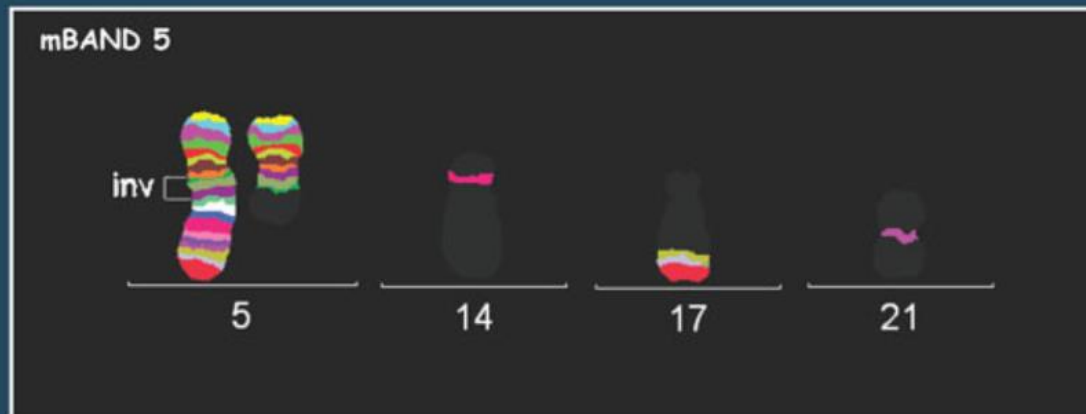
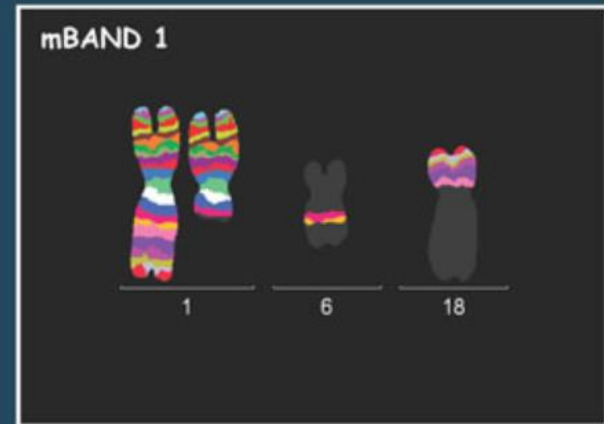
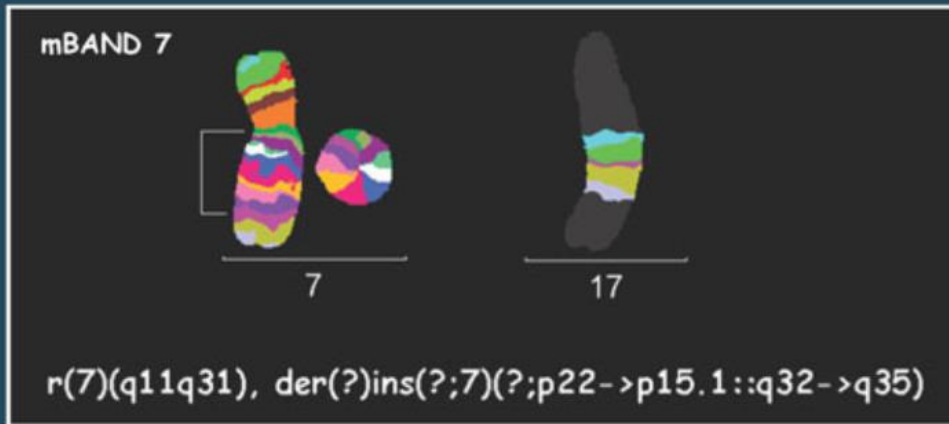
18

19

41,XY,psu dic(2;5)(p11.1;q11.2)t(5;20)(p15.3;p11.2),-5,-7,der(8)hsr(8)(q24.1)t(8;19;21)(q24.3;?;?),+9,  
-14,-16,der(17)t(2;14;17;18;19)(?;?;?;?;?),der(18)t(2;18;19)(q37;?;?)-19,der(20)t(2;20)(?;p11.2)  
t(18;20)(?;q?13.1),der(21;21)(q10;q10)

# Důsledky chromothripsis:

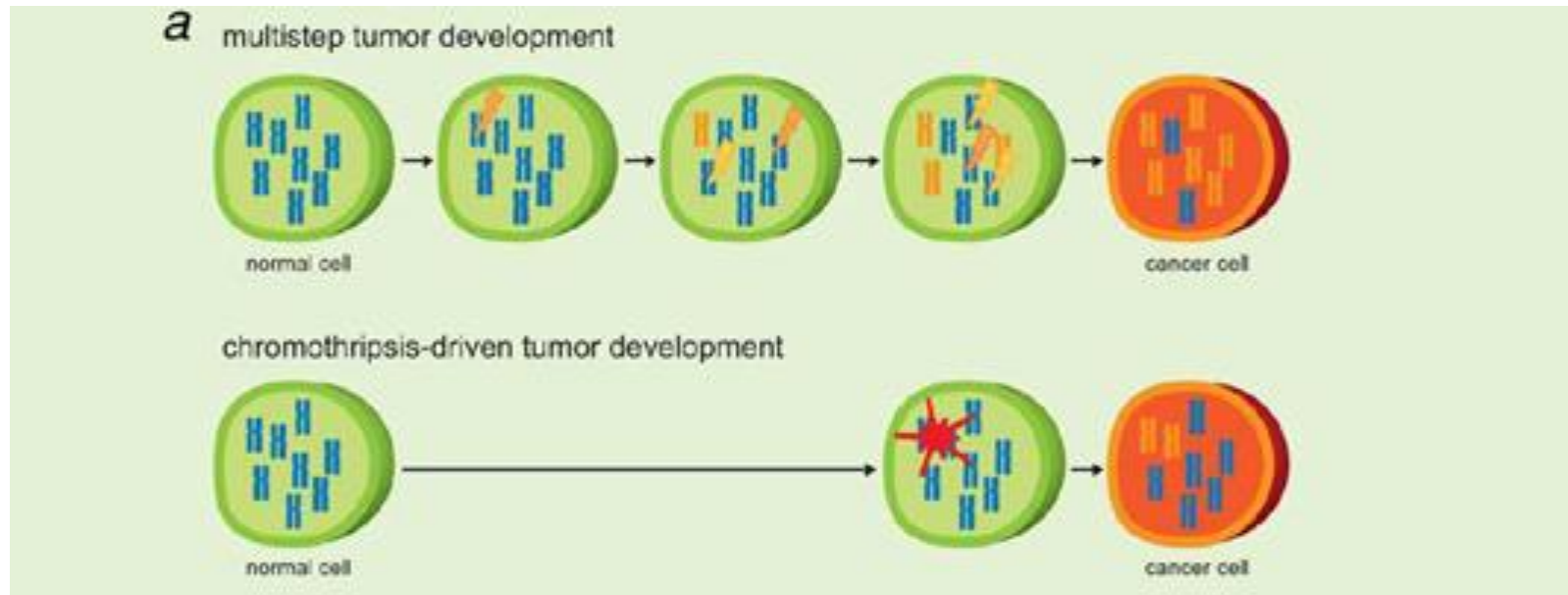
delece, inserce, inverse, ring chromosomy atd.



