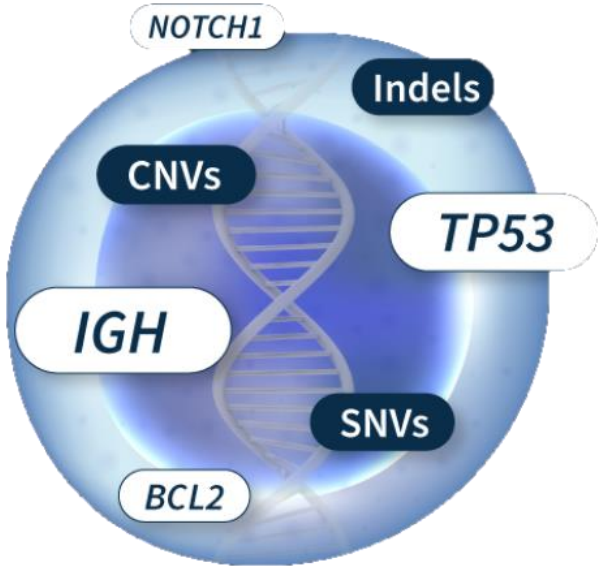
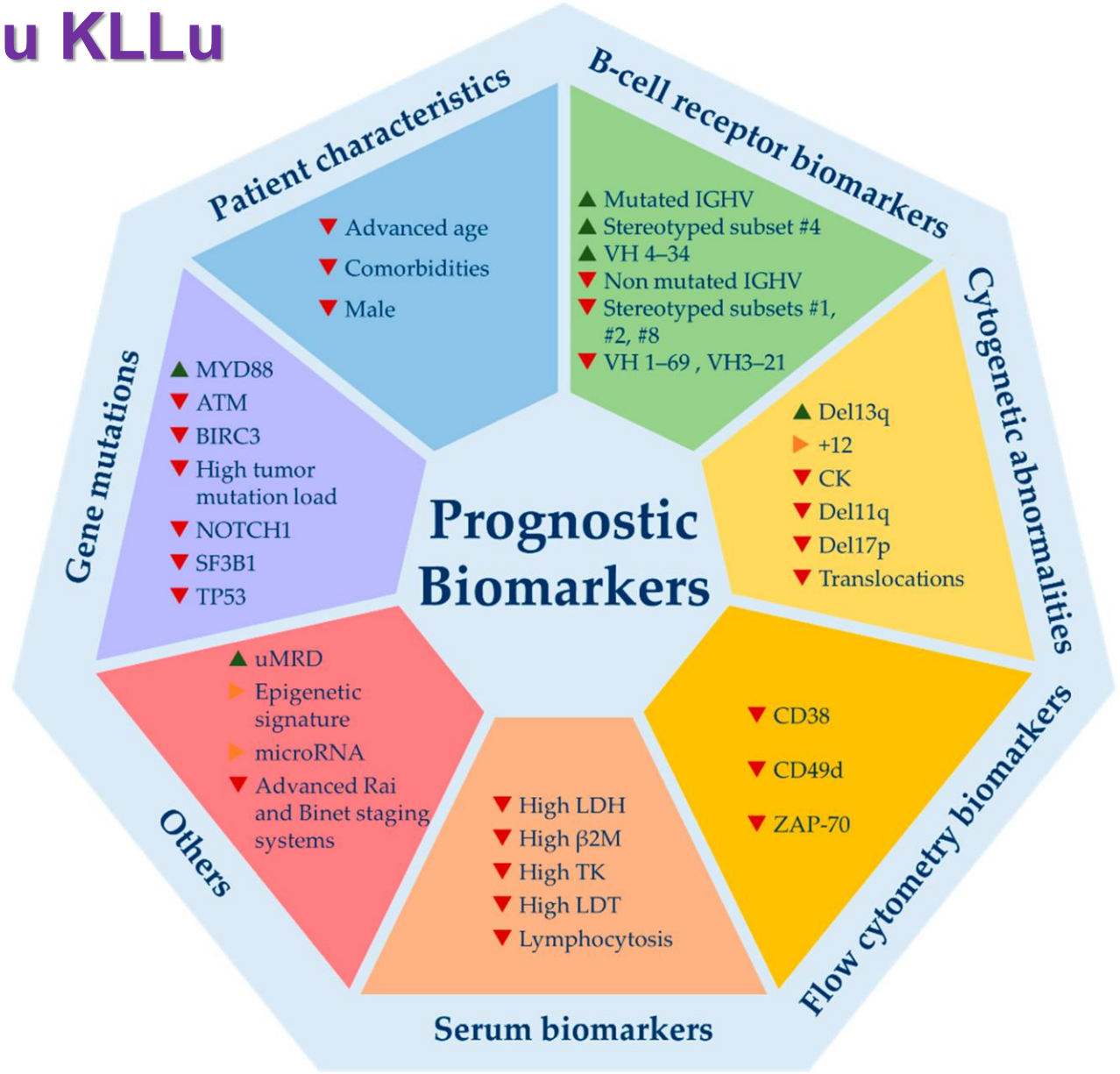


Molekularna dijagnostika KLL-a

Margareta Radić Antolic, spec.med.biochem.lab.med.
Odjel za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostku, KBC Zagreb

Prognostički biomarkeri u KLLu

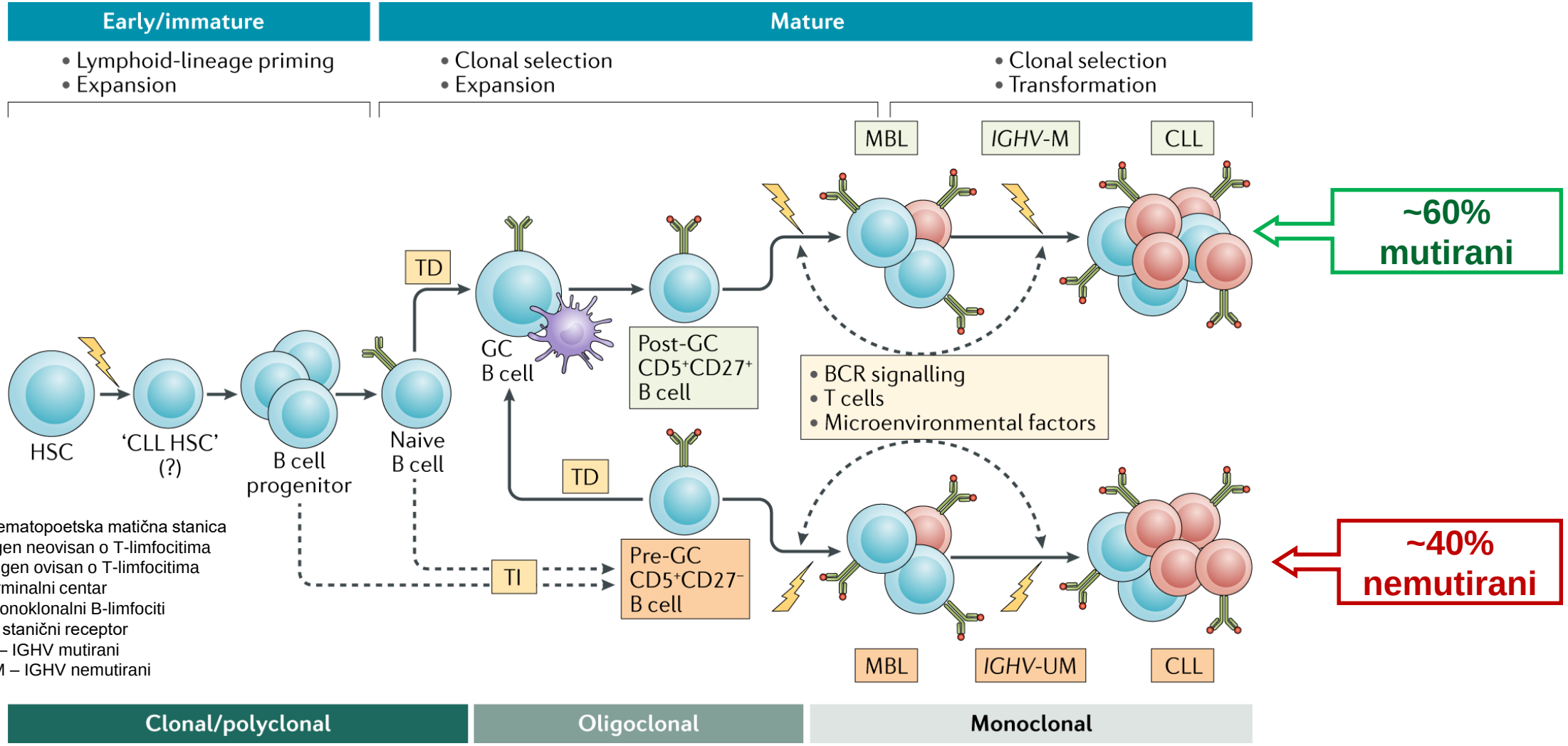
- ✓ **B stanični biomarkeri**
  - ✓ **IGHV mutacijski status**
  - ✓ **Stereotip BcR (subset)**
- ✓ **Mutacije u genima**
  - ✓ ***TP53***
  - ✓ ***BTK***
  - ✓ ***BCL2***
  - ✓ ***PLCG2***
  - ✓ ***NOTCH1***
  - ✓ ***SF3B1***
  - ✓ ***...***



