

20. April 2018

Gezielter Blick ins Genom myeloischer Neoplasien

Moderne Tumordiagnostikmethoden bei hämatologischen Erkrankungen

In der Hämatookologie rückt die Individualisierung der Therapie immer weiter in den Fokus der Behandlung. Seitdem hämatologische Neoplasien auf molekularer Ebene besser charakterisiert sind, werden diese anhand ihrer zugrundeliegenden molekulargenetischen Pathomechanismen in viele unterschiedliche Subtypen unterteilt. Differentiell aktivierte Signalwege sind für die Prognose und damit für den Therapieverlauf hämatologischer Neoplasien von entscheidender Bedeutung. Die Bestimmung von somatischen Mutationen und chromosomalen Aberrationen hat ihre Hauptindikation zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, bei der Verlaufskontrolle und bei der Überwachung therapeutischer Maßnahmen. Einen überragenden Vorteil gegenüber der mikroskopischen Diagnostik bieten molekulare Nachweisverfahren bei der Früherkennung von Rezidiven. Ein Anstieg der entsprechenden molekularen Marker kann dem klinischen Rezidiv um mehrere Monate vorausgehen. Das Feld der molekularen Hämatookologie wurde durch die Einführung moderner Hochdurchsatz-Sequenziertechnologien revolutioniert. Durch den Einsatz der sog. DNA-Sequenzierung der zweiten Generation (Next-Generation Sequencing, NGS) werden komplexe Pathomechanismen erfasst und ermöglichen damit eine maßgeschneiderte, präzise medikamentöse Therapie für den einzelnen Patienten. Innerhalb der NGS-Analytik wurden ebenfalls enorme innovative Fortschritte erzielt. Neue Weiterentwicklungen, zusammengefasst unter dem Begriff Hybrid-Capture-basiertes NGS, haben Eingang in die Routinediagnostik gefunden. Welche Vorteile bieten innovative NGS-Verfahren und wie werden diese in der molekularpathologischen Diagnostik hämatologischer Systemerkrankungen eingesetzt? Eine Antwort auf diese Frage finden Sie in diesem Artikel.

Molekularpathologische und prädiktive Diagnostik

Die molekularpathologische Diagnostik als interdisziplinäres medizinisches und naturwissenschaftliches Fachgebiet stellt einen Meilenstein in der Entwicklung der modernen Hämatookologie dar. Der gezielte Nachweis somatischer Mutationen und chromosomaler Aberrationen unterstützt und beschleunigt die klinische Einordnung und die Prognose-Einschätzung hämatologischer Systemerkrankungen und bildet die Grundlage für innovative Therapieansätze (targeted therapy). Zudem werden hochsensitive molekulargenetische Verfahren erfolgreich für die Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) und damit für die Beurteilung des Therapieansprechens im Krankheitsverlauf eingesetzt. Der hohe Stellenwert molekularpathologischer Alterationen in der Hämatookologie führt automatisch zu hohen Qualitätsanforderungen an die zugrundeliegenden genetischen Untersuchungen. So müssen

klonale Marker bei akuten und chronischen myeloischen Leukämien (z.B. BCR-ABL-Rearrangement, RUNX1-RUNX1T1-Rearrangement, NPM1- und JAK2-Mutationen) nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ aus nur wenigen Tumorzellen bestimmbar sein, um den Nachweis residueller Tumorzellen sicher beurteilen zu können. Zudem müssen klonale Marker nicht nur aus peripherem Venenblut und Knochenmarkblut, sondern auch aus Material wie formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe, aus dem eine DNA-Präparation sehr anspruchsvoll sein kann, zuverlässig detektiert werden.

Jeder molekulargenetischen Untersuchung sollte eine zytologische bzw. histologische und ggf. immunhistochemische Untersuchung vorausgehen. Weiterführende molekulargenetische Untersuchungen sind notwendig und wegweisend wenn

- a) mit den erhobenen klinischen Daten und den konventionellen Untersuchungen keine sichere Abgrenzung zwischen reaktiven Veränderungen und einer klonalen Erkrankung möglich ist
- b) zur differentialdiagnostischen Einordnung Leukämie-definierende Aberrationen bestimmt werden müssen
- c) zusätzlich zum klinischen Verlauf molekulargenetische Veränderungen hilfreich für die Einschätzung der Prognose sind und
- d) neue zielgerichtete Behandlungsoptionen in Erwägung gezogen werden.

In den vergangenen 6 Jahren sind dank moderner diagnostischer Methoden eine Reihe neuer genetischer Veränderungen bei hämatologischen Neoplasien und insbesondere bei myeloischen Neoplasien entdeckt worden, die eine erhebliche klinische und diagnostische Bedeutung haben.

Zusätzlich zu den für Leukämien und Lymphome typischen reziproken Translokationen sind somatische Genmutationen in den Fokus der molekularen Diagnostik gerückt. Betroffen sind vor allem Gene des RNA-Spleißapparates (z.B. SRSF2, SF3B1), der epigenetischen Regulation (z.B. TET2, ASXL1), Transkriptionsfaktoren der Hämatopoese (z.B. RUNX1, ETV6), des Cohesin-Komplexes (z.B. STAG2), der Proliferation und Tumorsuppressoren (z.B. JAK2, RAS, TP53) (Abb.1) (1, 2).

