

Sekvenování nové generace u MDS zkušenosti z pracoviště

Libor Červinek

**terní hematologická a onkologická klinika
LF MU a FN Brno**



**Interní hematologická a onkologická klinika
FN Brno a LF MU**

Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology,
University Hospital Brno
and Masaryk University, School of Medicine



Diagnóza MDS

Cytopenie → suspektní MDS



Doporučená vyšetření

- Anamnéza a klinické vyšetření
- Krevní obraz s diferenciálním rozpočtem, stanovení počtu retikulocytů
 - Vyhodnocení periferního krevního nátěru pod mikroskopem
- Vyšetření kostní dřeně s barvením na železo a cytogenetikou



Diagnóza MDS je postavena na morfologických a klinických kritériích

Klasifikace MDS dle WHO 2016

WHO jednotka	Dysplast linie	Počet cytopenií	Prstenčité sideroblasty	Blasty v periférii a ve dřeni	Cytogenetika
• MDS-SLD	1	1 nebo 2	< 15 % < 5 %*	KD < 5 % PK < 1 % Auerova tyč 0	Jakákoliv, kromě 5q-
• MDS-MLD	2 nebo 3	1 - 3	< 15 % < 5 %*	KD < 5 % PK < 1 % Auerova tyč 0	Jakákoliv, kromě 5q-
• MDS- RS-SLD	1	1 nebo 2	≥ 15 % ≥ 5 %*	KD < 5 % PK < 1 % Auerova tyč 0	Jakákoliv, kromě 5q-
• MDS- RS- MLD	2 nebo 3	1 - 3	≥ 15 % ≥ 5 %*	KD < 5 % PK < 1 % Auerova tyč 0	Jakákoliv, kromě 5q-
• MDS s izolovanou del (5q)	1 - 3	1 - 2	ne	KD < 5 % PK < 1 % Auerova tyč 0	del 5q- izol. ± 1 další změna**

Klasifikace MDS dle WHO 2016

• MDS-EB1	0 – 3	1 - 3	ne	KD 5 – 9 % PK 2 - 4 % Auerova tyč 0	Jakákoliv
• MDS-EB2	0 – 3	1 - 3	ne	KD 10 – 19 % PK 5 – 19 % Auerova tyč ±	Jakákoliv
• MDS-U • <i>s 1% blastů</i>	1 – 3	1 – 3	ne	<i>U všech typů:</i>	Jakákoliv
• <i>s 1 linií dysplazie a pancytopenií</i>	1	3	ne	KD < 5 %, PK = 1 %	Jakákoliv
• <i>na základě cytogenetiky</i>			< 15 %		Typický nález pro MDS
• Refrakterní cytopenie u dětí	1 – 3	1 – 3	ne	KD < 5 % PK < 2 %	Jakákoliv

Cytopenie je definována: hemoglobin < 100 g/l, destičky < 100x10⁹/l, absolutní počet neutrofilů < 1,8x10⁹/l

IPSS-R systém (*Greenberg et al., 2012*)

	Prognostická hodnota						
	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Karyotyp	Velmi dobrý		Dobrý		Střední	Špatný	Velmi špatný
Blasty v KD (%)	≤ 2		$>2 < 5\%$		5- 10%	$>10\%$	
Hemoglobin	≥ 10		$8 - < 10$	< 8			
Destičky	≥ 100	50 - 100	< 50				
Absolutní počet neutrofilů	≥ 0.8	< 0.8					

Cytogenetické prognostické skupiny:

Velmi dobrá: -Y, del(11q)

Dobrá: normální, del(5q), del(12p), del(20q), dvojitá změna zahrnující del(5q)

Střední: del(7q), +8, +19, i(17q), jiná jedna nebo dvě nezávislé změny v karyotypu

Špatná: -7, inv(3)/t(3q)/del(3q), dvojitá změna zahrnující -7/del(7q), komplexní změny se 3 změnami

Velmi špatná: Komplexní změny karyotypu > 3 abnormality karyotypu

- Velmi nízké riziko $\leq 1,5$ bodu
- Nízké riziko $> 1,5 - 3$ body
- Intermediární $> 3 - 4,5$ body
- Vysoké riziko $> 4,5 - 6$ body
- Velmi vysoké riziko > 6 bodů

Význam cytogenetiky pro prognózu MDS

Souhrnná multicentrická analýza 2351 pacientů s MDS
prokazuje nedocenění prognostického významu nepříznivé
cytogenetiky v IPSS

