



Εφαρμογές της PCR στις αιματολογικές κακοήθειες



Μ. Σπελέτας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ιατρική Σχολή,

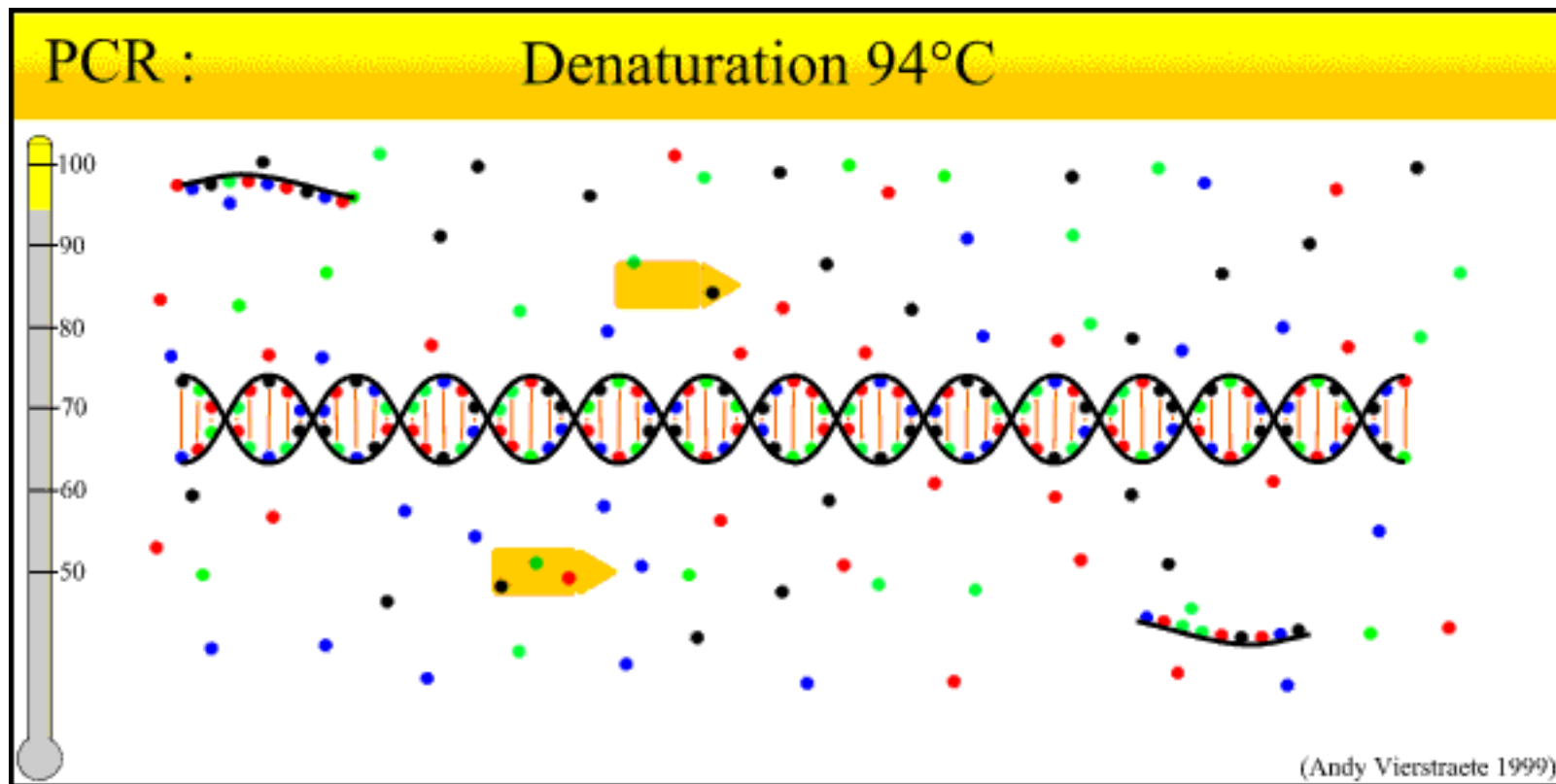
Λάρισα



Εφαρμογές της PCR στις αιματολογικές κακοήθειες

«Beginning with a single molecule of the genetic material DNA, the PCR can generate 100 billion similar molecules in an afternoon. The reaction is easy to execute. It requires no more than a test tube, a few simple reagents, and a source of heat».

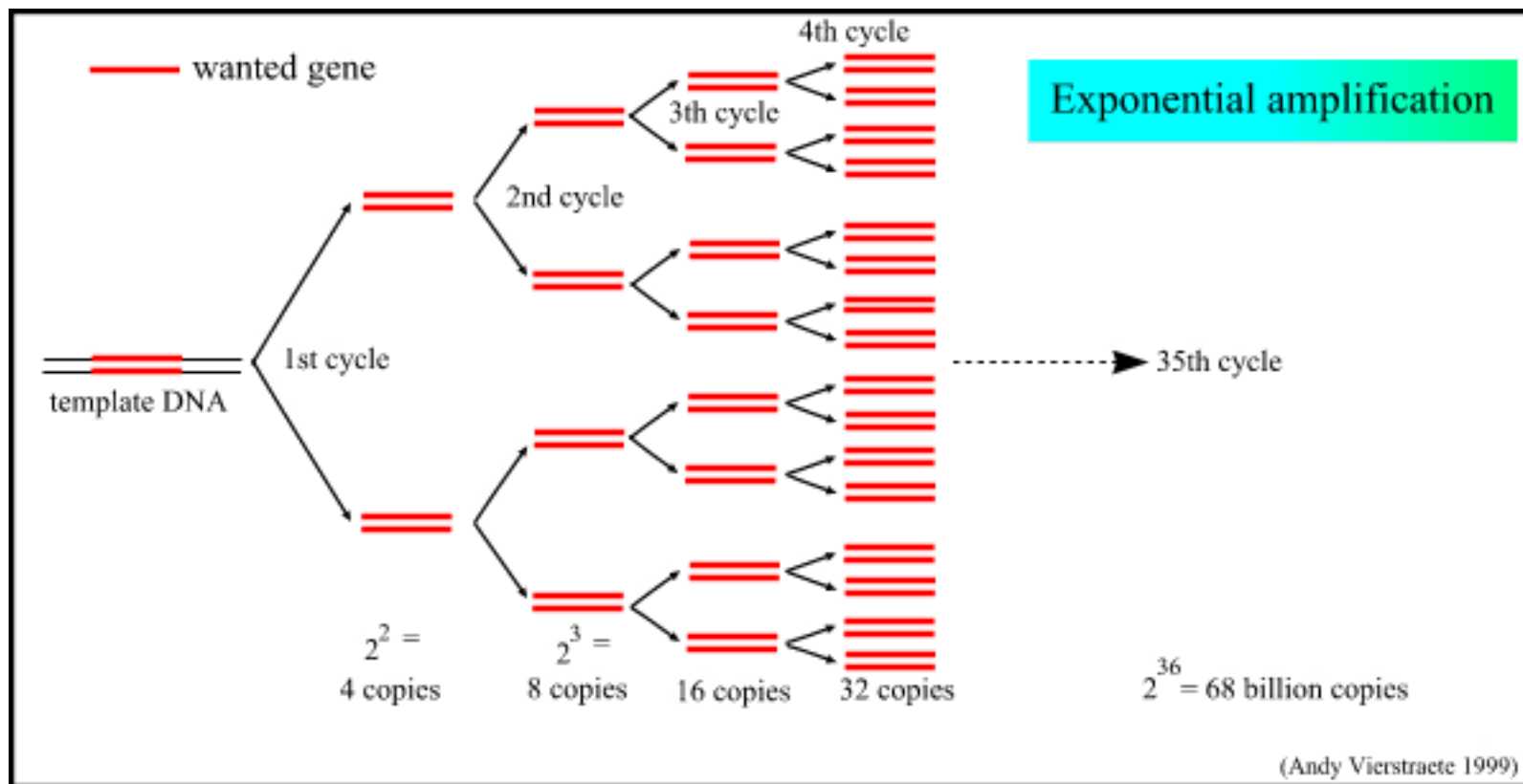
K. Mullis, *Scientific American* 1990;262:56–65.



Εφαρμογές της PCR στις αιματολογικές κακοήθειες

«Beginning with a single molecule of the genetic material DNA, the PCR can generate 100 billion similar molecules in an afternoon. The reaction is easy to execute. It requires no more than a test tube, a few simple reagents, and a source of heat».

K. Mullis, *Scientific American* 1990;262:56–65.



Πίνακας 1. Μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς (δεν περιλαμβάνονται τεχνικές μοριακής κυτταρογενετικής).

Εξετάσεις ανίχνευσης ειδικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών

- PCR (αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης σε επίπεδο DNA)
- RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης ανάλυση σε επίπεδο RNA)
- Real-time PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου)
- Γονοτύπιση για την ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών

Εξετάσεις για την ανάδειξη του μοντέλου έκφρασης γονιδίων

- Ανάλυση μικροσυστοιχιών (microarrays)*

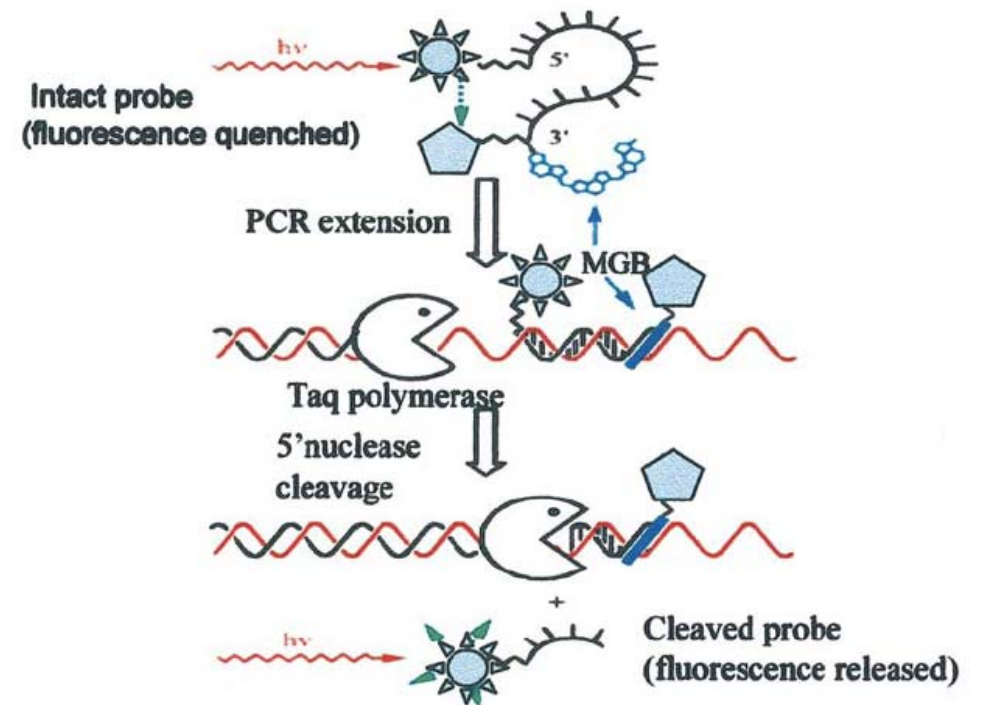
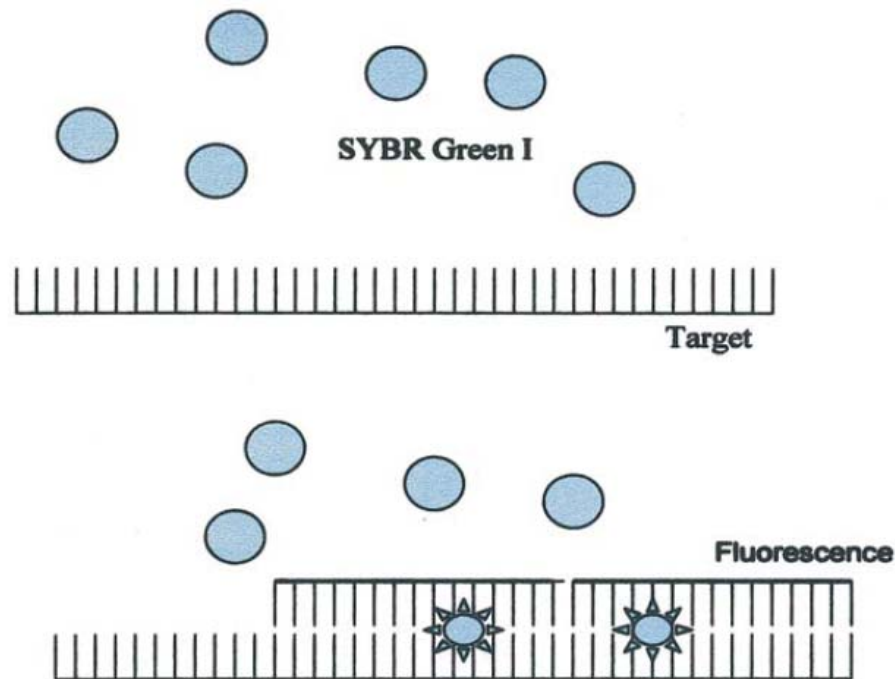
Εξετάσεις για την ανίχνευση ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (MRD-minimal residual disease)

- Φωλιασμένη (nested) PCR
- Ποσοτική (quantitative) real-time PCR (Q-PCR ή Q-RT-PCR)

* χρήση σήμερα μόνο για ερευνητικούς σκοπούς



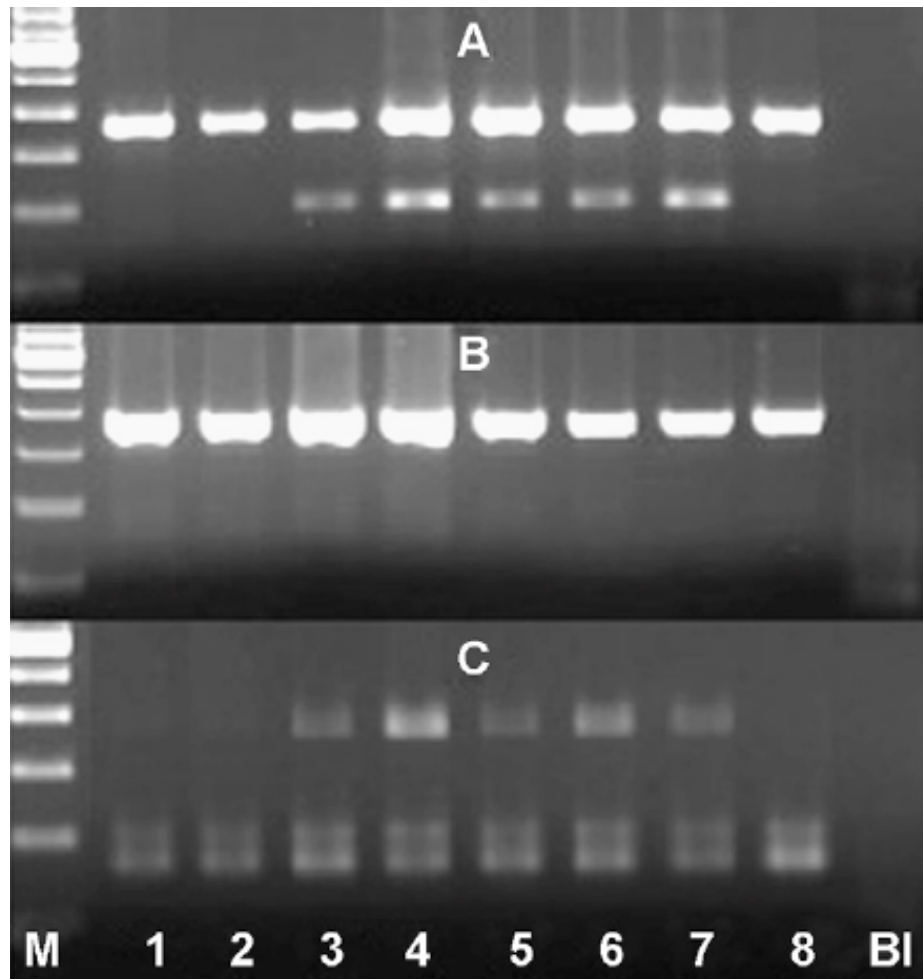
Εφαρμογές της PCR στις αιματολογικές κακοήθειες



Παραλλαγές της βασικής τεχνικής PCR

- Allele-specific PCR και PCR-RFLP
- Assembly PCR ή Polymerase Cycling Assembly (PCA)
- Asymmetric PCR και Linear-After-The-Exponential-PCR (LATE-PCR)
- Helicase-dependent amplification
- Hot-start PCR
- Intersequence-specific PCR (ISSR)
- Inverse PCR
- Ligation-mediated PCR και Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)
- Methylation specific PCR (MSP)
- Miniprimer PCR
- Multiplex-PCR
- Overlap-extension PCR
- Solid Phase PCR
- TAIL-PCR: Thermal asymmetric interlaced PCR
- Touchdown PCR
- Universal Fast Walking





Allele-specific PCR (A)

PCR-RFLP (B,C)

Speletas et al, Leukemia Research 2007

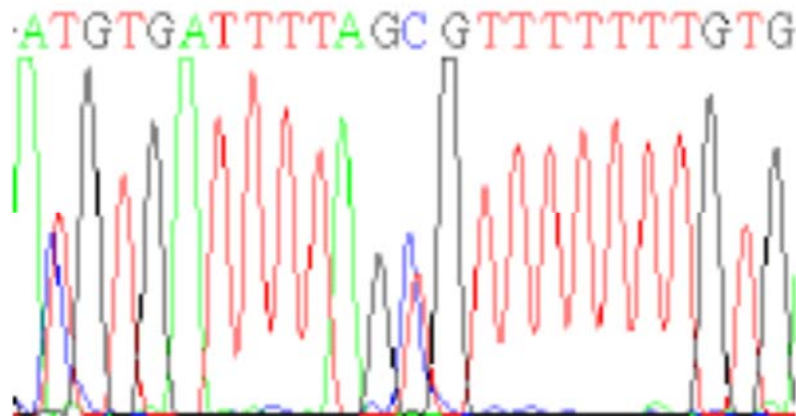


Παραλλαγές της βασικής τεχνικής PCR

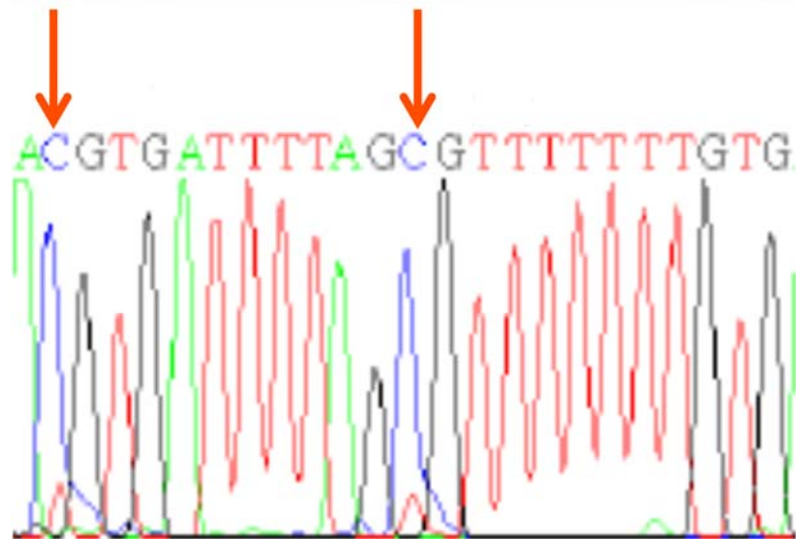
- Allele-specific PCR και PCR-RFLP
- Assembly PCR ή Polymerase Cycling Assembly (PCA)
- Asymmetric PCR και Linear-After-The-Exponential-PCR (LATE-PCR)
- Helicase-dependent amplification
- **Hot-start PCR**
- Intersequence-specific PCR (ISSR)
- Inverse PCR
- Ligation-mediated PCR και Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)
- **Methylation specific PCR (MSP)**
- Miniprimer PCR
- Multiplex-PCR
- Overlap-extension PCR
- Solid Phase PCR
- TAIL-PCR: Thermal asymmetric interlaced PCR
- **Touchdown PCR**
- Universal Fast Walking



Methylation specific PCR and sequencing after bisulfite modification of DNA



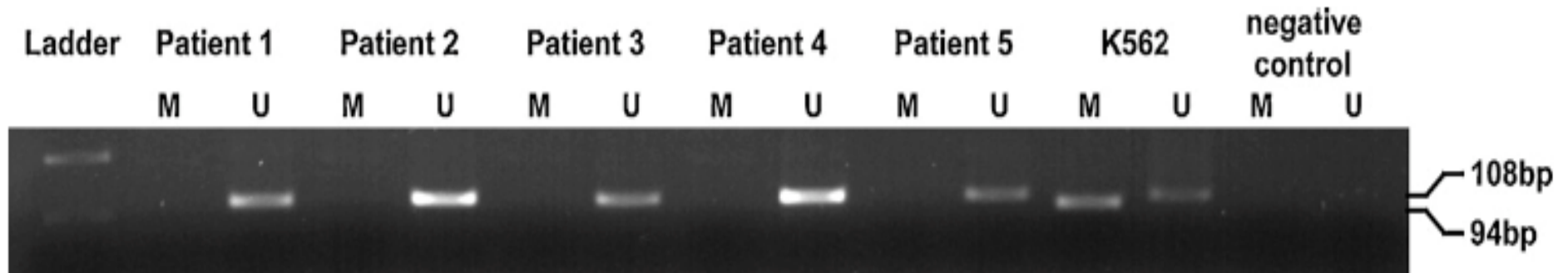
Wild-type



Patient 1



Methylation specific PCR (MSP)



