

# Hematologische tumordiagnostiek

Dr. Anneke Bosga-Bouwer

Staflid afdeling Genetica

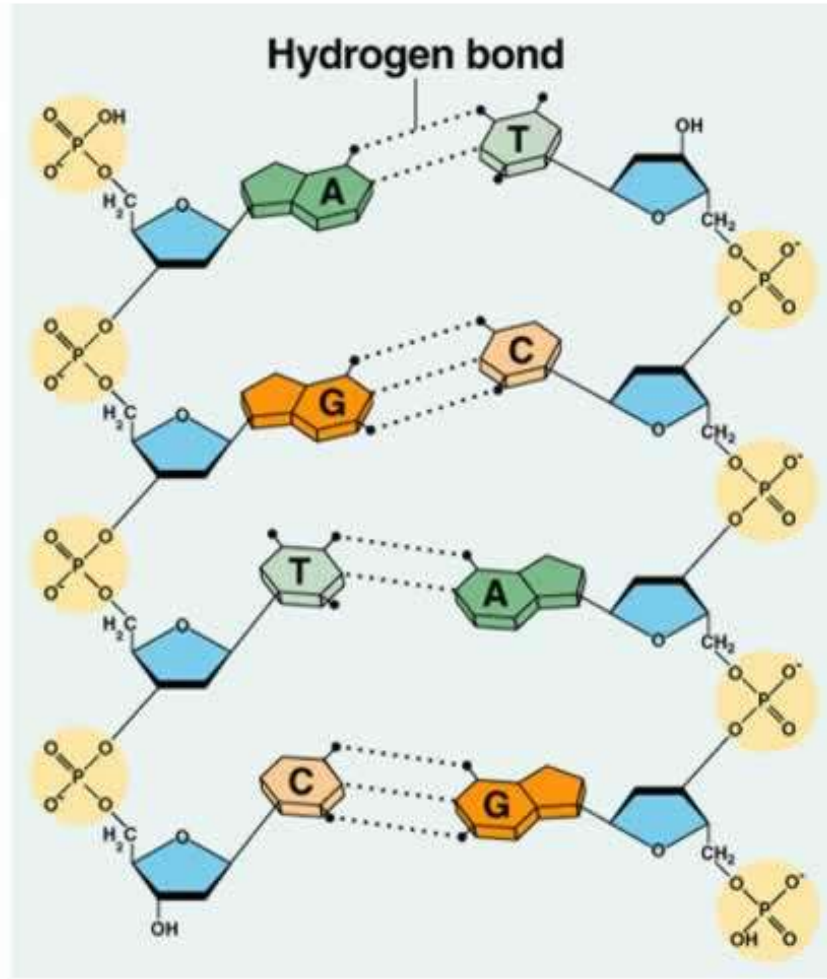
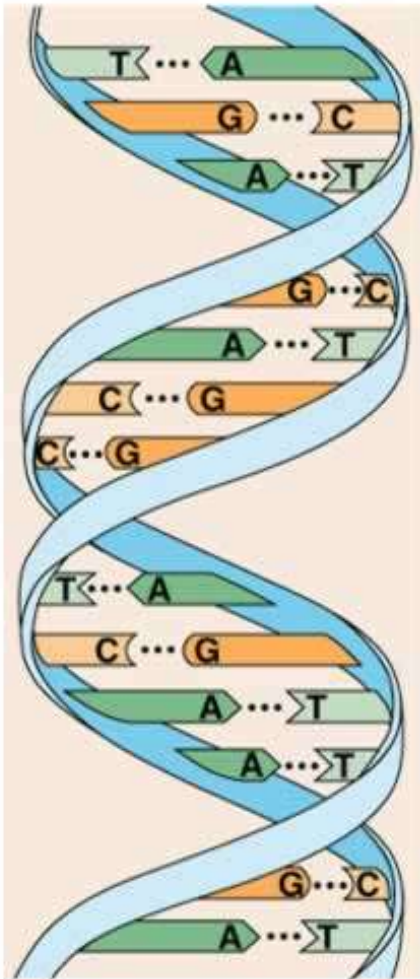
Dr. André Mulder

Arts klinische chemie/klinisch chemicus, afdeling Laboratoriumgeneeskunde

# Disclosures

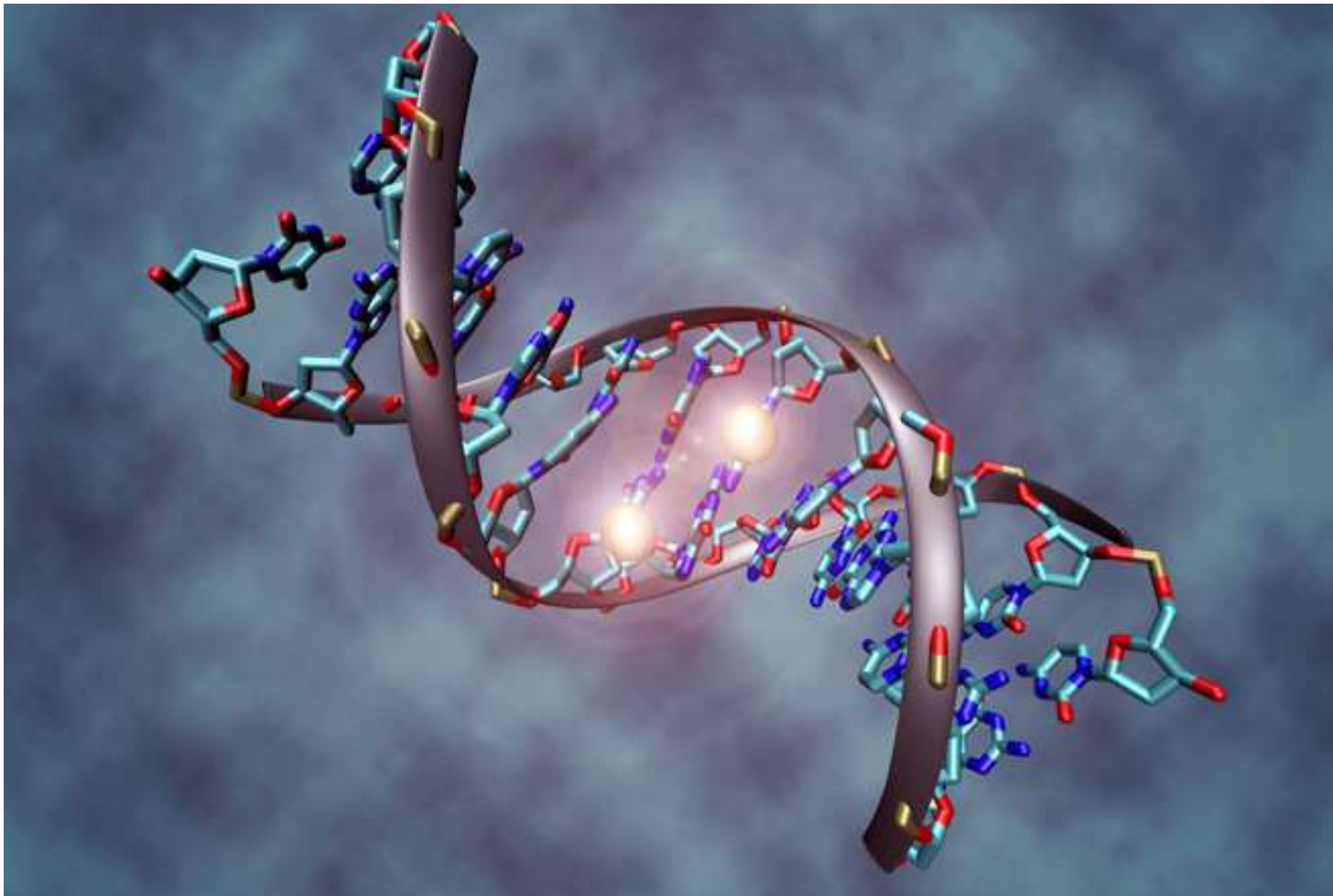
Type van verstrengeling / mogelijk (financieel) belang	Naam van commercieel bedrijf
<i>Ontvangst van subsidie(s)/research ondersteuning:</i>	Geen belangen
<i>Ontvangst van honoraria of adviseursfee:</i>	Geen belangen
<i>Lid van een commercieel gesponsord 'speakersbureau'</i>	Geen belangen
<i>Financiële belangen in een bedrijf (aandelen of opties)</i>	Geen belangen
<i>Andere ondersteuning (gelieve te specificeren):</i>	Geen belangen
<i>Wetenschappelijke adviesraad:</i>	Geen belangen

# Dubbelstreng DNA

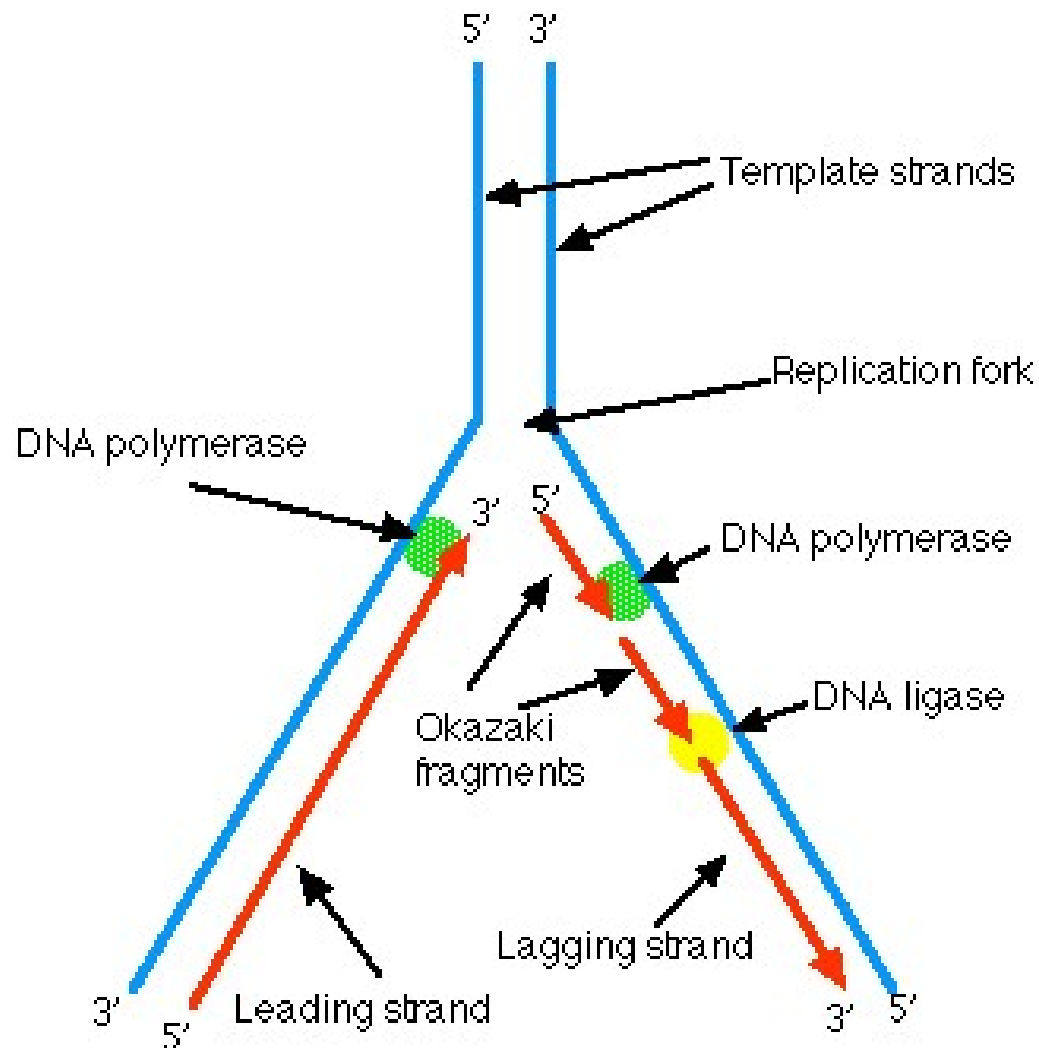


# Humaan genoom:

**3.000.000.000 bp = 3 miljard baseparen**



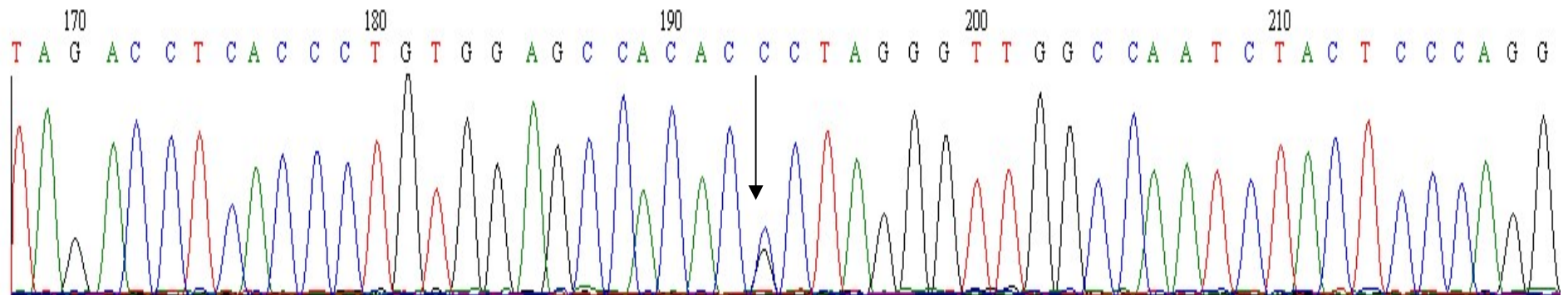
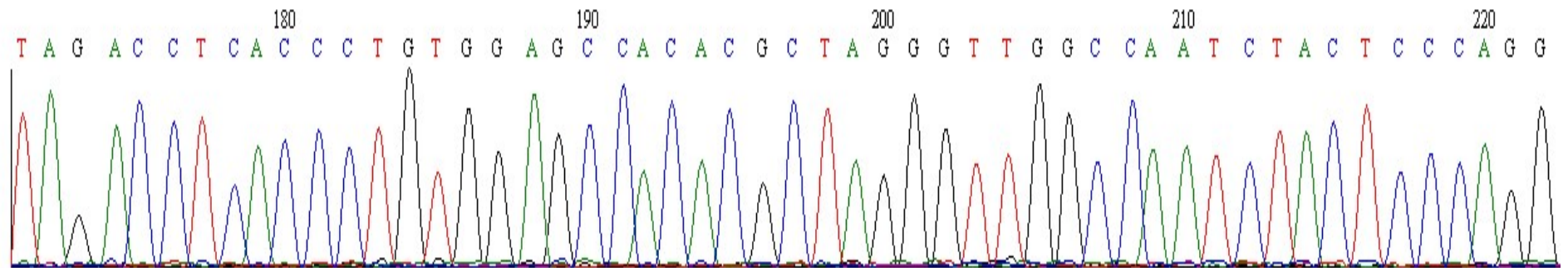
# Celdeing: replicatie



# Afwijkingen in coderend DNA

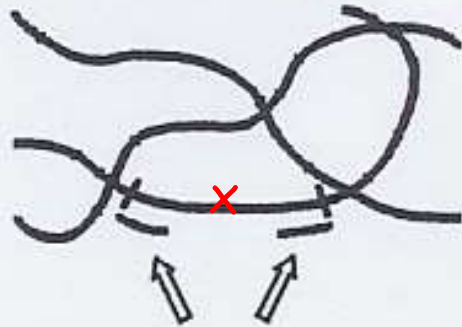
	normaal	defect
puntmutatie	—A—	—G—
insertie	—	— —
deletie	— —	—
triplet repeat	—(CTG) <sub>10</sub> —	—(CTG) <sub>100</sub> —

