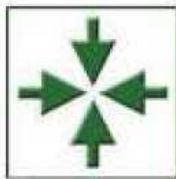


# INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO DELLE SINDROMI MIELOPROLIFERATIVE

Raffaella Milani  
ETMO



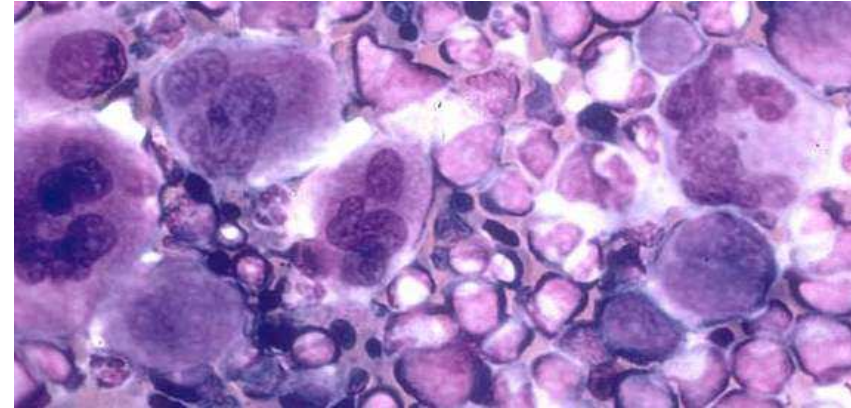
FONDAZIONE IRCCS  
ISTITUTO NAZIONALE  
DEI TUMORI



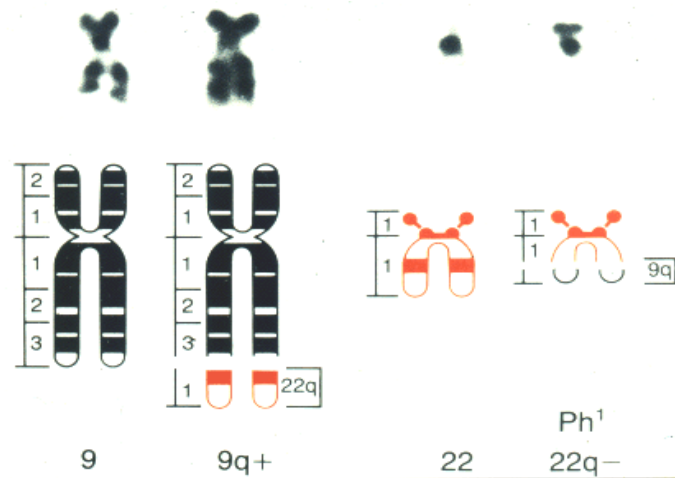
# LA DIAGNOSI



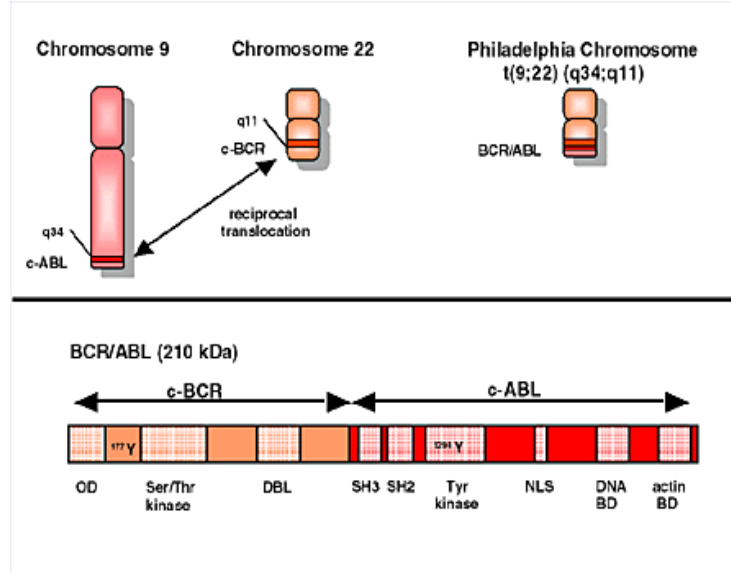
**CLINICA**



**MORFOLOGIA ISTOLOGIA**



**CITOGENETICA**



**MARCATORI MOLECOLARI**

## **Disordini mieloproliferativi**

### **1951 Dameshek**

- **Leucemia mieloide cronica (CML)**
- **Policitemia vera (PV)**
- **Trombocitemia essenziale (ET)**
- **Mielofibrosi primaria (PMF)**
- **Eritroleucemia**

## **Malattie mieloproliferative croniche (CMPD) 2001 World Health Organization**

- **Leucemia mieloide cronica (CML)**
- **Leucemia eosinofilica cronica (CEL) /  
sindrome ipereosinofila (HES)**
- **Policitemia vera (PV)**
- **Trombocitemia essenziale (ET)**
- **Mielofibrosi idiopatica (IMF)**
- **CMPD non classificabili**

## 2008 World Health Organization classification of myeloid neoplasms

- Malattie mieloproliferative croniche (CMPD) diventano **neoplasie mieloproliferative (MPN)**, per sottolineare che la mieloproliferazione è clonale e non reattiva
- Uso dei marcatori molecolari nelle MPN Ph negative
- Uso della caratterizzazione istologica per l'identificazione dei sottotipi di MPN

# 2008 World Health Organization classification of chronic myeloid neoplasms

Myeloproliferative neoplasms (MPN)  
Chronic myelogenous leukemia *BCR-ABL-1*-positive  
Chronic neutrophilic leukemia  
Polycythemia vera  
Primary myelofibrosis  
Essential thrombocythemia  
Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified  
Mastocytosis  
Myeloproliferative neoplasms, unclassifiable

- Myeloid and lymphoid neoplasms associated with eosinophilia and abnormalities of *PDGFRA*, *PDGRRB* or *FGFR1*
  - Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN)
    - Chronic myelomonocytic leukemia (CMML)
    - Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML)
    - Atypical chronic myeloid leukemia, *BCR-ABL*-negative (aCML)
    - Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-t)
  - Myelodysplastic syndrome (MDS)
-

- **Policitemia vera**
- **Mielofibrosi idiopatica**
- Trombocitemia ~~X~~ essenziale
- Leucemia ~~X~~ mieloide cronica

- **Policitemia vera**
- **Mielofibrosi idiopatica**



# Policitemia vera (PVSG)

- **A<sub>1</sub>** Aumento della volemia (♂  $\geq 36$  mL/Kg, ♀  $\geq 32$  mL/Kg)
- **A<sub>2</sub>** Saturazione O<sub>2</sub> >92%
- **A<sub>3</sub>** Splenomegalia
  
- **B<sub>1</sub>** Piastrine  $\geq 400.000/\mu\text{l}$
- **B<sub>2</sub>** Leucociti  $\geq 12.000/\mu\text{l}$
- **B<sub>3</sub>** PAL aumentata ( $\geq 100$ )
- **B<sub>4</sub>** Aumento vitB12 ( $\geq 900$  pg/mL)

**DIAGNOSI:** **A<sub>1</sub>+A<sub>2</sub>+A<sub>3</sub>**, oppure **A<sub>1</sub>+A<sub>2</sub>+ 2 criteri B**  
I livelli di EPO sono ridotti e non aumentati  
come nelle poliglobulie secondarie

# Policitemia vera

Formazione di colonie eritroidi endogene (EECs)

A differenza dei normali progenitori, le cellule staminali della PV formano colonie eritroidi in terreno semisolido in assenza di eritropoietina (Epo)

Nella revisione dei criteri diagnostici, proposto come:

“A” *facoltativo* oppure

“B”

# 2008 WHO criteria for PV

---

## Major criteria

Hemoglobin >18.5 g/dL in men, 16.5 g/dL in women or other evidence of increased red cell volume<sup>a</sup>

Presence of *JAK2V617F* or other functionally similar mutation such as *JAK2* exon 12 mutation

## Minor criteria

Bone marrow biopsy showing hypercellularity for age with trilineage myeloproliferation

Serum erythropoietin level below the normal reference range

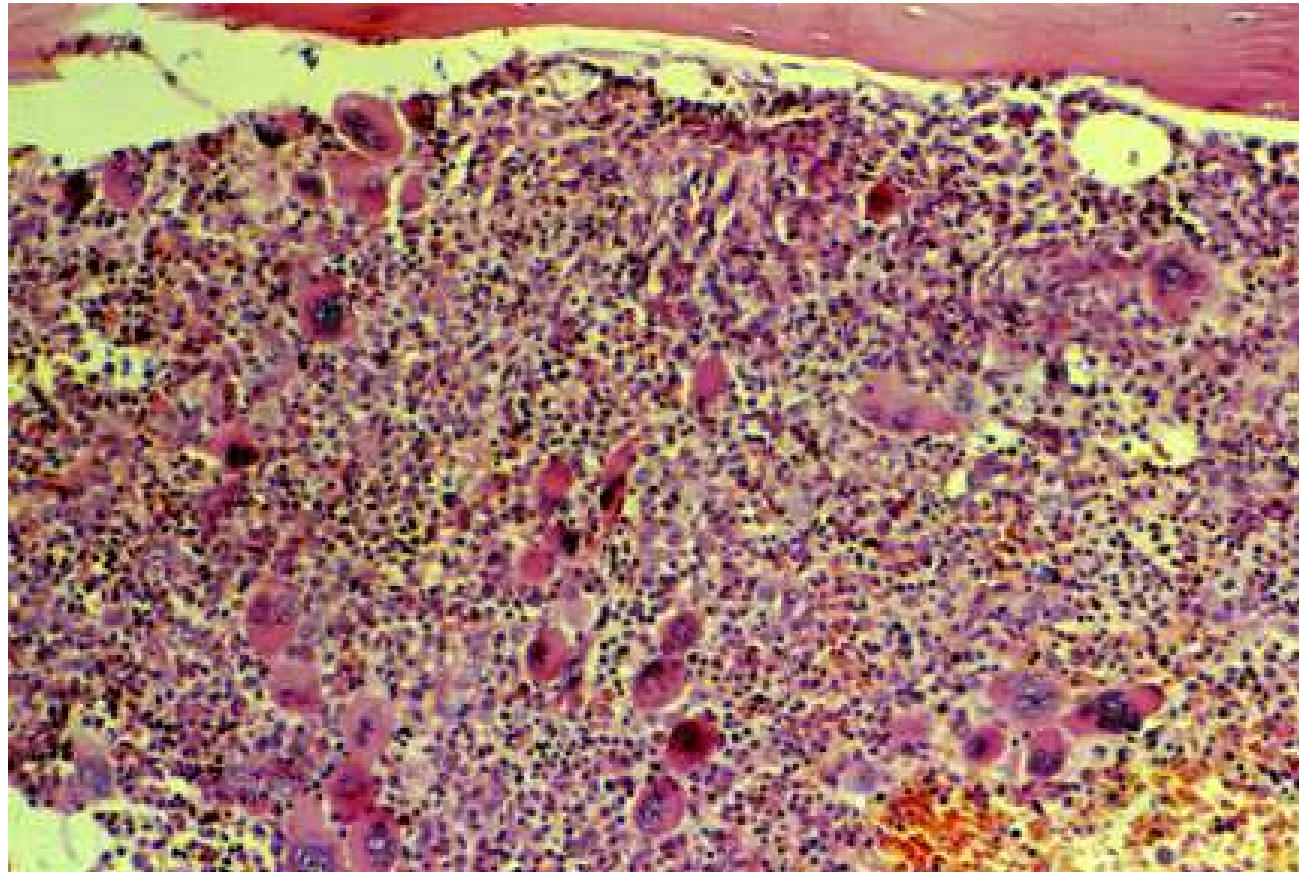
Endogenous erythroid colony formation in vitro

