



Национальный научно-практический центр  
детской гематологии, онкологии и иммунологии  
им. Дмитрия Рогачева



## Молекулярно-генетическая диагностика ОМЛ у детей

Применение технологии высокопроизводительного секвенирования

Лаборатория цитогенетики и молекулярной генетики  
ст.н.с. Панферова А.В.

8 апреля 2017, Москва

### Введение

15-20% - ОМЛ

0,5 – 0,7/100.000 детей в год

150 детей в год в России

Выживаемость ~70%

De novo- >95%/secondary- 1%

- транзиторий миелопролиферативный синдром  
тМПС
- Анемия Фанкони
- Дискератоз
- Синдром Швахмана-Даймонда
- нейрофиброматоз типа II
- тяжелая врожденная нейтропения
- врожденная тромбоцитопения/тромбоцитопатия
- приобретенная Апластическая анемия и др.

30% рецидив заболевания

5-10% - смерть от осложнений или побочных эффектов терапии



## Классификация ОМЛ

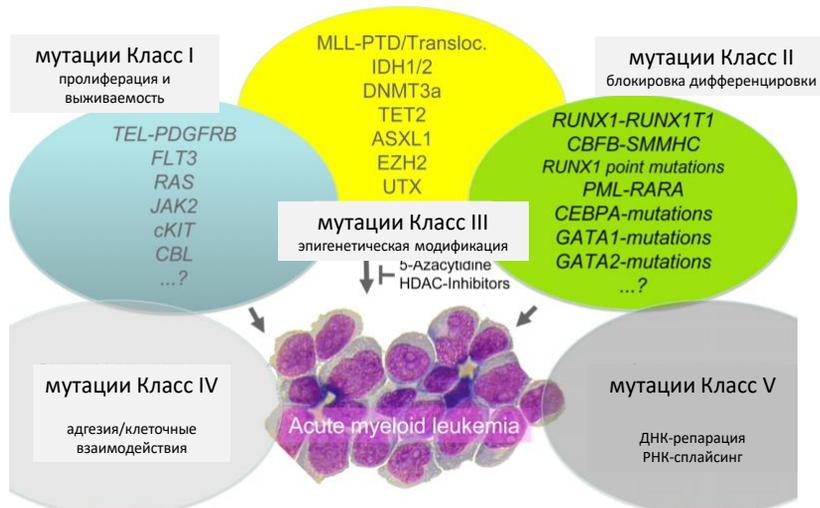
2001 – ВОЗ классификация, цитогенетические маркеры, даже при <20% бластов

2008 – ВОЗ расширил спектр цитогенетических маркеров и добавил мутации в генах *CEBPA* и *NPM1*, химерные гены и транскрипты

2016 – ВОЗ обновление, выделены в отдельную группу ОМЛ с BCR-ABL1, ОМЛ с мутацией в гене *RUNX1*

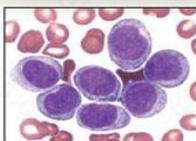
Современные технологии: генетические, эпигенетические, протеомные и иммунофенотипическая классификация

## Введение

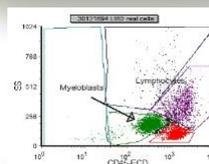


## Диагностика ОМЛ

### Морфология



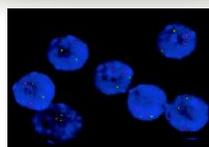
### Проточная цитометрия



### Цитогенетика



### FISH



## Современная классификация ОМЛ ВОЗ 2016 года

### ОМЛ с характерными цитогенетическими аномалиями

- ОМЛ t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
- ОМЛ inv(16)(p13;q22)
- t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
- ОПЛ с t(15;17)(q22;q12); *PML-RARα* и его варианты
- ОМЛ с t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLL3-KMT2A*
- ОМЛ с t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*
- ОМЛ с inv(3)(q21.3q26.2) или t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*
- мегакариобластный с t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*
- ОМЛ с *BCR-ABL1*
- ОМЛ с мутацией *NPM1*
- ОМЛ с биаллельной мутацией *CEBPA*
- ОМЛ с мутацией в *RUNX1*

### ОМЛ с мультилинейной дисплазией

- развившийся на фоне МДС или миелопролиферативного заболевания
- без предшествующего МДС

**t(1;22)(p13;q13)**  
**t(7;12)(q36;p13) MNX1/ETV6**  
**t(5;11)(q35;p15.5) NUP/NSD1**  
**t(11;12)(p15;p13) NUP98/KDM5A**  
**t(1;11)(q21;q23) KMT2A/MLLT1**

### ОМЛ, обусловленный предшествовавшей химиотерапией

- экспозицией алкилирующих агентов
- экспозицией ингибиторов топоизомераз II типа
- экспозицией других препаратов