# DNA sequentie mutatie-analyse



# Polymerase ketting reactie Polymerase chain reaction

chromosomaal DNA  
(0.1  $\mu\text{g}$ ,  $3 \times 10^9$  bp)

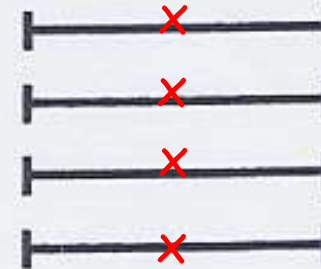


2 specifieke primers

PCR



gewenst fragment  
(100-5000 bp)

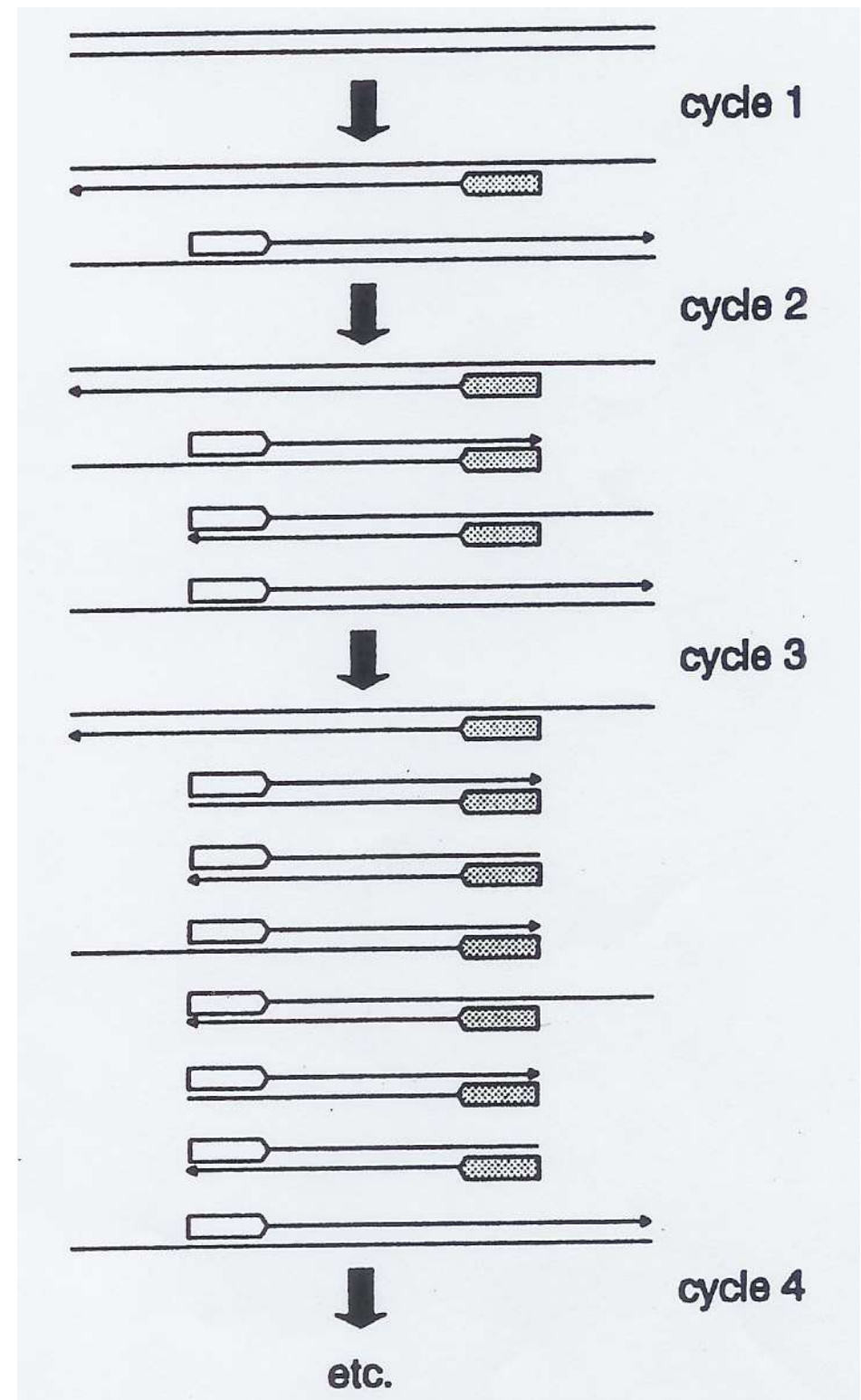


*onbeperkte hoeveelheden*



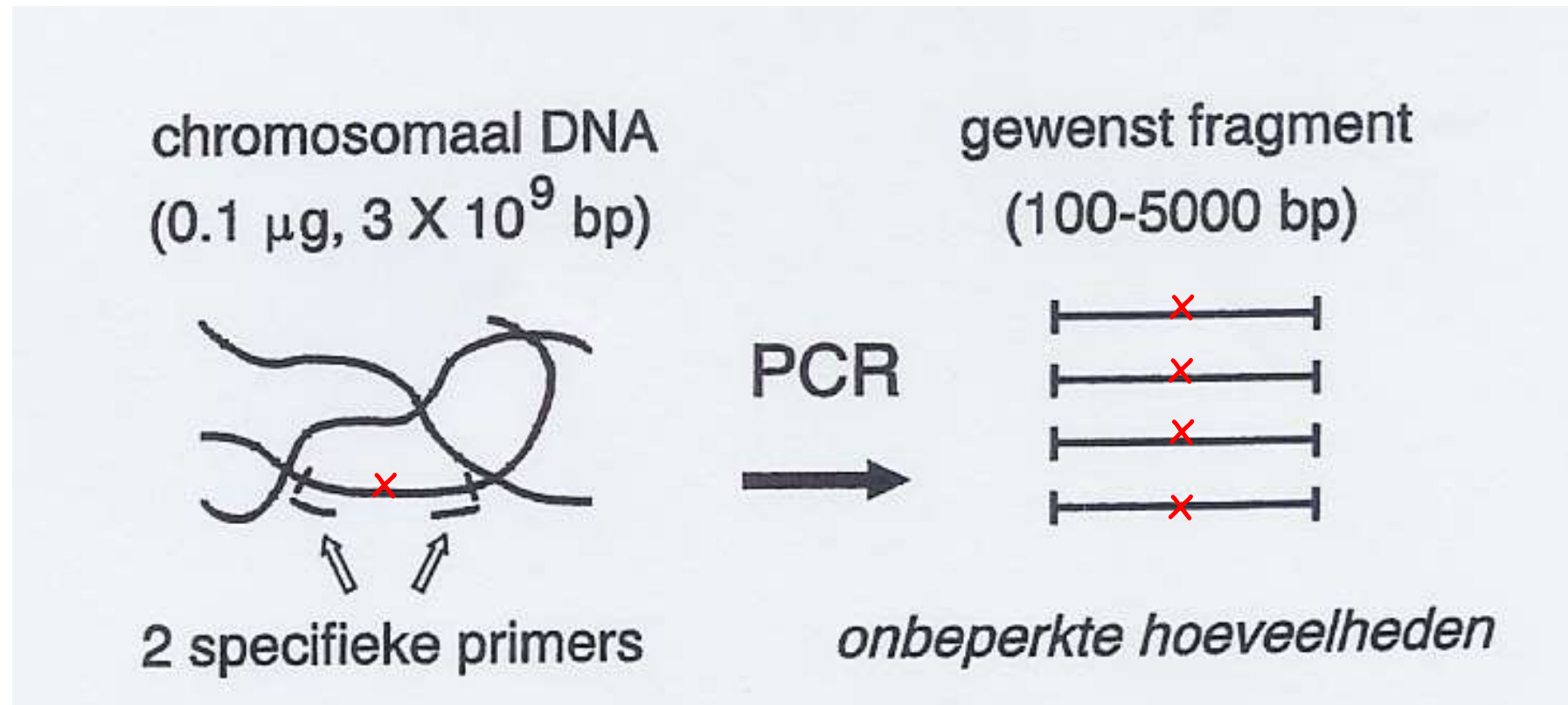
## PCR:

- denaturatie: 95°C
- annealing: 55-65°C
  - 2 primers ( $\pm 20$  nt)
- extension: 72°C:
  - Taq DNA polymerase:
    - *Thermus aquaticus*
    - heetwaterbronnen
  - losse nucleotiden (A,T,C,G)
- 25 - 40 cycli (circa 2 uur)



