

Molekularna dijagnostika u hematologiji

MOLEKULARNA GENETIKA - NOVOSTI U DIJAGNOSTICI I TERAPIJI
Znanstveni sastanak

Blaženka Grahovac
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Ponedjeljak, 16. listopada 2017.
Knjižnica Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti u
Zagrebu,
Strossmayerov trg 14, Zagreb

Johannes Friedrich Miescher
(1844- 1895)

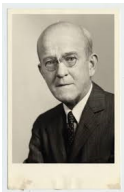
švicarski liječnik i biolog, koji je najpoznatiji po tome što je izolirao različite fosfatom bogate spojeve koje je nazvao "nuklein" (1869) iz staničnih jezgara leukocita

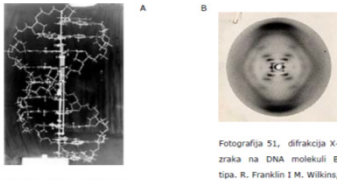
Sveučilište u Tuebingenu
(Laboratorij prof. Felix Hoppe-Seyler-a)



- Oswald Avery
- (1877-1955)
- kanadski bakteriolog

- 1944. godine pokazao je u eksperimentima na bakterijama da se geni sastoje od nukleinskih kiselina






A

Originalni DNA model (J. Watson i F. Crick, 1952.)

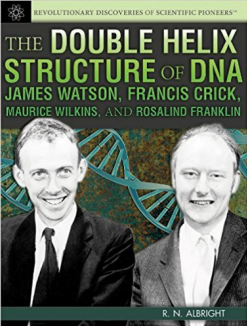
B

Fotografija 51, difrakcija X-zraka na DNA molekuli B tipa. R. Franklin i M. Wilkins, 1951.

C.



James Watson Francis Crick
Maurice Wilkins Rosalind Franklin




REVOLUTIONARY DISCOVERIES OF SCIENTIFIC PIONEERS™

THE DOUBLE HELIX
STRUCTURE OF DNA
JAMES WATSON, FRANCIS CRICK,
MAURICE WILKINS, AND ROSALIND FRANKLIN

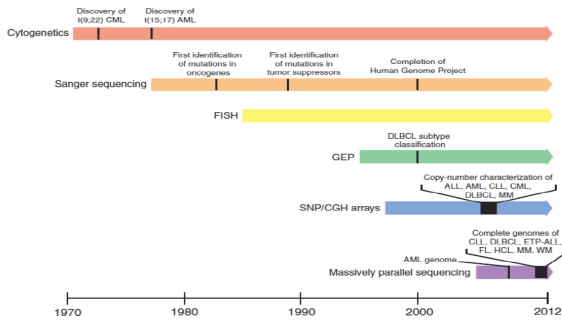
R. N. ALBRIGHT

- Za sudjelovanje u otkrivanju strukture molekule **DNK** iz 1953. **James Watson**, **Francis Crick** i **Maurice Wilkins** zajedno su dobili 1962. **Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu**.



Biokemičar **Kary Banks Mullis** američki je dobitnik **Nobelove nagrade 1993.** godine za izum metode **polimerazne lančane reakcije (PCR)**

Hematology Diagnostics Timeline

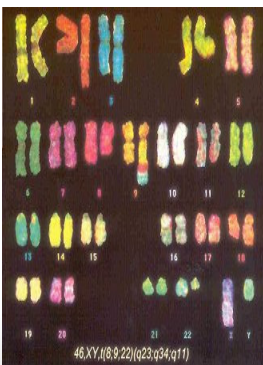


Blood Cancer Journal (2013) 3, e127; doi:10.1038/bcj.2013.26

Kronična mijeloična leukemija (KML) „Philadelphia kromosom priča“



Kariogram i rad objavljen u Science-u 1960.