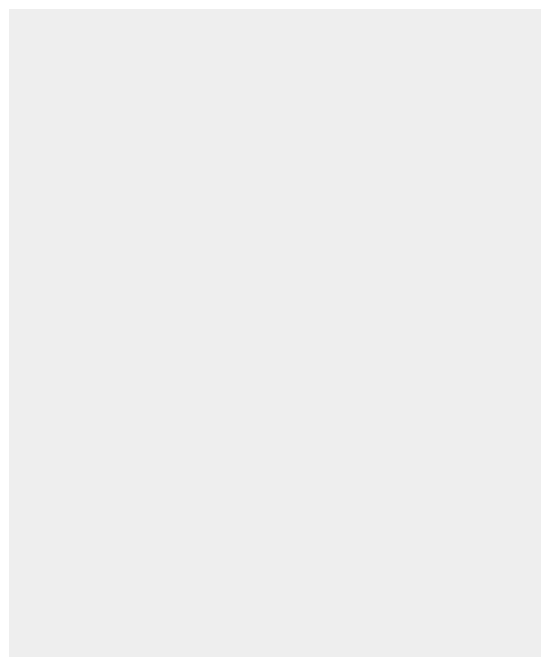
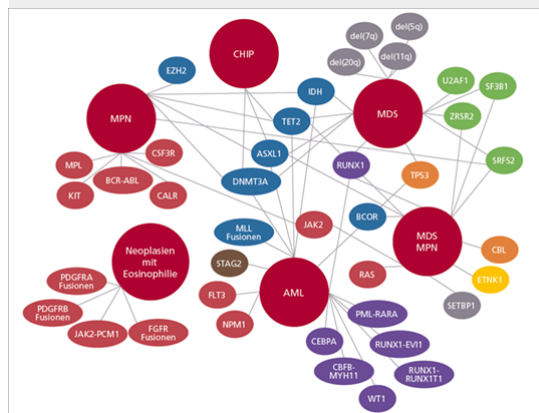


Abb. 1: Für die Entstehung von myeloischen Neoplasien verantwortliche genetische Veränderungen. Die genetischen Aberrationen sind nach ihrer zellulären Funktion farblich markiert. Blau: Epigenetische Modifikationen und Regulation der Genexpression, Grün: zelluläres Spleißen, Rot: Proliferation und Zellteilung, Orange: Tumorsuppressorgene, Lila: Transkriptionsfaktoren/Transkriptionsrepressoren der Hämatopoese, Gelb: Metabolismus, Braun: Cohesin-Komplex, Grau: unbekannte Funktion oder strukturelle Aberrationen. *CHIP: Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential; MDS: Myelodysplasie; MDS/MPN: Myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasie (Mischformen); MPN: Myeloproliferative Neoplasie; AML: Akute myeloische Neoplasie.*



Beispielsweise ist der Nachweis der p.V617F-Punktmutation im JAK2-Gen diagnostisch wegweisend für die Diagnose einer Polycythaemia Vera (PV), einer Primären Myelofibrose (PMF), einer Essentiellen Thrombozythämie (ET) oder einer Refraktären Anämie mit Ringsideroblasten (RARS). Diese spezielle Punktmutation führt im Exon 14 des JAK2-Gens zu dem spezifischen Aminosäureaustausch von Valin (V) gegen Phenylalanin (F) an der Aminosäureposition 617 und somit zu einer konstitutiven Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges (3). Wesentlich seltener, aber ebenfalls von großer Relevanz sind Treibermutationen im Exon 12 des JAK2-Gens, im Exon 9 des Calreticulin-Gens und im Exon 10 des MPL-Gens und sollten stufenweise bei Verdacht auf eine JAK2-V617F-negative MPN untersucht werden (WHO-Diagnose-Majorkriterien).

Bei ca. 5% aller PV- und PMF-Patienten und ca. 10% aller ET-Patienten lassen sich weder eine JAK2-, noch eine CALR- oder MPL-Mutation nachweisen, sie sind triple-negativ. Die Subgruppe der triple-negativen MPN stellt eine differentialdiagnostische Herausforderung dar. Insbesondere hinsichtlich der Abgrenzung zu anderen Entitäten bzw. reaktiven Veränderungen empfiehlt sich eine ausgedehnte Mutationssuche nach klonalen Markern (beispielweise TET2, ASXL1, EZH2, IDH1/2 und SRSF2).

Triple-negative Primäre Myelofibrosen haben ein erhöhtes Risiko für eine Transformation in eine akute Leukämie, insbesondere wenn eine ASXL1-Mutation als klonaler Marker nachgewiesen

werden kann (4).