# Polymerase ketting reactie Polymerase chain reaction

**PCR: 1:100.000-1.000.000 cellen!**

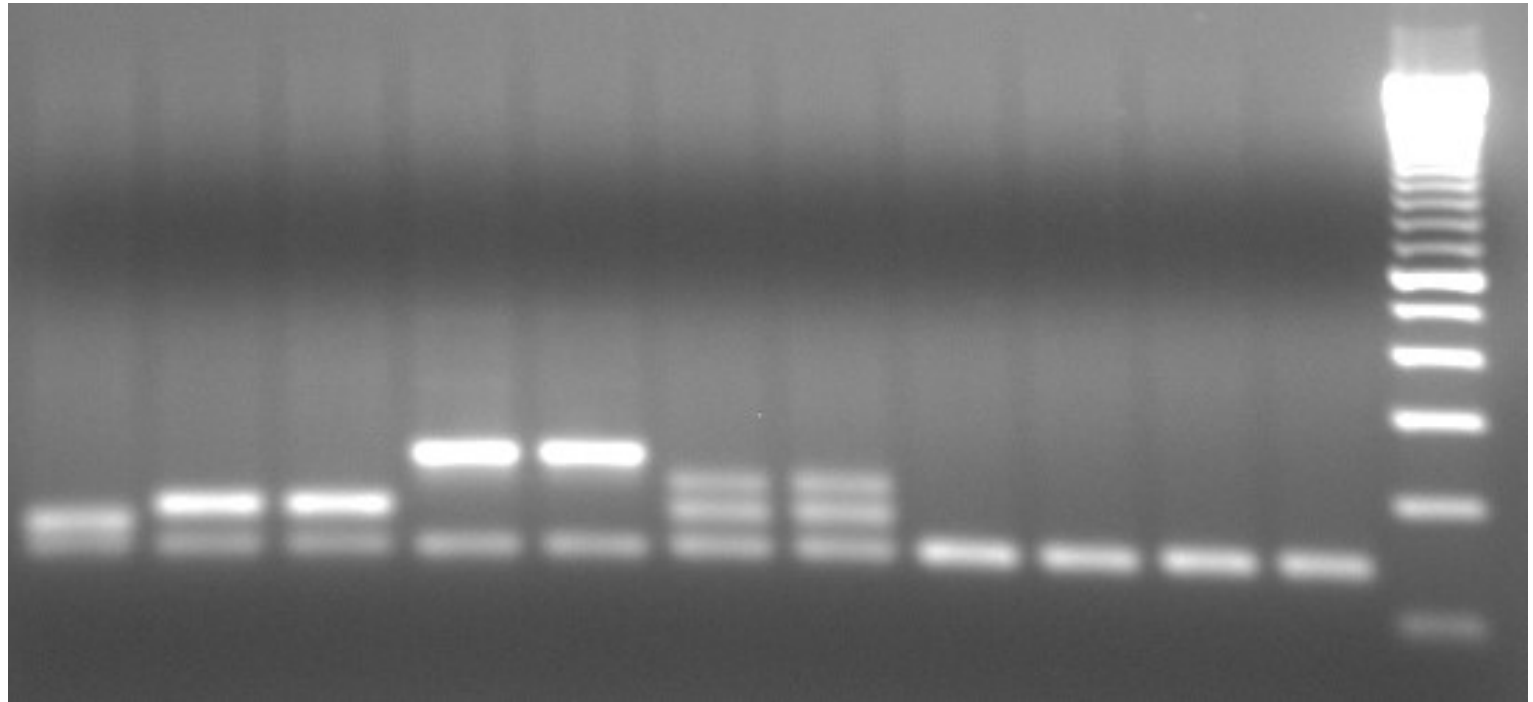


# Minimaal meetbare restziekte (MRD)

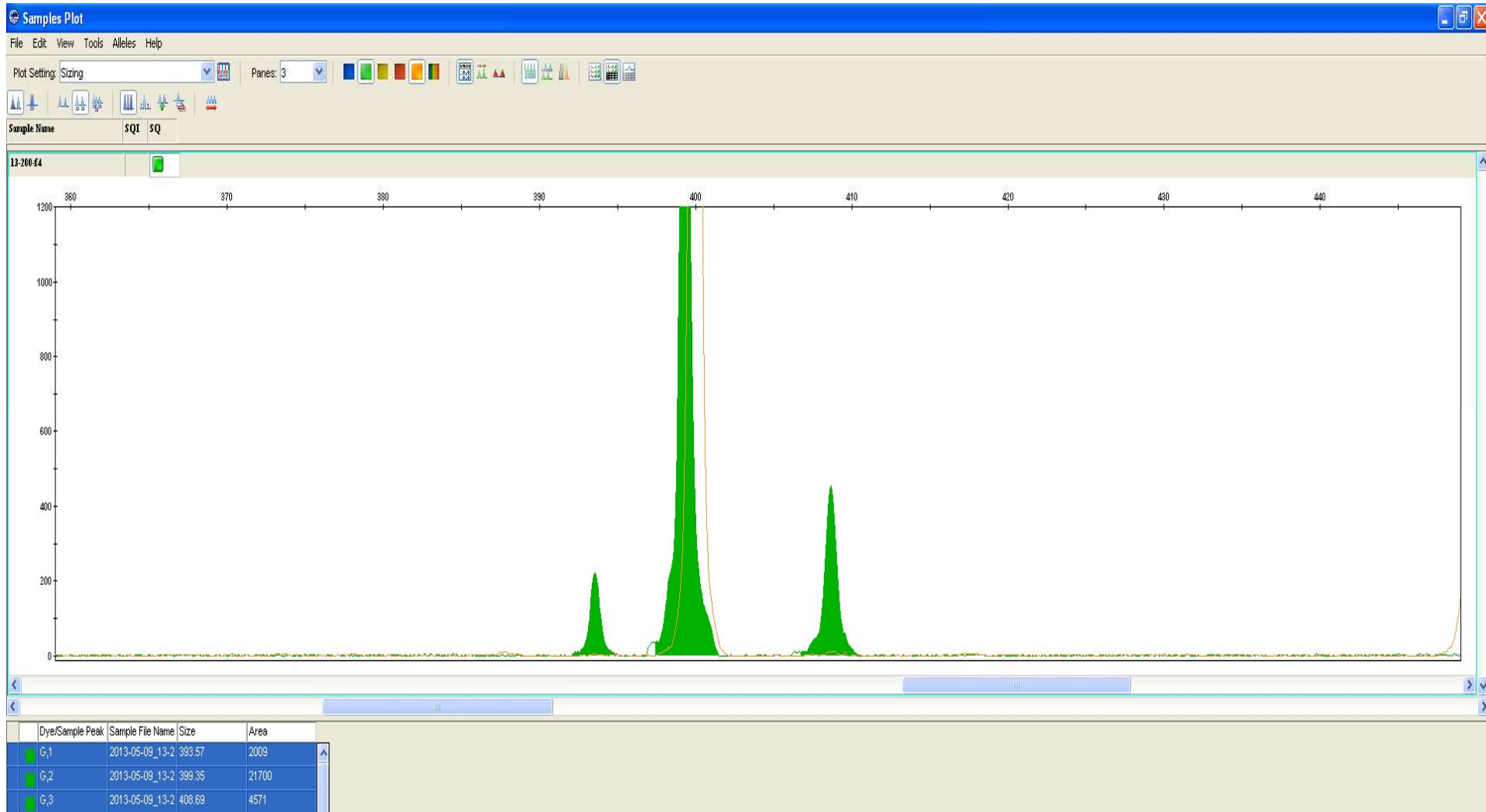




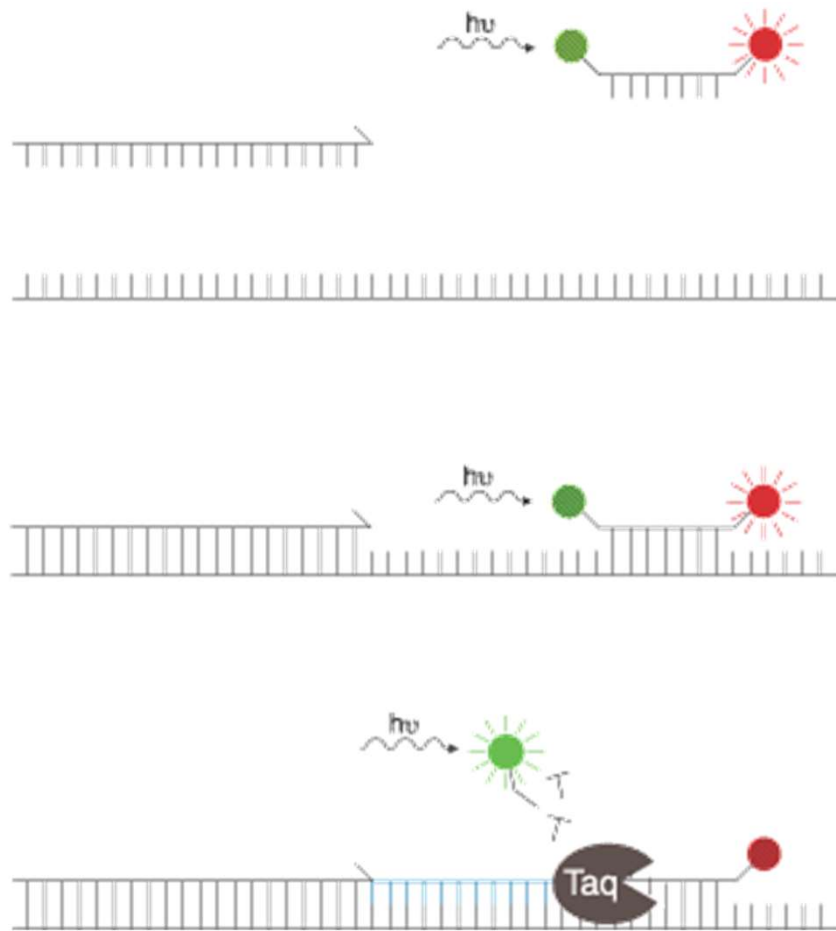
# FLT3-ITD: internal tandemduplicates



# Fragmentanalyse: capillaire electroforese



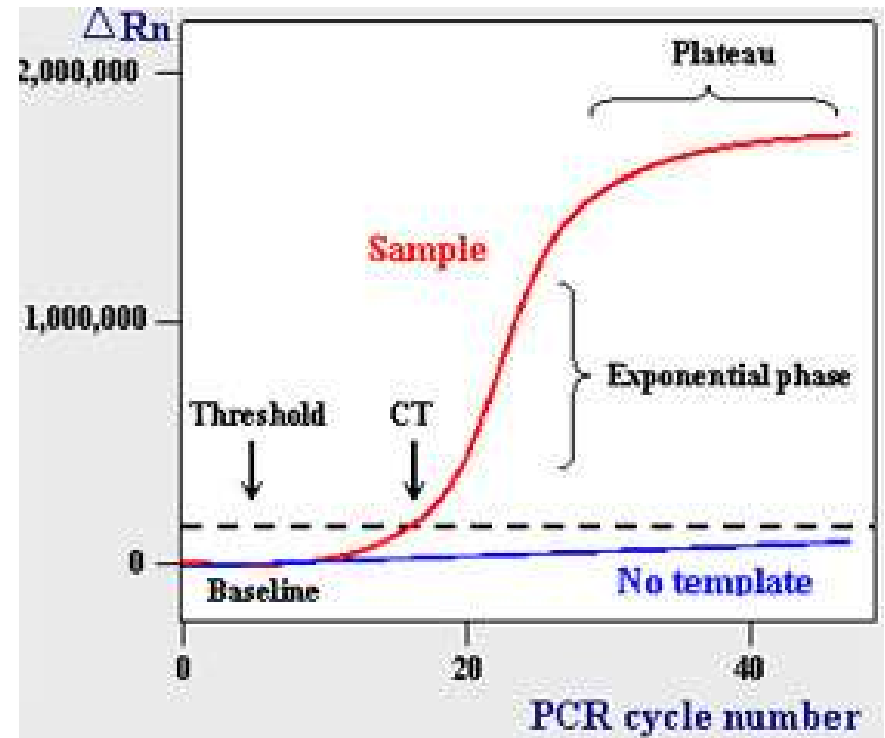
# Principe real time qPCR

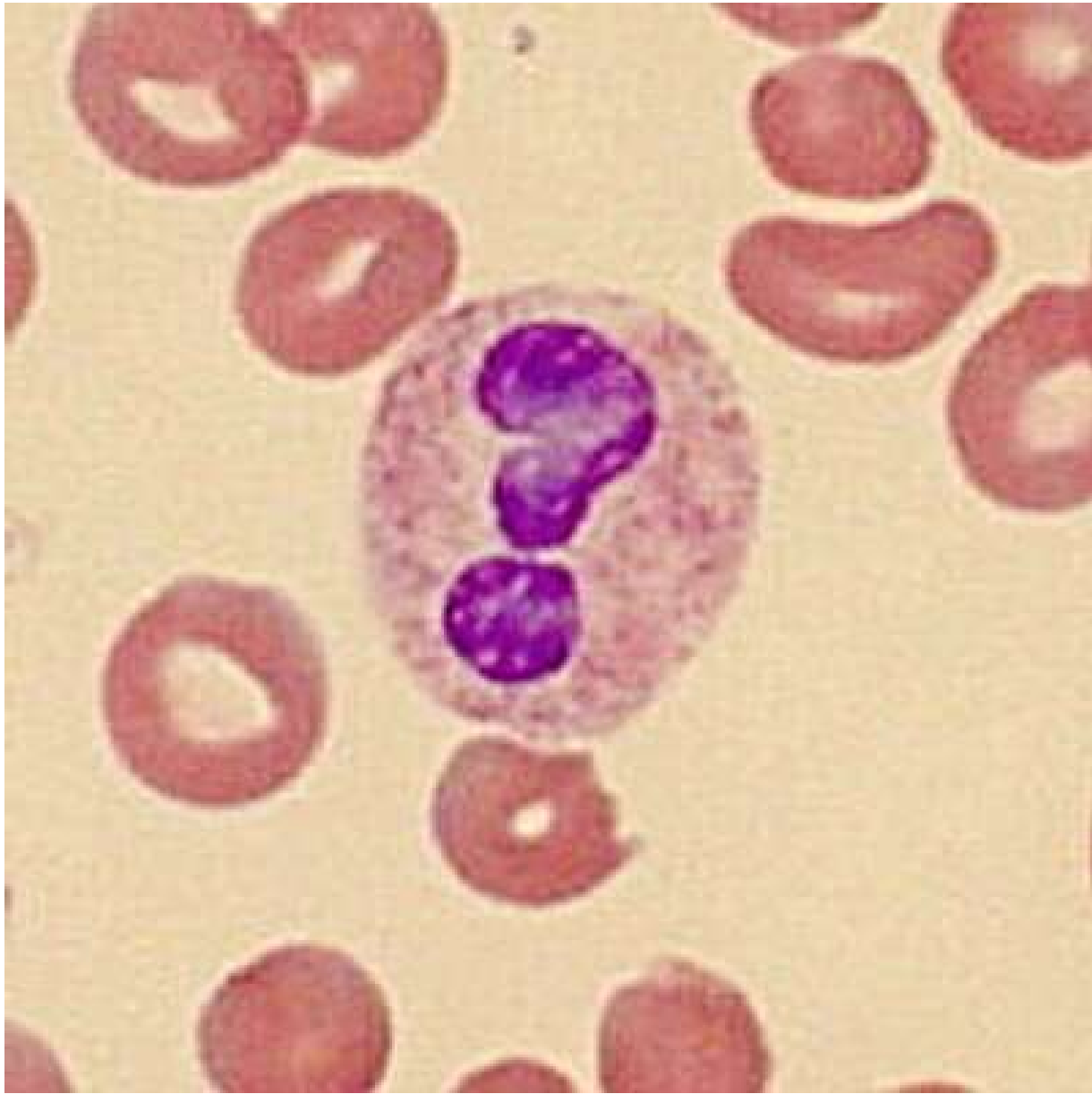