Cancers 2021, 13(8), 1782

Nastanak zloćudnog B staničnog klona

- podrijetlo zloćudnog klona definira IGHV mutacijski status

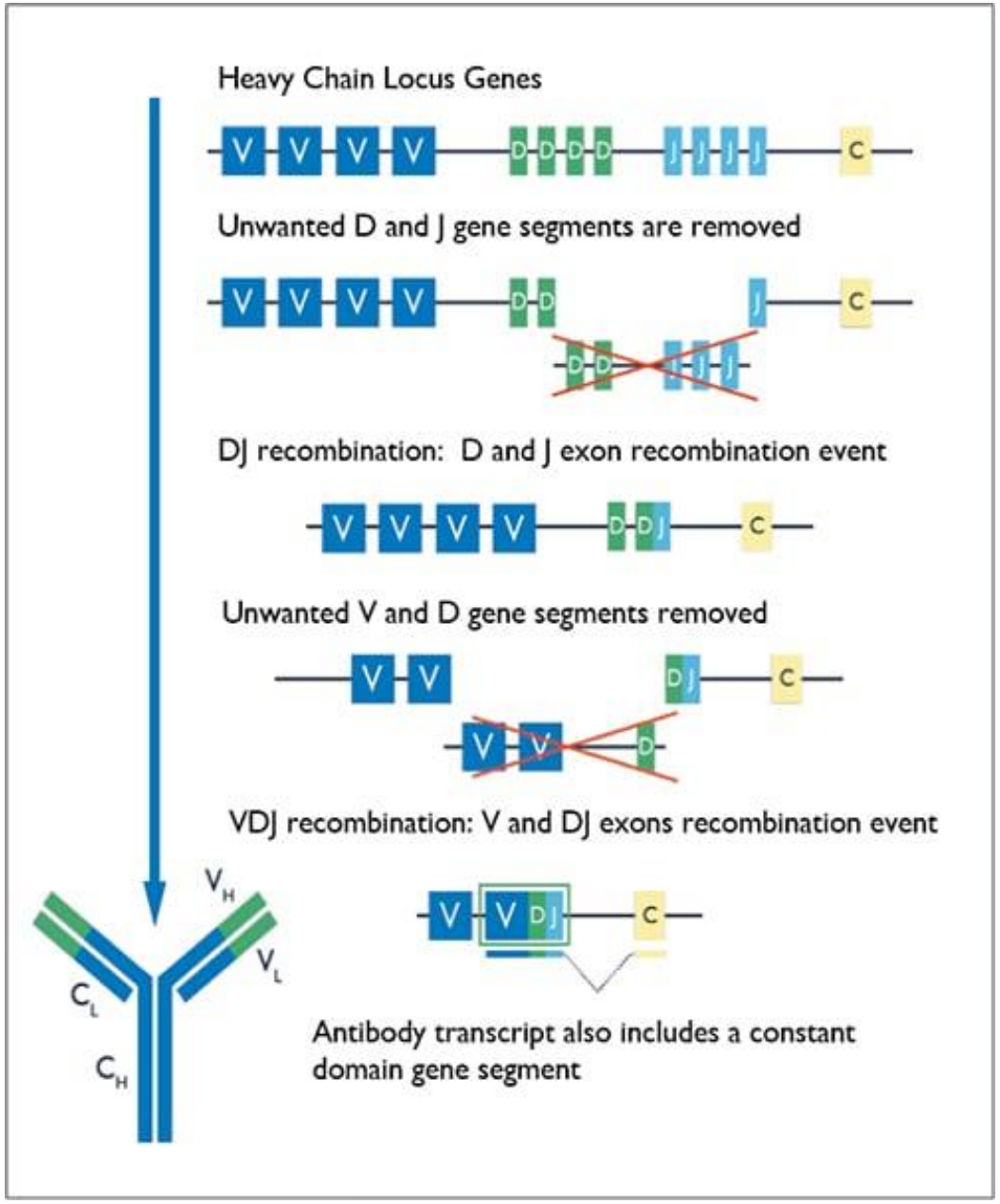


HSC – hematopoetska matična stanica
TI – antigen neovisan o T-limfocitima
TD – antigen ovisan o T-limfocitima
GC – germinalni centar
MBL – monoklonalni B-limfociti
BCR – B stanični receptor
IGHV-M – IGHV mutirani
IGHV-UM – IGHV nemutirani

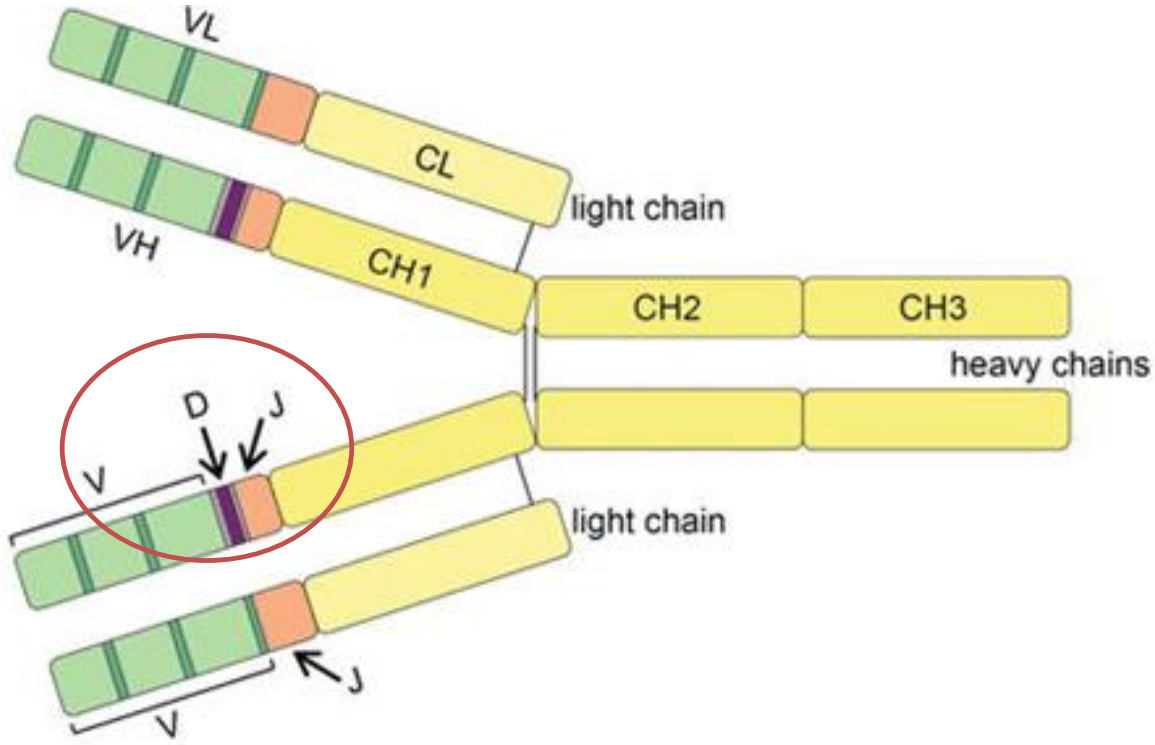
Bosch F, Dalla-Favera R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. Nat Rev Clin Oncol. 2019 Nov;16(11):684-701.

Preuredba teškog lanca imunoglobulina (IGH)

- ✓ teški lanac imunoglobulina (IGH)
- ✓ gen se nalazi na 14 kromosomu
- ✓ preuredba počinje rekombinacijom na razini DNA
- ✓ stvara se jedinstvena struktura preuređenog gena
  - ✓ IGHV-IGHD-IGHJ
- ✓ proces somatske hipermutacije

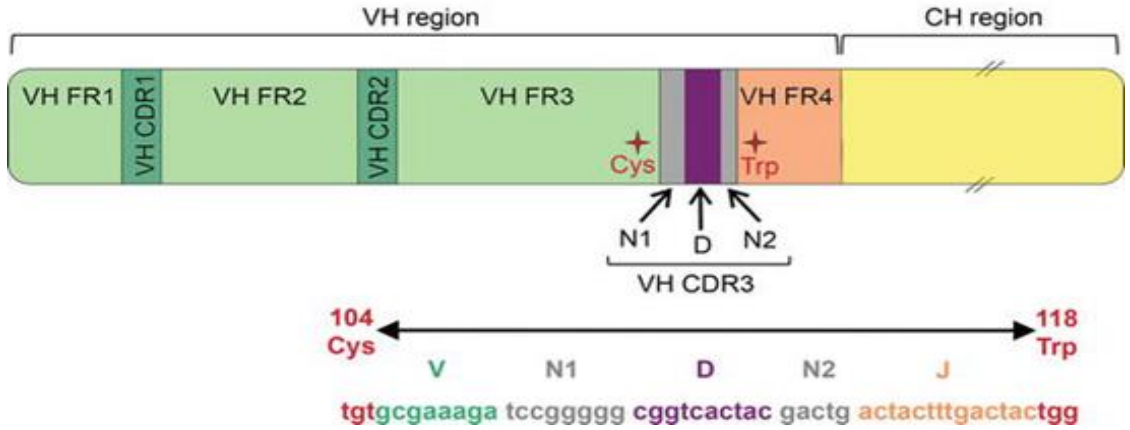


Preuzeto iz **Curtis A. Hanson, CAP TODAY webinar:** *IGHV* gene mutation at heart of CLL treatment



