

# Zytogenetische und molekularbiologische Diagnostik bei MDS



Detlef Haase  
Abteilung Hämatologie und Onkologie  
Universitätsmedizin Göttingen

# Gliederung

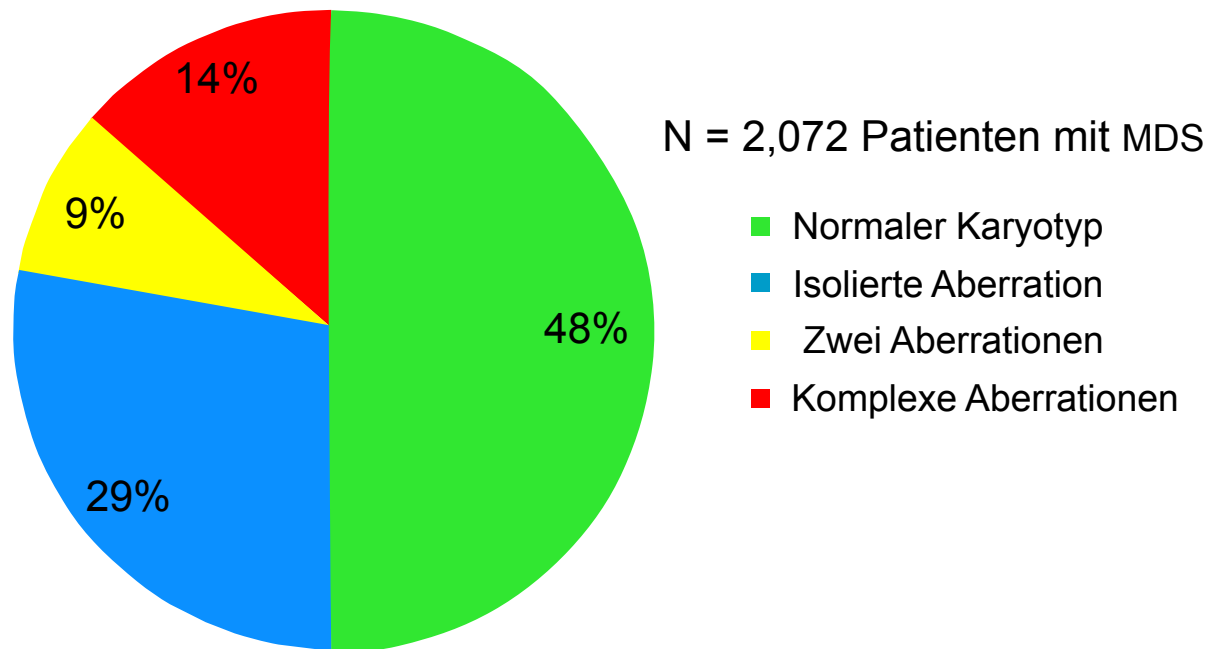
- **Zytogenetische Anomalien bei MDS**
- **Zytogenetisches Prognose-Scoring**
- **Neue Molekulare Marker und epigenetische Veränderungen**
- **SNP-Analysen**
- **CD34-FISH Analyse aus dem peripheren Blut**

# Bedeutung der Chromosomenanalyse bei MDS

- Etwa die Hälfte der Patienten mit MDS haben klonale Chromosomenanomalien<sup>1</sup>
  - Die Veränderungen haben pathogenetische Bedeutung (z.B. Verlust oder Hinzugewinn von Genfunktionen)
- Eine zytogenetische Analyse ist essenziell für die Diagnose und Klassifikation der MDS nach WHO<sup>2</sup>, IPSS<sup>3</sup> und WPSS<sup>4</sup>
- Chromosomenaberrationen haben prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben und für die Zeit bis zur leukämischen Transformation, unabhängig von anderen Parametern
- Die Chromosomenanalyse bildet die Basis für therapeutische Entscheidungen
  - Die Zytogenetik ist prädiktiv für das Ansprechen auf bestimmte Therapien, z.B. Lenalidomid bei del(5q)<sup>5</sup> und Azacitidine bei -7/del(7q)<sup>6</sup>
  - Die Prognose beeinflusst die Wahl der Therapie, z.B. die Chelattherapie<sup>5</sup>, immunsuppressive Therapie und allogene SZT

1. Haase D, et al. Blood. 2007;110:4385-95., 2. Swerdlow SH, et al. 2008. p. 441 3. Greenberg P, et al. Blood. 1998;89:2079-88, 4. Malcovati et al., JCO (2007),25(23):3503-10, 5. List AF, et al. N Engl J Med. 2006;355:1456-65. 6. Fenaux P, et al. Lancet Oncol. 2009;10:223-32

## Chromosomale Aberrationen treten bei MDS häufig und in unterschiedlichen Konstellationen auf



## WHO 2008: Inzidenz der häufigsten unbalancierten zytogenetischen Aberrationen bei MDS

| Unbalancierte Anomalien  | De novo MDS (%) | Sekundäre MDS (%) |
|--------------------------|-----------------|-------------------|
| +8*                      | 10              |                   |
| −7/del(7q)               | 10              | 50                |
| −5/del(5q)               | 10              | 40                |
| del(20q)                 | 5–8             |                   |
| −Y*                      | 5               |                   |
| iso(17q)/t(17p)/del(17p) | 3–5             |                   |
| −13/del(13q)             | 3               |                   |
| del(11q)                 | 3               |                   |
| del(12p)/t(12p)          | 3               |                   |
| del(9q)                  | 1–2             |                   |
| idic(X)q13)              | 1–2             |                   |

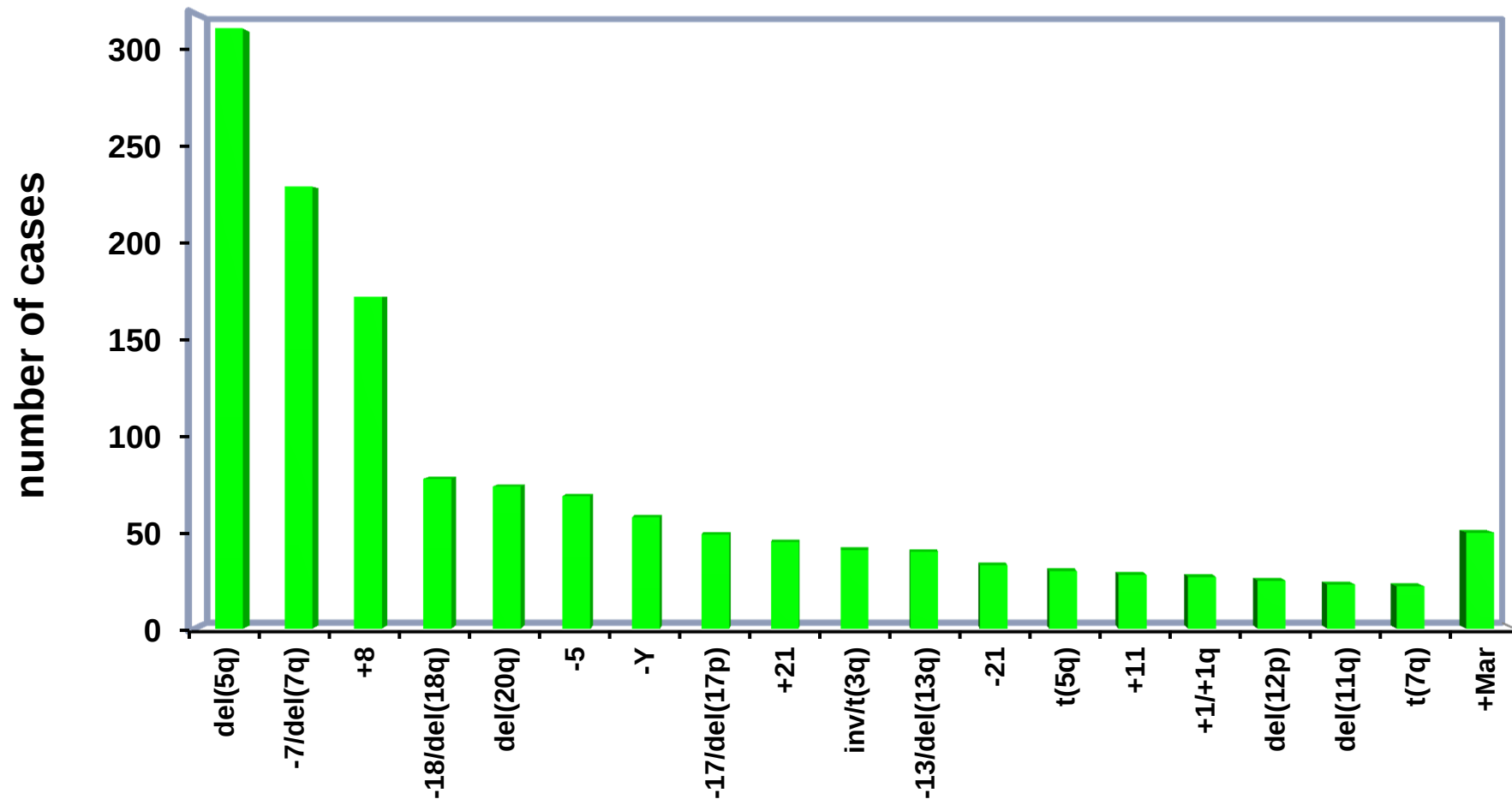
## WHO 2008: Inzidenz der häufigsten balancierten zytogenetischen Aberrationen bei MDS