J. Schanz, C.Steidl, G.Garcia- Manero, U. Germing, H. Kantarjian

Německo- rakouská + MDS Anderson Cancer center: databáze Journal of Clinical
Oncology 4/2011

Závěr: vliv nepříznivého karyotypu na přežití byl stejně významný
jako zvýšení počtu blastů nad 20 %

Hazard ratio: 3.3 nepříznivý karyotyp

4.8 komplexní karyotyp se změnami 5 a 7chromozomu

3.1 blasty od 21% do 30%

Cytogenetické abnormality

- Přítomny u poloviny primárních MDS
- Rozdílný prognostický význam
- Delece (3q/5q/7q/11q/12p/20q)
- Monosomie 5/7, trisomie 8/19, i(17q), a -Y
- Komplexní změny

Genetické změny

- Identifikováno více než 40 genů, které se jsou u MDS opakovaně mutovány
- Mutace přítomny u 70% pacientů
- Nejčastěji mutované geny lze zařadit k několika biologickým procesům
 - RNA splicing (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*)
 - DNA methylace (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*)
 - Modifikace histonů (*ASXL1*, *EZH2*, *BCOR*)
 - Transkripční faktory (*RUNX1*, *ETV6*, *CUX1*, *GATA2*)
 - Přenos signálu (*CBL*, *JAK2*, *NRAS*, *KRAS*, *MPL*, *NF1*, *PTPN11*, *KIT*, *FLT3*)
 - p53 dráha (*TP53*, *PPM1D*)

NGS u MDS ?

Více jak 40 genů, žádný není patognomický pro MDS

RNA sestřih, epigenomika, DNA opravy + metylace, transkripční faktory ...

Somatické mutace u více jak 10% pacientů nad 60 let a u 90% pacientů s MDS

Ale !! u MDS

1/ žádný z genů není mutovaný ve většině případů – nízká frekvence !

2/ žádný z mutovaných genů není specifický pro MDS – nízká specificta!

3/ klonální hematopoéza může být i u pacientů, bez MDS

4/ zárodečné mutace RUNX1, CEBPA, GATA 2

Každá laboratoř vlastní metodika- chybí standardizace

Genový panel

- Komerční panel
- Set genů byl cílen na myeloproliferativní onemocnění
- Velikost panelu 37 genů, 250 exonů
- Metoda multiplex PCR, specifické primery z jedné strany, ampliconové sekvenování s UMI
- Knihovny byly sekvenovány na přístroji NextSeq (Illumina)
- Bioinformatická analýza dat probíhala jak pomocí software dodávaného výrobcem, tak pomocí vlastní bioinformatické pipeline

Seznam genů v panelu

<i>ABL1</i>	<i>CSF3R</i>	<i>GATA2</i>	<i>NRAS</i>	<i>TET2</i>
<i>ANKRD26</i>	<i>DDX41</i>	<i>IDH1</i>	<i>PHF6</i>	<i>TP53</i>
<i>ASXL1</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>IDH2</i>	<i>PTPN11</i>	<i>U2AF1</i>
<i>BCOR</i>	<i>ETNK1</i>	<i>JAK2</i>	<i>RUNX1</i>	<i>WT1</i>
<i>BRAF</i>	<i>ETV6</i>	<i>KIT</i>	<i>SETBP1</i>	<i>ZRSR2</i>
<i>CALR</i>	<i>EZH2</i>	<i>KRAS</i>	<i>SF3B1</i>	
<i>CBL</i>	<i>FLT3</i>	<i>MPL</i>	<i>SRSF2</i>	
<i>CEBPA</i>	<i>GATA1</i>	<i>NPM1</i>	<i>STAG2</i>	

Genový panel - přehled testovaných genů, jejich exonů a referenčních sekvencí:

Gen	Anotace	Analyzované exony	Gen	Anotace	Analyzované exony
ABL1	NM_005157	4 - 10	KIT	NM_000222	2, 8, 9 - 15, 17, 18
ANKRD26	NM_014915	1 (c.-113-c.-134)	KRAS	NM_004985	2 - 4
ASXL1	NM_015338	11, 12, 13	MPL	NM_005373	10, 12
BCOR	NM_017745	2 - 7, 9 - 15	NPM1	NM_002520	11
BCOR	NM_001123385	8	NRAS	NM_002524	2 - 4
BRAF	NM_004333	11, 15	PHF6	NM_032458	9, 10
CALR	NM_004343	8, 9	PHF6	NM_032335	2 - 8
CBL	NM_005188	8, 9	PTPN11	NM_002834	3, 4, 7, 8, 12, 13
CEBPA	NM_004364	1	PTPN11	NM_080601	11
CSF3R	NM_000760	10, 14, 15, 16	RUNX1	NM_001754	2, 3, 5 - 9
CSF3R	NM_156039	17	RUNX1	NM_001122607	1, 5
CSF3R	NM_172313	18	SETBP1	NM_015559	4 (p.799 - p.950)
DDX41	NM_016222	1 - 17	SF3B1	NM_012433	13 - 18
DNMT3A	NM_022552	2, 3, 5 - 23	SRSF2	NM_003016	1, 2
DNMT3A	NM_153759	1, 2	STAG2	NM_006603	2 - 33
DNMT3A	NM_175630	4	STAG2	NM_001042749	32
ETNK1	NM_018638	3	TET2	NM_001127208	4 - 11
ETV6	NM_001987	1 - 8	TET2	NM_017628	3
EZH2	NM_004456	2 - 20	TP53	NM_000546	1 - 11
FLT3	NM_004119	8 - 17, 19 - 21	TP53	NM_001276696	10
GATA1	NM_002049	2	TP53	NM_001276695	10
GATA2	NM_032638	2 - 6	U2AF1	NM_006758	2, 5, 6
IDH1	NM_005896	3, 4	WT1	NM_024424	1 - 7,9
IDH2	NM_002168	4, 6	WT1	NM_001198552	8
JAK2	NM_004972	12 - 16	ZRSR2	NM_005089	1 - 11

Kdy nám pomůže vyšetření NGS u MDS ?

1/ diagnostika MDS- SF3B1 pro dg. RARS dg. kritérium WHO

ale přítomen i u MPN/MDS, CMMOL a RARS-T, ale často i u CLL

2/ TP 53 mutace 55% pacientů s komplexním karyotypem,

ale nízké zastoupení somatických mutací

Bialelická mutace TP 53 nejsilnější negativní faktor (Hase, Leukemia 2019)