Svaki neoplastični klon ima svoj jednistveni „BARKOD”

IGHV-IGHD-IGHJ

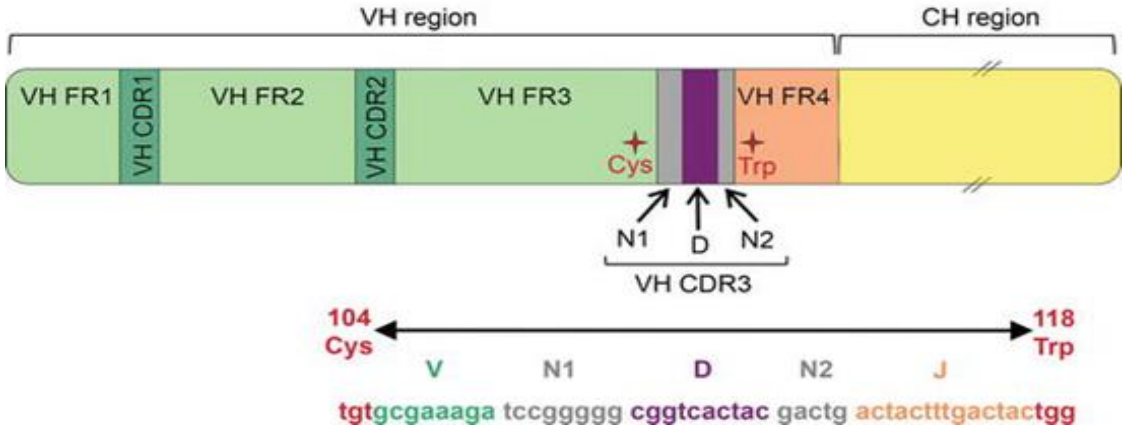


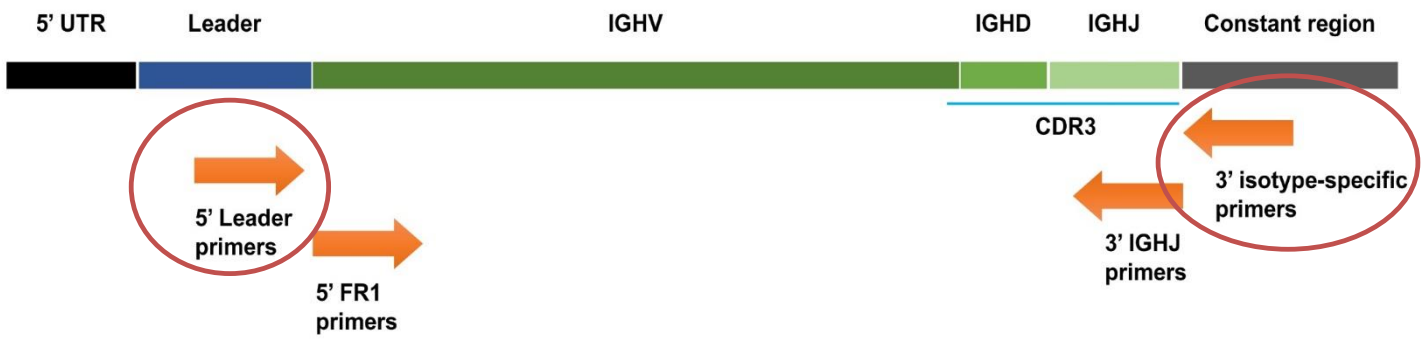
Standardizirani protokol

EDITORIAL

Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations

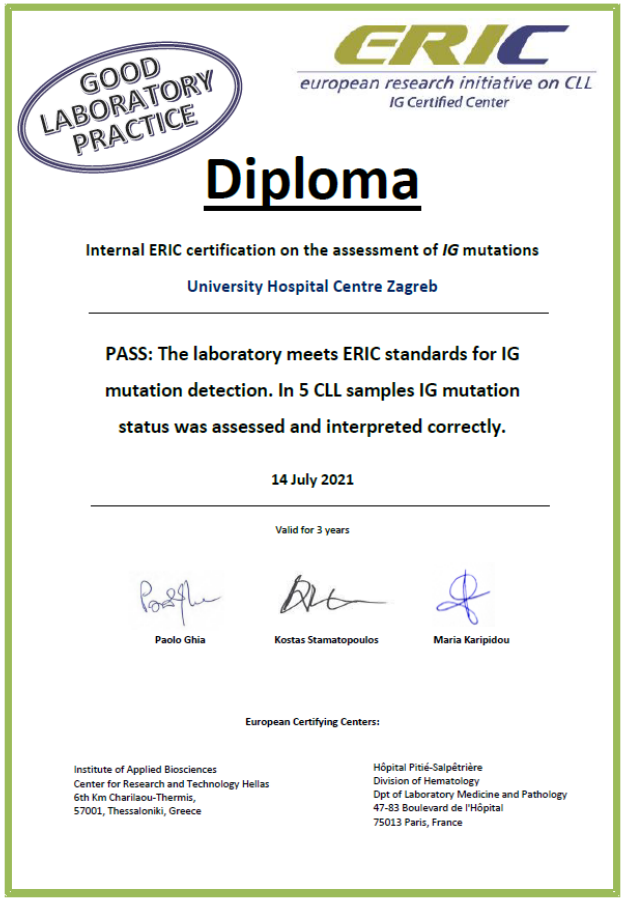
Leukemia (2017) **31,** 1477–1481; doi:10.1038/leu.2017.125





Krohem

https://www.krohem.hr/2020/10/12/mutiranost-igh-u-bolesnika-s-kll/



IGHV mutacijski status

Leukemia (2017) **31**, 1477–1481
www.nature.com/leu

EDITORIAL

Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations

Leukemia (2017) **31,** 1477–1481; doi:10.1038/leu.2017.125

```
>ig_
ggatctagactctttttggtggcagcagccacaggtgcccactccaggtccagcttgtg
cagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcaatgaaggtttcctgcaaggcttct
ggatacaccttcactagctatgctatgcattgggtgcgccaggcccccggacaaaggctt
gagtggatgggatggatcaacgctggcaatggtaacacaaaatattcacagaagttccag
ggcagagtcaccattaccagggacacatccgcgaacacagcctacatggagctgagcagc
ctgagatctgaagacacggctgtgtattactgtgcgagagagcagtggctggtacgggtt
aactttgactactggggccagggaaccctggtcaccgttccctcaggt
```

✓ uvijek mora biti PRODUKTIVNA preuredba

podudarnost sa sekvencom gena IGHV

Result summary:	**Productive IGH rearranged sequence** (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	Homsap IGHV1-3*01 F	score = 1422	identity = **99.31%** (286/288 nt)
J-GENE and allele	Homsap IGHJ4*02 F	score = 195	identity = 89.58% (43/48 nt)
D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis	Homsap IGHD6-19*01 F	D-REGION is in reading frame 3	
FR-IMGT lengths, CDR-IMGT lengths and AA JUNCTION	[25.17.38.11]	[8.8.13]	CAREQWLVRVNFDYW

VH obitelj gena

JH obitelj gena

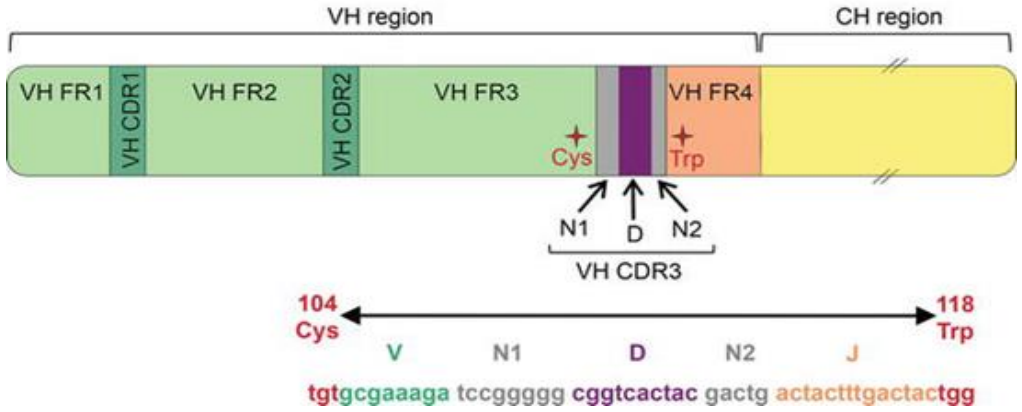
DH obitelj gena

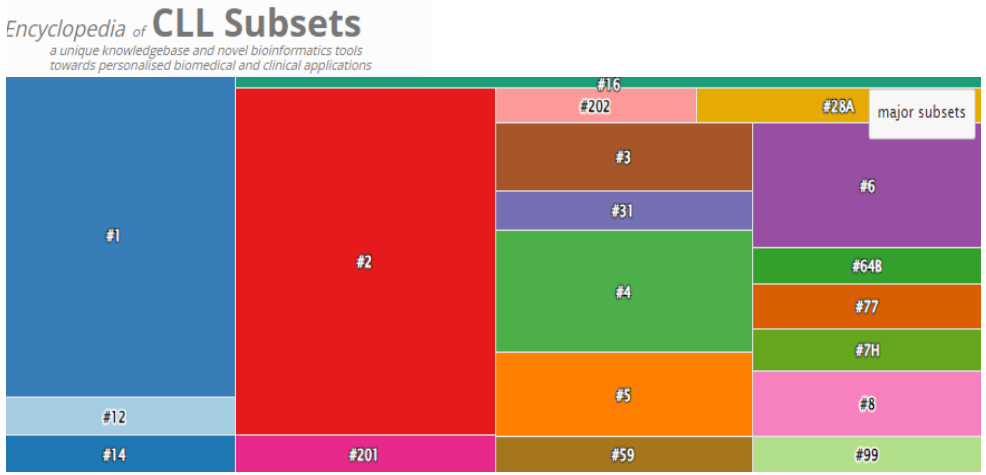
Aminokiselinski slijed od C^{104} do W^{118}