### ОМЛ, не относящийся к вышеперечисленным категориям

- с минимальной дифференцировкой
- без созревания
- с созреванием
- острый миеломоноцитарный лейкоз
- острый монобластный и острый моноцитарный лейкоз
- острый эритроидный лейкоз
- острый мегакариоцитарный лейкоз
- острый базофильный лейкоз
- острый панмиелоз с миелофиброзом

### Миелоидная саркома

Миелопролиферация у пациентов с синдромом Дауна  
Из бластных плазмоцитонидных дендритных клеток

## Стратификация по группам риска +

	<p><b>Благоприятный</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Цитогенетические. СВФ-ОМЛ inv(16) t(16;16) t(8;21) t(15;17) t(1;11)</li> <li>• Молекулярные. Нормальный кариотип: <i>NPM1</i> мутация при отсутствии <i>FLT3</i>-ITD или изолировано биаллельная мутация в <i>CEBPA</i></li> </ul>
	<p><b>Промежуточный</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Цитогенетические. Нормальный кариотип +8 t(9;11) другие неопределенные</li> <li>• t(8;21) or inv(16) with KIT mutation</li> </ul>
	<p><b>Плохой</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Цитогенетические. Комплексный кариотип (≥3 клональным хромосомным событиям). Моносомия: -5, 5q-, -7, 7q-, 11q23 – не t(9;11) inv(3), t(3;3) t(6;9) t(9;22) t(7;12) t(4;11) t(6;11) t(5;11) t(10;11) t(16;21)</li> <li>• Молекулярные. При нормальном кариотипе есть мутации <i>FLT3</i>-ITD, <i>WT1</i> и <i>TP53</i></li> </ul>

## Регистрационное исследование ОМЛ у детей в РФ

«Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению ОМЛ у детей», 2015 г.

**Основная задача лаборатории: оптимизация молекулярно-генетической диагностики**

Основные протоколы терапии:

- ОМЛ Москва-Минск – 2006 (ФНКЦ ДГОИ)
- ОМЛ НИИ ДОГ (2007/2012)
- ВФМ (модификации 1998, 2004 и 1987 года)
- ОПЛ
- Протокол ОМЛ для синдрома Дауна

### Стандартный риск

t(15;17)  
Inv16  
NPM1

### Промежуточный риск

t(9;11)  
t(8;21) без c-kit  
нормальный кариотип без FLT3

### Высокий риск

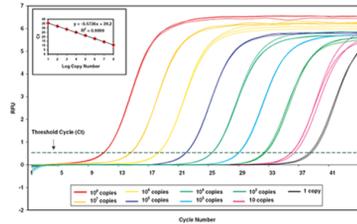
сложный кариотип (более 3-х поломок)  
t(8;21) с c-kit  
FLT3  
моносомия 7 и 5 хр.  
MLL  
M7, M6  
Мультилинейная дисплазия  
inv3, t(3;3)

## Минимальная остаточная болезнь

5 000 000 клеток

Количественная ОТ-ПЦР 1/10 000 -1/1 000 000

Калибраторы – IPSOGEN (Qiagen)



Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. van Dongen et al., *Leukemia* (1999) 13, 1901-1928

Chromosome aberration	RT-PCR target	Positive controls		Design and initial testing of primers	
		Cell lines*	Patients	Responsible laboratory	Collaborating laboratory
t(1;19)(q23;p13)	E2A-FBX1	697.SUP-B27.RCH-ACV	+	A Rambaldi et al	A Biondi et al
t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	RS4;11.MV4-11	+	F Griesinger et al	A Biondi et al and EA Macintyre et al
t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO	KASUMI-1	+	EA Macintyre et al	F Griesinger et al and JA Gabert et al
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL p190	TOM-1, ALL/MIK	+	G Saglio et al	A Rambaldi et al
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL p210	BV173, KCL22, K562, LAMA-84	+	JA Gabert et al	M Gonzalez et al
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1	REH	+	JA Gabert et al	G Saglio et al and A Biondi et al
t(15;17)(q22;q21)	PML-RARA	NB4	+	A Biondi et al	P Gameiro et al
inv(16)(p13;q22)	CBFB-MYH11	ME-1	+	EA Macintyre et al	JA Gabert et al
del(1)(p32;p32)	SIL-TAL1	CEM.RPM18402	+	EA Macintyre et al	JJM van Dongen et al

## Платформа Illumina (технология Solexa)



**MiSeq** (ноябрь 2014 г., использовать – с сентября 2015 г.)

- ✓ Small genomes (бактерии, вирусы)
- ✓ Amplicons
- ✓ Targeted sequencing (небольшие геномные панели)
- ✓ 1 exome

