

Přehled, indikace a interpretace genetických vyšetření v diagnostice lymfoproliferací

Jana Kotašková

Sekce nádorové genomiky a lymfoproliferativních onemocnění

Centrum molekulární biologie a genetiky
Interní hematologická a onkologická klinika
Fakultní nemocnice Brno

24. 4. 2023

4th WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues

- mezinárodně uznávaná klasifikace
- 4. vydání 2008
- revize 4. vydání 2017



Table 1. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues

Mature B-cell neoplasms
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
B-cell prolymphocytic leukemia
Splenic marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia
Splenic lymphoma/leukemia, unclassifiable*
Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma*
Hairy cell leukemia variant*
Lymphoplasmacytic lymphoma
Waldenström macroglobulinemia
Heavy chain diseases
α Heavy chain disease
γ Heavy chain disease
μ Heavy chain disease
Plasma cell myeloma
Solitary plasmacytoma of bone
Extraosseous plasmacytoma
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
Nodal marginal zone lymphoma
Pediatric nodal marginal zone lymphoma*
Follicular lymphoma
Pediatric follicular lymphoma*
Primary cutaneous follicle centre lymphoma
Mantle cell lymphoma
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the CNS
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV-positive DLBCL of the elderly*
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK-positive large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castlemans disease
Primary effusion lymphoma
Burkitt lymphoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma

5th WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues (2022)

Mature B-cell neoplasms

Pre-neoplastic and neoplastic small lymphocytic proliferations

Monoclonal B-cell lymphocytosis

Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma

Splenic B-cell lymphomas and leukaemias

Hairy cell leukaemia

Splenic marginal zone lymphoma

Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma

Splenic B-cell lymphoma/leukaemia with prominent nucleoli

Lymphoplasmacytic lymphoma

Lymphoplasmacytic lymphoma

Marginal zone lymphoma

Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue

Primary cutaneous marginal zone lymphoma

Nodal marginal zone lymphoma

Paediatric marginal zone lymphoma

Follicular lymphoma

In situ follicular B-cell neoplasm

Follicular lymphoma

Paediatric-type follicular lymphoma

Duodenal-type follicular lymphoma

Cutaneous follicle centre lymphoma

Primary cutaneous follicle centre lymphoma

Mantle cell lymphoma

In situ mantle cell neoplasm

Mantle cell lymphoma

Leukaemic non-nodal mantle cell lymphoma

Transformations of indolent B-cell lymphomas

Transformations of indolent B-cell lymphomas

Large B-cell lymphomas

Diffuse large B-cell lymphoma, NOS

T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma

Diffuse large B-cell lymphoma/ high grade B-cell lymphoma with *MYC* and *BCL2* rearrangements

ALK-positive large B-cell lymphoma

Large B-cell lymphoma with *IRF4* rearrangement

High-grade B-cell lymphoma with 11q aberrations

Lymphomatoid granulomatosis

EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma

Diffuse large B-cell lymphoma associated with chronic inflammation

Fibrin-associated large B-cell lymphoma

Fluid overload-associated large B-cell lymphoma

Plasmablastic lymphoma

Primary large B-cell lymphoma of immune-privileged sites

Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type

Intravascular large B-cell lymphoma

Primary mediastinal large B-cell lymphoma

Mediastinal grey zone lymphoma

High-grade B-cell lymphoma, NOS

Burkitt lymphoma

Burkitt lymphoma

KSHV/HHV8-associated B-cell lymphoid proliferations and lymphomas

Primary effusion lymphoma

KSHV/HHV8-positive diffuse large B-cell lymphoma

KSHV/HHV8-positive germinotropic lymphoproliferative disorder

Lymphoid proliferations and lymphomas associated with immune deficiency and dysregulation

Hyperplasias arising in immune deficiency/dysregulation

Polymorphic lymphoproliferative disorders arising in immune deficiency/dysregulation

EBV-positive mucocutaneous ulcer

Lymphomas arising in immune deficiency / dysregulation

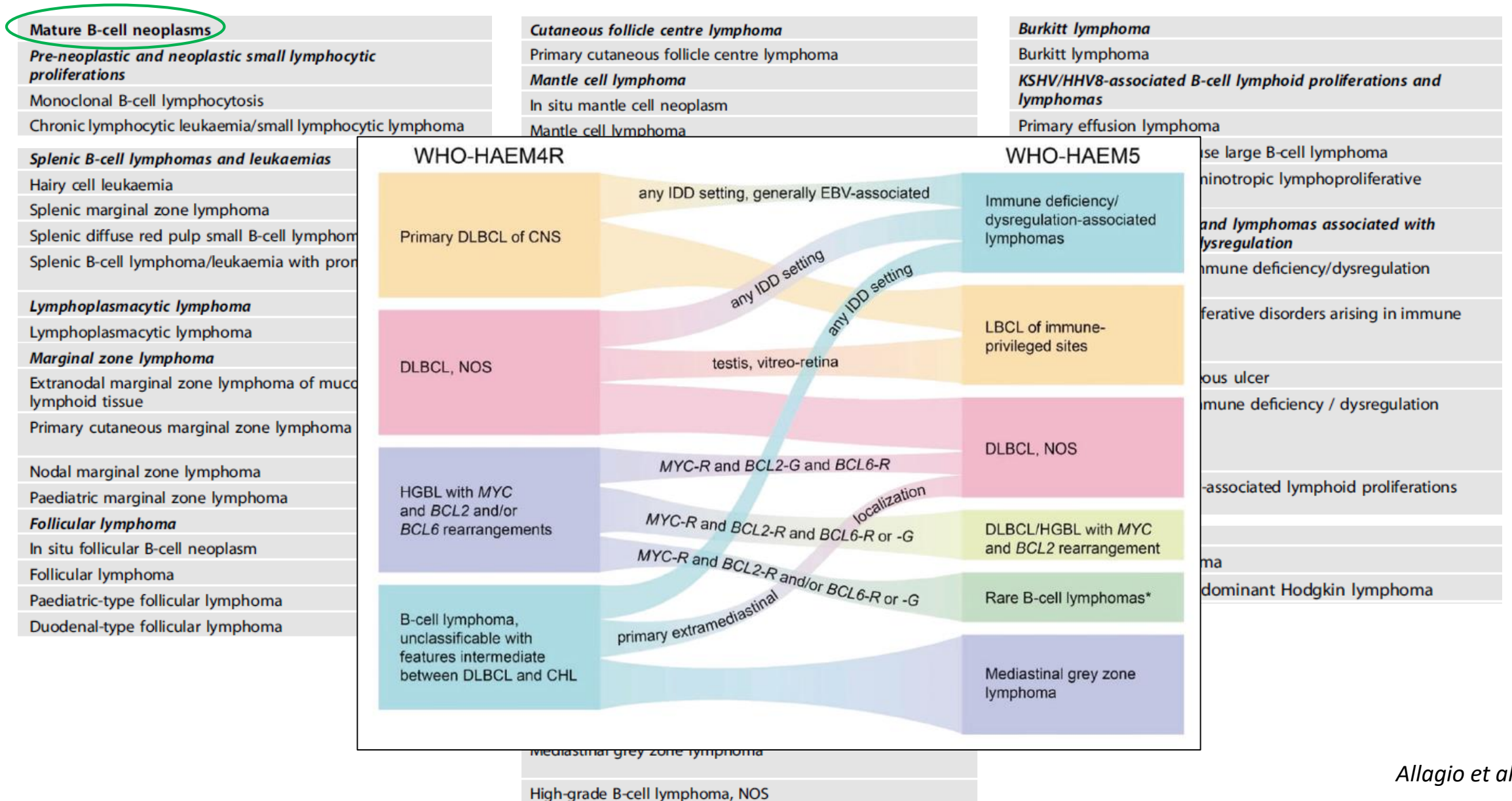
Inborn error of immunity-associated lymphoid proliferations and lymphomas