MUTIRANI← < 98 % - podudarnost sa sekvencom gena IGHV- > 98% →**NEMUTIRANI**

Podskupine zloćudnog B staničnog klona

- podskupina (subset) zloćudnog klona definirana je aminokiselinskim slijedom u CDR3 regiji između Cys^{104} i Trp^{118}





104	105	106	107	108	109	114	115	116	117	118	Frame	CDR3-IMGT length	Molecular mass	pI	PhysicoChemical Descriptor
C	A	R	D	Q	N	G	M	D	V	W					
ig_ tgt	gcg	aga	gac	cag	aac	ggt	atg	gac	gtc	tgg	+	9	1,294.43	4.44	CARDQNGMDVW

Be aware that some allele reference sequences may be incomplete or from cDNAs. In those cases, IMGT/JunctionAnalysis uses automatically the allele *01 for the analysis of the JUNCTION.

104	105	106	107	108	109	110	111	111.1	111.2	111.3	111.4	111.5	112.6	112.5	112.4	112.3	112.2	112.1	112	113	114	115	116	117	118	Frame	CDR3-IMGT length	Molecular mass	pI	PhysicoChemical Descriptor
C	A	R	D	Y	T	Y	Y	D	F	W	S	G	Y	T	G	Y	Y	Y	Y	Y	G	M	D	V	W					
ig_ tgt	gcg	aga	gat	tat	acg	tat	tac	gat	ttt	tgg	agt	ggt	tat	acg	ggt	tac	tac	tac	tac	tac	ggt	atg	gac	gtc	tgg	+	24	3,372.66	4.15	CARDYTYYDFWSGYTGYYYYYGMDVW

Be aware that some allele reference sequences may be incomplete or from cDNAs. In those cases, IMGT/JunctionAnalysis uses automatically the allele *01 for the analysis of the JUNCTION.

104	105	106	107	108	109	110	111	111.1	111.2	111.3	111.4	111.5	111.6	112.6	112.5	112.4	112.3	112.2	112.1	112	113	114	115	116	117	118	Frame	CDR3-IMGT length	Molecular mass	pI	PhysicoChemical Descriptor
C	T	R	D	G	W	K	W	E	L	L	A	Q	R	V	P	Q	Y	G	Q	Y	N	W	F	D	P	W					
ig_ tgt	act	aga	gac	gga	tgg	aag	tgg	gag	cta	cta	gcc	caa	cgg	gta	ccg	cag	tac	ggg	cag	tac	aac	tgg	ttc	gac	ccc	tgg	+	25	3,443.85	6.38	CTRDGWKWELLAQRVPQYGQYNWFDPW

Be aware that some allele reference sequences may be incomplete or from cDNAs. In those cases, IMGT/JunctionAnalysis uses automatically the allele *01 for the analysis of the JUNCTION.

Stereotipovi BcR u KLLu - podskupina

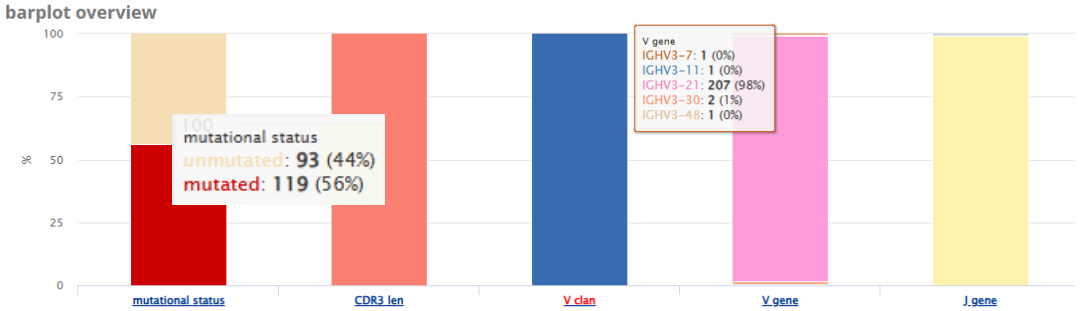
MUTACIJSKI STATUS IgHV

Mutiran (96,88% podudarnosti sa sekvencom gena IGHV3-21*01 u zametnim stanicama). Dokazan je produktivan gen IGHV3-21*01/ IGHD2-2*01/ IGHJ6*02 koji ima podudarnost od 96,88% sa sekvencom gena IGHV3-21*01 u zametnim stanicama.
Mišljenje:
Kod bolesnika je utvrđen mutirani gen IGHV3-21*01/ IGHD2-2*01/ IGHJ6*02 koji pripada podtipu (subset) #2 te je povezan s NEPOVOLJNOM prognozom kronične limfatične leukemije.
Obrazloženje:
Granična vrijednost podudarnosti sa sekvencom gena IGHV za svrstavanje slučajeva KLL u prognostičke skupine je 98% stoga je mutacijski status gena IGHV definiran kao nemutirani ukoliko je podudarnost sa sekvencom gena IGHV veća od 98% odnosno kao mutirani ako je podudarnost manja od 98%.

MUTACIJSKI STATUS IgHV podskupina

Preuredba gena u ovom uzorku pripada podskupini #2 te ukazuje na nepovoljnu prognozu bolesti.

	cases	mutational status	V clan	CDR3 len	V gene	J gene	sequence logo
#2	212	mixed	clanIII	9	IGHV3-21	IGHJ6	



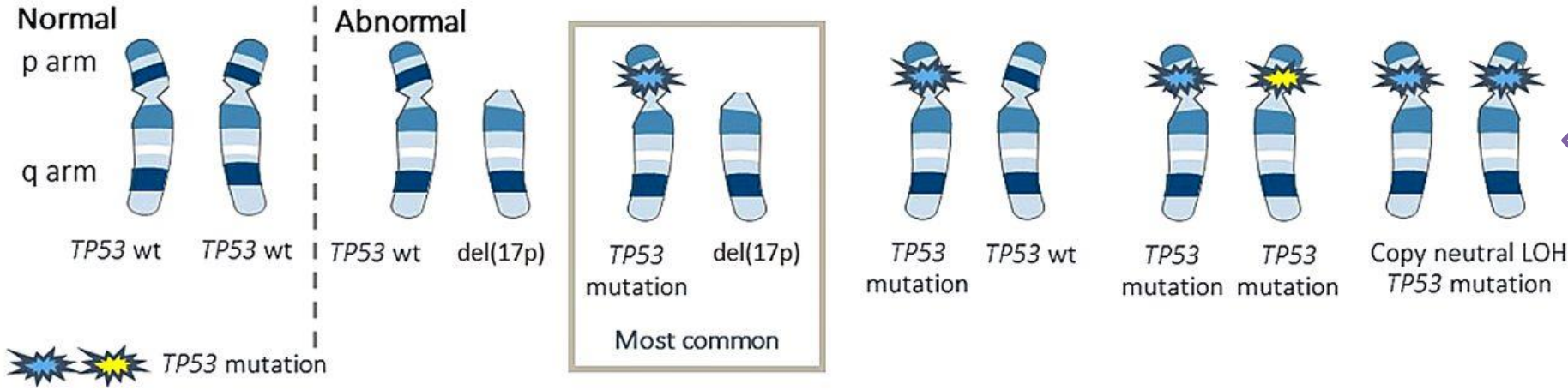
REVIEW

Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia

K Stamatopoulos[1,2], A Agathangelidis[1,3], R Rosenquist[2] and P Ghia[3]

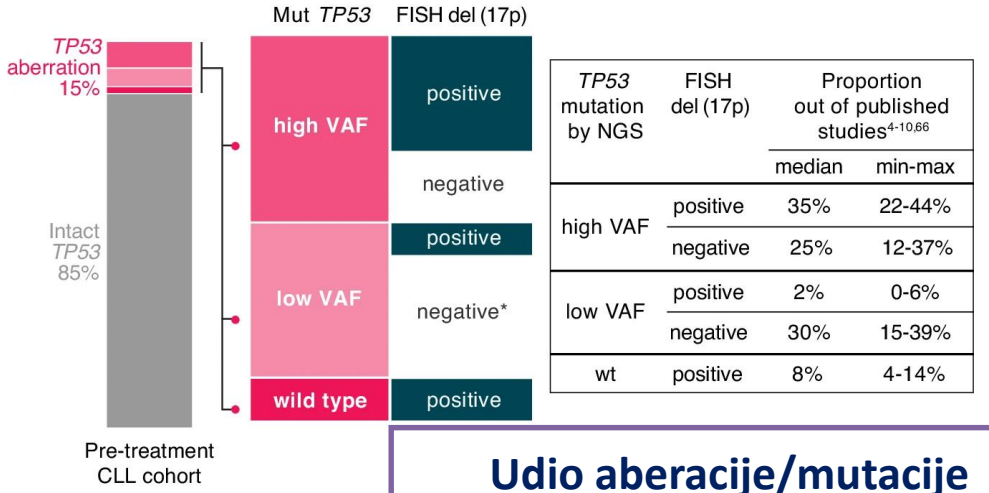
Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, Ghia P. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 2017 Feb;31(2):282-291.