silnější než monosomální karyotyp nebo více jak 3 chromozomální změny

IHOK: standard vyšetření TP 53 NGS- pacienti s MDS del 5q

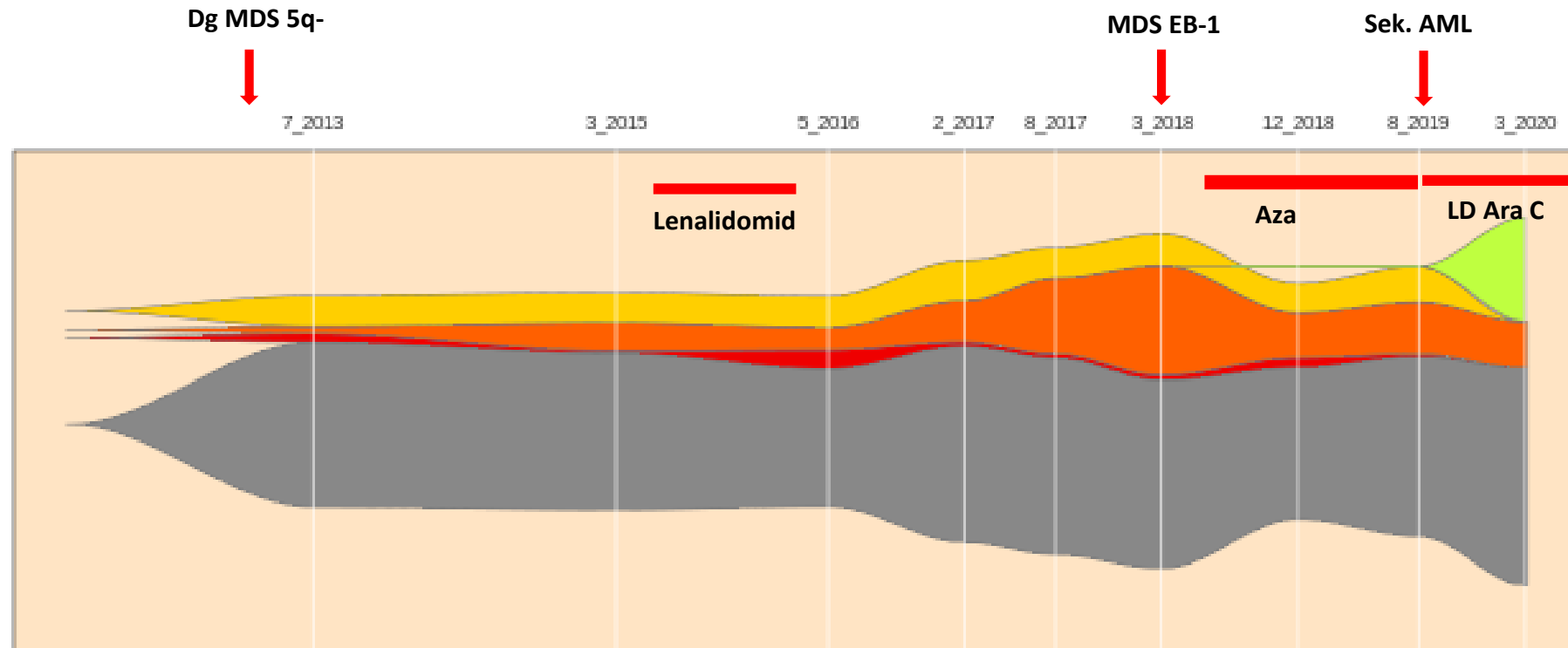
při diagnóze, léčbě lenalidomidem

průkaz nárůstu mutace, někdy vývoj dalších mutací

3/ průkaz mutací: pozitivní i negativní prediktivní faktor –pokud není zachycena mutace vysoká predikce nepřítomnosti MDS

Klonální vývoj

- Pacientka diagnostikovaná jako 5q syndrom (2013), transfúzní dependence
- Terapie erythropoetinem bez efektu
- Terapie lenalidomidem (5/2015 – 3/2016) s velmi dobrým efektem transfúzní independence
- Progrese do EB1, terapie Aza
- Progrese do sek. AML, nyní v terapii LD Ara C



- klon1: (DNMT3A:Phe752Ile, Pro419_Ser420insTer)
- klon2: DNMT3A:Arg736His
- klon3: (JAK2:Val617Phe, TP53: Gly245Ser)
- klon4: TET2:Ile1873Thr
- klon5: TET2:Val415Leu

Vyšetření: Analýza genu TP53 metodou FASAY, došetřeno pomocí sekvenování nové generace (NGS) -2016-2018

Mutace	Typ mutace	% alel; odběr 3/2015	% alel; odběr 5/2016	% alel; odběr 2/2017	% alel; odběr 3/2018
c.733G>A p.(G245S)	záměnová mutace, hot spot patogenní mutace	0,6	2,2	6,7	18,6
c.707A>G p.(Y236C)	záměnová mutace, častá patogenní mutace	0,1	2,5	5,4	2,5
c.818G>A p.(R273H)	záměnová mutace, hot spot patogenní mutace	nedetekováno	1,0	2,6	0,2
c.581T>G p.(L194R)	záměnová mutace, častá patogenní mutace	nedetekováno	0,3	2,1	0,5
c.524G>A p.(R175H)	záměnová mutace, hot spot patogenní mutace	0,06	1,0	1,8	3,0
c.721T>C p.(S241P)	záměnová mutace, málo častá patogenní mutace	nedetekováno	0,5	1,8	0,6
c.742C>T p.(R248W)	záměnová mutace, hot spot patogenní mutace	nedetekováno	1,9	1,3	0,4
c.742C>G p.(R248G)	záměnová mutace, častá patogenní mutace	nedetekováno	0,6	1,0	0,3
c.659A>G p.(Y220C)	záměnová mutace, hot spot patogenní mutace	0,02	0,3	0,6	0,8