---

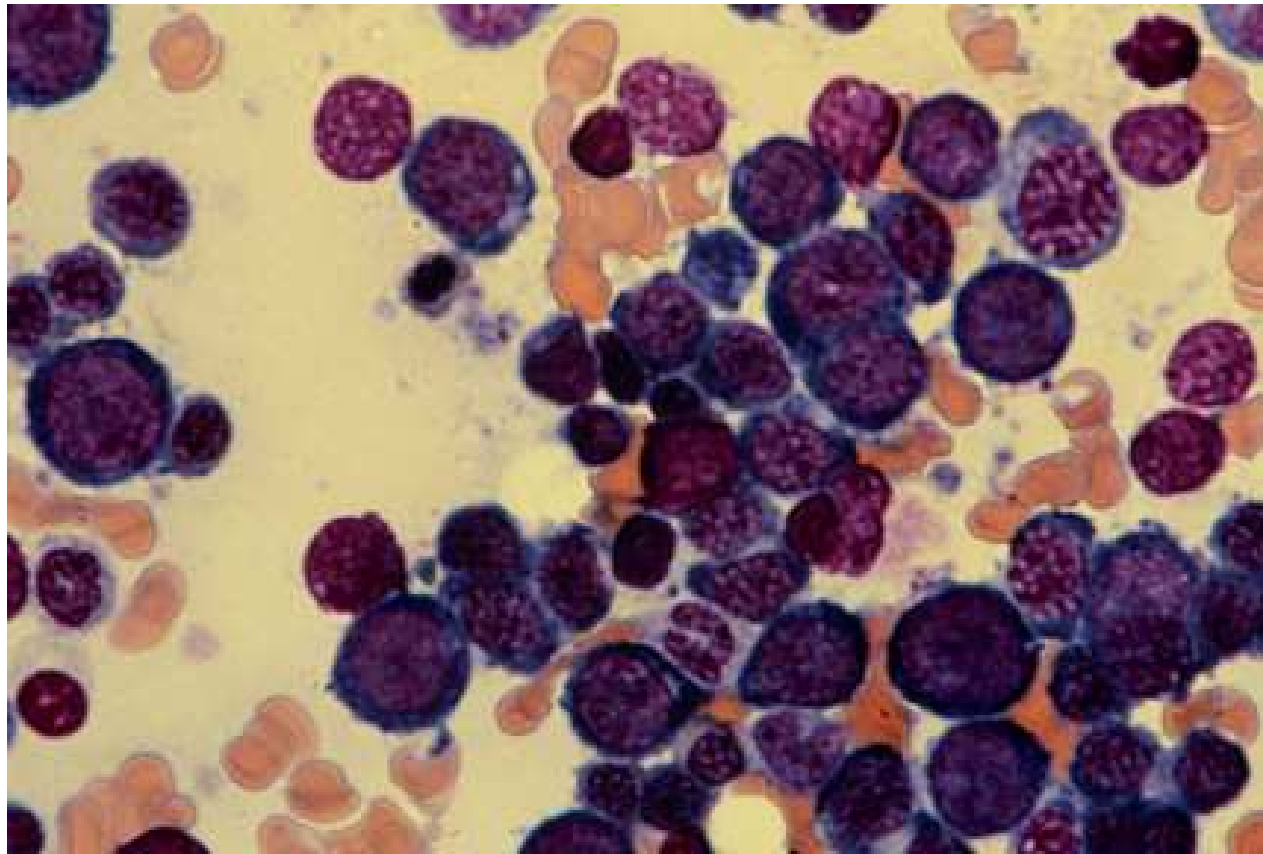
Diagnosis of PV requires meeting either both major criteria and one minor criterion or the first major criterion and two minor criteria

<sup>a</sup> Hemoglobin or hematocrit >99th percentile of reference range for age, sex or altitude of residence; or red cell mass >25% above mean normal predicted or hemoglobin 17 g/dL (men) or >15 g/dL (women) if associated with a sustained increase of >2 g/dL from baseline that can not be attributed to correction of iron deficiency

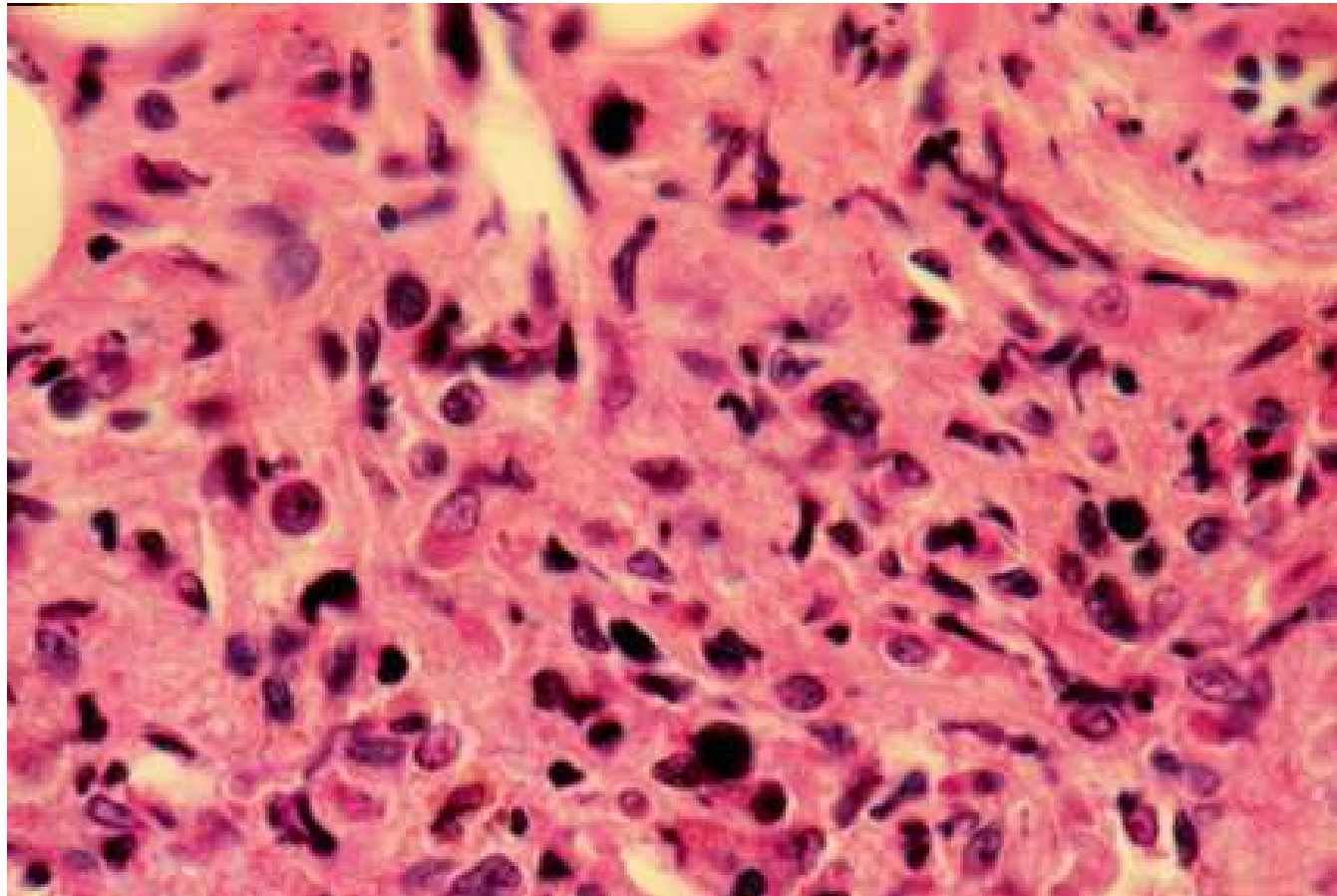
# PV istologia



# PV iperplasia eritroide



# PV fase spenta-fibrosi





# **PV clinica**

- **Asintomatica per lungo tempo**
- **Sintomi da iperviscosità (cefalea , vertigini), prurito, astenia, iperemia cutanea.**
- **Rischio di trombosi e emorragie in vari distretti tra cui CNS**
- **Splenomegalia 70%**
- **Epatomegalia 40%**

## **EVOLUZIONE**

- **Mielofibrosi con MM 20% dei casi**
- **Leucemia acuta 10% dei casi**

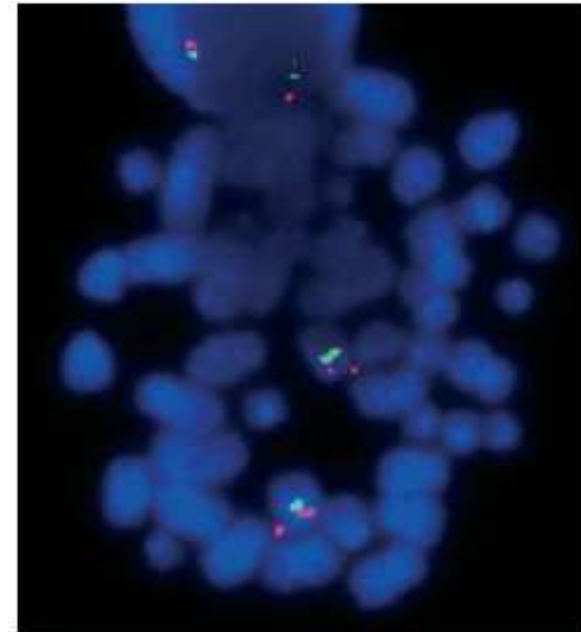
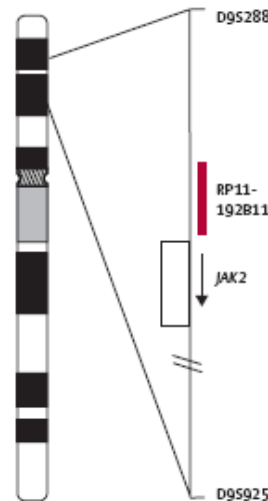
# PV citogenetica

- Cariotipo normale on >80% dei casi alla diagnosi → anomalie cromosomomiche si associano all'evoluzione → 100% dei casi di evoluzione acuta presenta anomalie cariotipiche:
  -  del(20q), +8, +9 come unica anomalia o in associazione nel 20%, del(13q) e parziale dup(1q) nel 10%, altre anomalie 30%. **Nessuna con significato prognostico.**
  -  del(5q), del (7q), ipodiploidia → evoluz. AL correlata a terapia → conferma la diagnosi e ha **significato prognostico negativo**