Tumor protein 53 – *TP53*



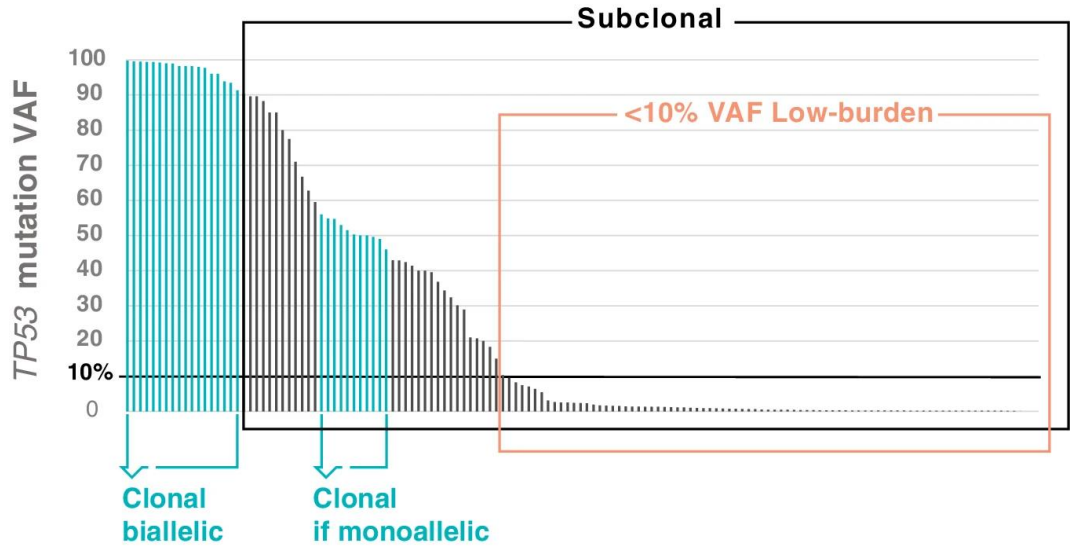
Vrsta aberacije

***TP53* aberacije** **10%** **60%** **30%**



TP53 mutation by NGS	FISH del (17p)	Proportion out of published studies[4-10,66]	
		median	min-max
high VAF	positive	35%	22-44%
	negative	25%	12-37%
low VAF	positive	2%	0-6%
	negative	30%	15-39%
wt	positive	8%	4-14%

Udio aberacije/mutacije



*Malcikova, J., Pavlova, S., Baliakas, P. et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia—2024 update. Leukemia **38**, 1455–1468 (2024).*