A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia

In seven cases thus far investigated the minute, two banded, λ 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 one of the seven cases reported here: Nowell and Hungerford, *J. Natl. Cancer Inst.* 31 (1963)] but no one 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 have names in our manuscript) grown in culture for 24-72 hours, and prepared for cytological examination by a recently developed air-drying technique [Nowell, et al., *Exp. Cell Research*, in press]. The pattern varied from asymptomatic transient cases to extensively spread cases of several years duration in terminal myeloblastic crisis. All seven individuals showed a similar minute chromosome, and none showed any other karyotypic 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 support 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

Nowell & Hungerford, 1960 Science 132:1497

Doprinosi J. Rowley

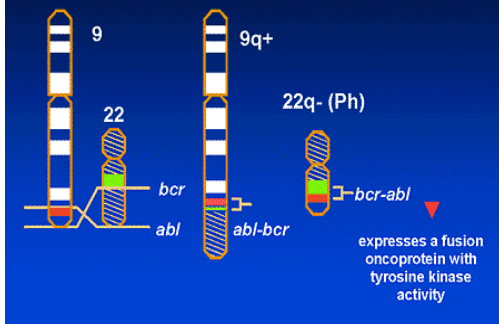
Janet Rowley (1925-2013)



Prva je opisala kromosomske translokacije u podlozi hematoloških neoplazija

- **1. Translokacija t(8;21) u AML**
• *Ann Genet* 1973; 16:109-112.
- **2. Translokacija t(9;22) u KML**
• *Nature* 1973;243: 290-293.
- **3. Translokacija t(15;17) u APL**
• *Lancet* 1977;1:549-550.

The t(9;22) translocation produces the Philadelphia (Ph) chromosome



Kronična mijeloična leukemija

1. Kronična mijeloična leukemija (KML) je klonalna bolest matičnih krvotvornih stanica
2. Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) ubraja se u mijeloproliferativne zloćudne tumore
3. KML je prva humana neoplazija za koju je dokazana specifična stečena genetska lezija – recipročna t(9;22)(q34;q11) translokacija koja se prepoznaje kao skraćeni 22. kromosom nazvan Philadelphia (Ph) kromosom.

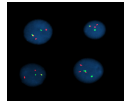
Kronična mijeloična leukemija

- U osnovi genetskog preuređenja je novonastali **fuzijski gen *BCR-ABL1*** koji kodira fuzijski onkoprotein s konstitutivno aktiviranom tirozin kinazom
- **Aktivirana tirozin kinaza u citoplazmi fosforilira niz staničnih proteina uključenih u regulaciju**
- **proliferacije**
- **blokiranja apoptoze,**
- **neučinkovitu adheziju**
- **genomsku nestabilnost**
- Posljedično, dolazi do značajne proliferacije mijeloičnih leukemijskih stanica s promijenjenim funkcionalnim značajkama.

Dijagnostičke smjernice - obrada pri dijagnozi

Dijagnostički testovi

- Koštana srž
 - Citogenetika: dokaz bcr-abl (Ph)
 - G-pruganje
 - FISH
 - Imunofenotipizacija?
- Periferna krv
 - Kvalitativni PCR, probir, podtip bcr-abl
 - Kvantitativni PCR na bcr-abl/abl (IS)



•D. Sertić (KROHEM Trakošćan)

Liječenje KML

- Liječenje kronične mijeloične leukemije bitno je napredovalo tijekom posljednjeg desetljeća, uvođenjem **prve generacija inhibitora tirozin kinaze (TKI) - imatinib mezilata** u kliničku praksu 1998/2000. godine.
- **Imatinib selektivno inhibira ABL1 kinazu i inducira hematološku i citogenetsku remisiju.**

Praćenje bolesnika – molekularna dijagnostika

VRSTE MOLEKULARNOG ODGOVORA:

MMR (major molecular response) $\leq 0.1\%$ ^{IS}

CMR (complete molecular response): nedetektabilni BCR-ABL1 transkript, dokazan pomoću qRT-PCR u 2 uzastopna uzorka, s osjetljivošću $> 10^4$

Definitions of Complete Molecular Response (CMR)

CMR⁴ (≥ 4 log reduction; $\leq 0.01\%$ ^{IS})

CMR^{4.5} (≥ 4.5 log reduction; $\leq 0.0032\%$ ^{IS})