Hodgkin lymphoma

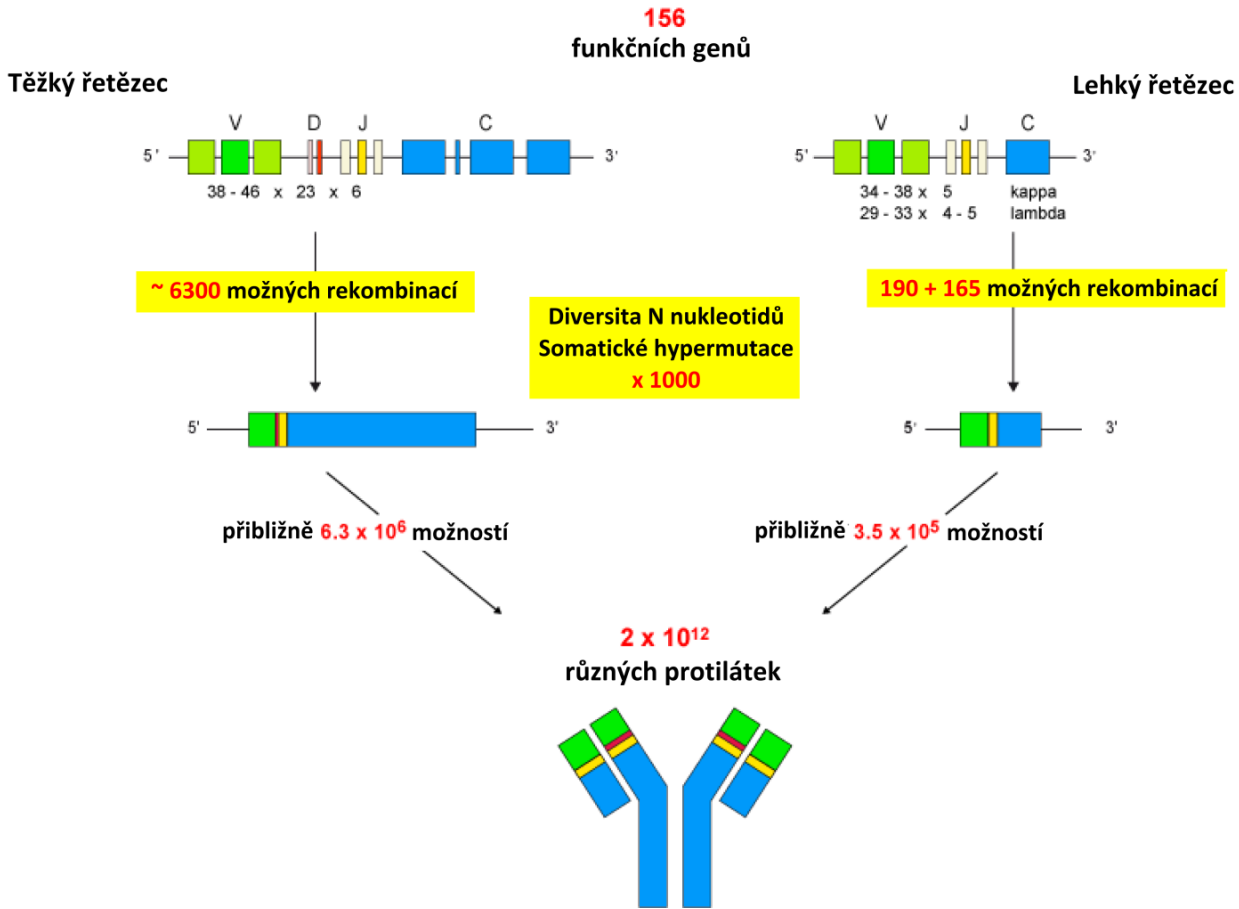
Classic Hodgkin lymphoma

Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma

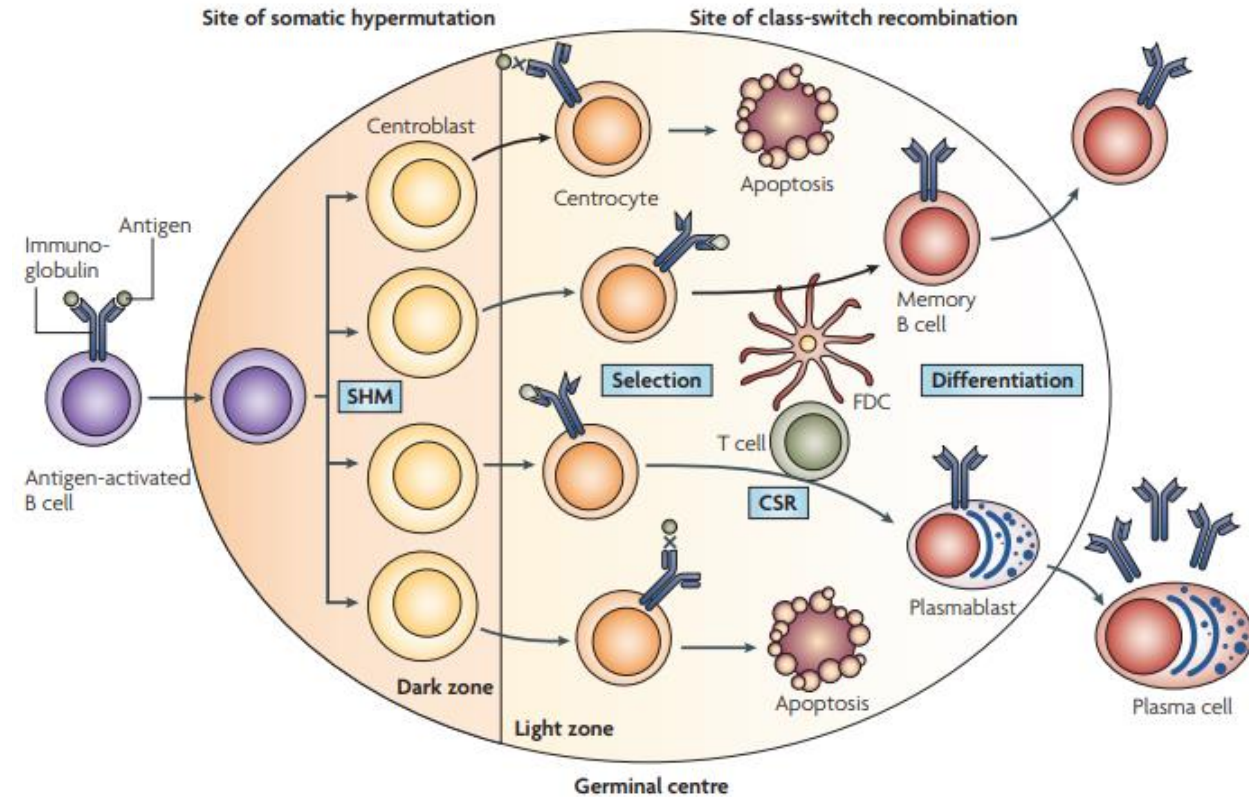
5th WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues (2022)