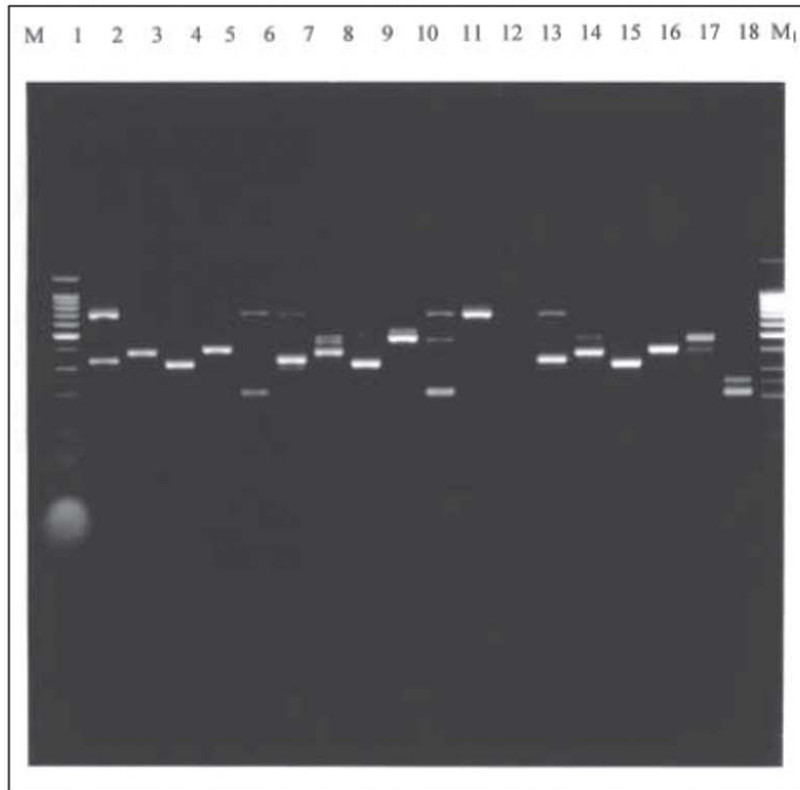
Avramouli et al, Leukemia Research 2009



Παραλλαγές της βασικής τεχνικής PCR

- Allele-specific PCR και PCR-RFLP
- Assembly PCR ή Polymerase Cycling Assembly (PCA)
- Asymmetric PCR και Linear-After-The-Exponential-PCR (LATE-PCR)
- Helicase-dependent amplification
- Hot-start PCR
- Intersequence-specific PCR (ISSR)
- Inverse PCR
- Ligation-mediated PCR και Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)
- Methylation specific PCR (MSP)
- Miniprimer PCR
- **Multiplex-PCR**
- Overlap-extension PCR
- Solid Phase PCR
- TAIL-PCR: Thermal asymmetric interlaced PCR
- Touchdown PCR
- Universal Fast Walking





Multiplex-PCR

Detection of:

- *BCR-ABL* / t(9;22)
- *E2A-PBX1* / t(1;19)
- *MLL-AF4* / t(4;11)
- *TEL-AML1* (also termed *ETV6-CBFA2*) / t(12;21).

M = 100 bp DNA molecular marker.

Lanes 1-5 = representative patient samples with fusion transcripts.

Lane 6 = positive control cell line REH.

Lane 7 = positive control cell line 697.

Lane 8 = positive control cell line Sup B15

Lane 9 = positive control cell line K562

Lane 10 = positive control cell line RS4

Lane 11 = negative control cell line HL60

Lane 12 = negative control, H2O (no cDNA)

Lane 13-18 = split-out PCR on patient samples found to be positive
in multiplex reaction

M1 = 50 bp DNA molecular marker

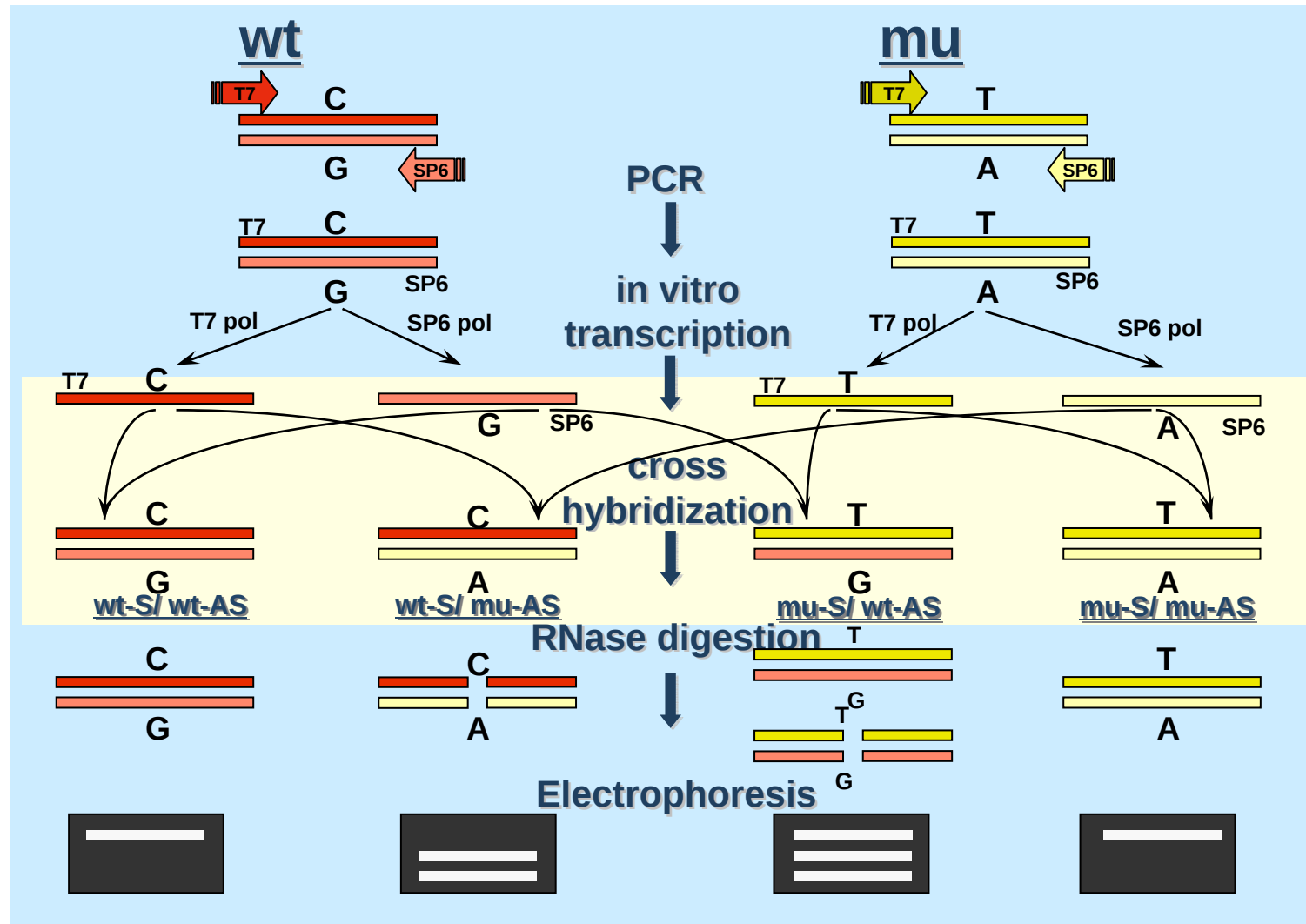


Παραλλαγές της βασικής τεχνικής PCR

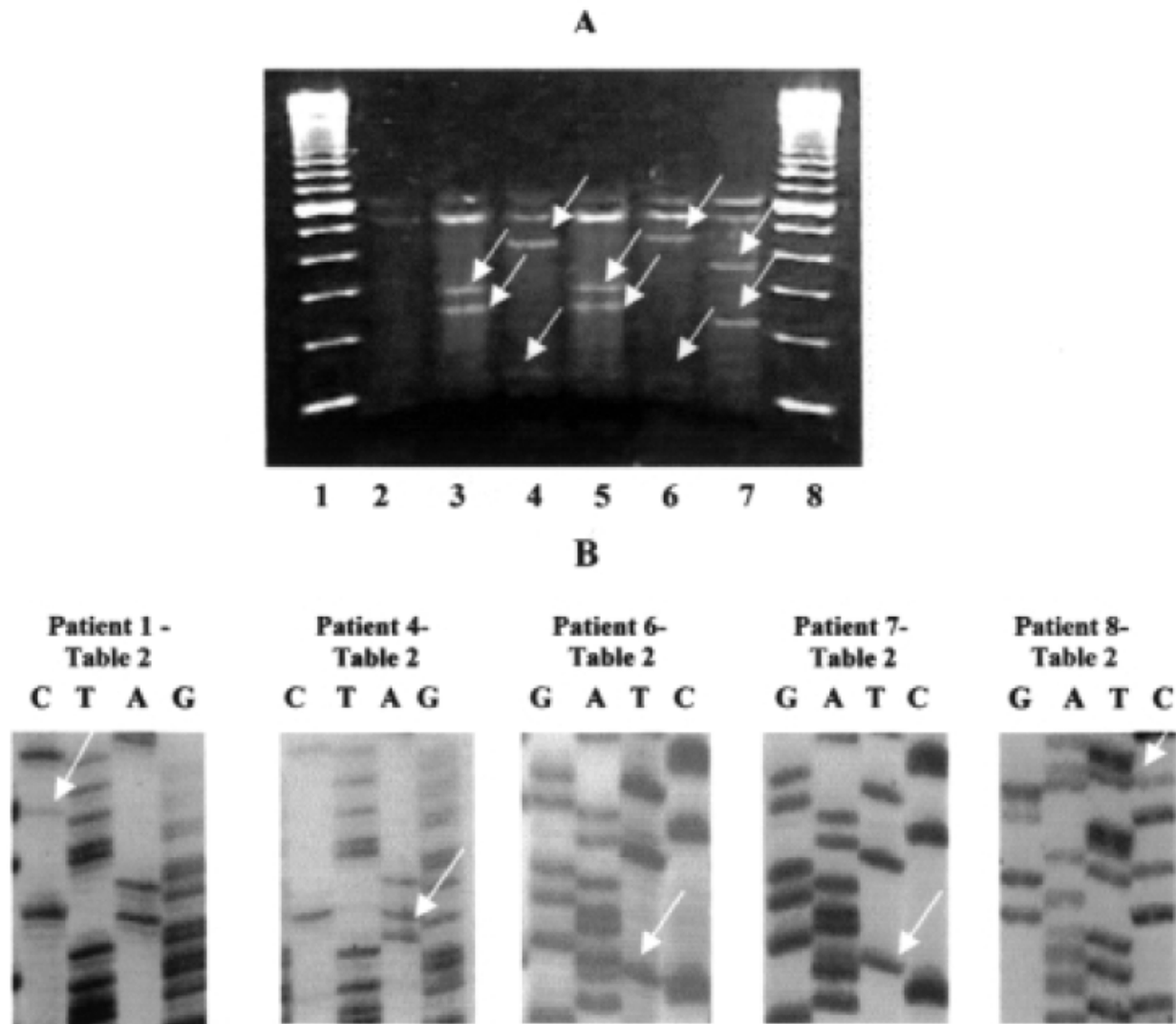
- Allele-specific PCR και PCR-RFLP
- Assembly PCR ή Polymerase Cycling Assembly (PCA)
- Asymmetric PCR και Linear-After-The-Exponential-PCR (LATE-PCR)
- Helicase-dependent amplification
- Hot-start PCR
- Intersequence-specific PCR (ISSR)
- Inverse PCR
- Ligation-mediated PCR και Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)
- Methylation specific PCR (MSP)
- Miniprimer PCR
- Multiplex-PCR
- **Overlap-extension PCR**
- Solid Phase PCR
- TAIL-PCR: Thermal asymmetric interlaced PCR
- Touchdown PCR
- Universal Fast Walking