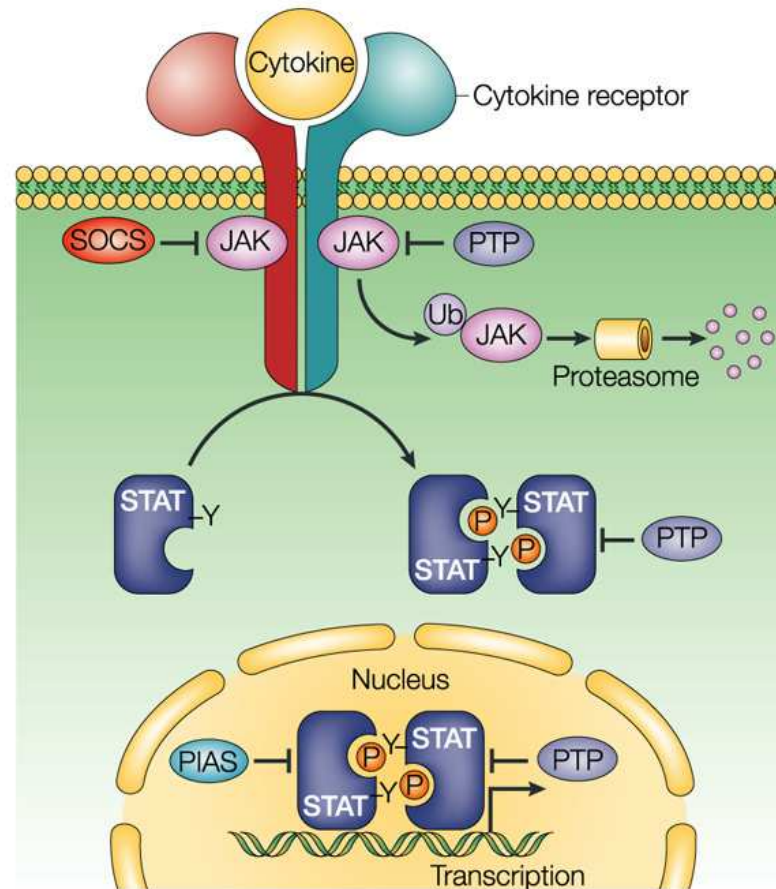
# PV patogenesi

- **JAK-2 (Janus kinase-2)**
- **Chr 9p24**

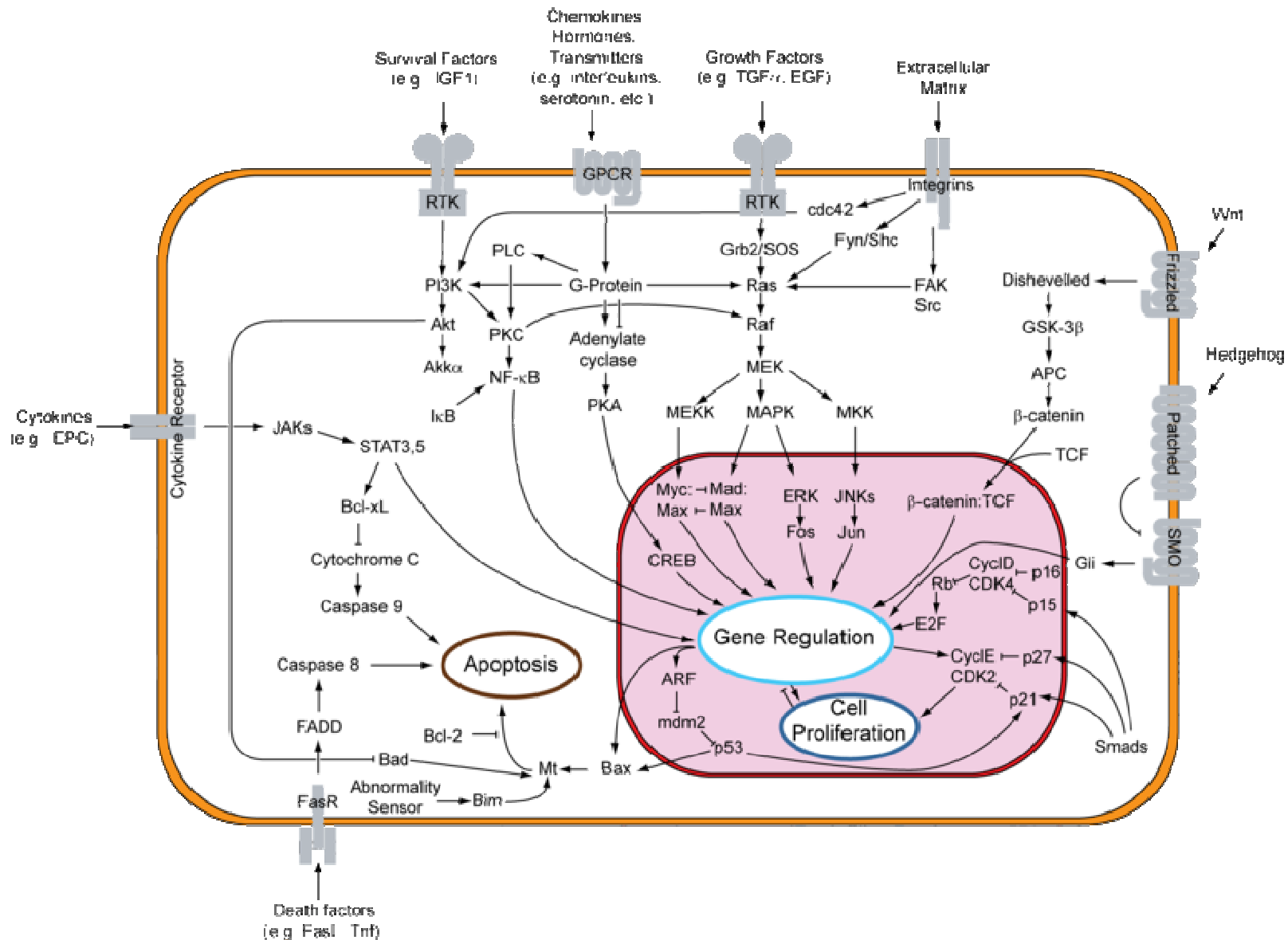


- **Tirosina-kinasi citoplasmatica**
- **Associata ai domini intracitoplasmatici dei recettori citochinici e di multipli fattori di crescita.**
- **Svolge un ruolo chiave nella **trasduzione del segnale****

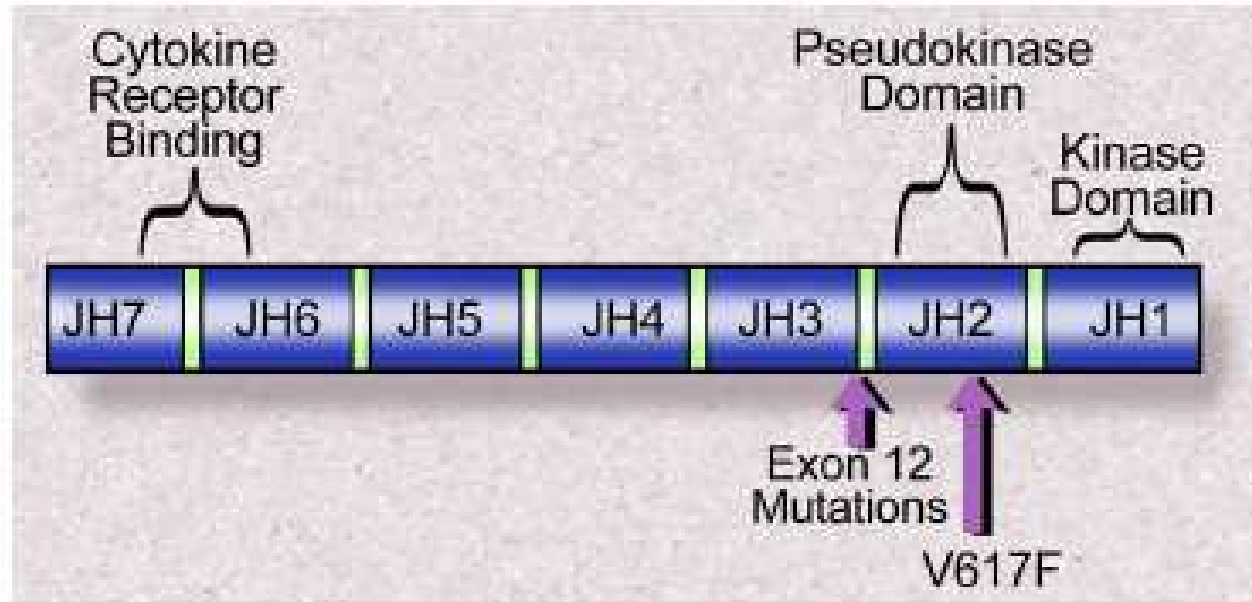
# Jak-STAT pathway



# Jak-STAT e apoptosi



# TirosinoK non-recettori della famiglia Janus



- Comprendono: *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, and *TYK2*.
- Ognuna delle tirosino kinasi ha 7 domini, il dominio JH1, all'estremità C-terminale contiene il dominio catalitico, mentre JH7 all'estremità N-terminale è essenziale per l'interazione con i recettori citochinici.
- Il dominio JH2, o pseudokinasi, ha una grande omologia con il dominio JH1, ma manca di attività catalitica

# JAK-2 mutazione Val617Phe

- Una singola mutazione puntiforme G → T al nucleotide 1849 (esone 14)

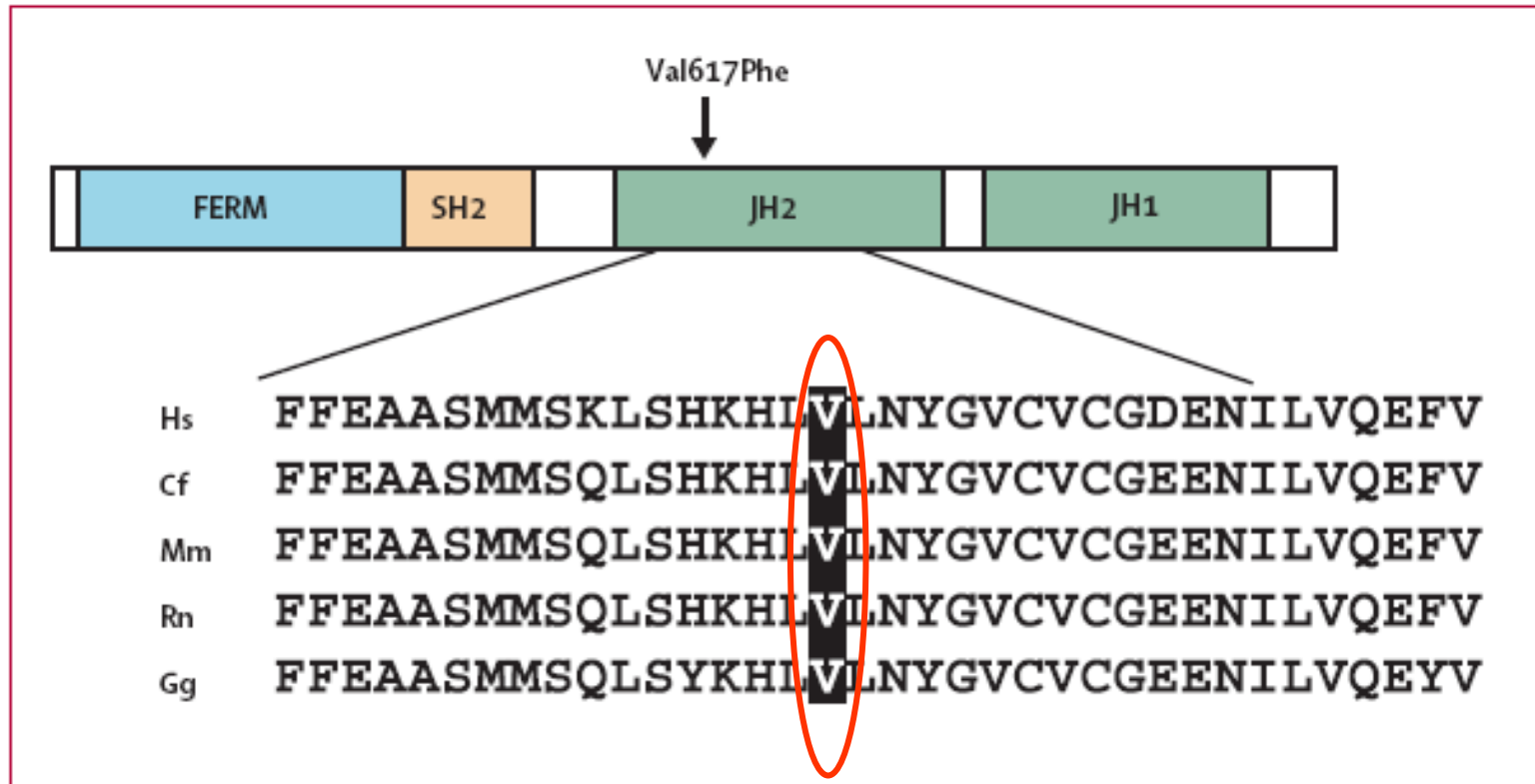


- Sostituzione di Valina altamente conservata con Phenilalanina in posiz 617, del dominio regolatorio negativo JH2



- **Disregolazione dell'attività chinastica**

# Struttura di JAK-2

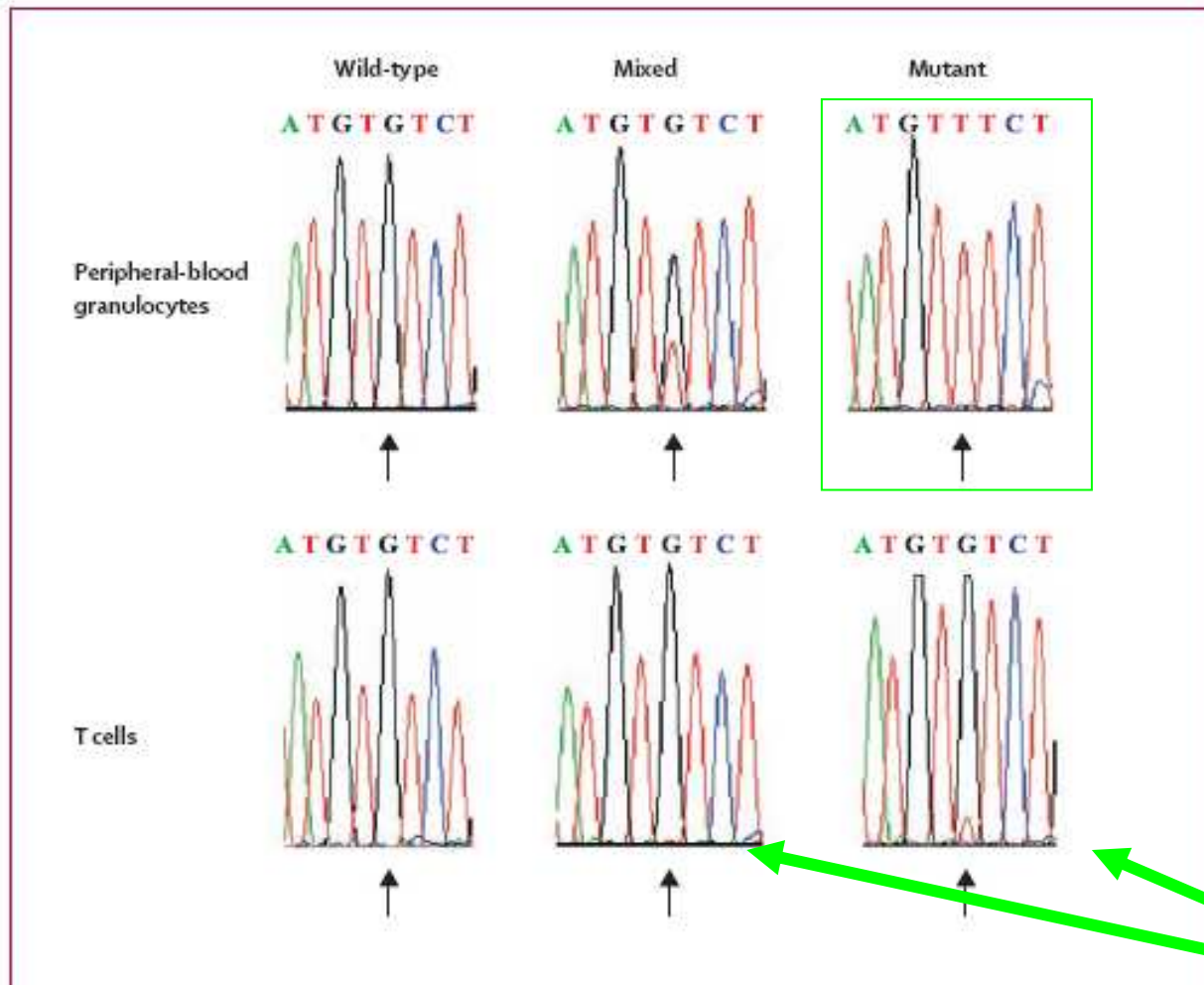


FERM, SH2, JH2, and JH1 domains are shown, together with a sequence alignment of part of the JH2 domain. Hs=*Homo sapiens*. Cf=*Canis familiaris*. Mm=*Mus musculus*. Rn=*Rattus norvegicus*. Gg=*Gallus gallus*.