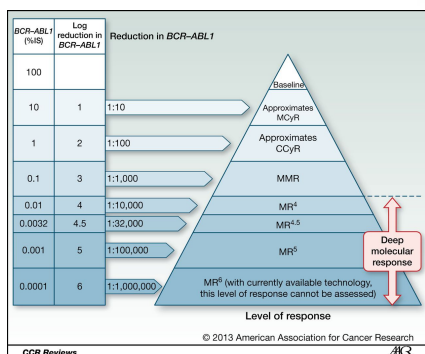
CMR⁵ (≥ 5 log reduction; $\leq 0.001\%$ ^{IS})



log reduction = reduction from IRIS baseline, not individual pretreatment levels

International Scale

Levels of molecular response in CML. MCyR, major cytogenetic response; MR, molecular response.



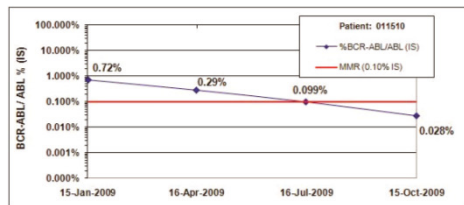
CCR Reviews

François-Xavier Mahon, and Gabriel Etienne Clin Cancer Res 2014;20:310-322

© 2013 American Association for Cancer Research

Clinical Cancer Research

Kumulativni rezultat bcr-abl/abl omjera



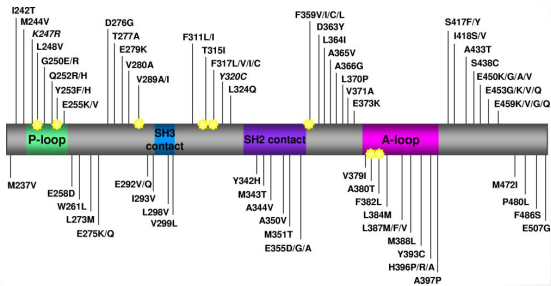
Kvantitativni PCR, KADA?

- svaka 3 mjeseca do postizanja MMR ($\leq 0,1\%$ IS), zatim svakih 3-6 mjeseci
- po potrebi češće u slučaju
- porasta bcr-abl1/abl1 (kopija transkripta)
- prije promjene terapije

Molekularno praćenje leukemijskog klona - zaključci

- Molekularno testiranje je najosjetljivija metoda za procjenu ostatne maligne mase kod Ph+ KML
- Dubina (jačina) molekularnog odgovora je udružena s povoljnijim dugoročnim ishodom bolesti
- Postignuće kompletnog molekularnog odgovora je udruženo s manjim brojem mutacija
- Postignuće MMR je udruženo s višim stopama učestalosti preživljenja bez neželjenih događanja i bez progresije bolesti.

Analiza BCR-ABL1 mutacija u funkciji optimalnog odgovora na terapiju s inhibitorima tirozin kinaze



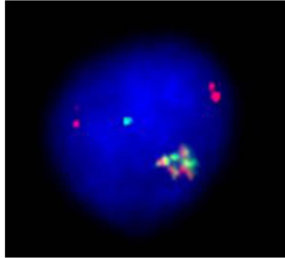
Rezistencija na terapiju imatinibom

- Već 2001. god. kod prvih imatinib-rezistentnih slučajeva, pokazano je kako **točkaste mutacije u domeni kinaze BCR-ABL1** fuzijskog gena mogu narušiti ili čak potpuno onemogućiti vezanje imatiniba.
- Ubrzo je postalo evidentno da oko **20-40% pacijenata** koji su liječeni imatinibom u prvoj liniji, razvijaju rezistenciju na terapiju.
- Studije su pokazale da je rezistencija na imatinib (gubitak hematološkog, citogenetskog i molekularnog terapijskog odgovora) uzrokovana
- **mutacijama u ABL1 kinaznoj domeni - oko 90% slučajeva**
- **amplifikacijom BCR-ABL1 gena – oko 10% slučajeva**

Rezistencija na terapiju inhibitorima tirozin kinaza

- Citogenetske aberacije u Philadelphia kromosomu
- Amplifikacija fuzijskog BCR-ABL1 gena
- Mutacije u ABL1 kinaznoj domeni BCR-ABL 1 gena