| Balancierte Aberrationen | De novo MDS (%) | Secondary MDS (%) |
|--------------------------|-----------------|-------------------|
| t(11;16)(q23;p13.3)      |                 | 3                 |
| t(3;21)(q26;q22.1)       |                 | 2                 |
| t(1;3)(p36.3;)(q21.2)    | 1               |                   |
| t(2;11)(p21;q23)         | 1               |                   |
| inv(3)(q21q26.2)         | 1               |                   |
| t(6;9)(p23;q34)          |                 |                   |

Unbalancierte Aberrationen mit Verlust genetischer Information (Deletionen oder Monosomien) sind sehr häufig bei MDS; balancierte Aberrationen sind selten

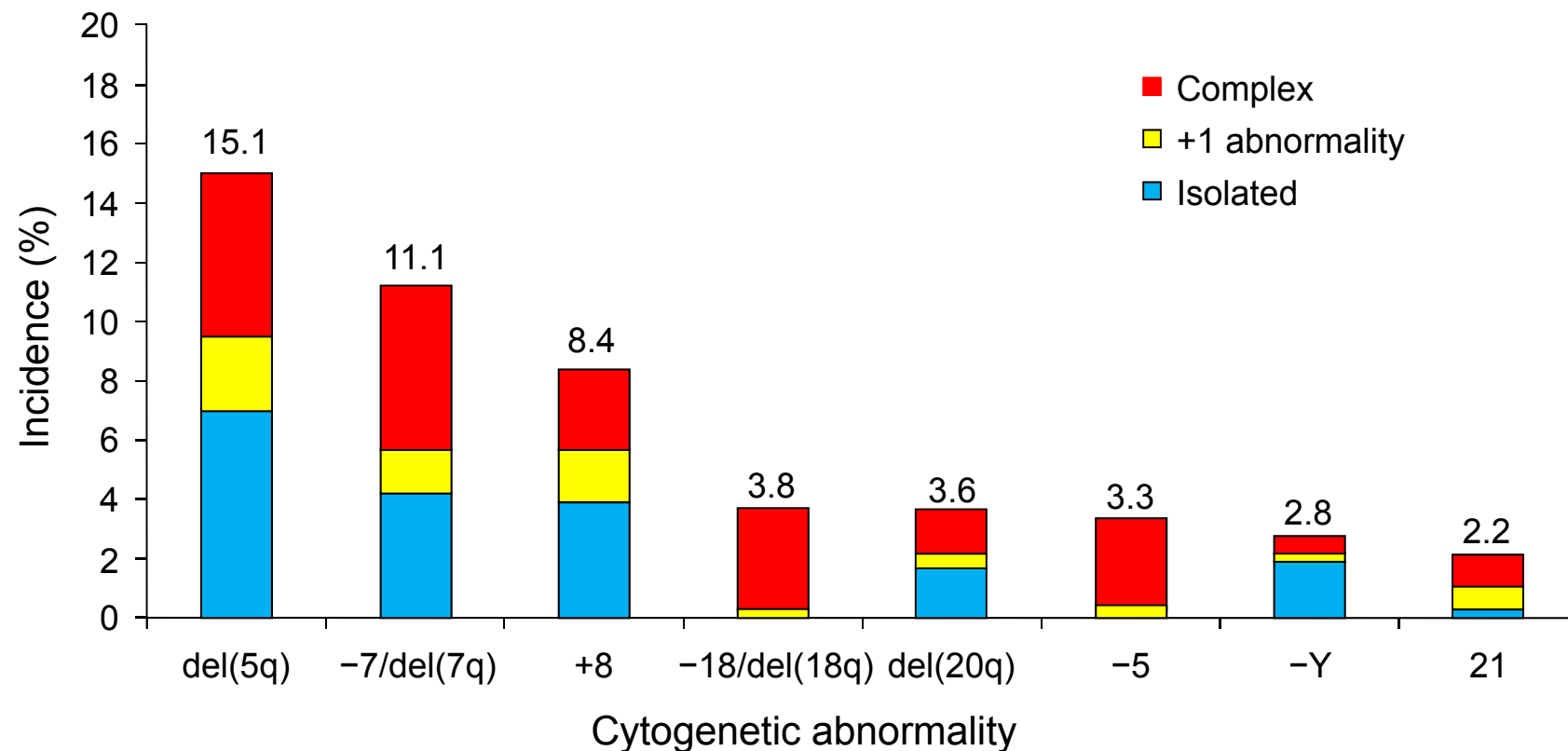
# Chromosomenanomalien bei 1080 Patienten mit MDS

(Haase et al., 2007, Blood, 110, 4385-4395)



Chromosomenanomalien

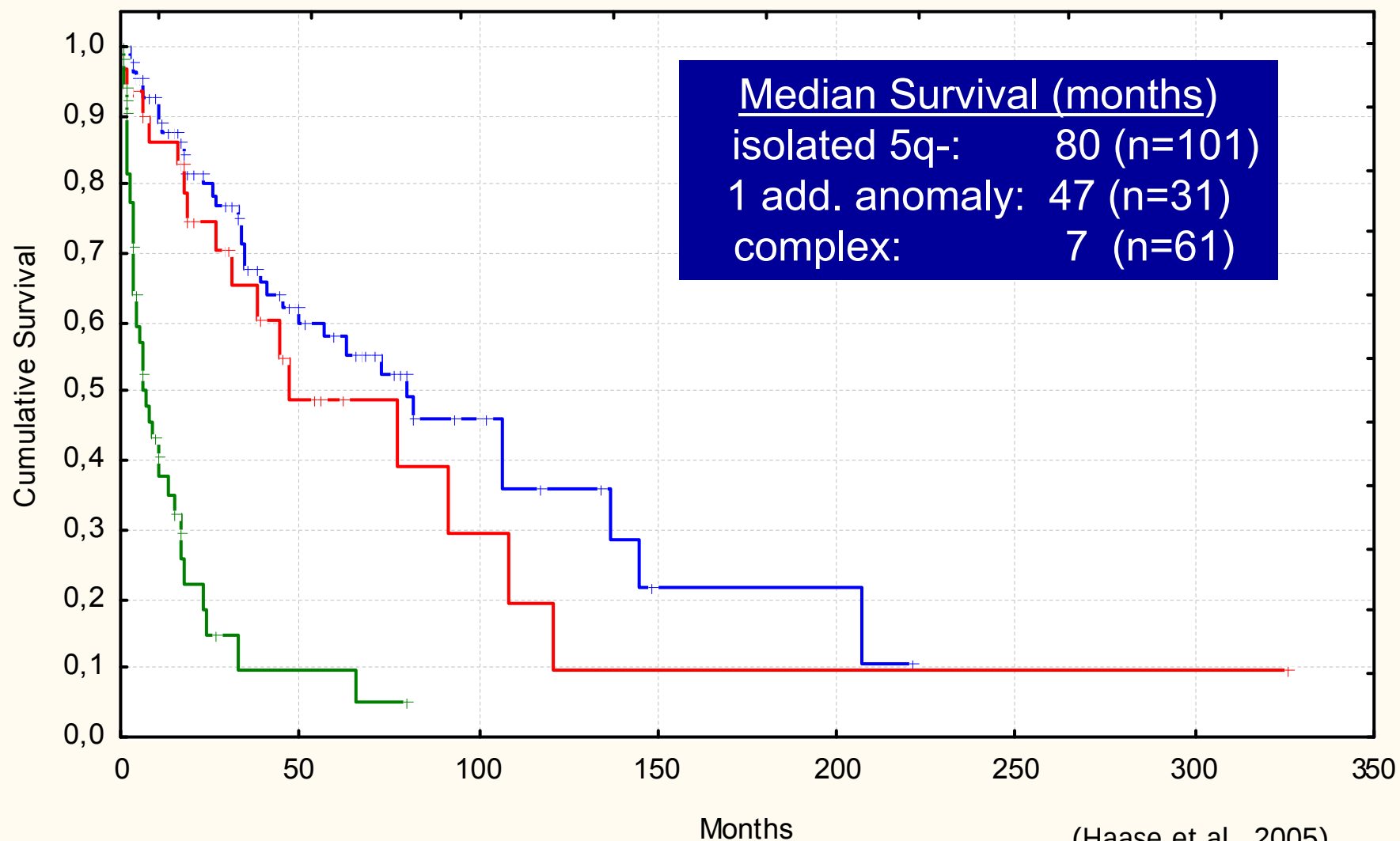
## Zytopogenetische Aberrationen sind häufig Bestandteil komplex aberranter Karyotypen