FERM domain (short for band 4.1 ezrin, radixin and moesin), SH (Src Homology). JH (Jak Homology)

**Baxter, Lancet 2005**

# Sequenza esone di JAK-2

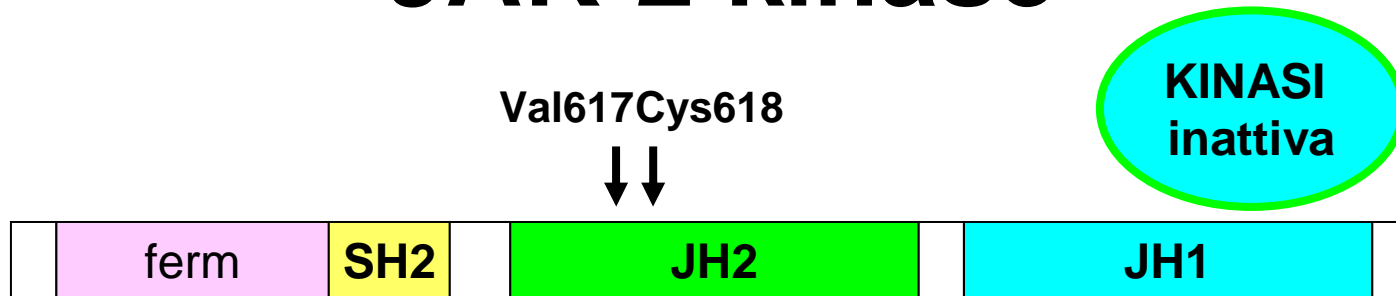


In 30 pazienti con la mutazione Val617Phe, la sequenza ottenuta da linfociti-T purificati ha evidenziato un pattern wild-type, mostrando che la mutazione è acquisita

Wild-type pattern in a patient with idiopathic myelofibrosis. Mixed and mutant sequences in two patients with polycythaemia vera. Arrows indicate the relevant base.

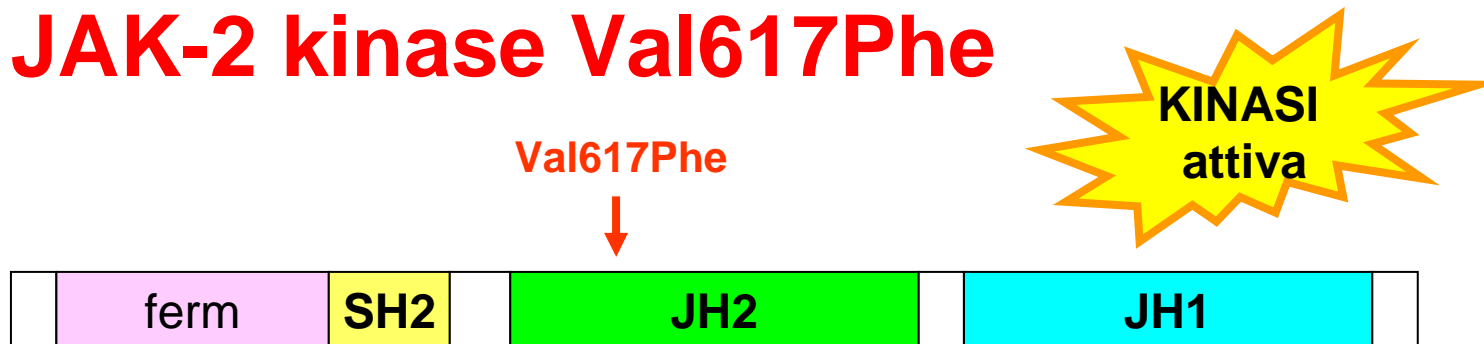
**Baxter, Lancet 2005**

# JAK-2 kinase



Modelli strutturali hanno evidenziato che la valina in posizione 617 e la cisteina in 618 sono importanti per mantenere il dominio kinasico di Jak2 in conformazione inattiva

## JAK-2 kinase Val617Phe



La sostituzione della valina 617 con la fenilalanina, destabilizza l'interazione inibitoria, e risulta in una aumentata attività kinasica



# JAK-2 mutazione Val617Phe

- Ricontrata nel **97% delle PV**, 50% PMF, 57% ET
- Mutazione acquisita
- Insorge nella cell. **stam. multipotente** che origina linea eritroide e mieloide
- Eterozigote nella maggior parte dei casi, omozigote in alcuni per ricombinazione mitotica
- **Presente in tutte le colonie eritroide EPO-indipendenti** □ **ruolo nella crescita fattore indipendente**

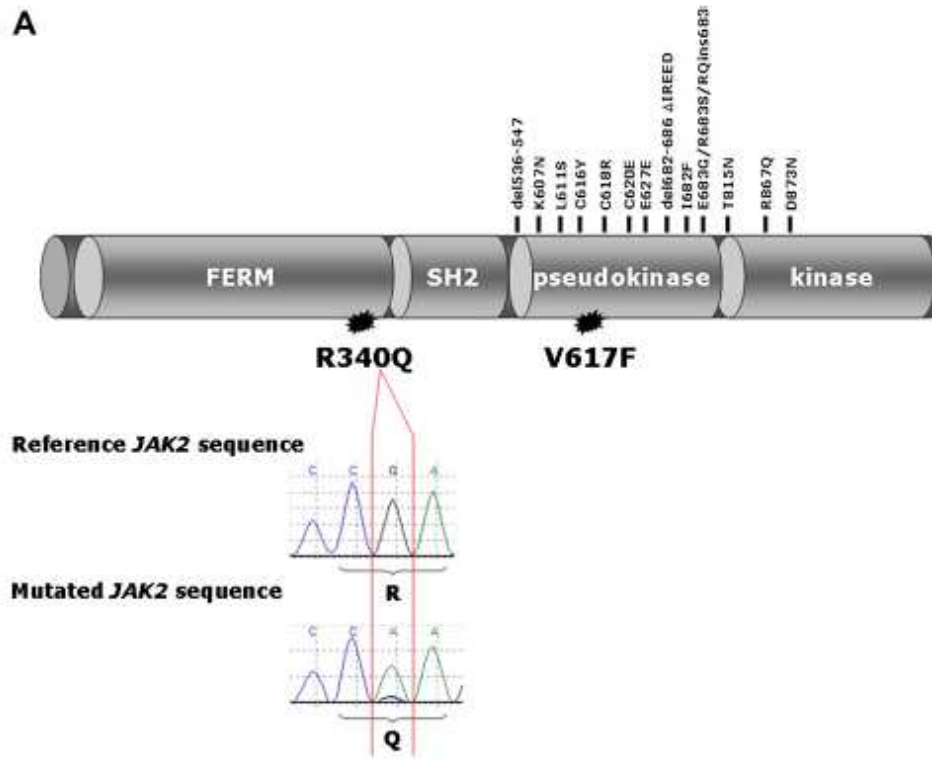
Baxter, Lancet 2005; James, Nature 2005; Levine, Cancer Cell 2005

# Mutazioni dell'esone 12 di JAK-2

- Identificate 4 mutazioni a livello dell'esone 12 interessanti i residui dal 537 al 543, associate a attivazione costitutiva dell'attività tirosinokinasi di Jak-2
- I residui dal 537 al 543 stanno tra regione SH2 e il dominio JH2 di Jak-2
- I pazienti in cui sono state identificate avevano una diagnosi istologica di PV o eritrocitosi idiopatica
- Bassi livelli di eritropoietina
- Colture di progenitori eritroidi eritropoietina-indipendenti da cellule di sangue periferico.
- A differenza delle colture eritroidi derivate da pazienti affetti da PV V617F-positivi, quelle da pazienti con mutazione dell'esone 12 non sono omozigoti per le mutazioni di Jak-2

# Mutazioni del dominio FERM di JAK-2

A

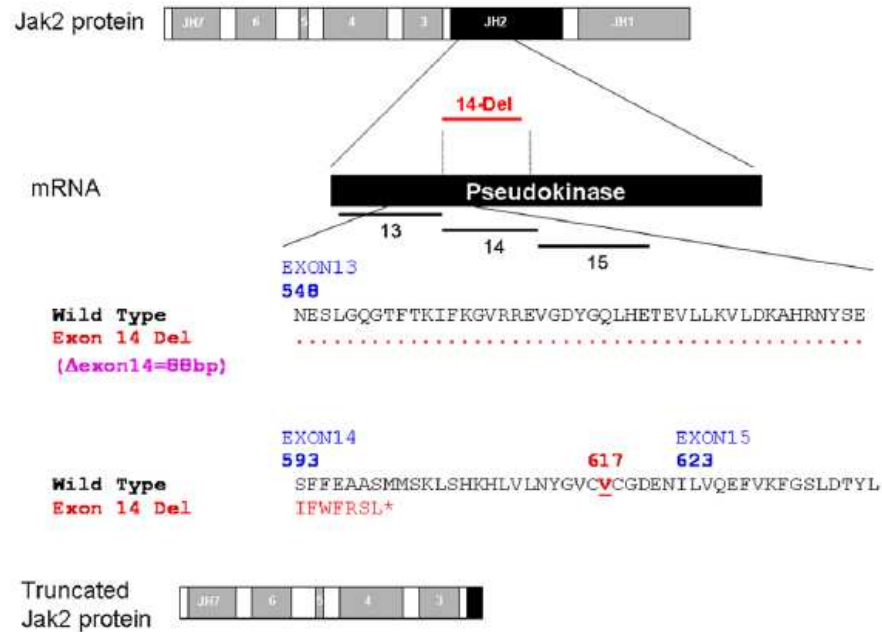


La mutazione 70505 G>A, nell'esone 8 di Jak-2, codificante per il dominio FERM, potrebbe essere una nuova mutazione attivante Jak-2. Necessarie analisi funzionali

B



# Delezione dell'esone 14 di JAK-2



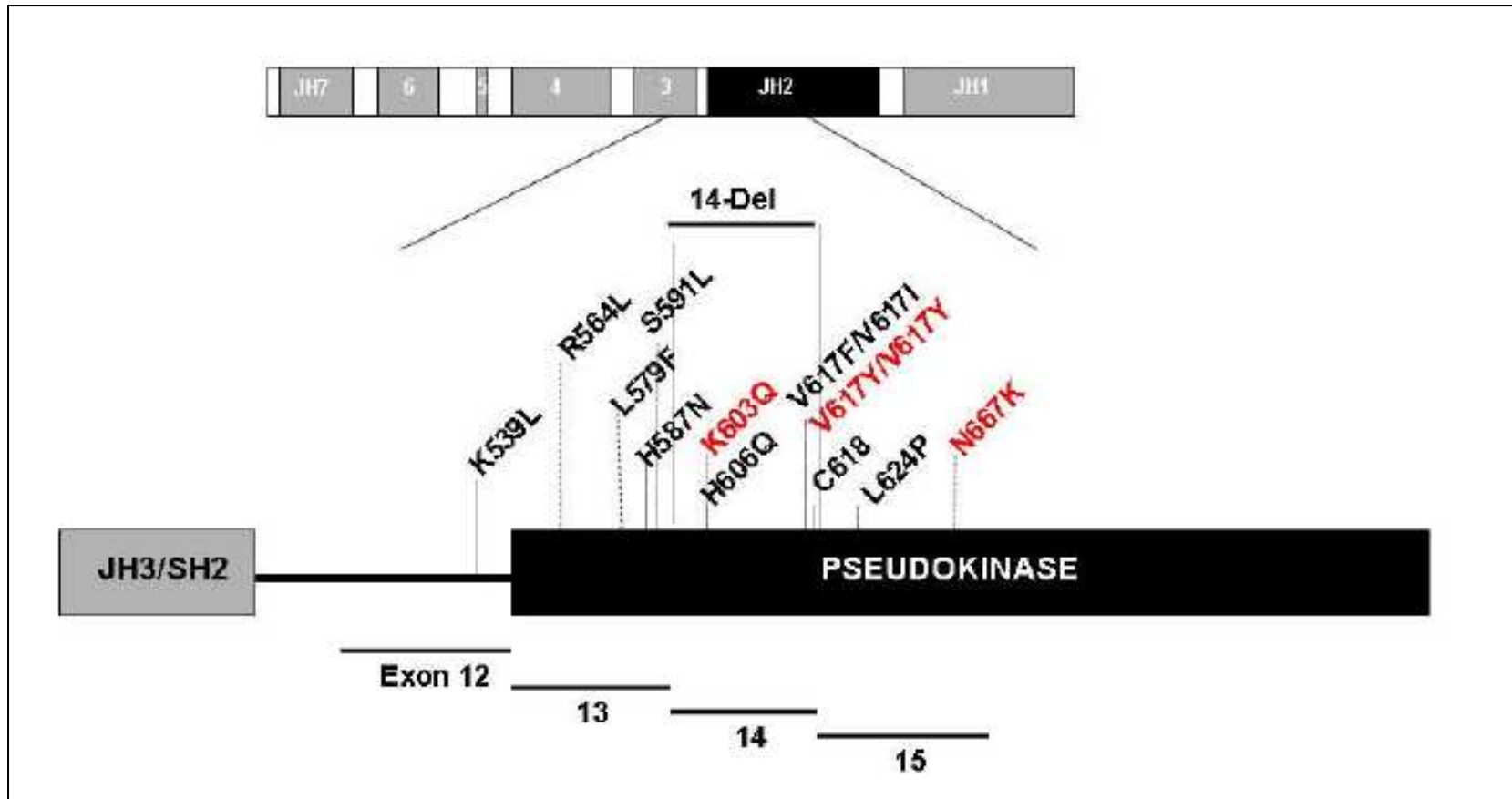
- La delezione nel dominio JH2 causa la perdita di JH1, e pone domande sull'attivazione della via JAK-STAT, mentre conserva i domini FERM (JH4-7) mantenendo la possibilità di interazione con i recettori delle citochine.