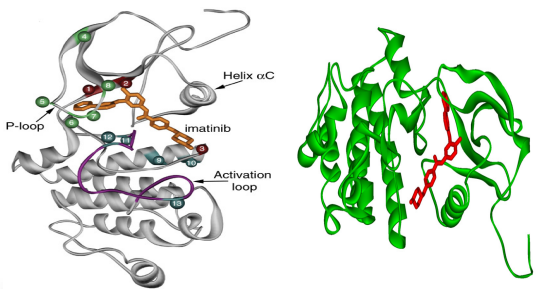
BCR-ABL amplifikacija prikazana FISH analizom. Interfazna jezgra pokazuje klaster signala fuzijskog gena *BCR-ABL*.
Cancer Genetics and Cytogenetics 159 (2005) 164–167



Preporuke Europske grupe za leukemije (ELN-a) :
Analiza mutacija u *ABL1* kinaznoj domeni

- 1. Prilikom postavljanja dijagnoze**
 - u blastnoj krizi
- 2. Tijekom 1. linije terapije**
 - neuspjeh terapije
 - povećanja omjera kopija *bcr-abl/abl1* s naznakama gubljenja velikog molekularnog odgovora (MMR)
 - suboptimalni terapijski odgovor
- 3. Tijekom 2. linije terapije (nilotinib/dasatinib)**
 - gubitak hematološkog/ citogenetskog odgovora.

Preporučeni mehanizam djelovanja imatinib-rezistentnih mutacija (kristalna struktura *ABL* kinazne domene s prikazom interpolacije imatiniba)

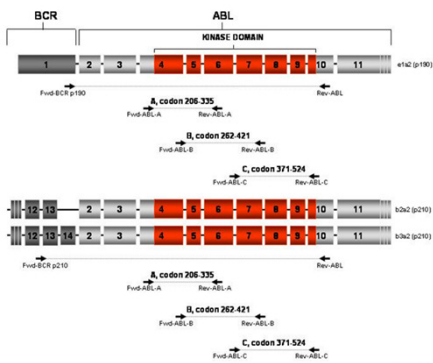


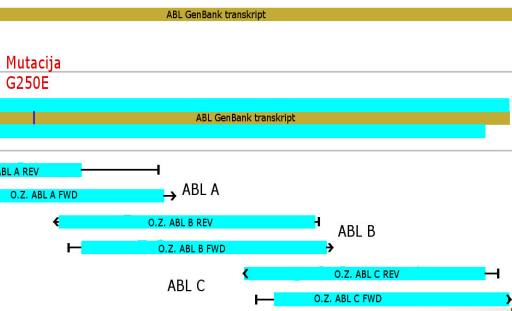
Osjetljivost staničnih kultura s mutacijam na dasatinib i nilotinib u proliferacijskim testovima *in vitro*.