# 5q-

Survival (Kaplan-Meier) of patients with 5q-

- 5q- sole
- 5q- with 1 additional aberration
- 5q- within complex karyotype



(Haase et al., 2005)

# Risiko-Stratifikation und Prognose Scoring für MDS: IPSS

|               | IPSS score |      |      |       |       |
|---------------|------------|------|------|-------|-------|
| Variable      | 0          | 0.5  | 1.0  | 1.5   | 2.0   |
| BM blasts (%) | < 5        | 5–10 | –    | 11–20 | 21–30 |
| Karyotype     | Good       | Int. | Poor |       |       |
| Cytopenia(s)  | 0/1        | 2/3  |      |       |       |

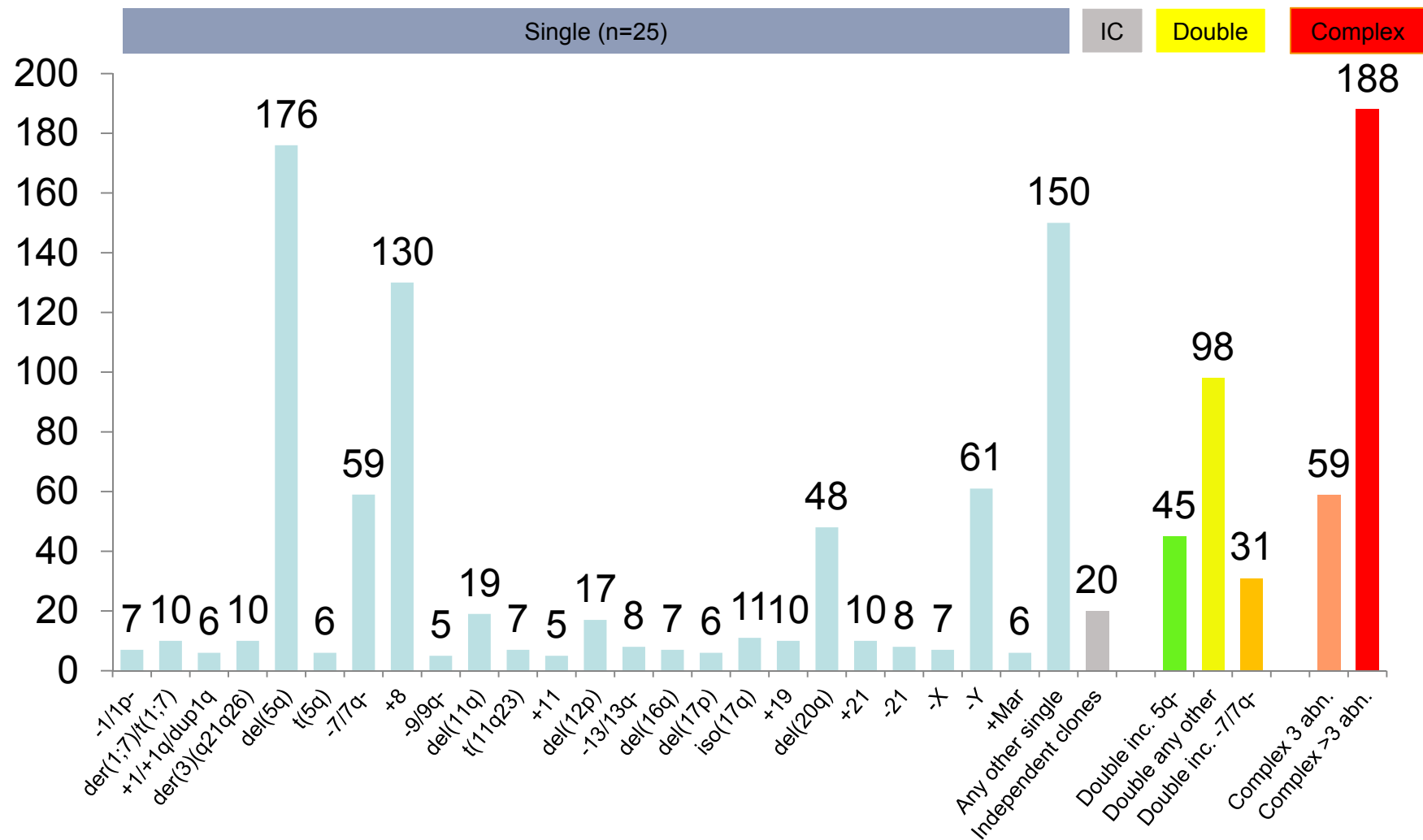
## Einfluss des Karyotyps gemäß MDS

- Good = normal, –Y, del(5q), del(20q)
- Poor = komplex ( $\geq 3$  Anomalien) oder Chromosome 7-Anomalien
- Int. = alle anderen Aberrationen

# Schwächen des IPSS

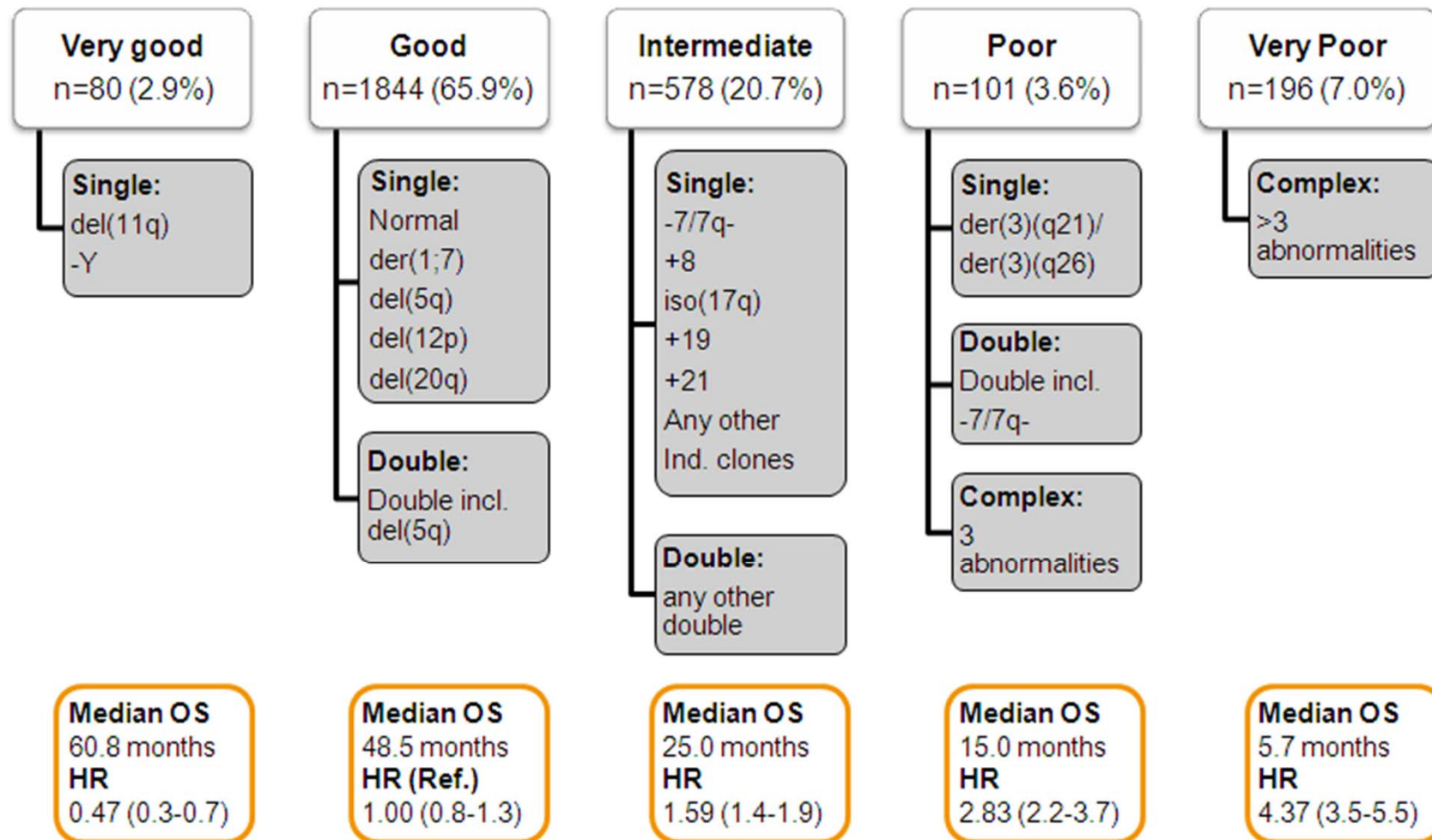
- Anzahl der Patienten mit abnormen Karyotypen ist gering (n = 327)
- Bedeutung seltenerer Anomalien (die bei MDS häufig sind) ist unbekannt
- “Intermediate” Gruppe (14% der Patienten) beruht lediglich auf Ausschluss (weder gut noch schlecht)
- Bedeutung von Doppelanomalien wurde weder untersucht noch berücksichtigt
- Eine Untergruppierung von Patienten mit komplexen Anomalien wurde ebenfalls nicht vorgenommen