540 Mb-15 Gb



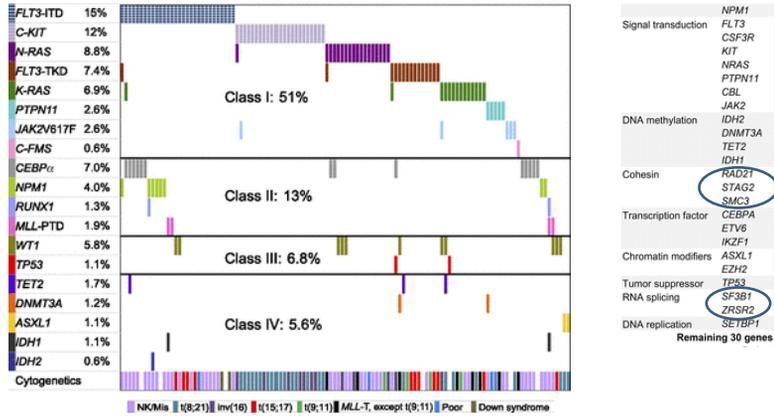
**NextSeq500** (февраль 2016 г., использовать – с апреля 2016 г.)

- ✓ 1-16 exomes
- ✓ 1-20 transcriptomes
- ✓ 6-96 targeted panels
- ✓ 12-40 gene expression profiling samples

16-120 Gb

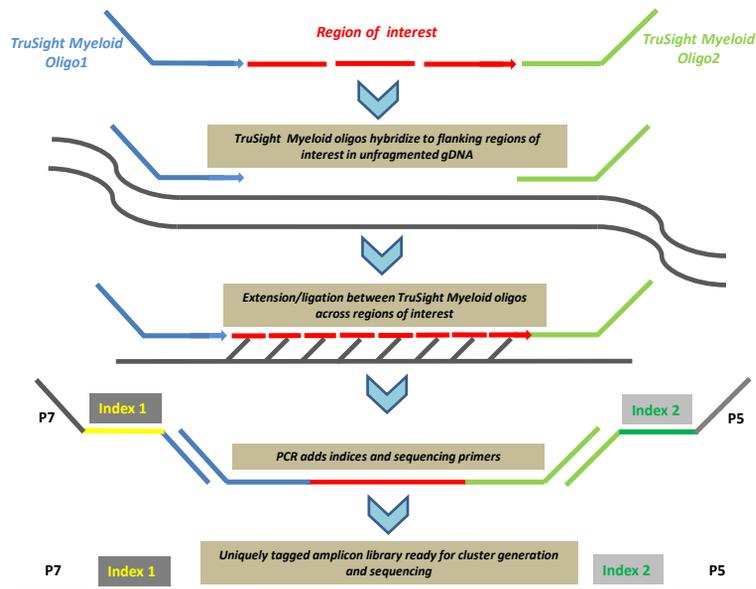


## Спектр мутаций при детских ОМЛ



Der-Cheng Liang 2013, Blood 121 (15) Cooperating gene mutations in childhood acute myeloid leukemia with special reference on mutations of ASXL1, TET2, IDH1, IDH2, and DNMT3A

## Принцип создания библиотеки



## Задачи

- Оценить применение технологии высокопроизводительного секвенирования для выявления мутаций в генах, участвующих в риск-стратификации пациентов с помощью панели TruSight Myeloid (Illumina)

## Направления

MiSeq, v.3 - 18 запусков /147 образцов:

ОМЛ (для некоторых: инициальный + рецидив + в динамике)

ЮММЛ

МДС

ХМЗ

Т-ОЛЛ

ОМЛ:

1) Ретроспективные исследования

- нормальный кариотип
- t(8;21)
- смена линии дифференцировки (ОМЛ-ОЛЛ, ОЛЛ-ОМЛ)
- t(16;21) редкая транслокация
- MLL rear
- M7 t(1;22)

2) Проспективная диагностика (с сентября 2016г.)

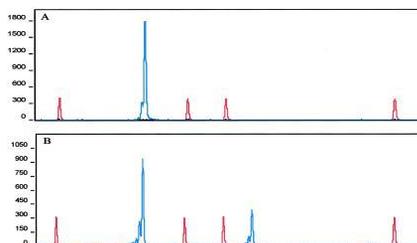
- все первичные, включенные в регистрационное исследование

## Проспективная диагностика

с сентября 2016 г.