- Il prodotto è una proteina troncata

- La causa potrebbe essere una mutazione o uno splicing alternativo

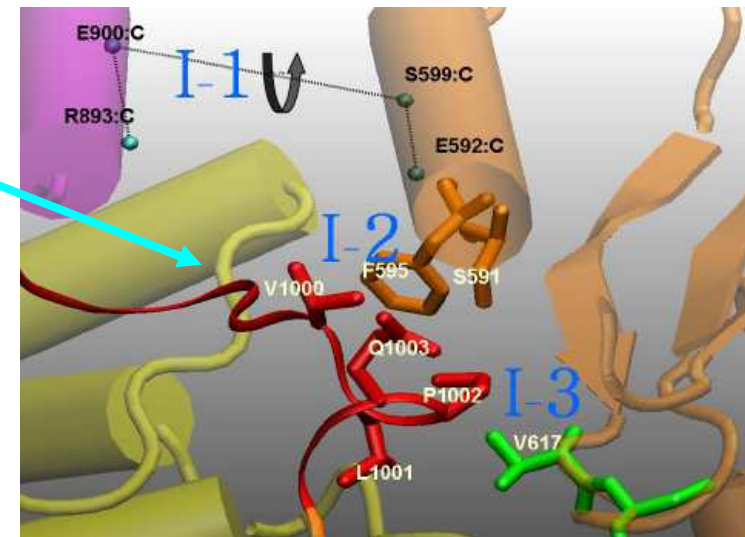
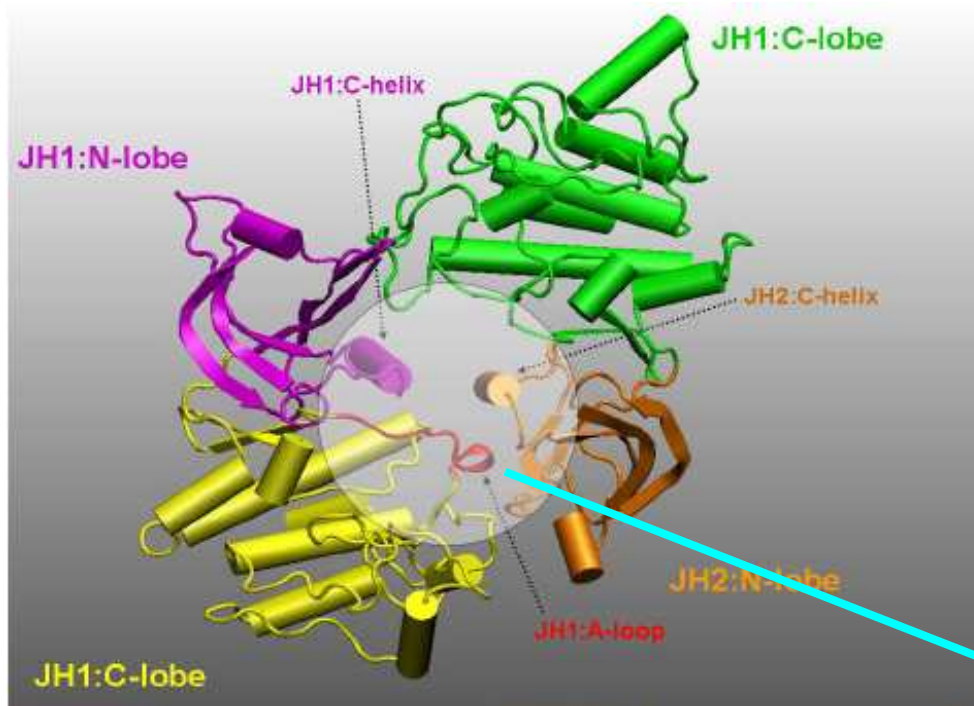
La delezione dell'esone 14 è presente solo nelle MPN, e prevalentemente in quelle negative per la mutazione V617F. Questa alterazione non è evidenziata dai test che utilizzano DNA invece che RNA

# Studi strutturali delle mutazioni di JAK-2

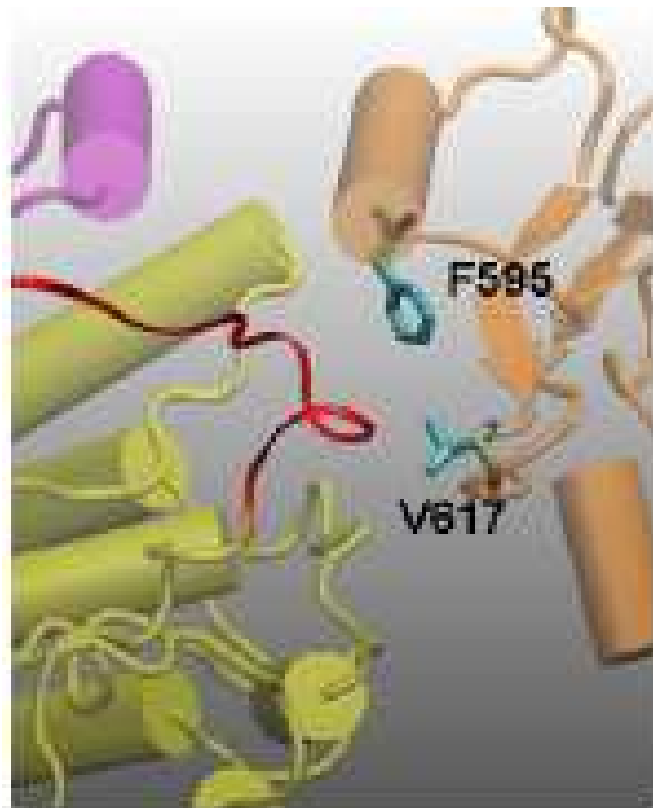


In rosso: mutazioni controllo, in nero: mutazioni in pts con MPN

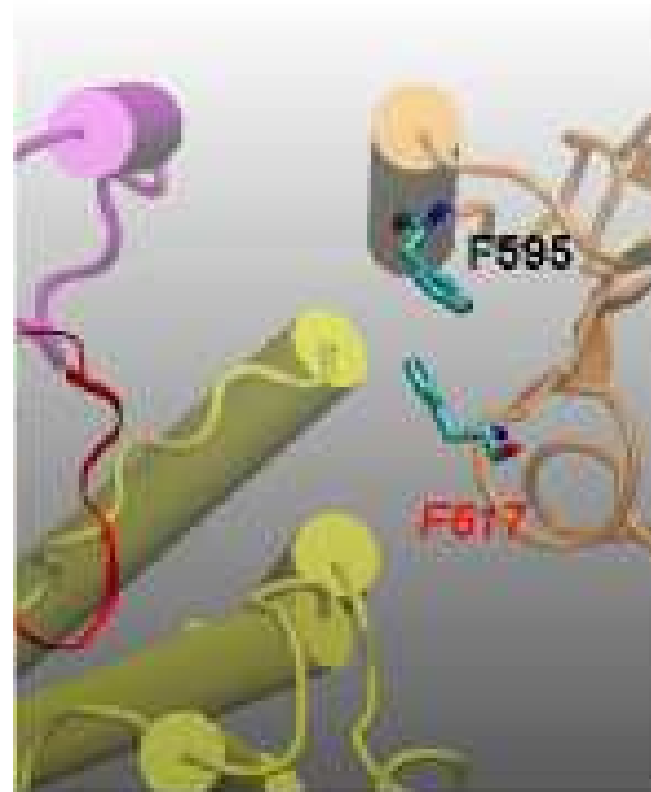
# Simulazione interazioni tra JH1 e JH2 di JAK-2



## Differenze strutturali tra JAK-2 WT e V617F



WT



V617F

- Policitemia vera
- **Mielofibrosi idiopatica**



# Mielofibrosi primaria (PMF)

- **Fibrosi midollare dimostrata con impregnazione argentea**
- **Assenza Ph<sub>1</sub> o riarrangiamento BCR/ABL**
- **Splenomegalia marcata**
- **Dacriociti, anisopoichilocitosi**
- **Screzio leuco-eritroblastico nel sangue periferico (presenza allo striscio di mielociti, metamielociti, eritroblasti)**
- **Esclusione di patologie che possano causare fibrosi midollare**

# WHO 2008 criteria for PMF

## Major criteria

Presence of megakaryocyte proliferation and atypia, accompanied by either reticulin or collagen fibrosis,

Or,

In the absence of significant reticulin fibrosis, the megakaryocyte changes must be accompanied by an increased marrow cellularity characterized by granulocytic proliferation and often decreased erythropoiesis (ie, prefibrotic cellular-phase disease)

Not meeting WHO criteria for PV, CML MDS or other myeloid disorders

Demonstration of *JAK2V617F* or other clonal marker (e.g. *MPL* W515K/L)

Or,

In the absence of the above clonal markers no evidence of secondary bone marrow fibrosis

