

How to improve diagnostics in idiopathic cytopenia by using a targeted NGS gene panel

Yannick Wouters

Promotor: Dr. Helena Devos

Myelodysplastisch syndroom (MDS)

- **Prevalentie en definitie**

- 75 nieuwe diagnoses per 100.000 personen (>65 jaar)
- Gemiddelde leeftijd 70 jaar

- **Falen van het beenmerg om normale hematopoëse te voorzien**

- Ontstaan van **cytopenie**
- **Progressie** over tijd
- **Dood** als gevolg

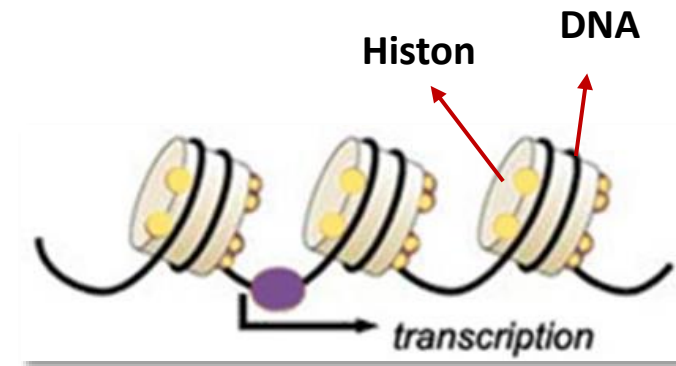
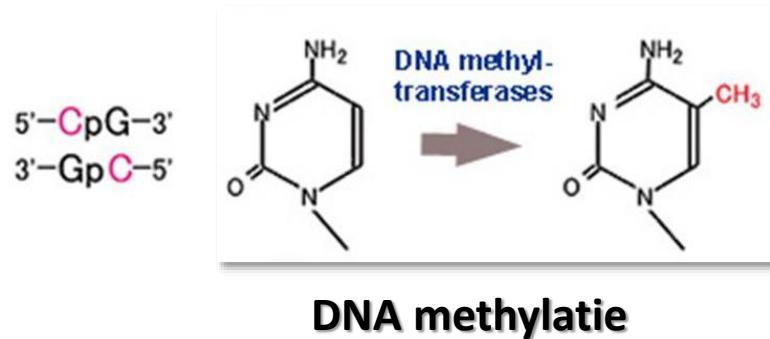


- Cytopenie in **minstens één** cellijn
- Dysplasie in **minstens één** cellijn
- **Exclusie andere oorzaak**
- **Cytogenetische afwijking:**
del 5q, del 11q, del 12p, ...

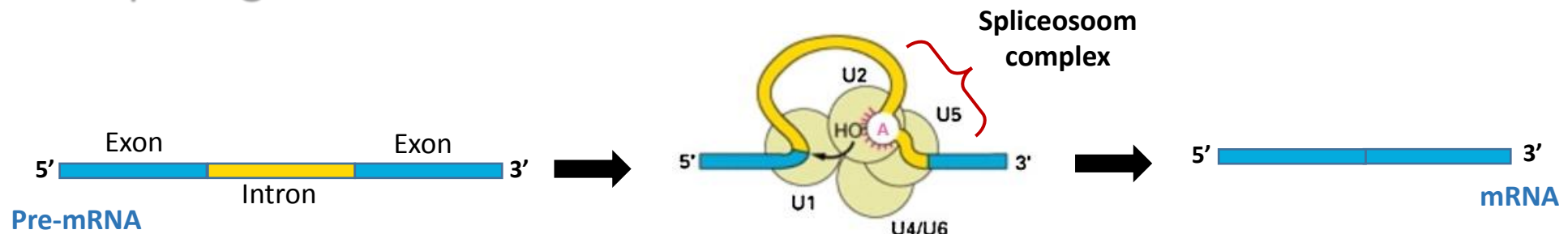
Myelodysplastisch syndroom (MDS)

- Somatische mutaties bij MDS

- Epigenetische regulatie (TET2/DNMT3A/IDH1/IDH2) & (ASXL1/EZH2)



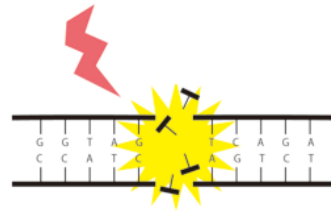
- RNA splicing (SF3B1/U2AF1/SRSF2/ZRSR2)