Denature

Anneal

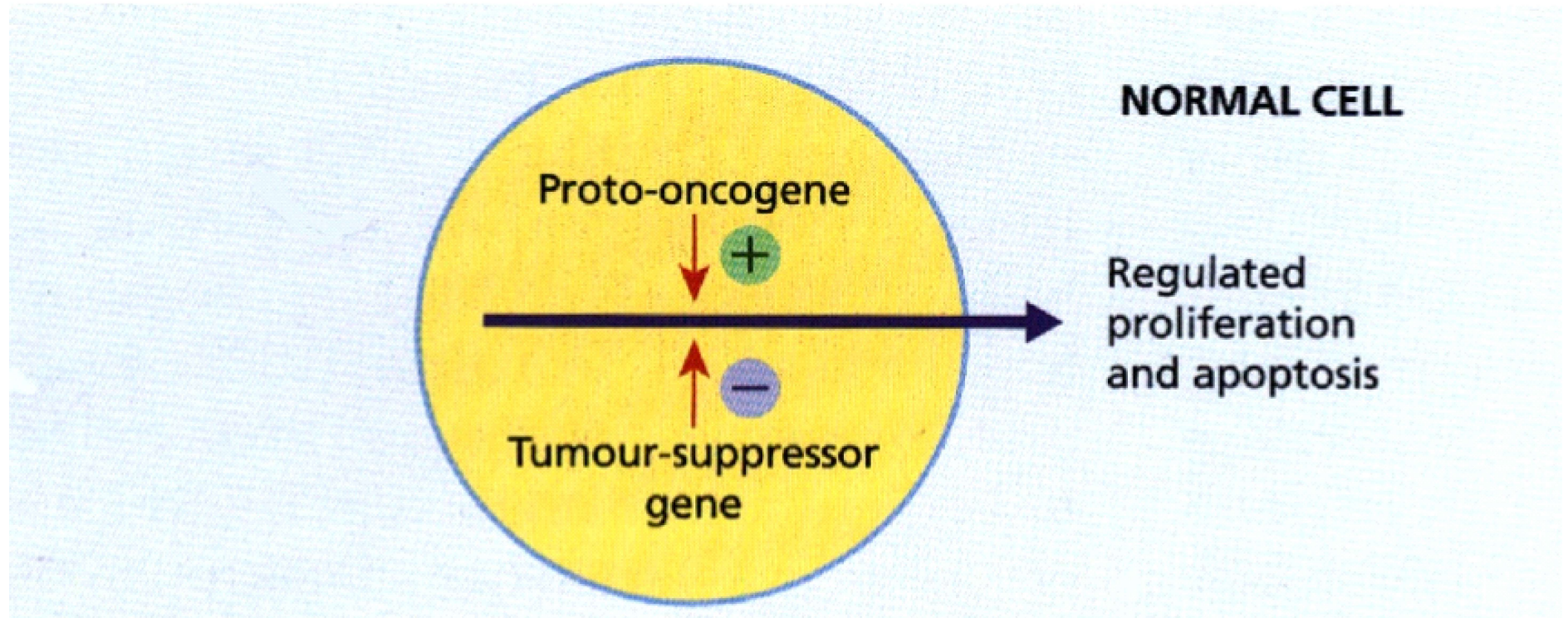
Extend

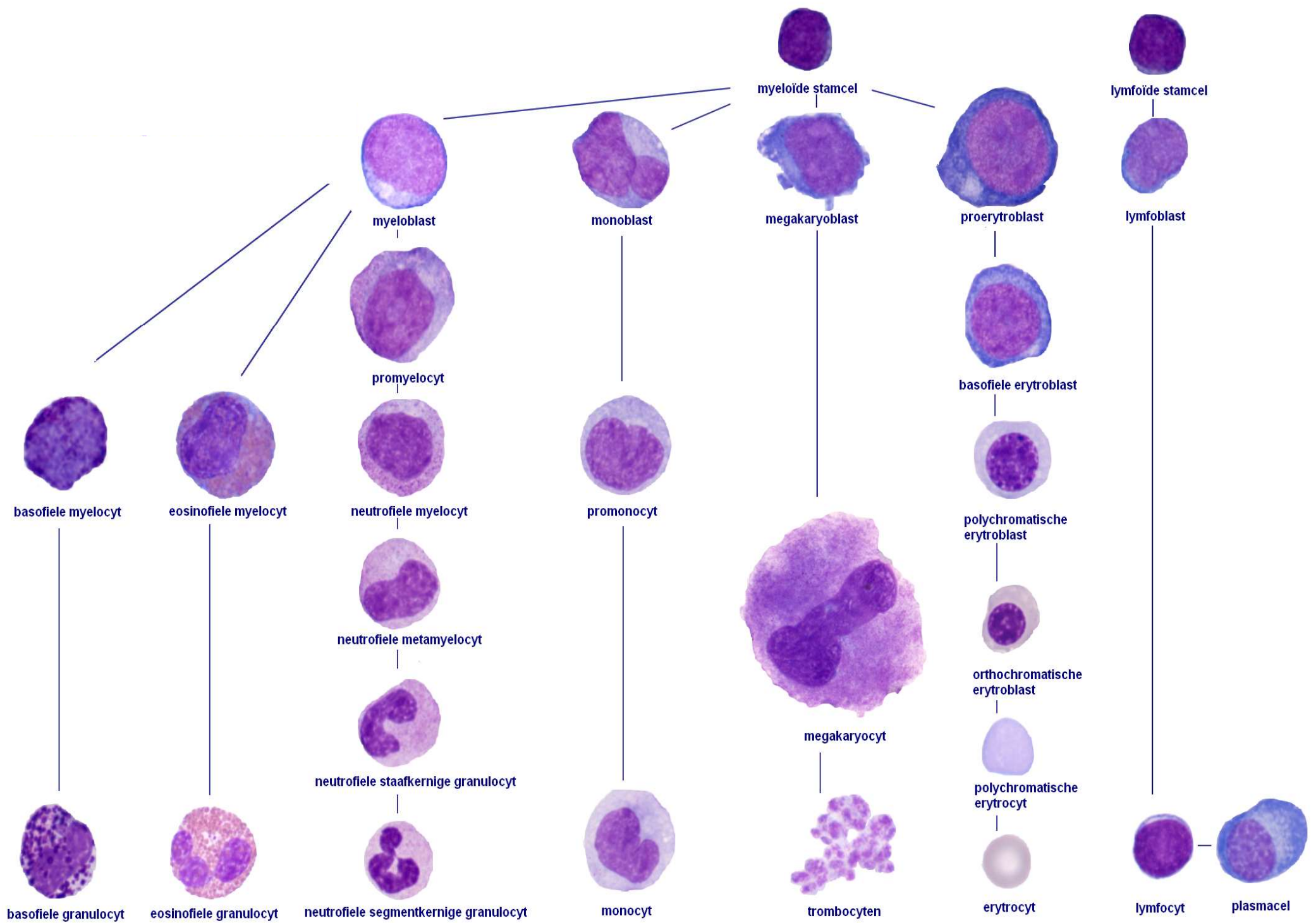


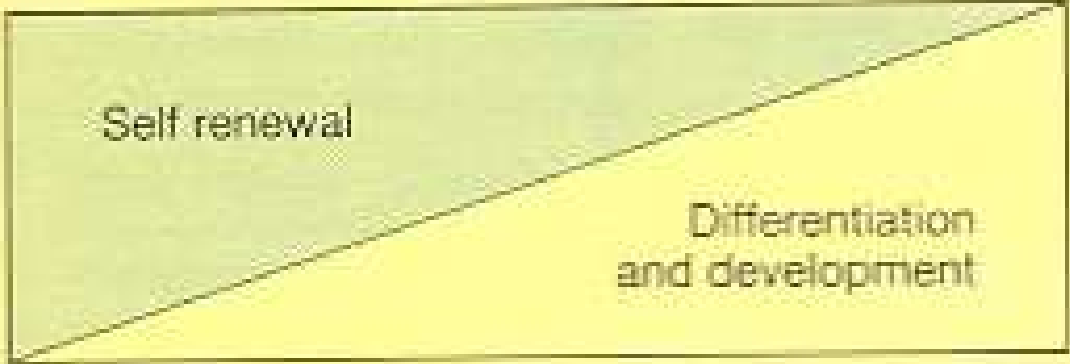




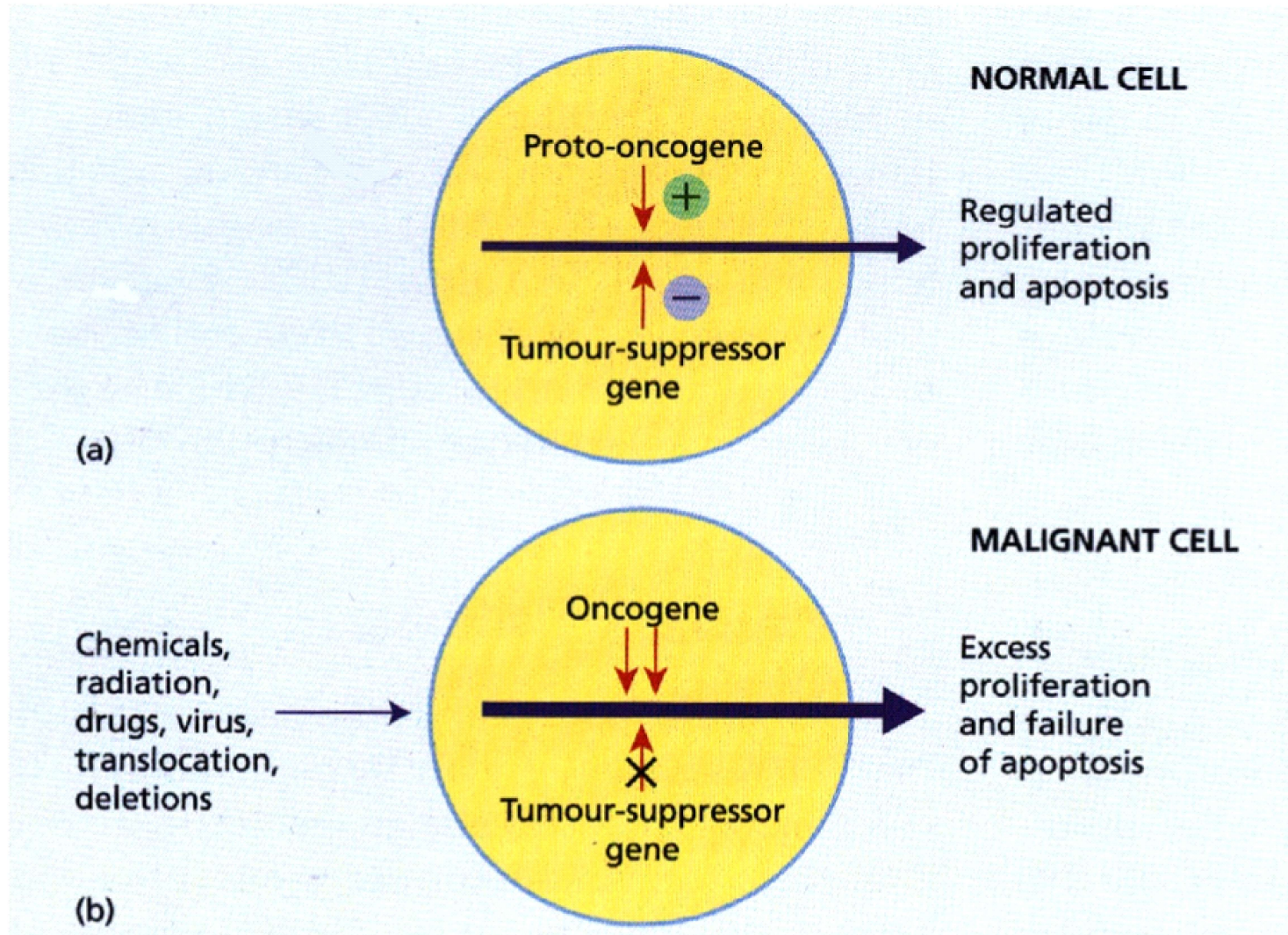
# Balans

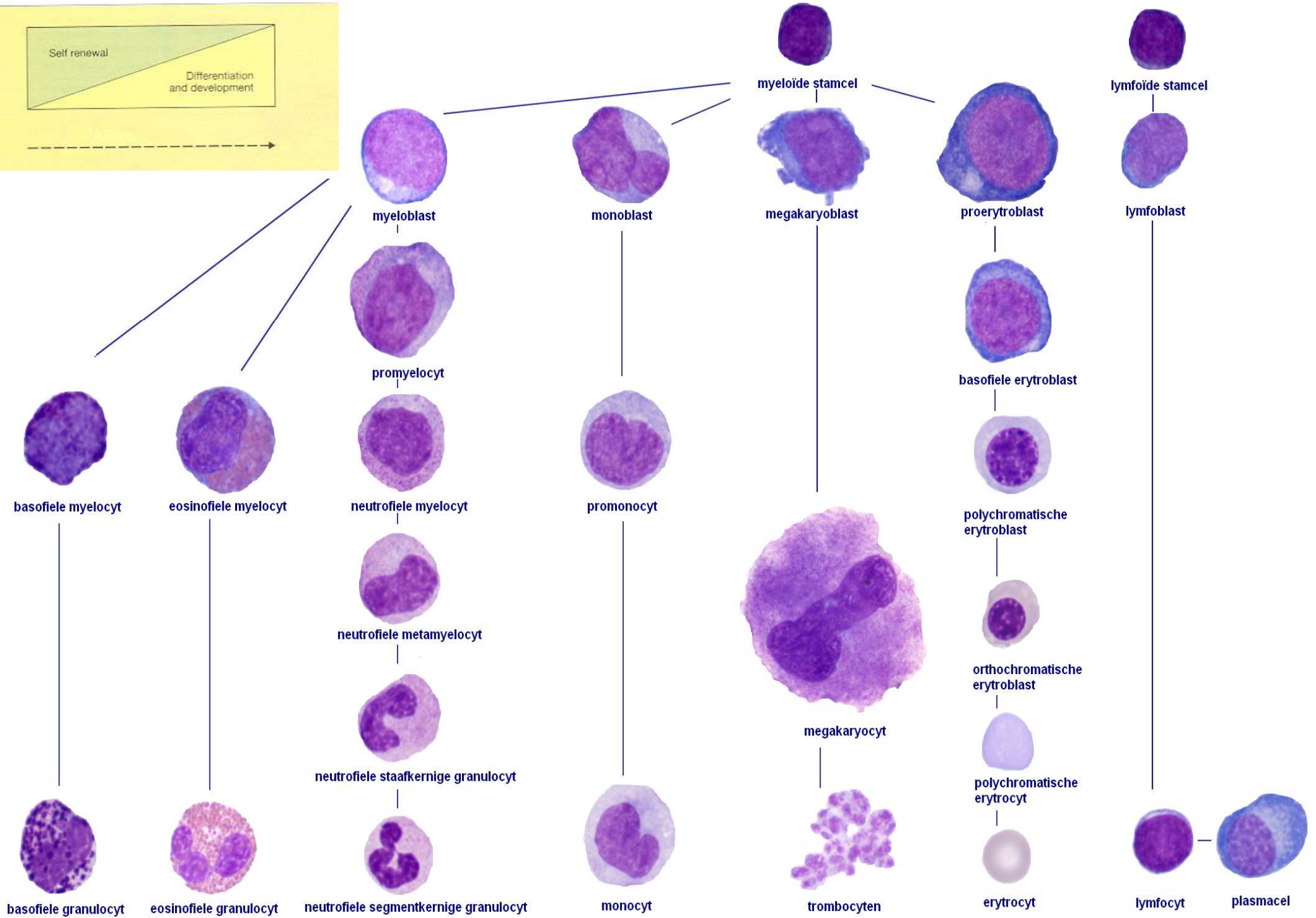
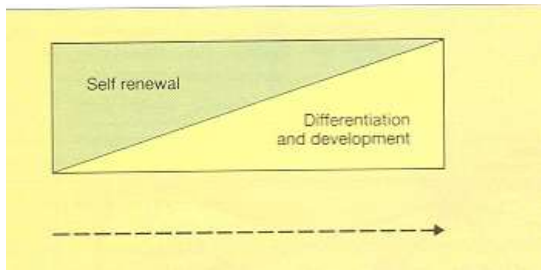




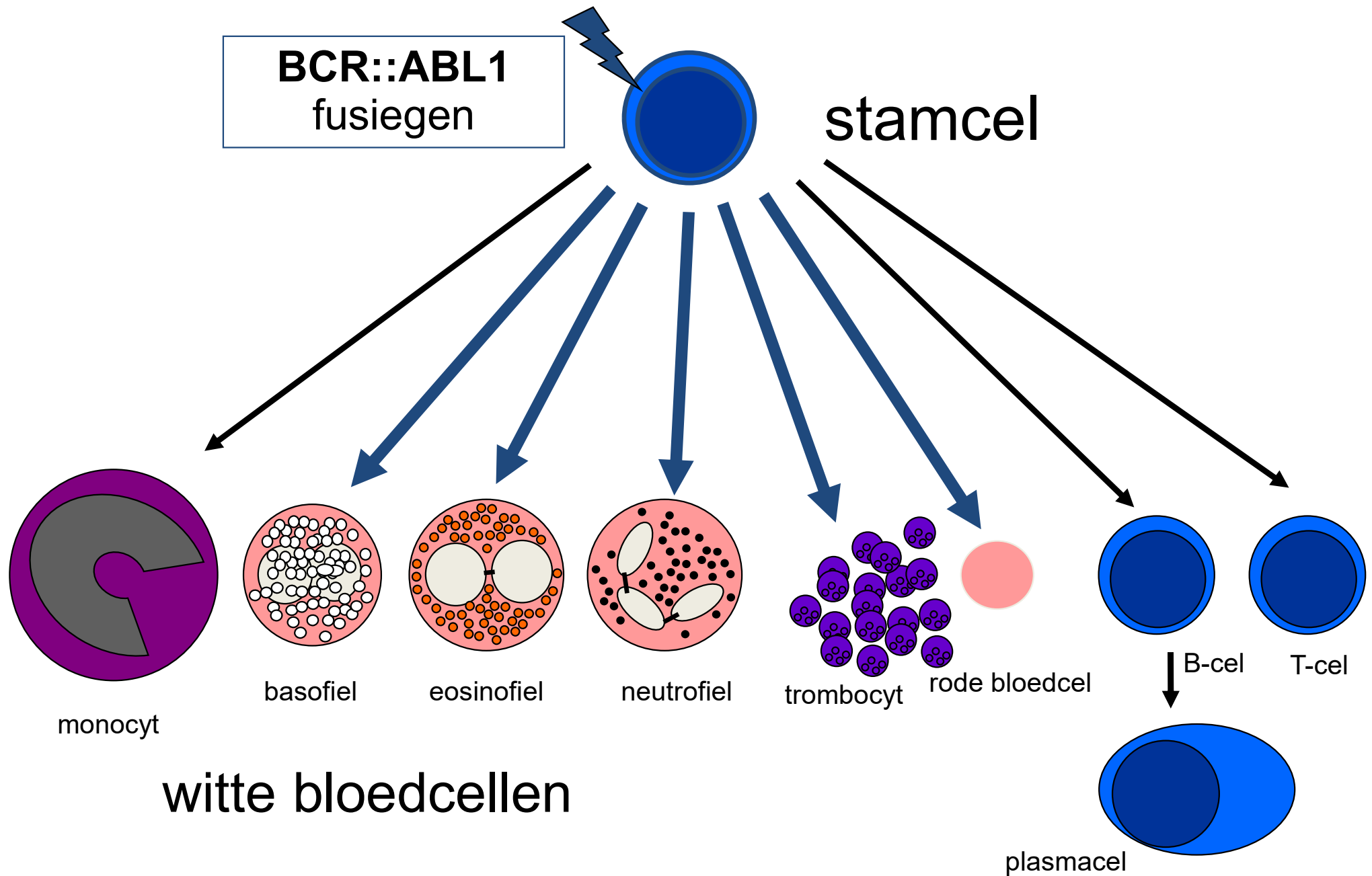


# Balans ↔ geen balans



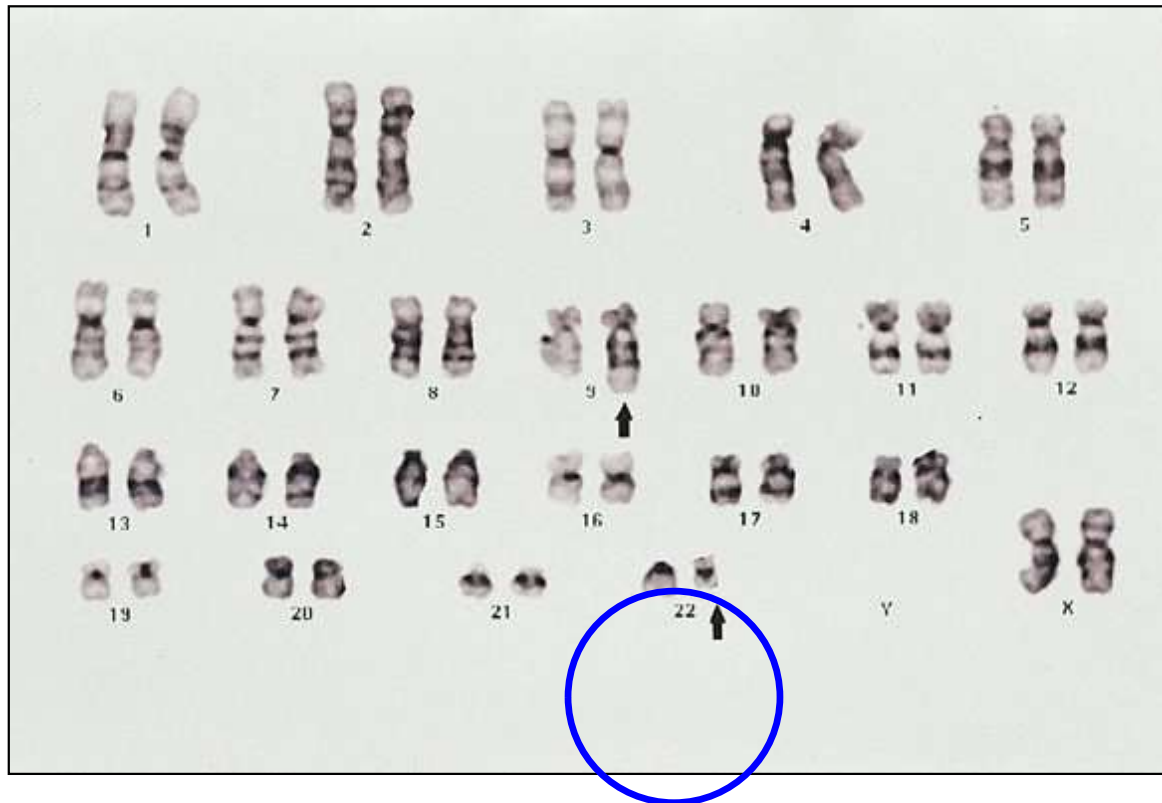
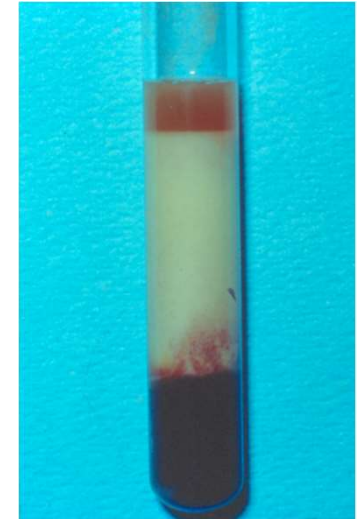


