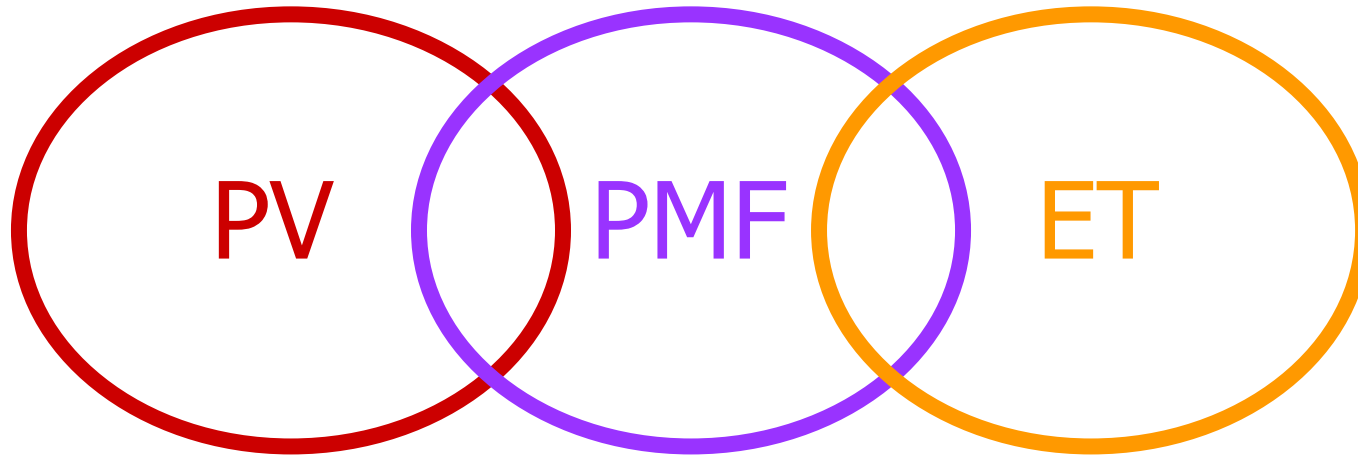


# Molekulární podstata myeloproliferativních neoplázií



**Michael Doubek**



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

MUNI  
MED



CEITEC

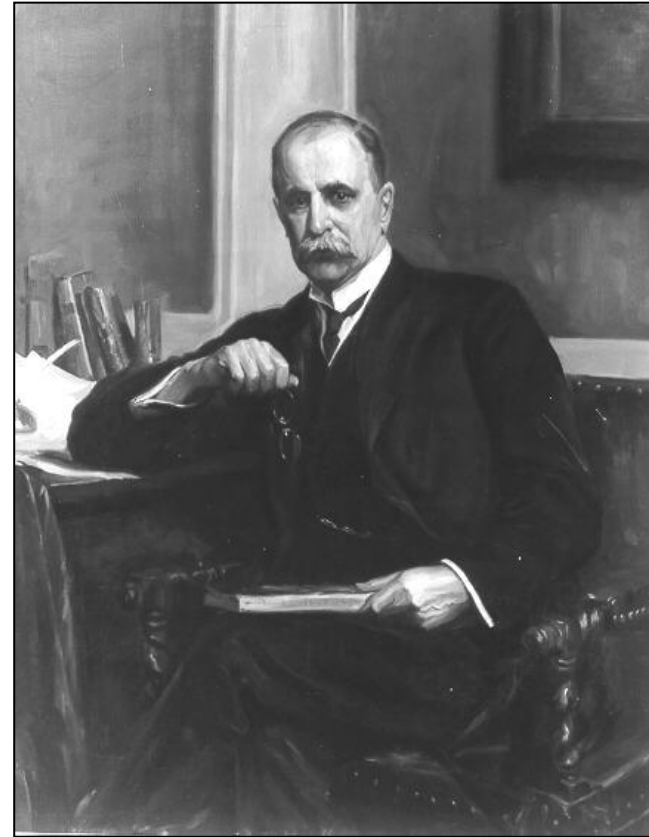
THE  
AMERICAN JOURNAL  
OF THE MEDICAL SCIENCES.

AUGUST, 1903.

CHRONIC CYANOSIS, WITH POLYCYTHÆMIA AND ENLARGED  
SPLEEN: A NEW CLINICAL ENTITY.

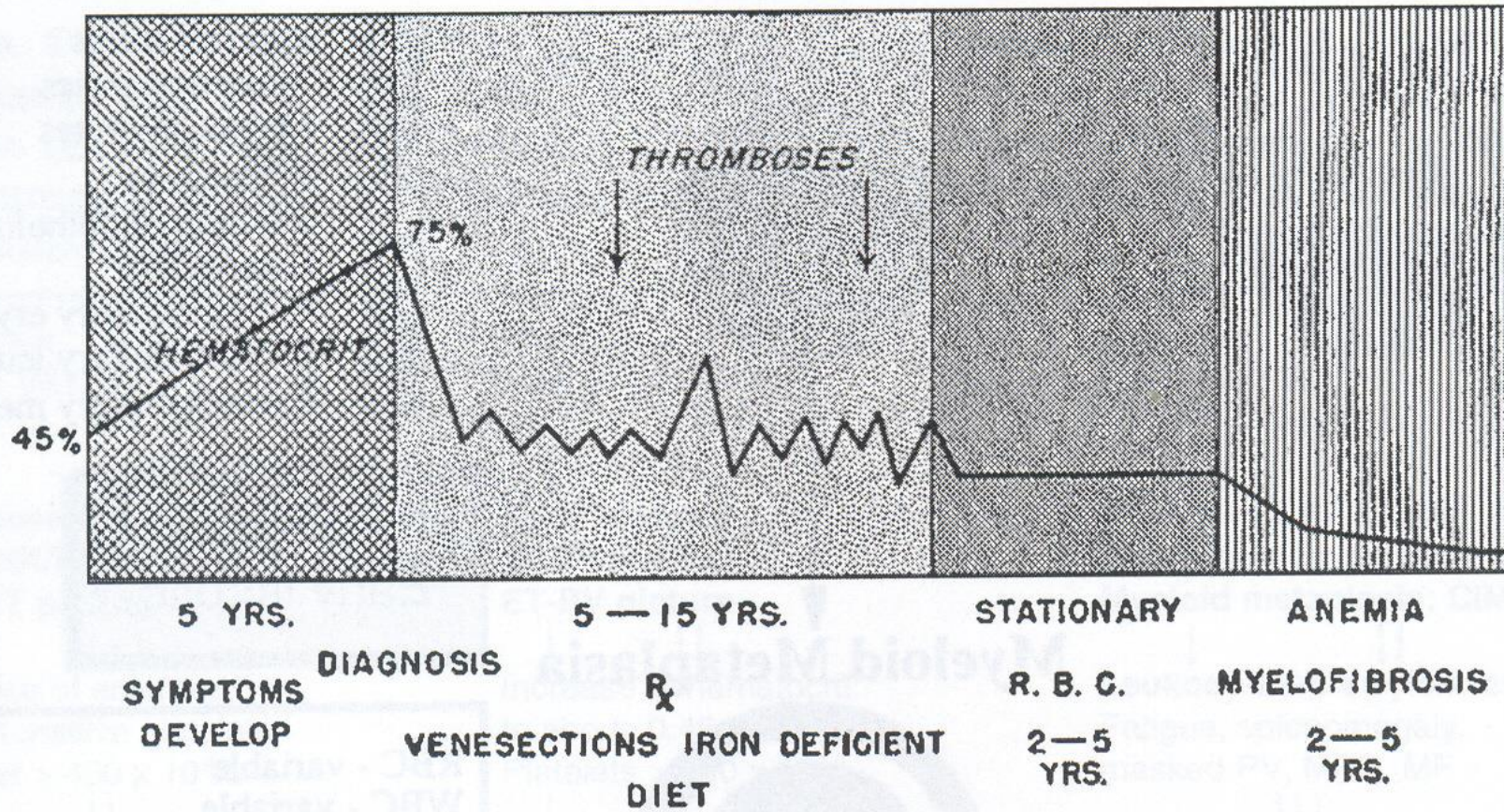
BY WILLIAM OSLER, M.D.,  
PROFESSOR OF MEDICINE IN JOHNS HOPKINS UNIVERSITY.