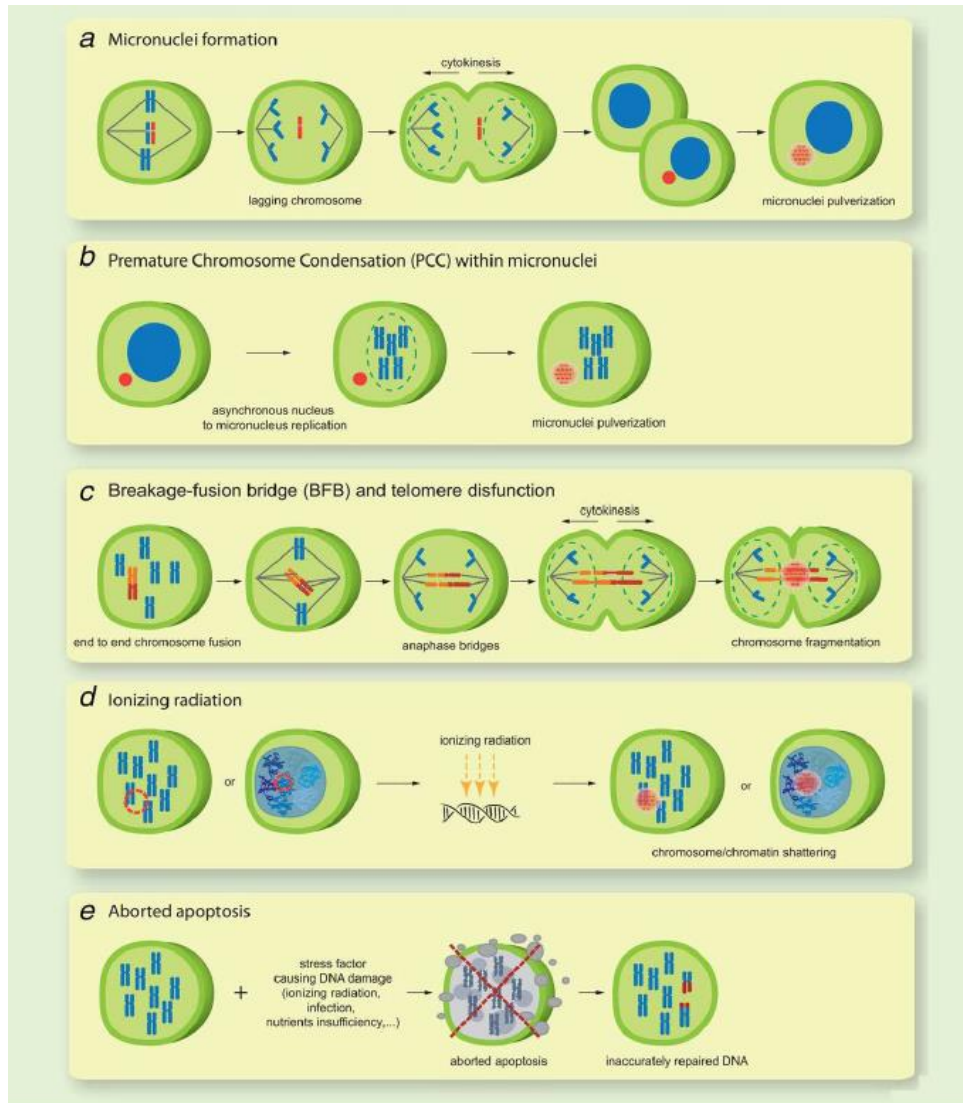
# Objev chromothripsos přinesl nový pohled úlohu chromozomových změn při tvorbě nádoru

a) model of „multistep tumor development“ -  
postupná kumulace mutací a genomových změn

b) „chromothripsis – driven tumor development“ –  
jedna katastrofická událost

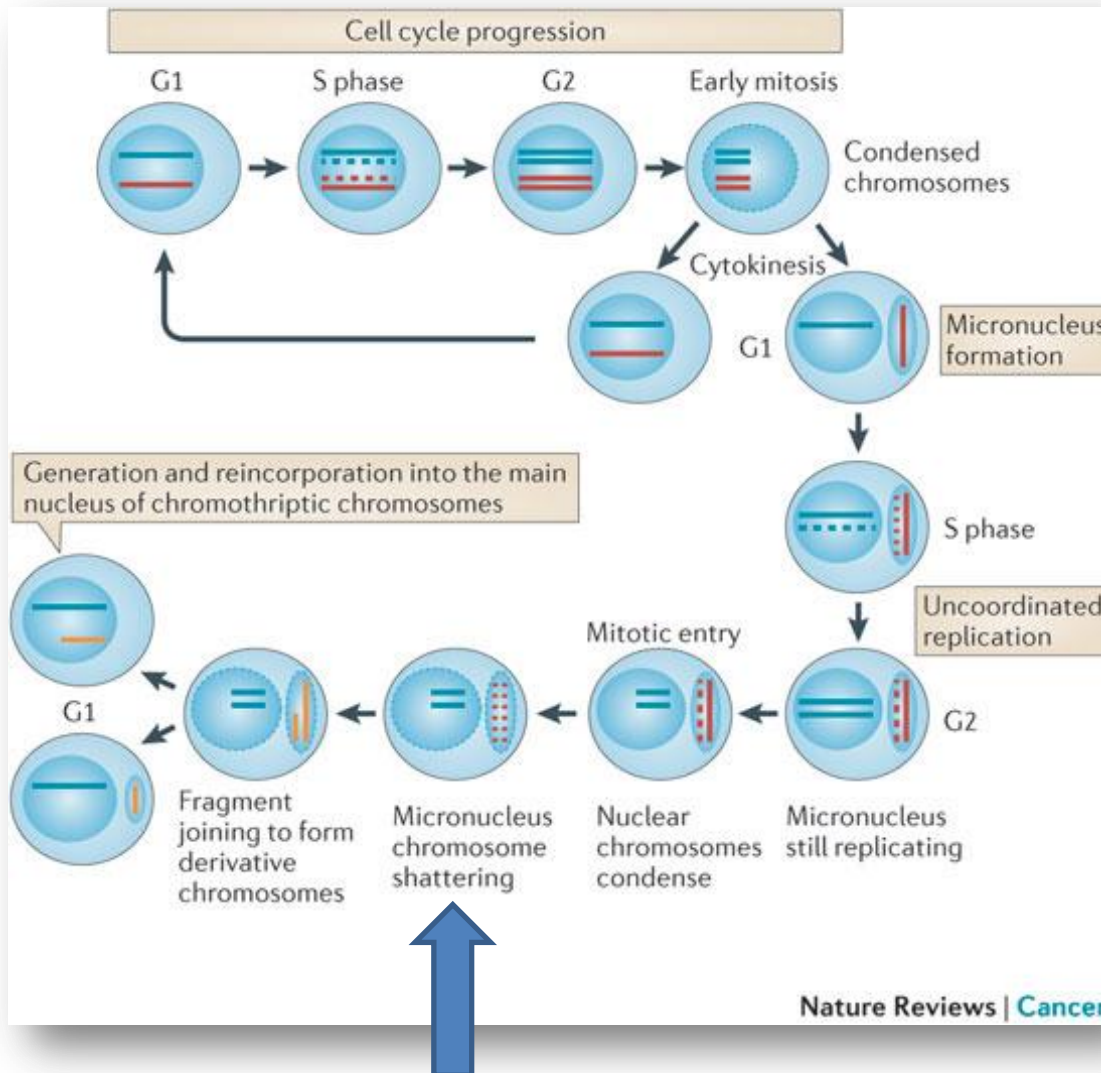


# Co může spustit chromothripsis - modely



- **vnější a vnitřní faktory**
- chyby při segregaci chromozomů – vznik mikrojádra
- předčasná kondenzace chromozomů (PCC) v mikrojádre
- porucha telomer – fúze sesterských chromatid
- vnější faktory (oxidativní stres, ionizující záření)
- selhání apoptózy
- mutace genu *p53*
- replikační stres – inhibice DNA polymerázy...