Dabei muss berücksichtigt werden, dass Mutationen in den Genen DNMT3A, TET2 und ASXL1 auch bei der klonalen Hämatopoese unbestimmten Potenzials (CHIP) nachgewiesen werden, die zwar mit einem höheren Risiko, eine hämatologische Neoplasie zu entwickeln, assoziiert ist, aber ohne morphologisches Korrelat und ohne Blutbildveränderungen die diagnostischen Kriterien für eine hämatologische (myeloische) Neoplasie nicht erfüllt (5-7).

Ein weiterer wesentlicher Aspekt ist, dass molekulargenetische Alterationen in der Hämatookologie zunehmend Relevanz für die Therapie gewinnen.

Mit dem erfolgreichen Einsatz von „small molecules“ für die zielgerichtete Krebstherapie wurde 2001 mit der Zulassung des Tyrosinkinase-Inhibitors (TKI) Imatinib (Glivec®) ein Durchbruch in der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie (CML) erzielt. Die zugrundeliegende Pathophysiologie der CML ist auf molekulargenetischer Ebene genau definiert. Die maligne Transformation der hämatopoetischen Stammzellen wird durch das t(9;22)-Rearrangement (Philadelphia-Chromosom) induziert. Fast 25 Jahre später wurden die spezifischen Chromosomenbruchstellen als BCR-ABL-Translokation identifiziert. Die BCR-ABL-Translokation führt zu einer massiven Proliferation myeloischer Zellen. Die Onkogen-Abhängigkeit der BCR-ABL-positiven Stammzellen wird gezielt durch den Einsatz von TKIs inhibiert. Mit der TKI-Therapie veränderte sich das Behandlungsmuster der CML sehr stark und Behandlungsoptionen wie die Stammzelltransplantation, die häufig mit schwerwiegenden Komplikationen verbunden sein kann, rückten in den Hintergrund und werden heute als spätere Therapielinien nach Progression unter einer TKI-Therapie in Betracht gezogen. Weiterhin bietet die Einführung von sog. Zweitgenerationssubstanzen (Nilotinib, Dasatinib, Ponatinib) eine wirksame Behandlungsmöglichkeit bei Intoleranz oder Resistenzentwicklung unter einer vorausgegangenen TKI-Therapie.

Im Gegensatz zur CML unterliegen die meisten myeloischen Neoplasien multiplen Pathomechanismen und weisen mehrere Mutationen und/oder Chromosomenaberrationen auf. Vor dem Hintergrund der genetischen Variabilität dieser sehr heterogenen Gruppe von Erkrankungen ist ein breites Mutationsscreening von entscheidender Bedeutung, um die Patienten zu erfassen, die von einer zielgerichteten Therapie profitieren könnten.

Eine Reihe neuer Medikamente befinden sich in der klinischen Testung (1), darunter TKIs, epigenetische Modifikatoren, Zellzyklus-Inhibitoren und BCL2-Inhibitoren. In Europa ist der FLT3-Inhibitor Midostaurin für die Behandlung der FLT3-positiven AML zugelassen (8). Der orale IDH2-Inhibitor AG-221 (Enasidenib) wurde von der amerikanischen FDA für die Behandlung der rezidierten/refraktären IDH2-positiven AML zugelassen (9).

Der detaillierteren molekulargenetischen Aufschlüsselung myeloischer Neoplasien stehen zurzeit nur wenige klinische Datensätze gegenüber, die die Patienten-individuelle Mutationskonstellation (bei Vorliegen mehrerer Mutationen) systematisch mit dem Krankheits- bzw. Therapieverlauf korrelieren.

So konnte für Patienten mit Primärer Myelofibrose gezeigt werden, dass mit Nachweis von Hochrisiko-Mutationen, wie z.B. in den Genen ASXL1, EZH2, SRSF2 und IDH1/2, ein aggressiverer Krankheitsverlauf zu erwarten ist (10-12).

Das Wissen um prognostische genetische Marker ist nicht nur für die Abschätzung des Krankheitsverlaufs entscheidend, sondern wird vermutlich zunehmend wichtiger für die Therapiefindung. So sind Mutationen im Tumorsuppressorgen TP53 mit einer relativen Resistenz gegen konventionelle Chemotherapie verbunden. Ihr Vorliegen ist assoziiert mit zytogenetischen Veränderungen (komplex aberranter Karyotyp) und trägt somit zu dem aus der Literatur berichteten prognostisch ungünstigen klinischen Verlauf bei (13, 14).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Aufschlüsselung genetischer Risikofaktoren zu einem besseren klinischen Verständnis hämatologischer Systemerkrankungen führt. Die umfassende klinische und molekulargenetische Charakterisierung von myeloischen Neoplasien ermöglicht es, genetische Varianten zu identifizieren, die nicht nur von diagnostischer, sondern auch von prognostischer Relevanz sind.