THE group of cases here reported, with those collected from the literature, are worthy of careful study, as we have here in all probability "a definite clinical entity and one which is new to medical science," to use the words of Saundby and Russell in describing their case. The condition is characterized by chronic cyanosis, polycythæmia, and moderate enlargement of the spleen. The chief symptoms have been weakness, prostration, constipation, headache, and vertigo. A further analysis will be reserved until after the consideration of the cases :



**Klinický obraz je dozajista zvláštní. Symptomy jsou jaksí nevymezené a patologie zcela temná.**

***Osler W. Chronic cyanosis, with polycythemia and enlarged spleen:  
A new clinical entity. Am. J. Med. Sci. 126, 1903***



*Dameshek W. J. Am. Med. Assoc., 142, 1950, 790-797*

- **Molekulární nálezy**
- **Léčebná odpověď**
- **Predispozice k MPN**

## Myeloproliferative neoplasms (MPN)

Chronic myeloid leukemia (CML), *BCR-ABL1*<sup>+</sup>

Chronic neutrophilic leukemia (CNL)

Polycythemia vera (PV)

Primary myelofibrosis (PMF)

PMF, prefibrotic/early stage

PMF, overt fibrotic stage

Essential thrombocythemia (ET)

Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified (NOS)

MPN, unclassifiable

## Mastocytosis

### Myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia and rearrangement of

*PDGFRA*, *PDGFRB*, or *FGFR1*, or with *PCM1-JAK2*

Myeloid/lymphoid neoplasms with *PDGFRA* rearrangement

Myeloid/lymphoid neoplasms with *PDGFRB* rearrangement

Myeloid/lymphoid neoplasms with *FGFR1* rearrangement

*Provisional entity: Myeloid/lymphoid neoplasms with PCM1-JAK2*

## Myeloproliferative neoplasms (MPN)

Chronic myeloid leukemia (CML), *BCR-ABL1*<sup>+</sup>

Chronic neutrophilic leukemia (CNL)

Polycythemia vera (PV)

Primary myelofibrosis (PMF)

PMF, prefibrotic/early stage

PMF, overt fibrotic stage

Essential thrombocythemia (ET)

Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified (NOS)

MPN, unclassifiable

## Mastocytosis

### Myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia and rearrangement of

*PDGFRA*, *PDGFRB*, or *FGFR1*, or with *PCM1-JAK2*

Myeloid/lymphoid neoplasms with *PDGFRA* rearrangement

Myeloid/lymphoid neoplasms with *PDGFRB* rearrangement

Myeloid/lymphoid neoplasms with *FGFR1* rearrangement

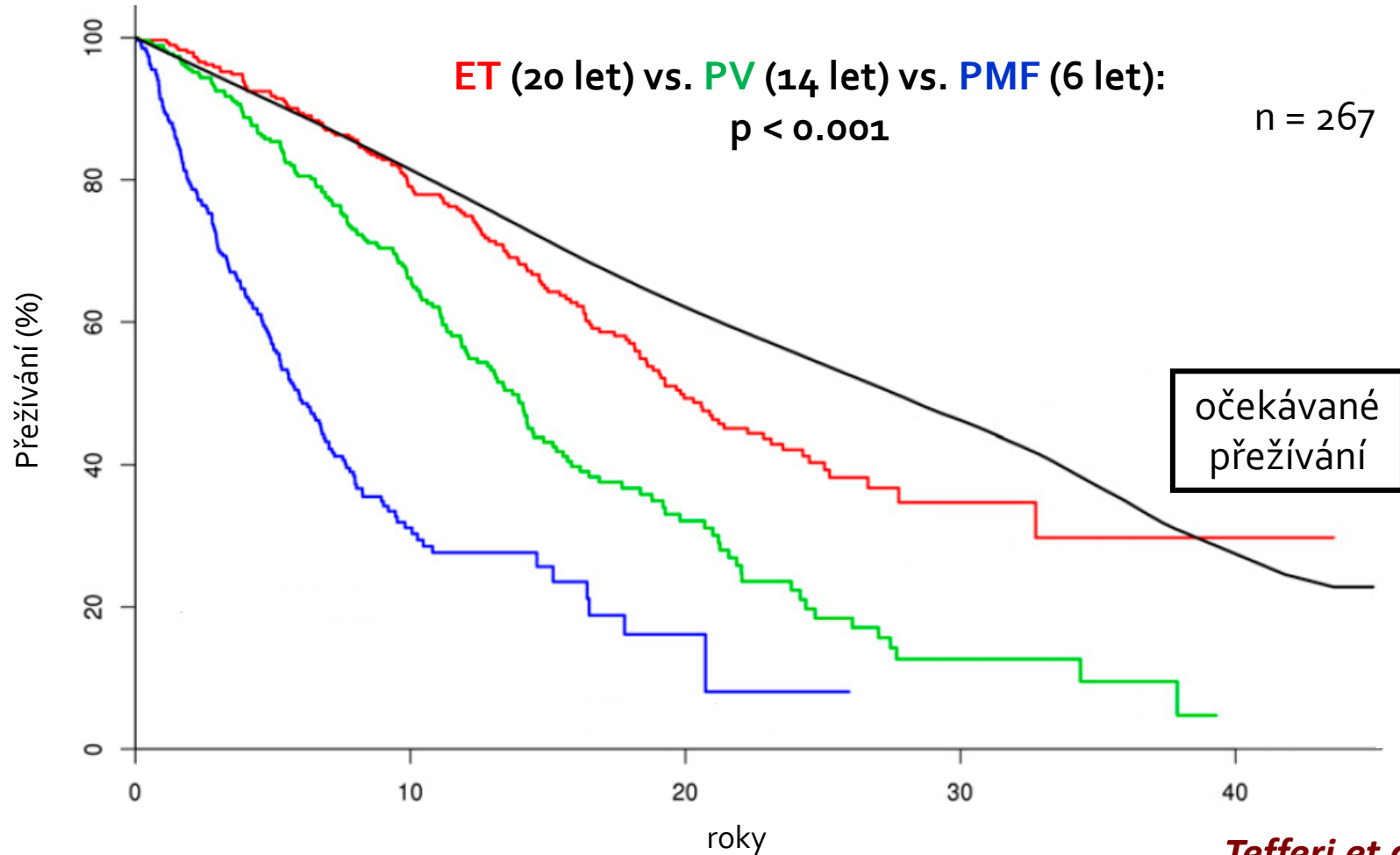
*Provisional entity: Myeloid/lymphoid neoplasms with PCM1-JAK2*

# Incidence

<b>PV</b>	1,08/100000 (0,02 – 2,8)
<b>ET</b>	1,65/100000 (0,59 – 2,53)
<b>PMF</b>	0,45/100000