## 32 Zytogenetische Subgruppen (internationaler Datensatz mit 2901 Pat.)



(Schanz et al., EHA, 2010)

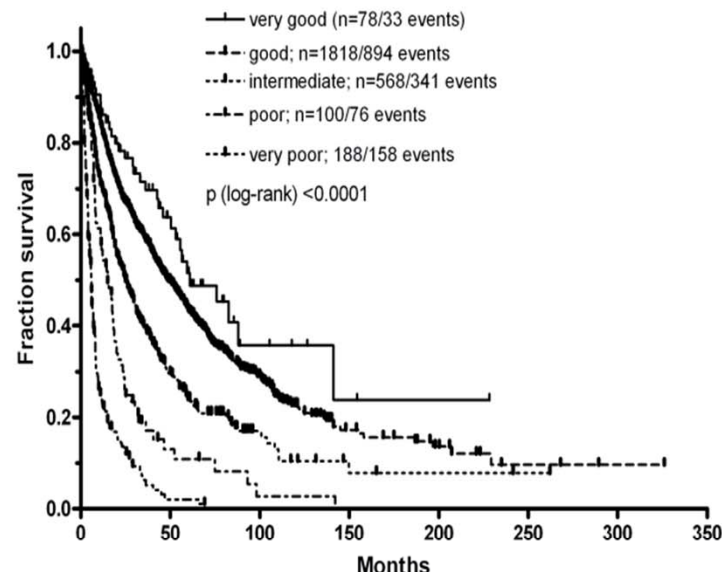
## Design des Prognosesystems mit 21 zytogenetischen Subgruppen



(Schanz et al., EHA, 2010)

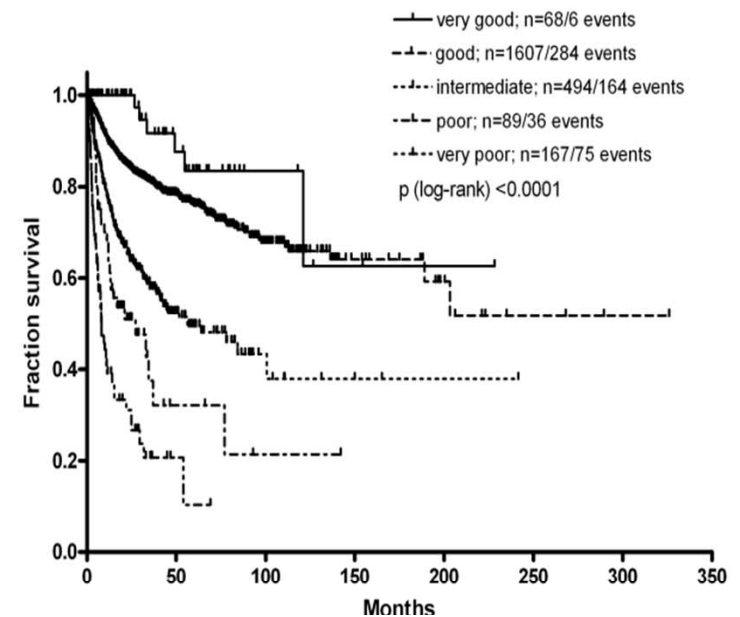
# Anwendung am vorhandenen Datensatz: Ergebnisse der univariaten Kaplan-Meier Analysen

A Overall survival by cytogenetic prognostic subgroups  
(univariate analysis)



P<0.001

B AML-free survival by cytogenetic prognostic subgroups  
(univariate analysis)



P<0.001

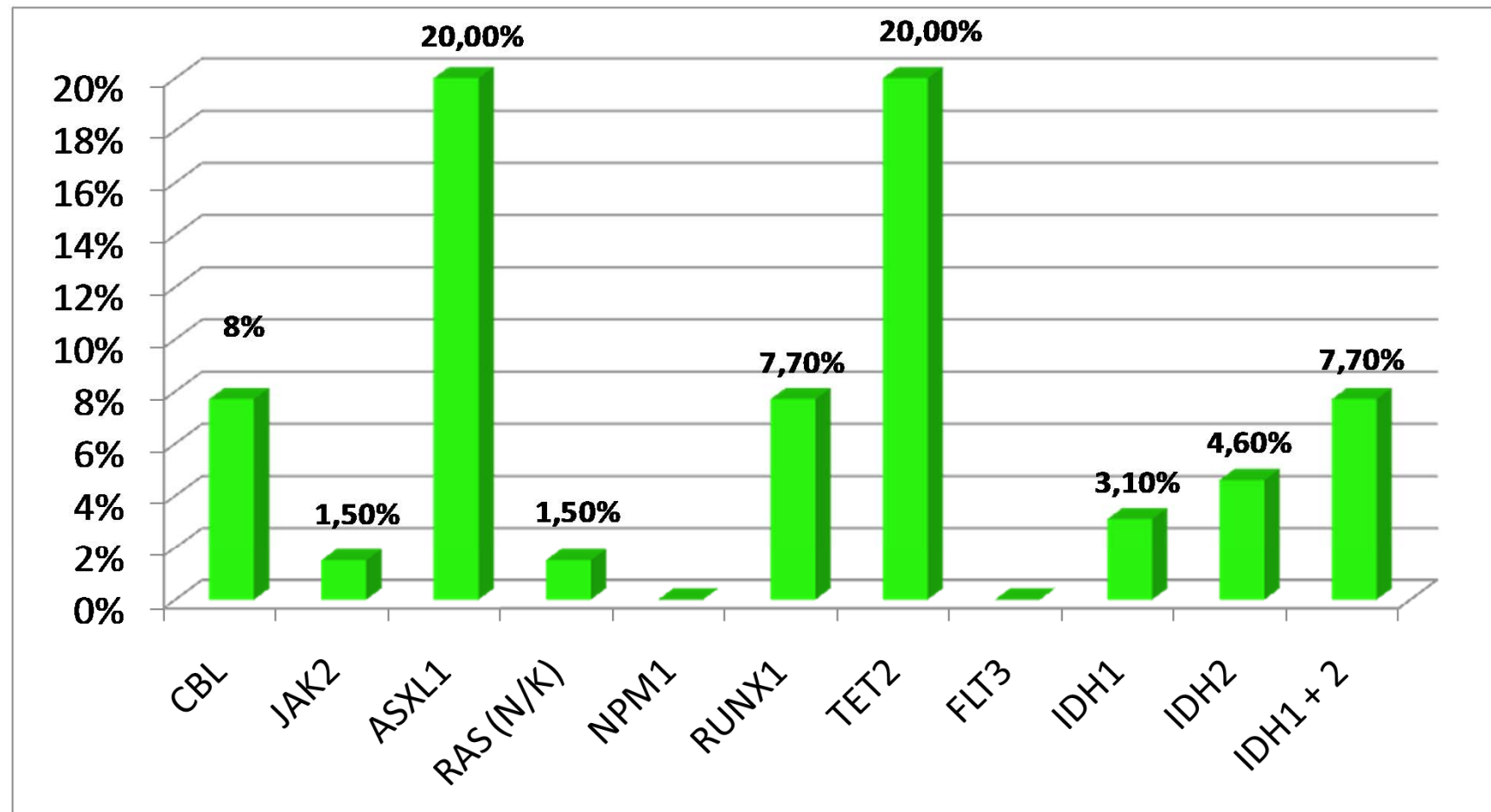
(Schanz et al., EHA, 2010)