1. Фрагментный анализ +  
секвенирование по Сэнгеру с  
Forward:

- 14-15 exons *FLT3* ITD
- 11 exon *NPM1*
- 2 exon *GATA1*

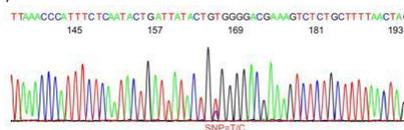


Чувствительность – 1%

2. Секвенирование по методу Сэнгера:

(«Anchor»-праймеры)

- 20 exon *FLT3* TKD
- 11 exon *NPM1*
- 2, 8-11, 13, 17 exons *ckIT*
- ***CEBPA***
- *GATA1*



Чувствительность 5-10%

## Оценка результатов

Рекомендации Illumina для MiSeq:

v2 - 5 пациентов  
v3 - 8 пациентов  
парно-концевое прочтение 2x150 cycles

Вторичная биоинформационная обработка-

**MiSeq Reporter software (MSR)**

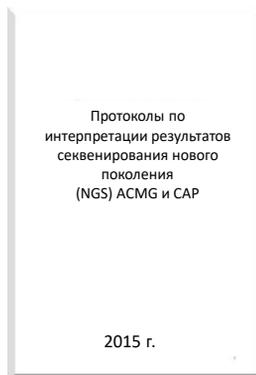
- выравнивание
- структурные варианты
- сборка контига для каждого генома и образца
- данные первичного анализа, качество и покрытие по каждому образцу
- прединсталлированные базы данных и геномы:  
dbSNP, refGene, human (Homo sapiens) build hg19

## Аннотация

### Variant Studio (Illumina)

Критерии фильтрации:

- Read depth >500 (мы смотрим > 100)
- Population frequency <5
- Use Cross Sample Substraction – удаление вариантов, которые содержатся в контрольном образце (есть в наборе)



## Аннотация

Очень сильно патогенные варианты:

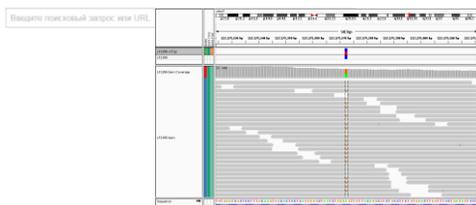
- нонсенс мутации;
- мутации со сдвигом рамки считывания;
- изменения канонических  $\pm 1$  или  $\pm 2$  нуклеотидов сайта сплайсинга;
- варианты, приводящие к исчезновению стопкодона;
- делеции/дупликации одного или нескольких экзонов) в генах, где данный тип варианта является известной причиной развития заболевания

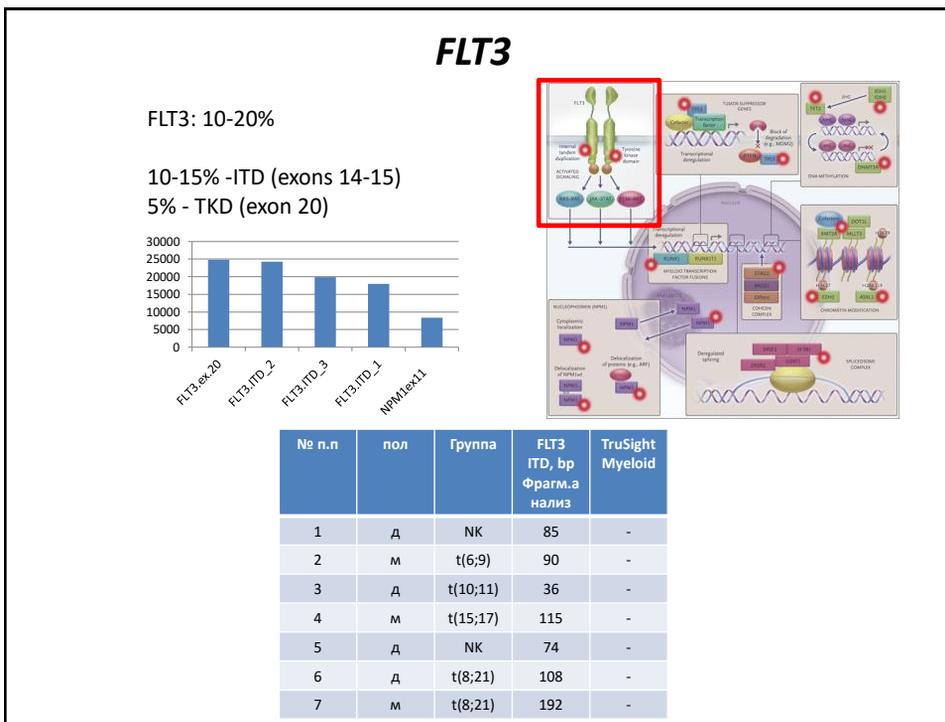
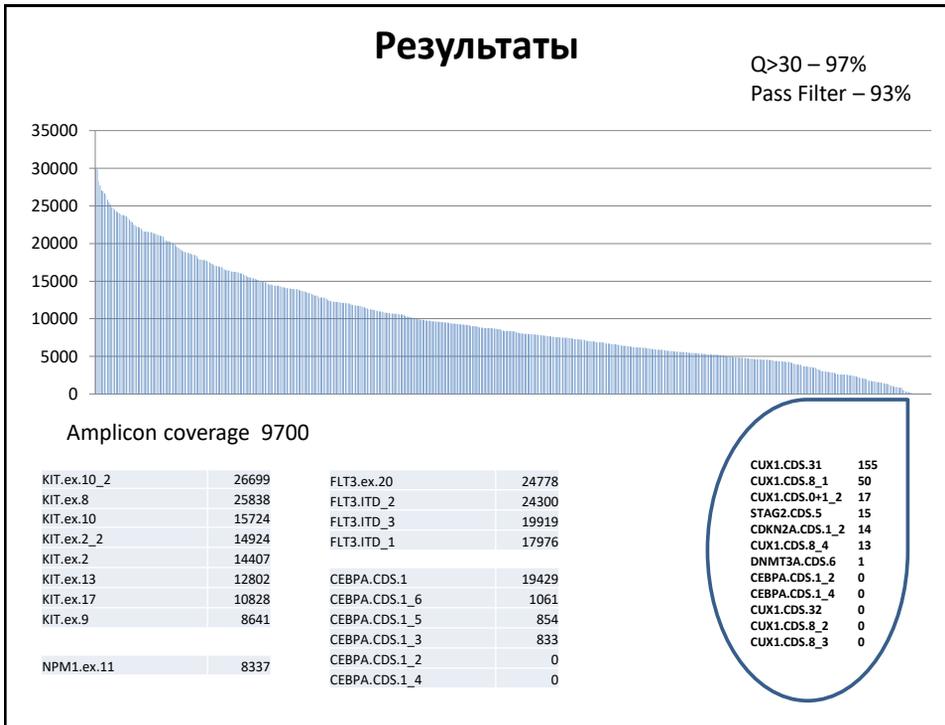
Миссенс мутации:

- COSMIC database
- Статьи
- Программы предикторы:
- SIFT
- PROVEAN
- PolyPhen2
- MutationTaster
- FATHMM

Пока не учитываем в анализе:

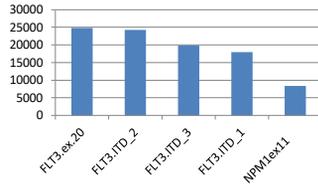
- мутации сайта-сплайсинга
- мутации UTR





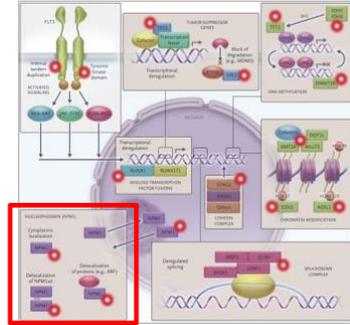
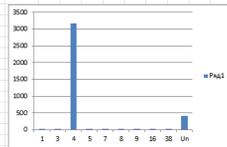
# NPM1

NPM1: 10%  
20%-25% - NK



Score:		3629	
SNP	13		
Indel	3616		

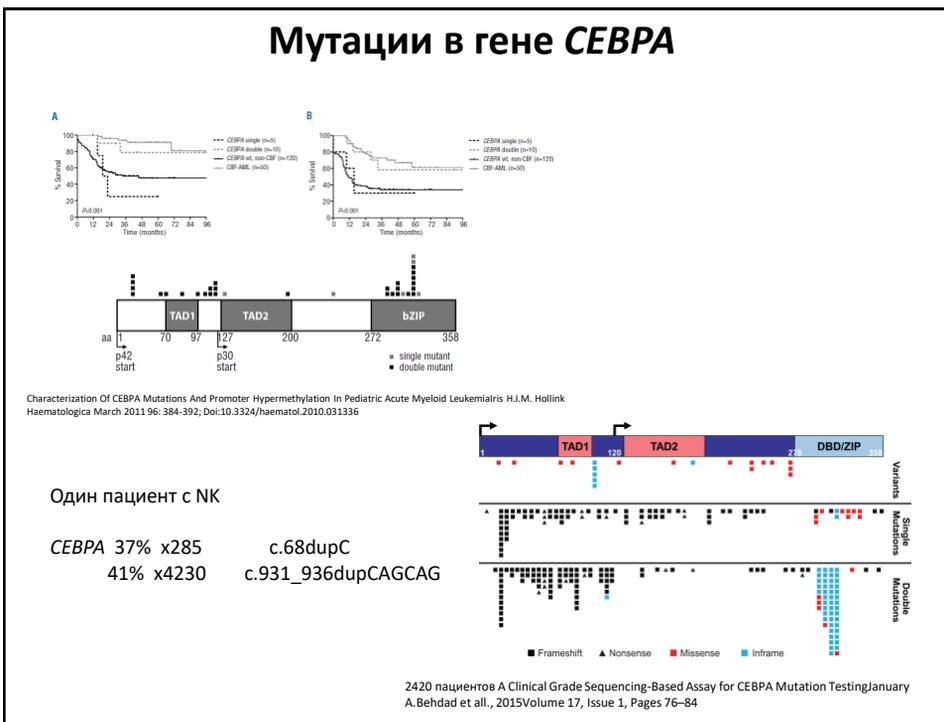
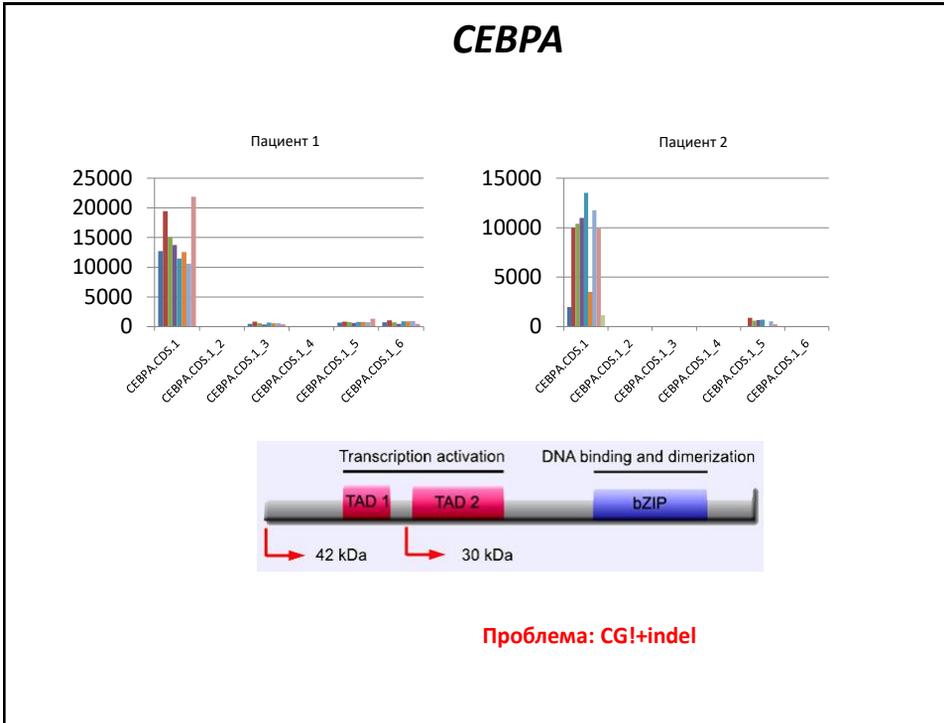
		Indel										
Length		1	3	4	5	7	8	9	16	38	Un	
Number		3	6	3180	2	1	4	1	1	1	3	416
%		0,08	0,17	87,94	0,06	0,03	0,11	0,03	0,03	0,08	11,50	