NIRCA (Non Isotopic RNase Cleavage Assay)

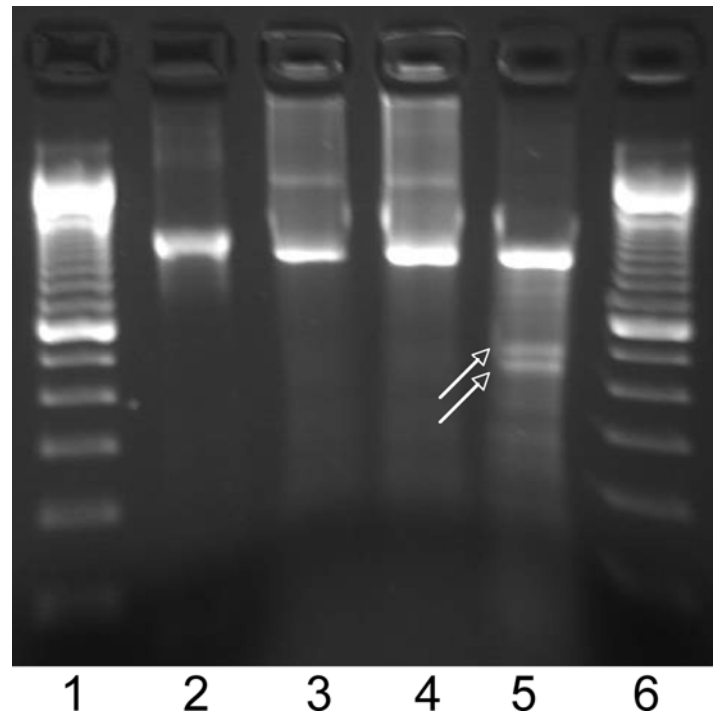


Εφαρμογές της PCR στις αιματολογικές κακοήθειες

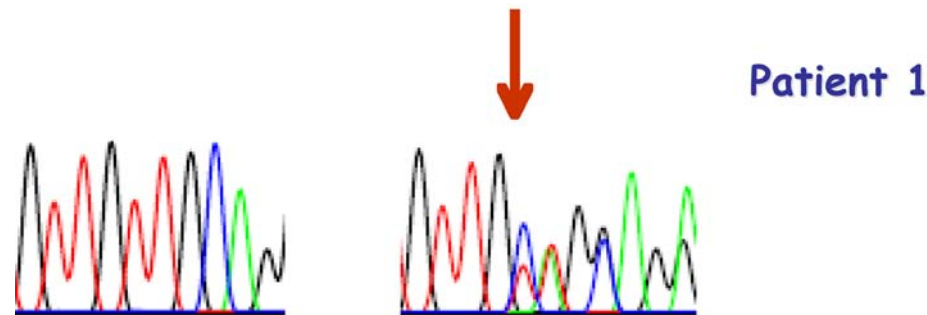


Speletas et al, Haematologica 2001

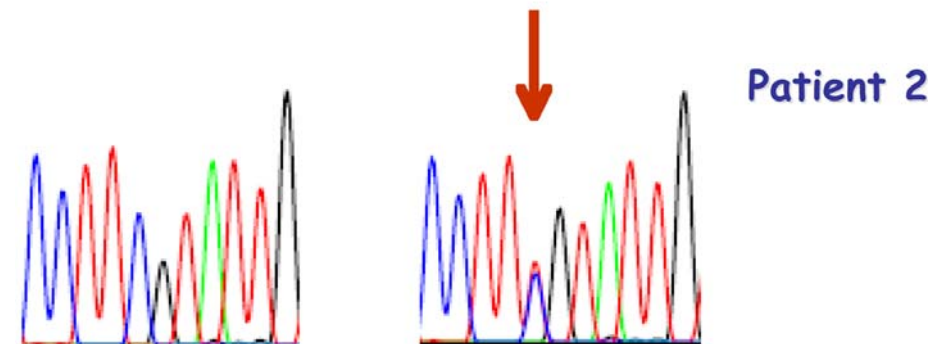




WT
GTTGTTGCAG
delGTT(914-916)
→V162Δ
GTTGCNGNAGA



WT
CCTTCGTATTG
G963A→R178G
CCTTNGTATTG'



Speletas et al, Blood Cell Mol Dis 2008



Εφαρμογές της PCR στις αιματολογικές κακοήθειες

Πίνακας 2. Πλεονεκτήματα και περιορισμοί από τη χρήση μοριακών τεχνικών στη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες.

Πλεονεκτήματα	Παραδείγματα
Διάγνωση και καθορισμός θεραπείας	1. <i>PML-RARA</i> - All trans ρετινοϊκό οξύ 2. <i>BCR-ABL</i> - TKIs
Διαφορική διάγνωση νοσημάτων	1. άτυπα λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα (κλωνικότητα B ή T κυττάρων) 2. άτυπα μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα (<i>JAK2-V617F</i> , <i>BCR-ABL</i>)
Ανάδειξη ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων μη αντιληπτών με άλλες κλασσικές τεχνικές, όπως η κλασσική κυτταρογενετική	1. ΧΗΛ - <i>FIP1L1-PDGFR</i> 2. ΟΜΛ - <i>CBFα2/ETO</i> , <i>CBFβ/MYH11</i> , <i>PML-RARA</i> , μερικός διπλασιασμός <i>MLL</i> , μεταλλάξεις ή τυχαίος διπλασιασμός <i>FLT3</i> , μεταλλάξεις <i>NPM1</i>
Καθορισμός προγνωστικών δεικτών, για έγκαιρη μεταβολή θεραπευτικών επιλογών	3. ΟΛΛ - <i>ETV6/CBFα2</i> , <i>BCR-ABL</i> 1. Ανάλυση μικροσυστοιχιών σε υψηλού βαθμού κακοήθειας NHL 2. Σωματικές υπερμεταλλάξεις IgH σε B-ΧΛΛ 3. <i>API2/MLT</i> σε MALT NHL
Ανίχνευση ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου	1. ΟΛΛ (παιδιά) 2. διάγνωση πρώιμης υποτροπής σε ΧΜΛ ή ΟΜΛ 3. «καθαρότητα» αυτόλ. μοσχευμάτων
Τεχνικοί λόγοι	1. μελέτη αρχειακού υλικού 2. μεγάλη ευαισθησία
Περιορισμοί	
«Ψευδώς θετικά» αποτελέσματα	1. Ανίχνευση ανασυνδυασμών ή μεταλλάξεων σε φυσιολογικά άτομα 2. Ανίχνευση κλωνικών πληθυσμών T ή B κυττάρων, χωρίς παρουσία νεοπλασίας
Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα	1. Μη ανίχνευση κλωνικότητας σε B-λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα ή ΟΛΛ 2. <i>t(11;14)</i> – στο 50% περιπτώσεων



Ειδικά σε περιπτώσεις όπου:

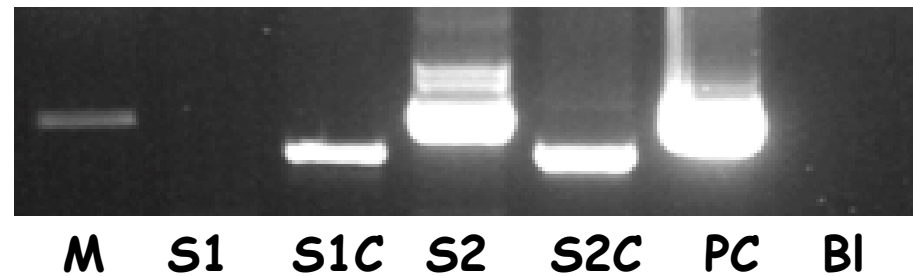
- (1) η ποσότητα του αναλυόμενου ιστού είναι μικρή (FNA)
- (2) η ιστολογία και ο ανοσοφαινότυπος παρέχουν ασαφείς ενδείξεις
- (3) η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση συνήθως δεν μπορεί να καθορίσει την παρουσία κλωνικότητας (όπως σε T-LPD, σε αντίθεση με τα B-LPD, όπου χρησιμοποιείται ο λόγος της έκφρασης των ελαφρών αλύσεων των ανοσοσφαιρινών)
- (4) διαφορική διάγνωση νεοπλασματικών λεμφοβλαστών και αιματογονίων
- (5) σε MPD ή MDS, με φυσιολογικά ευρήματα από τον καρυότυπο, η ανίχνευση (σε γυναίκες) κλωνικού πληθυσμού (με την τεχνική HUMARA για την ανίχνευση XCI-P-X chromosome inactivation pattern)



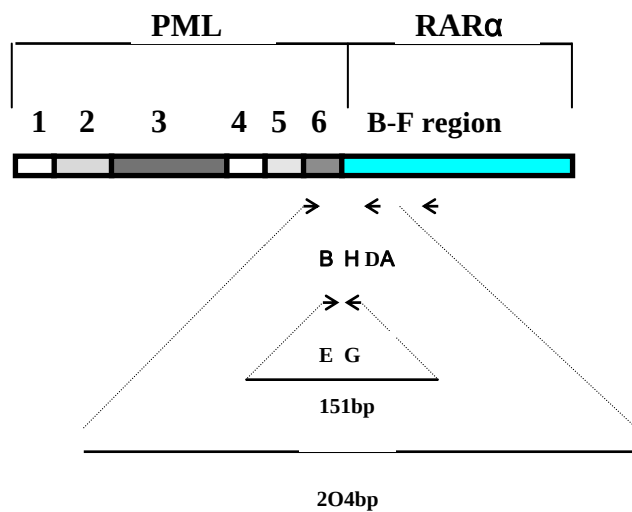
1. Διάγνωση και καθορισμός θεραπείας

- CML - **BCR-ABL**/imatinib, TKIs
- APL - **PML-RARA**/all-trans retinoic acid
- CEL - **FIP1L1-PDGFR**/imatinib