# Neue molekulare Marker bei MDS

- **TET2 in 4q24**
- **RUNX1/AML1 in 21q22**
- **CBL in 11q23**
- **ASXL1 in 20q11**
- **IDH1 in 2q33.3, IDH2 in 15q26.1**
- **EZH2 in 7q36.1**

# Inzidenz von 10 Genmutationen bei MDS

(n= 65 Patienten: RA=5, RARS=13, RCMD=7, RAEB1=16, RAEB2 = 19, MDS-U = 5 )



(Rocquain J. et al. (2010), BMC Cancer, 10:401-407)

# Prognose neuer molekularer Mutationen bei MDS

| Betroffenes Gen               | Prognose  | Häufigkeit                                    |
|-------------------------------|-----------|-----------------------------------------------|
| ASXL (20q11.1)                | ungünstig | CMML: 43%, MDS: 11%                           |
| RUNX1/AML1 (21q22)            | ungünstig | MDS: 11%, t-MDS: 41%                          |
| IDH 1 und 2 (2q33.3, 15q26.1) | ungünstig | MDS: 3-5%                                     |
| EZH2 (7q36.1)                 | ungünstig | MDS: 5-6%, CMML: 13%                          |
| TET2 (4q24)                   | günstig   | Bis 40% bei normalem Karyotyp                 |
| JAK2 (9p21)                   | günstig   | 6% (5q-) bis 90% RARS-T (>600.000 T/ $\mu$ l) |
| CBL (11q23.3)                 | günstig   | CMML: 25%                                     |

## Genfunktionen können auch ohne Veränderungen des eigentlichen Genoms betroffen sein

- DNS Hypermethylierung kommt bei MDS häufig vor
- Zu den Genen, die bei fortgeschrittenen MDS und bei AML häufig hypermethyliert sind zählen *SOCS1*, *p15<sup>INK4b</sup>*, und *SFRP1* (und *WNT* pathway)

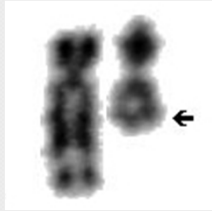
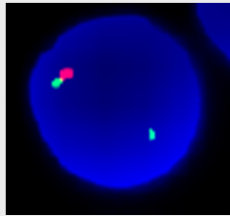
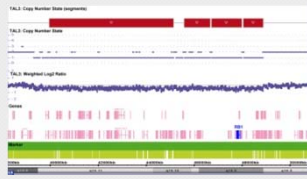
| Gen                                      | Hypermethyliert | High/Low risk                  | Assoziationen                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>SOCS1</i><br>(ref. 1)                 | 47.4%           | 52.6%/25.8%                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• NRAS Mutation</li> <li>• Invers korrel. mit günstigem Karyotyp</li> </ul>                                                                                                                |
| <i>p15<sup>INK4b</sup></i><br>(refs 2–5) | 48% (20–79%)    | 58% (28–100%)/<br>32% (0–100%) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• del(7q)/7q- chromosome arm<sup>3</sup></li> <li>• Poor prognosis<sup>4</sup></li> <li>• Methylierungsfrequenz und Stärke nimmt mit fortschreitender Erkrankung zu<sup>3</sup></li> </ul> |

- *SFRP1* (and *WNT* pathway)<sup>6,7</sup>
  - aberrante Methylierung bei 29% of primärer AML
  - geringere mRNA Transkription bei MDS

1. Wu SJ, et al. Br J Haematol. 2006;135:317-23.
2. Aggerholm A, et al. Eur J Haematol. 2006;76:23-32.
3. Christiansen DH, et al. Leukemia. 2003;17:1813-9.
4. Lübbert M. Leukemia. 2003;17:1762-4.
5. Uchida T, et al. Blood. 1997;90:1403-9.
6. Jost E, et al. Br J Haematol. 2008;142:745-53.
7. Reins J, et al. Leuk Res. [Epub ahead of print 2010 May 13].

## Analyse von „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNP)

- Neues molekular-zytogenetisches Verfahren zum Nachweis submikroskopischer genetischer Imbalancen/Variationen der Kopienanzahl von DNS-Abschnitten

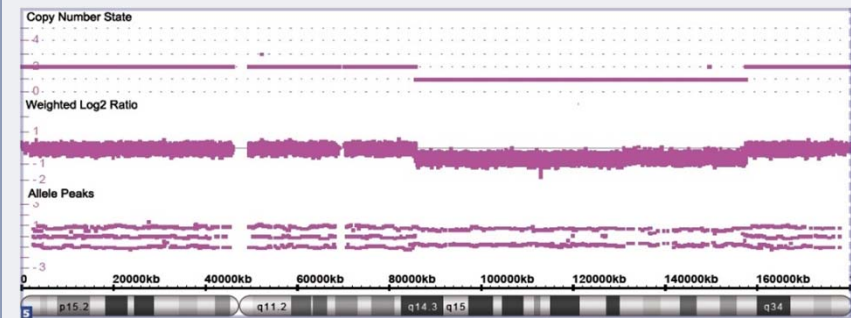
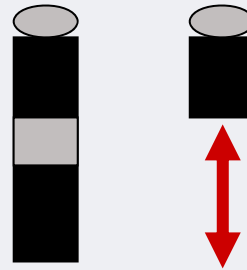
|                                       |                                                                                    |                                                                                     |                                                                                     |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|                                       |  |  |  |
| <b>Methode</b>                        | <b>klassische Zytogenetik</b>                                                      | <b>FISH</b>                                                                         | <b>SNP</b>                                                                          |
| <b>Auflösung</b>                      | <b>niedrig</b>                                                                     | <b>niedrig</b>                                                                      | <b>hoch</b>                                                                         |
| <b>neue Aberrationen</b>              | <b>ja</b>                                                                          | <b>nein</b>                                                                         | <b>ja</b>                                                                           |
| <b>sich teilende Zellen notwendig</b> | <b>ja</b>                                                                          | <b>nein</b>                                                                         | <b>nein</b>                                                                         |
| <b>Sensitivität</b>                   | <b>10%</b>                                                                         | <b>&lt;10%</b>                                                                      | <b>20-30%</b>                                                                       |
| <b>unterschiedliche Klone</b>         | <b>ja</b>                                                                          | <b>ja</b>                                                                           | <b>nein</b>                                                                         |
| <b>balanzierte Aberrationen</b>       | <b>ja</b>                                                                          | <b>ja</b>                                                                           | <b>nein</b>                                                                         |
| <b>UPD</b>                            | <b>nein</b>                                                                        | <b>nein</b>                                                                         | <b>ja</b>                                                                           |

Maciejewski  
et al. (2009)

# Aberrationen, die mit SNP Arrays detektiert werden können

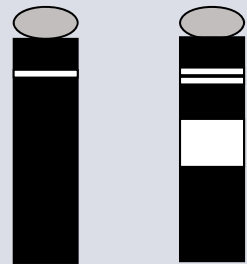
## Verluste

Zytogenet. Deletionen  
Mikrodeletionen



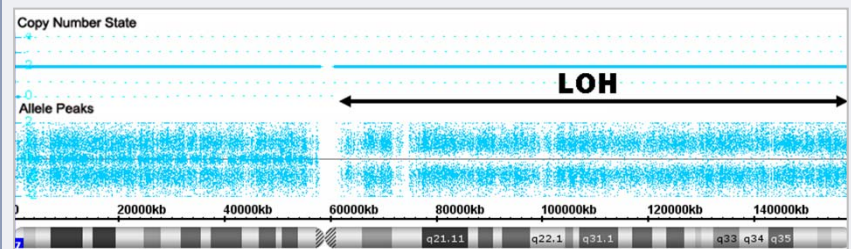
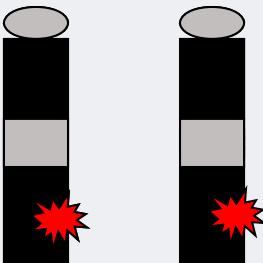
## Zugewinne