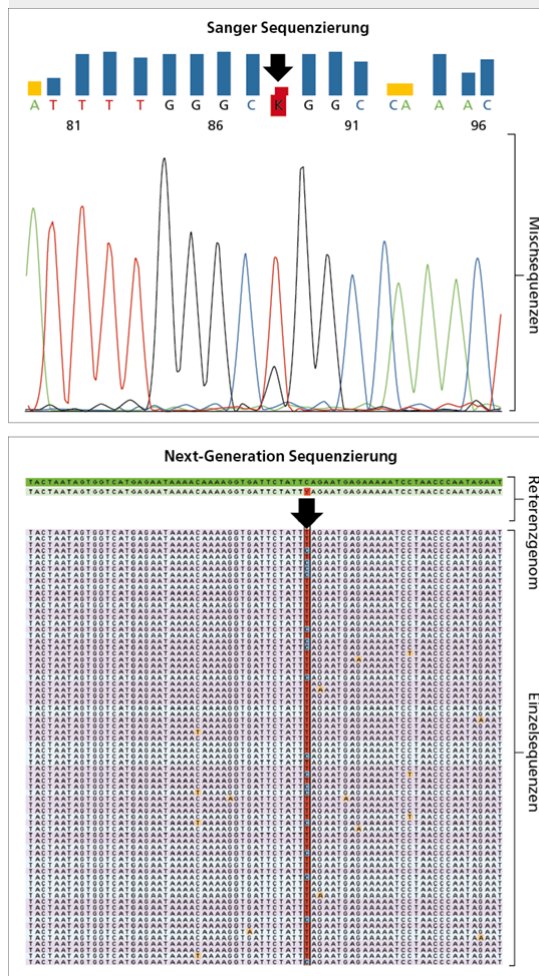
Genomics: Moderne hämatologische Diagnostik

Durch die Einführung der Sequenzierung wurde in der medizinischen Diagnostik das Zeitalter der Genomik eingeleitet. Neben Sonden-basierten PCRs galt die Sanger-Sequenzierung lange als alleinige Schlüsseltechnologie zur Charakterisierung genetisch bedingter Erkrankungen durch den direkten Nachweis der pathogenen (krankheitsauslösenden) Mutation/en. Dabei müssen einzelne kodierende Bereiche der relevanten Gene (Exons) zunächst mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert werden, um danach mit einer Kettenabbruch-basierenden Sequenzierreaktion die Abfolge der Nukleotide zu bestimmen. Durch den Einsatz der Sanger-Sequenzierung kann ein DNA-Fragment aus einer Blutprobe von bis zu 800 Basenpaaren (bp) Länge sequenziert werden. Dabei ist zu beachten, dass die Nachweisgrenze dieser Technologie bei ca. 20% Tumoranteil liegt und damit Mutationsanalysen aus Materialien mit niedrigen Tumorzellinfiltraten kritisch zu betrachten sind. Die mittels Sanger-Sequenzierung konventionelle „Gen für Gen“-Einzelanalyse gilt bis heute für spezifische Fragestellungen als Goldstandard, stößt jedoch bei Mutationsanalysen großer Gene (z.B. TET2, ca. 6.000 bp) an ihre Grenzen.

Für die hämatoonkologische Diagnostik stellt der rasante Wissenszuwachs klinisch relevanter molekulargenetischer Alterationen eine große Herausforderung hinsichtlich der Entwicklung neuer qualitativer und quantitativer Analyseverfahren dar. Dabei wird die klassische, sequenzielle (Gen für Gen)-Stufendiagnostik mittels Sanger-Sequenzierung zunehmend durch moderne Hochdurchsatzsequenzierverfahren abgelöst. Diese Verfahren werden unter dem Oberbegriff NGS oder Deep Sequencing zusammengefasst und beschreiben unterschiedliche molekulargenetische Verfahren, um Sequenzanalysen von gezielten Genen (Multi-Gen-Panel Sequencing) über das gesamte Exom (Whole Exome Sequencing) bis hin zum kompletten Genom (Whole Genome Sequencing) zu bewerkstelligen. Die Einführung der NGS-Sequenzierung ermöglicht vielen medizinischen Disziplinen (Molekularpathologie, Onkologie, Humangenetik) die Analyse komplexer genetischer zum Teil krankheitsübergreifender Pathomechanismen zu entschlüsseln. Die Technologie ermöglicht dabei die parallele Analyse großer Patientenkohorten. Im Gegensatz zur konventionellen Sanger-Sequenzierung, die die Sequenzen aller DNA-Moleküle aus einer Probe zu einer Sequenz zusammenführt, werden bei der NGS-Sequenzierung die Sequenzierergebnisse von allen analysierten DNA-Molekülen einzeln abgebildet und können somit auch präziser ausgewertet werden (Abb. 2). Insbesondere für die molekulare Onkologie bietet die NGS-Sequenzierung daher den großen Vorteil, dass nun auch Mutationen mit niedrigen

Allelfrequenzen (je nach zugrundeliegender Methodik: 3%-0,1% Mutationsrate) zuverlässig detektiert werden. So können mit dem Sequenziergerät MiSeq der Firma Illumina bis zu 25 Millionen Einzelsequenzen (reads) und mit dem Sequenziergerät NextSeq der Firma Illumina sogar bis zu 400 Millionen reads parallel erzeugt werden, wodurch die Sequenzierung eines kompletten humanen Genoms in nur einem Lauf ermöglicht wird.