ICUS: Idiopathic cytopenia of undetermined significance

Cytopenie: trombocytopenie! nesplnění dg. kritérií pro MDS/ morfologie, CTG/

Nejsou kriteria klonality: CTG a mutace

Nepřítomnost mutace- negativní predikce MDS

CCUS: clonal cytopenias of undetermined significance

klonalita /mutace / + idiopatická cytopenie

CHIP: clonal hematopoiesis of indeterminate potential

Analogie MGUS a monoklonální B lymfocytosy

Odds. progrese do malignity 0,5-1% rok

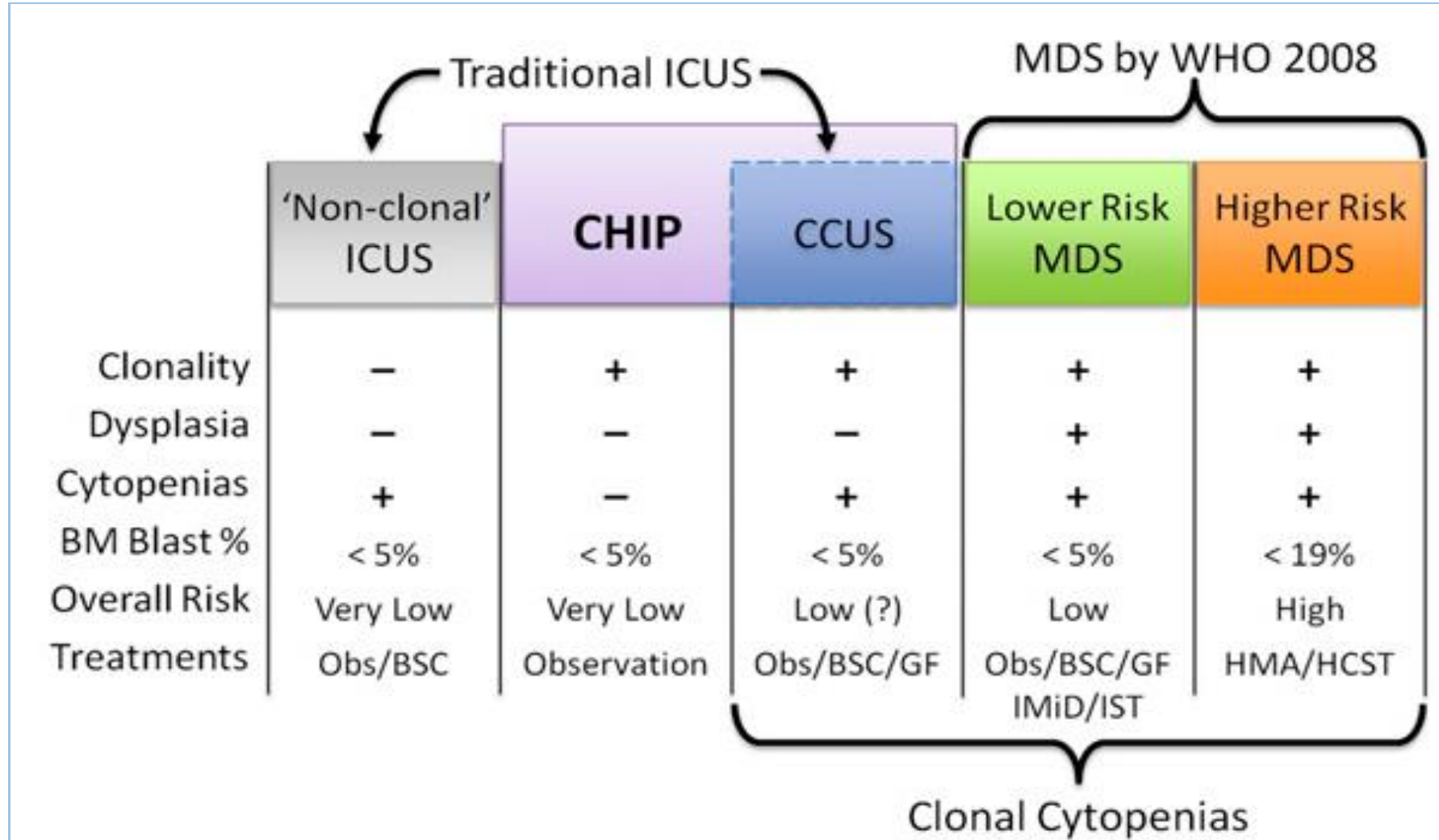
Nález somatické mutace asociované s hematologickou malignitou,