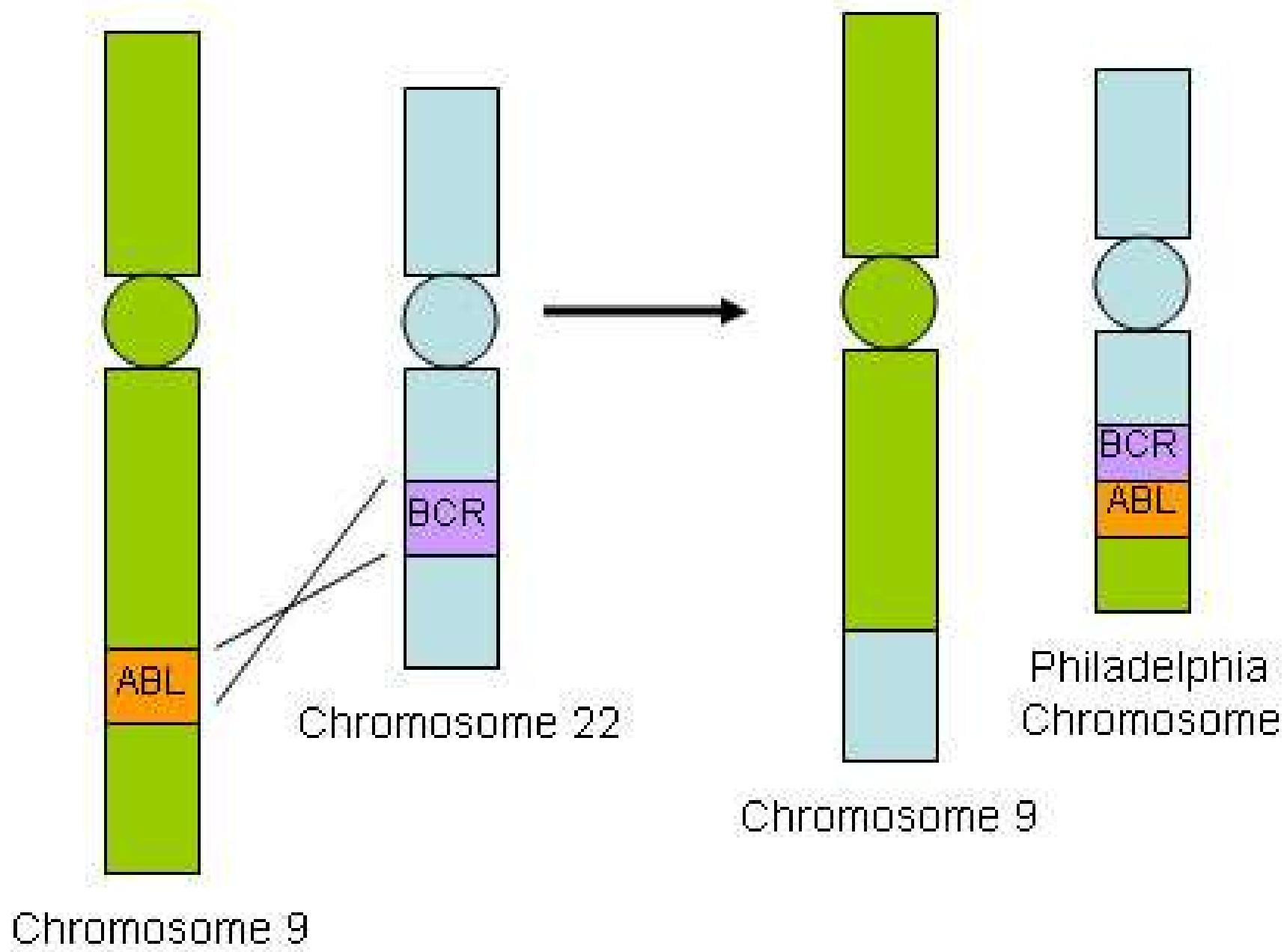
# Bloedaanmaak bij Chronische Myeloïde Leukemie (CML)



# Ph chrom.; t(9;22)(q34;q11.2)

Nowell PC, Hungerford DA.  
A minute chromosome in human chronic  
granulocytic leukemia.  
Science **1960**;132:1497, abstract.





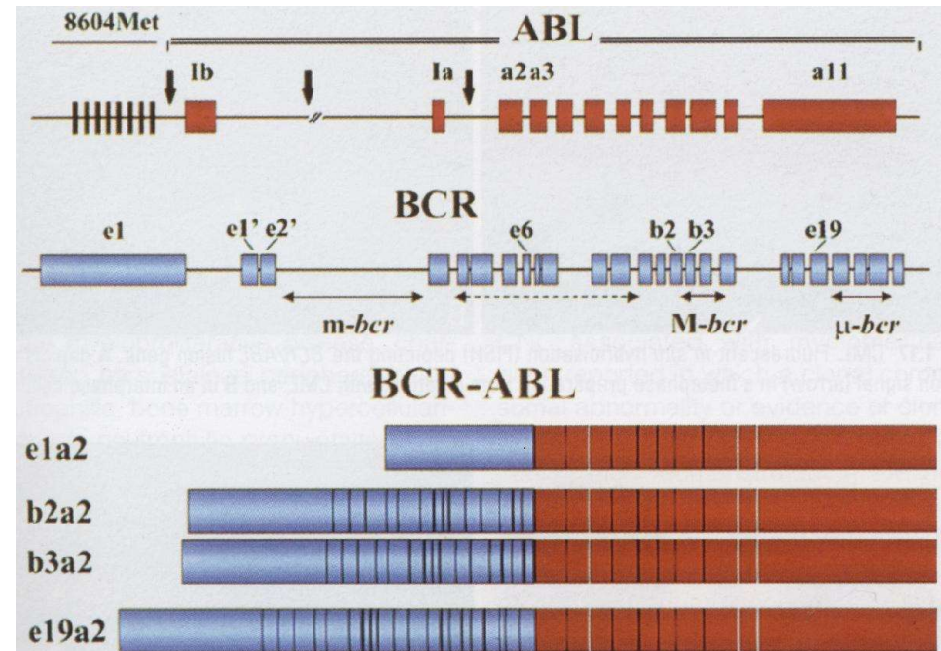
**BCR::ABL1 product: Tyrosine kinase**



# *CML: altijd BCR::ABL1 fusiegen +*

## Diagnose:

- Breukpunt:
  - **P210:**
    - **b2 (e13)/a2** (BV173)
    - **b3 (e14)/a2** (K562)
    - qRT-PCR
  - **P190: e1/a2** (TOM): qRT-PCR
    - Monocytose (dd: CMML)
    - B-ALL
    - 90% in lage concentratie aanwezig
  - **P230: e19/a2:** alleen conventionele PCR!
    - Bij sterke granulocyttaire uitrijping (dd: CNL)
    - Bij sterke trombocytose (dd: ET)
    - **Wordt niet standaard uitgevoerd!**

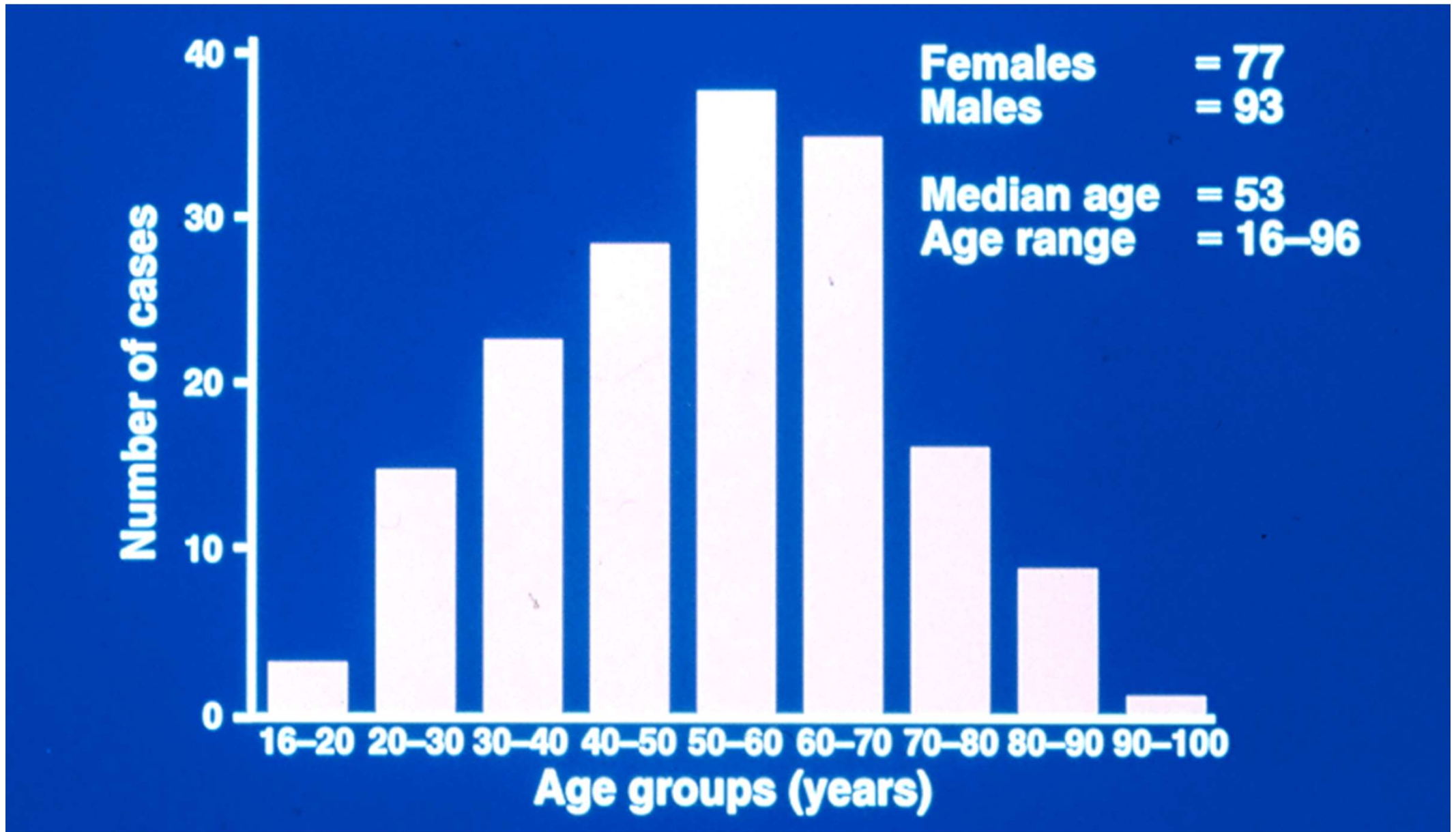


# *BCR::ABL1* fusiegen

## **Diagnose: cytogenetica en PCR**

- Vaststellen t(9;22)/Ph. chromosoom
- Breukpunt *BCR::ABL1* (voor follow-up)
- Cryptic translocation: cytogenetica negatief
- Additionele cytogenetische afwijkingen