Zytogenet. Duplikationen  
Mikroamplifikationen



## UPD

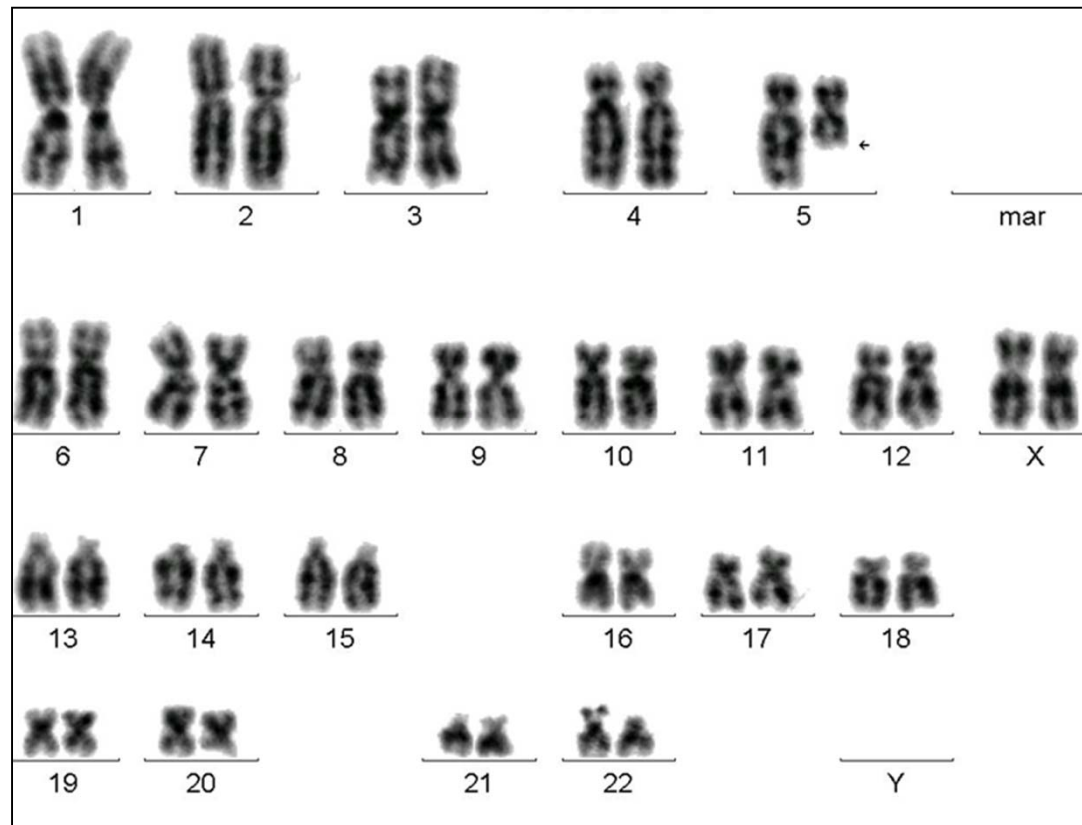
Homozygote Bereiche ohne  
Verlust  
von Material:  
UPD (uniparental disomy)  
CNN LOH (copy number neutral  
LOH)  
LCSH (long continuous  
stretches  
of homozygosity)



# Fallbeispiele aus unserem Labor

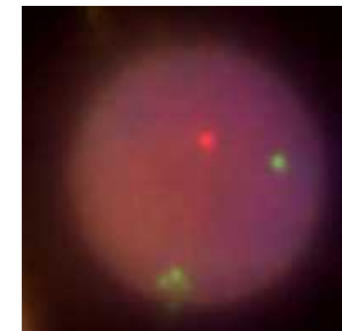
## Patient 1 (MDS-RAEB-II)

- Karyotyp:  
46,XX,del(5)(q13q31) [20]/ 46,XX [4]



- FISH-Analyse an CD34+ Blutzellen:

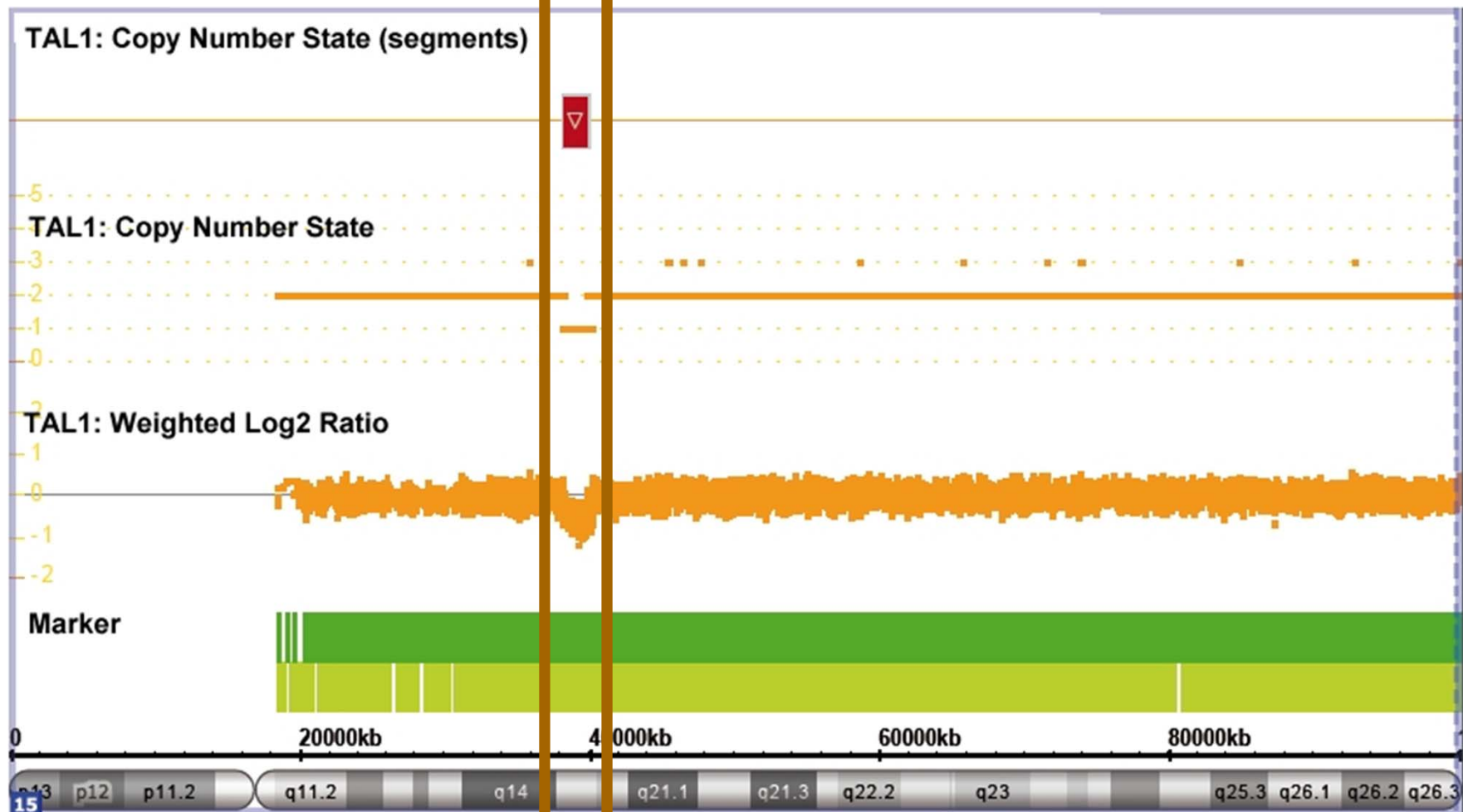
— 5q- (in 77%)