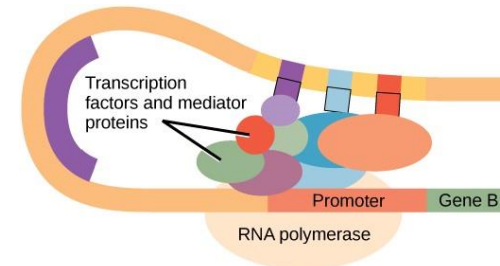
Myelodysplastisch syndroom (MDS)

- Somatische mutaties bij MDS

- DNA herstel (**TP53**)

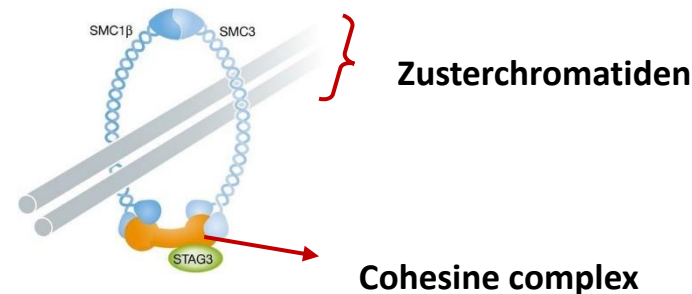
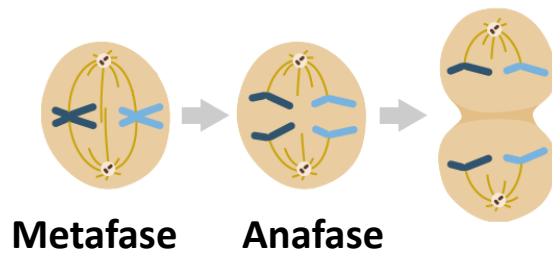


- Transcriptie factoren (**RUNX1/BCOR/ETV6**)

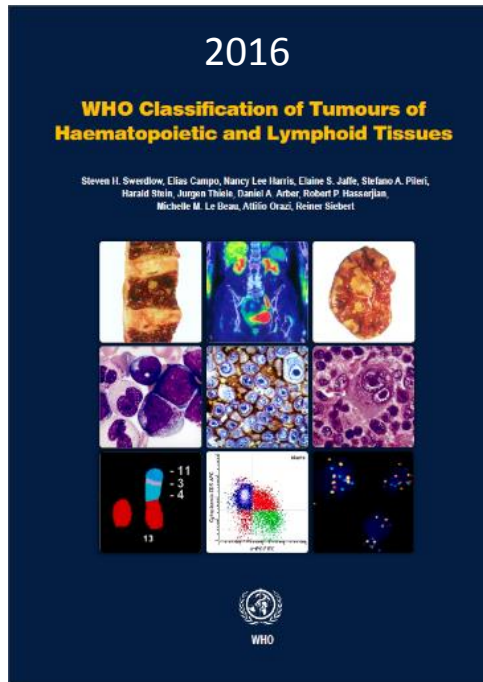


- Signaal transductiefactoren (**CBL/JAK2/NF1/NRAS/KRAS**)

- Cohesine complex (**STAG2**)



Myelodysplastisch syndroom (MDS)



- Cytopenie in minstens één cellijn
 - ~~Dysplasie in minstens één cellijn~~
 - Exclusie secundaire oorzaak
- Cytogenetische afwijking:
del 5q, del 11q, del 12p, ...

Myelodysplastisch syndroom
MDS



*Idiopathic cytopenia of undetermined
significance*
ICUS



+ somatische mutatie

*Clonal cytopenia of undetermined
significance*
CCUS

Mutatieanalyse in het AZ Sint-Jan

- **Next-generation sequencing met Illumina® MiSeq analyser**

- Generead DNaseq custom panel (19 genen)

ASXL1, CALR, CSF3R, DNMT3A, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, MPL, NPM1, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1, WT1

- **Inclusiecriteria**

- ≤ 75 jaar
 - Cytopenie in **minstens 1** cellijn
- $\left\{ \begin{array}{l} \text{Hb} < 10\text{g/dL} \\ \text{PLT} < 100 \cdot 10^9/\text{L} \\ \text{ANC} < 1,8 \cdot 10^9/\text{L} \end{array} \right.$



Vraag 1: Klinische **betekenis** somatische mutaties bij ICUS?
Vraag 2: Aanpassing van **screeningsprotocol** vereist?