# Leeftijds- en geslachtsverdeling bij 170 CML-patiënten



# De milt

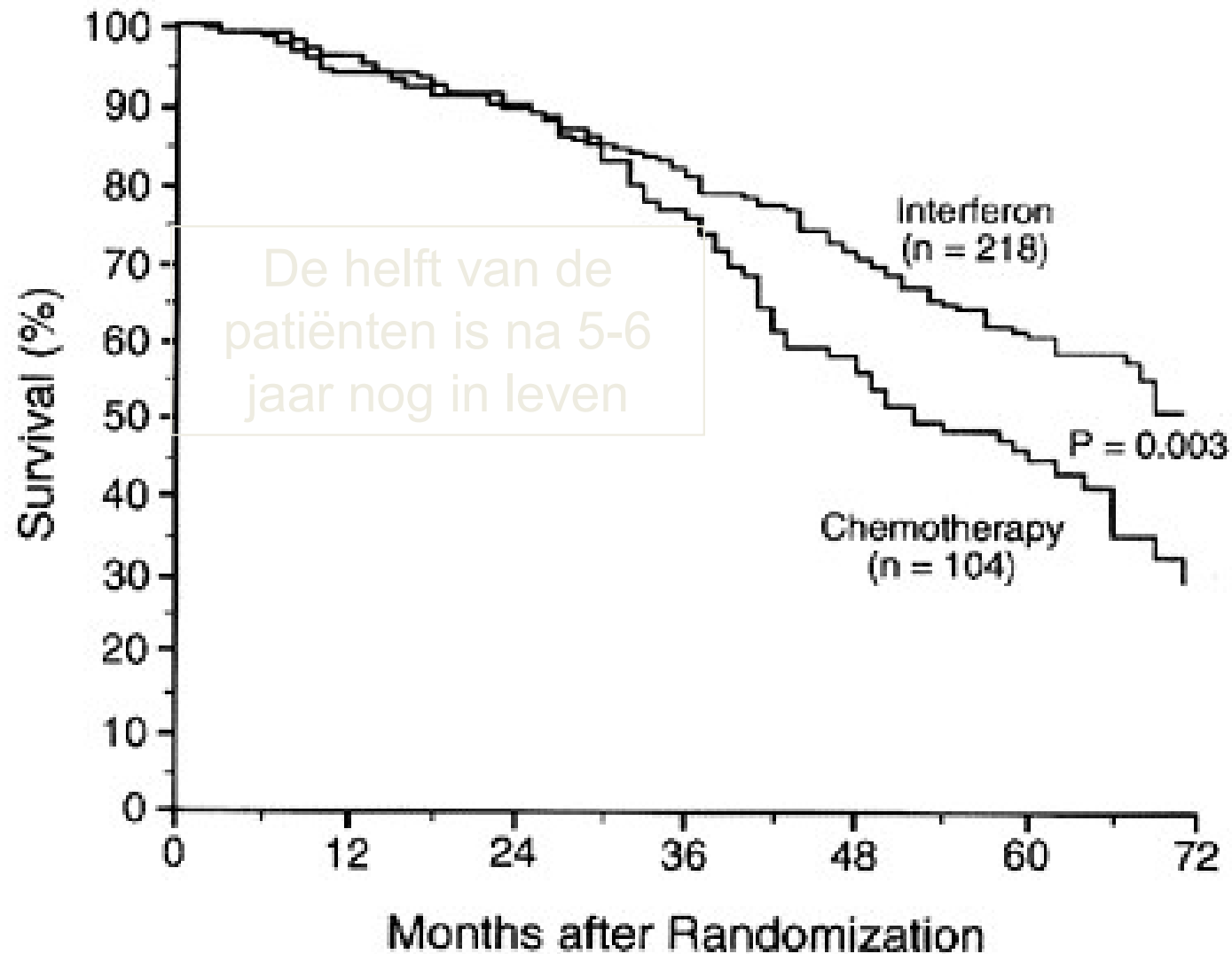


normaal



vergroot

# Overleving CML 'vroeger' met twee verschillende behandelingen (1994)



# Chronisch myeloïde leukemie

## Karakteristieke vroegere beloop

Chronische fase



Geaccelereerde fase



Blastencrise



2e chronische fase



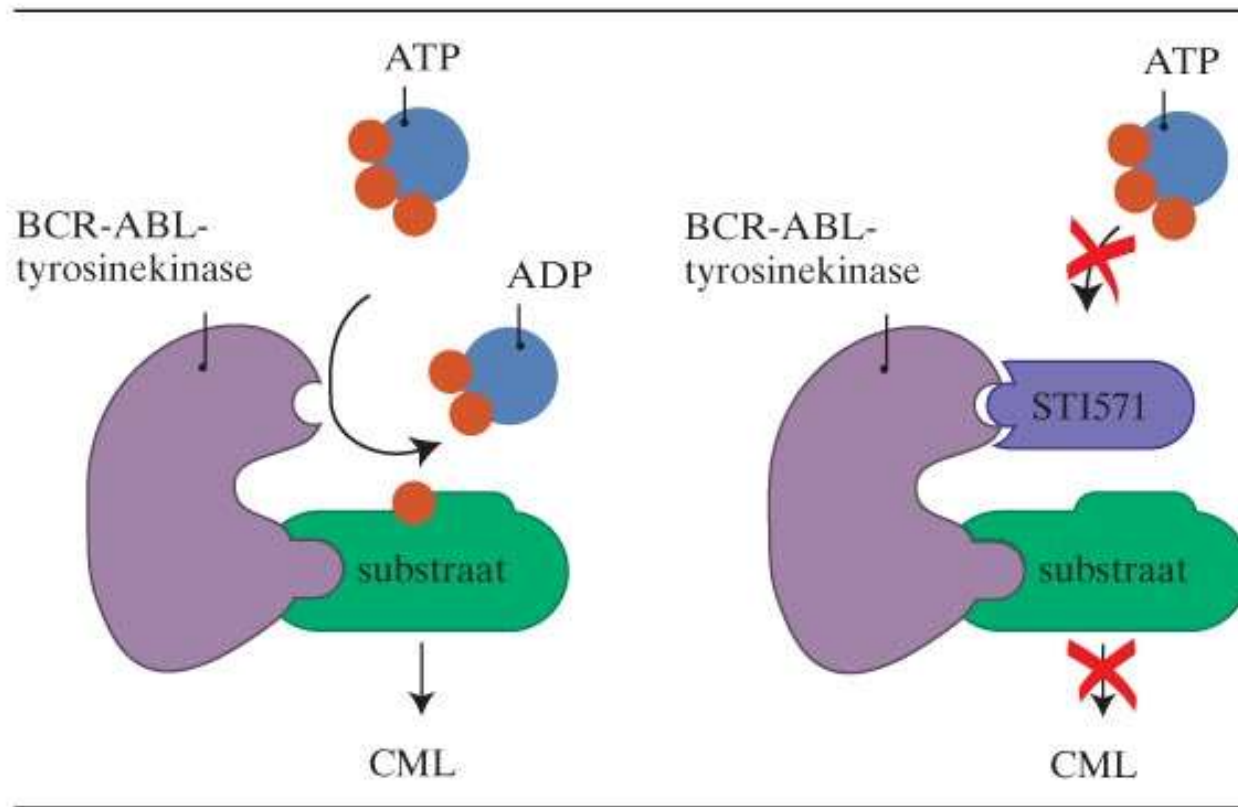
Blastencrise



Dood



# Imatinib (Glivec)



**Uitgangssituatie**

**Optimaal**

**3 maanden**

***BCR::ABL1* ≤10% en/of Ph+ <65%**

**6 maanden**

***BCR::ABL1* ≤10% en/of Ph+ <35%**

**12 maanden**

***BCR::ABL1* ≤1% en/of Ph+ 0%**

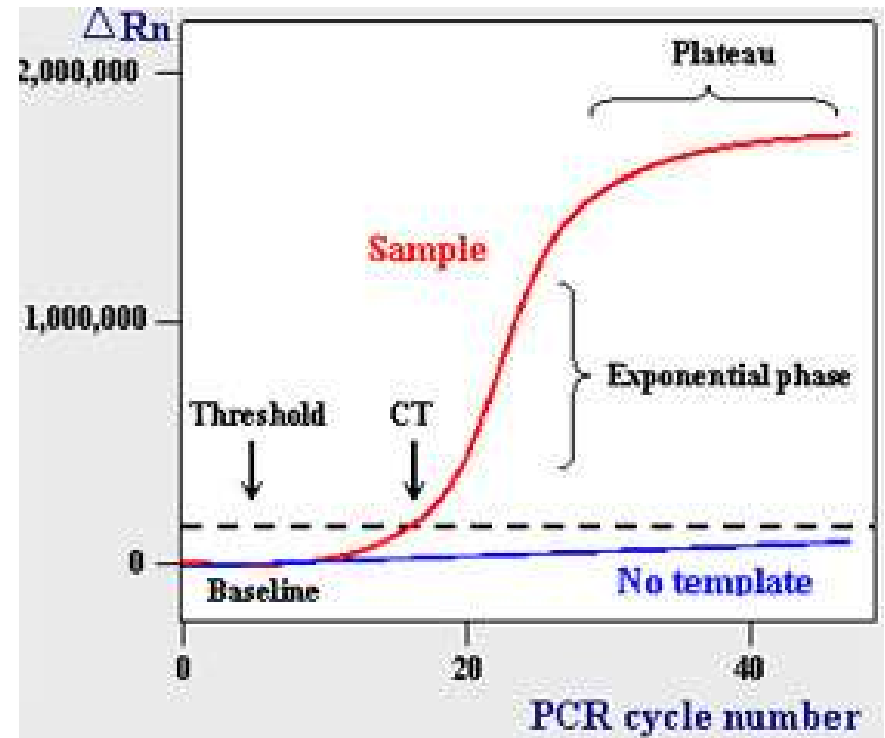
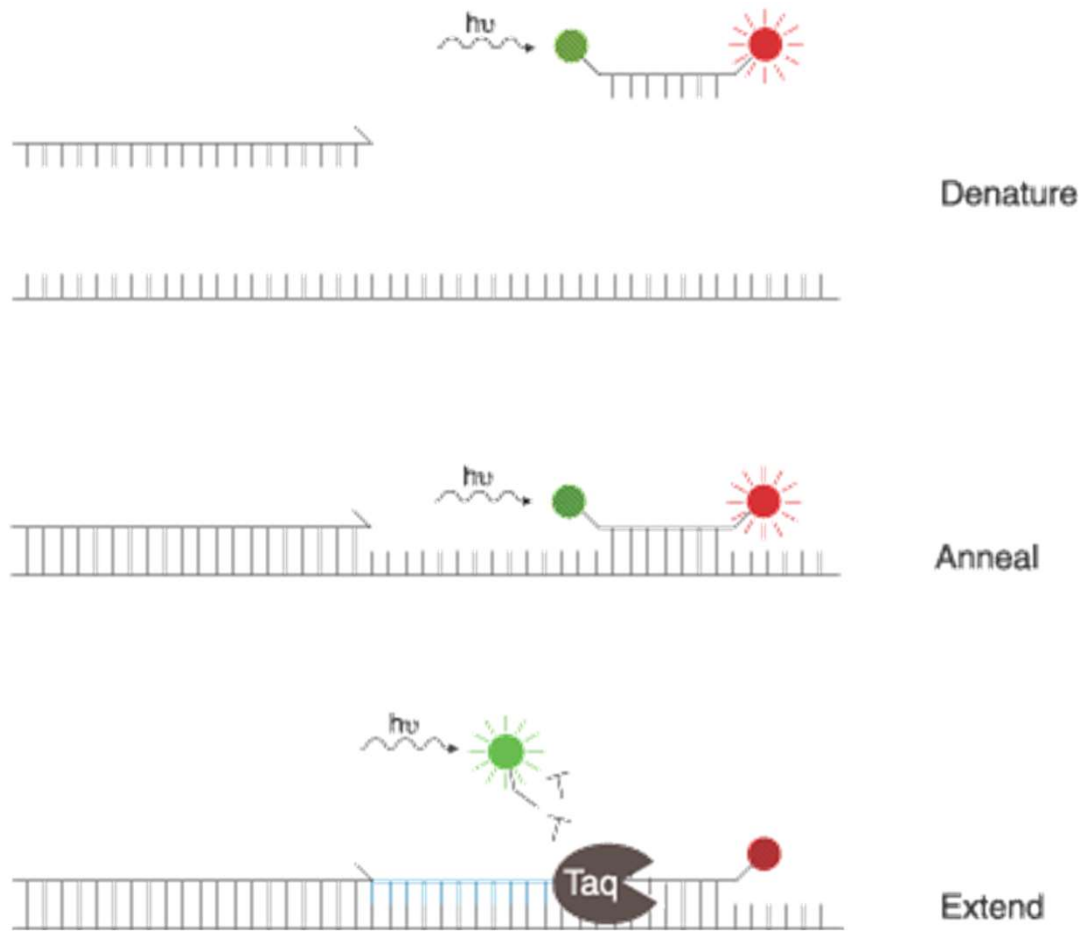
**Daarna, en op elk  
moment**

***BCR::ABL1* ≤0,1%:  
Major Molecular Response (MMR)**

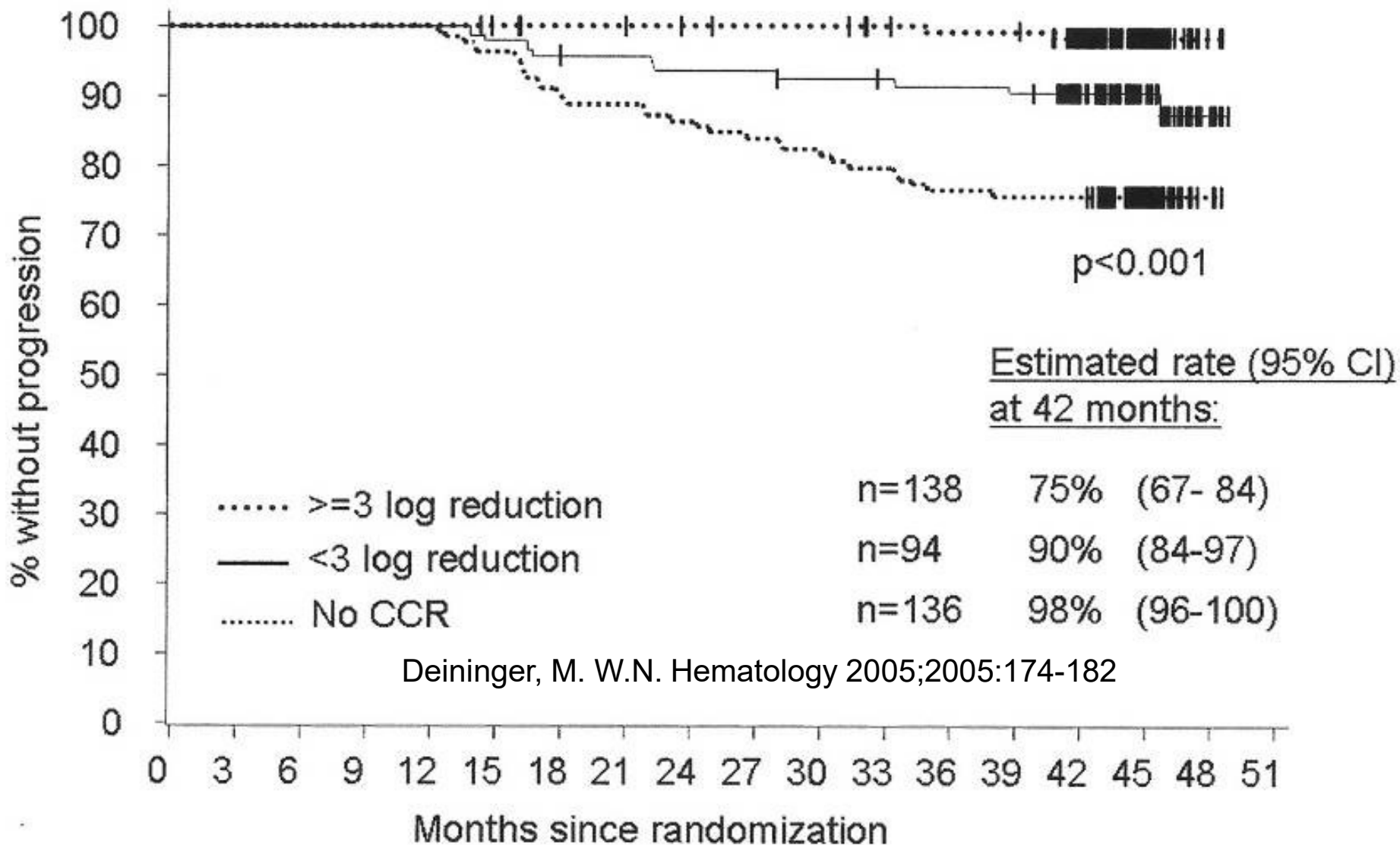
**CMR: *BCR::ABL1*: < 0,0032% ( $10^E-4,5$ ): stoppen?**



# Principe real time qPCR



## Progressievrije overleving van CML-patiënten 'nu' behandeld met imatinib, afhankelijk van hun verbetering op 12 maanden



## **Diagnose: cytogenetica en PCR**

- Breukpunt BCR::*ABL1*
- Concentratie
- Cryptic translocation: cytogenetica negatief
- Additionele cytogenetische afwijkingen

## **Follow-up: PCR en cytogenetica**

- Concentratie Ph-chrom./BCR::*ABL1*

## **CML-AP/BP?:**

- Additionele cytogenetische afwijkingen
- Additionele mutaties in BCR::*ABL1* (TKI-resistentie)
- Additionele mutaties in andere genen?