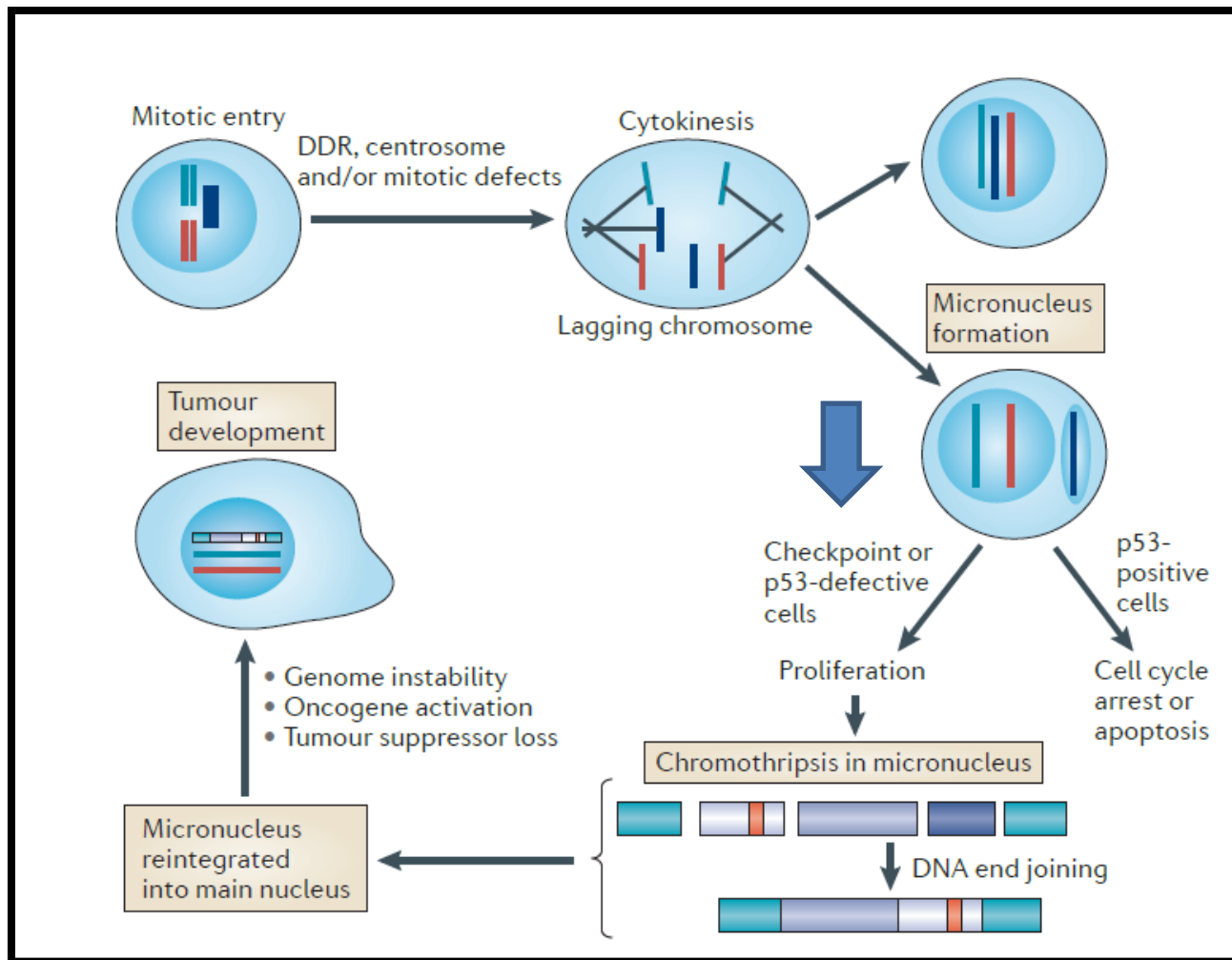
# Jak vzniká chromothripsis - A model of chromothripsis and aneuploidy via micronucleus formation



- vznik mikrojádra
- defektivní a opožděná replikace chromozomu v mikrojádře – poškození DNA
- předčasná kondenzace chromozomu
- masivní rozpad chromozomu v mikrojádře
- spojení fragmentů – vznik derivovaného chromozomu s chromothripsis
- začlenění do jádra

