

## LOPENDE PROJECTEN 2019 Samenvatting

### **Project 2019-1**

#### **Analyse van de T-cell receptor klonaliteit bij primaire en gemetastaseerde tumoren, predictieve waarde bij behandeling met checkpoint inhibitoren.**

In samenwerking met dr. Lilla Reiniger, Semmelweis University, Budapest, Hongarije en Prof. Zoltan Szallasi, Harvard Medical School and Danish Cancer Society Research Center worden de karakteristieken van hersenmetastasen versus primaire long kanker en het effect van chemotherapie op de PD-L1 expressie bij tumorcellen onderzocht. Er wordt vermoed dat de T-cel klonaliteit bij deze patiënten verantwoordelijk is voor een verschillend prognostisch en klinisch verloop bij deze patiënten. TCRgamma genherschikking zal bij 47 hersenmetastasen worden getest met behulp van een recent door ons centrum gepubliceerde methode (Nollet et al., Int. J. Lab. Hematology, 2018).

### **Project 2019-2**

#### **Mutatieanalyse van cel-vrij DNA in bloed plasma ('liquid biopsy').**

De aanwezigheid van cel vrij tumor DNA in het bloed plasma van patiënten met een solide tumor of lymfoom opent de mogelijkheid om DNA mutaties op te sporen uit een eenvoudige bloedafname. Op die manier vermijdt men het nemen van een invasieve biopsie, en onderzoekt men tevens de multipole lokalisaties van een tumor. Het doel van dit project is de optimalisatie en validatie van de liquid biopsy analyse.

### **Project 2019-3**

#### **Exome en whole genome sequencing.**

Er is een evolutie naar steeds uitgebreidere mutatieanalyse. We evolueren in de komende jaren uiteindelijk tot een analyse met karakterisatie van de afwijkingen in het complete genoom. Voor zowel exome als whole genome sequencing is de verwerking en interpretatie van dergelijke gegevens een belangrijke uitdaging. Het uitbouwen van deze expertise is cruciaal. Het doel van dit project is wetenschappelijk onderzoek en uitbouw van expertise bij analyse van onco-hematologische aandoeningen door comprehensive tumor panels, exome en/of whole genome sequencing.

### **Project 2019-4**

#### **Bio-bank onco-hematologie**

Het centrum hematologie van het AZ Sint-Jan is één van de grootste centra van Vlaanderen voor behandeling van hematologische aandoeningen, en op die manier worden heel wat restmaterialen van (zeldzame) diagnosestalen bekomen. Dit project heeft tot doel om deze materialen voor wetenschappelijk onderzoek beschikbaar te stellen conform de regelgeving.

### **Project 2019-5**

#### **Mesenchymale stamceltherapie voor behandeling van patiënten met ernstige refractaire graft-versus-host ziekte na stamceltransplantatie.**

Bij sommige patiënten die een allogene stamceltransplantatie hebben ondergaan stellen we vast dat de donor lymfocyten de gezonde weefsels van de patiënt herkennen en beschadigen (GVHD, graf-versus-host-disease). Een behandeling van terugkomende GVHD met mesenchymale stamcellen (MSC) is in de gevallen waar de eerstelijnsbehandeling faalt een optie. De MSC worden geïsoleerd uit beenmerg van gezonde donoren en verwerkt door het laboratorium voor Cel en Gentherapie, te CHU luik.

## **Project 2019-6**

### **Extracorporele fotofereze (ECP) voor cutaan T-cel lymfoom**

Volgens de richtlijnen van de Belgische Hematologie Vereniging en internationale aanbevelingen is ECP een zeer goede therapeutische optie bij Sézary syndroom en vergevorderde stadia van Mycosis fungoides vanaf eerste lijn, en voor beperktere stadia bij refractaire ziekte of na multiële lijnen van eerdere therapie, zeker wanneer er ook (beperkt of meer) circulerende atypische T-lymfocyten zijn.

Bij ECP worden mononucleaire cellen in het perifeer bloed verzameld door aferese, en geïncubeerd met methoxypsoralen en vervolgens bestraald met UV-A licht, en daarna opnieuw toegediend aan de patiënt. Door het UV-A licht ontstaat crosslinking van het DNA waarvoor celdood of apoptose van de lymfocyten worden geïnitieerd. Het exacte mechanisme waardoor ECP actief is bij cutane T cellymfomen blijft nog onderwerp van verder onderzoek. Het werkt immunomodulerend waardoor er een expansie van dendritische cellen ontstaat en een verbeterde Thelper 1 respons. De behandeling wordt zeer goed getolereerd. De te verwachten overall response rate is ongeveer 40-60% (hoogst in combinatie). De behandeling nieuw, erg beloftevol, maar is nog niet terugbetaald in ons land, en kan oplopen tot 18.000 euro.