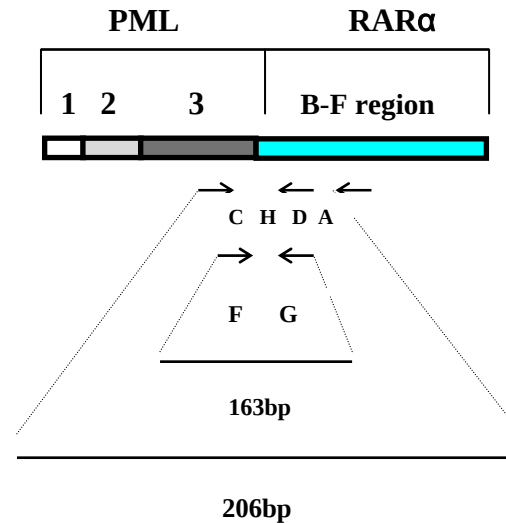
Detection BCR-ABL rearrangement



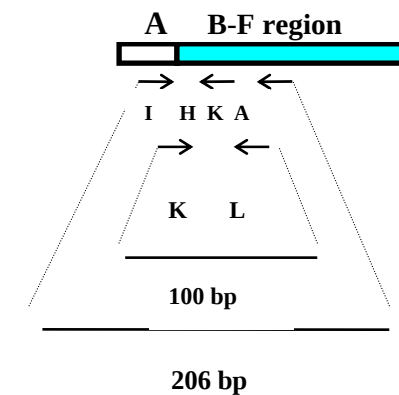
1. Διάγνωση και καθορισμός θεραπείας



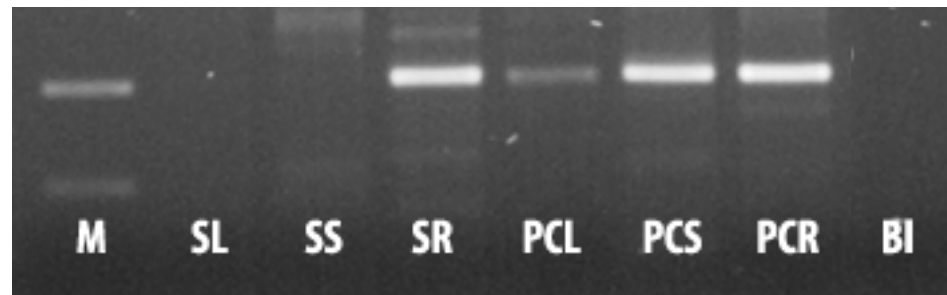
PML-RARα (L)



PML-RARα (S)

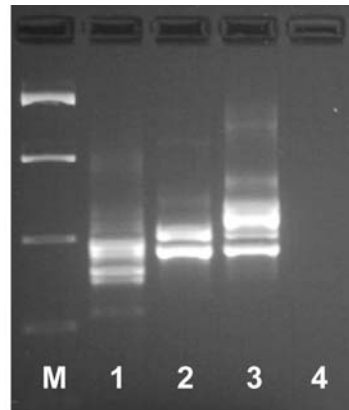


Normal RARα



Εφαρμογές της PCR στις αιματολογικές κακοήθειες - Πλεονεκτήματα

A.

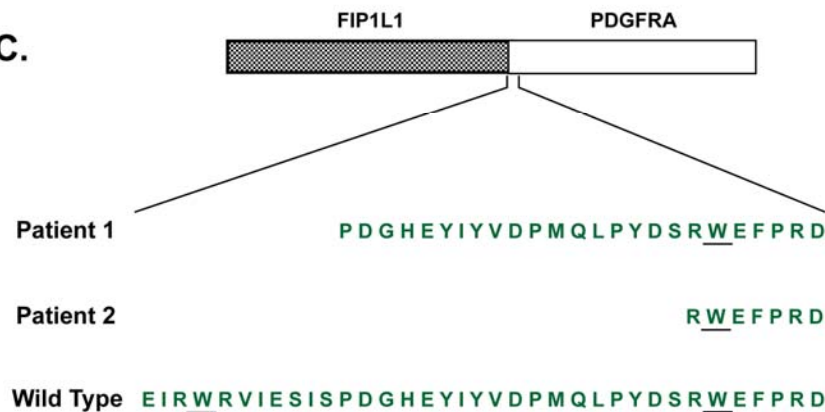


B.

Patient 1
 FIP1L1 exon 8 PDGFRA exon 12
 aagactgggcttcaccgagcag CCCGGATGGACATGAA
 K T G L P P S S P D G H E

Patient 2
 FIP1L1 exon 8α PDGFRA exon 12
 agggccgaatcacctgatctaag ATGGGAGTTTCCAAGA
 R A E S P D L R W E F P R

C.

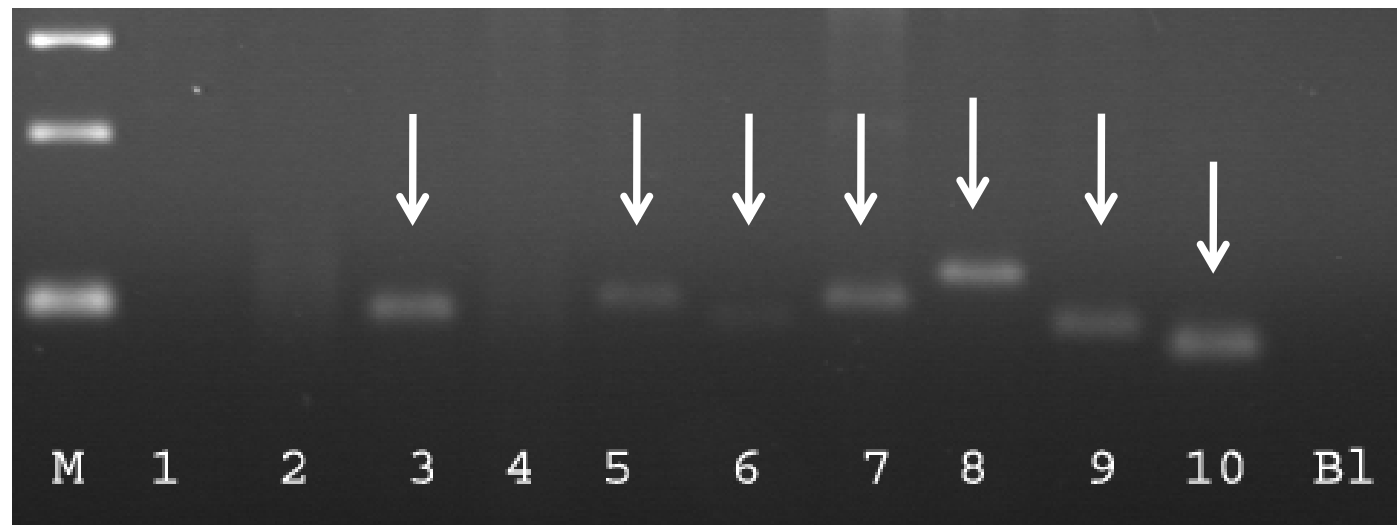


Loules et al, BMC Blood Dis 2009



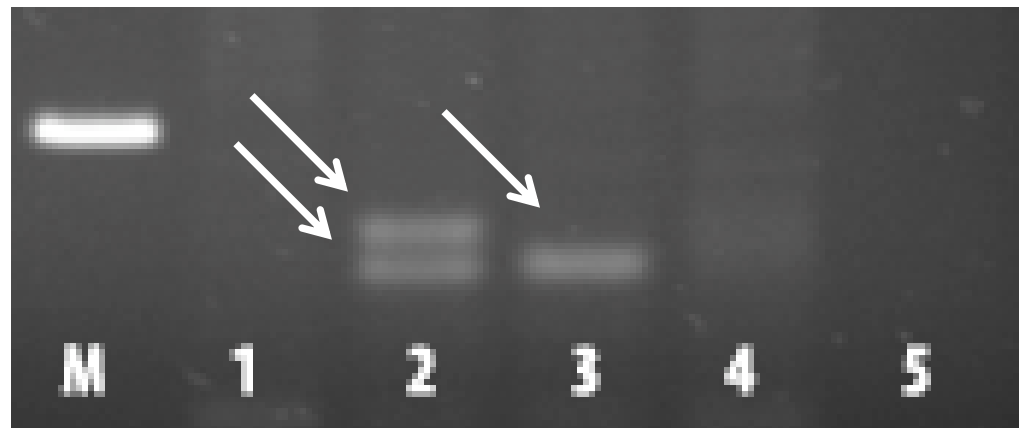
2. Διαφορική διάγνωση νοσημάτων

- Άτυπα λεμφοπαραγωγά σύνδρομα - **VDJ/CDRIII, TCR γ**
- Άτυπα μυελοπαραγωγά σύνδρομα - **BCR-ABL, JAK2-V617F**



2. Διαφορική διάγνωση νοσημάτων

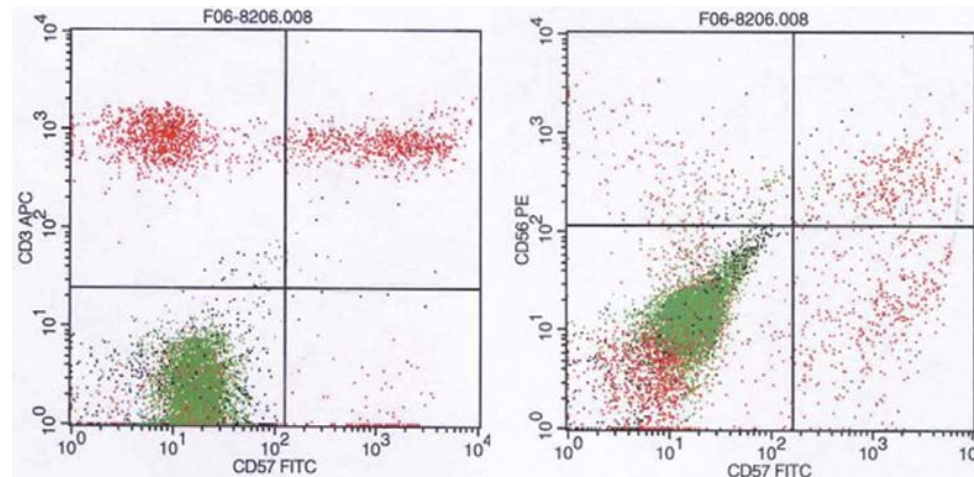
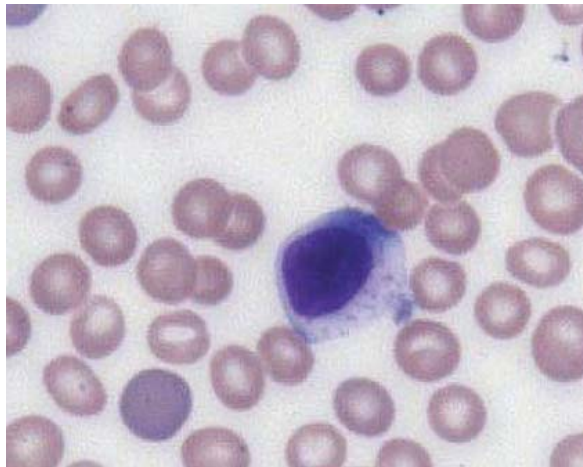
- Άτυπα λεμφοπαραγωγά σύνδρομα - **VDJ/CDRIII, TCR γ**
- Άτυπα μυελοπαραγωγά σύνδρομα - **BCR-ABL, JAK2-V617F**