Abb. 2: Sanger-Sequenzierung im Vergleich zum NGS. Ein Vorteil der NGS-Analytik gegenüber der konventionellen Sanger-Sequenzierung ist, dass durch die klonale Amplifikation der isolierten DNA eine deutlich höhere Auflösung der Ergebnisse erzielt wird. Während bei der Sanger-Sequenzierung DNA-Mischfragmente aus Wildtyp- und Tumor-DNA analysiert werden, besteht die NGS-Auswertung aus Millionen von Einzelsequenzen, die gegen ein Referenzgenom abgeglichen werden. Somit ermöglicht die NGS-Analytik den spezifischen Nachweis geringster Mengen mutierter Tumor-DNA. Bei der Sanger-Sequenzierung liegt die Nachweisgrenze hingegen bei 20% Tumor-DNA. Die Punktmutationen sind durch schwarze Pfeile markiert.



Die Sequenzierung des gesamten Genoms aus Tumorproben im Rahmen der medizinischen Grundlagenforschung bietet die Möglichkeit neue krankheitsauslösende Risiko-Gene zu

identifizieren, die bspw. potenzielle Zielstrukturen für neue Medikamente darstellen. Im Gegensatz zu diesem wissenschaftlichen Ansatz ist in der molekularpathologischen Routinediagnostik die Sequenzierung des gesamten Genoms einer Tumorprobe i.d.R. nicht notwendig, da im klinischen Alltag nur auf definierte und gut charakterisierte genetische Alterationen eine stratifizierte und personalisierte Therapie aufgebaut wird. Daher kommen eher kleinere, auf kodierende Regionen beschränkte, Genpanels zum Einsatz, die weit unter 1% des gesamten Genoms ausmachen und spezifisch für die zu untersuchende Entität sind. Dieses Vorgehen hat sich nicht nur aus Sicht der Dateninterpretation, sondern auch hinsichtlich der enormen anfallenden Datenmengen als sinnvolles Vorgehen erwiesen. Als konkretes Beispiel möchten wir ein Multi-Gen-Panel (MDS/MPN-Panel) erwähnen, das im Institut für Hämatopathologie Hamburg etabliert wurde, um Leukämien, im Speziellen myeloische Neoplasien, zu untersuchen. Dieses Multi-Gen-Panel ermöglicht eine simultane und damit kosteneffiziente Analyse von 22 diagnostisch und therapeutisch relevanten Krankheitsgenen und umfasst ein genetisches Territorium von ca. 120 Exons und 30.000 bp. Dabei können bis zu 25 Patienten (MiSeq Lauf) bzw. bis zu 130 Patienten (NextSeq, MidOutput Lauf) gleichzeitig auf Mutationen und kleine Insertionen und/oder Deletionen untersucht werden. Analysiert werden die häufigsten klonalen Marker (z.B. TET2, ASXL1, JAK2), sowie seltene klonale Marker, die nach aktueller Literaturlage stark mit dem klinischen Phänotyp der myeloischen Leukämie assoziiert sind. Ähnliche Untersuchungen wurden in publizierten Studien erfolgreich angewendet, um myeloische Neoplasien umfassend zu charakterisieren (15, 16). Um dieses genetische Territorium mittels Sanger-Sequenzierung auf Mutationen zu untersuchen, müssten ca. 40-60 Reaktionen pro Tumorprobe veranschlagt werden, was für 25 Patienten mehrere Monate Analysezeit bedeuten würde. Im Gegensatz dazu nimmt die NGS-Analytik inklusive der aufwendigen Datenanalyse nur ca. 10 Werkstage in Anspruch. Zusammenfassend erlaubt die Multi-Gen-Panel-NGS-Untersuchung, Mutationen, kleine Deletionen und Insertionen (Indels) in diagnostisch oder prognostisch relevanten Zielgenen mit hoher Spezifität und Sensitivität zeitgleich zu identifizieren, um ein aussagekräftiges, patientenindividuelles Tumorprofil zu generieren. Für die Multi-Gen-Panel Untersuchung wird in der hämatologischen Routine-Diagnostik sehr häufig die Amplicon-basierte NGS-Technologie („Amplicon deep-sequencing“) verwendet. Diese ist der Sanger-Sequenzierung sehr ähnlich und ist besonders gut geeignet, um Punktmutationen und kleine Indels in bis zu 200 Genen nachzuweisen. Hierbei wird die isolierte Patienten-DNA für die Herstellung einer sog. Gen-Bibliothek („Library“) verwendet. Dazu müssen die gewünschten Zielregionen mit einer Multiplex-PCR angereichert und anschließend mit patientenspezifischen DNA-Sonden markiert werden. Im ersten Schritt werden mit hoher Spezifität alle relevanten Genabschnitte amplifiziert. Für das oben genannte MDS/MPN-Panel werden ca. 220 PCR-Reaktionen benötigt um alle kodierenden Bereiche der 22 krankheitsrelevanten Gene abzudecken. An die amplifizierte DNA werden anschließend spezifische Adapter ligiert, die dafür sorgen, dass die einzelnen PCR-Produkte (Amplikons) kovalent an einen Glasobjektträger („Flow Cell“) gebunden werden. Weiterhin werden durch die Integration von kurzen patientenspezifischen Gensonden (molekulare Barcodesequenzen) die Sequenzierprodukte bioinformatisch der jeweiligen Patienten-DNA zugeordnet. Alle Patientenproben werden anschließend vereint und auf die „Flow Cell“ geladen, auf der auch später die eigentliche Sequenzierung stattfindet. Eine zweite PCR auf der „Flow Cell“, die das gebundene markierte Amplicon als Template nutzt, sorgt für eine Vervielfältigung und führt über eine sogenannte „bridge-amplification“ zu einer Cluster-Generierung aus mehreren Hundert bis mehreren Tausend identischen Molekülen. Die anschließende Sequenzierung erfolgt zyklusweise und nutzt fluoreszenzmarkierte Nukleotide. Abschließend werden mit Hilfe von speziellen Analysesoftware die generierten Sequenzen nach