## Minor criteria

Leukoerythroblastosis

Increased serum lactate dehydrogenase level

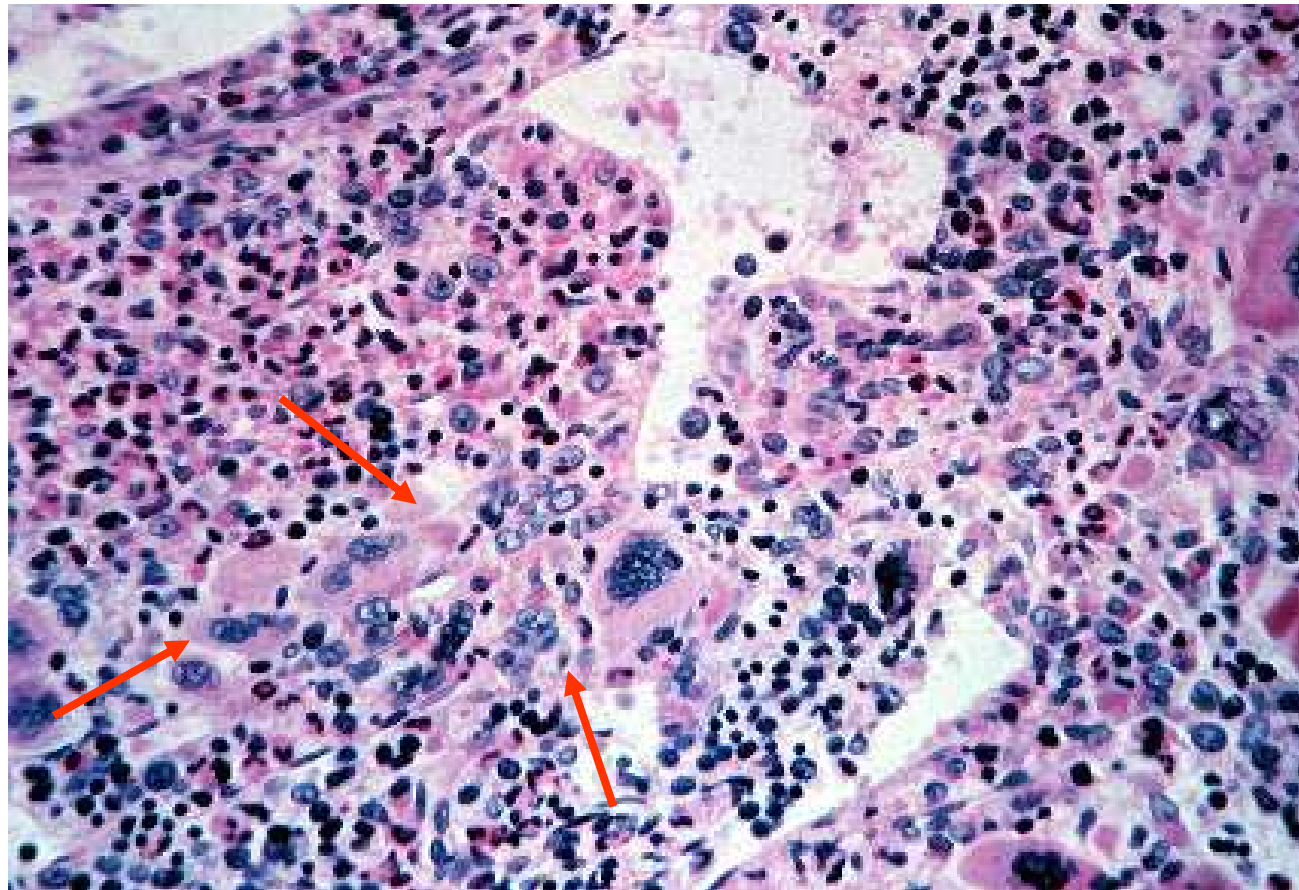
Anemia

Splenomegaly

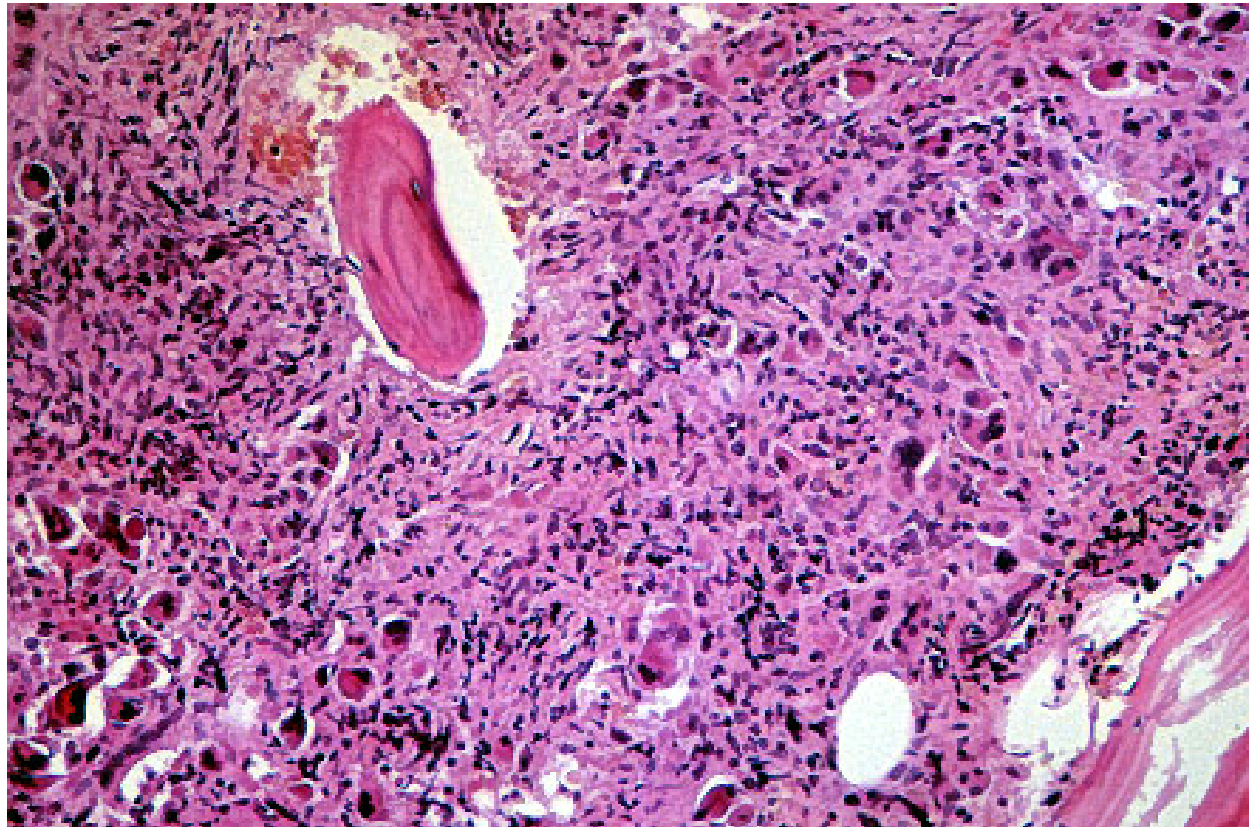
Diagnosis requires all three major criteria and 2 minor criteria

*PV* polycythemia vera, *CML* chronic myelogenous leukemia, *MDS* myelodysplastic syndrome