## **Project 2018-1**

### **Impact van TP53 mutatie op uitkomst van allogene SCT bij MDS en AML, een retrospectieve studie**

Men heeft recent vastgesteld dat de overleving van MDS patiënten na stamceltransplantatie afhankelijk is van de aan- of afwezigheid van een TP53 mutatie bij deze patiënten. Ook andere genmutaties zouden een belangrijke rol spelen. De rapporten suggereren bovendien dat een uitgebreide mutatie profilering noodzakelijk is om een beslissing tot transplantatie te kunnen nemen.

Bij 20 transplantpatiënten behandeld in het AZ Sint-Jan voor MDS is diagnostisch DNA materiaal beschikbaar. De TP53 mutatie-analyse zal uitgevoerd worden in het laboratorium om na te gaan of dit ook in ons centrum kan worden vastgesteld.

Literatuur : Lindsley et al., NEJM 2017, 376:536-47, Della Porta et al., JCO 2016 34(30):3627-3637.

## **Project 2018-2**

### **Gevoelige Ig/TCR klonaliteitsanalyse voor MRD bepaling en opsporing lymfomen in (hersens)vocht.**

Analyse van de immunoglobine en TCR genen zijn belangrijk bij de diagnose van een kwaadaardige B- of T-cel aandoening. De next generation DNA sequentie technologie laat toe de herschikkingen van deze genen te karakteriseren. Deze herschikking kan bij opvolging worden opgespoord met een gevoeligheid die kan oplopen tot 1 in  $10^4$  of  $10^5$  normale cellen. Vooral bij patiënten met een diagnose van B/T-ALL waarbij geen gevoelige merker beschikbaar is kan deze analyse een grote meerwaarde betekenen. Er zijn bovendien eerste indicaties (mededelingen op symposia) dat aanwezigheid van lymfomen in het centraal zenuwstelsel met een erg hoge gevoeligheid kunnen worden opgespoord door analyse van deze herschikkingen in het celvrij DNA in cerebrospinaal vocht. Dit project wenst deze techniek in het laboratorium op te zetten.

## **Project 2018-3**

### **RhD en foetale fractie bepaling op celvrij DNA.**

Anti-Rhesus D (RhD) antistoffen zijn een frequent voorkomende oorzaak van ernstige hemolyse bij het pasgeboren kind. In vele landen wordt een anti-D profylaxis toegediend aan alle Rhesus-D negatieve zwangere vrouwen, ook indien de foetus Rhesus-D negatief

is (30%). In andere landen zoals Nederland, Denemarken en Finland werd een nationaal screeningsprogramma opgezet voor niet-invasieve foetale RhD genotypering waarbij men de toediening van anti-D profylaxis beperkt tot de risicogevalen.

We wensen de accuraatheid en haalbaarheid van de foetale RhD genotyping op cel vrij DNA in maternas plasma te evalueren, een analyse die (in het kader van een screeningsprogramma) in België niet wordt terugbetaald.

### **Project 2017-2**

#### **Evaluatie van de mutatiestatus in AML patiënten door gerichte next generation sequencing**

Heel recent heeft next generation sequencing (NGS) meerdere mutaties gekarakteriseerd die voorkomen bij patiënten met AML, waaronder ook deze zonder chromosoomafwijkingen. We wensen de mutatiestatus van minstens 100 AML patiënten te onderzoeken bij diagnose en/of relapse over een periode van twee jaar met behulp van een custom-made NGS myeloïd gene panel. Het doel is de meerwaarde van deze moleculaire karakterisatie te bepalen ten opzichte van het klassieke chromosoom en moleculaire (PCR en Sanger) onderzoeken.

### **Project 2017-1**

#### **Moleculaire mutatiescreening bij patiënten met onverklaarbare anemie en/of cytopenie.**

In de klinische praktijk wordt men frequent geconfronteerd met onverklaarbare anemie en cytopenie (bloedarmoede), vooral bij oudere patiënten. Omdat een myeloïde leukemie een mogelijke oorzaak kan zijn, heeft een uitgebreide DNA-mutatiescreening hier mogelijk een grote meerwaarde.