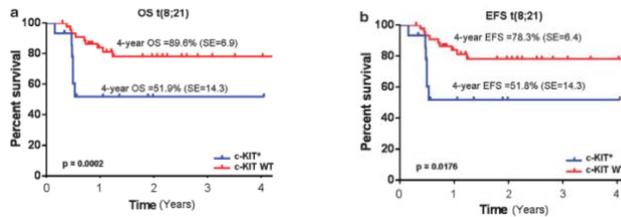
**Проблема: наличие генов – гомологов!**

## Мутации NPM1 в группе пациентов с НК

№ п.п.	Пол	Фрагм.анализ	Сэнгер	TruSight Myeloid	% бластных клеток
1	м	-	-	-	70
2	д	+	c.859_860insTCTG	c.859_860insTCTG	70
3	д	-	-	-	80
4	м	+	c.862_863insGCCG	c.862_863insGCCG	97
5	д	+	c.861_862insTGCA	c.861_862insTGCA	35
6	д	-	-	-	50
7	м	-	-	-	63
8	д	-	-	-	86
9	м	-	-	-	61
10	м	-	-	-	85
11	д	-	-	-	60
12	д	-	-	-	32
13	д	+	c.860_863dupTCTG	c.860_863dupTCTG	90
14	д	-	-	-	50
16	д	-	-	-	16
17	м	-	-	-	13
18	д	-	-	-	60
19	д	-	-	-	23
20	м	+	-	c.863_864insTAAG	10
21	м	-	-	-	70