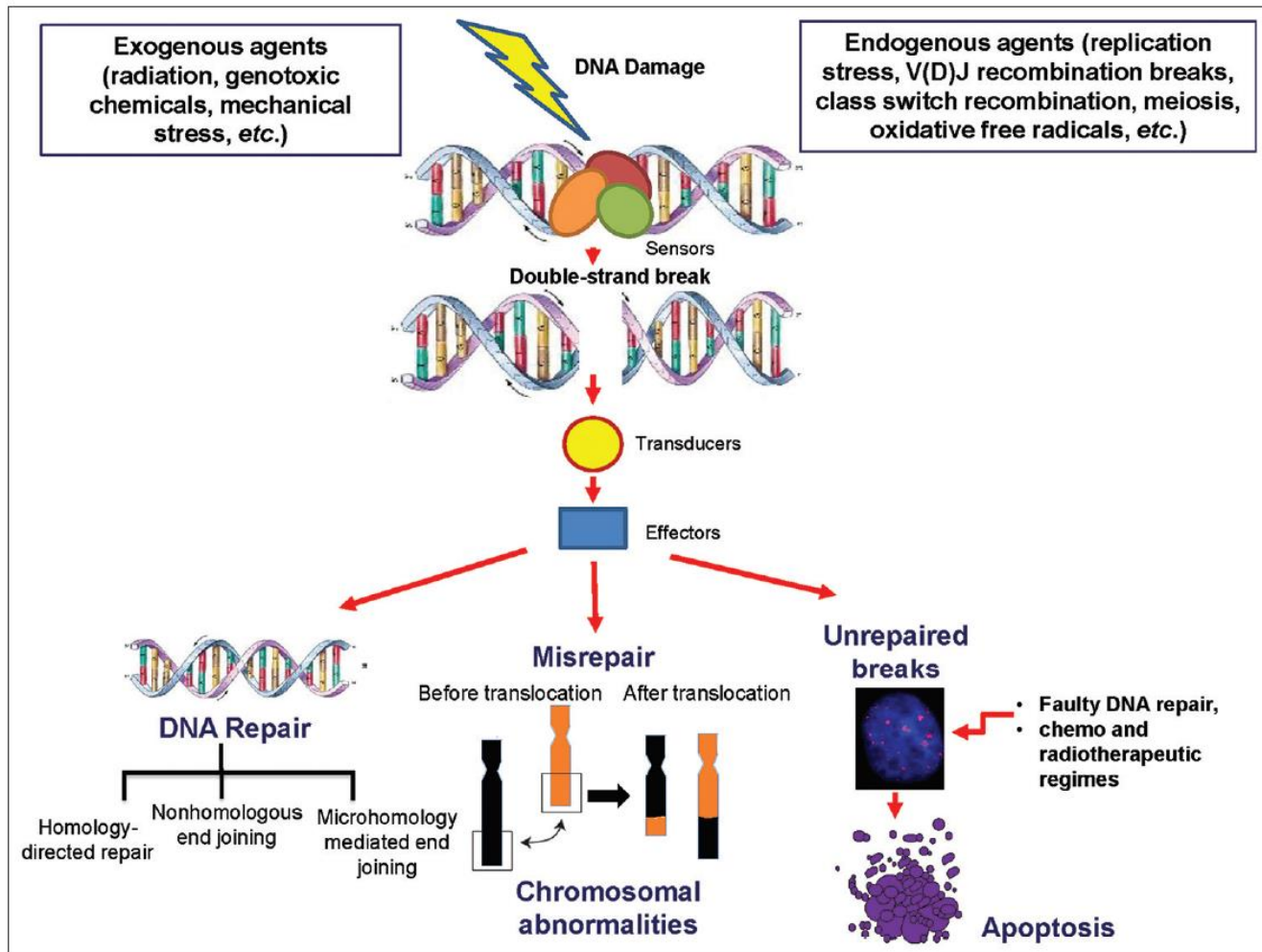
*Forment et al. 2012*

# Chromothripsis a mutace genu p53 předchází mutace genu 53 chromothripsis?

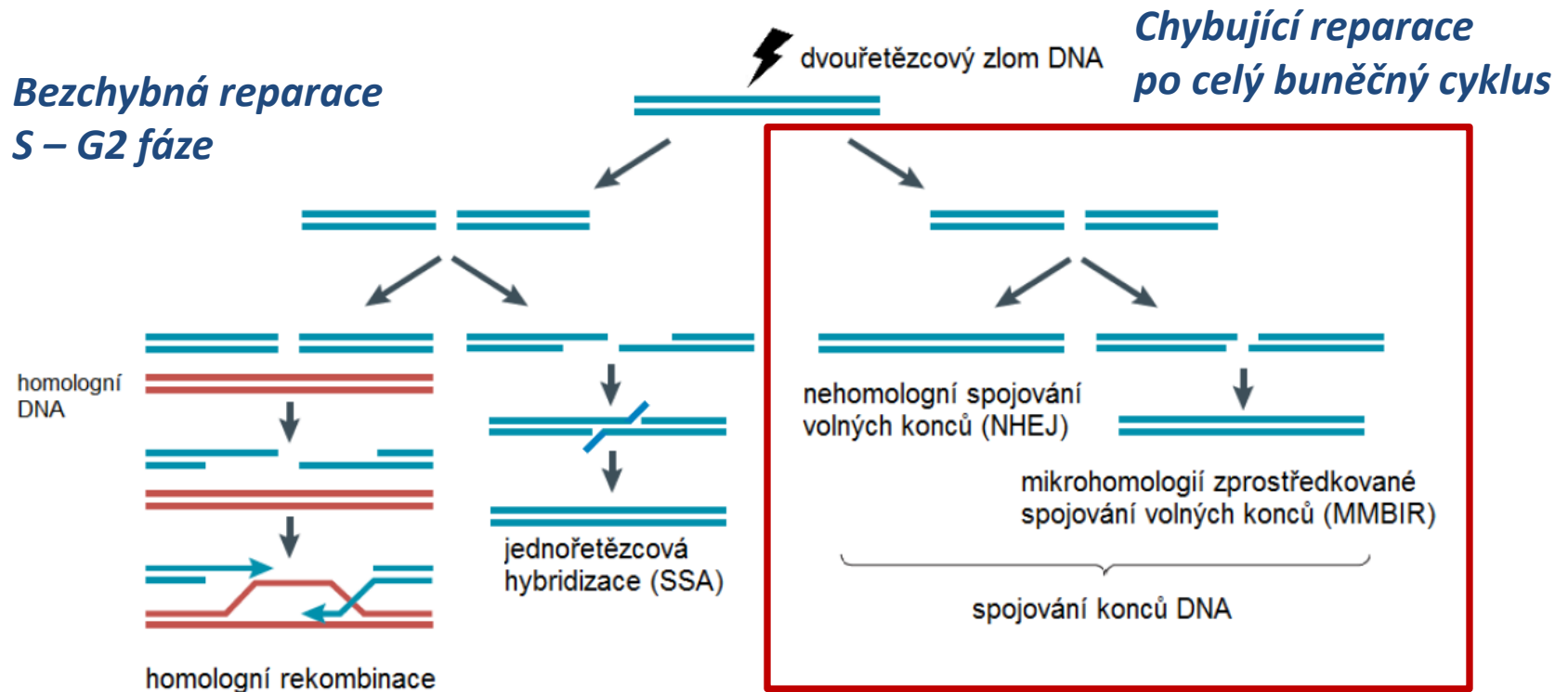




# Molekulární mechanismus rozpadu chromozomů = mnohonásobný dvouřetězcový zlom (DSB)



# Chromothripsis – molekulární mechanismy vzniku aberantních chromozomů – chybná reparace DSB



Homologní rekombinace vyžaduje homologní sekvenci jako templát. Jednořetězcová hybridizace (SSA) probíhá pomocí jednovláknových úseků, které jsou následně odštěpeny. Nehomologní spojování volných konců (NHEJ) zahrnuje přímou ligaci volných konců. Mikrohomologií zprostředkované spojování volných konců (MMBIR) vyžaduje pro ligaci nalezení mikrohomologních úseků a úpravu konců. (Forment *et al.*, 2012; upraveno)

# Chromothripsis u nádorových onemocnění

- **výskyt 2 – 3 %** všech nádorových onemocnění
- **chromothripsis** prokázána u leukémií, mnohočetného myelomu, karcinomu tlustého střeva, meduloblastomu, neuroblastomu...
- častý výskyt u **nádorů kostí (až 25 %)**- osteosarkom, Ewingův sarkom, chondrosarkom
- **chromothripsis – horší prognóza !!!** – rozsáhlé přestavby - delece, duplikace, inverze, inzerce - deregulace velkého počtu genů !!!

Table 1. Prevalence of chromothripsis across tumor entities

Tumor entity	n <sup>1</sup>	Method	CT prevalence (%) <sup>2</sup>	Ref.
<b>Hematopoietic malignancies</b>				
Acute lymphoblastic leukemia with iAMP21	9	WGS	88.9	12
Acute myeloid leukemia with mutant TP53	17	SNP array	47.1	4
Acute myeloid leukemia with WT TP53	91	SNP array	1.1	4
Myelodysplastic syndrome with complex chromosome aberrations	157	SNP array	47	13
Chronic lymphocytic leukemia	10	WGS	10	3
Multiple myeloma	764	SNP array	1.3	14
<b>Carcinomas</b>				
Invasive bladder carcinoma	5	WGS	60	15
High-risk breast cancer	29	aCGH	41	16
Breast cancer (basal-like)	12	WGS	0	17
Ovarian cancer	11	WGS	0	17
High-risk prostate cancer	6	WGS	16.7	18
Lung adenocarcinoma	6	WGS	33.3	17
Lung squamous cell carcinoma	13	WGS	15.4	17
Esophageal adenocarcinoma	123	WGS and SNP array	32	19
Malignant melanoma	20	aCGH	10	20
Uveal melanoma	25	OncoScan assay	8	21
Hepatocellular carcinoma	88	WGS	5.7	22
<b>Central nervous system tumors</b>				
SHH medulloblastoma with mutant <i>TP53</i>	10	SNP array and WGS	100	4
Medulloblastoma, all subgroups	98	SNP array and WGS	13.3	4
Medulloblastoma, all subgroups	1,070	SNP array	11.4	23
Glioblastoma	18	WGS	38.9	17
Grade IV glioma, <i>IDH</i> mutant	24	OncoScan assay	37.5	24
Grade II–III glioma	45	OncoScan assay	11.1	24
Low-grade glioma	41	SNP array	2.4	25
Ependymoma	41	WGS	22	26
Neuroblastoma	87	WGS	11.4	27
Neuroblastoma	233	SNP array	4.3	28
Meningioma	11	WGS	9.1	29
Retinoblastoma	94	WGS and SNP array	3.2	30
Glioneuronal tumors	114	WGS	2.6	31
<b>Soft tissue tumors</b>				
Uterine leiomyoma	36	WGS	41.7	32
Uterine leiomyoma	5	SNP array	20	33
Osteosarcoma	9	SNP array	33.3	3
Chordoma	11	WGS	18.2	3
Phaeochromocytoma	36	SNP array	2.5	34