# UMCG: NGS: 107 genes

## Myeloid Extended Solution - 98 genes

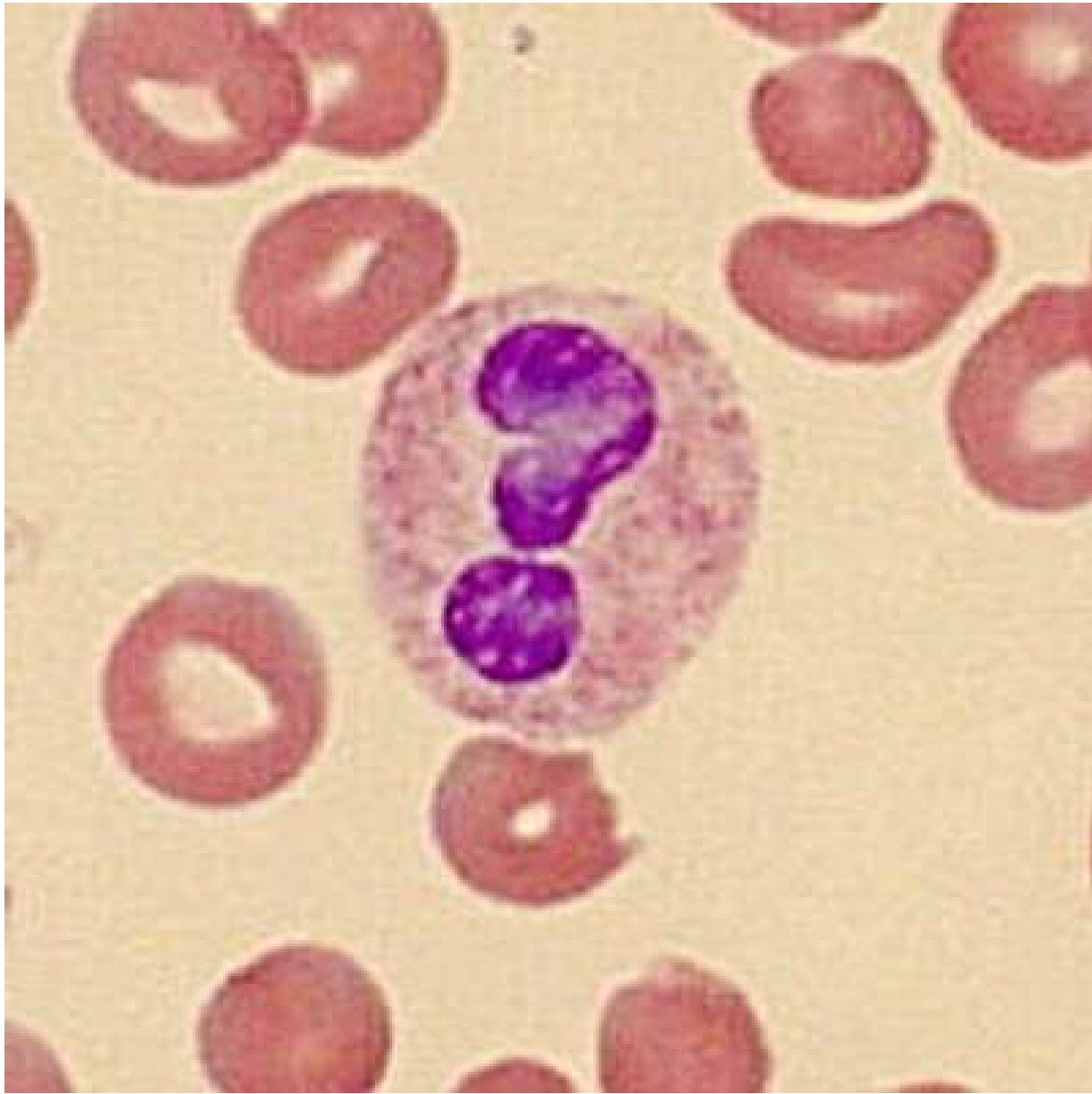
ABL1  
ANKRD26  
ASXL1  
ASXL2  
ATM  
ATRX  
BCOR  
BCORL1  
BRAF  
BRCC3  
CALR  
CBL  
CBLB  
CBLC  
CCND2  
CDKN2A  
CEBPA  
CHEK2  
CREBBP  
CSF3R  
CSMD1  
CSNK1A1  
CTCF  
CUX1  
DDX41  
DHX15  
DNMT3A  
ELANE  
ETNK1  
ETV6  
EZH2  
FANCA

FANCL  
FLT3  
GATA1  
GATA2  
GNAS  
GNB1  
HNRNPK  
HRAS  
IDH1  
IDH2  
IKZF1  
JAK1  
JAK2  
JAK3  
KDM6A  
KIT  
KMT2A  
KMT2D  
KRAS  
LUC7L2  
MECOM  
MET  
MPL  
MYC  
NF1  
NOTCH1  
NOTCH2  
NPM1  
NRAS  
PAX5  
PDGFRA  
PHF6  
PIGA  
PML

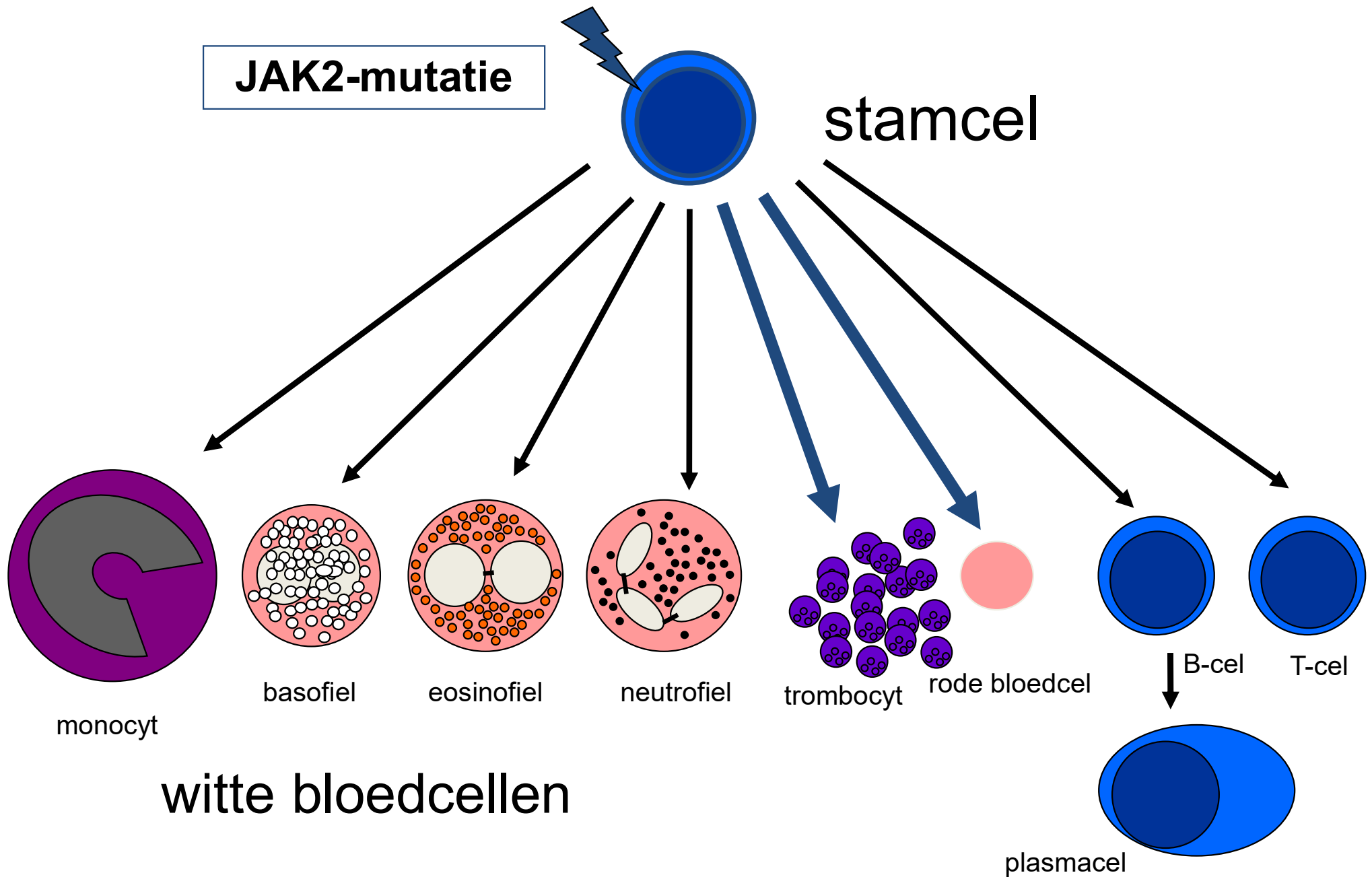
PPM1D  
PTPN11  
RAD21  
RAF1  
RB1  
RBBP6  
RPS19  
RTEL1  
RUNX1  
SAMD9  
SAMD9L  
SBDS  
SETBP1  
SF3B1  
SH2B3  
SMC1A  
SMC3  
SOS1  
SRP72  
SRSF2  
STAG1  
STAG2  
STAT3  
STAT5B  
TERC  
TERT  
TET2  
TP53  
U2AF1  
WT1  
ZBTB7A  
ZRSR2

## Extra 9 genes:

MYD88, FBXW7, PTEN, NFE2, BIRC3, IL2RG, SAMHD1, TCL1A, UBA1

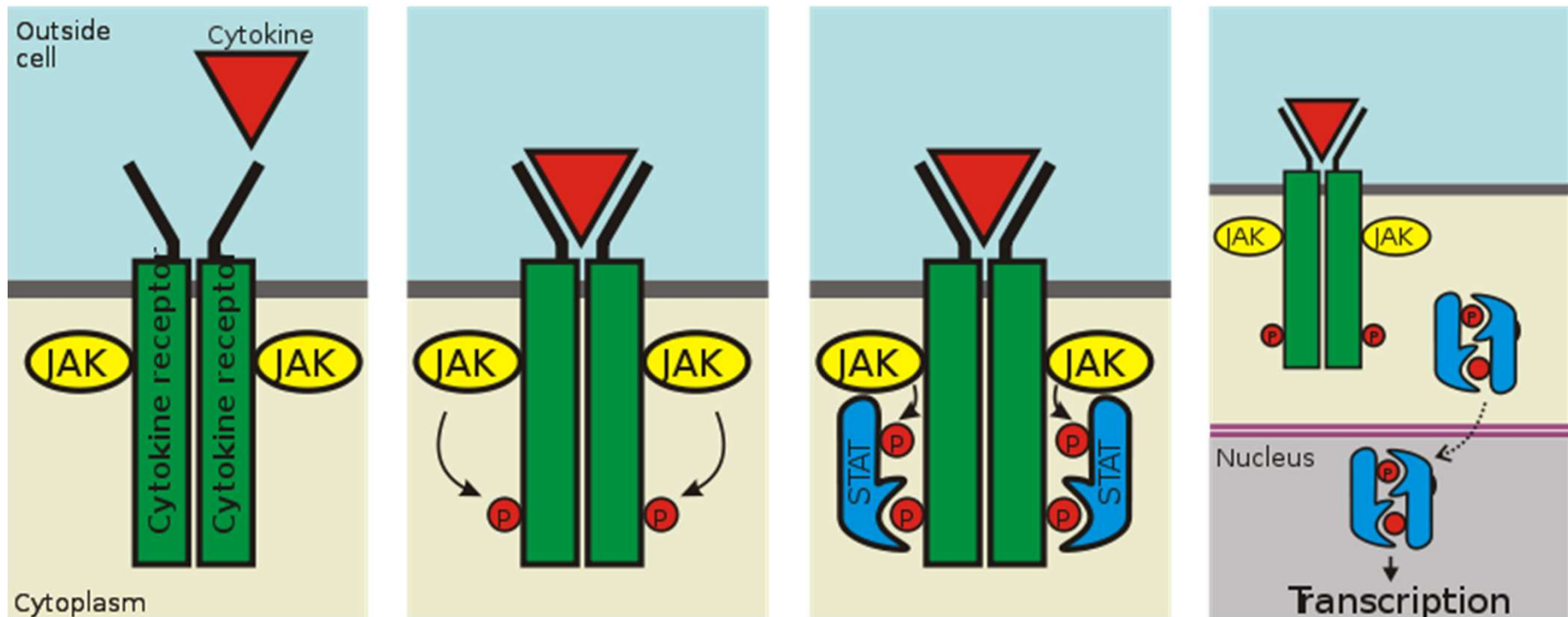


# Bloedaanmaak bij PV/ET/PMF



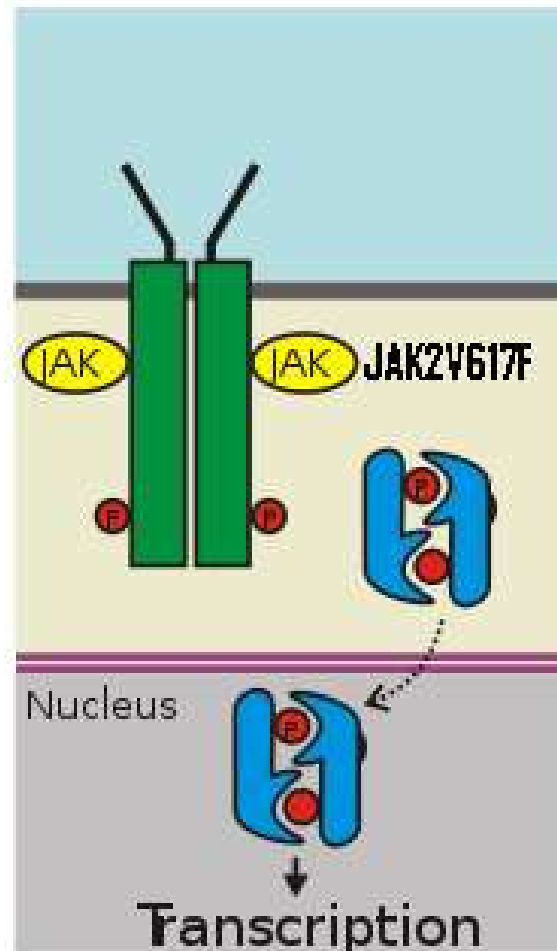
# JAK2

## Janus Kinase 2: fosfo(P)-tyrosine kinase



# Mechanisme activatie bij *JAK2* mutaties

Activeert zonder  
cytokine (Epo, Tpo)





# JAK2 V617F

- Janus Kinase 2 eiwit: (Just another kinase)
  - Gen: bestaat uit 24 exonen op 9p24
  - Meestvoorkomende mutatie:
    - **Puntmutatie in exon 14**
    - **Guanine** vervangen door **Thymine**
    - 617<sup>e</sup> aminozuur **Valine** vervangen door **Fenylalanine**
    - **JAK2 V617F mutatie**

# JAK2 V617F mutatie



- Analysetechniek: qPCR
- **Diagnose:**
  - Homozygoot of heterozygoot?
  - Positief tot 1% allelfrequentie (MODHEM)
  - 1– 0,1%: **“zwak positief, klinische betekenis onduidelijk”**
  - < 0,1%: negatief
- **Follow-up:**
  - Post-allo-Tx
  - JAK2-remmers (ruxolitinib)

# Casus

- **Man, 1956**
  - **Verwijzer: MDL arts**
  - **VG: sinds 2013 linkszijdige colitus ulcerosa**
  - **2015: actuele klacht: jeuk na douchen**
    - geen trombose
    - geen hoofdpijn
    - geen B-symptomen
  - **LO: rood hoofd**
    - geen palpabele milt en lever
    - geen tekenen van trombosebeen
    - **ECHO: milt iets vergroot (13,9 cm)**

# Casus

- **Lab:**
  - **Cytometrie/Diff:**
    - **Hb 12,5 mmol/L**
    - **MCV 91**
    - **WBC  $7.5 \times 10^9/L$**
    - **PLT  $252 \times 10^9/L$**
    - **Handdiff: normaal**
  - **Overig:**
    - **CRP <5**
    - **LDH normaal**
    - **EPO: 1,2 (4,5 – 19,6 U/L)**

# Casus

## Beenmergaspiraats:

- Hypercellulair, vlokrijk crista-aspiraats met een actieve, licht afwijkende erythropoiese, geen depotijzer en geen inbouw, normaal actieve, licht afwijkende myelopoiese, actieve, licht afwijkende megakaryopoiese en < 5% blasten.
- Conclusie: actief beenmerg, **dd: reactief of beginnend MPN-beeld, mede gezien ijzergebrek is PV niet geheel uitgesloten.**