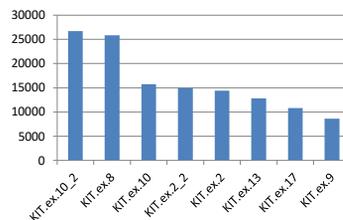
## Группа t(8;21) мутации в гене *KIT*



94 пациента Core-binding factor acute myeloid leukemia in pediatric patients enrolled in the AIEOP AML 2002/01 trial: screening and prognostic impact of c-KIT mutations E Manara et al., Leukemia, 2014

### c-KIT mutation

exon 8—C-1252-1256insAAAA  
 exon 8—C-1252-1258delTACGACinsTTC  
 exon 8—C-1249-1258delACTGACGACinsTTG  
 exon 8—C-1249-1261delGTCTGTAAGTCAGinsGGTTTTCTG  
 D816V  
 exon 8—C-1255-1261insTTCTCTC  
 exon 8—C-1249-1257delGTCTGTAAGinsTTCCC  
 exon 8—C-1249-1255delGTCTGTAAGTinsCAAATA  
 exon 8—C-1246-1261delGTCTGACTTACGACAGGinsCCGAAATTGTGG  
 exon 8—C-1252-1258delTACGACinsTTG  
 exon 8—C-1249-1257delACTTACGACinsATTCCC  
 exon 8—C-1255-1261delGACAGGinsGCC  
 exon 8—C-1249-1258delACTTACGACinsAGCCGTGACTTTG  
 exon 8—C-1252-1258delTACGACinsTAG  
 D816Q  
 D816V  
 D816Y  
 N822K  
 N822K  
 ITD—→ + 97nt



**Проблема: indel!**

## Результаты

группа t(8;21)

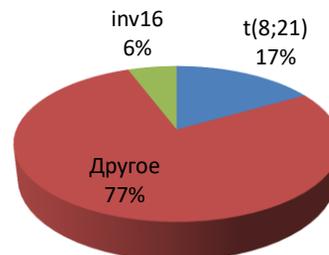
28 пациентов:

14 девочек /14 мальчиков

Медиана возраста 137 месяцев

5 пациентов – рецидив заболевания

1 пациентка с ЦНС IV миелоидная саркома спинномозгового канала

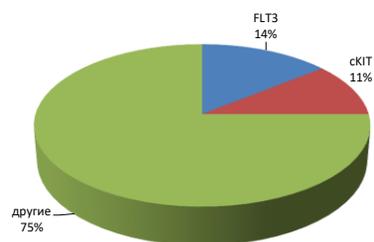


СВФ-ОМЛ (общая группа 155 пациентов)

## Результаты

группа t(8;21)

		Высокий риск	FLT3	KIT	NRAS	KRAS
1	Д	+	108 ITD			
2	Д		TKD			
3	М					
4	Д					
5	М					
6	Д	+				
7	М					
8	Д	+				
9	М	+				
10	М	+				
11	Д					
12	М					
13	М					
14	М		192 ITD			
15	Д					
16	Д	+				
17	Д					
18	М					
19	Д	+				
20	М					
21	Д					
22	Д					
23	М					
24	Д					
25	М					
26	Д		TKD			
27	М					
28	М	+				



У всех STAG2 NM\_001042749.1:c.1580G>T  
NP\_001036214.1:p.Cys527Phe  
«патогенная сильная» - PS1

Всегда 15-20% покрытие >500 –  
**ошибка секвенирования!**

## Результаты

группа t(8;21)

		Высокий риск	FLT3	KIT	NRAS	KRAS	EZH	Другое
1	Д	+	108 ITD					CSF3R, SMC3, IDH2, BCORL1
2	Д		TKD					
3	М							CBL
4	Д							FBXW7
5	М							CEBPA
6	Д	+						ASXL1, CEBPA, IDH2
7	М							
8	Д	+						
9	М	+						
10	М	+						ATRX
11	Д							PHF6 TET2
12	М							TET2 CSF3R
13	М							
14	М		192 ITD					
15	Д							IDH1
16	Д	+						ETV6
17	Д							ZRSR2 ASXL1
18	М							
19	Д	+						
20	М							BCORL1
21	Д							ETV6
22	Д							
23	М							
24	Д							
25	М							ASXL1
26	Д		TKD					ABL1 CEBPA
27	М							CBL
28	М	+						KDM6A

40%  
эпигенетической  
регуляции и  
когезинового  
комплекса

## Результаты

группа t(8;21)



## Выводы

С помощью ВПС и применения таргетной панели TruSight Myeloid (Illumina):