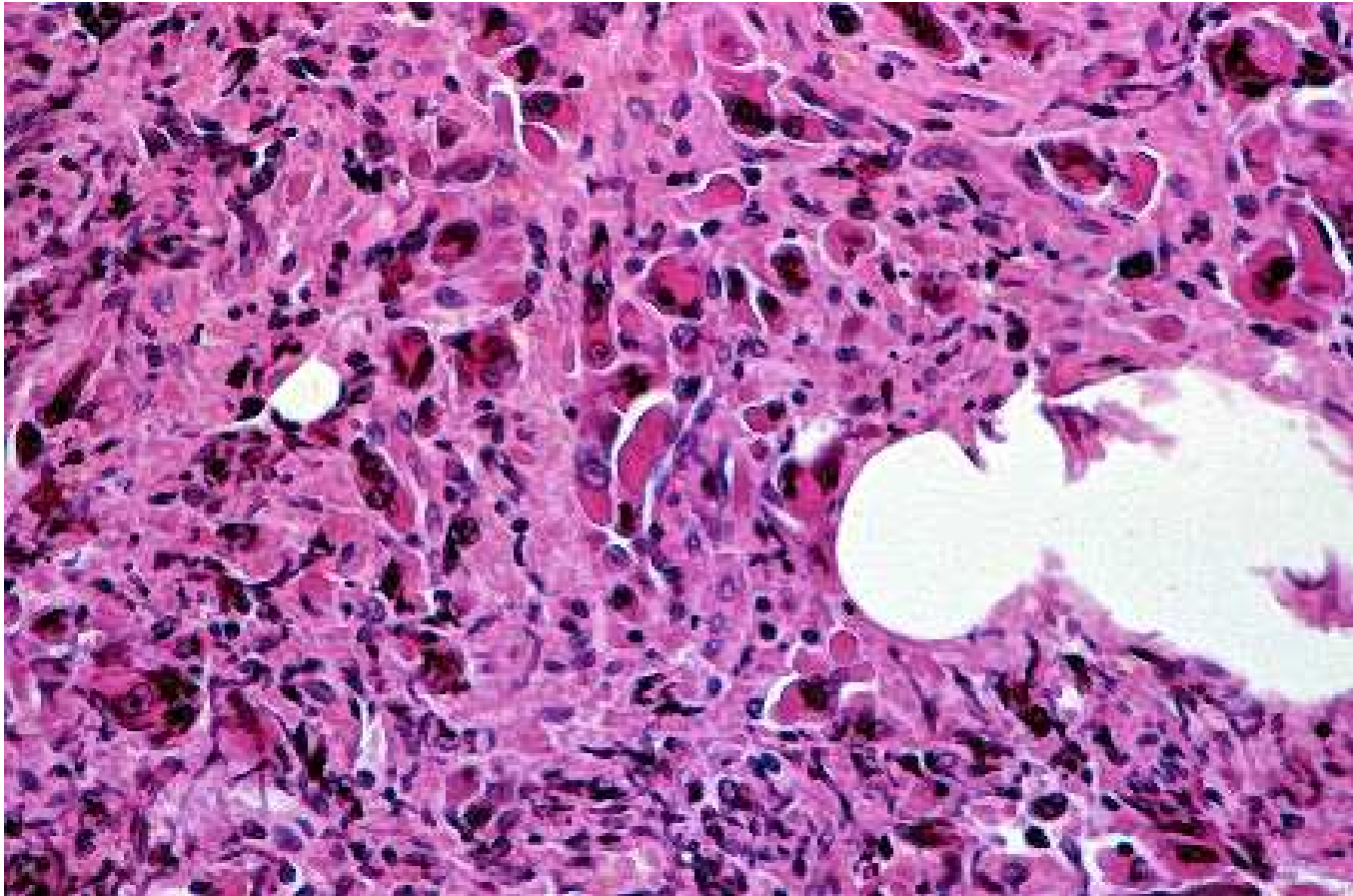
# PMF BOM fase cellulare



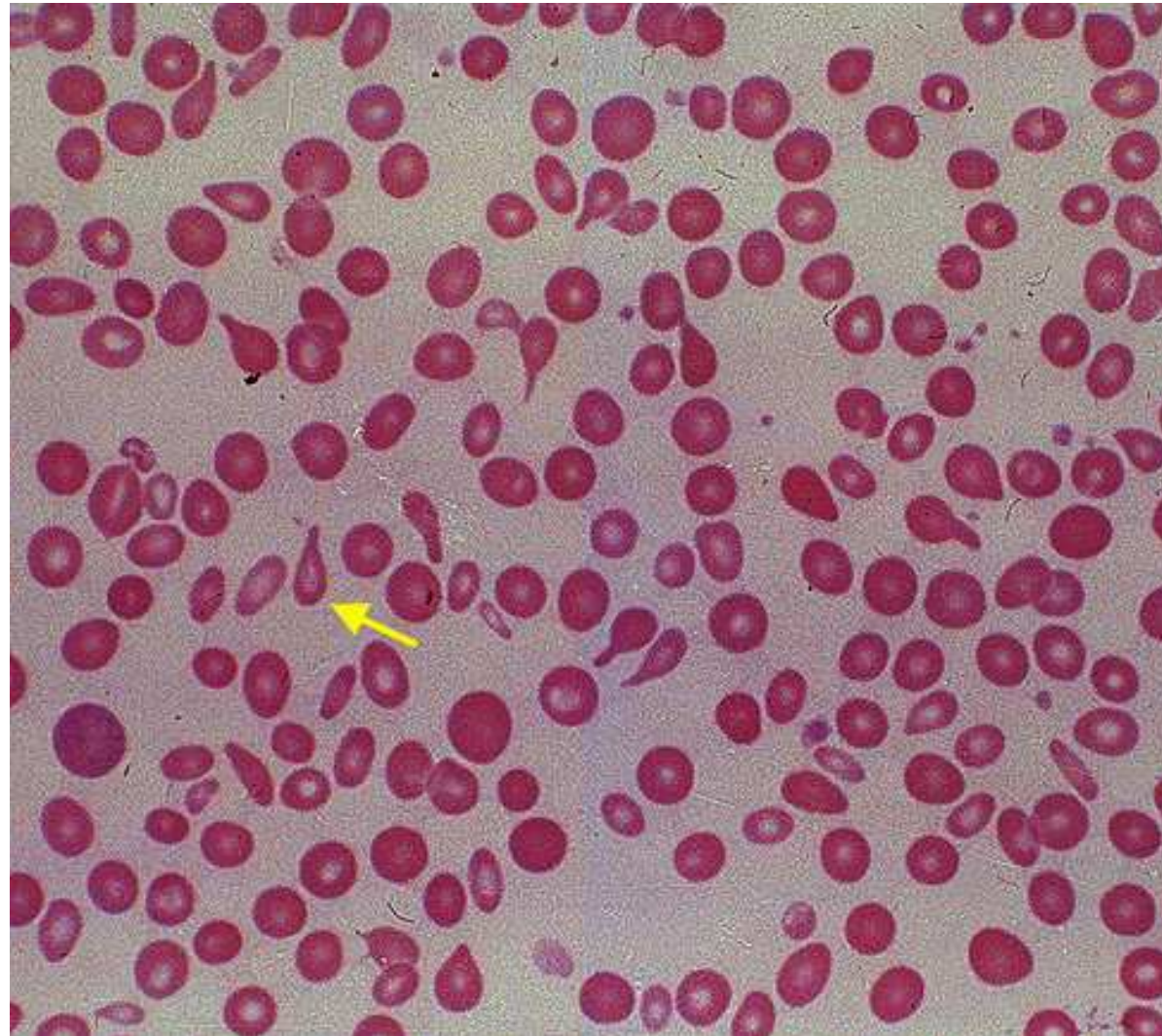
# PMF BOM fibrosi



# PMF BOM fibrosi high resol.

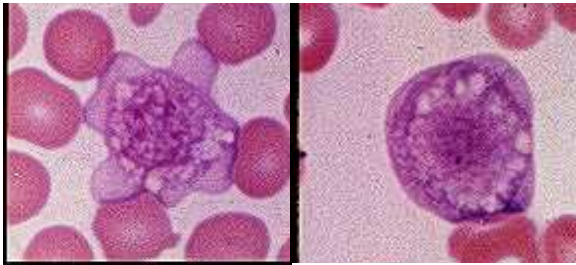


# PMF SP dacriociti

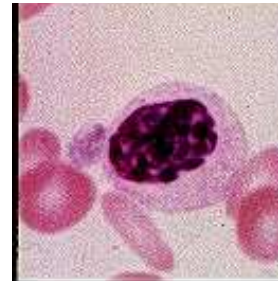




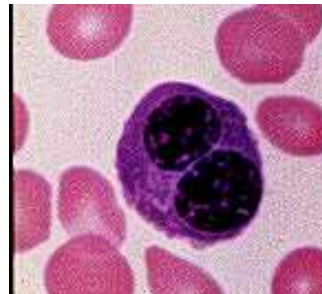
# PMF SP cellule circolanti



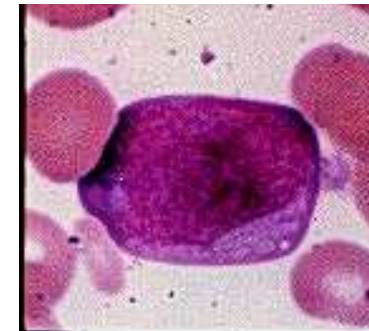
**macrotrombociti**



**neutrofili  
pseudo-Pelger**

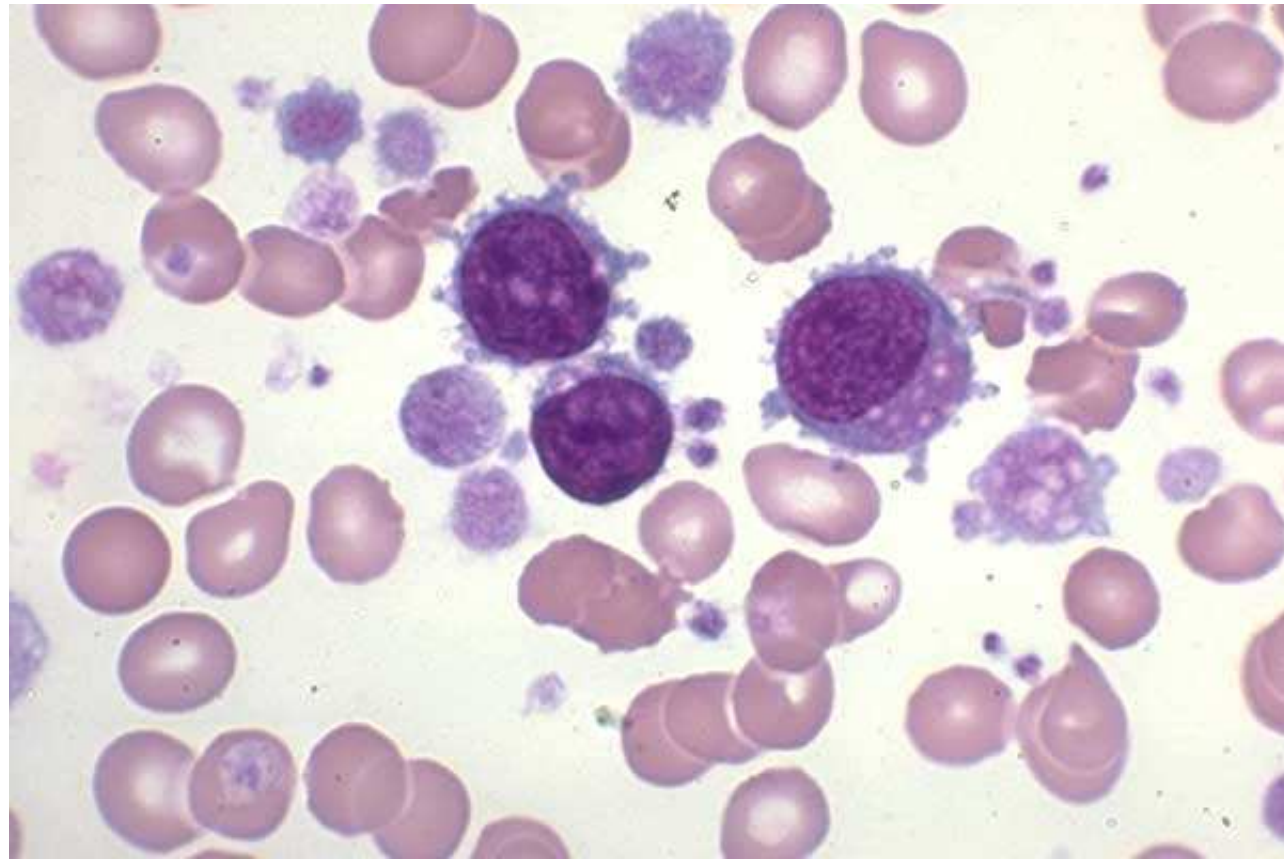


**eritroblasti**



**blasti**

# PMF SP micromegacariociti post-splenectomy





# PMF clinica

- **Asintomatica per lungo tempo**
- **Sintomi legati a splenomegalia e anemia**
- **Splenomegalia 100%, epatomegalia 50%**

## **EVOLUZIONE**

- **Fase proliferativa seguita da fase pancitopenica**
- **Foci ectopici di emopoiesi (milza, fegato)**
- **Pancitopenia e ipertensione portale da splenomegalia sono le maggiori cause di decesso**
- **Evoluzione in AL 15-20% (conta CD34 circolanti)**

# PMF citogenetica

- **Anomalie cariotipiche nel 40%**
- **Parziale trisomia 1, del(5q), -5, -7, +8, +9, del(13q), del(20q) nel 5-10% dei casi con anomalie cromosomiche**

# PMF GATA-1

- GATA-1 appartiene alla famiglia dei **fattori di trascrizione**.
- Legandosi alla sequenza consenso (A/T)GATA(A/G) nel promotore e enhancer dei geni target, **regola la proliferazione e differenziazione** delle cellule eritroidi, megacariociti, eosinofili e mastociti
- Nelle cellule eritroidi e nei megacariociti, GATA-1 si lega alla sequenza complementare, come dimero con FOG-1 (friend of Gata-1)

# GATA-1 dati pre-clinici

- Topi FOG-1<sup>null</sup> e GATA-1<sup>null</sup> determinano morte embrionale per anemia fatale
- Topi GATA-1<sup>low</sup> (ottenuti per delezione delle sequenze regolatorie di GATA-1) **non esprimono GATA-1 nei megacariociti** e hanno espressione ridotta di GATA-1 negli eritroblasti e mastociti.

Topi GATA-1<sup>low</sup> sviluppano trombocitopenia e difetti di maturazione megacariocitaria, severa fibrosi midollare, osteosclerosi, dacriociti, ↑progenitori emopoietici circolanti, splenomegalia e emopoiesi extramidollare

# GATA-1 in PMF megacariociti

- **PMF megacariociti** sia in vitro (derivati da colture di CD34 circolanti), sia ex-vivo (immunoistochimica su biopsia ossea), contengono **ridotti livelli di GATA-1** rispetto ai megacariociti dei controlli, ET e PV e rispetto agli eritroblasti e CD34
- Non deficit di GATA-2, né FOG-1
- Non correlazione con JAK-2 Val617Phe (50% casi di PMF)

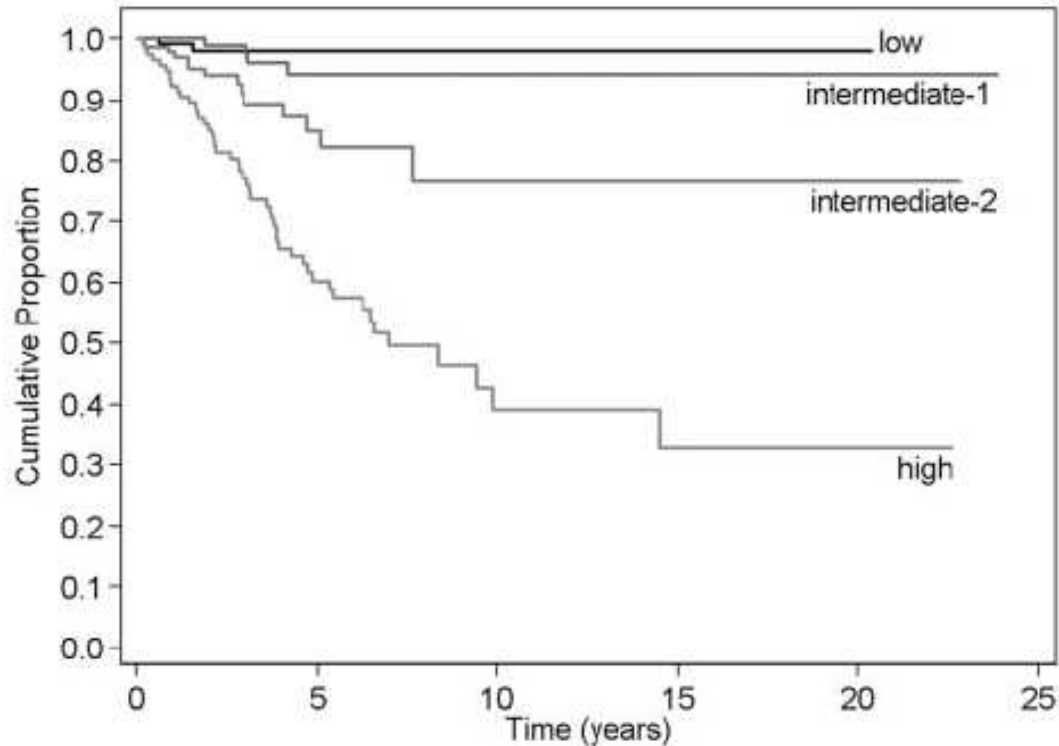
# Deficit GATA-1

- **Ridotta espressione GATA-1 rappresenta una anomalia selettiva dei megacariociti in PMF, e potrebbe avere un ruolo nella patogenesi della malattia**
- **Deficit di GATA-1 costituisce un nuovo marcatore con potenziali implicazioni diagnostiche**

# Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS)

- The International Working Group on Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) ha recentemente sviluppato un modello prognostico, tempo-dipendente, DIPSS, che predice la sopravvivenza dei pazienti affetti da PMF e la progressione in fase blastica.
- Questo modello include: età > 65 anni, Hb < 10 g/dL, WBC > 25 x 10<sup>9</sup>/L, blasti periferici ≥ 1% e sintomi sistemici.

# DIPSS Blast-phase free survival



**Figure 1. Kaplan-Meier estimate of blast phase-free survival in primary myelofibrosis according to the DIPSS.** Risk categories were according to the score obtained anytime during follow-up. Values for score calculation are as follows: 1 for age > 65 years, 2 for hemoglobin level < 10 g/dL, 1 for white blood cell count >  $25 \times 10^9/L$ , 1 for peripheral blood blasts  $\geq 1\%$ , and 1 for constitutional symptoms. Risk categories are low (score: 0), intermediate-1 (score: 1 or 2), intermediate-2 (score: 3 or 4), and high (score: 5 or 6).



# TET2 mutations

- La famiglia dei geni TET mostra regioni molto conservate, ma con funzione biologica non nota
- Putativo ruolo oncosoppressore
- TET2 è localizzato su 4q24 (sito di traslocazione reciproca in anomalie di AML)
- TET2 ha multiple isoforme, tra cui TET2 isoA e TET2 isoB.
- Molte delle mutazioni note a oggi sono localizzate nella sequenza codificante della isoA
- Le mutazioni di TET2 sono state riscontrate nel 17% delle MPN V617F+ e nel 7% di quelle V617F-

# TET2 mutations

- La frequenza delle mutazioni di TET2 correla come fattore indipendente con l'età: 23% in pts  $\geq 60$  anni, 4% nei pts giovani ( $P < 0.0001$ )
- Le mutazioni di TET2 non influenzano la sopravvivenza, l'evoluzione leucemica o la trombosi, sia in PV che in PMF
- La mutazione di TET2 precede sempre la mutazione V617F di Jak2

# TET2 mutations

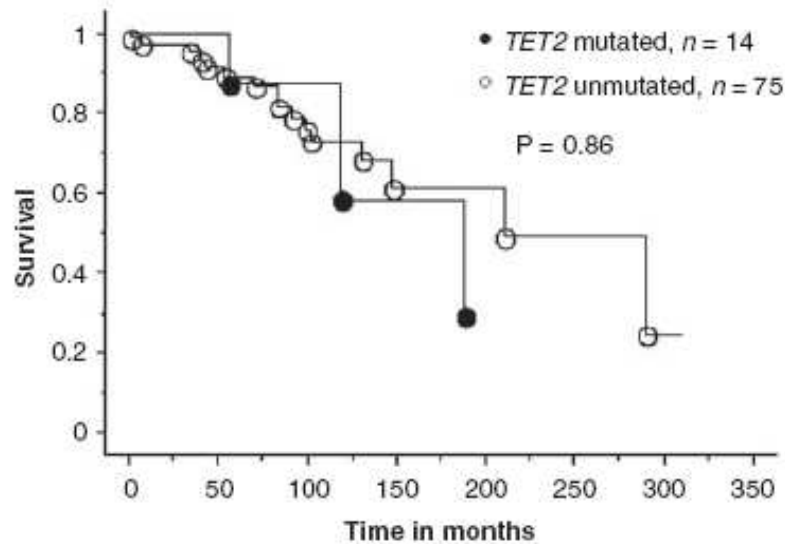


Figure 1 Survival curves for 89 patients with polycythemia vera stratified by their *TET2* mutational status (14 mutated and 75 unmutated patients).