**EGR1**  
**D5S721**

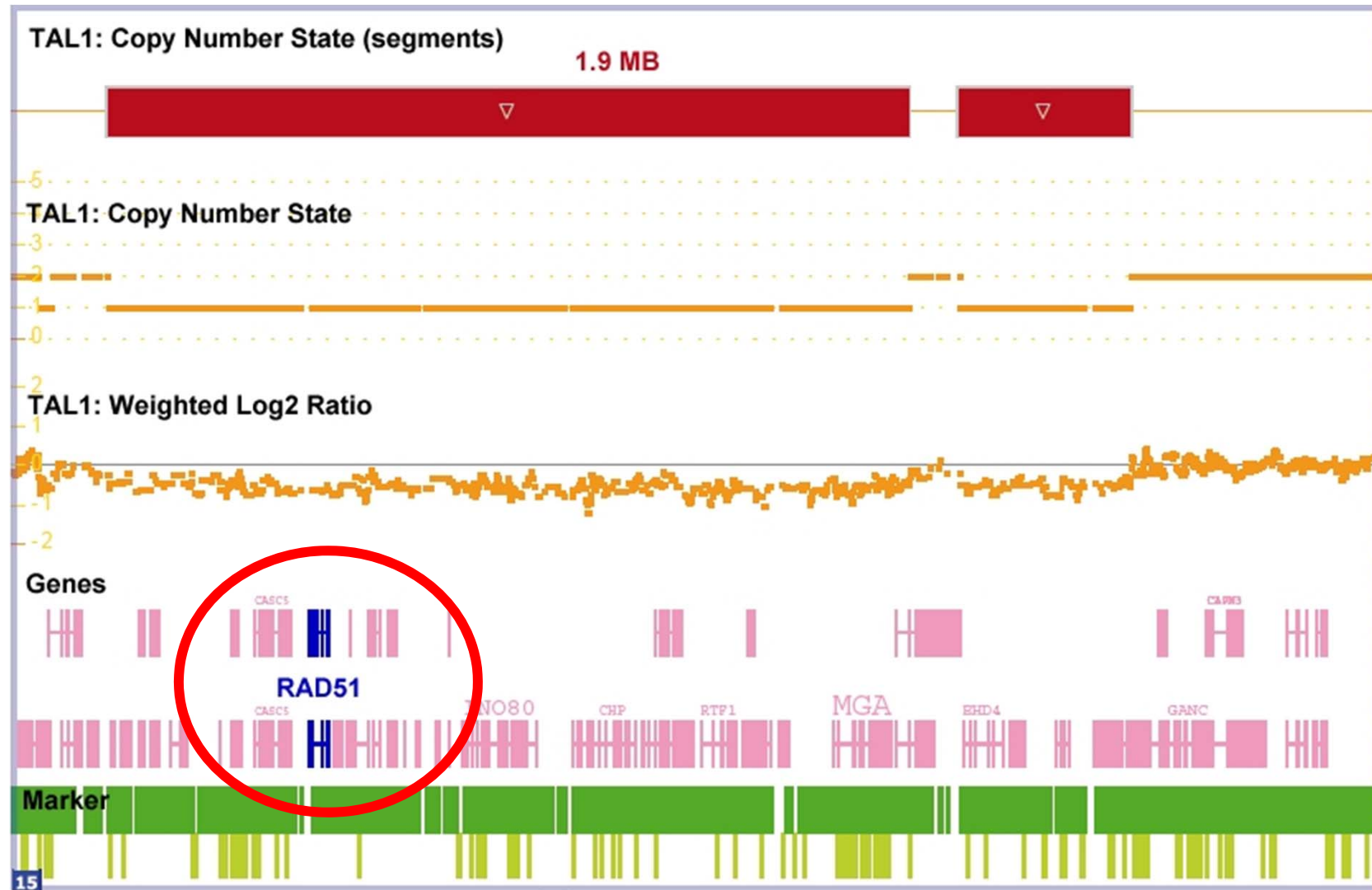
# Patient 1

## Chromosom 15



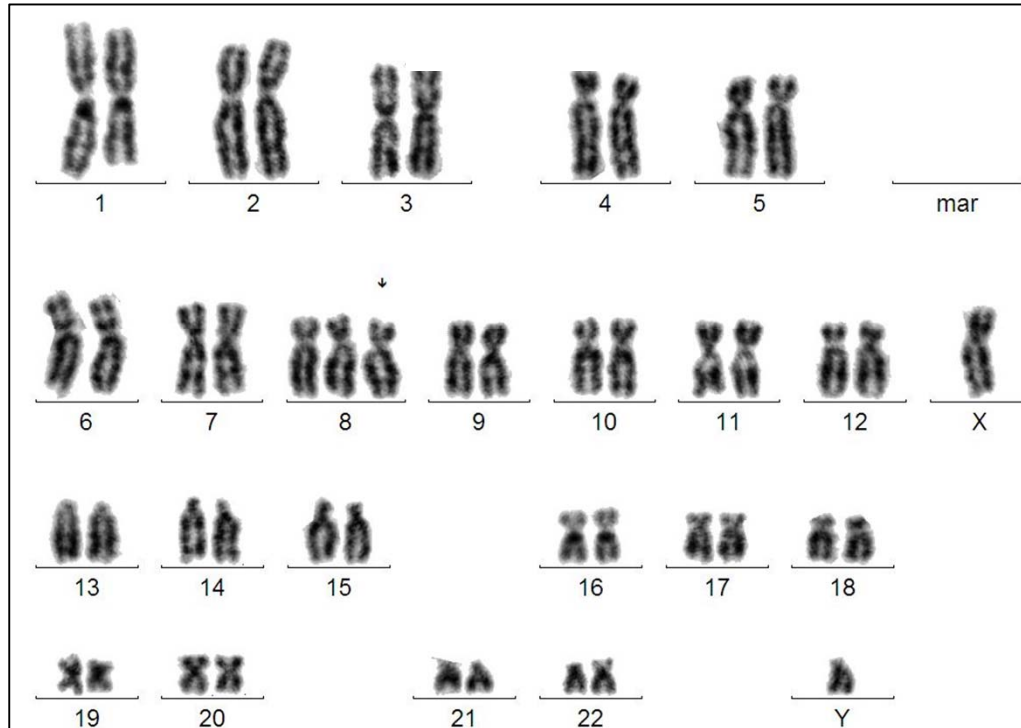
# Patient 1

## Chromosom 15



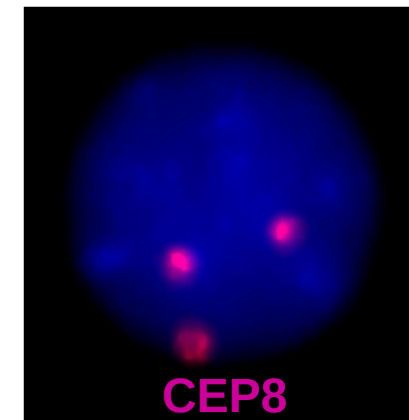
# Patient 2 mit MDS RCMD

- Karyotyp: 47,XY,+8 [18]/46,XY [7]

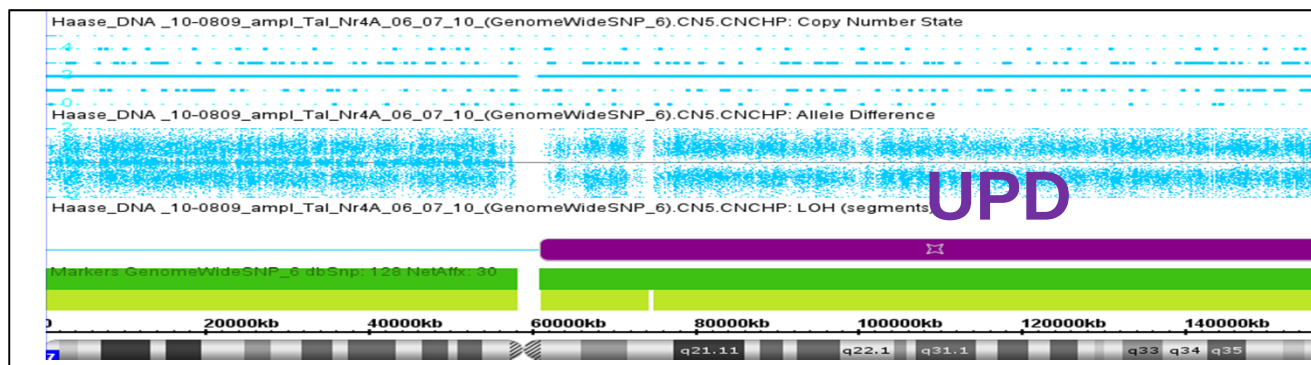


- FISH-Analyse an CD34+ Blutzellen:

— +8 in 56 % der Interphasekerne



- SNP Array Analyse an CD34+ Blutzellen:



- UPD von 7q

Chromosom 7

## Resumeé

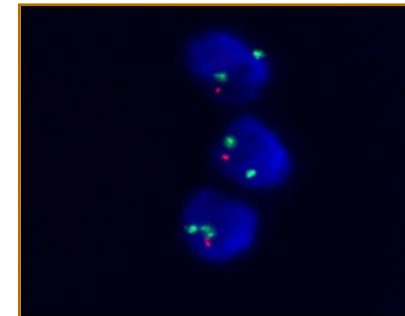
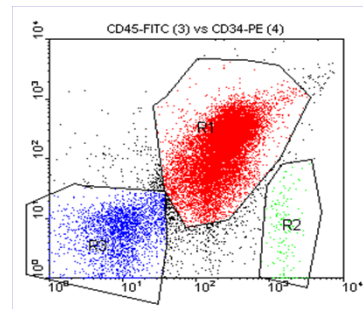
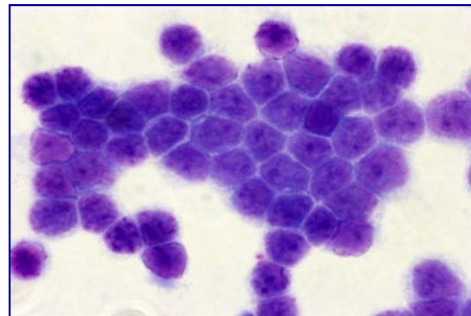
- SNP-Analysen auch an CD34+ Blutzellen möglich
- Aufdeckung neuer Anomalien
- Zusatzinformationen bei normalem Karyotyp
- Zusatzinformationen bei aberrantem Karyotyp
- Potenzial für verbesserte individuelle Prognoseabschätzung