Patientenproben sortiert gegen ein Referenzgenom abgeglichen. Um technische Artefakte auszuschließen, werden nur Mutationen angezeigt, die in einer Mindestprozentanzahl von Einzelsequenzen aufgetreten sind (je nach Fragestellung 2-3%).

Die zielgerichtete Sequenzierung von Zielregionen mittels der Amplikon (PCR)-basierten NGS-Technologie stellt ein robustes und kosteneffektives System dar, um Punktmutationen und kleine Indels von vielen krankheitsrelevanten Genen simultan zu detektieren.

Ein Nachteil der Amplikon-basierten NGS-Multi-Gen-Panel-Technologie ist jedoch, dass größere genetische Alterationen ab einer Größe von ca. 600 bp wie große Indels, Genfusionen (Translokationen) oder Genamplifikationen (copy number variations, CNV) zumindest auf DNA-Ebene nicht detektiert werden können. Gerade diese großen genetischen Alterationen sind in der Hämatologie wichtig, insbesondere wenn es um die Charakterisierung und Klassifizierung von akuten myeloischen Leukämien (AML) und myeloischen Neoplasien mit Eosinophilie geht. Die große Bedeutung von Genfusionen für das Verständnis der molekularen Pathogenese der AML spiegelt sich in der aktuellen WHO-Klassifikation wieder. Das Vorliegen bestimmter balancierter Translokationen oder Inversionen ist nicht nur beweisend für das Vorliegen einer AML, sondern definiert auch den spezifischen Subtyp. Eigene Entitäten sind bspw. akute myeloische Leukämien mit RUNX1-RUNX1T1 t(8;21), PML-RARA t(15;17), MLLT3-KMT2A t(9;11) und DEK-NUP214 t(6;9)-Translokationen. Dadurch werden AML-Subtypen mit spezifischen, zytogenetischen Aberrationen getrennt von solchen, die durch ihre Myelodysplasie-assoziierten genetischen Veränderungen, therapieassoziierten Veränderung (therapieinduzierte AML) oder ihrer Morphologie (AML mit multilineärer Dysplasie oder nach FAB-Kriterien) definiert werden.

Als weiteres relevantes Beispiel sind Genfusionen der PDGFRA-, PDGFRB-, FGFR- und JAK2-Gene zu nennen, die häufig in myeloischen Neoplasien mit Eosinophilie gefunden werden. In der aktuellen WHO-Klassifikation werden myeloische/lymphatische Neoplasien mit Eosinophilie und PDGFRA-, PDGFRB-, FGFR1- und PCM1-JAK2-Translokation als eigene Diagnosegruppe zusammengefasst. Die oben genannten Genfusionen führen zur Bildung von konstitutiv aktiven Tyrosinkinase-Fusionsproteinen, die alle ligandenunabhängig und damit konstitutiv das onkogene Wachstum der betroffenen Zellreihe fördern. Der Nachweis von PDGFRA- und PDGFRB-Translokationen hat therapeutische Konsequenzen, da sich beide Rezeptor-Tyrosinkinasen sehr gut mit TKIs (bspw. Imatinib und Nilotinib) hemmen lassen und ähnlich wie bei der BCR-ABL-positiven CML eine komplette Remission erzielt werden kann. Bei Patienten mit nachgewiesener FGFR-Translokation gibt es durch In-vitro-Experimente und in einer Fallstudie Hinweise auf ein Ansprechen auf den TKI Ponatinib (17, 18).

Um ein umfassendes Tumorprofil zu erstellen, werden daher in der Routinediagnostik zusätzlich zum Amplikon-basierten NGS noch weitere (molekular) zytogenetische (FISH), molekulargenetische (RNA-basierte Real-Time PCR) sowie immunhistochemische Analysen durchgeführt. Nur so können alle genetischen Alterationen (Punktmutationen, kleine Indels, Genfusionen und Genamplifikationen) effizient nachgewiesen werden. Weiterhin sollte bei der Diagnostik von Translokationen der Gene PDGFRB, FGFR1 und MLL, welche mit zahlreichen Genpartnern fusionieren können, der Nachweis aller möglichen Fusionskombinationen ermöglicht werden, um falsch negative Ergebnisse mit fatalen therapeutischen Folgen auszuschließen.