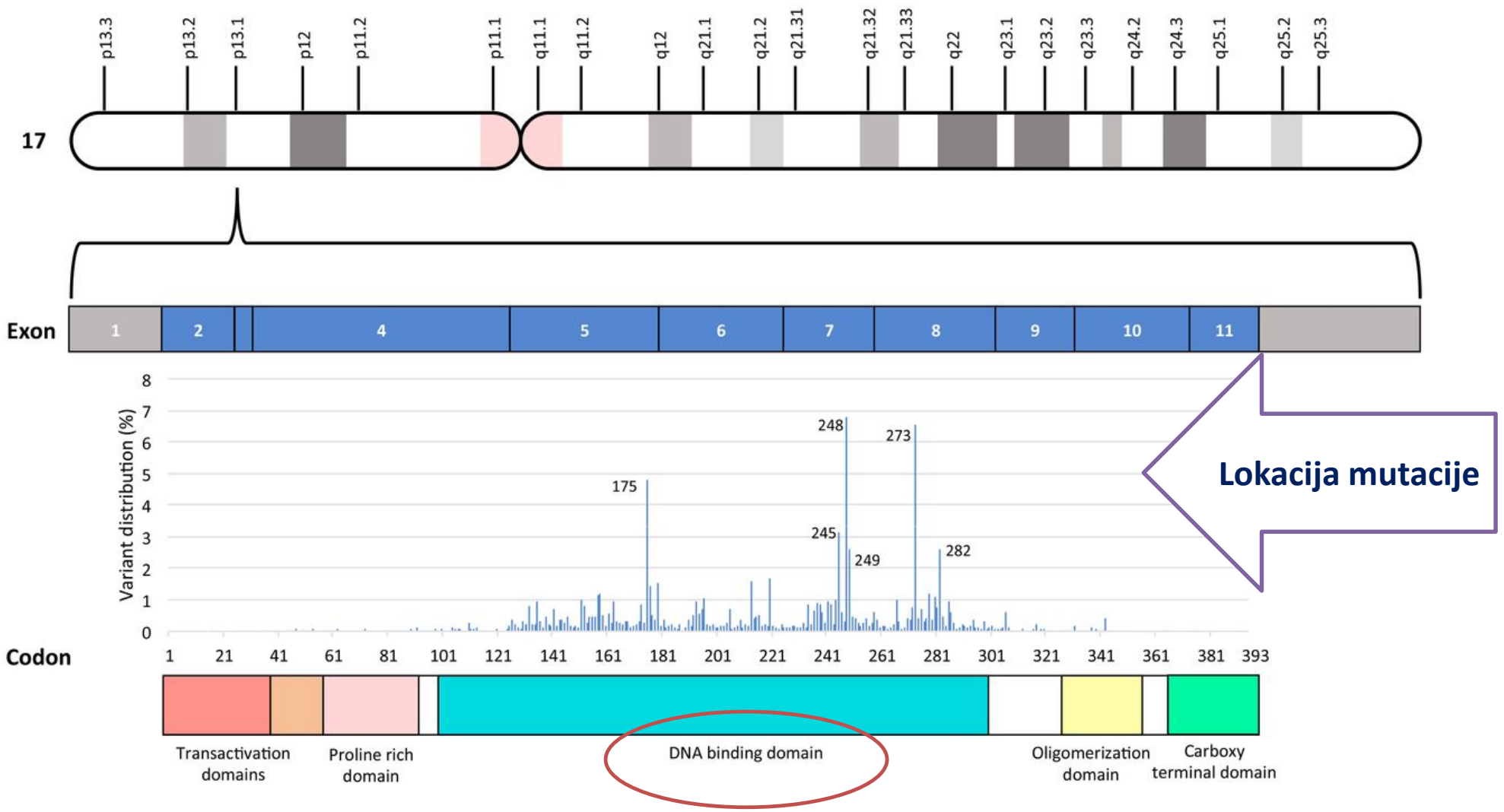
TP53 mutacijski status

Relaps

30-70%

5-15%

Dijagnoza



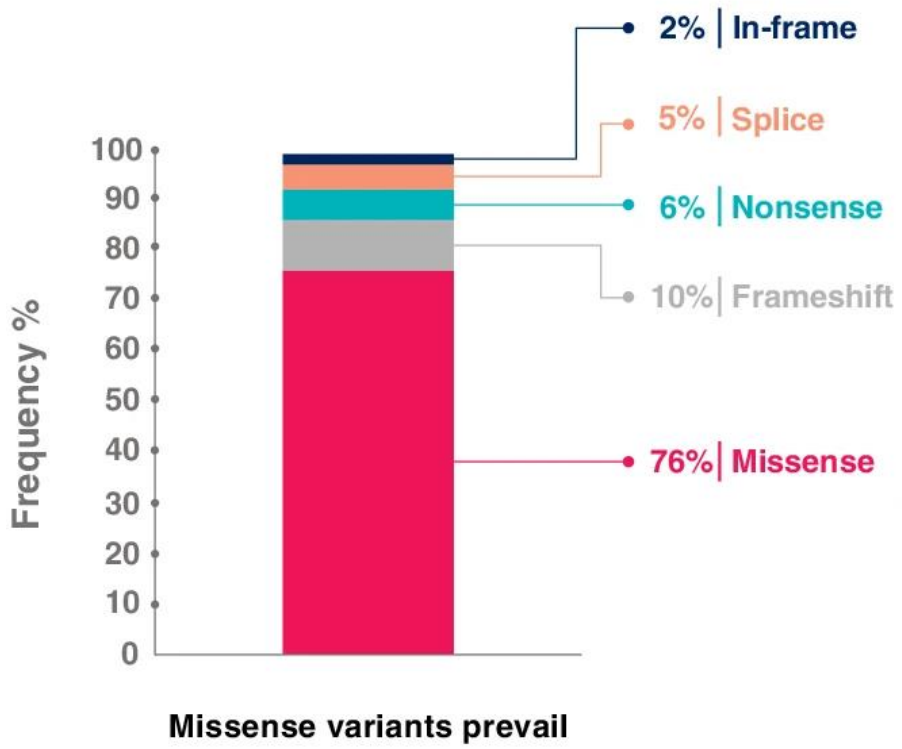
Standardizirani protokol

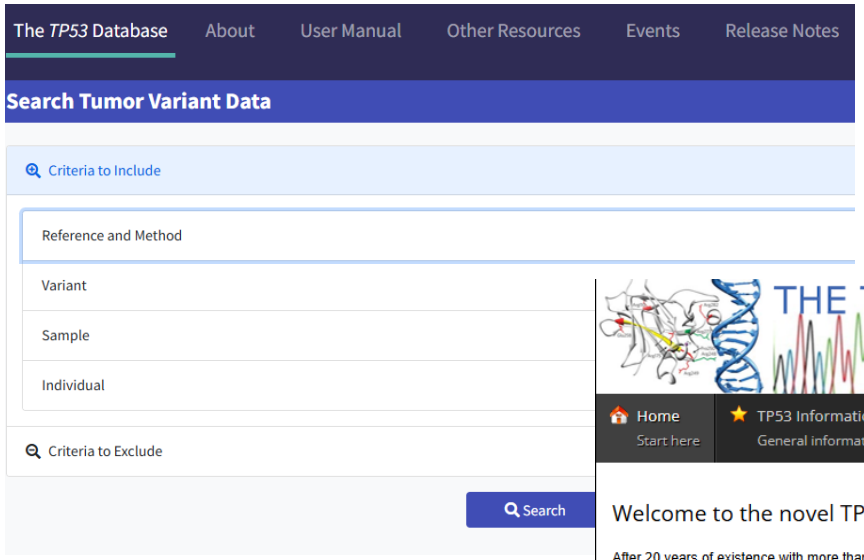
Review Article | Open access | Published: 02 February 2018

ERIC recommendations for *TP53* mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia—update on methodological approaches and results interpretation

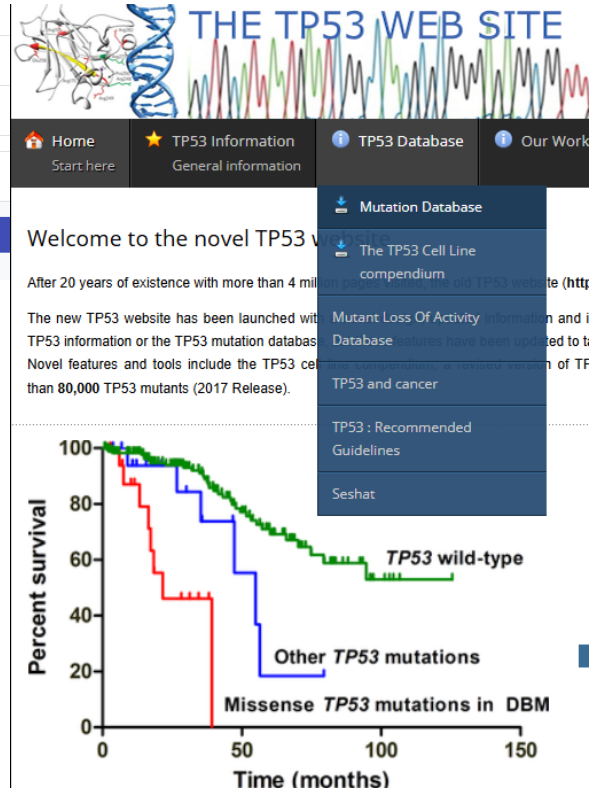
J. Malcikova, E. Tausch, D. Rossi, L. A. Sutton, T. Soussi, T. Zenz, A. P. Kater, C. U. Niemann, D. Gonzalez, F. Davi, M. Gonzalez Diaz, C. Moreno, G. Gaidano, K. Stamatopoulos, R. Rosenquist, S. Stilgenbauer, P. Ghia & S. Pospisilova on behalf of the European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia (ERIC) — TP53 network

Leukemia **32**, 1070–1080 (2018) | Cite this article





The TP53 database:
https://tp53.isb-cgc.org/
TP53 website:
http://p53.fr/



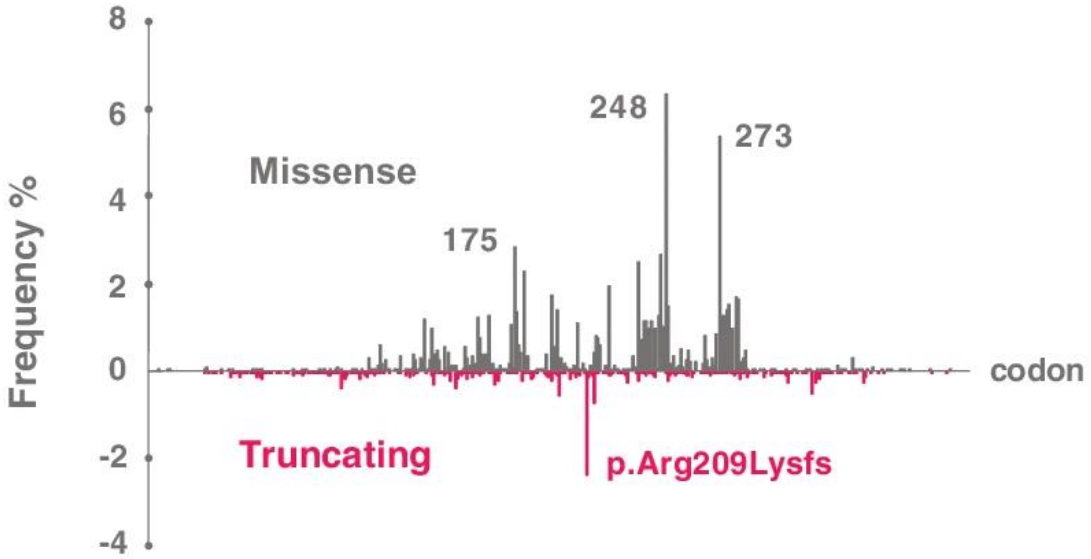
Standardizirani protokol

Review Article | Open access | Published: 02 February 2018

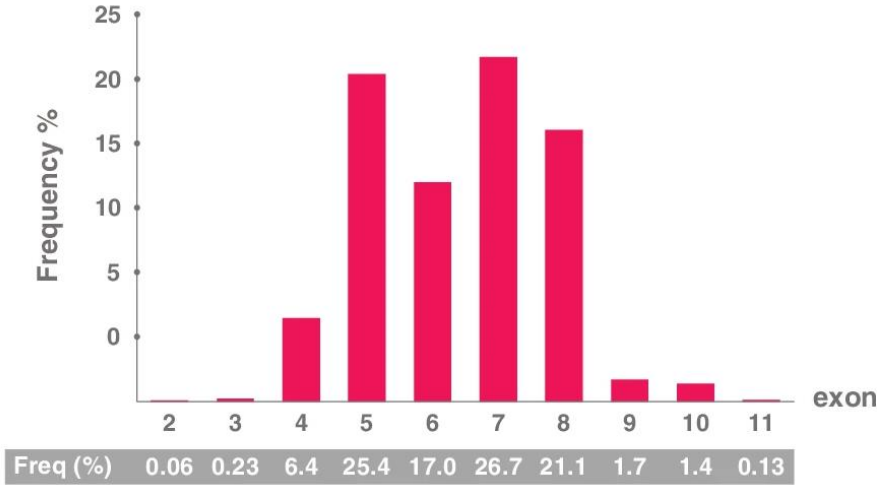
ERIC recommendations for *TP53* mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia—update on methodological approaches and results interpretation

J. Malcikova, E. Tausch, D. Rossi, L. A. Sutton, T. Soussi, T. Zenz, A. P. Kater, C. U. Niemann, D. Gonzalez, F. Davi, M. Gonzalez Diaz, C. Moreno, G. Gaidano, K. Stamatopoulos, R. Rosenquist, S. Stilgenbauer, P. Ghia ✉ & S. Pospisilova ✉ on behalf of the European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia (ERIC) — TP53 network

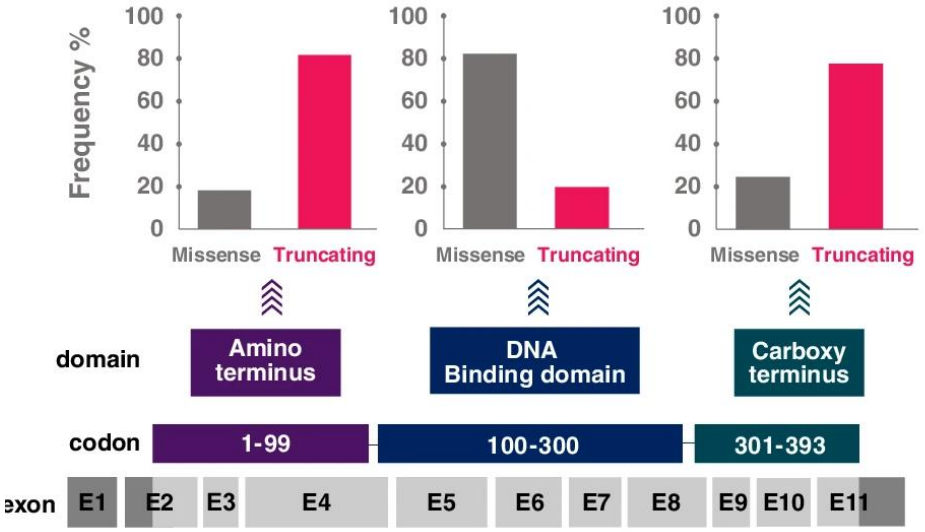
Leukemia **32**, 1070–1080 (2018) | Cite this article



Variants are present along the gene and cluster in hot-spots



Majority of variants in exons 5-8



Truncating variants prevail in N- and C- terminus

Putovanje KLL bolesnika od dijagnoze do ...