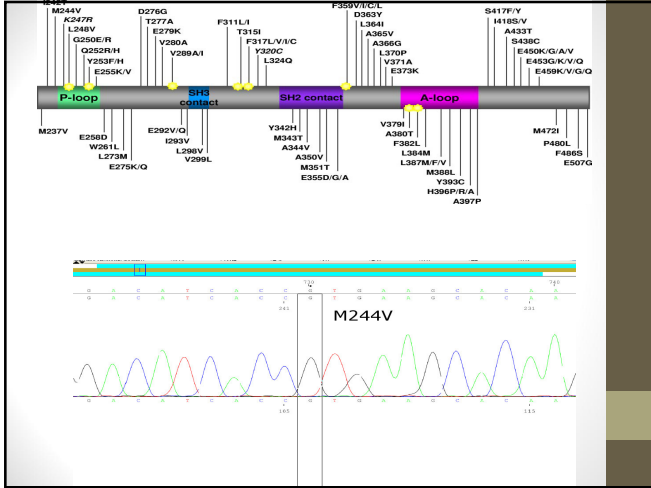
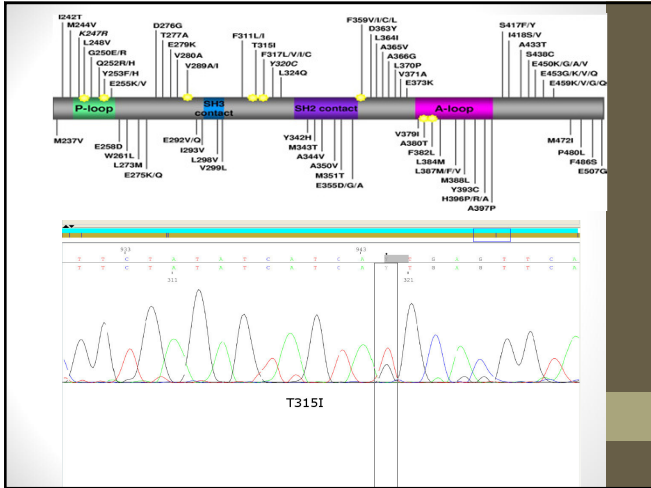
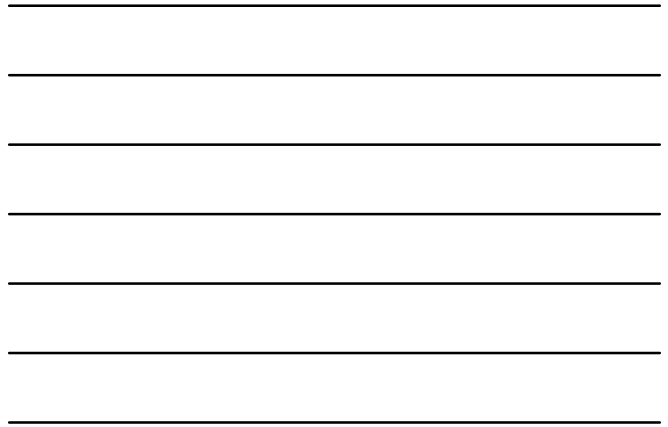
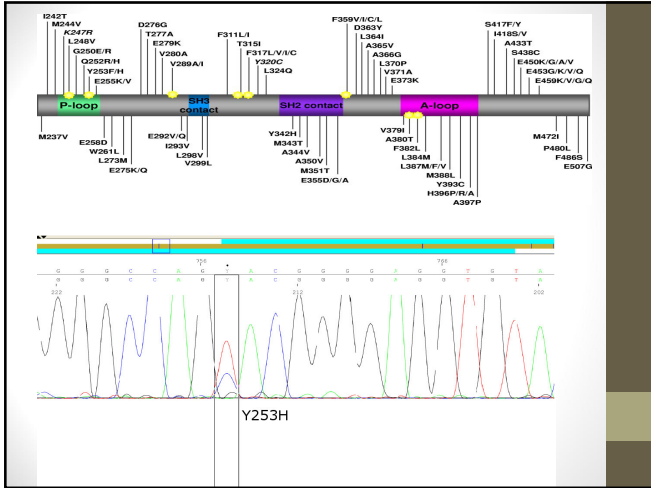
(**crveno**: izražena rezistencija; **narančasto**: rezistencija; **žuto**: umjerena rezistencija; **zeleno**: osjetljivost)

Dasatinib		Nilotinib	
O'Hare et. al. ³⁴	Redaelli et. al. ³⁵	O'Hare et. al. ³⁴	Redaelli et. al. ³⁵
T3159	T3151	T3151	T3151
T315A*	V299L	Y253H	E255V
F317V	E255K	E255V	E255K
V299L	L248V	E255K	F359V
E255V	F317L	F359V	G250E
F317L	G250E	Y253F	Y253F
E255K	E255V	Q252H	H396R
Q252H	Q252H	T315A	L248V
F359V	F486S	V379I	Q252H
L387M	L384M	F317L	H396P
G250E	E279K	L387M	L384M
E355G	H396R	G250E	F317L
Y253F	Y253F	H396R	E279K
Y253H	F359V	H396P	D276G
M244V	D276G	M244V	F486S
H396R	H396P	F311L	V299L
F311L	M351T	M351T	G398R
M351T	G398R		M351T
V379I			
H396P			