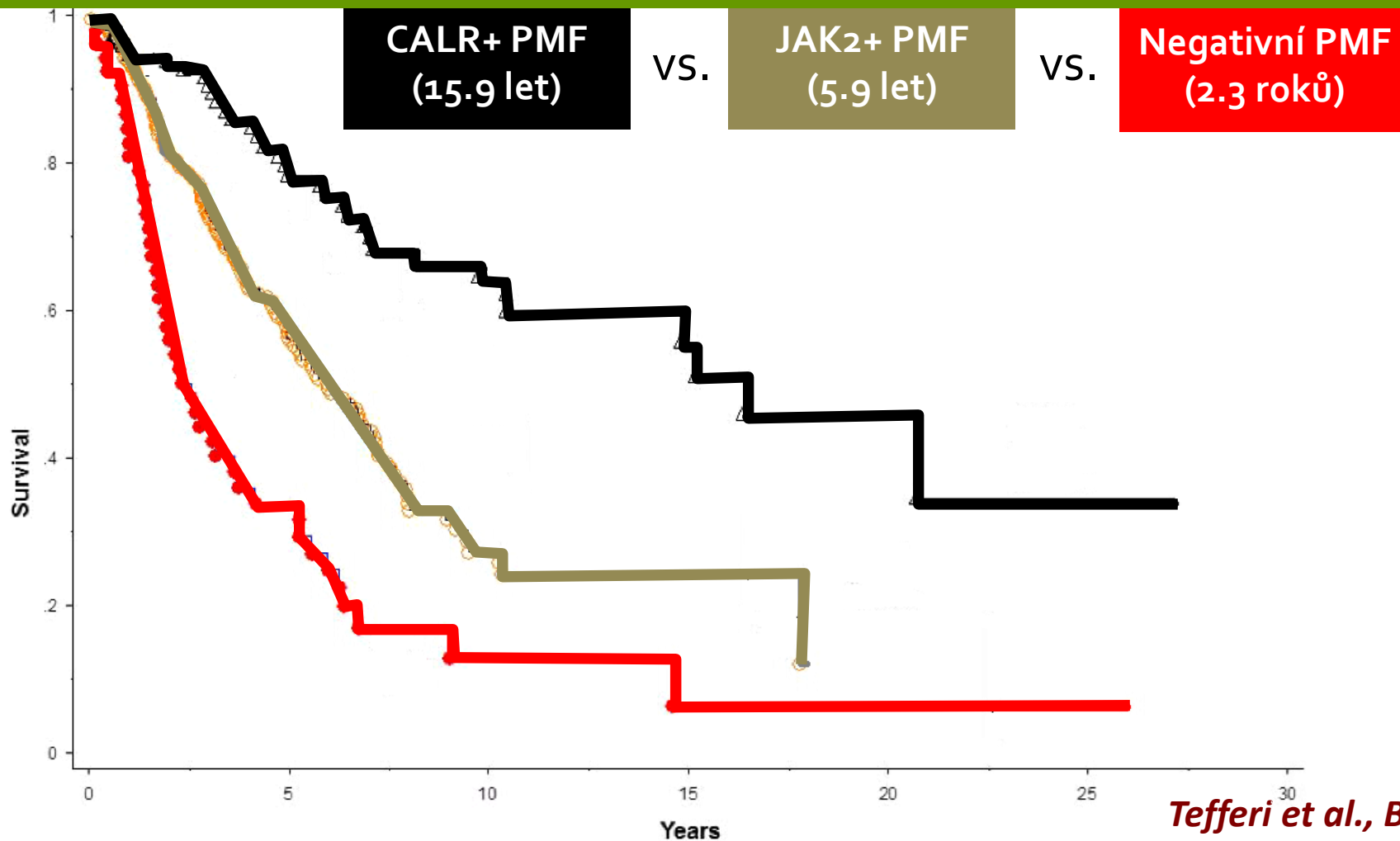
*Phekoo et al., Haematologica/Hematol. J., 91, 2006, 1400 - 1404*  
*Johansson, Semin. Thromb., Hemost., 32, 2006, 171 - 173*

# MPN – celkové přežití





# PMF – celkové přežití



# Genetické změny u Ph- MPN

Mutace nalézány u více jak **90 %** pacientů

Identifikováno cca **30 genů**, ve kterých jsou u MPN opakovaně detekovány mutace

Nejčastěji mutované geny lze zařadit k několika biologickým procesům

- **Přenos signálu** (*CALR, CBL, JAK2, NRAS, KRAS, MPL, NF1, PTPN11, KIT, FLT3*)
- **RNA splicing** (*SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2*)
- **DNA methylace** (*TET2, DNMT3A, IDH1, IDH2*)
- **Modifikace histonů** (*ASXL1, EZH2, BCOR*)
- **Transkripční faktory** (*RUNX1, ETV6, CUX1, GATA2*)
- **p53 dráha** (*TP53, PPM1D*)

# MPN – „driver“ mutace

(a) PV Driver Mutations



ET Driver Mutations

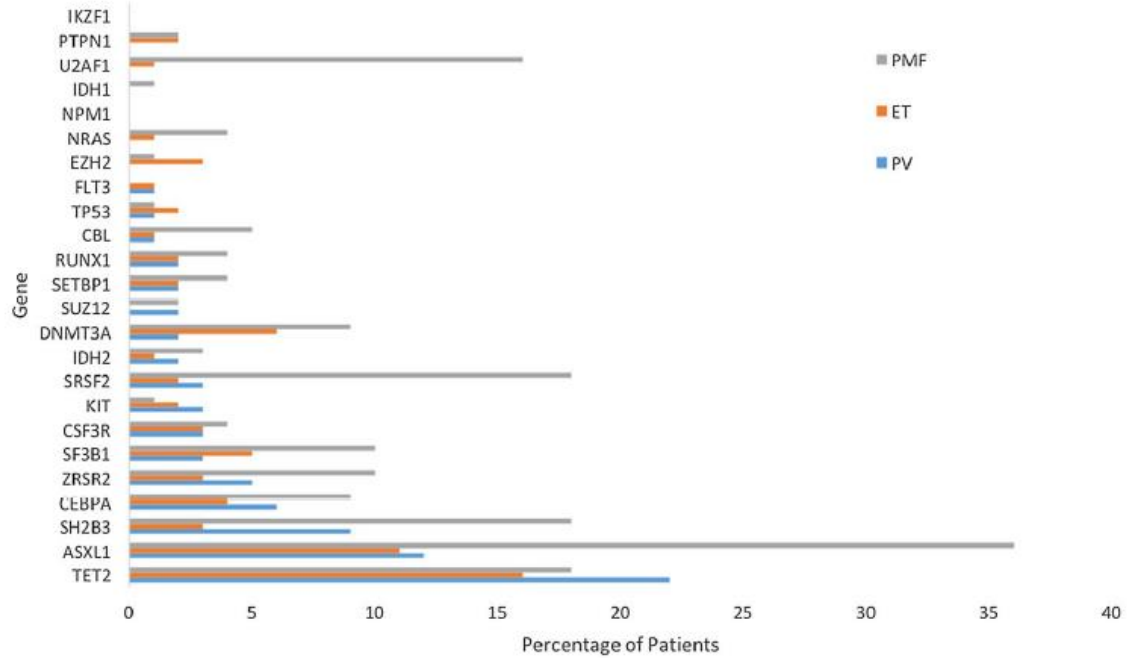


PMF Driver Mutations



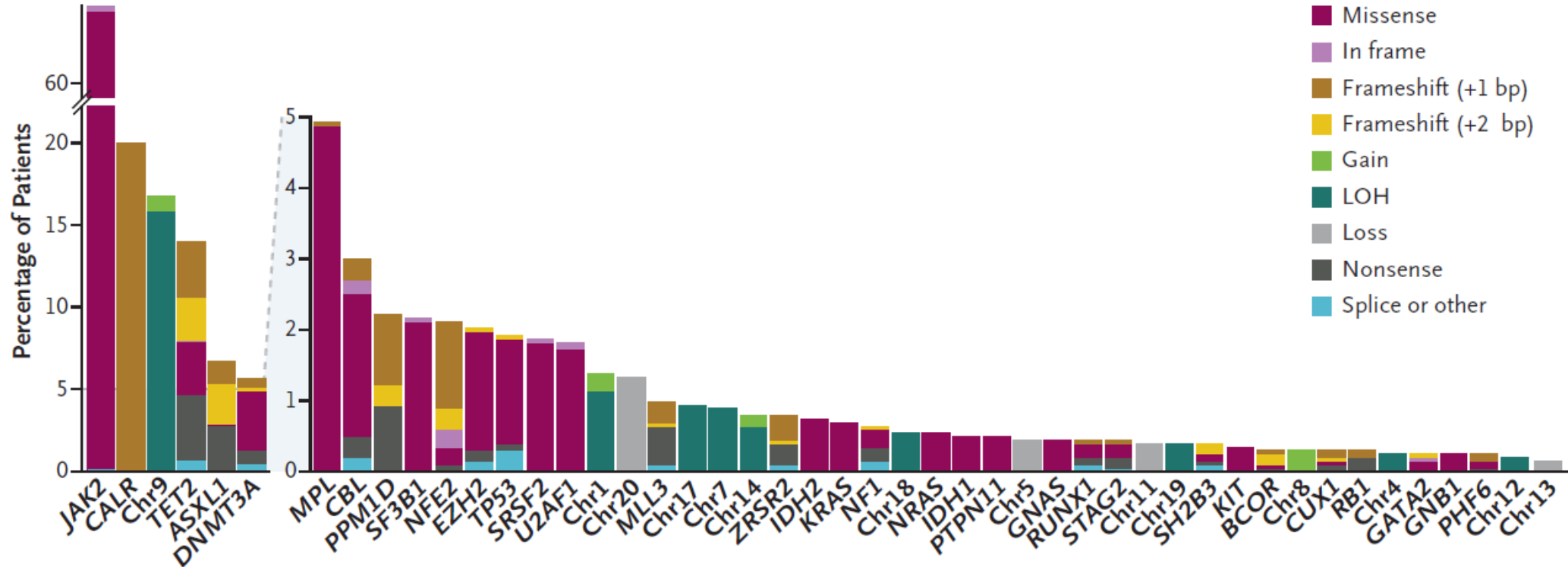
■ JAK2 V617F    ■ JAK2 exon 12  
■ MPL    ■ CALR  
■ Triple Negative