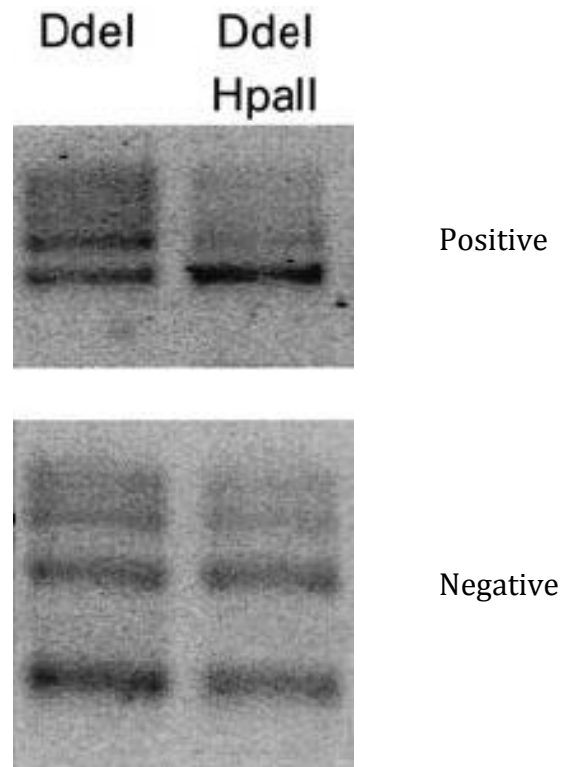
Therapeutic implications of T-cell clonopathy of unknown significance in chronic immune thrombocytopenic purpura

INDU SABNANI¹ & PATRICIA TSANG²

¹*Frederick B. Cohen Comprehensive Cancer and Blood Disorders Center, Newark Beth Israel Medical Center, Newark, NJ, USA, and* ²*Department of Laboratory Medicine and Pathology, Newark Beth Israel Medical Center, Newark, NJ, USA*



XCIP by HUMARA



3. Ανάδειξη ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων μη αντιληπτών με άλλες τεχνικές, όπως η κλασσική κυτταρογενετική

- CEL - FIP1L1-PDGFR

- AML - CBF α 2/ETO, CBF β /MYH11, PML-RARA, μερικός διπλασιασμός MLL, μεταλλάξεις ή τυχαίος διπλασιασμός FLT3, μεταλλάξεις NPM1

- ALL - ETV6/CBF α 2, BCR-ABL



3. Ανάδειξη ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων μη αντιληπτών με άλλες τεχνικές, όπως η κλασσική κυτταρογενετική

TABLE 2. Cytogenetic Stratification of Acute Nonlymphoblastic Leukemia (ANLL)

Risk group	Genetics	Frequency	CR rate	5-year survival
Favorable	t(8;21), t(15;17), inv(16)	≈25% (≈5%)	≈85% (≈70%)	≈60% (≈35%)
Intermediate	Normal, +8, +21, 11q23	≈50% (≈63%)	≈80% (≈60%)	≈40% (≈13%)
Unfavorable	-5, -7, 3q complex	≈25% (≈32%)	≈60% (≈25%)	≈15% (≈2%)

Abbreviation: CR, complete remission.

NOTE. The percentages are derived from combined data from CALGB, UK-MRC, and US-intergroup data for young (<55- or 60-year-old) patients with ANLL. The percentages in parentheses are for older patients with ANLL. Although the distribution of the risk groups is different, the prognostic relevance is still retained, albeit with worse CR rates and 5-year survivals.

Bagg A, Hum Pathol 2003

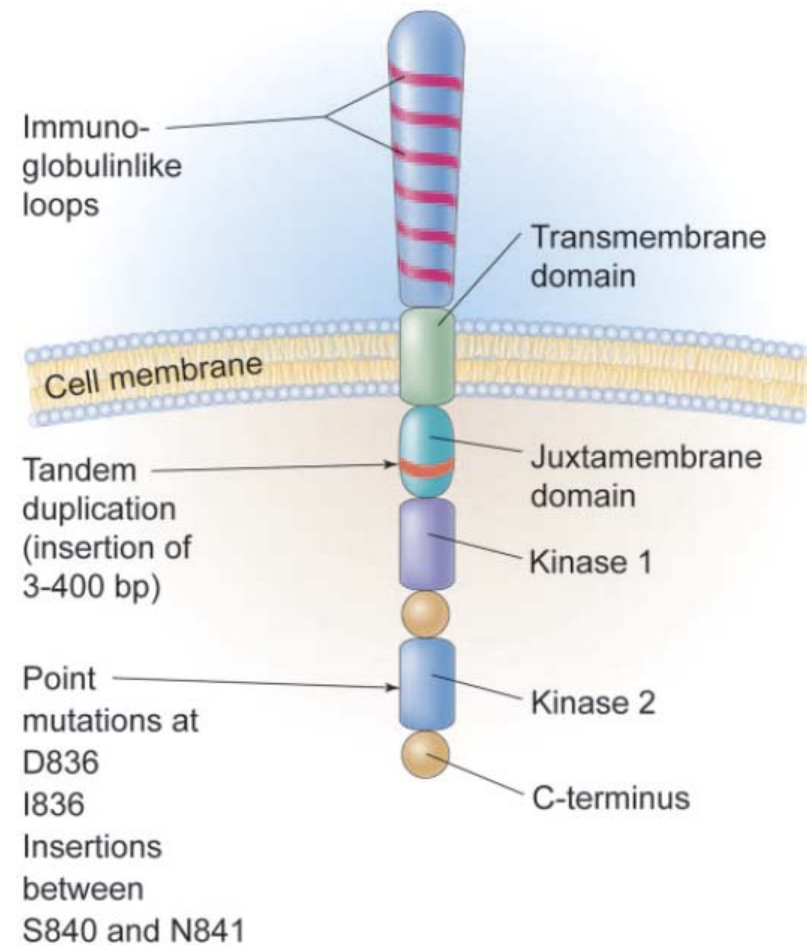


3. Ανάδειξη ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων μη αντιληπτών με άλλες τεχνικές, όπως η κλασσική κυτταρογενετική

- AML - μεταλλάξεις ή τυχαίος διπλασιασμός (ITD) FLT3

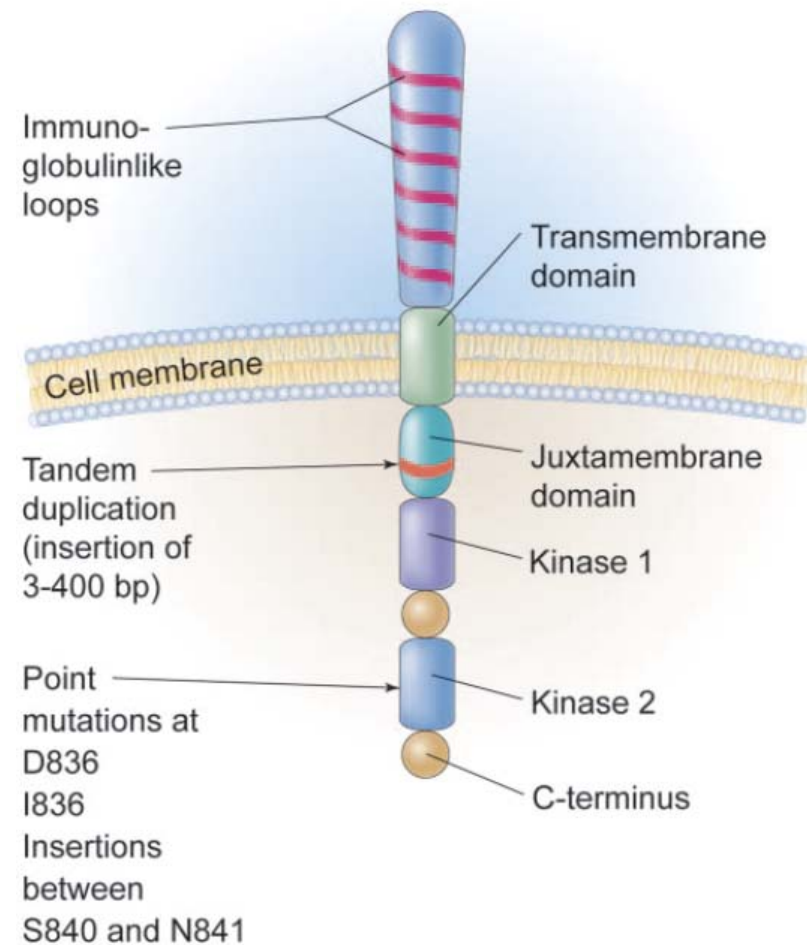
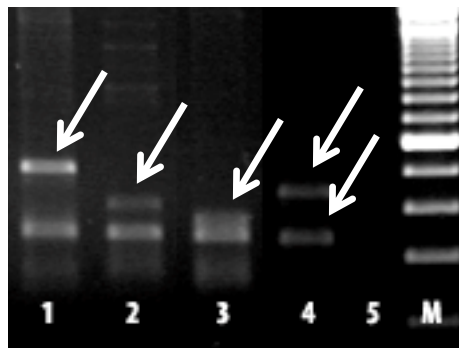
ITD - 23% of AML patients

D836X - 7% of AML patients

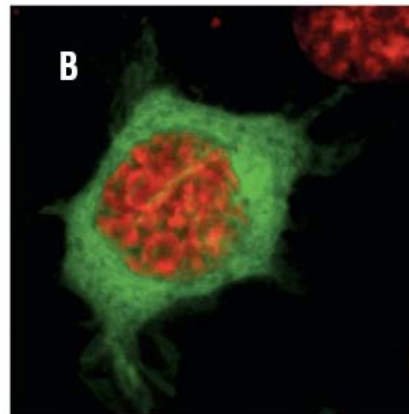
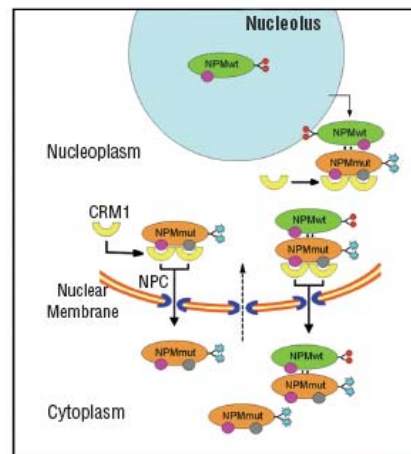
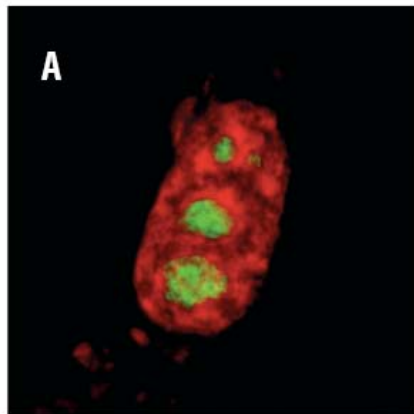
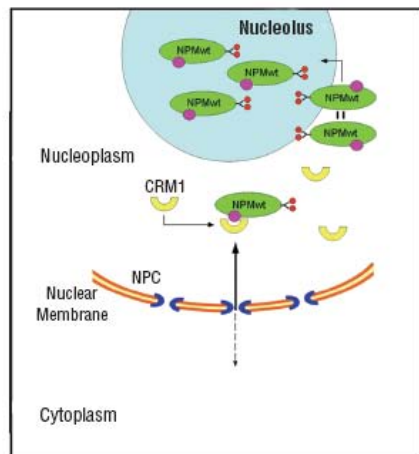