Tot op heden is het echter onduidelijk hoe men de analyseresultaten bij deze indicatie moet interpreteren. Immers, een mutatie wordt ook waargenomen worden bij ongeveer 10% van de gezonde 70+ jarigen, men noemt dit *clonal hematopoiesis of indeterminate potential* (CHIP).

Er wordt echter gepleit om de patiënten nauwgezet op te volgen indien er een aanwezigheid is van meerdere mutaties, met oplopende cytopenie en bij aanwezigheid van mutaties die typerend zijn voor myeloïde aandoeningen.

We wensen in dit project prospectief een groep patiënten met een onverklaarbare anemie/cytopenie te testen naar aanwezigheid van mutaties. De resultaten kunnen vervolgens worden gecorreleerd met andere laboratoriumanalyseresultaten en het verdere klinisch verloop van de patiënt.

Het doel is de waarde van waargenomen genetische mutaties beter te kunnen inschatten en publiceren van de bevindingen.

### **Project 2016-2**

#### **Gevoelige opsporing van BCR-ABL1 kinase domein mutaties met behulp van NGS**

Chronische myeloïde leukemie (CML) wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van het fusieoncogen BCR-ABL1, een gevolg van de aanwezige t(9,22) chromosomale translocatie (het Philadelphia chromosoom). Mutaties in het BCR-ABL1 kinase domein zijn een belangrijke oorzaak van het falen van behandeling met tyrosine kinase inhibitoren (TKI). Bovendien kunnen subklonaal meerdere mutaties aanwezig zijn, vooral indien de patiënt behandeld werd met verschillende TKI's.

Tot dusver was DNA Sanger sequencing de gouden standaard voor de detectie van deze resistentiemutaties. Deze methode heeft echter een gevoeligheid van slechts ~20 %. De recente introductie van Next Generation Sequencing (NGS) laat toe om de mutaties gevoeliger op te sporen (1-5%) en met een hoge reproduceerbaarheid (Vannuffel ASH 2015), en is de methode in staat om mutaties vroegtijdig op te sporen en de klonale

evolutie van de resistente subklones op te volgen. kloon

We wensen prospectief patiënten met een primaire en (vooral) secundaire resistentie tegenover TKI's met deze gevoelige NGS mutatieanalyse te onderzoeken. Hiervoor wordt samengewerkt met het Institut de Pathologie et de Génétique (Gosselies).

### **Project 2015-1**

#### **Extracorporele fotofereze voor chronische graft-versus-hostziekte**

Graft-versus-hostziekte ('graft-versus-host disease'; afgekort GVHD) is een belangrijke en ernstige complicatie bij allogene hematopoëtische stamceltransplantatie. De *Belgian Hematological Society* heeft een studie opgestart voor behandeling van chronische GVHD op basis van extracorporele fotofereze (ECP). Het is een vorm van immunotherapie waarbij de T-lymfocyten worden uitgeschakeld. Bij ECP worden mononucleaire cellen in het perifere bloed verzameld met behulp van aferese en geïncubeerd met methoxsaleen, vervolgens bestraald met ultraviolet (uv) A-licht en ten slotte gereïnfundeerd.

Door de uvA-straling ontstaat celschade aan vooral de lymfocyten, door 'cross-linking' van DNA waardoor celdood (apoptose) wordt geïnitieerd. Na reïfusie accumuleren deze apoptotische cellen in lymfoïde organen, waar zij antigeen-presenterende cellen activeren. Het exacte immunologische mechanisme waardoor ECP effectief is bij GVHD en andere T-celgemedeerde aandoeningen, blijft onderwerp voor onderzoek. Naast de toename van apoptotische processen die kunnen leiden tot het verdwijnen van graft reactieve T-cellen, zijn modulatie van subpopulaties van dendritische cellen en verandering in verschillende vormen van effector-T-cellen van een cytokineprofiel geassocieerd met het T-helpercel type 1-fenotype tot een T-helperceltype 2 gedomineerd cytokineprofiel waargenomen.

Deze behandeling moet slechts in de meest ernstige gevallen van GVHD worden overwogen, maar er is hiervoor geen financiering voorzien. De kost voor deze behandeling, ongeveer 15.000 euro, zal indien nodig door het Fonds worden gedragen.