(b)

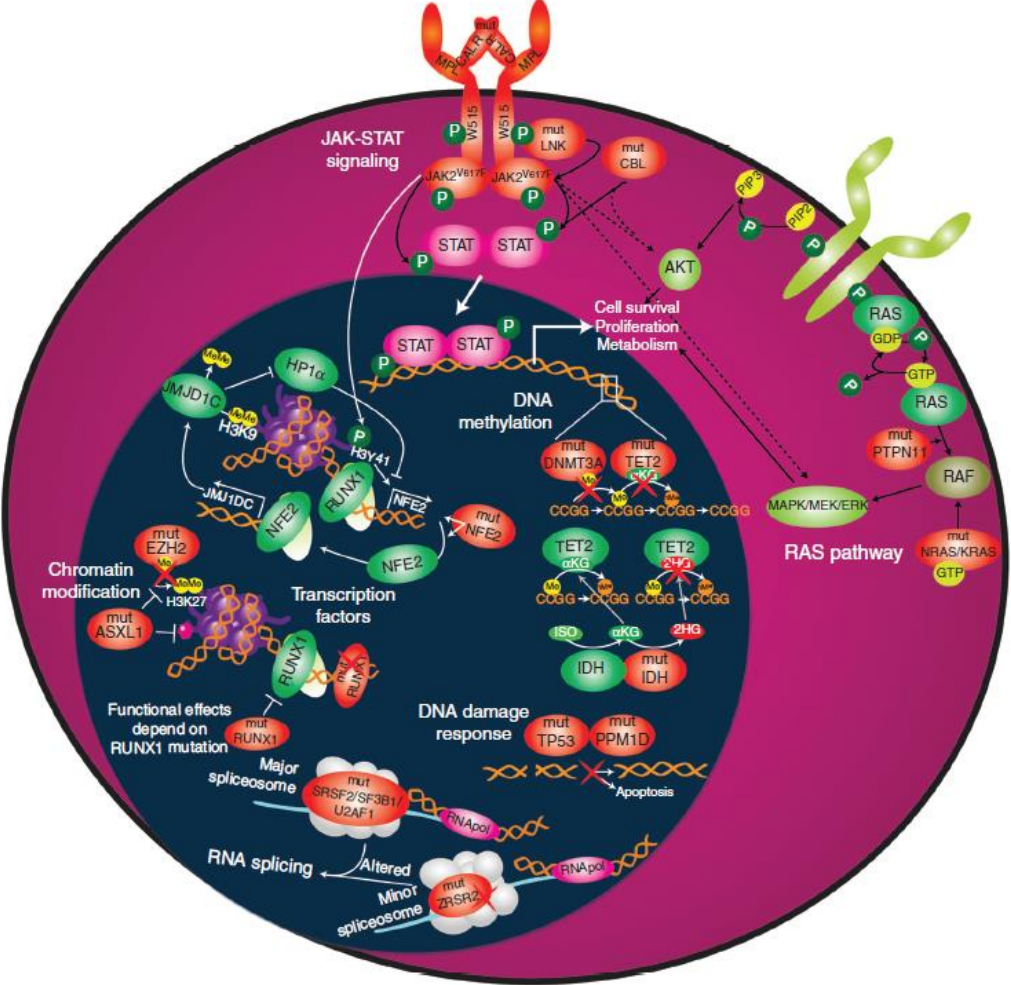


# MPN – rekurentní mutace

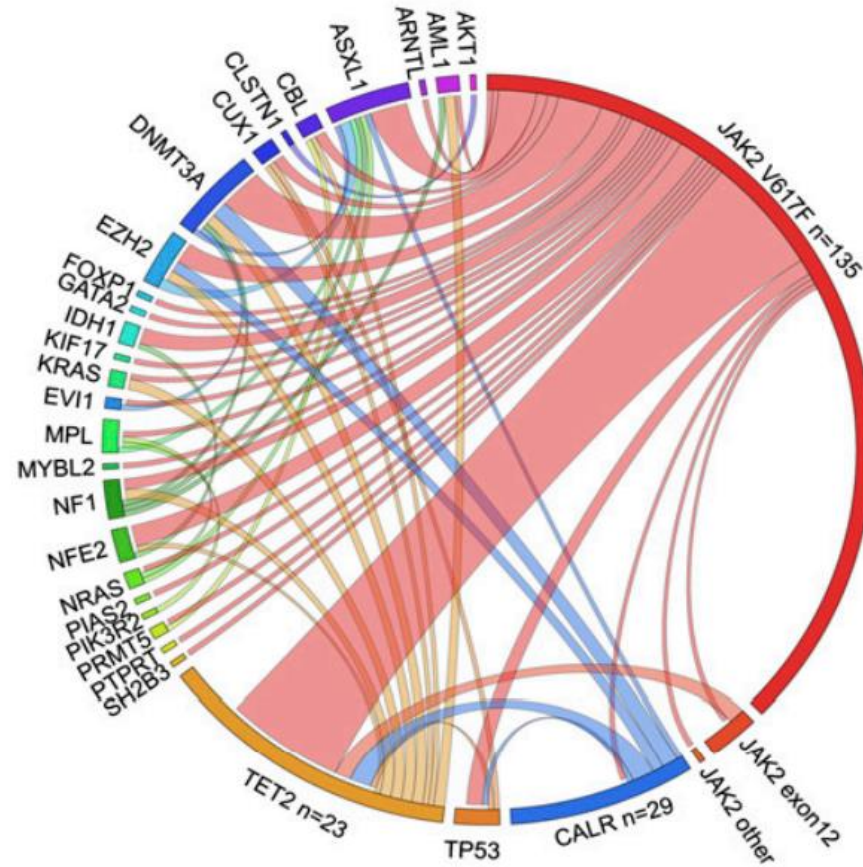
**A** Recurrently Mutated Genes and Chromosomal Abnormalities



# MPN – „driver“ mutace



# Mutace a jejich společný výskyt v buňce



# NGS panely u MPN

- **Diagnóza**
  - *JAK2, CALR, MPL* - mutované geny jako diagnostický marker a průkaz klonální hematopoézy
- **Prognóza**
  - *ASXL1, TP53, U2AF1, RUNX1, ZRSR2* – nezávislé markery spojené se špatnou prognózou a progresí do AML
- **Predikce odpovědi na terapii**
  - *TET2* a *DNMT3A* vs. Interferon
- **Identifikace markeru pro sledování zbytkové choroby**
- **Terapeutický cíl**

# NGS panely u MPN

- **Diagnóza**

- *JAK2, CALR, MPL* - mutované geny jako diagnostický marker a průkaz klonální hematopoézy

- **Prognóza**

- *ASXL1, TP53, U2AF1* - špatnou prognózu

- **Predikce odpovědi na léčbu**

- *TET2* a *DNMT3A* v

- **Identifikace markeru**

- **Terapeutický cíl**

Gen	Inhibitory
<i>FLT3</i>	Tyrozinkinázové inhibitory ve fázi klinických studií u AML (midostaurin, sorafenib, gilteritinib, crenolanib, quizartinib, atd.)
<i>IDH1/IDH2</i>	IDH1 a IDH2 inhibitory v klinických studiích u AML (AG-120, AG-221)
<i>JAK2</i>	Ruxolitinib
<i>BRAF</i>	Vemuratinib
<i>KIT</i>	Tyrosinkinázové inhibitory ve fázi klinických studií u AML a systémové mastocytózy (midostaurin)