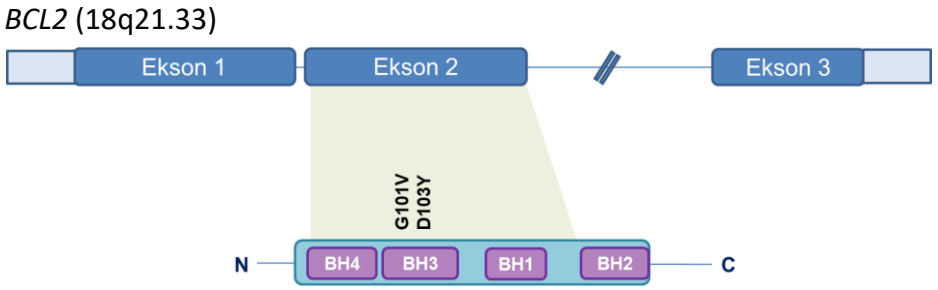
Dijagnostičko/prognostički biljezi

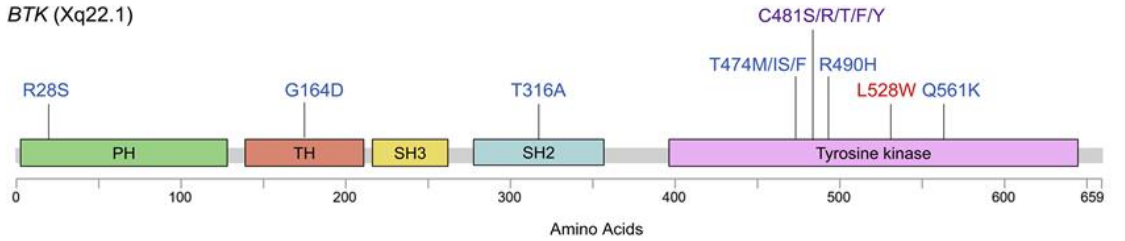
- ✓ **IGHV mutacijski status**
- ✓ **BcR stereotip**
- ✓ **Del(17p), Del(11q),** Del(13q),+12
- ✓ ***TP53* mutacijski status**
- ✓ ***ATM, NOTCH1, SF3B1, BIRC3...***
  - ✓ *NFKBIE, EGR2, MYD88, XPO1, CHD2*

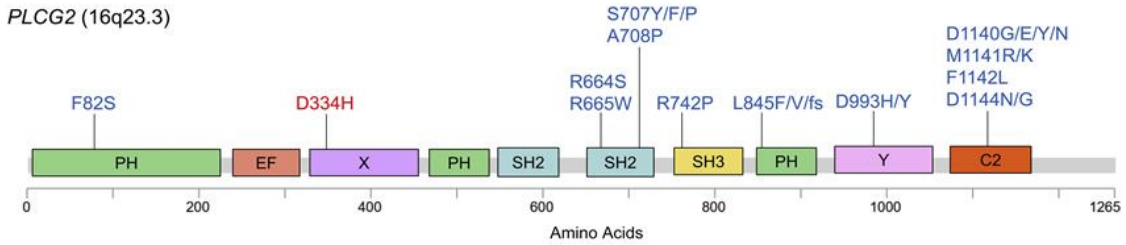
Prediktivni

- ✓ ***TP53* mutacijski status**
- ✓ ***BTK*, *PLCG2* mutacijski status**
- ✓ ***BCL2* mutacijski status**
- ✓ ***CARD11* mutacijski status**

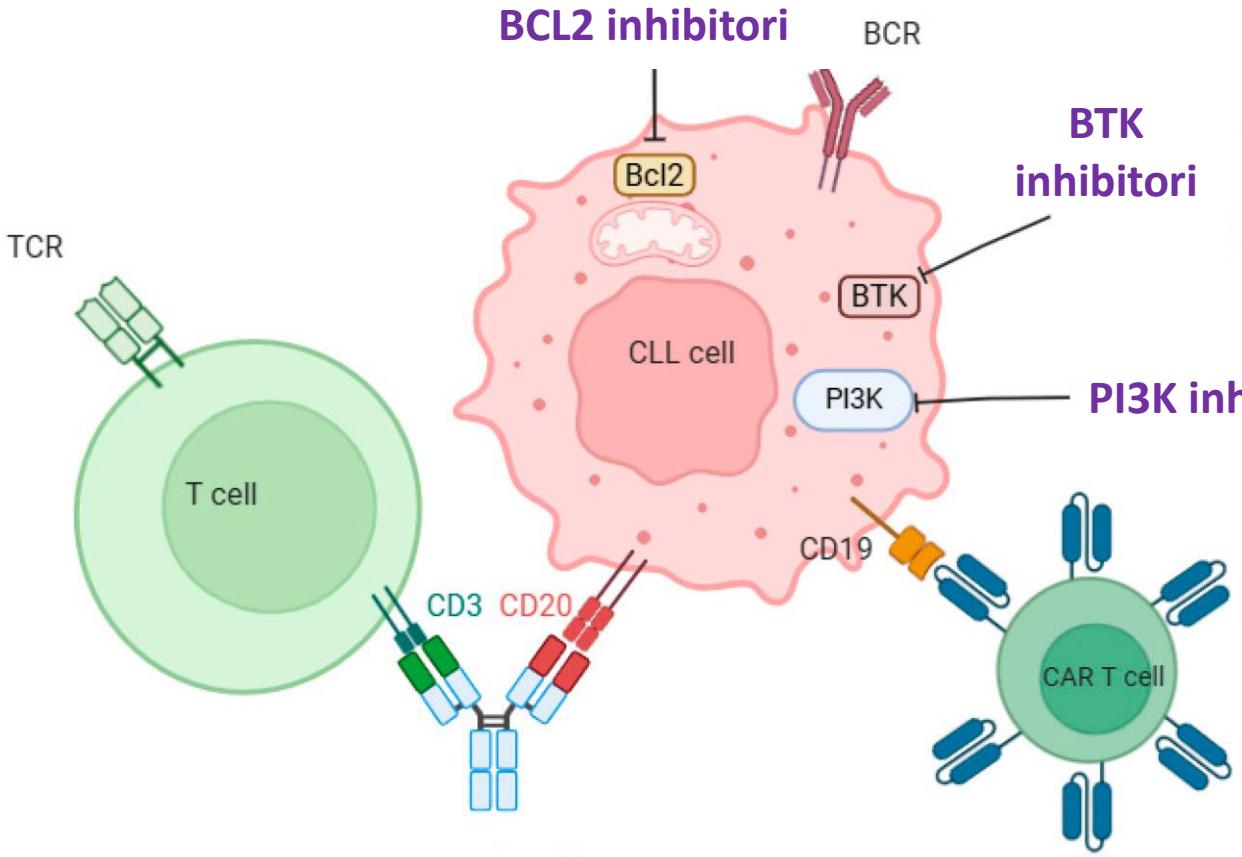
Predikcijski biljezi za bolesnike na terapiji







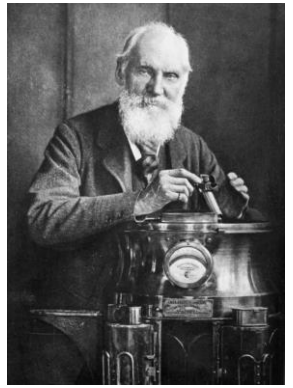
Associated with CLL progression
Associated with Richter transformation
Associated with both CLL and Richter transformation



- ✓ ***TP53* mutacijski status**
- ✓ ***BCL2***
  - ✓ G101V, D103Y
- ✓ ***BTK***
  - ✓ **C481,** druge mutacije u TKD
- ✓ ***PLCG2***

MRD – mjerljiva ostatna bolest

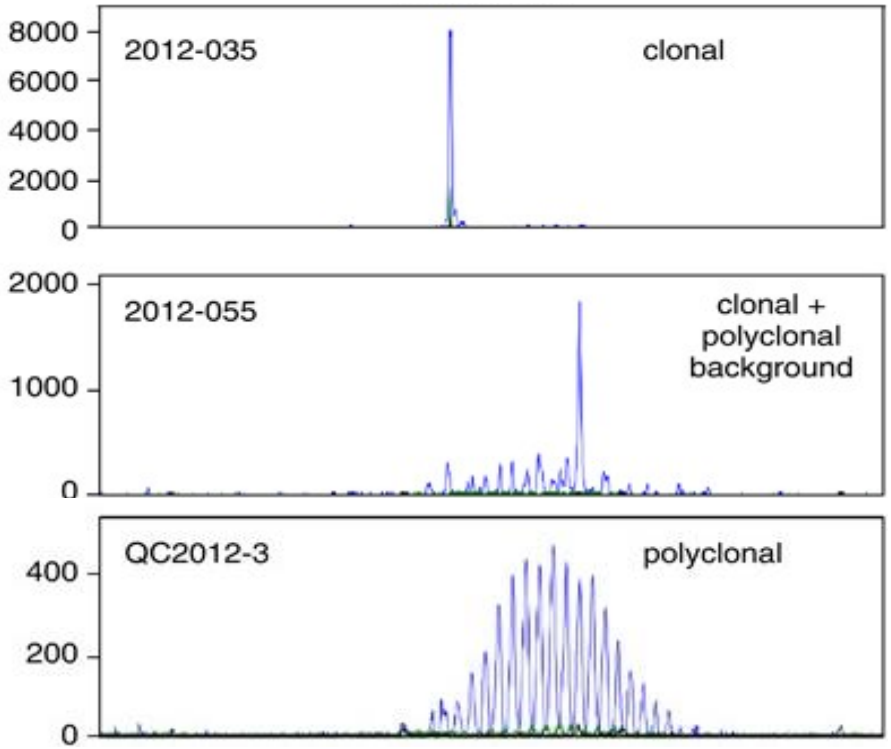
- ✓ uzorak – periferna krv
- ✓ vremenske točke
- ✓ marker – klonalnost teškog lanca (IGH)
- ✓ metoda



“When you can measure what you are speaking about and express it in numbers, you know something about it.”