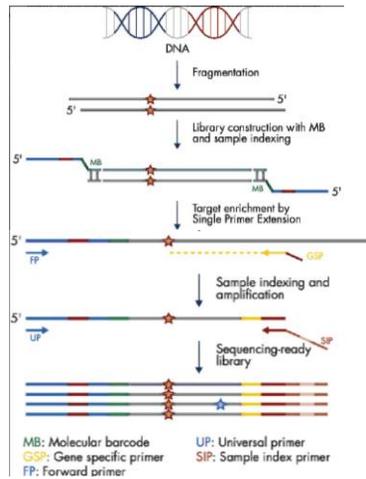
- Достоверно выявлены мутации в образцах с низким содержанием бластных клеток
- Позволила оценить молекулярный профиль ОМЛ у каждого пациента

Однако:

- Панель не позволила выявить FLT3 ITD
- Панель не позволила полностью секвенировать ген CEBPA
- Не подходит в качестве оптимального решения

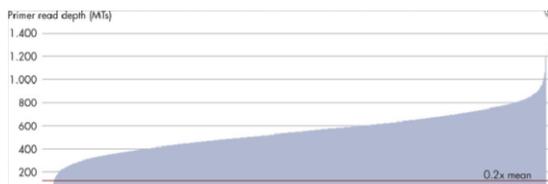
## Новая таргетная панель

Human myeloid Neoplasms Panel (Qiagen) -2016 г.  
141 ген, молекулярное баркодирование, возможность анализа  
CNV, + GC – богатые регионы

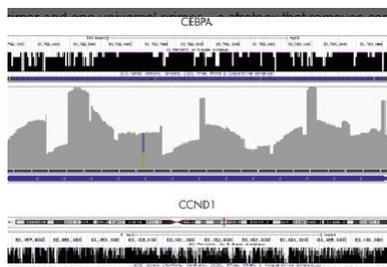


## Новая таргетная панель

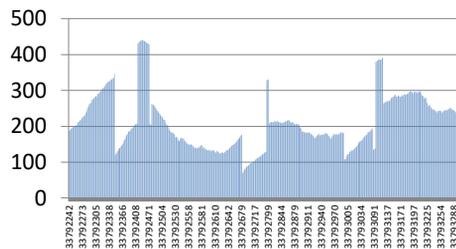
Human myeloid Neoplasms Panel (Qiagen) -2016 г.  
141 ген, молекулярное баркодирование, возможность анализа  
CNV, + GC – богатые регионы



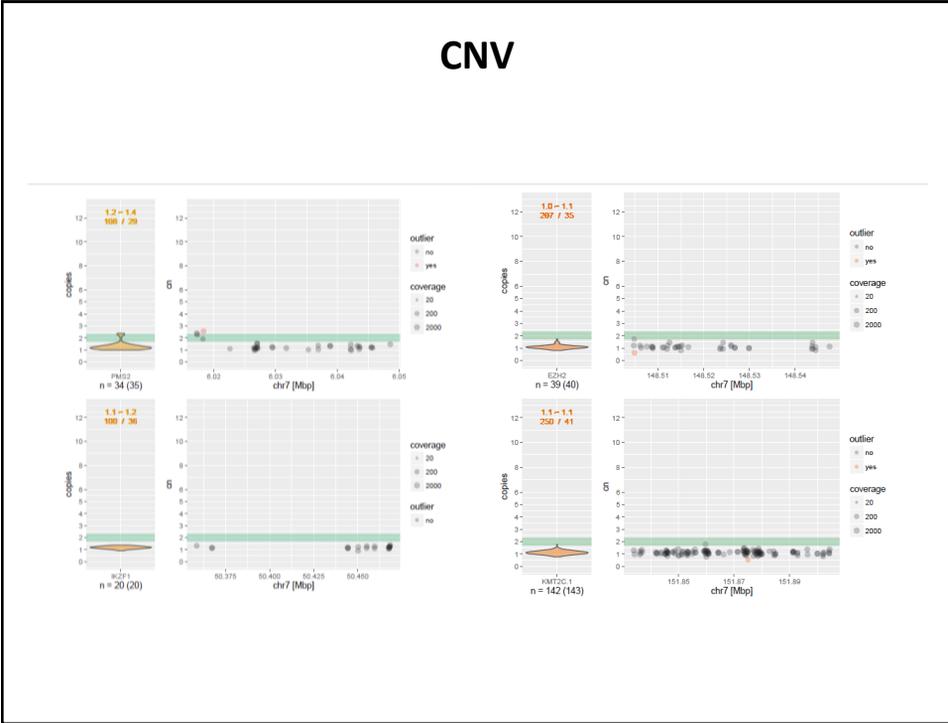
Mean read depth 570  
On target – 95,4%  
Q>30 – 98%



186



# CNV



Спасибо за внимание