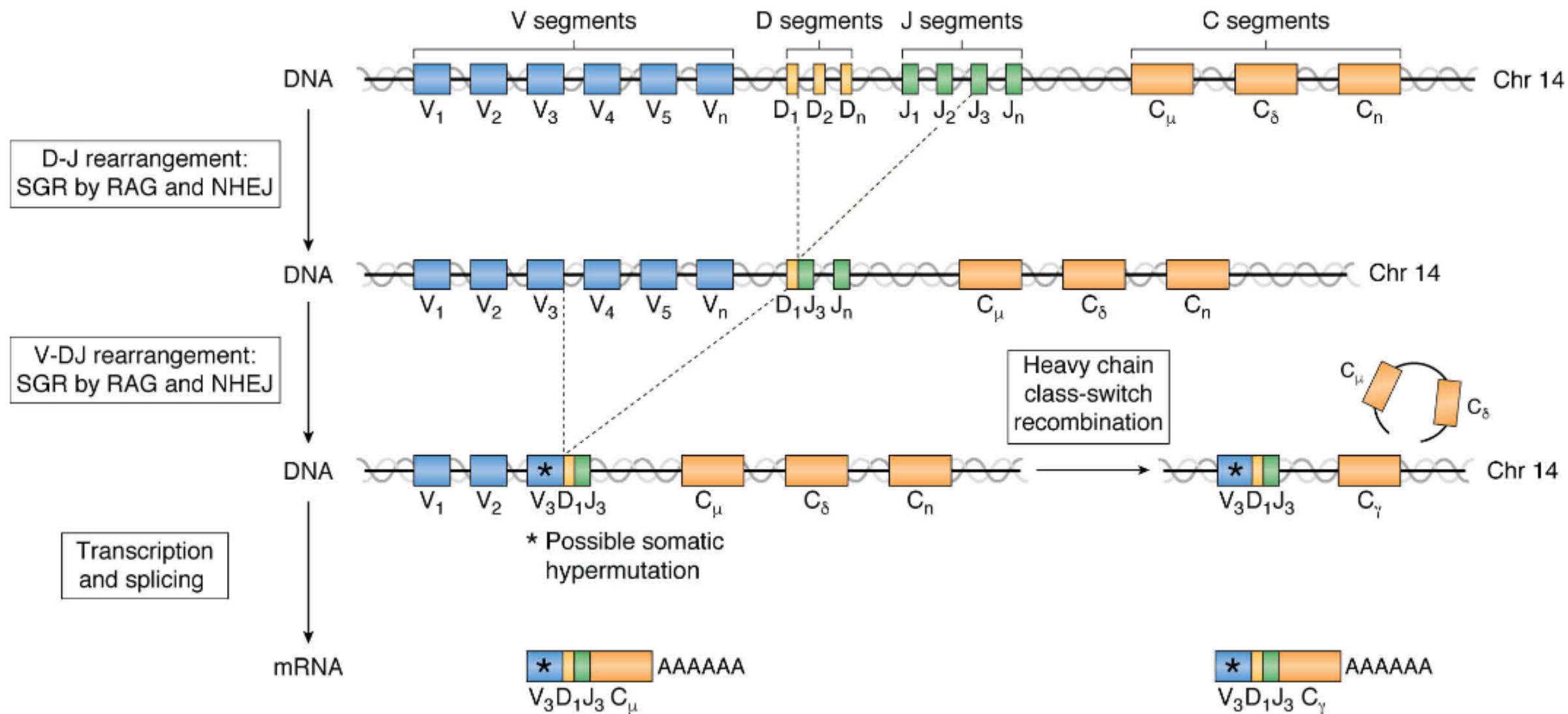
Vznik B buněčného receptoru



B lymfocyty v germinálních centrech



Přestavby IG genů

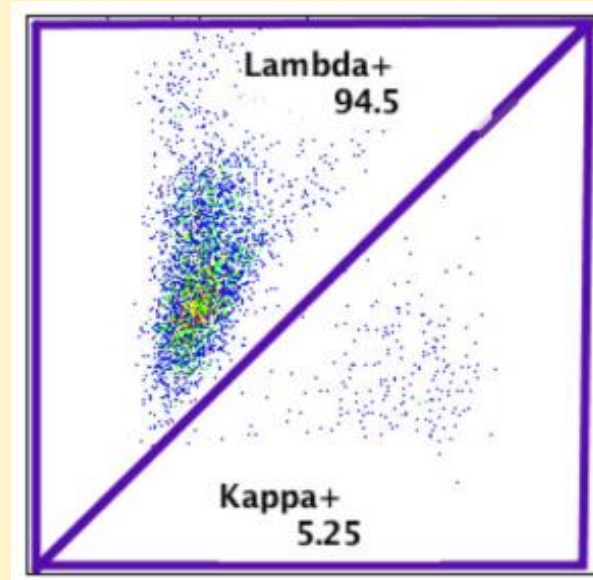


Klonalita IG – základní diagnostické vyšetření

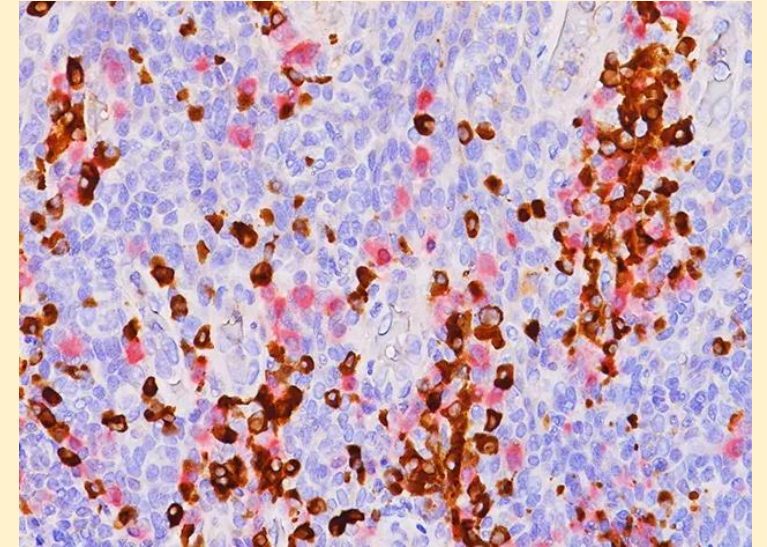
Poměr kappa/lambda

– fyziologicky kolem 2:1

Průtoková cytometrie



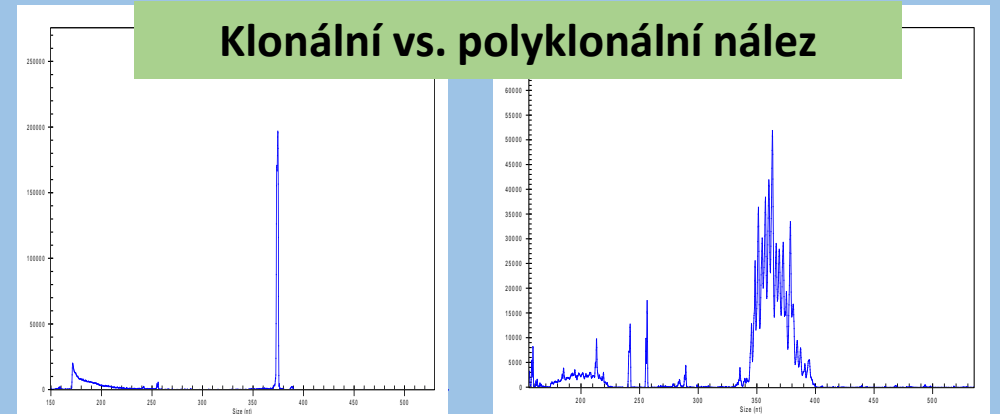
Imunohistochemicky



Identifikace přestavby IG

- zhodnocení klonality lehkých i těžkých řetězců
- sekvenace V-D-J přestavby
- možnost sledování klonu u pacientů po terapii pomocí citlivých metod (qPCR)
- IGH: Stanovení % somatických hypermutací (SHM) u CLL

Klonální vs. polyklonální nález



Klonalita IG – základní diagnostické vyšetření

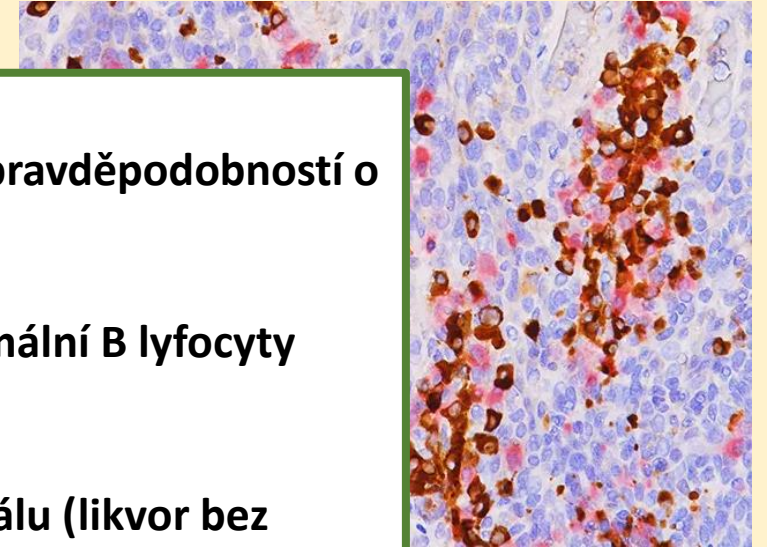
Poměr kappa/lambda

– fyziologicky

Průtoková cytometrie



Imunohistochemicky

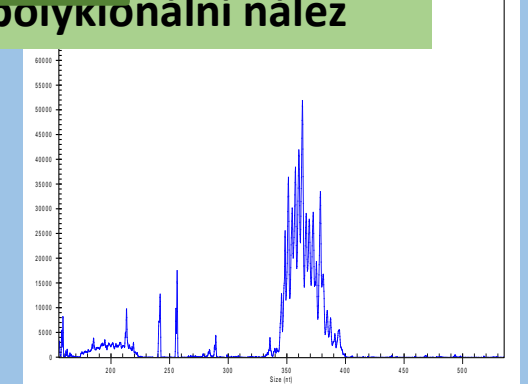
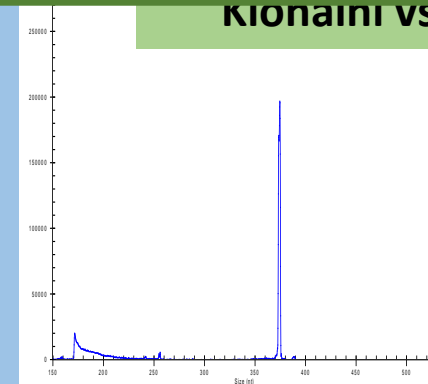


- Pokud je zachycena klonální přestavba, pak jde s velkou pravděpodobností o lymfoproliferativní onemocnění
- Pokud je výsledek vyšetření „polyklonální, pak jde o normální B lyfocyty nebo je špatně zvolený vyšetřovaný materiál
- Pokud není analýza hodnotitelná, bývá problém v materiálu (likvor bez buněk, atp.)