# Prognostický význam klonálních chromozomových aberací při použití nových léčebných metod u MM

## MNOHOČETNÝ MYELOM

- Tvoří asi 10% všech onkohematologických onemocnění
- Klonální onemocnění, jehož podstatou je maligní mutace ve vývoji B-lymfocytu
- Postihuje zejména starší osoby, do 40 let věku se vyskytuje vzácně
- V současné době nevléčitelný, různá je délka přežívání a odpovědi pacientů na léčbu
- široké spektrum klinických projevů: destrukce kostí, pancytopenie, anemie, porucha protilátkové imunity, myelomová nefropatie ...
- Optimalizace léčby vyžaduje stanovení **prognostických faktorů**



# Chromozomové aberace - prognostický význam !

**Hypodiploidie:** nejčastěji monozomie chromozomu 8, 13, 14, X  
nepříznivá prognóza

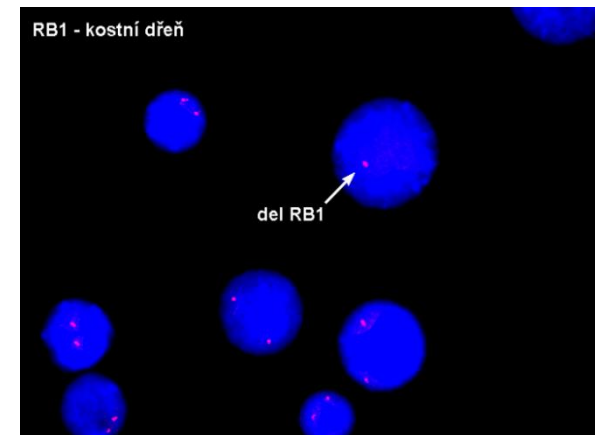
**Hyperdiploidie:** nejčastěji trizomie chromozomu 3, 5, 7, 9, 11,  
příznivá prognóza

**Translokace zahrnující *IgH* gen (14q32):**  
t(11;14) (q13;q32)  
t(4;14)(p16;q32),  
nepříznivá prognóza

**Delece genu *RB1* (13q14) střední prognóza**

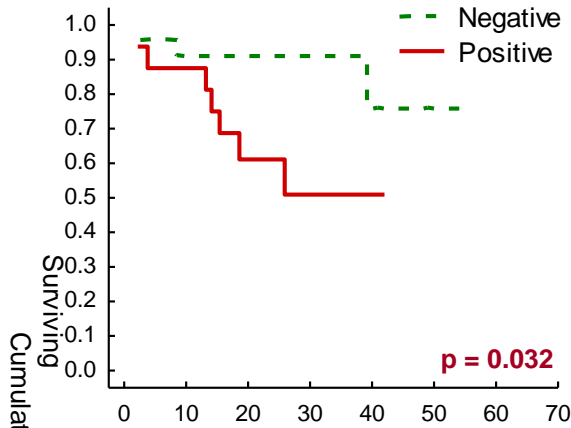
**Delece genu *p53* (17p) špatná prognóza**

**Zisk 1q – špatná prognóza**

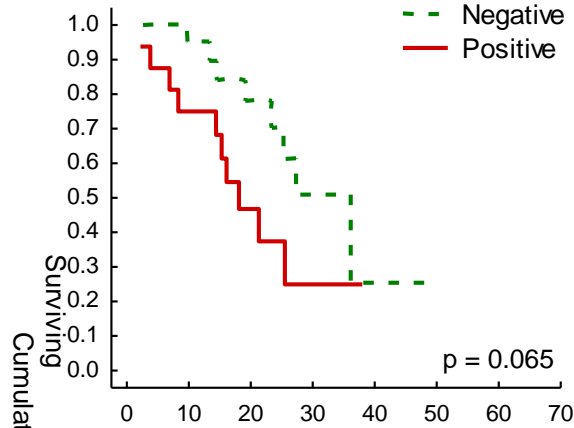


# Analýza přežití – vliv zisku 1q21 u pacientů s MM

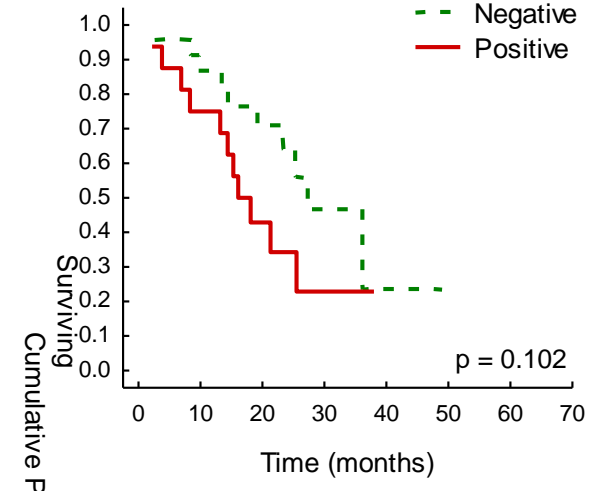
OS



TTP



PFS



Display Settings: Abstract

Send to:

ELSEVIER FULLTEXT ARTICLE

Biol Blood Marrow Transplant. 2010 Apr;16(4):548-54. Epub 2010 Jan 18.

## Gain of 1q21 is an unfavorable genetic prognostic factor for multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy.

Nemec P, Zemanova Z, Greslikova H, Michalova K, Filkova H, Tajtlova J, Kraiova D, Kupksa R, Smetana J, Krejci M, Pour L, Zahradova L, Sandecka V, Adam Z, Buchler T, Spicka J, Gregora E, Kuglik P, Hajek R.

University Research Centre, Czech Myeloma Group, Masaryk University, Kamenice 5, Brno, Czech Republic. handcock@mail.muni.cz

### Abstract

The prognostic significance of 1q21 gain, del(13)(q14), del(17)(p13), t(4;14)(p16.3;q32), and t(11;14)(q13;q32) detected by interphase fluorescein in situ hybridization (FISH) was studied in a cohort of 91 patients with newly diagnosed multiple myeloma (MM). 1q21 gain was detected in 37 of 91 patients (40.7%). In comparison with patients lacking 1q21 gain, patients with 1q21 gain had significantly shorter progression-free survival (PFS) (14.9 versus 27.4 months;  $P = .044$ ) and worse 4-year overall survival (OS) (40.1% versus 76.2% of patients;  $P < .001$ ). PFS or OS were not influenced by the presence or absence of the other studied chromosomal abnormalities. Although the occurrence of 1q21 gain correlated with deletion of 13q14, the presence of 1q21 gain can be considered an independent prognostic factor, as no impact of del(13)(q14) as an isolated chromosomal abnormality on either PFS or OS has been observed. In comparison with patients lacking 1q21 gain, patients with 1q21 gain were significantly more likely to discontinue the preplanned treatment protocol because of disease progression or death. We conclude that 1q21 gain defines a prognostically unfavorable group of MM patients.