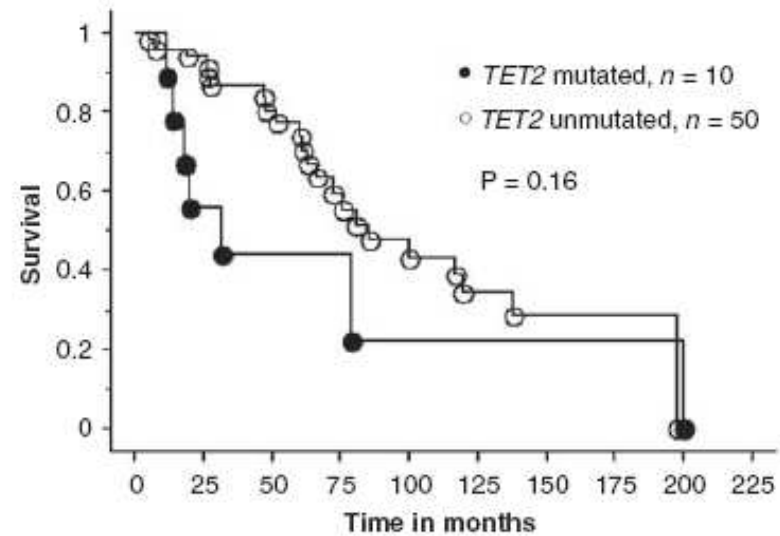
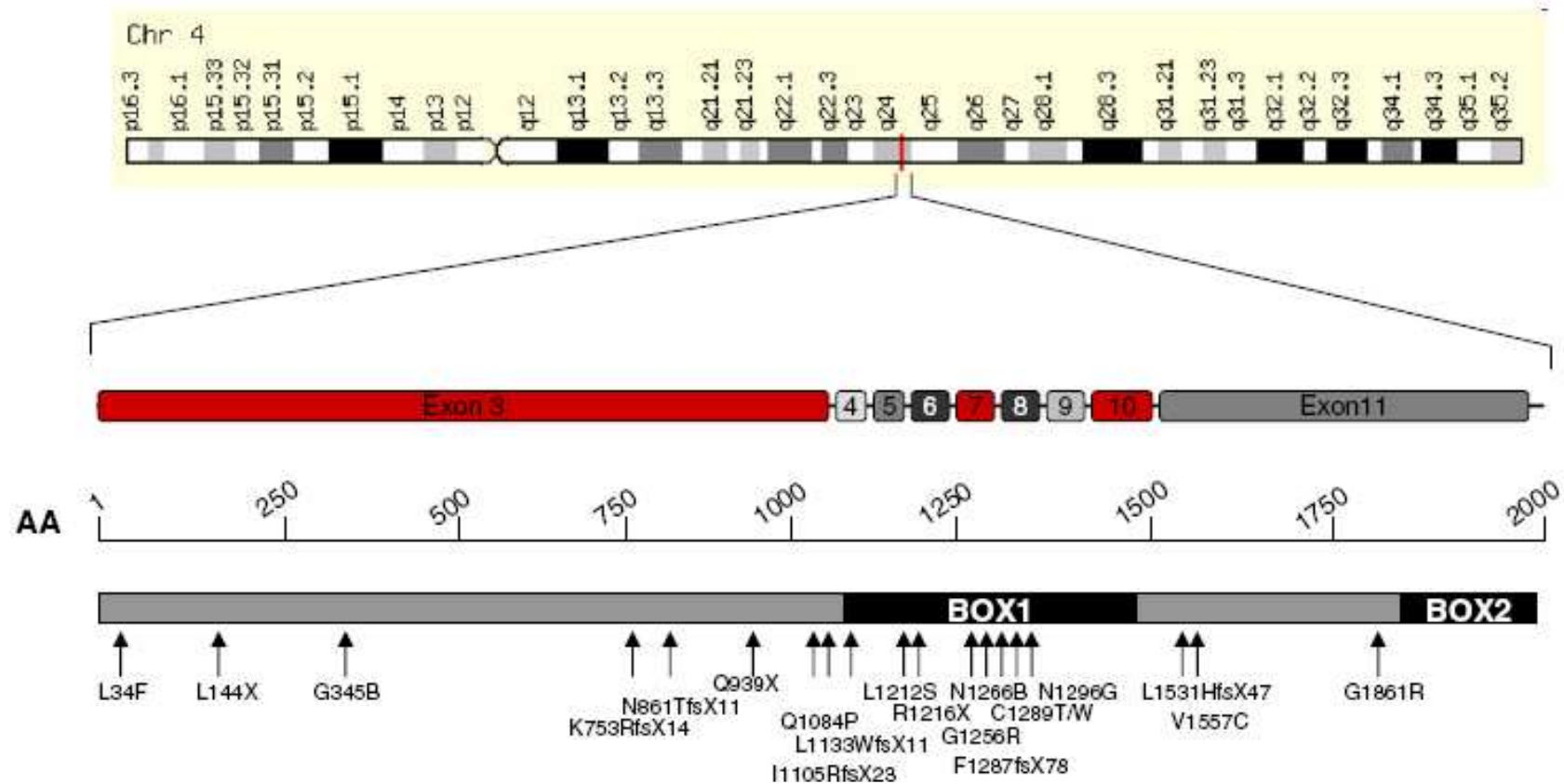


Figure 2 Survival curves for 60 patients with primary myelofibrosis stratified by their *TET2* mutational status (10 mutated and 50 unmutated patients).

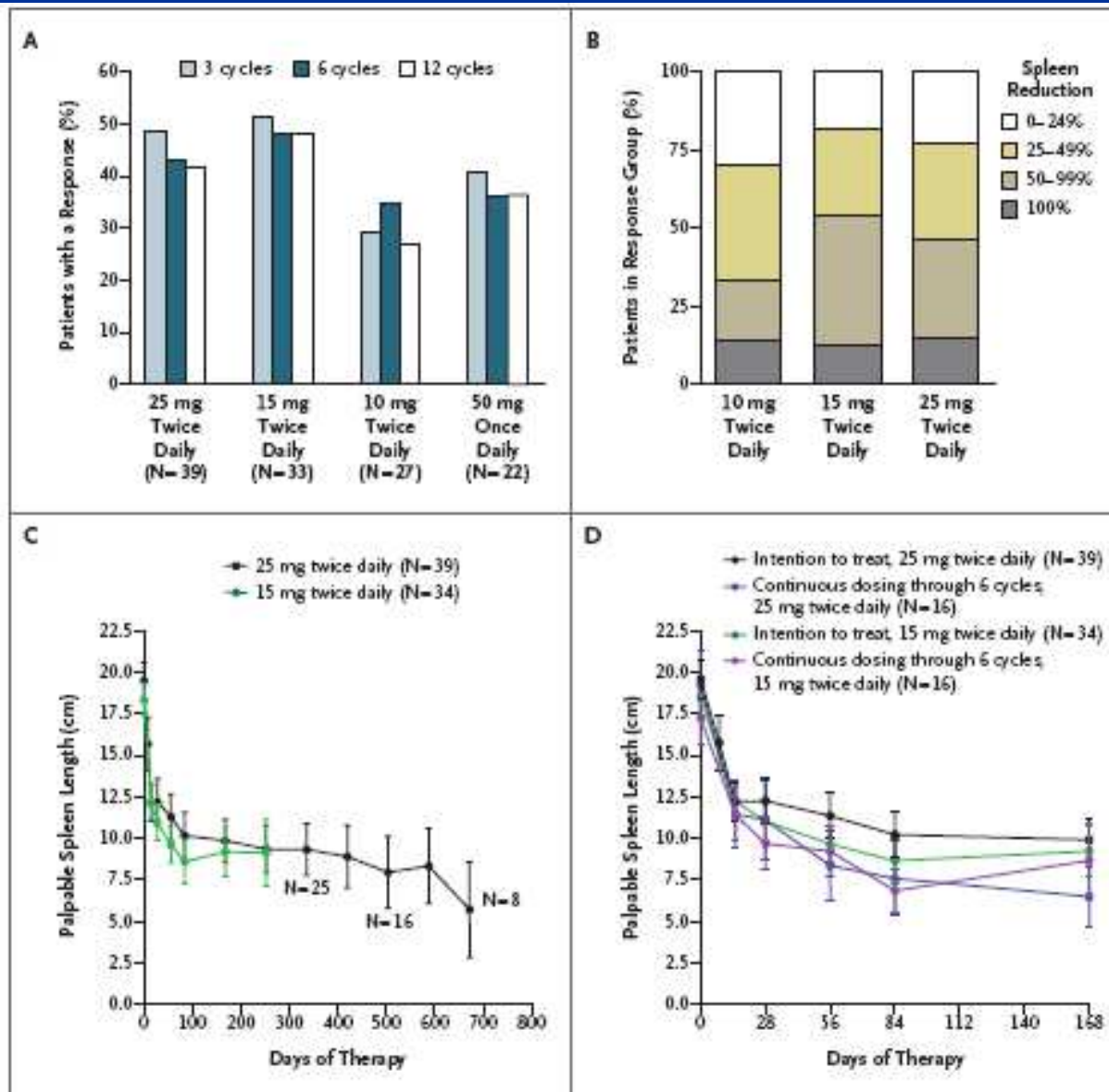
# TET2 mutations



# Ruolo degli inibitori di Jak-1 e Jak-2

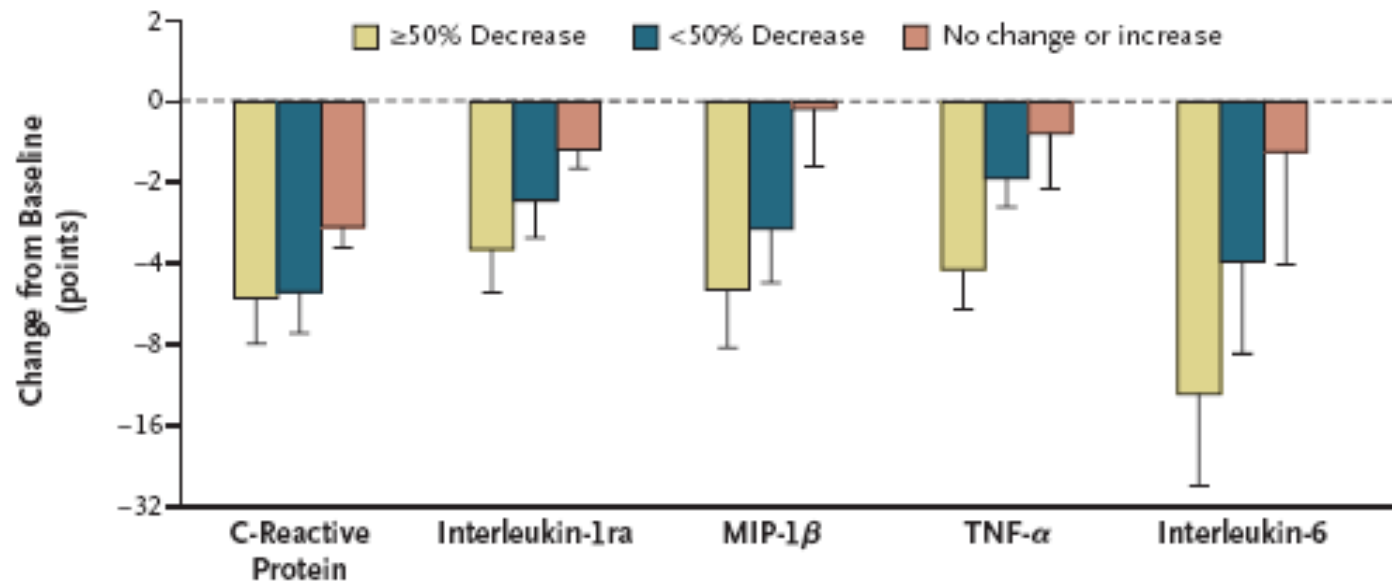
- Maggiore esperienza in PMF
- INCB018424 è un potente e selettivo inibitore di Janus kinase 1 (JAK1) and JAK2
- Trial fase 1-2, in PMF Jak-2 V617F pos e V617F neg, in mielofibrosi secondaria a PV e in mielofibrosi secondaria a ET
- 153 pazienti hanno ricevuto INCB018424 per un tempo mediano >14.7 mesi
- Meno del 10% dei pazienti hanno accusato tossicità di grado 3-4 (prevalentemente mielosoppressione)

# INCB018424 risposta clinica



# INCB018424 risposta citochinica

Change in Cytokine Level, 6 Cycles of Therapy



## Altri inibitori di Jak-1 e Jak-2

- TG101348: selettivo inibitore di Jak-2
- CEP-701: inibitore multi-kinasico
- XL019: inibitore selettivo di Jak-2 il cui sviluppo clinico è stato bloccato per neurotossicità



# CONCLUSIONI

- **I nuovi marcatori fenotipici descritti e le anomalie cromosomiche forniscono informazioni importanti per la comprensione della patogenesi delle MNP**
- **E' possibile classificare le MNP in base alle alterazioni molecolari**
- **La conoscenza dei meccanismi molecolari apre la strada allo sviluppo di nuovi farmaci selettivi**
- **La correlazione con il decorso clinico potrà fornire la base per decisioni terapeutiche nella gestione del paziente**

**Grazie per la vostra attenzione**