### **Project 2012-1**

#### **Bepaling van T-cel chimerisme bij RIC (reduced intensity conditioning) transplantaties.**

Het herstel van de bloedcelaanmaak na transplantatie verloopt voor de T-lymfocyten anders dan voor de andere bloedceltypes. Het isoleren van deze T-cellen uit perifeer bloed en beenmerg is vooral belangrijk bij een bepaald type van transplantatie, nl. de reduced intensity conditioning transplantatie. De chimerisme test kan de herkomst van de cellen achterhalen (donor ofwel patiënt) door DNA fingerprinting. De immuno-onderdrukkende therapie wordt indien nodig aangepast om zo een falen van een transplantatie te voorkomen.

### **Project 2011-3**

#### **Celscheiding**

Heel wat onderzoekstechnieken hebben een beperkte gevoeligheid. Door het sorteren van cellen uit bloed of beenmerg op basis van een specifieke eiwit-merker aan het celoppervlak kunnen we de gevoeligheid sterk verhogen.

Een hogere gevoeligheid van de analyses komt de patiënten ten goede. Bij diagnose: bijvoorbeeld het opzuivering van de plasmacellen bij multiple myeloom (project 2010-2); opzuivering van cellen voor arrayCGH analyse (project 2010-1); opzuivering van erythroïde voorlopercellen voor opsporing van JAK2 mutaties (project 2006-2). Ook kan bij opvolging van patiënten onder behandeling een herval vroeger worden gedetecteerd.

Het Wetenschappelijk Fonds Hematologie kocht recent een automaat aan dat op basis van magnetische partikels specifieke celfracties kan opzuiveren. We gaan momenteel het gebruik na van dit toestel in combinatie van de beschikbare analysemethodes.

### **Project 2011-1**

#### **Opsporen van p53 genmutaties bij chronische lymfoïde leukemie**

Het ziekteverloop bij patiënten met een chronische lymfoïde leukemie is erg variabel. Verlies van chromosoom-17 ter hoogte van het p53 gen betekent een ongunstige prognose voor de patiënt. Dit wordt vastgesteld bij ongeveer 5% van de patiënten. Genmutaties van het p53 gen hebben eenzelfde biologische betekenis.

Opsporing gebeurt door DNA analyse van de mutatie hotspot van het p53 gen door directe DNA sequentiebepaling.

### **Project 2006-1**

#### **Evaluatie van haplo-identische stamceltransplantatie bij patiënten die niet in aanmerking komen voor een matched unrelated donor transplantatie.**

Bij een haplo-identieke transplantatie is de donor de vader/moeder of het kind van de patiënt. Door de overerving van de chromosomen is het weefseltype van deze potentiële donoren steeds half-identiek aan dat van de patiënt. Om het risico op afstoting te beperken dient wel een dure selectie van de stamcellen (CD34+ cellen) uit het beenmerg te gebeuren. Hiertoe werd een toestel met steun van het Fonds aangekocht. Gegevens betreffende de gevolgde behandelingswijze en resultaten van deze vorm van transplantatie in ons centrum worden verzameld en verwerkt om deze transplantatietechniek in te toekomst verder te verfijnen.

### **Project 2000-1**

#### **Fluorescente *in situ* hybridisatie voor bepaling van chromosomale afwijkingen bij hematologische pathologieën**

Fluorescente *in situ* hybridisatie (FISH) is een gevoelige techniek om DNA-afwijkingen in in de celkernen aan te kleuren. Hiermee kan de behandelende arts de behandeling gaan bepalen omdat deze afwijkingen kunnen wijzen op een gunstige of minder gunstige prognose. Steeds meer nieuwe afwijkingen worden in de wetenschappelijke literatuur beschreven en zijn van belangrijke klinische betekenis.

### **Project 1997-4**

#### **Registratie van gegevens van stamceltransplantatie in AZ Sint-Jan voor verwerking door Belgische, Europees en internationaal stamceltransplantatie register.**

Zowel op Belgisch als op internationaal niveau worden de gegevens van stamceltransplantaties bijgehouden, en dit reeds sinds 1987. Onze registraties van de gegevens over de patiënten, hun behandeling en de resultaten van deze behandeling dragen bij tot de zoektocht naar de beste behandelingswijze voor de patiënten.