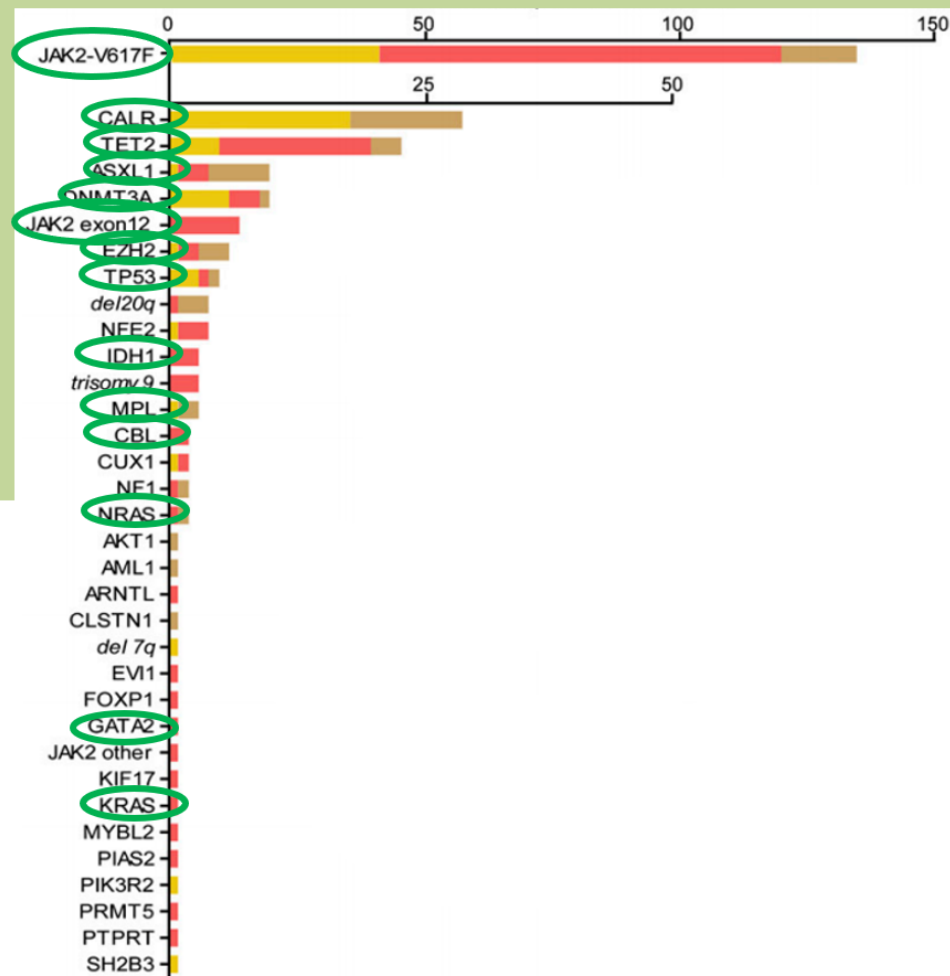


# NGS panel, kterým testujeme

- Komerční panel Archer VariantPlex Core Myeloid
- Set genů spojených s myeloproliferativními onemocněními
- Velikost panelu **37 genů**, 250 exonů
- Metoda multiplex PCR, specifické primery z jedné strany, ampliconové sekvenování s UMI
- Knihovny jsou sekvenovány na přístroji NextSeq (Illumina)
- Bioinformatická analýza dat probíhá 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>	

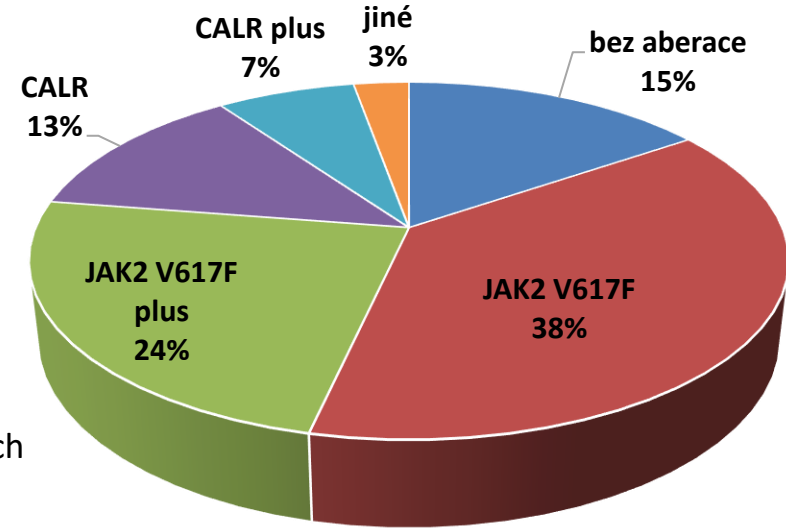




# Naše nálezy (71 nemocných)

## – patogenní/pravděpodobně patogenní varianty

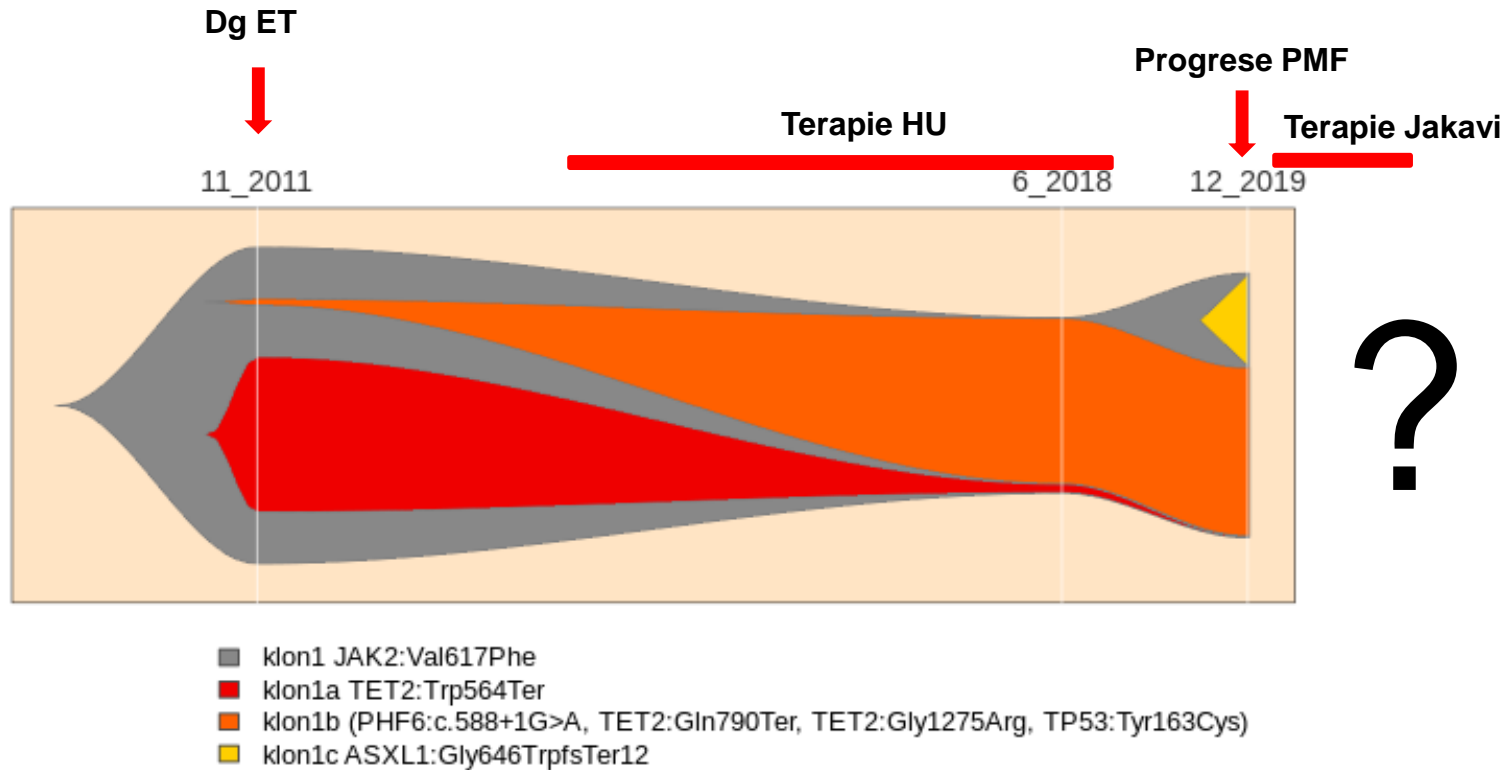
- u **11 pacientů (15 %)** jsme nedetekovali aberace ve vybraných genech
- u **44 pacientů (62 %)** jsme detekovali mutaci **JAK2 V617F**
  - U **27 pacientů (38 %)** jsme detekovali pouze mutaci **JAK2 V617F**
- u **14 pacientů (20 %)** jsme detekovali mutace v genu **CALR**
  - u **9 pacientů (13 %)** jsme detekovali pouze mutaci v **CALR**
- celkem u **jedné třetiny (24 pacientů)** jsme detekovali mutace v dalších genech mimo **JAK2, CALR** a **MP**