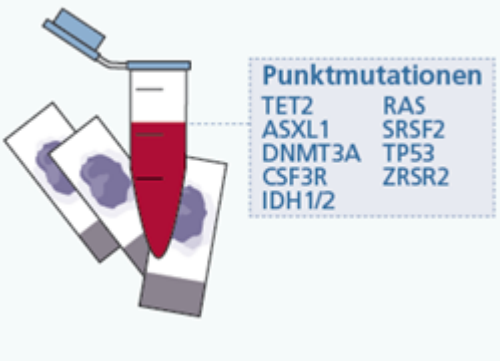
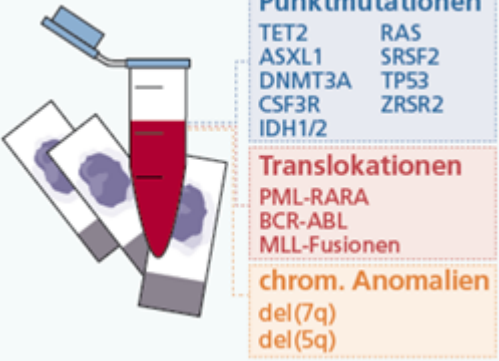
Die Weiterentwicklung der NGS-Technologie zur Erfassung aller therapeutisch relevanten

genomischen Alterationen in einer einzigen Untersuchung ist ein notwendiger Prozess, um eine schnellere und kosteneffiziente Mutationsanalyse zu ermöglichen.

Steigerung der diagnostischen Präzision durch neue NGS-Verfahren

Die Anreicherung durch Hybridisierung, das Hybrid-Capture-basierte NGS, ist eine solche innovative Weiterentwicklung der NGS-Analytik (19, 20). Es stellt eine technologische Weiterentwicklung des Amplikon-basierten NGS dar und erlaubt den Nachweis praktisch aller genetischer Alterationen (Punktmutationen, kleine Indels, Genfusionen und Genamplifikationen) zeitgleich an einer Tumorprobe (Tab. 1). Der Hauptunterschied des Hybrid-Capture-basierten NGS zum Amplikon-basierten NGS ist die Anreicherung der relevanten Zielregionen. Diese erfolgt nicht wie beim klassischen Amplikon-basierten NGS mittels einer Multiplex-PCR, sondern durch einen Hybridisierungsschritt mit spezifischen RNA- oder DNA-Sonden. Durch ein tumorspezifisches Sondendesign werden daher beliebig viele genetische Zielstrukturen („targets“) aus dem Patientengenom gefischt, mit Adapter- und patientenspezifischen Barcode-Sequenzen markiert und anschließend sequenziert. Die Anreicherung durch Hybridisierung hat den enormen Vorteil, dass diese Methode im Gegensatz zur PCR-basierten Technologie beliebig erweitert werden kann und dadurch große intronische Genbereiche, in denen bspw. die genomischen Bruchpunkte der Fusionsgene (z.B. MLL und BCR-ABL) lokalisiert sind, mit entsprechenden Sonden abgedeckt, angereichert und anschließend sequenziert werden können. Dabei erlaubt diese Technologie den Nachweis von bereits beschriebenen Translokationen als auch Genfusionen mit unbekanntem Translokationspartnern (z.B. PDGFRB).

Tab. 1: Vergleich der Amplikon-basierten mit der Hybrid-Capture-basierten NGS-Technologie anhand der MDS/MPN-Target-Sequenzierung, die am Institut für Hämatopathologie Hamburg in der Routinediagnostik durchgeführt wird.

Amplikon-basiertes NGS	Hybrid-Capture-NGS
 <p>Punktmutationen TET2 RAS ASXL1 SRSF2 DNMT3A TP53 CSF3R ZRSR2 IDH1/2</p>	 <p>Punktmutationen TET2 RAS ASXL1 SRSF2 DNMT3A TP53 CSF3R ZRSR2 IDH1/2</p> <p>Translokationen PML-RARA BCR-ABL MLL-Fusionen</p> <p>chrom. Anomalien del(7q) del(5q)</p>
Basiert auf einem Multiplex-PCR Verfahren	Basiert auf sequenzspezifische Hybridisierung
DNA-Input: ca. 30 ng	DNA-Input: ca. 100 ng
Wet lab Workflow: 2 - 3 Tage	Wet lab Workflow: 3 - 4 Tage

Punktmutationen und kleine Insertionen / Deletionen begrenzt genetisches Territorium	Punktmutationen und kleine Insertionen / Deletionen + Translokationen + Kopienzahlveränderungen + strukturelle Aberrationen unbegrenzt genetisches Territorium
ca. 1 Mio reads/Patient	ca. 7,5 Mio reads/Patient

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Hybrid-Capture-basierte NGS an praktisch allen Materialien (Mindestkonzentration von ca. 100-200 ng DNA) und sowohl für die Primäranalyse als auch bei Rezidivbildung einsetzbar ist. Dabei weist das Hybrid-Capture-basierte NGS wie das klassische Amplikon-basierte NGS eine Sensitivität von ca. 3% auf. Durch Herausrechnen von DNA-Duplikaten und Sequenzierartefakten mittels Einzelmolekülmarkierung („molecular barcoding“) und gleichzeitiger Erhöhung der Abdeckung („coverage“) aller relevanten Genabschnitte, kann das Detektionslimit bis hin zu einer Nachweisgrenze von etwa 0,1% herabgesetzt werden. Dadurch wird diese Technologie auch für die MRD-Verlaufsdagnostik einsetzbar.