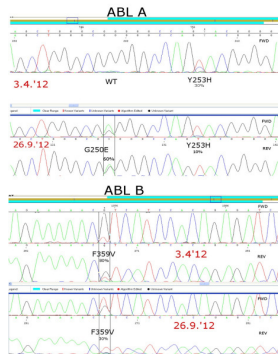
SEKVENCIJIRANJE ABL1: Analiza mutacija po prilagođenom protokolu Soverini S. i Martinelli G., University of Bologna



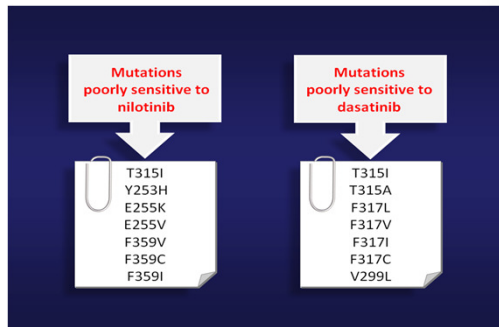




Evolucija mutacija tijekom TKI terapije



Soverini S. Optimal patient monitoring in 2013- molecular and mutational analysis (Helsinki 2013)



Klinički značajne ABL 1 mutacije

- **T 315I** rezistencija na TKI (imatinib, nilotinib, dasatinib)
- **V299L, F317L/V/I/C** rezistencija dasatinib
- **E255K/V, Y253H/F, F359V/C/I** rezistencija nilotinib

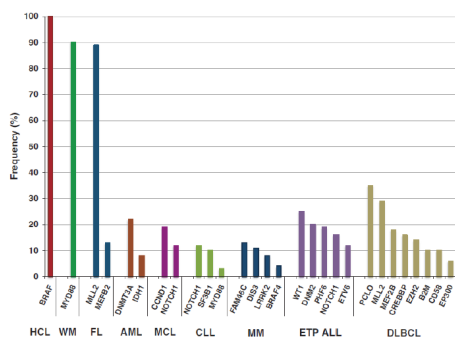
Analiza mutacija u periodu 09/2012. do 02/2015.
(Rijeka)

Broj pacijenata - ukupno	15	
Pacijenti s mutacijama	6	
Jedna mutacija	5	
Više mutacija	1 - (ukupno 3 mutacije)	
Tip mutacija	5 - poznatih	G 250 E M 244 V T 315 I F 359 V Y 253 H
	1 - bez podataka o kliničkom značaju	N 499 S

Analiza ABL1 mutacija
(Zavod za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci)

Broj pacijenta	ABL1 mutacija	Tip transkripta
Pacijent 1	G250E	B2a2 + b3a2
Pacijent 2	M244V	B2a2 + b3a2
Pacijent 3	T315I	B2a2
Pacijent 4	Nisu utvrđene mutacije	B2a2 + B3a2
Pacijent 5	F359V 03. 04. 2012	B2a2
	Y253H 03. 04. 2012	
	F359V 26. 09. 2012.	
	G250E 26. 09. 2012. Y253H 26. 09. 2012.	
Pacijent 6	Nisu utvrđene mutacije	B2a2 + b3a2
Pacijent 7	Nisu utvrđene mutacije	B2a2 + b3a2
Pacijent 8	Nisu utvrđene mutacije	B3a2
Pacijent 9	Nisu utvrđene mutacije	B2a2
Pacijent 10	Nisu utvrđene mutacije	B2a2 + b3a2
Pacijent 11	N499S - klinički nepoznate značajnosti	B3a2
Pacijent 12	Nisu utvrđene mutacije	B3a2