# Was ist, wenn kein Knochenmark zur Verfügung steht?

- Patient lehnt Punktion ab
- Arzt lehnt Punktion ab
- Punctio sicca

**Neue Option:  
Zytogenetik mittels CD34-FISH aus peripherem Blut**

# Das Verfahren



- 20 ml peripheres Blut
- Anreicherung zirkulierender CD34+ Zellen aus peripherem Blut mittels „immunomagnetic cell sorting“ (MACS®)
- 80 000 – 400 000 CD34+ Zellen/Blutprobe
- FISH Analyse der angereicherten zirkulierenden CD34+ Zellen mit umfassenden FISH Sonden-Panels

## Ergebnisse der Pilotstudie

- n=27 Pat. mit MDS
  - n=16 Pat. mit „higher risk“ MDS behandelt mit  $\geq 4$  Zyklen 5-Aza
- und erste Daten der multizentr. prospektiven Studie**
- n=300 Pat. mit MDS und unterschiedlichen Therapien

## Die Analyse zirkulierender CD34+ Zellen mit FISH...

- ist ein verlässl. Verfahren um die Größe aberranter Klone im peripheren Blut zu überwachen und korreliert sehr gut mit der Bänderungsanalyse
- ist sowohl bei Hoch- als auch bei Niedrig-Risiko MDS durchführbar
- ist repräsentativ für die klonale Situation im Knochenmark
- erlaubt ein engmaschiges Monitoring unter Therapie
- kann die Notwendigkeit wiederholter Knochenmarkpunktionen reduzieren
- ist immer dann besonders hilfreich, wenn eine KMP nicht möglich oder erfolglos war
- detektiert frühzeitig/ist prädiktiv für klonale Evolutionen und Erkrankungsprogressionen

# Fallbeispiel

**Patientin F.H. weiblich, 74 Jahre alt**

**2005 Erstdiagnose eines hepat. metastas. Rektum Ca, OP, adjuvante Radiochemotherapie**

**2006 2-Zyklen Anti-CEA Radioimmuntherapie (Therapiestudie)**

**10/09 In der Nachsorge unklare Panzytopenie  
KMP: hochgradige Hypoplasie DD aplastische  
Anämie, keine Dysplasien, keine  
Blastenvermehrung**

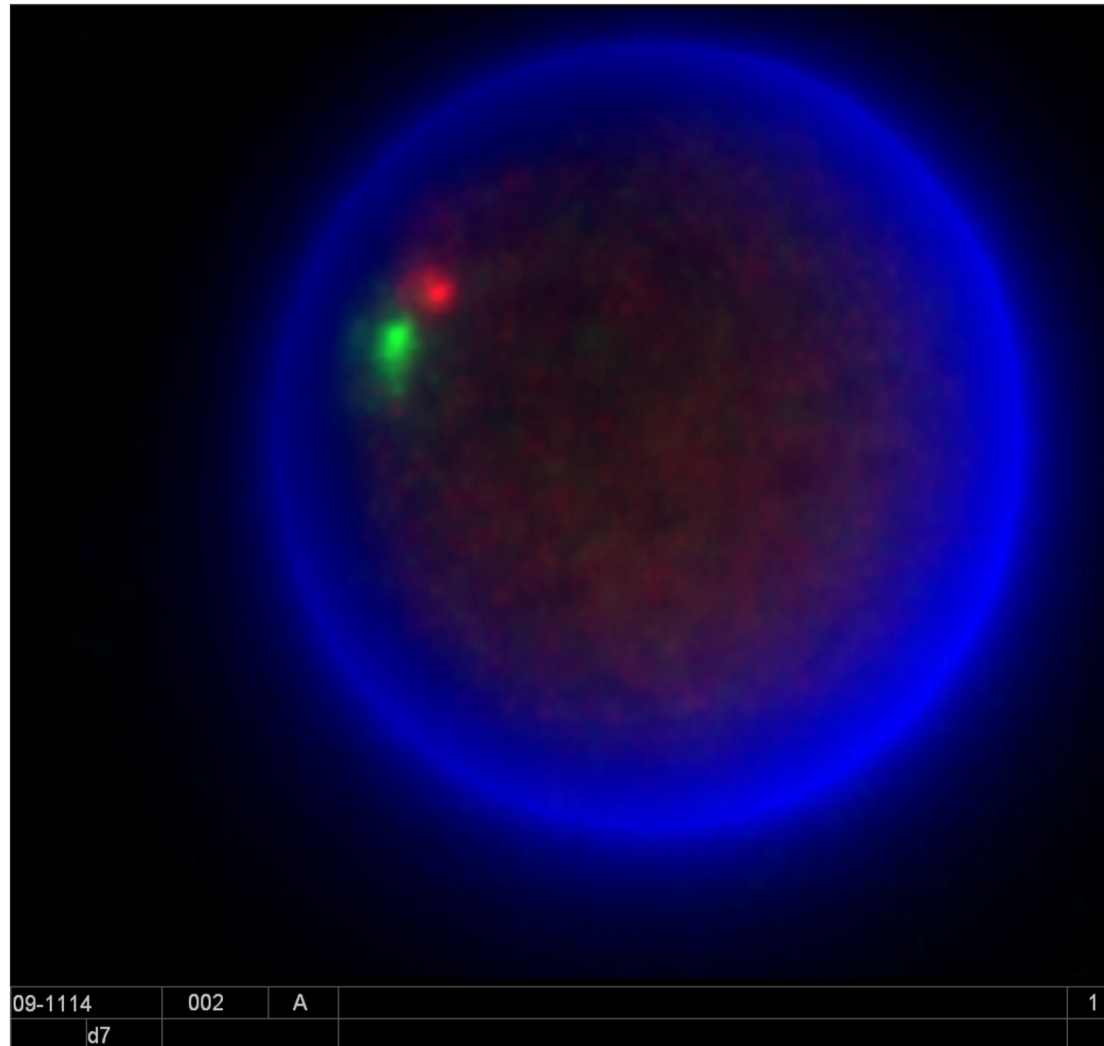
**Zur weiteren Abklärung Durchführung einer CD34-FISH-  
Analyse an pB-Zellen**

**h1**

Wann wurde die KMP für die Bänderungsanalyse durchgeführt, bitte darauf hinweisen, dass hier die Ausbeute an Zellen in Teilung gering war. Grund hierfür eruierbar? (wenig Material? langer Transportweg? schlechte Chromosomenqualität?) Ist ein sehr eindrucksvolles Fallbeispiel

haase\_detlef; 20.08.2009

# Komplette Monosomie 7 ( nur je 1 grünes Signal (Zentromer) und rotes Signal (langer Arm))



## **CD34 FISH aus pB:**

- **90% Zellen mit -7/7q- und**
- **70% P53-Allelverlust**

**Diagnose:  
„therapieassoziiertes MDS/AML mit  
ungünstiger Zytogenetik“**

# Zusammenfassung

- Chromosomenbänderungsanalyse ist nachwievor Standard für Diagnose, Prognose und Therapieentscheidungen
- Neue molekulare Marker und SNP-Analysen können die Zytogenetik ergänzen
  - Prognostische Bedeutung muss in multizentrischen Studien validiert werden
  - Besonders vielversprechend bei MDS/V.a. MDS mit normalem Karyotyp
- CD34 FISH Analyse aus peripherem Blut wertvolle Ergänzung der Zytogenetik
  - Ermöglicht eine zytogenetische Analyse auch bei nicht verfügbarem KM
  - Erlaubt engmaschige Kontrollen des Erkrankungsverlaufs und frühzeitige Erfassung von Progression
  - Ermöglicht ein genetische Therapiemonitoring unter neuen Substanzen wie
  - Lenalidomid und Azacitidine

# Perspektiven

- Mittels CD34-FISH aus dem peripheren Blut lässt sich das genetische Monitoring bei MDS deutlich vereinfachen und verbessern.
- In den nächsten Jahren wird die Nachweisbarkeit klonaler genetischer Veränderungen bei MDS durch die konsequente Kombination der konventionellen Zytogenetik mit Mutations-, SNP- und epigenetischen Analysen von aktuell 50% auf 80-90% und mehr zunehmen.
- Die diagnostischen Fortschritte werden zu spürbaren Verbesserungen der personalisierten Medizin auch bei MDS führen.
- Die höheren diagnostischen Kosten werden sich durch den gezielteren Einsatz teurer, innovativer Medikamente rentieren.

# Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