Copyright (c) 2010 American Society for Blood and Marrow Transplantation. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Save items

★ Add to Favorites

Related citations in PubMed

Predictive role of interphase cytogenetics for  $\epsilon$  [J Clin Oncol. 2000]

Negative prognostic significance of two or more cytog [Neoplasma. 2010]

Impact of cytogenetics in patients with relapsed or refr [Leuk Res. 2011]

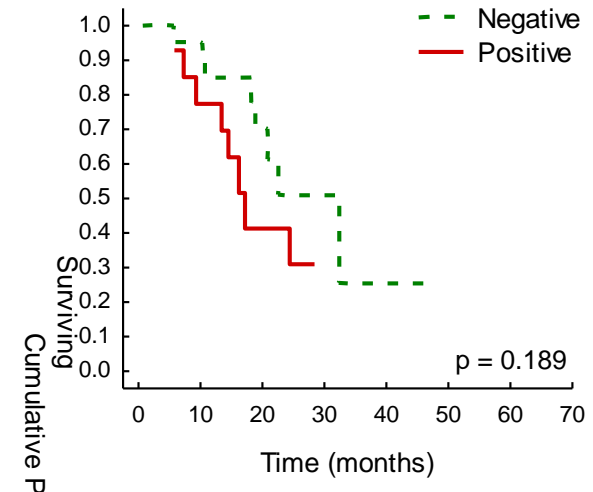
Review [Genetic abnormalities in multiple mye [Rev Med Interne. 2007]

Review The prognostic significance of cytogenetics [Cancer Genet. 2011]

See reviews...

See all...

DOR



# Chromothripsis u MM – údaje z literatury

[Blood](#). 2011 Jul 21;118(3):675-8. doi: 10.1182/blood-2011-03-344069. Epub 2011 May 31.

## Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients.

[Magrangeas F](#)<sup>1</sup>, [Avet-Loiseau H](#), [Munshi NC](#), [Minvielle S](#).

### ⊕ Author information

#### Abstract

Multiple myeloma (MM) develops from a premalignant plasma cell proliferative disorder, and with time can progress to a more aggressive disease in extramedullary locations. The gradually clinical evolution is supported by clonal expansion of cells that acquire genetic lesions over years. This model of cancer evolution based on ongoing genomic instability mechanism may apply to development of most MM cases. However, in a small fraction of newly diagnosed MM who relapse quickly and finally die within 2 years, the gradual model appears to be untenable. Analysis of high resolution copy number profiles obtained using single nucleotide polymorphism array data from 764 newly diagnosed MM identified large numbers of genomic rearrangements with the hallmarks of chromothripsis in 1.3% of samples. Moreover, this catastrophic event confers a poor outcome. Because chromothripsis appears to occur in a single crisis, our results suggest that high-risk MM patients use this novel way of cancer evolution.

- **soubor 764** n.d. pacientů, analýza na SNP arrays
- incidence chromothripsis **1,3% (10/764)**, velmi špatná prognóza
- medián **OS < 2 roky** (6 – 34 měsíců)



# Chromothripsis chromozomu 18 - kazuistika

Vyšetřen soubor 184 MM pacientů pomocí array-CGH -  
4x44K a 4x180K Agilent Human Microarrays:

CNAs detekovány u 98.9% (182/184), **cth 1,1% (2/184)**

- Pacientka M.M., nar. 1949, diagnóza MM 2/2012
- D.S. stadium III, ISS II., MR komprese C3 a L5 obratle
- 7x CVD Junior, dosaženo PR
- Autolog. PBSC + MEL 200
- 8/2013 – **EM relaps páteře** a míšní léze - nasazen RAD režim
- **10/2013** – celkové zhoršení stavu, hospitalizace na JIP
- 11/2013 – **exitus (OS = 21 měsíců)**

# Genetická charakteristika PCLs

- CD138+ populace: 92%
- **FISH** – disrupce *IgH* negat. , del. *TP53* a *RB1* neg.,  
*+1q21*: 86%, *H-MM (+5,+9,+15)* – 81%
- **aCGH**

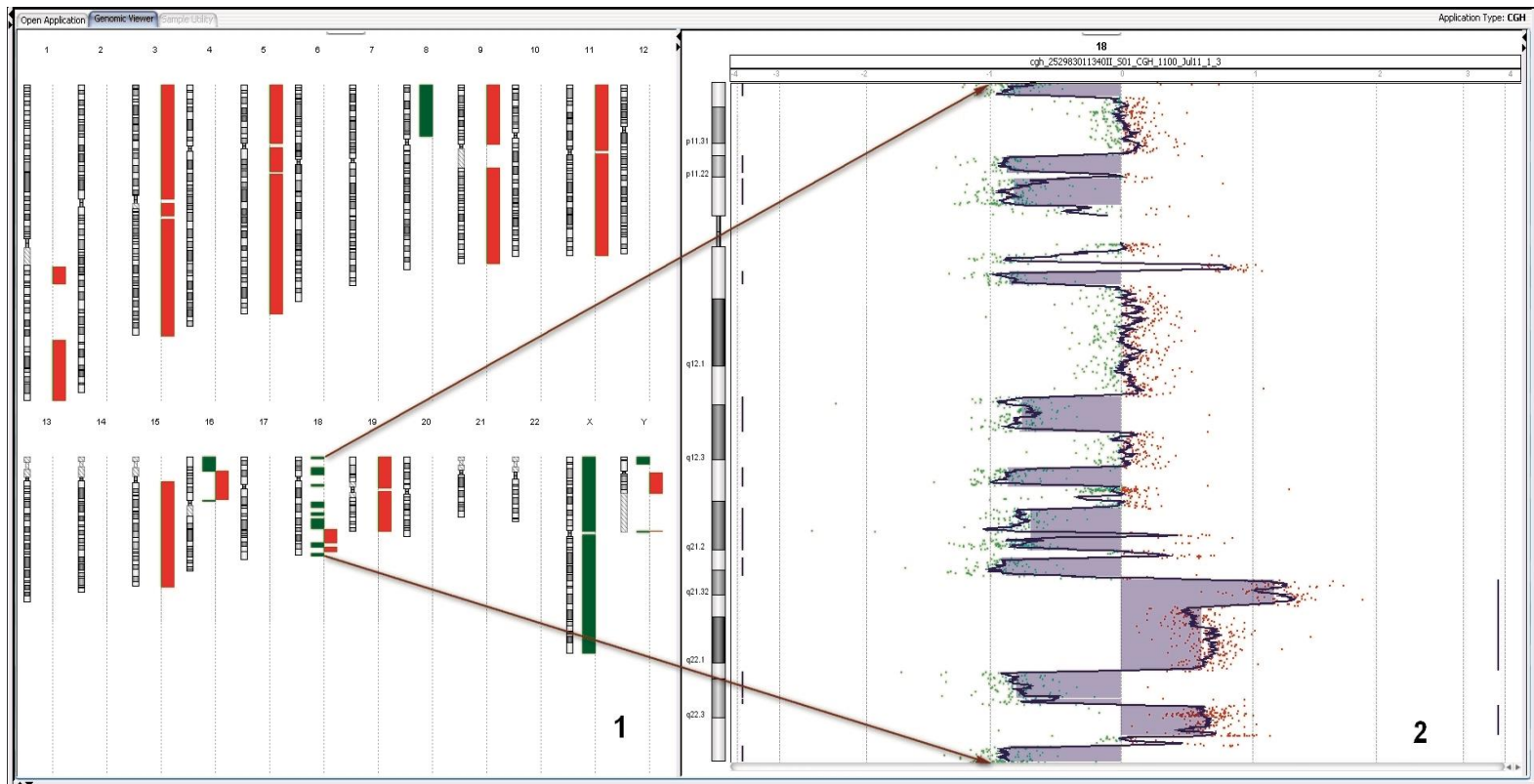
aneuploidie: +3,+5,+9, +11, +15,+19, -X

strukturní změny: 9x oblastí získů, 18 ztrát

***Chromothripsis 18 !!!***

# Array-CGH profil (4x44k) chromothripsis 18

CNAs: 12x delece, 4x zisk, 2x amplifikace,  
medián vel. CNAs: delece 7,4 Mbp, zisk 15,4 Mbp, 7x oblastí zlomů