nesplnění dg.kritérií pro MDS/ morfologie, CTG/

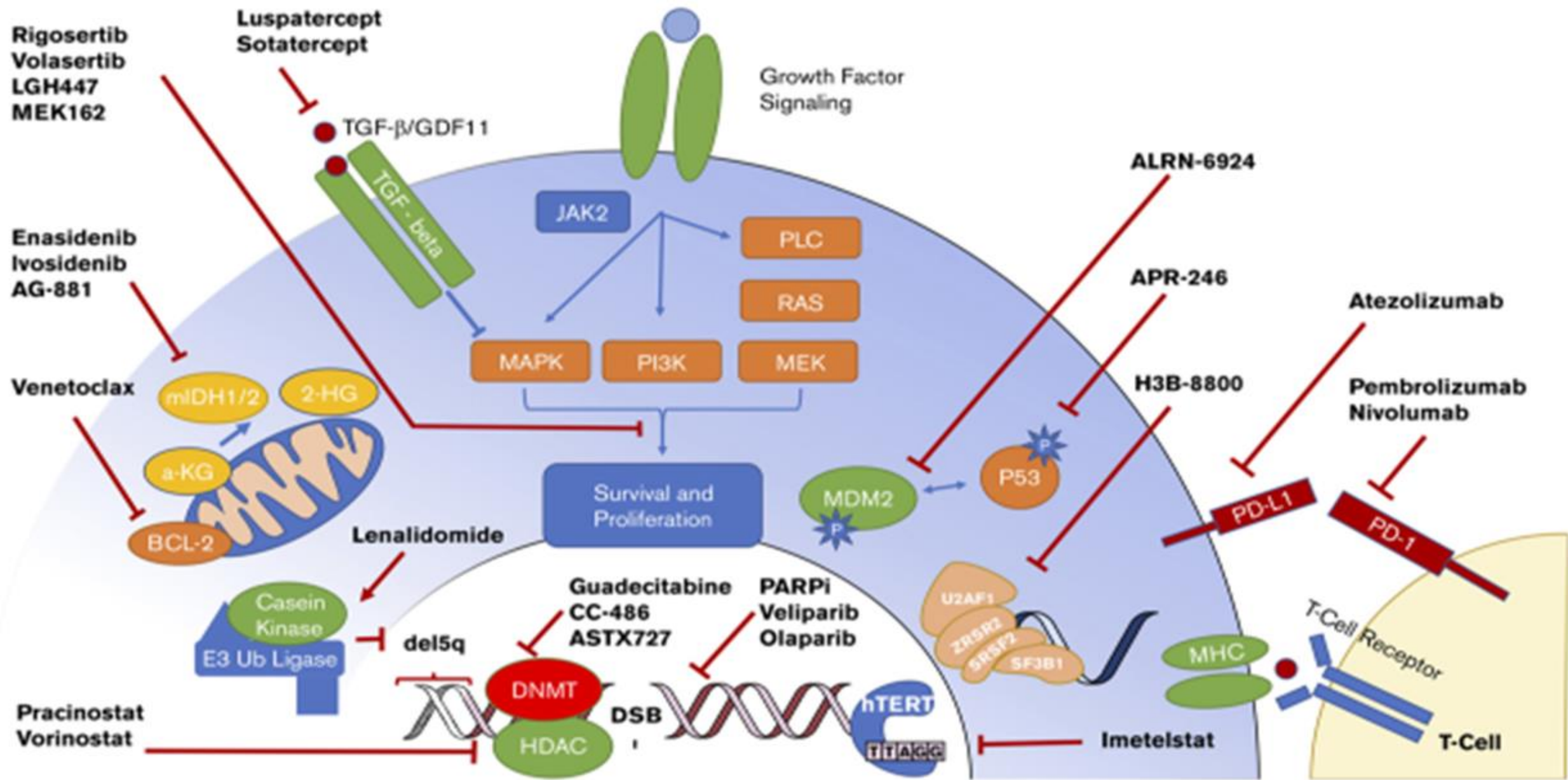
Minimální velikost mutované alely 2% v PK

Mutované geny: DNMT3A, TET2, JAK2, SF3B1, ASXL1, TP53, CBL, GNB1, BCOR, U2AF1, CREBBP, CUX1, SRSF2, MLL2, SETD2, GNAS, PPM1D, BCORL1

NGS přináší nové klinické jednotky



Molecular pathophysiology of the myelodysplastic syndromes: insights for targeted therapy



Souhrn

- NGS : Jasný přínos TP53 a SF3B1
- Nejasný přínos – panel mnoha genů, negativní predikace MDS
- Nová nemoc :CHIPclonal hematopoiesis of indeterminate potential
- Budoucnost zacílení léčby dle mutovaných genů