Clonale hematopoëse

- **Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS)**
 - Somatische mutatie bij **28-62%**
 - Epigenetische regulatie (ASXL1, TET2, DNMT3A)
 - Spliceosoom complex (SRSF2)
 - (DNA herstel & transcriptionele regulatie)
 - # mutaties per patiënt: **1-2**
 - Gemiddelde **VAF van 25-62%**

Artikel	Type studie	# patiënten	VAF cut-off	# genen	# CCUS	Gemiddelde VAF
Malcovati et al. (Blood 2017)	Prospectief	435 (209 MDS/ 154 ICUS/72 andere)	2%	40	36%	34%
Hansen et al. (Am J Hematol 2016)	Retrospectief	60 (60 ICUS)	2-5% 5%	20	62% 52%	33% 52%
Kwok et al. (Blood 2015)	Prospectief	144 (24 MDS/120 ICUS)	5%	22	28%	25-32%
	Retrospectief	340 (91 MDS/249 ICUS)	5%	22	38%	GG
Cargo et al. (Blood 2015)	Retrospectief (prediagnose MDS/AML)	69 (69 ICUS)	2%	26	91%	40%

Clonale hematopoëse

- **Mutatiepatronen binnen de MDS groep**
 - **Mutuele exclusiviteit**
 - RNA spliceosoom mutaties
 - Mutaties signaal transductie
 - TET2 met IDH1 of IDH2
 - **SF3B1** mutatie **zeldzaam co-gemuteerd** (zz. DNMT3A en JAK2)
- **Prognostisch belang van somatische mutaties bij MDS**
 - Prognostisch ongunstig: (ASXL1), **EZH2, NRAS, RUNX1 en TP53**
 - Prognostisch gunstig: **SF3B1**

IPSS-R
onafhankelijk

Clonale hematopoëse

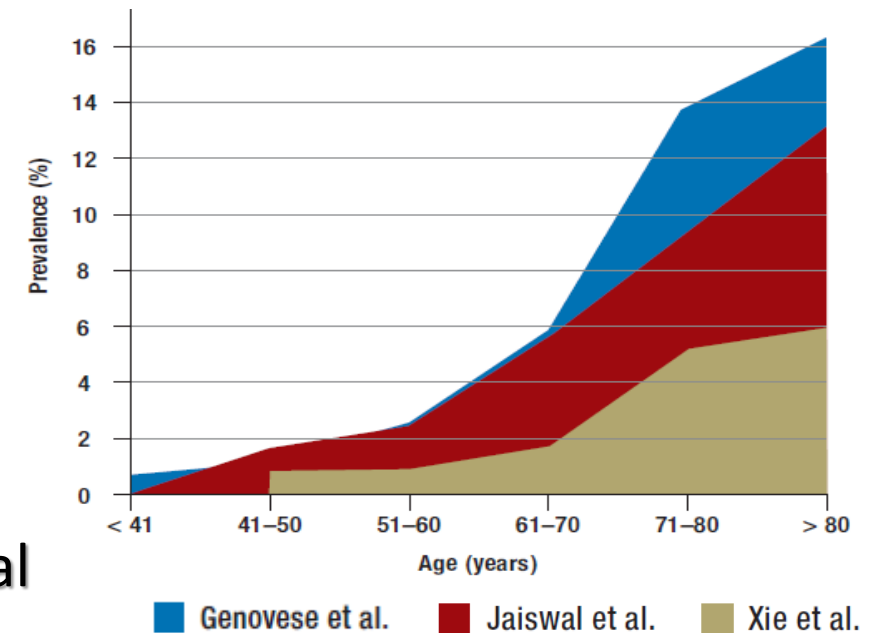
- **Somatische mutaties niet-MDS specifiek**

- ASXL1, BCOR, EZH2, NRAS, SRSF2, ZRSR2 en TET2 ➡ **CMML**
- JAK2, CALR, MPL ➡ **MPN**
- TP53 ➡ **andere maligniteiten**

- **Mutaties gezonde volwassenen**

- Variant allele frequentie (VAF) – 2 à 5%
- Betrokken genen
 - DNMT3A, TET2
 - ASXL1
- Clonal hematopoiesis of indeterminate potential

} **Epigenetische
regulatie**



Clonale hematopoëse

- Definitie **CHIP**, **ICUS**, **CCUS** en **MDS**

	CHIP	ICUS	CCUS	MDS
Cytopenie		X	X	X
Somatische mutatie	X		X	Niet vereist
Dysplasie				X