3. Ανάδειξη ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων μη αντιληπτών με άλλες τεχνικές, όπως η κλασσική κυτταρογενετική

- AML - μεταλλάξεις ή τυχαίος διπλασιασμός (ITD) FLT3

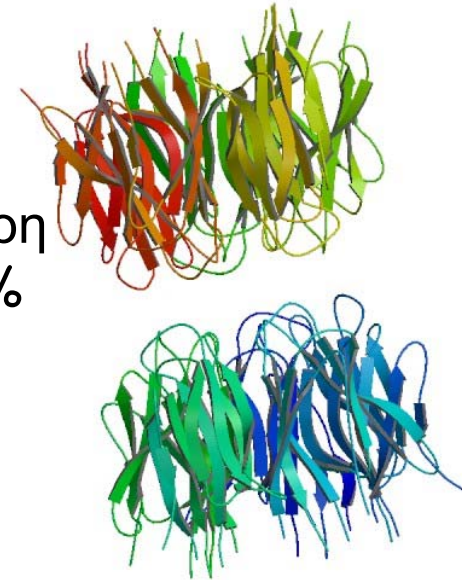


NPM1 (νουκλεοφωσμίνη)



NPM1 (νουκλεοφосμίνη)

- Μεταλλάξεις του *NPM1* γονιδίου είναι η συχνότερη γενετική ανωμαλία σε ασθενείς με *AML* (24-35% όλων των περιπτώσεων, 43-62% επί φυσιολογικού καρυότυπου)
- Δεν ανευρίσκονται σε παιδιά με *AML* <3 ετών
- Σχετίζονται με
 - φύλο (γυναίκες)
 - αυξημένο ποσοστό βλαστών
 - αυξημένα επίπεδα LDH, WBC, PLT
 - αυξημένη έκφραση CD33
 - χαμηλή ή απουσία έκφρασης του CD34
 - στο 85% των περιπτώσεων παρατηρούνται επί φυσιολογικού καρυότυπου

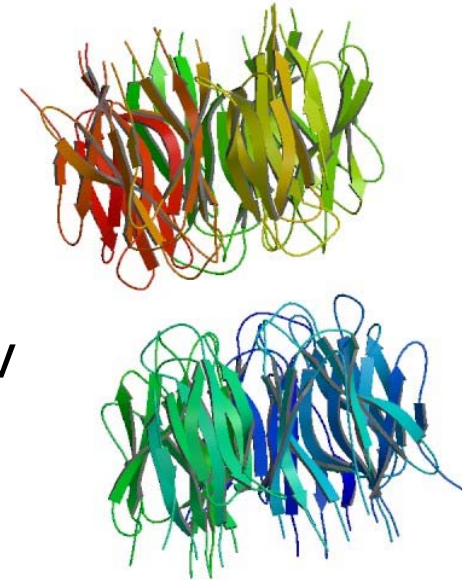


Dohner et al, 2005; Schnittger et al, 2005; Thiede et al, 2006; Schlenk et al, 2008



NPM1 (νουκλεοφосμίνη)

- **NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{neg}**
 - ευνοϊκότερη πρόγνωση των ασθενών και καλύτερη ανταπόκριση σε χημειοθεραπεία
 - Υπερήλικες ανταποκρίνονται καλύτερα σε θεραπεία διαφοροποίησης με all-trans ρετινοϊκό οξύ, όταν αυτό χορηγείται σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία



Dohner et al, 2005; Schnittger et al, 2005; Thiede et al, 2006; Schlenk et al, 2008



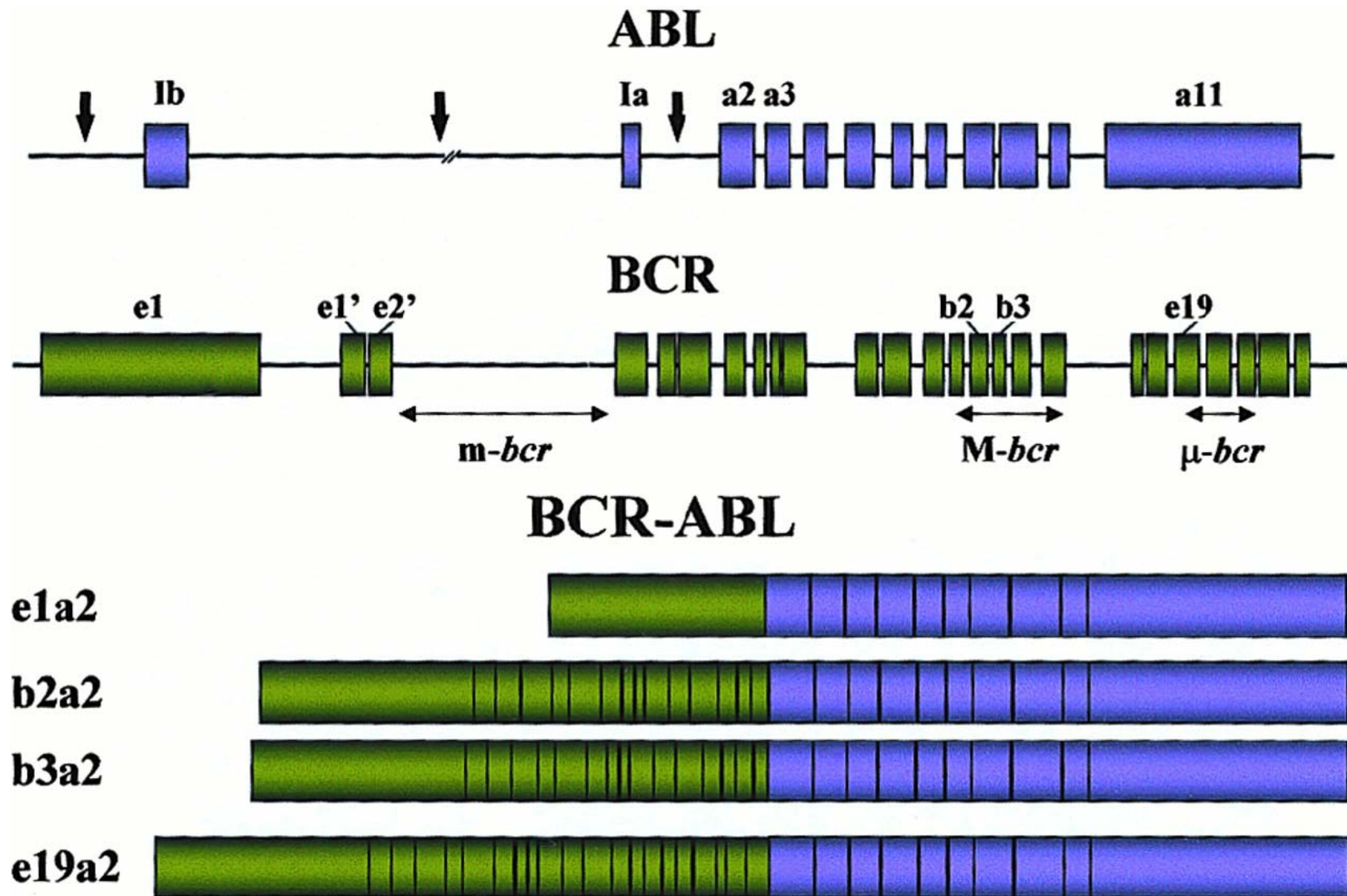
3. Ανάδειξη ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων μη αντιληπτών με άλλες τεχνικές, όπως η κλασσική κυτταρογενετική

- CEL - FIP1L1-PDGFR

- AML - CBF α 2/ETO, CBF β /MYH11, PML-RARA, μερικός διπλασιασμός MLL, μεταλλάξεις ή τυχαίος διπλασιασμός FLT3, μεταλλάξεις NPM1, έκφραση WT1

- ALL - ETV6/CBF α 2, BCR-ABL





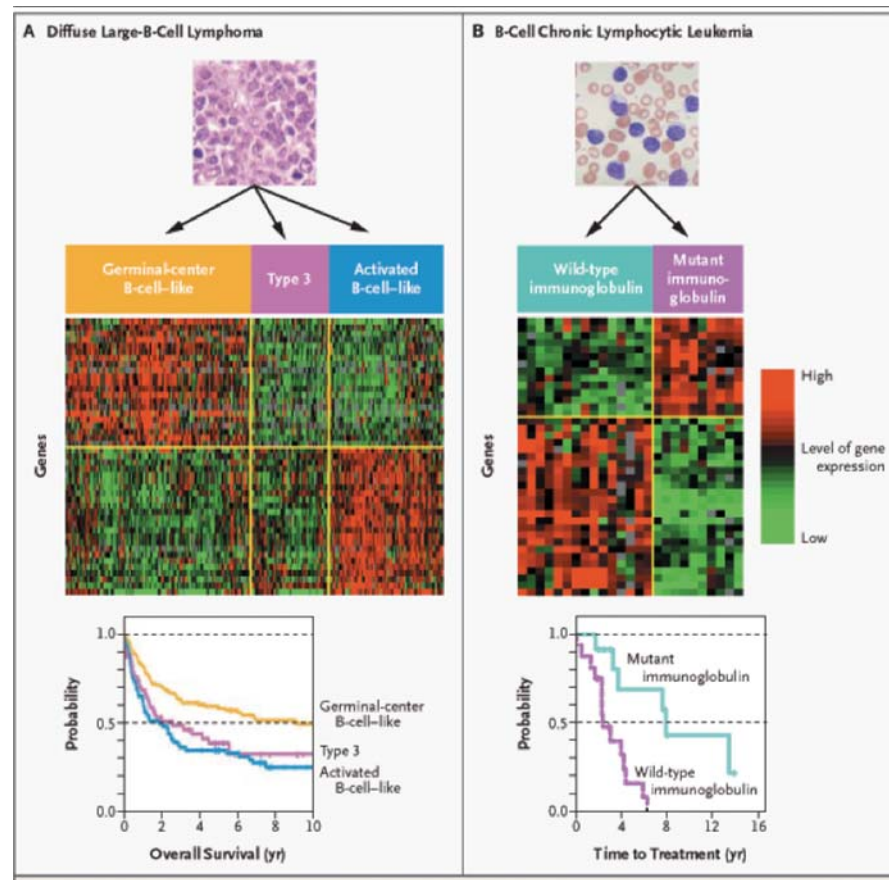
4. Μελέτη της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου

- οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία - **VDJ-CDRIII**
- διάγνωση πρώιμης υποτροπής σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία - **BCR-ABL**
- μεταμόσχευση μυελού των οστών - **αυτόλογα μοσχεύματα**

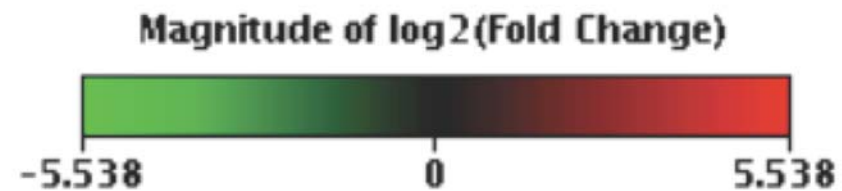
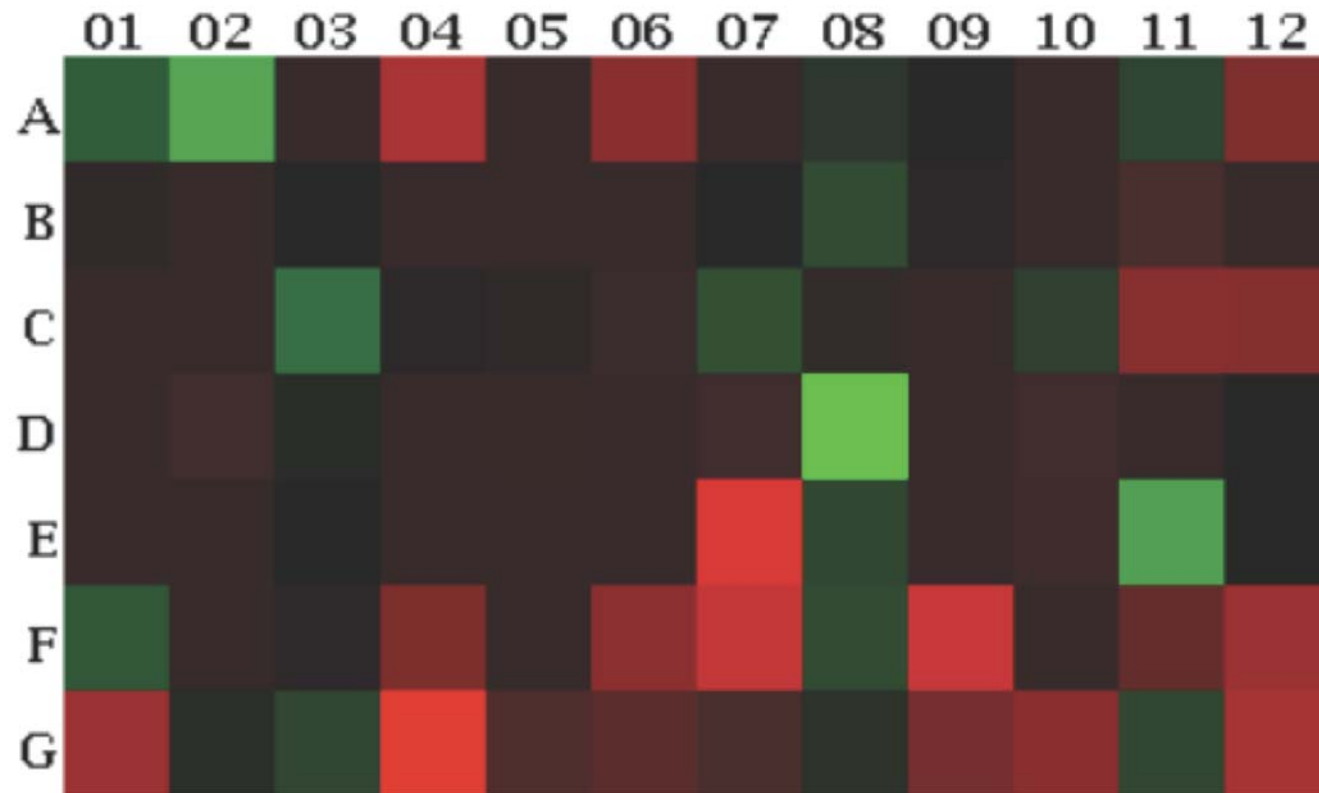


5. Καθορισμός προγνωστικών δεικτών για έγκαιρη μεταβολή θεραπευτικών επιλογών

- Diffuse large B cell lymphoma - **microarrays**



Εφαρμογές της PCR στις αιματολογικές κακοήθειες - Πλεονεκτήματα

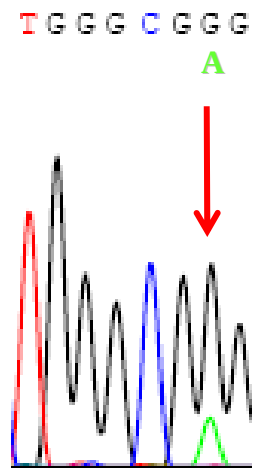


5. Καθορισμός προγνωστικών δεικτών για έγκαιρη μεταβολή θεραπευτικών επιλογών

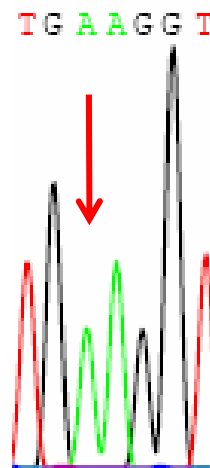
- Diffuse large B cell lymphoma - **microarrays**
- B-CLL - **υπερμεταλλάξεις IgH**
- MALT λέμφωμα στομάχου - **t(11;18) - API2/MLT**
- CML - **μεταλλάξεις *abl***



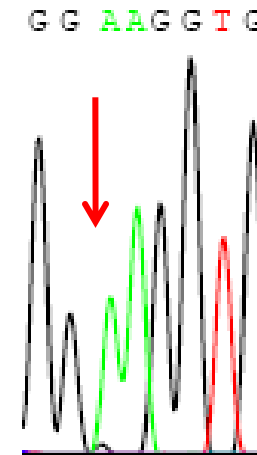
Εφαρμογές της PCR στις αιματολογικές κακοήθειες - Πλεονεκτήματα



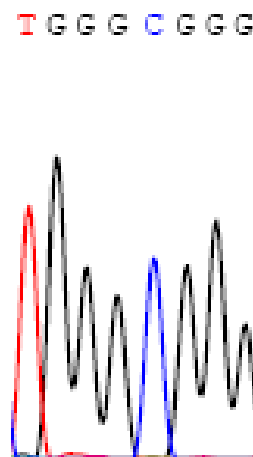
G250V



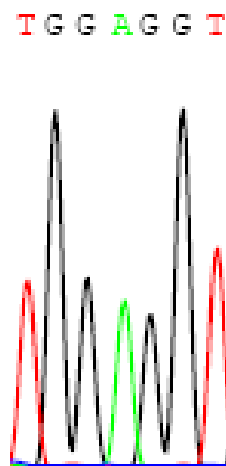
E279K



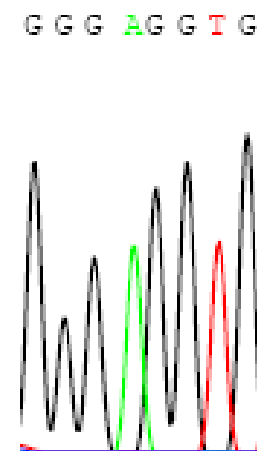
E255K



WT



WT



WT



6. «Ψευδώς θετικά» αποτελέσματα

Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα



6. «Ψευδώς θετικά» αποτελέσματα

- Ανίχνευση ανασυνδυασμών ή μεταλλάξεων σε φυσιολογικά άτομα

Ανασυνδυασμός	Χιμαιρικό γονίδιο	Νόσημα	Φυσιολογικές καταστάσεις	Βιβλιογραφία
t (14;18)	BCL2-IgH	Οζώδες λέμφωμα	Άτομα μεγάλης ηλικίας, καπνιστές Ηπατίτιδα C, με ή χωρίς κρυοσφαιριναιμία (εξαφανίζεται με αντιϊκή αγωγή) Ασθενείς με πολυκλωνική B- λεμφοκυττάρωση	<i>Liu et al, 1994</i> <i>Zuckerman et al, 2001</i> <i>Delage et al, 2001</i>
t (9;22)	BCR-ABL	CML	Φυσιολογικά άτομα	<i>Bose et al, 1998</i>
t (12;21)	TEL-AML1	B-ALL	8.8% φυσιολογικών ατόμων	<i>Eguchi-Ishimae et al, 2001</i>
t (2;5)	NPM-ALK	Αναπλαστικό NHL	Ανίχνευση σε αντιδραστικούς λεμφαδένες	<i>Maes et al, 2001</i>
inv (2)	ATIC-ALK	Αναπλαστικό NHL	Ανίχνευση σε αντιδραστικούς λεμφαδένες	<i>Maes et al, 2001</i>
Μελέτη κλωνικότητας αντιγονικών υποδοχέων				
	IgH clonality	B-LPDs	Υλικό με λεμφοπενία (βιοψίες) Γαστρίτιδα από <i>Helicobacter pylori</i> Ηπατίτιδα C Σύνδρομο Sjogren, ρευματοειδής αρθρίτιδα Φυσιολογικά άτομα (3.5%, MLUS)	<i>Elenitoba-Johnson et al, 2000</i> <i>Saxena et al, 2000</i> <i>Zuckerman et al, 2001</i> <i>Bahler et al, 1998</i> <i>Wang et al, 2002; Rawstron et al 2002</i>
	TCR clonality	T-LPDs	Συμπαγείς όγκοι (T-πληθυσμοί) Αντιδραστικές δερματίτιδες Μετά BMT	<i>Lim et al, 2001</i> <i>Wood et al, 2001</i> <i>Gorochov et al, 1994</i>



6. Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα

- κλωνικότητα ανασυνδυασμού αντιγονικών υποδοχέων
 - Τη εκινητητών και προϊόντος PCR διαφέρει σημαντικά
 - χρήση consensus εκινητητών
 - σε B-ALL, ongoing ανασυνδυασμοί του υποδοχέα στο 1/3 των περιπτώσεων, ή παρουσία μερικού DJ αντί πλήρους VDJ ανασυνδυασμού,
 - deletion της βαρείας αλυσού (10% των λεμφωμάτων)
- t(11;14) στο λέμφωμα μανδύα (50% των περιπτώσεων) - προτιμάται η μελέτη με FISH, ή ανίχνευση κυκλίνης D1 με ανοσοϊστοχημεία.





Σας ευχαριστώ για
την προσοχή σας!



Μ. Σπελέτας

Ιατρική Σχολή, Λάρισα