Identifikace přestavby IG

- zhodnocení klonality lehkých i těžkých řetězců
- sekvenace přestavby
- možnost sledování klonu u pacientů po terapii pomocí citlivých metod (qPCR)
- IGH: Stanovení % somatických hypermutací (SHM) u CLL

Klonální vs. polyklonální nálezy



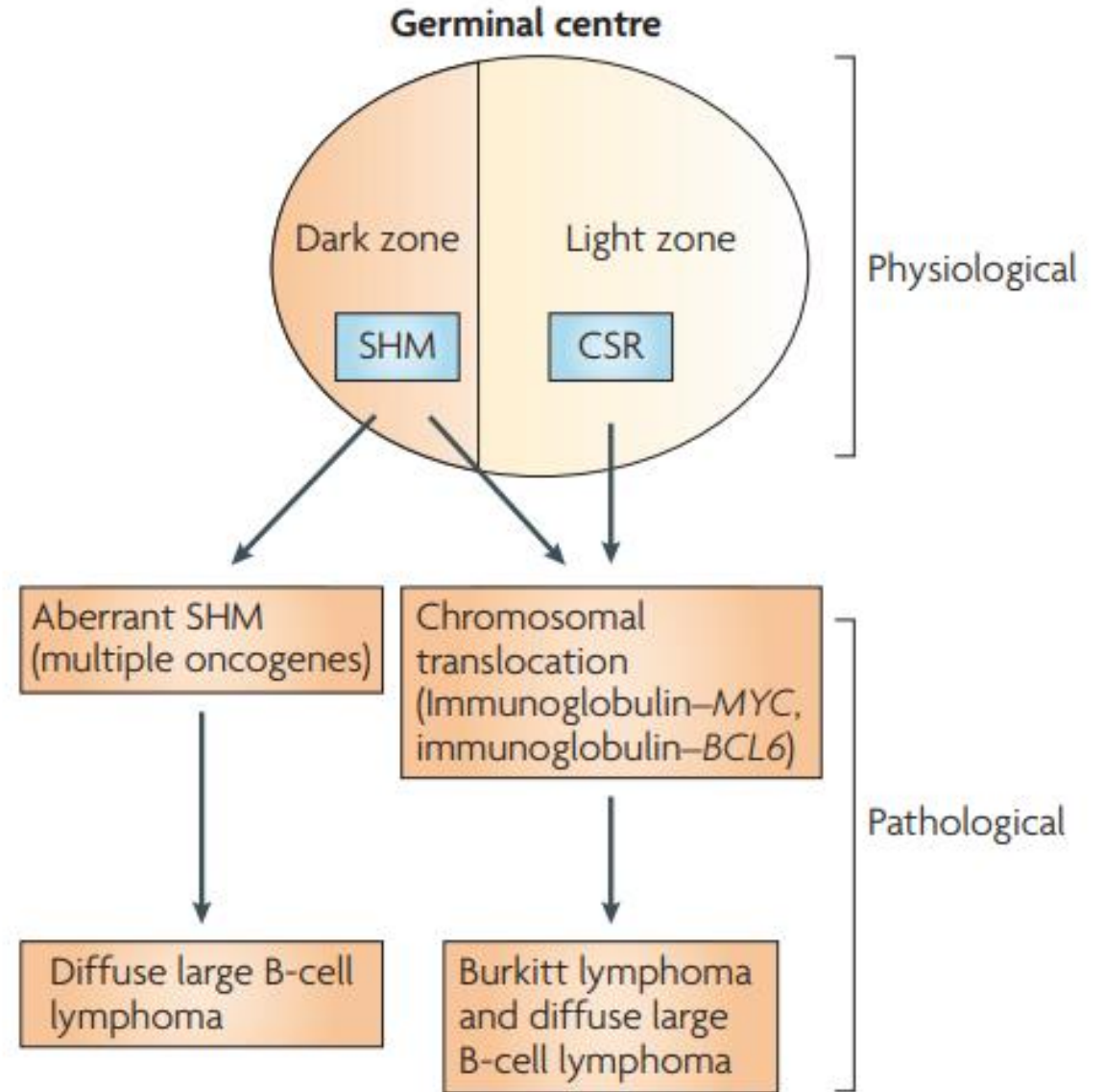
Vznik aberací v lymfocytech

Somatické hypermutace

- Mutace v dalších genech mimo IG

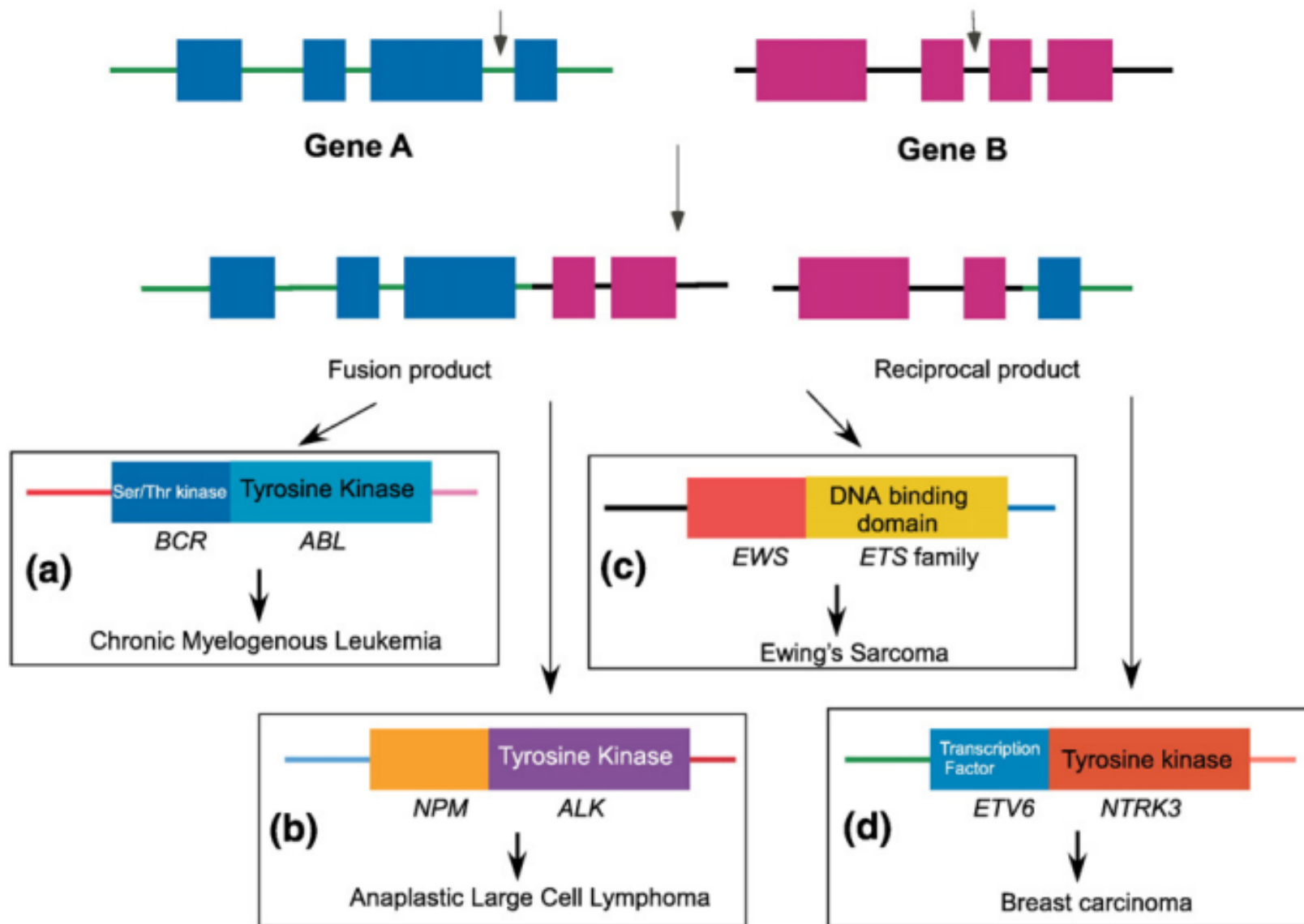
Izotypový přesmyk

- Vznik translokací



Translokace se vznikem fúzního genu

M. Nambiar et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* 1786 (2008) 139–152



FISH

- Detekce pomocí speciálních „break apart“ sond

Detekce transkriptu

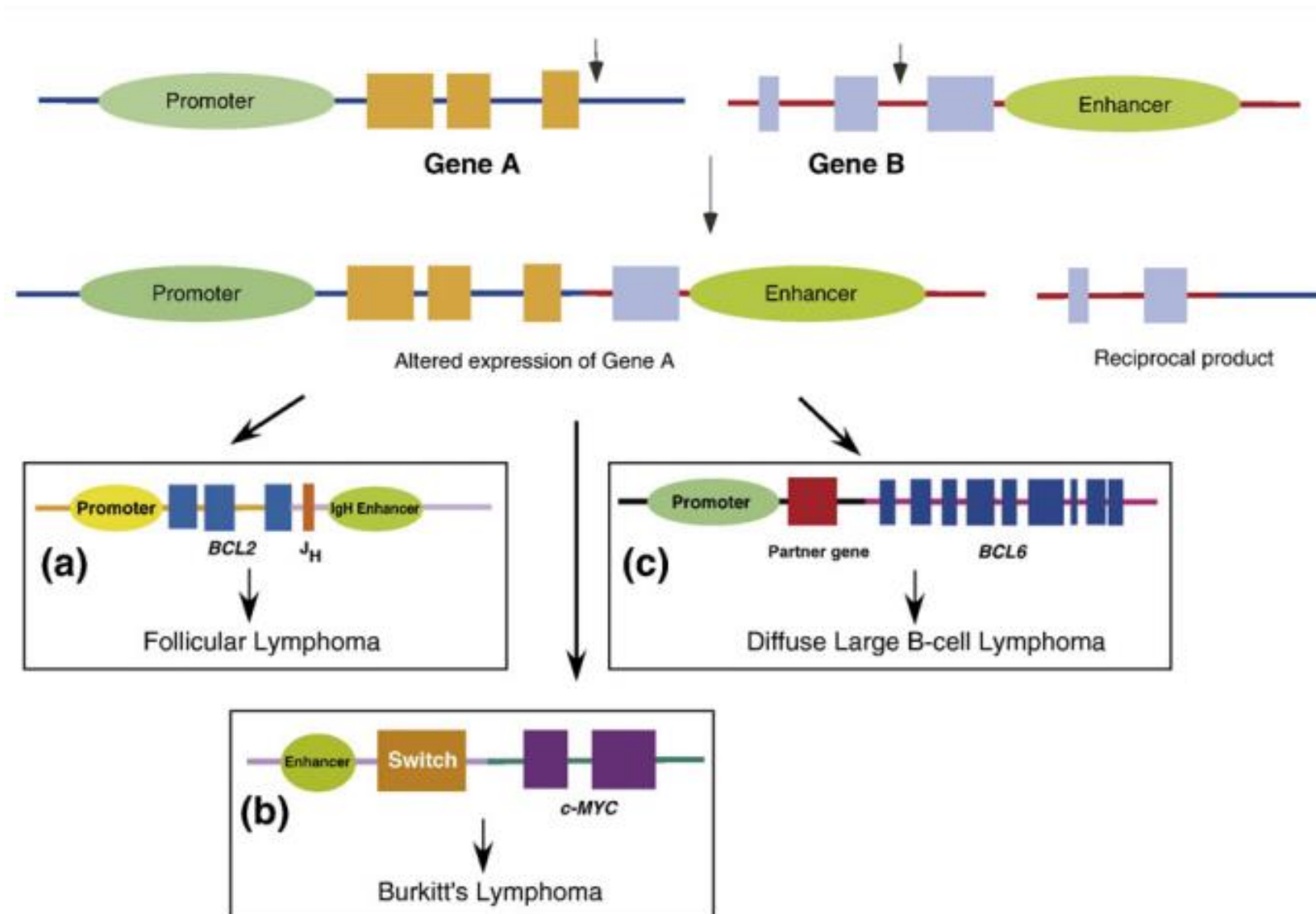
- analýza RNA
- cíl pro sledování MRD

Translokace vedoucí k aberantní genové expresi

FISH

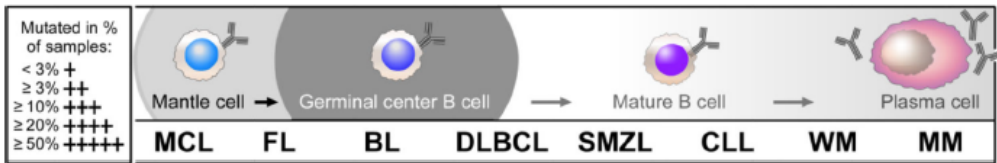
Detekce translokace

- DNA
- Různé varianty PCR
- NGS
- Cíl pro sledování MRD



Detekce translokací t(8;14), t(11;14) a t(14;18)

- Pokud je translokace zachycena, lze ji využít jako cíl pro MRD monitoring
- Pokud je výsledek vyšetření negativní, pak
 - translokace není přítomna
 - translokace je mimo navrženou esej
 - partnerem translokace je IGK/L (až 25 % translokací MYC u BL)
 - je špatně zvolený vyšetřovaný materiál



	MCL	FL	BL	DLBCL	SMZL	CLL	WM	MM
Platform (N)	WGS (4) WES (29) TS (172)	WGS (6) WES (4) TS (100)	WGS (4) WES (63) TS (149) RNAseq (41)	WES (100) RNAseq (80) SNParray (105)	WES (8) TS (109) RNAseq (6)	WGS (4) WES (270) TS (303)	WGS (30) TS (57)	WES (203) WGS (38)
TP53	++++		++++	+++	+++	+++		++
NOTCH1	++		++	++	++	+++		
SF3B1						+++		
ATM	++++					++		++
MYD88			++	+++	++	++	++++	
XPO1					++	++		+
CHD2						++		
POT1						++		
SAMHD1						++		+
FBXW7						++		
BIRC3	++				++	++		
HIST1H1E		+++				++	++++	
LRP1B			++++	++++		++		++
KLHL6		++				+		
DDX3X			++++	+		+		
ITKB					++	+		