Clonale hematopoëse

- Betrokken genen bij **CHIP**, **CCUS** en **MDS**

	CHIP		CCUS				MDS				
	Jaiswal et al. (N Engl J Med 2015)	Genovese et al. (N Engl J Med 2014)	Malcovati et al. (Blood 2017)	Hansen et al. (Am J Hematol 2016)	Kwok et al. – prospectief (Blood 2015)	Kwok et al. - retrospectief (Blood 2015)	Xu et al. (Oncotarget 2017)	Tefferi et al. (Am J Hematol 2017)	Kwok et al. – prospectief (Blood 2015)	Kwok et al. - retrospectief (Blood 2015)	Haferlach et al. (Leukemia 2014)
Epigenetische regulatie											
RNA splicing	5-20%			28-62%					80%		
DNA herstel											
Transcriptionele regulatie	VAF			VAF					VAF		
Signaal transductie	2-5%			25-52%					40%		
Cohesine complex											
Andere											

<1%

1-4%

5-9%

10-49%

≥50%

NVT

<1%
1-4%
5-9%
10-49%
≥50%
NVT

Vraag 1: Betekenis van somatische mutaties

- **Klinische betekenis van somatische bij ICUS?**

- MDS/AML  90% somatische mutatie prediagnostisch
 Gemiddelde VAF 40% (min. 20%)

Cargo et al. (Blood 2015)

- # Mutaties  hogere progressie naar MDS/AML
- Mutatie frequentie: lichte dysplasie > zonder dysplasie

Hansen et al. (Am J Hematol 2016)

Kwok et al. (Blood 2015)

- **Mutatieafhankelijke progressie**

- Mutaties RNA spliceosoom (SF3B1, SRSF2, U2AF1)
- Mutaties Epigenetische regulatie (TET2, DNMT3A, ASX1) + **co-mutatie**
- Zelfde progressiegraad als **low-risk MDS** met zelfde mutatie.

Malcovati et al. (2017)

 Één somatische mutatie bij ICUS: 82% progressie **binnen 5 jaar** of 90% **binnen 10 jaar**

Vraag 1: Betekenis van somatische mutaties

- **Klinische betekenis van somatische bij ICUS**

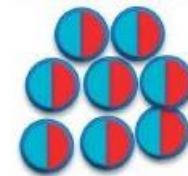
- CCUS = (low-risk) MDS?

- Ifv dysplasie
- Ifv # mutaties
- Ifv gemuteerde gen(en)

WHO 2016.2 ?

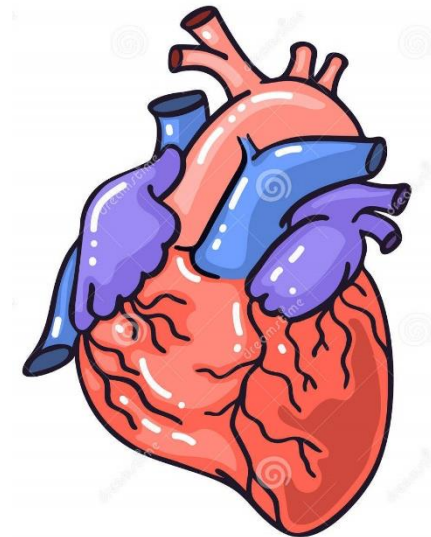
- CCUS = preMDS?

- CHIP/ICUS $\Rightarrow$ CCUS $\Rightarrow$ MDS ($\Rightarrow$ AML)
- Epigenetische regulatie & RNA slicing $\Rightarrow$ “founding mutations”



Vraag 1: Betekenis van somatische mutaties

- **Klinische betekenis van somatische bij ICUS**
 - Hoger risico op coronaire vaatziekte
 - Mutaties in ASXL1, DNMT3A, TET2, JAK2
 - Indien VAF 10% $\Rightarrow$ 12x hoger risico op calcificatie
 - ≤ 50 jaar met mutatie $\Rightarrow$ 4x hoger risico op myocard infarct
- Ontdekt bij 'gezonde' volwassenen (**CHIP**)



Vraag 2: Literatuur en het AZ-Sint Jan

- **Next-generation sequencing in het AZ Sint-Jan Brugge**
 - Myeloïd panel **bestaande uit 19** genen
 - Minimale dekking van 300 reads
 - Minimale **VAF van 5%**
 - Rapportering van varianten
 - **Geen** synonieme variants
 - **Geen** mutatie in intron
 - **Geen** rapportering als MAF >1% bedraagt in dbSNP databank
 - Annotatie obv **COSMIC databank** en **ENSEMBL variant effect predictor**
 - Pathogene mutatie
 - 'waarschijnlijk pathogene' mutaties
 - Variant of undetermined significance (VUS)