Otkrića novih mutacija metodom NGS u hematološkim neoplazijama



Blood Cancer Journal (2013) 3, e127; doi:10.1038/bcj.2013.26

Thermo Fisher Life Technologies,

Sequencing Technologies

Platform	Sensitivity (for clinical use)	Sample Requirement	Multiplexing Capability	Throughput	Type of mutations	Quantitative
Sanger	20%	High (ug)	None	Low	Point, indel	No
Pyrosequencing	5%	Intermediate	None	Low	Point	Yes
Genotyping / ABI TaqShot	10%	Intermediate	Intermediate	Medium	Point	Yes
NGS	5%	Low (ng)	High (amplicons and samples)	High	Point, indel, translocation, copy number change	Yes

NGS= next-generation sequencing

- Ion Torrent (Life Technologies)
 - Semiconductor based detection of pH change

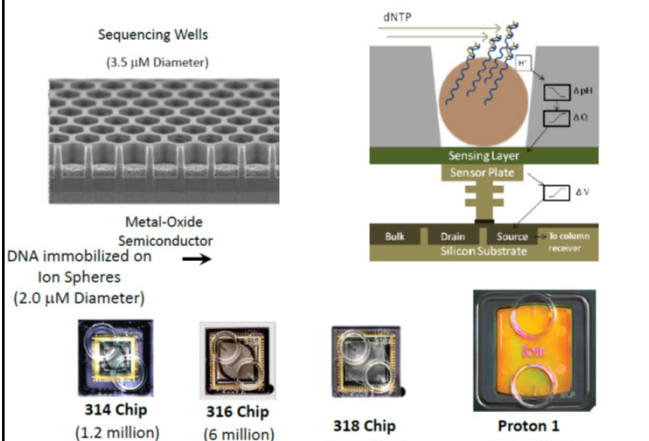


Small Gene Panels (1.5 – 2.0 Gbases/run)



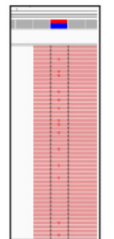
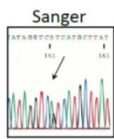
Large gene panels and Whole Exome Sequencing (10 Gbases/run)

Ion Torrent: Semiconductor based sequencing

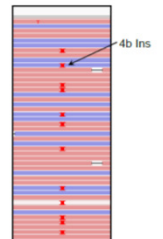
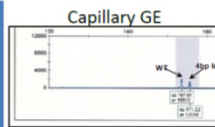


Mutation Detection by NGS

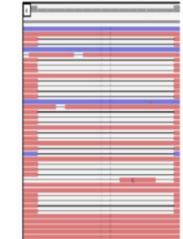
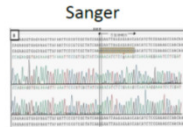
Point Mutation



Insertion



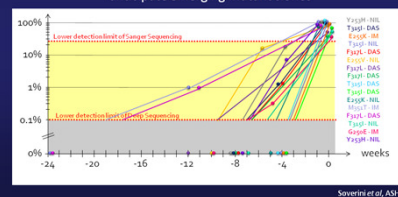
Deletion



Soverini S. Optimal patient monitoring in 2013- molecular and mutational analysis (Helsinki 2013)

Higher sensitivity & reliable detection of emerging mutants

With a lower detection limit set at $\geq 1\%$, next-generation sequencing is proving a reliable tool to scan the KD and anticipate emerging mutant clones



Značaj dokazivanja mutacija u Abl1 KD kod imatinib rezistentnih pacijenata

1. Prisustvo ili odsustvo mutacija

- Prisustvo bilo koje mutacija je upozoravajući signal na nestabilnost leukemijskog klona

2. Tip mutacije

- Detekcija specifične mutacije utječe na izbor TKI terapije (2. i 3. generacija TKI).

Soverini S. Preporuke za optimalno praćenje pacijenata sa suboptimalnim terapijskim odgovorom na imatinib (Helsinki 2013)

1. BCR-ABL/ABL1 > 10%
(manje od parcijalnog
citogenetskog odgovora)
kroz 3 mjeseca TKI
terapije

2. BCR-ABL/ABL1 > 1% -
manje od kompletnog
citogenetskog odgovor)
kroz 6 mjeseci TKI
terapije

MEDRI

Hvala na pažnji

Suradnici:



- Dr. sc. Bojana Mohar,
mag. mikrobiologije
- Dr. sc. Miljenko
Katunarić, mag.
biologije