EGR2					+	+		
KRAS						+		++++
NRAS						+		++++
MED12						+		
ZMYM3						+		
BCOR						+		
RIPK1						+		
CCND1	++++							++
MLL2	+++			++++	+++			+
WHSC1	+++							+
DCP1D	+++							
TRMP6	+++							
MEF2B	++	+++		++				
NOTCH2	++				++++			
SP140	++							++
CREBBP		++++		++++				
KDM2B		++++		++				
EZH2		++++		+++				
TNFRSF14		++++						
CARD11		+++	++	+++	++			+
TNFAIP3		+++		+++	++			
STAT6		+++						
EBF1		+++						
CD79B		++		++				
MYC			++++	++				++
ID3			++++					
MLL3			++++	++++				++
SMARCA4			++++	+++				
CCND3			+++	++				
GNA13			+++	++				
EP300			++	+++	++			
PIM1			++	+++				+
ARID1A				+++	++		+++	+
PRDM1				+++				++
BCL2				+++				
TBL1XR1					+++			
FAM46C								+++
DIS3								+++
References	61	62	63, 64, 65	63, 65, 66	67	8, 11, 13, 15	17	68, 69

Rekurentně mutované geny u nejčastějších lymfoproliferací

- MCL – mantle cell lymphoma
- FL – follicular lymphoma
- BL - Burkitt lymphoma
- DLBCL – diffuse large B cell lymphoma
- SMZL – splenic marginal zone lymphoma
- CLL – chronic lymphocytic leukemia
- WM – Waldenström macroglobulinemia
- MM – multiple myeloma

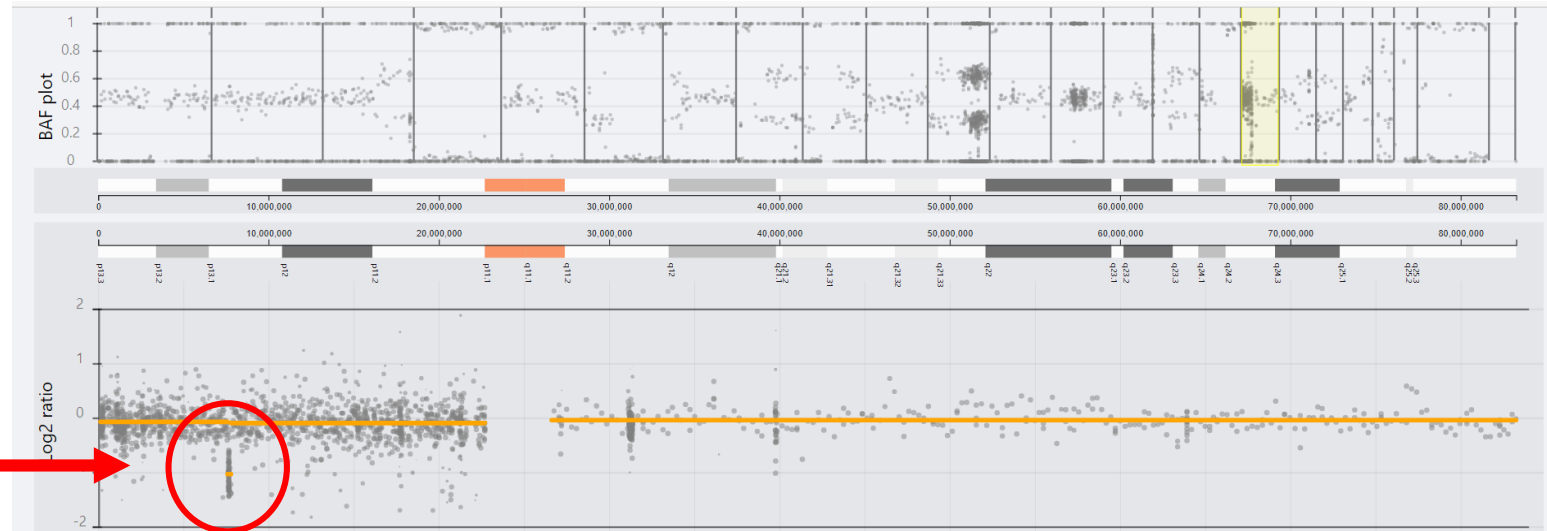
Mutace v genu *TP53*

- **Negativní prognostický a prediktivní marker**
- **Citlivost eseje závisí na metodě a frakci nádorových buněk ve vzorku**
- **Pokud je výsledek vyšetření negativní, pak**
 - **mutace není přítomna**
 - **mutace není přítomna nad limit metody (minoritní mutace)**
 - **je špatně zvolený vyšetřovaný materiál**
- **Na vyšetření *TP53* a na některé další geny rutinně separujeme nádorovou frakci – částečně nebo plně**

Bialecká inaktivace *TP53*

***TP53* c.833C>G p.Pro278Arg VAF 94 %**

Detail delece genu *TP53*
na chr. 17



Problém na druhé alele

- Pomocí sekvenování lze odhadnout (VAF > 50 %)
 - delece druhé alely – FISH ověří
 - monosomie – FISH ověří
 - cnLOH (ztráta heterozygotnosti) – SNP analýza