Vraag 2: Literatuur en het AZ-Sint Jan

• Next-generation sequencing in het AZ Sint-Jan Brugge

- Van december 2016 tot januari 2018
 - 61 MDS patiënten $\Rightarrow$ 61% (37/61) somatische mutatie
 - 34 ICUS patiënten $\Rightarrow$ 18% (6/34) somatische mutatie

ICUS	TET2	SRSF2	TP53	DNMT3A	IDH2
Patiënt 1					
Patiënt 2					
Patiënt 3					
Patiënt 4					
Patiënt 5					
Patiënt 6					

- # mutaties ICUS < # mutaties MDS
- VAF 24% ICUS < VAF 36% MDS
- Geen follow-up beenmerg

Vraag 2: Literatuur en het AZ-Sint Jan

• Next-generation sequencing in het AZ Sint-Jan Brugge

- Van december 2016 tot januari 2018
 - 61 MDS patiënten $\Rightarrow$ 61% (37/61) somatische mutatie
 - 34 ICUS patiënten $\Rightarrow$ 18% (6/34) somatische mutatie

ICUS			MDS		
Gen	# patiënten	Gemiddelde VAF	Gen	# patiënten	Gemiddelde VAF
TET2	3	24%	TET2	21	39%
TP53	2	20%	TP53	6	36%
SRSF2	2	32%	SRSF2	1	48%
DNMT3A	1	16%	DNMT3A	2	44%
IDH2	1	8%	IDH2	2	44%

- # mutaties ICUS < # mutaties MDS
- VAF 24% ICUS < VAF 36% MDS
- Geen follow-up beenmerg

Vraag 2: Literatuur en het AZ-Sint Jan

- **Resultaten overeenkomstig met literatuur?**

- 18% mutaties versus 28-62% literatuur
 - Malcovati et al. (40 genen): **max. 6%**
 - Kwok et al. (22 genen): **max. 4-6%**
 - Hansen et al. (20 genen): **max. 15%**

MAAR: Vaak co-mutatie BCOR, CBL, NRAS, STAG2

- **DNMT3A, CSF3R en WT1** transcripten met **beperkte sensitiviteit**

	Exon	Transcript (Ensemble)	RefSeq	Sensitiviteit (%)
DNMT3A	23	ENST00000321117	NM_022552.4	65,80%
WT1	7,9	ENST00000332351	NM_024426	75,10%
CSF3R	14, 17	ENST00000373103	NM_156039	56,70%

Vraag 2: Literatuur en het AZ-Sint Jan

- Resultaten overeenkomstig met literatuur?
 - Invloed van studieopzet

	Malcovati et al. (Blood 2017)	Hansen et al. (Am J Hematol 2016)	Kwok et al. prospectief (Blood 2015)	Kwok et al. retrospectief (Blood 2015)
Grenswaarden cytopenie	Onduidelijk	Hb < 12,9 g/dL (man) Hb < 11,3 g/dL (vrouw) ANC < 1,8*10 ⁹ /L PLT < 150*10 ⁹ /L	Hb < 10 g/dL ANC < 1,8*10 ⁹ /L PLT < 100*10 ⁹ /L	Hb < 10 g/dL ANC < 1,8*10 ⁹ /L PLT < 100*10 ⁹ /L
Duur cytopenie	Onduidelijk	6 maanden	Geen rekening mee gehouden	Geen rekening mee gehouden
Staaltype	PB	PB	BM	BM
Cut-off VAF	2%	2% & 5%	5%	5%



WHO 2008 VS WHO 2016: + 18% MDS patiënten

- Annotatiewijze
 - Zeer divers
 - Geen 100% transparantie ➡ rapportering **VUS**?

Conclusie

- **Vraag 1: Klinische betekenis van gemuteerde ICUS?**

- Sommige gevallen eerder te beschouwen als **MDS**
- Vermoedelijk stelt CCUS een **preMDS** stadium voor
- Patiënten vertonen een **verhoogd risico op CHD**

- **Vraag 2: Aanpassing van het screeningsprotocol?**

- Vervolledigen van het panel met **EZH2** en **ZRSR2**
- NGS analyse enkele bij **persisterende cytopenie** (≥ 6 maanden)
- **Minder stringente criteria** voor cytopenie

➡ **Ontbrekende gegevens voor klinisch impact, nood aan nieuwe studies**

Conclusie

To be continued...