## Beenmergbiopsie:

- **Normocellulair (!!)** beenmerg met toegenomen erythropoiese en megakaryopoiese. Megakaryocyten sporadisch iets groter dan normaal.
- Conclusie: **dd: reactief of myeloproliferatief neoplasma**

# Casus

## Aanvullend onderzoek:

- Erythrocytenvolume: **erythrocytenvolume** relatief meer **toegenomen** dan plasmavolume. Beeld kan passen bij PV.
- **Verlaagde Epo spiegel**
- **Cytogenetica:**
  - 46, XY
- **Moleculaire diagnostiek:**
  - BCR::ABL niet aangetoond (detectiegrens 1%)
  - JAK2V617F niet aangetoond (detectiegrens 0,1%)
  - JAK2 exon 12 mutaties niet aangetoond (detectiegrens 10-20%)
  - CALR mutaties niet aangetoond (detectiegrens 10-20%)

# UMCG: NGS: 107 genes

## Myeloid Extended Solution - 98 genes

ABL1  
ANKRD26  
ASXL1  
ASXL2  
ATM  
ATRX  
BCOR  
BCORL1  
BRAF  
BRCC3  
CALR  
CBL  
CBLB  
CBLC  
CCND2  
CDKN2A  
CEBPA  
CHEK2  
CREBBP  
CSF3R  
CSMD1  
CSNK1A1  
CTCF  
CUX1  
DDX41  
DHX15  
DNMT3A  
ELANE  
ETNK1  
ETV6  
EZH2  
FANCA

FANCL  
FLT3  
GATA1  
GATA2  
GNAS  
GNB1  
HNRNPK  
HRAS  
IDH1  
IDH2  
IKZF1  
JAK1  
JAK2  
JAK3  
KDM6A  
KIT  
KMT2A  
KMT2D  
KRAS  
LUC7L2  
MECOM  
MET  
MPL  
MYC  
NF1  
NOTCH1  
NOTCH2  
NPM1  
NRAS  
PAX5  
PDGFRA  
PHF6  
PIGA  
PML



PPM1D  
PTPN11  
RAD21  
RAF1  
RB1  
RBBP6  
RPS19  
RTEL1  
RUNX1  
SAMD9  
SAMD9L  
SBDS  
SETBP1  
SF3B1  
SH2B3  
SMC1A  
SMC3  
SOS1  
SRP72  
SRSF2  
STAG1  
STAG2  
STAT3  
STAT5B  
TERC  
TERT  
TET2  
TP53  
U2AF1  
WT1  
ZBTB7A  
ZRSR2

## Extra 9 genes:

MYD88, FBXW7, PTEN, NFE2, BIRC3, IL2RG, SAMHD1, TCL1A, UBA1

# Casus: PV!

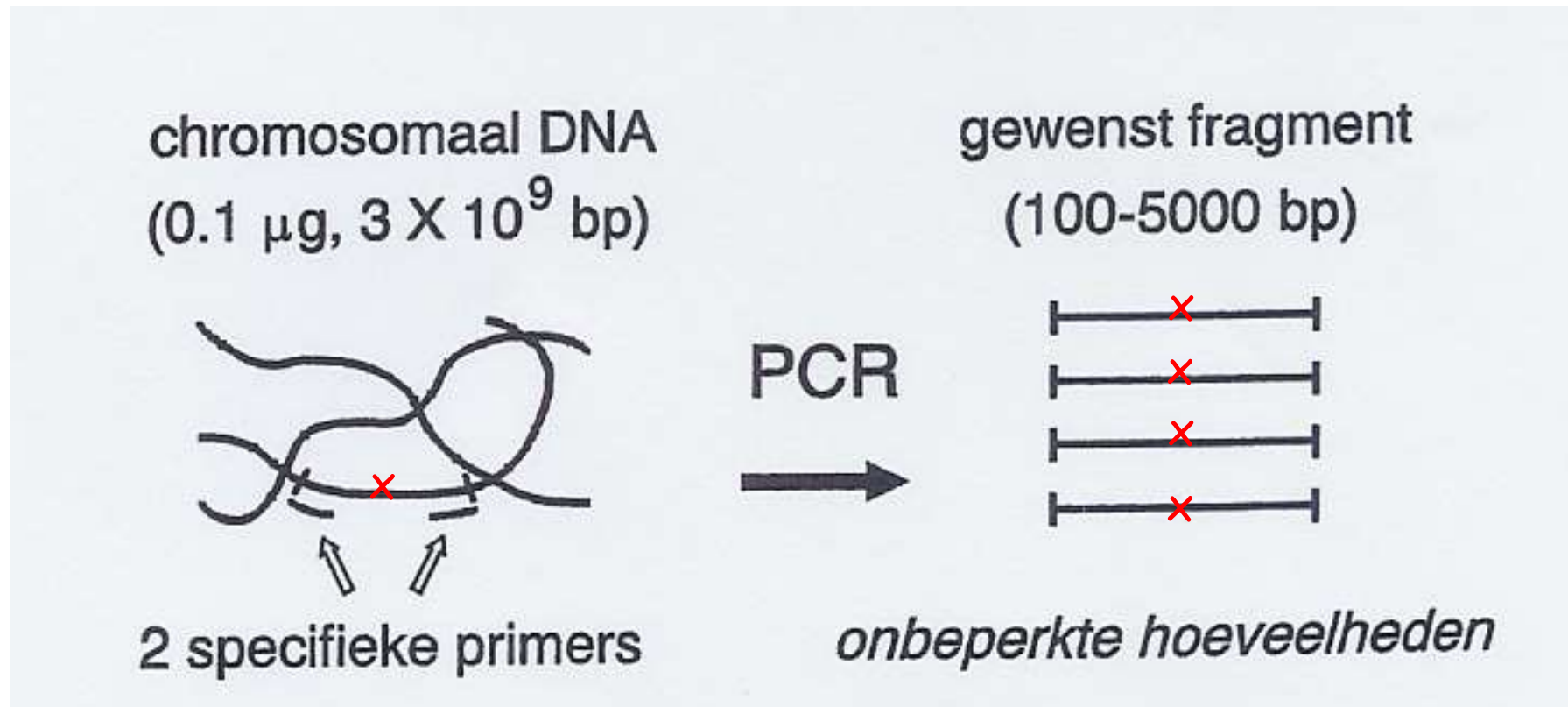
Geen BCR-ABL, JAK2 V617F, CALR mutatie en MPL aangetoond

Gen	cNomen	pNomen	Allelfreq.
JAK2	c.1849G>T	p.V617F	0,37
JAK2	c.1852T>C	p.C618R	0,37
ASXL1	c.2344_2350delCATCCGG	p.H782Mfs*34	0,06
DNMT3A	c.875T>C	p.I292T	0,06



# Polymerase ketting reactie Polymerase chain reaction

**PCR: 1:100.000-1.000.000 cellen!**

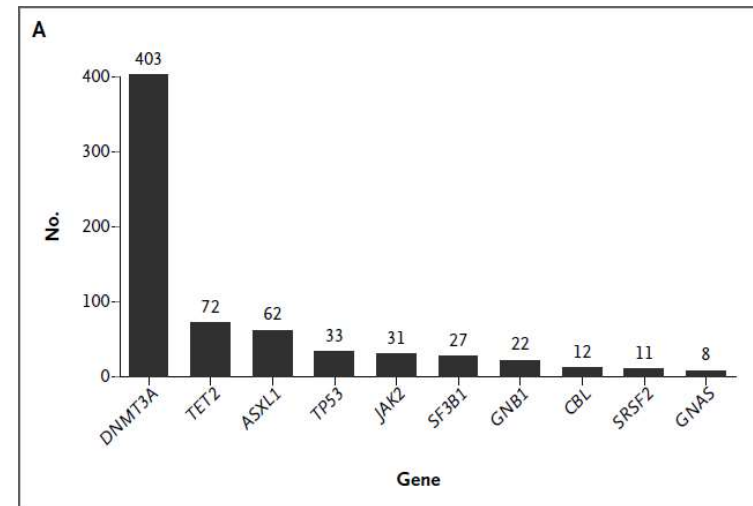
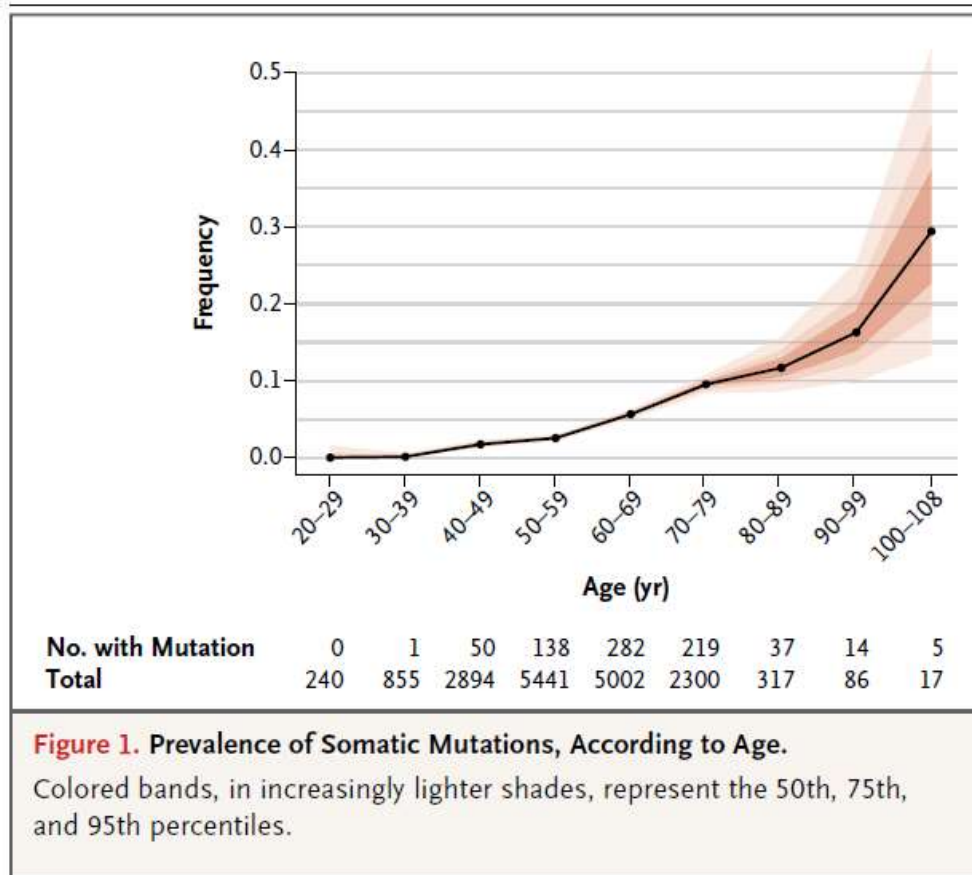


# Casus: PV!

Geen BCR-ABL, JAK2 V617F, CALR mutatie en MPL aangetoond

Gen	cNomen	pNomen	Allelfreq.
JAK2	c.1849G>T	p.V617F	0,37
JAK2	c.1852T>C	p.C618R	0,37
<b>ASXL1</b>	c.2344_2350delCATCCGG	p.H782Mfs*34	0,06
<b>DNMT3A</b>	c.875T>C	p.I292T	0,06

# Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes



Blood 2015, Steensma et al.

## **Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential, CHIP**

- normaal bloedbeeld
- geen dysplasie
- geen afwijkende kliniek
- verworven mutaties in genen geassocieerd met hematologische maligniteiten
- Variant allel frequentie  $\geq 2\%$  in bloed

# Pathogenesis: Clonal evolution to MDS/AML

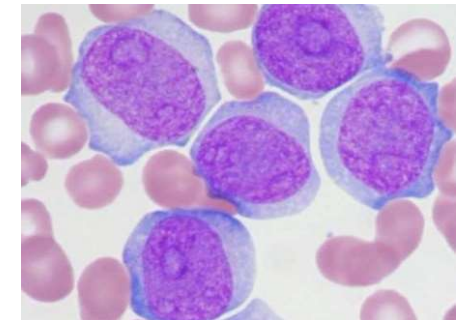
Hematopoiesis

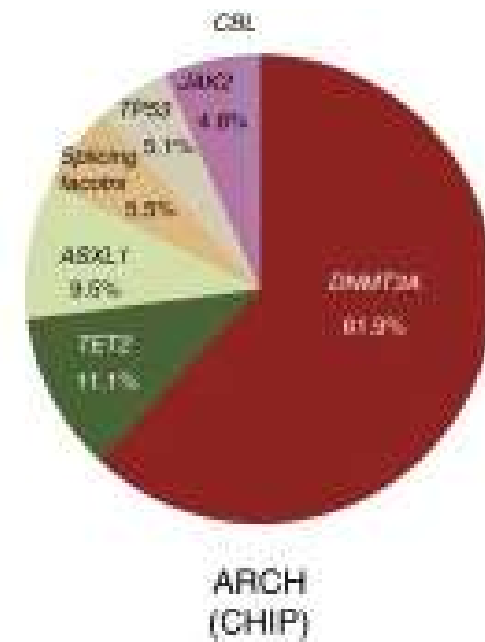
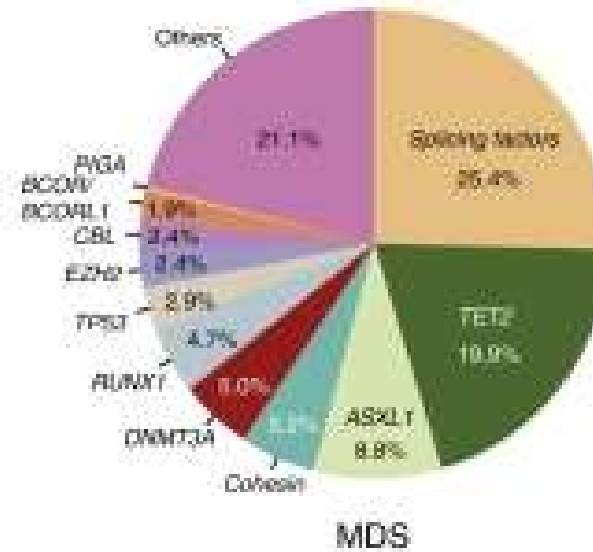
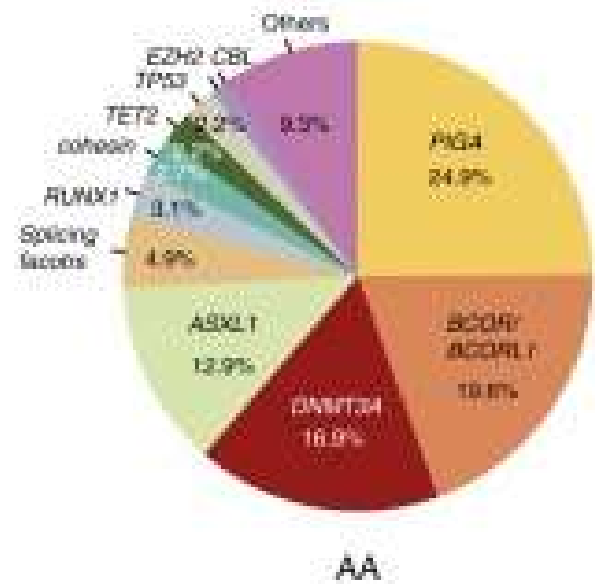


Clonal Hematopoiesis  
CHIP



Risk about 1% per year





- Clonal hematopoiesis in acquired aplastic anemia
- [Seishi Ogawa](#)
- [Blood](#). 2016 Jul 21; 128(3): 337–347.

**Pas op: JAK2 V617F kan ook een CHIP variant zijn!!**