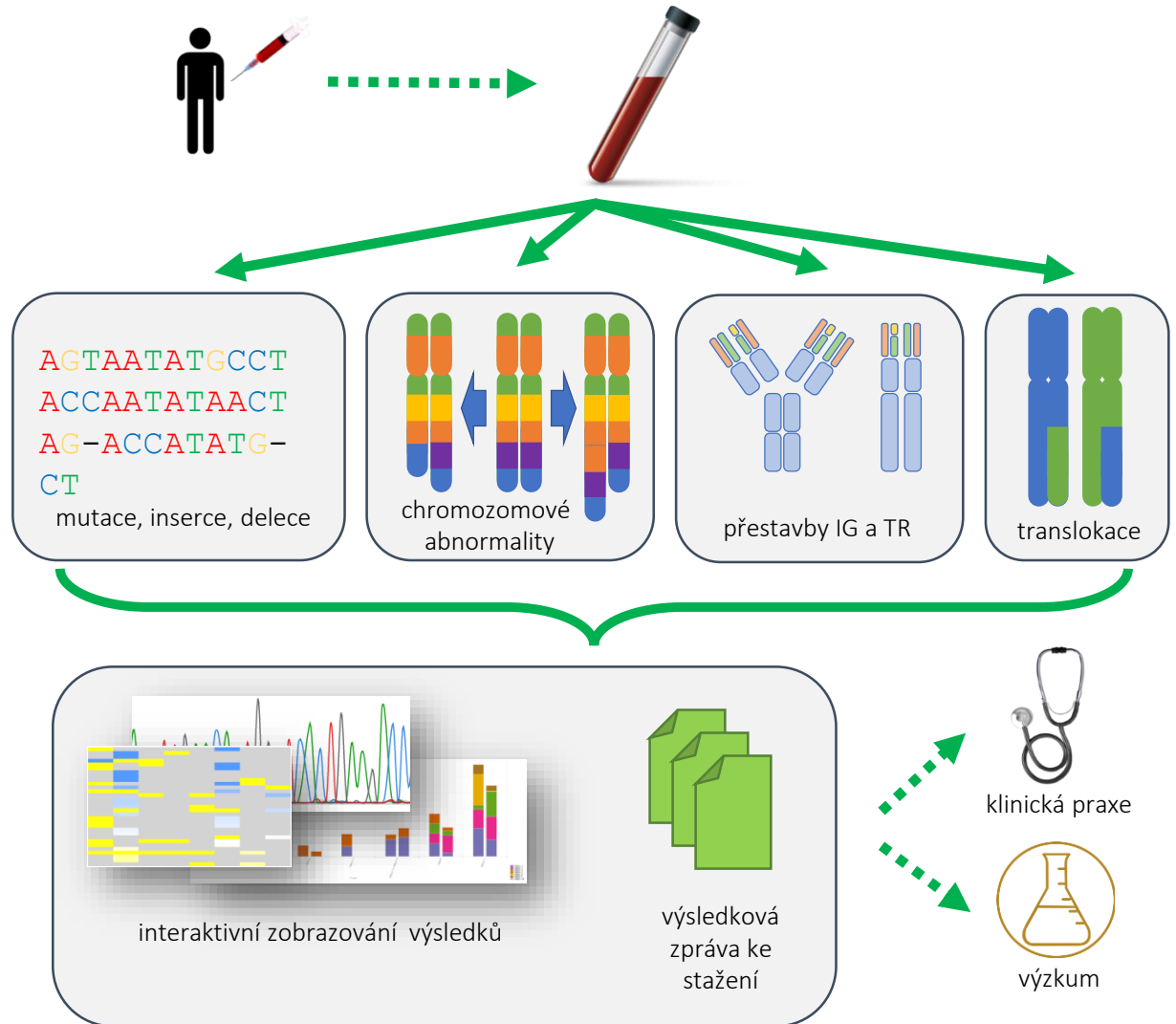


PANEL LYNX (Lymfoidní NGS panel)

- komplexní analýza markerů lymfoidních malignit
- detekce mutací, chromozomových abnormalit, klonality IG a TCR, a vybraných translokací
- citlivá analýza v jediném experimentu
- jednoduché zpracování dat pomocí webového softwaru
- interaktivní analýza a zobrazování výsledků
- kompletní informace o prognóze pacienta



Podpořeno z programového projektu TACR ZETA TJ02000133.



Nalezené aberace reportujeme podle guidelines

Výsledek vyšetření:

1. V testovaných genech BYLY NALEZENY tyto varianty:

Gen	Klasifikace varianty	Nukleotidová záměna	Aminokyselinová záměna	VAF *
BCL2	varianta s prokázaným klinickým významem	ENST00000333681.5:c.23G>A	ENSP00000329623.3:p.Gly8Glu	14,3 %
BCL2	varianta s prokázaným klinickým významem	ENST00000333681.5:c.256C>G	ENSP00000329623.3:p.Leu86Val	15,8 %
BCL2	varianta s prokázaným klinickým významem	ENST00000333681.5:c.39G>C	ENSP00000329	
KMT2D	varianta s potenciálním klinickým významem	ENST00000301067.11:c.3067C>T	ENSP00000301	
ARID1A	varianta s potenciálním klinickým významem	ENST00000324856.13:c.3634C>T	ENSP00000320	
CREBBP	varianta s potenciálním klinickým významem	ENST00000262367.9:c.4444T>A	ENSP00000262	
EP300	varianta s potenciálním klinickým významem	ENST00000263253.9:c.4230G>T	ENSP00000263	

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 19, No. 1, January 2017



SPECIAL ARTICLE

Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer



A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists

Marilyn M. Li,⁺¹ Michael Datto,^{+†} Eric J. Duncavage,^{+§} Shashikant Kulkarni,^{+¶} Neal I. Lindeman,^{+||} Somak Roy,^{+***} Apostolia M. Tsimberidou,^{+||} Cindy L. Vnencak-Jones,^{+††} Dayna J. Wolff,^{+§§} Anas Younes,^{+¶¶} and Marina N. Nikiforova^{+***}

Tier I: Variants of Strong Clinical Significance

Therapeutic, prognostic & diagnostic

Level A Evidence

FDA-approved therapy
Included in professional guidelines

Level B Evidence

Well-powered studies with consensus from experts in the field

Tier II: Variants of Potential Clinical Significance

Therapeutic, prognostic & diagnostic

Level C Evidence

FDA-approved therapies for different tumor types or investigational therapies

Multiple small published studies with some consensus

Level D Evidence

Preclinical trials or a few case reports without consensus

Tier III: Variants of Unknown Clinical Significance

Not observed at a significant allele frequency in the general or specific subpopulation databases, or pan-cancer or tumor-specific variant databases

No convincing published evidence of cancer association

Tier IV: Benign or Likely Benign Variants

Observed at significant allele frequency in the general or specific subpopulation databases

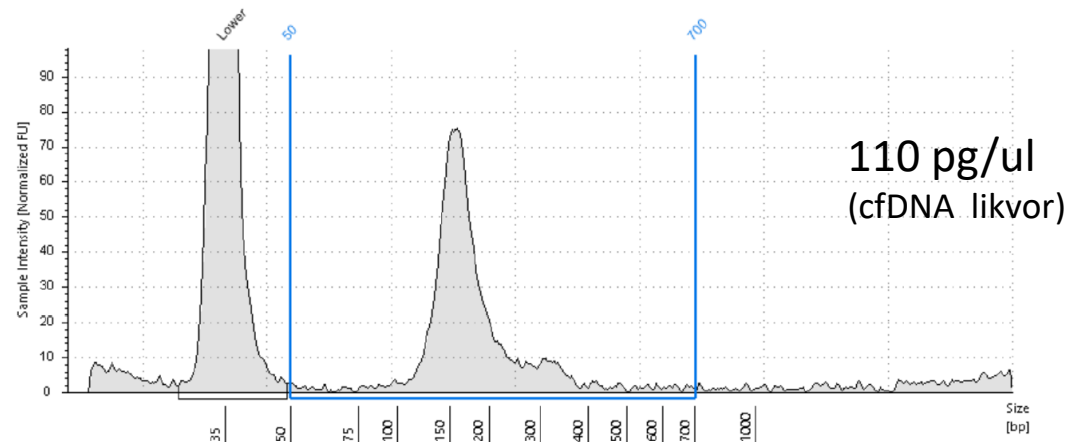
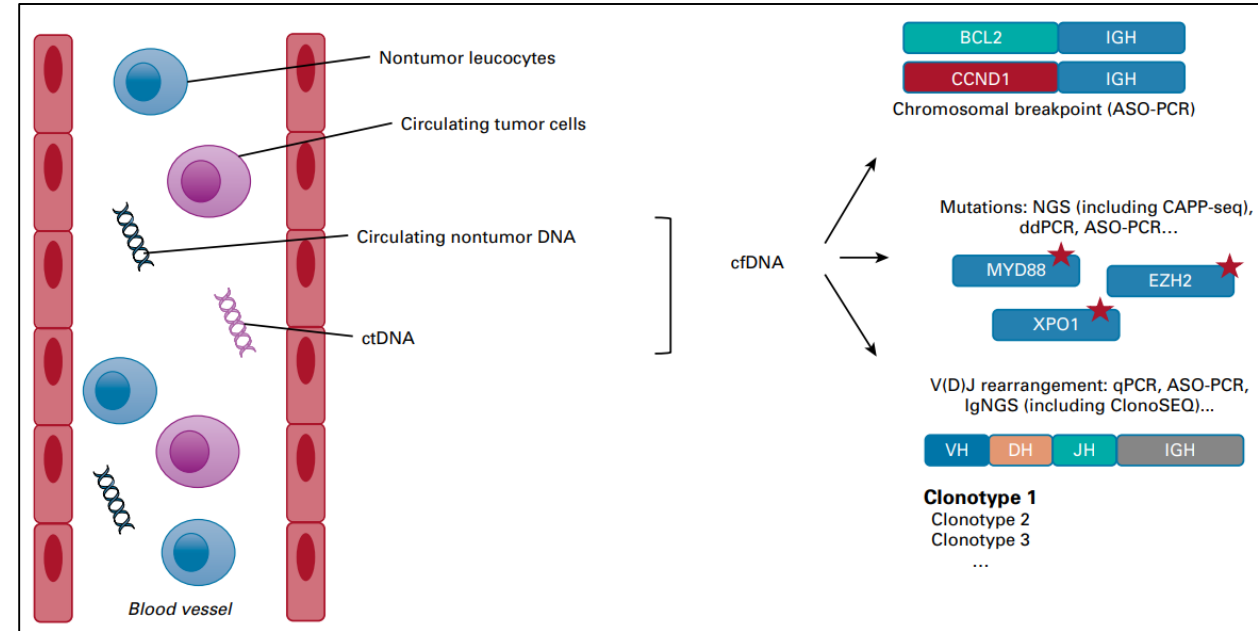
No existing published evidence of cancer association