Lord Kelvin (William Thompson), scientist

Chen, J., Gale, R.P., Hu, Y. *et al.* Measurable residual disease (MRD)-testing in haematological and solid cancers. *Leukemia* **38**, 1202–1212 (2024). https://doi.org/10.1038/s41375-024-02252-4



Langerak, A W et al. *Leukemia* vol. 26,10 (2012): 2159-71.

- ✓ Najsnažniji **prognostički** pokazatelj
- ✓ Definiranje **trajanja** vremenski ograničene **terapije**
- ✓ Rano **otkrivanje relapsa**
- ✓ Definiranje **odgovora na terapiju** (svakodnevna praksa, kliničke studije)

Usporedba NGS i NGF za procjenu MRD u KLLu

	NGS (sekvenciranje)	NGF (protočna citometrija)
PRIMJENA	**>90%**	**100%**
POTREBAN DG UZORAK	**DA, važna je identifikacija neoplastičnog klona**	**Nije neophodan**
METODA	**Specifična preuredba imunoglobulina se koristi za usporedbu količine u praćenju u odnosu na dijagnostički uzorak**	**Anormalni klonalni limfociti se identificiraju prema imunofenotipu u odnosu na normalne stanice**
VRIJEME IZVOĐENJA ANALIZE	**>7 dana**	**5h**
OSJETLJIVOST	**10^{-6}**	**10^{-6}**
KOLIČINA UZORKA	**3 milijuna stanica za osjetljivost 10^{-6}**	**Do 10 milijuna stanica za osjetljivost 10^{-6}**
KLONALNA EVOLUCIJA	**Može se detektirati**	**Ne može se detektirati**
STANDARDIZACIJA	**Komercijalne kompanije**	**EuroFlow konzorcij**
OBRADA UZORKA	**Moože se odgoditi jer analize ne ovisi o svježini uzorka**	**Analiza unutar 24–48 h; isključivo svježi uzorak**
CIJENA	**++/+++**	**+**
KONTROLA KVALITETE	**Nije standardizirana**	**Korelira s morfološkim analizama**

Ferla V, Antonini E, Perini T, et al. Minimal residual disease detection by next-generation sequencing in multiple myeloma: Promise and challenges for response-adapted therapy. *Front Oncol*. 2022;12:932852.

https://www.krohem.hr/kronicna-limfocitna-leukemija-kll/

24h

KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR ZAGREB
KBC ZAGREB *KLINIČKI ZAVOD ZA LABORATORIJSKU DIJAGNOSTIKU*
MEDICINSKOG FAKULTETA SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

Kišpatićeva 12, Zagreb, Republika Hrvatska Tel: 2367 360

Zahtjev za testiranje mutacijskog statusa IGHV bolesnika s KLL

Ime i prezime:

Datum rođenja:

Naziv ustanove u kojoj se liječi:

Hematolog:

Kontakt hematologa koji traži analizu (e mail, telefon):

Status pacijenta:

a.) ne liječeni bolesnici za opservaciju

b.) ne liječeni bolesnici za prvu liniju liječenja

c.) kasnije linije liječenja

Citogenetika - rezultat analize:

FISH: a.) u tijeku

b.) ima del 17p i/ili del 11q

c.) nema del 17p i del 11q

Ranije određen IGHV mutacijski status:

a.) da

b.) ne

Laboratorijski nalaz datum:

broj leukocita (x10^9/L): _____

postotak limfocita (%): _____

Hgb :_____ Trc: _____

Potencijalni datumi slanja uzorka (koje dane lokalni laborato

_____

KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR ZAGREB
KBC ZAGREB *KLINIČKI ZAVOD ZA LABORATORIJSKU DIJAGNOSTIKU*
MEDICINSKOG FAKULTETA SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

Upute za uzorkovanje za testiranje mutacijskog statusa IGHV bolesnika s KLL

1. Poslati upit za analizu u obliku Zahtjeva na email kontakta u laboratoriju
2. Prema dogovorenom pravilno uzorkovati i transportirati uzorak u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku (Molekularna hematologija) KBC Zagreb

Uzorak za analizu je periferna krv

- ✓ (iznimno koštana srž ili punktat limfnog čvora)
- ✓ uzeta u spremnik s EDTA antikoagulansom (ljubičasti čep)
- ✓ dostavljena na hladnom (4°C) unutar 24h od uzorkovanja

Uzorak mora biti na hladnom (4°C) od uzorkovanja do dostave u laboratorij.

Kontakt osobe: Margareta Radić Antolic
mradicantolic@gmail.com

KBD
Klinička bolnica Dubrava

Upute za uzorkovanje i slanje uzorka za analizu TP53 mutacijskog statusa

1. Poslati upit za analizu (ispunjen obrazac „Zahtjev za testiranje mutacijskog statusa TP53“) na e-mail **tp53@kbd.hr** nakon čega će se dogovoriti datum slanja uzorka
2. Prije zahtjeva za analizu mutacijskog statusa TP53 potrebno je imati rezultat FISH analize u kojoj je potvrđeno da ne nosi deleciju 17p.
3. Nakon dogovora potrebno je pravilno uzorkovati i transportirati uzorak u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku – Odjel za molekularnu dijagnostiku i genetiku, Kliničke bolnice Dubrava

Za analizu mutacijskog statusa TP53 koristi se:

- periferna krv ili ovisno o potrebi koštana srž ili punktat limfnog čvora
- za uzorkovanje se koristi epruveta s ljubičastim čepom (EDTA)
- uzorak se čuva i dostavlja na hladnom (4°C) unutar 24 sata od uzorkovanja

Kontakt:
dr. sc. Branimir Gizdić
bgizdic@kbd.hr
091 620 0683

KBD
Klinička bolnica Dubrava

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku – Odjel za molekularnu dijagnostiku i genetiku, Klinička bolnica Dubrava, Avenija Gojka Šuška 6, Zagreb. tp53@kbd.hr

Zahtjev za testiranje mutacijskog statusa TP53

Ime i prezime:

Datum rođenja:

Naziv ustanove u kojoj se liječi:

Hematolog:

Kontakt hematologa koji traži analizu (e mail, telefon):

Status pacijenta:

a) neliječeni bolesnik

b) neliječeni bolesnik za prvu liniju liječenja

c) kasnije linije liječenja

Citogenetika - rezultat FISH analize:

a) delecija 17p

b) bez del 17p

Ranije određen TP53 mutacijski status:

a) da, nađene mutacije _____

b) ne

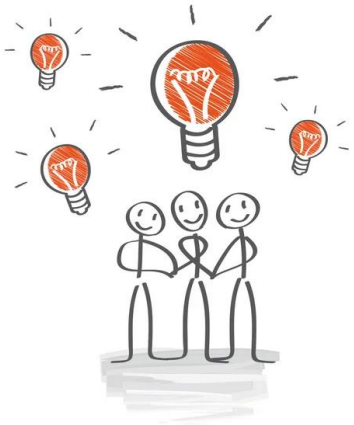
Laboratorijski nalaz datum:

broj leukocita (x10^9/L): _____

postotak limfocita (%): _____

Potencijalni datumi slanja uzorka (kada je moguće iz laboratorija poslati uzorak):

_____



Molekularna dijagnostika u KLLu

- ✓ neophodna je u modernoj **dijagnostici i liječenju** bolesnika s KLLom
  - ✓ osigurava pravilnu **stratifikaciju rizika**
  - ✓ mogućava **individualni** pristup liječenju
- ✓ uključuje:
  - ✓ Mutacijski status varijabilne regije teškog lanca imunoglobulina (**IGHV**)
  - ✓ ***TP53*** mutacijski status (del17p i točkaste mutacije)
  - ✓ druge kromosomske i **genske aberacije** (*ATM, NOTCH1, SF3B1, ..)*
  - ✓ Testiranje **rezistencije** na lijekove (*BCL2, BTK, PLCG2*…)
- ✓ **MRD** – kao neovisni prognostički pokazatelj