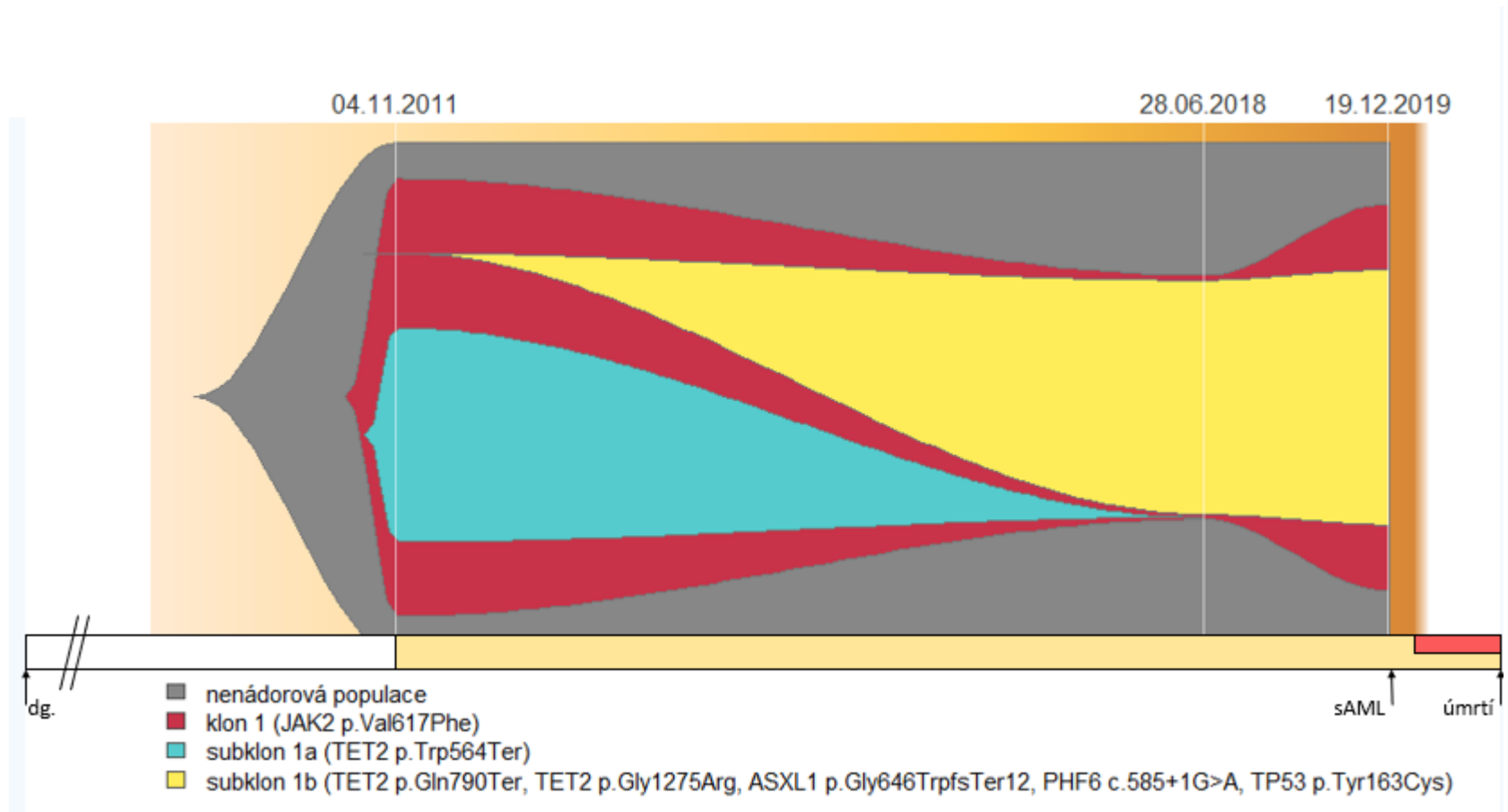
Panel genů – mutované geny (modře)