Detekce aberací z volné DNA

- primární CNS
- obtížně bioprovatelný lymfom, progresse do CNS
- volná mimobuněčná DNA
 - uvolňuje se z buněk podstupujících apoptózu, nekrózu
 - ve všech tělních tekutinách – plazma, likvor, moč, sliny
 - fragmentovaná – cca 170bp
 - **polčas rozpadu < 2,5 hod**
 - u zdravých lidí v malém množství (1 -10ng/ml plazmy)

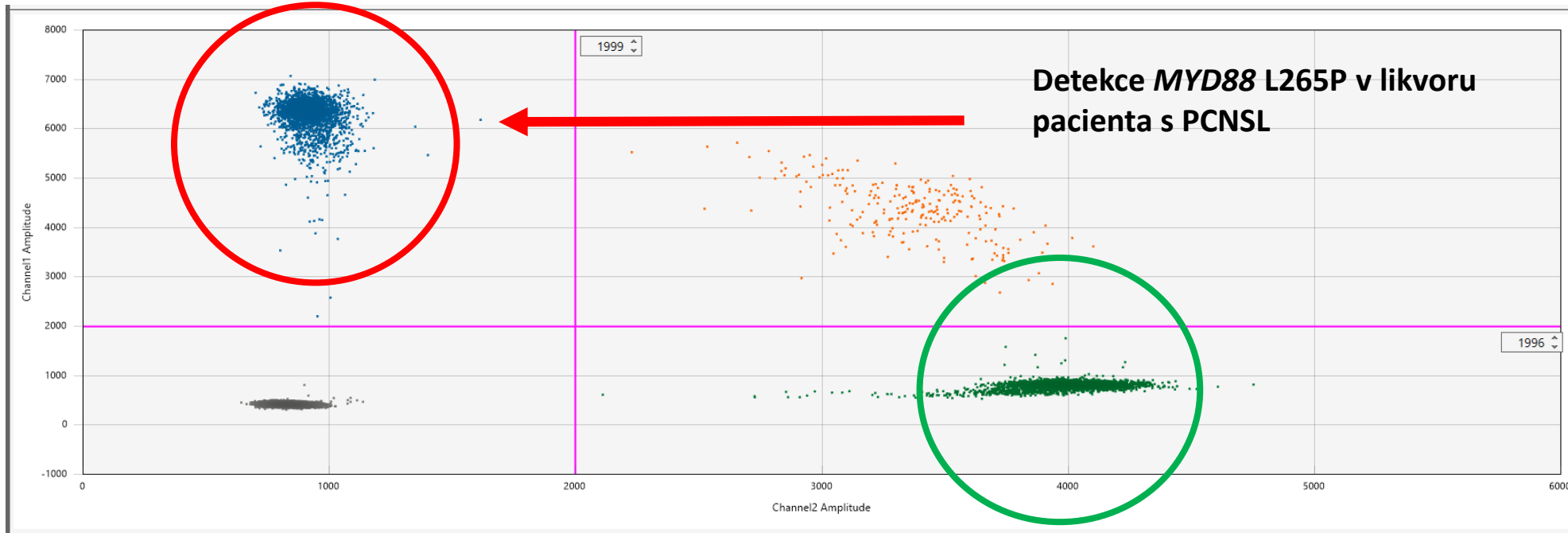
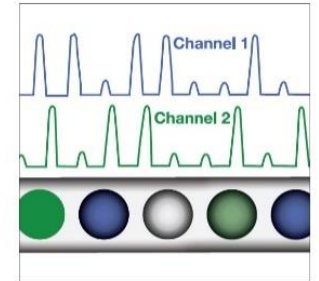
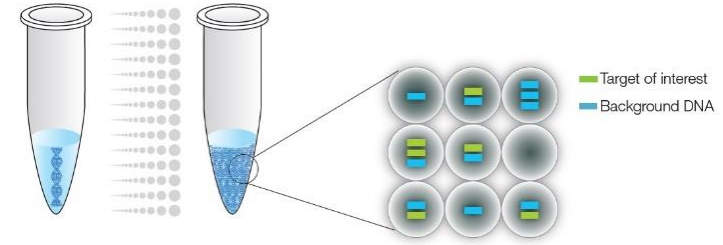
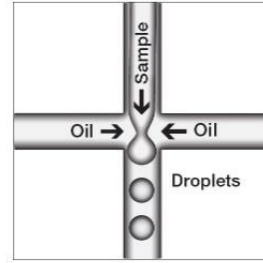


- Izolace volné DNA z plazmy nebo likvoru
- komplexní obraz o nádoru v těle
 - souhrnný obraz z více ložisek



Droplet digital PCR

- sledování tzv. hot spot variant, citlivost až $1 \cdot 10^{-5}$
- *MYD88* L265P u WM – vzorky s nízkou infiltrací
- *MYD88* L265P u primárních lymfomů CNS v likvoru (přítomna až u 80 % pts)
- sledování potvrzených rekurentních hotspot v plazmě (*BRAF*, *KRAS*, *NRAS*,..)



Detekce *MYD88* L265P v likvoru pacienta s PCNSL

NGS panel - DNA z KD a volná DNA z plazmy a likvoru

Pacient s agresivním lymfomem

- muž, ročník 55, dg v 2021, 66 let
- leukemizovaný lymfom DLBCL/BL/HGBL, masivní ložiska v mesenteriu, po terapii regrese
- biopsie nebyla možná pro špatný stav
- vyšetření dřeně cytogeneticky: komplexní karyotyp, t(8;22) a t(14;18)
- časná progresse do CNS

Biologický materiál				Záchyt	Progrese do CNS	
				kostní dřeň (DNA)	likvor (cfDNA)	plazma (cfDNA)
Mutace	Gen	HGVSc	HGVSp	Frekvence (%)	Frekvence (%)	Frekvence (%)
	<i>KMT2D</i>	c.8936_8937del	p.Leu2979ArgfsTer10	21.7	32.7	ND
	<i>BTG1</i>	c.428T>A	p.Val143Glu	34.5	48.5	ND
	<i>CREBBP</i>	c.2177_2184del	p.Pro726LeufsTer103	23.2	45.8	ND
	<i>BCL2</i>	c.392C>T	p.Ala131Val	27.3	36.1	ND
	<i>ASXL1</i>	c.1534C>T	p.Gln512Ter	6.3	3.6	32.1
	<i>EP300</i>	c.3610T>G	p.Cys1204Gly	33	47.3	ND
Translokace	Gene partners	koordináta	koordináta partnera	Frekvence (%)	Frekvence (%)	Frekvence (%)
	IGH/ <i>BCL2</i>	14:105,863,241	18:63,120,802	63	100	ND
CNAs	Lokalizace na genomu (hg38)	Typ	Dotčené geny (LYNX)	Frekvence (%)	Frekvence (%)	Frekvence (%)
	chr2:58183800-68149300	zisk	<i>XPO1</i>	70	100	ND
	chr8:4617400-145005800	zisk	<i>PAG1, UBR5, MYC</i>	70	80	ND
	chr12:38525800-73670100	zisk	<i>KMT2D, STAT6</i>	80	90	ND
	chr1:0-49650114	CN-LOH	<i>TNFRSF14, ID3</i>	70	100	ND
	chr9:21726012-22249845	biallelická ztráta	<i>CDKN2A, CDKN2B</i>	80	100	ND
	chr13:47033917-48010829	ztráta	-	30	80	ND
IG přestavby	Lokus	V gen	J gen	Frekvence (%)	Frekvence (%)	Frekvence (%)
	IGK	IGKV2-26	-	97	91	ND
	IgL	IgLV3-22	IgLJ3	72	46	ND