- 1) H-MM profil (+3,+5,+9, +11, +15,+19), zisk v oblasti 1q21 a 16p12.1 - 16p13.3, ztráty materiálu v oblasti 8p, 16p13.3; ->
- 2) arr18p11q32.3(64748-78012829)cth



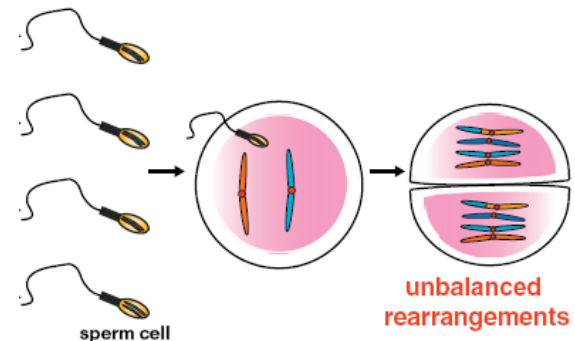
## Chromothripsis in Treatment Resistance in Multiple Myeloma

Kyoung Joo Lee<sup>1</sup>, Ki Hong Lee<sup>1</sup>, Kyong-Ah Yoon<sup>2</sup>, Ji Yeon Sohn<sup>3</sup>, Eunyoung Lee<sup>4</sup>,  
Hyewon Lee<sup>4,5</sup>, Hyeon-Seok Eom<sup>1,4</sup>, Sun-Young Kong<sup>1,3,4,6\*</sup>

**Pacienti s MM a chromothripsis – rezistence k nejmodernějším protinádorovým lékům – Bortezomid (Velcade) ?**

# Chromothripsis u vrozených genetických chorob – čím se liší

- častěji postižen původem otcovský chromozom (spermatogeneze citlivější k poškození DNA ...)
- vznik komplexních přestaveb, delece, duplikace, inverze, translokace...ale méně změn...
- důsledkem jsou pacienti s dysmorfickými rysy, vývojovými vadami, PMR...



# Chromothripsis u vrozených chorob

Loeys–Dietz syndrome type 4, caused by chromothripsis, involving the *TGFB2* gene



Paolo Fontana <sup>a,\*</sup>, Rita Genesio <sup>a</sup>, Alberto Casertano <sup>b</sup>, Gerarda Cappuccio <sup>b</sup>, Angela Mormile <sup>a</sup>, Lucio Nitsch <sup>a</sup>, Achille Iolascon <sup>a</sup>, Generoso Andria <sup>b</sup>, Daniela Melis <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, Federico II University, Naples, Italy

<sup>b</sup> Department of Translational Medical Sciences, Division of Pediatrics, Federico II University, Naples, Italy

**Loeys-Dietzův syndrom** - je autozomálně dominantní genetické onemocnění, které se podobá **Marfanovu syndromu**.

Toto onemocnění je způsobeno mutací v genech kódující **TGF- $\beta$  signální dráhu**. Tato dráha reguluje buněčnou proliferaci, **diferenciaci a reguluje několik funkcí pojivové tkáně**. Narušení genů kódujících TGF- $\beta$  signální dráhu nebo jejích složek je příčinou několika lidských patologií, jako jsou **aneurisma aorty, skolióza, arachnodaktylie, hrudní deformace, hyperflexibilitu kloubů a mentální postižení**.

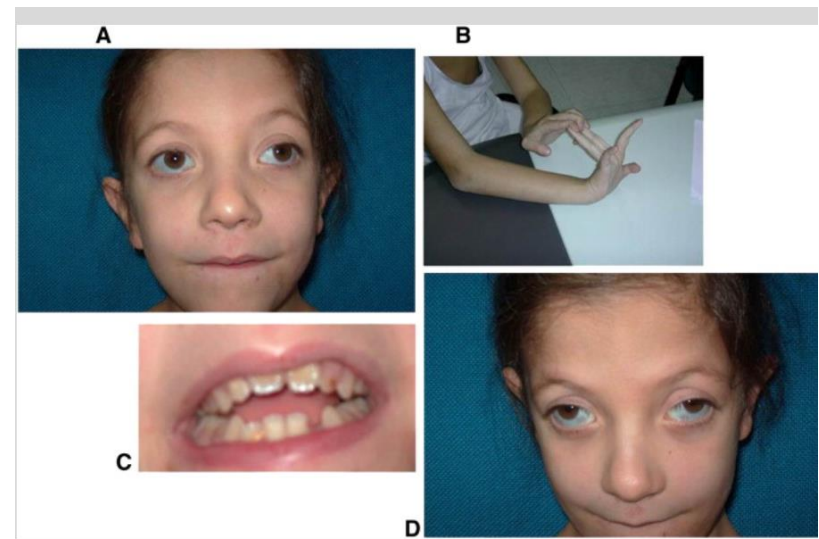
# Loeys–Dietzův syndrom a chromothripsis

Kazuistika - 18 letá ženy nízkého vzrůstu, která měla nízké IQ (70), vývojové vady, srdeční anomálie, skoliózu, morfologické anomálie kostí, hyperflexibilitu kloubů a mnoho dalšího, které odpovídají mutaci v genech pro TGF- $\beta$  signální dráhu - *Fontana, et al. (2014)*

- Genetická analýza pomocí aCGH prokázala 6 zlomových míst (čtyři na chromozomu 1, jedno na chromozomu 9 a jedno na chromozomu 21) a **čtyři *de novo* delece zahrnující 20 genů**
- Array-CGH identified the interstitial **deletion of four regions**: 1q41, that was approximately 5.23 Mb in size; 1q43 (1.33 Mb); 9p24.3 (158.71 kb); and 21q22.12 (826 kb).
- Deletované OMIM geny - SMYD2, PTPN14, CENPF, KCNK2, KCTD3, USH2A, ESRRG, SPATA17, RRP15, **TGFB2 (1q41)**; CHRM3 (1q43); KANK1 (9p24.3); RCAN1, CLIC6, RUNX1 (21q22.12).

-

# Fenotyp pacientky s Loeys–Dietzovým syndromem



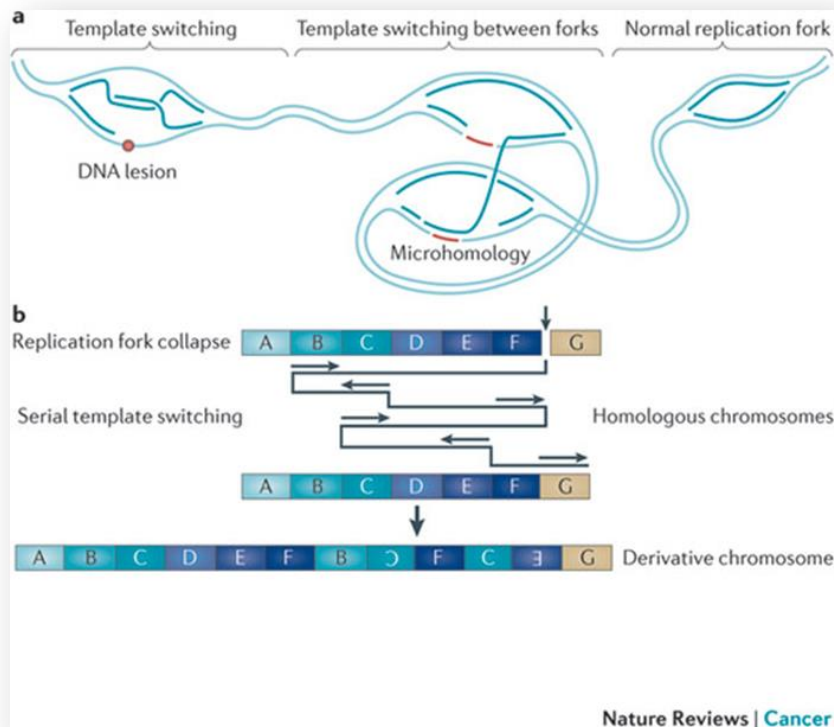
Na obrázku lze vidět morfologické anomálie kostí a extrémní prohnutí kolenou (*Fontana, et al., 2014*)