Am Institut für Hämatopathologie Hamburg konnten wir in Zusammenarbeit mit der Siemens Healthineers-Tochter NEO New Oncology ein 28 Gen und 16 Genfusionen umfassendes Hybrid Capture-basiertes NGS in die Routinediagnostik myelodysplastischer/myeloproliferativer Neoplasien integrieren, das den Testumfang an genetischen Alterationen deutlich steigert. Es deckt ein genetisches exonisches und intronisches Territorium von ca. 500.000 bp (0,5 Mb) ab und ermöglicht zusätzlich zu den klassischen genetischen Alterationen den Nachweis von seltenen Genfusionen mit aberranten Bruchpunkten oder unbekanntem Genfusionspartnern. Durch den Einsatz dieses modernen NGS-Verfahrens erhoffen wir uns einen diagnostischen und therapeutischen Mehrwert für die molekulare hämatoonkologische Diagnostik chronischer und akuter myeloischer Neoplasien.

Fazit

Für akute und chronische myeloische Neoplasien ist der Nachweis molekulargenetischer Alterationen ein wesentlicher Bestandteil der modernen Diagnostik und für eine gezielte Diagnosestellung unerlässlich. Die einzelnen Mutationen und Genfusionen, aber auch bestimmte Mutationskombinationen, können die Differentialdiagnose myeloischer Neoplasien erleichtern. Zudem ist es möglich, anhand der Allelfrequenz genetische Subklone zu identifizieren, die zusätzlich zum Hauptklon einen Einfluss auf die Prognose haben können und damit potenziell therapieentscheidend sind. Weiterhin ermöglicht das NGS genauere Aussagen zur Mutationslast, was in der Zusammenschau mit potenziell zusätzlich mutierten Genen eine Abschätzung des Krankheitsverlaufs oder der Phase (chronische vs. progrediente) erlaubt. Neue innovative NGS-Verfahren ermöglichen eine schnelle und zuverlässige Analyse aller klinisch relevanten genetischen Alterationen an einer Blut- oder Gewebeprobe und werden in Zukunft neue wegweisende Einblicke in die Biologie und in die Pathomechanismen myeloischer Neoplasien

geben.

Interessenkonflikte: Es besteht kein Interessenkonflikt.

Nachlese aus Ausgabe 03/18 - Lesen Sie dazu auch:

**„MPN: Prävention und Therapie
thromboembolischer Ereignisse vs. Blutungen“**

unter www.med4u.org/13229

Dr. Athena Chalaris-Rißmann

Ph.D.

Abteilung Molekularpathologie

Athena Chalaris-IDres. Tiemann & Schulte Partnerschaft

Institut für Hämatopathologie

Image not found or type Fangdieckstraße 75 A

22547 Hamburg

Tel.: 040/707085-253

E-Mail: chalaris@hp-hamburg.de

Dr. Holger Hauspurg

M.D.



Abteilung Hämatopathologie
Dres. Tiemann & Schulte Partnerschaft
Institut für Hämatopathologie
Fangdieckstraße 75 A
22547 Hamburg

Tel.: 040/707085-232

E-Mail: hauspurg@hp-hamburg.de

ABSTRACT

A. Chalaris-Rißmann, H. Hauspurg, M. Tiemann, Institut für Hämatopathologie, Hamburg

Precision medicine by genetic-based profiling has become a powerful tool to treat blood cancer. The classification of hematologic malignancies in different subtypes based on biomarkers highlights the importance of genetic aberrations for clinical practice. The move towards precision medicine in blood cancer treatment is strongly depending on the deep understanding of oncogenic signaling pathways which promote disease initiation, progression, and response to therapy. Over the past several years the application of high-throughput sequencing technologies known as next-generation sequencing (NGS) has certainly revolutionized the field of diagnosis and treatment of blood cancer. NGS has unravelled important susceptibility genes and complex disease mechanism matched to the individual tumor profile. This gained knowledge can be utilized to develop new treatment strategies for fighting cancer. The recent development of new massively parallel sequencing techniques known as hybrid capture-based-NGS enables testing of a broad spectrum of genetic alterations that occur in hematologic malignancies. This comprehensive genetic testing enables the simultaneous detection of point mutations, small insertions and deletions as well as chromosomal translocations and exonic or gene copy number variations in a single assay. This review discusses the impact of NGS techniques on routine diagnostics, treatment decisions and clinical outcomes of hematologic malignancies.

Keywords: *Hematologic malignancies, genetic aberrations, NGS*