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

# Klonální vývoj – příklad 1

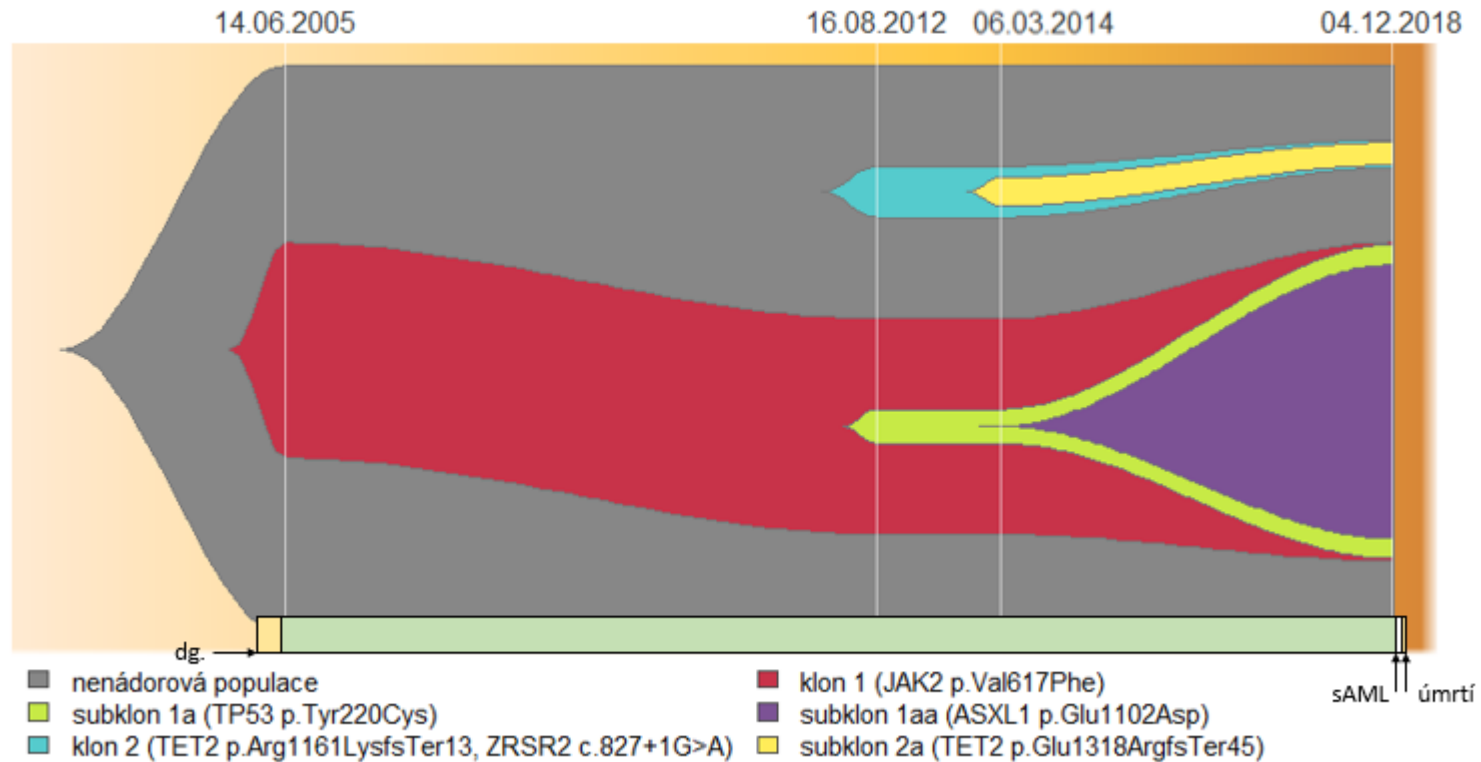


# Klonální vývoj – příklad 2





# Klonální vývoj – příklad 4

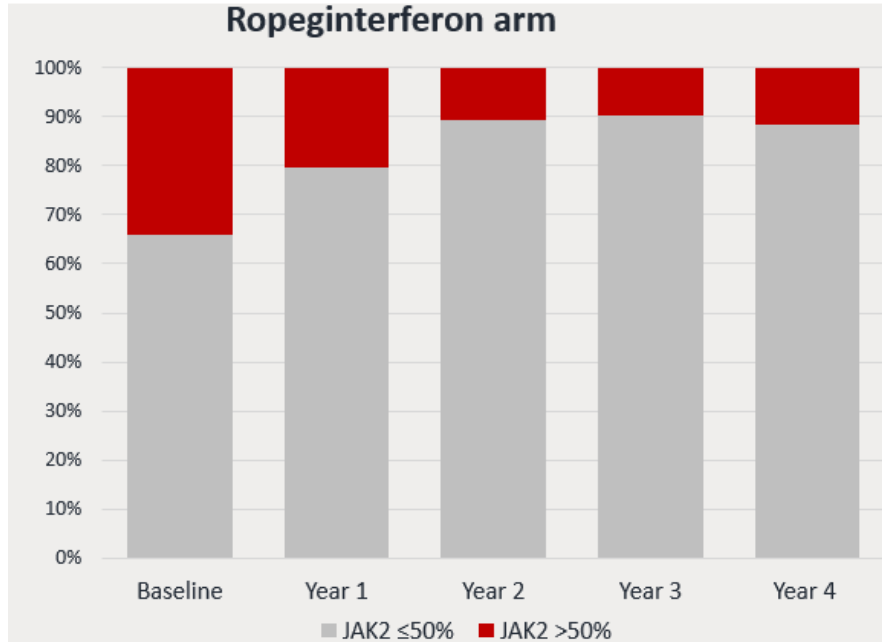


# Monitoring léčebné odpovědi

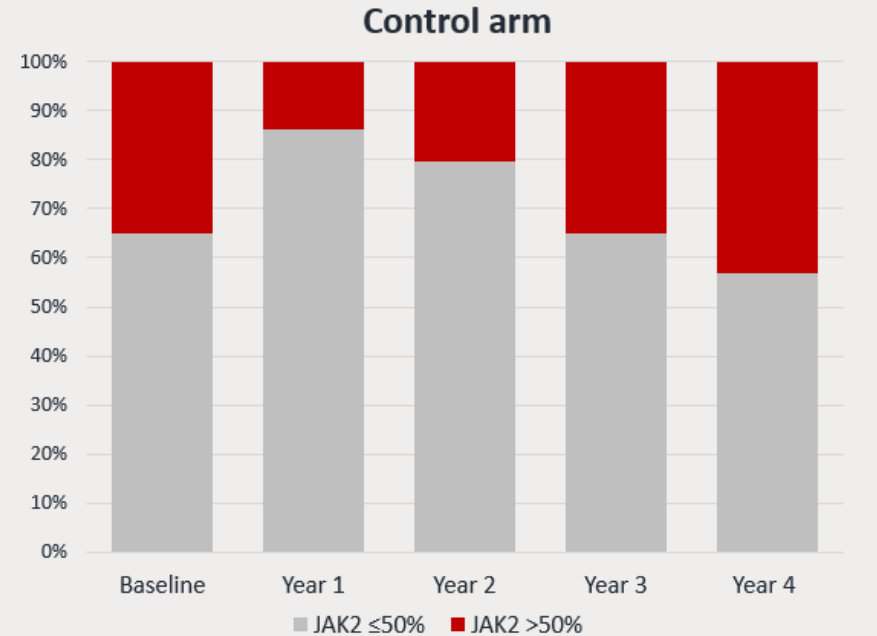


# PV – ropeginterferon alfa-2b

## Aleická nálož



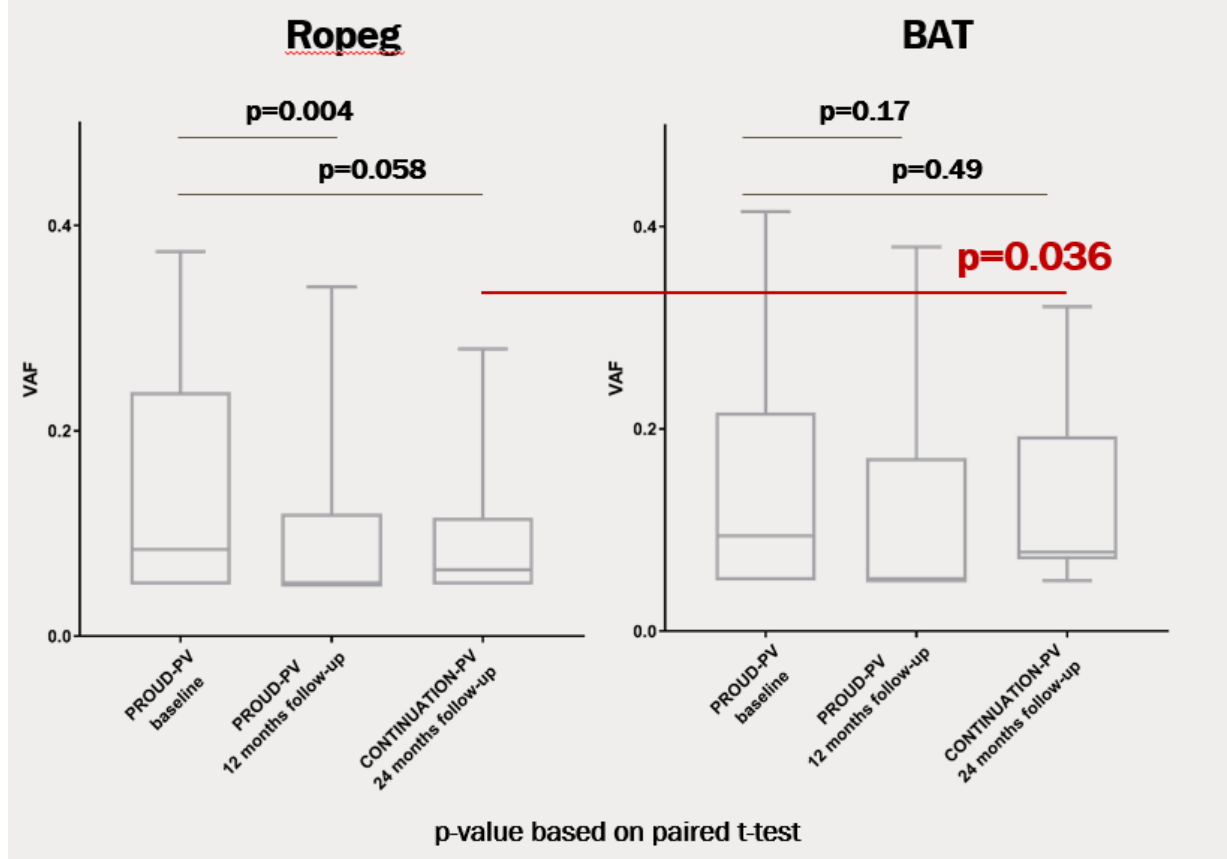
Trvalý pokles pacientů s aleickou náloží  
 $JAK2^{V617F} >50\%$  v ropeginterferon rameni



Po prvním roce léčby **opětvný nárůst pacientů**  
s aleickou náloží  $JAK2^{V617F} >50\%$  v kontrolním  
rameni

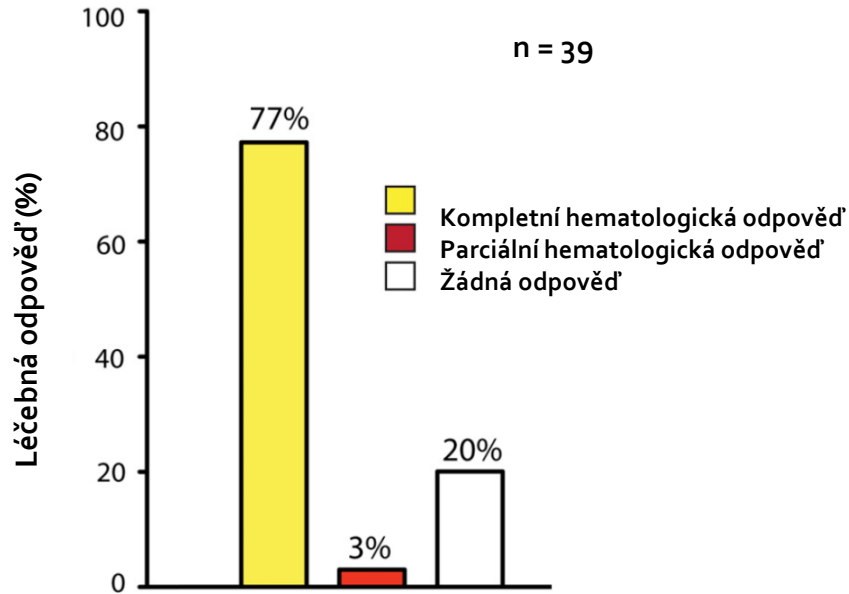
# PV – ropeginterferon alfa-2b

Alelická nálož non *JAK2* mutací – *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *EZH2*