# Chromothripsis u vrozených chorob – jiné mechanismy vzniku aberantních chromozomů

## ABERANTNI REPLIKACE

- **blokování replikační vidlice a změna templátového vlákna** (fork stalling and template switching, FoSTeS) nebo
- **replikace způsobená zlomem zprostředkovaným mikrohomologií** (microhomology-mediated break induced replication, MMBIR)



**Tento typ přestaveb je někdy nazýván *chromoanasythesis* – častější duplikace, triplikace, inverze !!!**

# Nová klasifikace – chromoanagenesis ?

**Chromoanagenesis** – komplexní strukturální přestavby vzniklé při jedné katastrofické události postihující jeden či více chromozomů



**Chromothripsis** - postihuje jeden chromozom, rameno či část chromozomu – rozpad a náhodné spojení chromozomů, změny mohou být balancované, či se vyskytují zisky a ztráty sekvencí, výskyt hlavně **u nádorů (NHEJ)**

**Chromoanasyntesis** – důsledek chybné replikace, vznik delecí, duplikací, triplikací, vyskytuje se spíše **u vrozených onemocnění (poruchy replikace)**

## Clinical report

# Constitutional chromoanasythesis: description of a rare chromosomal event in a patient

Julie Plaisancié<sup>a,\*</sup>, Pascale Kleinfinger<sup>b</sup>, Claude Cancès<sup>c</sup>, Anne Bazin<sup>b</sup>, Sophie Julia<sup>a</sup>, Detlef Trost<sup>b</sup>, Laurence Lohmann<sup>b</sup>, Adeline Vigouroux<sup>d</sup>

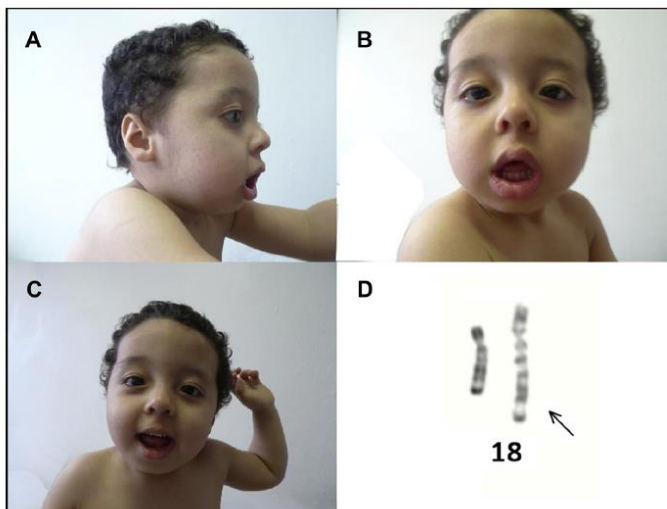


Fig. 1. A, B, C: Photographs of the proband at the age of 30 months. Note the round hypotonic face, the telecanthus with the downslanted palpebral fissures and the low and posteriorly rotated ears, and D: RHG-banding showing complex rearrangement of one of the copies of chromosome 18 of the patient (the derivative chromosome is marked by an arrow).

## Pacient s faciální dysmorfii – abnormální chromozom 18

- 7 duplikovaných segmentů na 18q
- 1 triplikace 18p
- 20 MB navíc

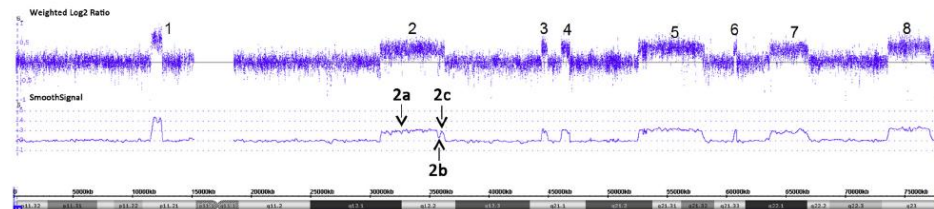


Fig. 2. Results of the SNP-array (40 Kb) showing the duplications and triplication observed in the patient. It consisted of seven duplicated segments of the long arm of chromosome 18 and one triplicated segment of the short arm. The size of these regions ranged from 200 Kb to 5 Mb, representing around 20 Mb of surplus chromosomal material.

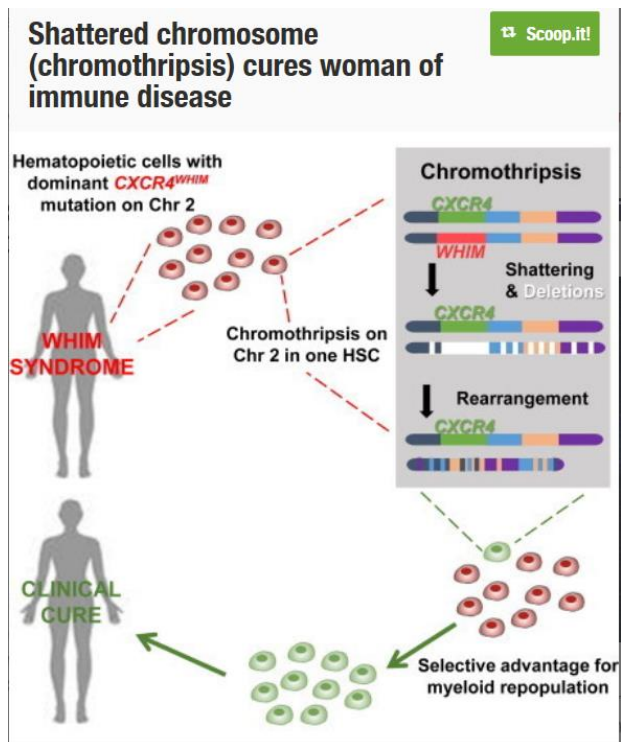


Fig. 3. Schematic representation of the complex chromosomal rearrangement identified in our patient. Duplications and triplication observed by SNP-array were localized by FISH analysis using BAC probes.

# Může být chromothripsis užitečná?

## • WHIM syndrom

- **WHIM** - warts, hypogammaglobulinemia, infections and myelokathexis syndrome
- **vzácný syndrom vrozené imunodeficiency** – opakované bakteriální a virové infekce
- příčina – mutace genu *CXCR4* (2q22.1) ...autozomově dominantní



- 59 letá pacientka, 2 postižené dcery s mutací *CXCR4*
- sama 20 let bez potíží
- cytogenetické vyšetření – nález o 15 % kratší chromozom 2
- NGS – chybí mutovaná alela *CXCR4* a dalších 163 genů
- **delece genu po reparaci - chromothripsis léčí?**

# Závěr

- **Chromothripsis** – nový typ strukturní variability lidského genomu objevený v roce 2011 díky NGS a aCGH
- **nový pohled na vzniku nádorů ...‘all-at-once’**
- špatná prognóza ...rezistence k současným léčebným přístupům ....jiná léčba?
- vzácně i u vrozených genetických chorob
- **nutno používat celogenomové metody při vyšetřování pacientů !**

**Děkuji za pozornost !**