CN-LOH - copy-neutral loss of heterozygosity; ND - nedetekováno

Přehled vyšetření u lymfoproliferací

Stanovení klonality IG/TR

- abnormální kumulace lymfocytů nesoucích jednu konkrétní přestavbu

Identifikace přestavby IG/TR

- možnost sledování klonu u pacientů po terapii pomocí citlivých metod

Detekce translokací a fúzních genů

- lymfomy: MCL t(11;14), FL t(14;18), BL t(8;14)
- sledování zbytkové choroby

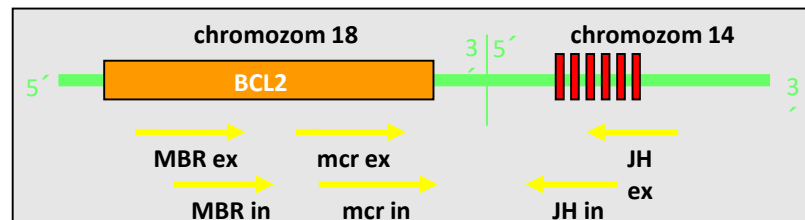
Analýza rekurentně mutovaných genů

- *TP53* – negativní prognostický a prediktivní marker
- *MYD88* – primární CNS lymfomy, WM, MZL

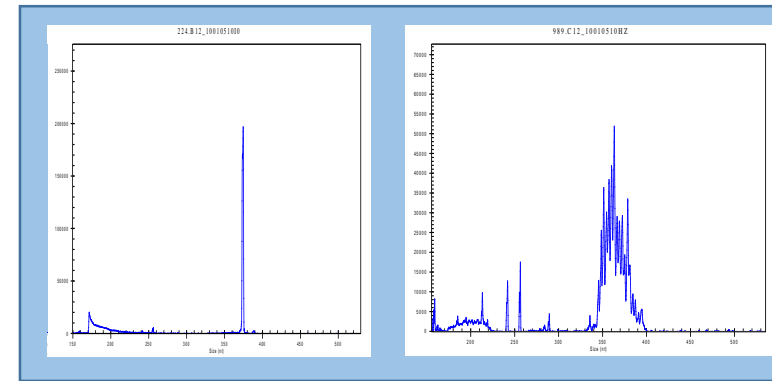
Komplexní analýza pomocí NGS panelu

- diagnóza, prognóza

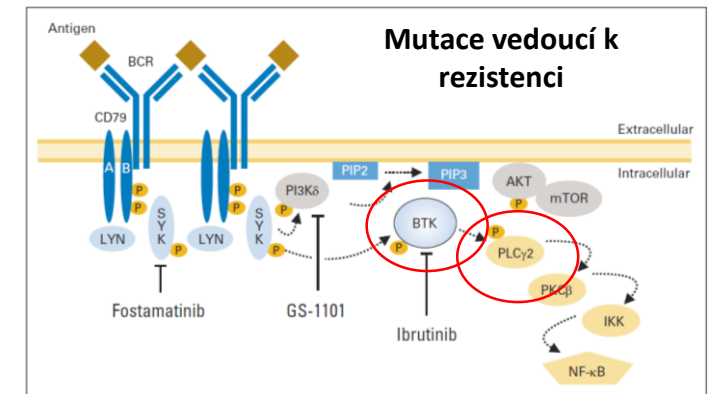
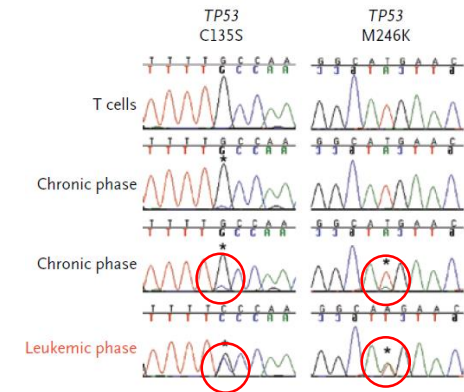
Detekce translokace t(14;18)(q32;q21) u FL



Klonální vs. polyklonální nálezy



Mutace v genu TP53



Sledování zbytkové choroby (MRD) v terapii



Personalizovaná medicína u lymfoproliferací v praxi

Diagnostika integrující

- propojování informací z hematologie, průtokové cytometrie, patologie, cytogenetiky a genetiky

Diagnostika šitá na míru

- výběr relevantních markerů a metod jejich detekce

Identifikace privátních aberací jedinečných pro daného pacienta

- přestavba IG/TR
- sledování zbytkové choroby

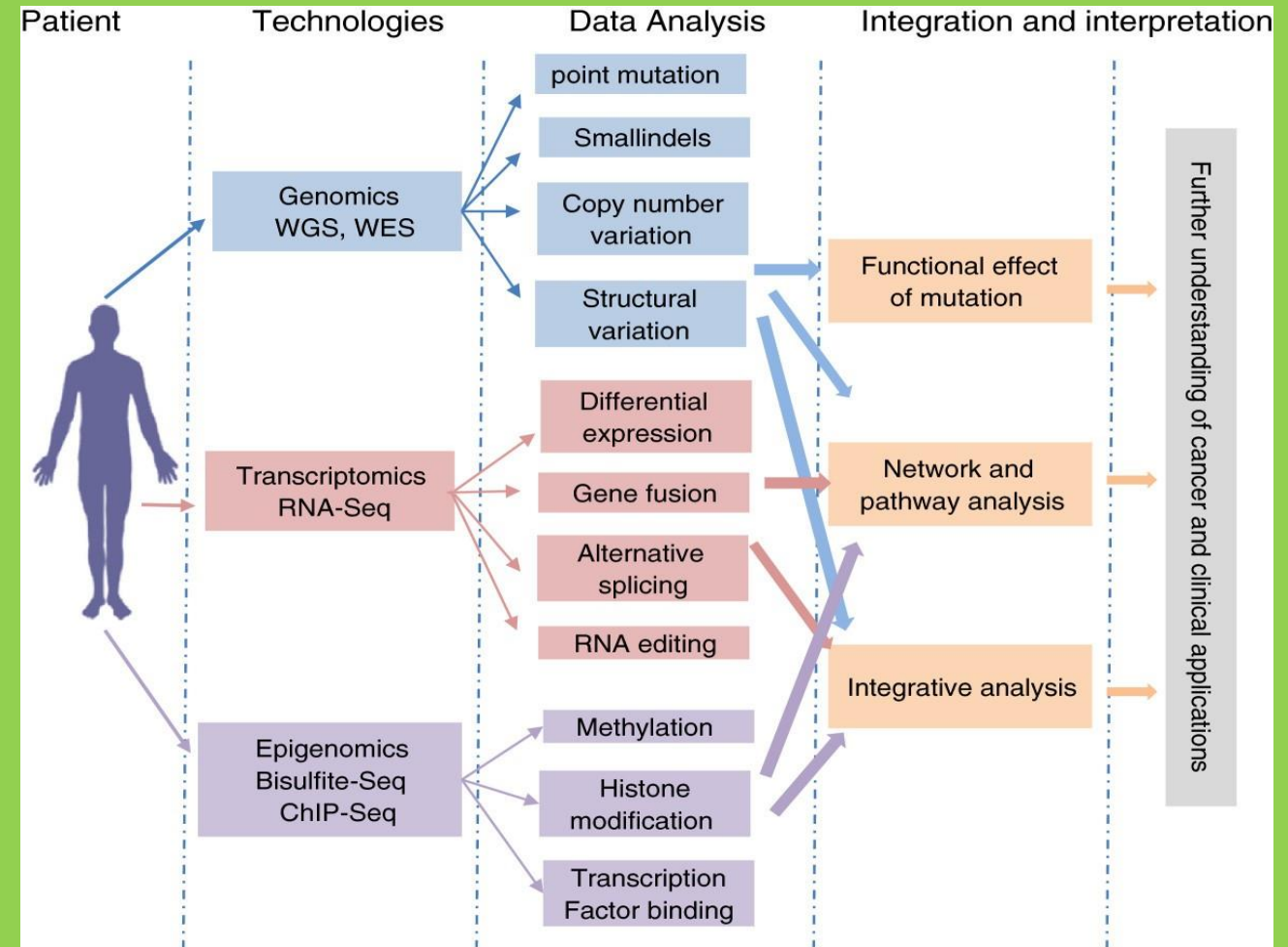
Zpracování biologického materiálu podle potřeb vyšetření

- separace nádorových buněk
- paralelní vyšetření různých materiálů

Cílem detailní a personalizované diagnostiky

- přesná klasifikace
- stanovení prognózy
- volba léčebné strategie
- sledování odpovědi na léčbu
- prevence relapsu

Snad už brzy.....



Děkuji za pozornost