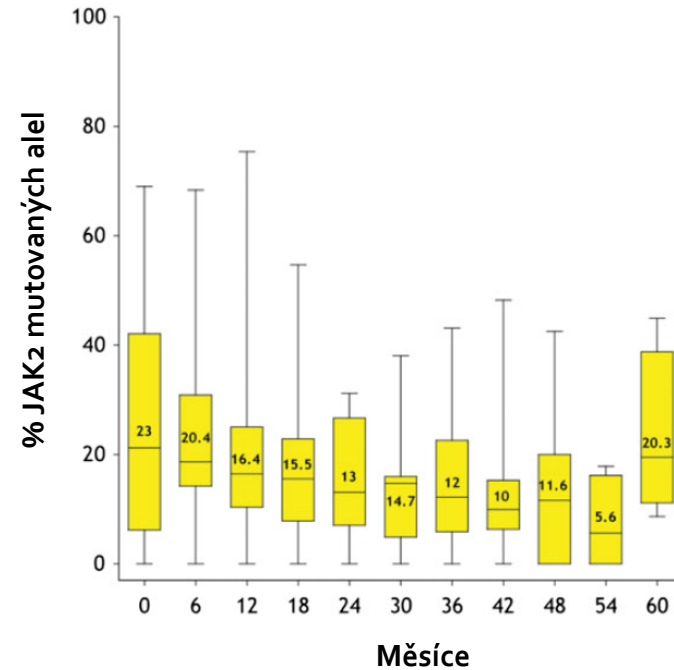


# ET – pegylovaný interferon alfa-2a

## Hematologická odpověď



## Molekulární odpověď



Peg-interferon-2a indukuje dlouhodobé hematologické a molekulární odpovědi u pacientů s ET

# ET – pegylovaný interferon alfa-2a vs. ASA vs. HU

## Molekulární odpověď – CALR+ ET

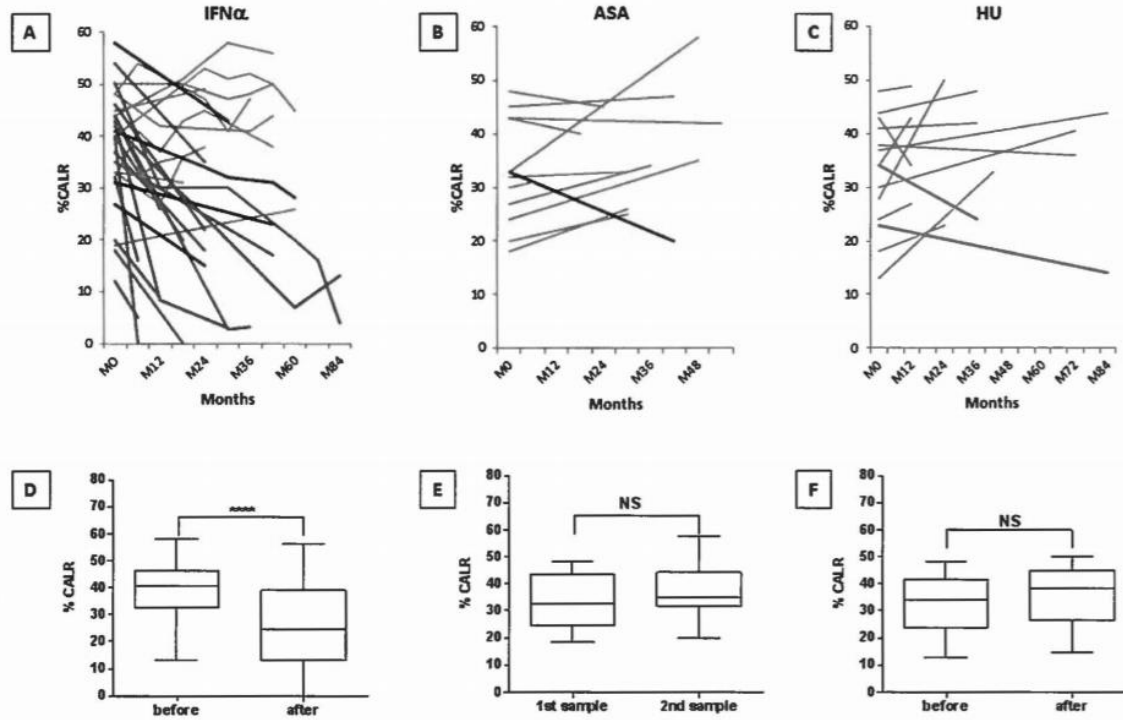


Figure 1: Evolution of CALR mutant allele burden (%CALR) with time.

Upper panel: Evolution of %CALR in each patient at different time points during treatment with PegIFN $\alpha$  (A), Aspirin only (B) or Hydroxyurea (C).

Patients with CMR or PMR are depicted in red while patients with no response or mMR are depicted in grey and black respectively.

Lower panel: Median %CALR before treatment and at the last time point during follow-up for patients treated with PegIFN $\alpha$  (D), Aspirin only (E) or Hydroxyurea (F)

IFN $\alpha$ : Interferon alpha; ASA: Aspirin; HU: Hydroxyurea.

# MPN predispozice

# MPN predispozice

## Příklad z praxe

Gen	Klasifikace varianty	Nukleotidová záměna	Aminokyselinová záměna	VAF
<i>DDX41</i>	nejasný klinický význam	NM_016222.3:c.536C>T	NP_057306.2:p.Pro179Leu	50,38%
<i>JAK2</i>	patogenní	NM_004972.3:c.1849G>T	NP_004963.1:p.Val617Phe	57,77%

# MPN predispozice

## Příklad z praxe

Gen	Klasifikace varianty	Nukleotidová záměna	Aminokyselinová záměna	VAF
<i>DDX41</i>	nejasný klinický význam	NM_016222.3:c.536C>T	NP_057306.2:p.Pro179Leu	50,38%
<i>JAK2</i>	patogenní	NM_004972.3:c.1849G>T	NP_004963.1:p.Val617Phe	57,77%

- **Familiární hematologické malignity (MDS/AML/MPN)**
- ***DDX41, ETV6, JAK2, CHEK2, ATM, TERT...***

# MPN predispozice

## Příklad z praxe

Gen	Klasifikace varianty	Nukleotidová záměna	Aminokyselinová záměna	VAF
<i>DDX41</i>	nejasný klinický význam	NM_016222.3:c.536C>T	NP_057306.2:p.Pro179Leu	50,38%
<i>JAK2</i>	patogenní	NM_004972.3:c.1849G>T	NP_004963.1:p.Val617Phe	57,77%

- **Familiární hematologické malignity (MDS/AML/MPN)**
- *DDX41, ETV6, JAK2, CHEK2, ATM, TERT...*

U pacientů IHOK



# MPN predispozice a NGS

**Důležitost NGS pro hledání dalších klonálních markerů**

**Důležitost hledání germinálních defektů u MPN**

**Důležité pro terapii**

=

**Molekulárně orientovaná terapie (negenotoxická)**

Sledování léčebné odpovědi (*JAK2* mutation burden)

Sledování klonální evoluce

**Diagnóza**

**Prognóza**

**Predikce odpovědi na terapii**

**Identifikace markeru pro sledování zbytkové choroby**

**Terapeutický cíl**

**Diagnóza**

**Prognóza**

**Predikce odpovědi na terapii**

**Identifikace markeru pro sledování zbytkové choroby**

**Terapeutický cíl**

**Společné projekty (MPN, SM – cfDNA)**

Většina lékařů, nejen hematologové, má tendenci léčit téměř každou odchylku co nejintenzivněji, jak jen to jde. V hematologii trvá snaha srovnat všechny početní odchylky leukocytů nebo trombocytů do normálních rozmezí, ať už to pacient potřebuje nebo ne!

*William Dameshek, 1968*