



# MLL News

13.02.2019

---

## Additive molekulargenetische Diagnostik beim multiplen Myelom

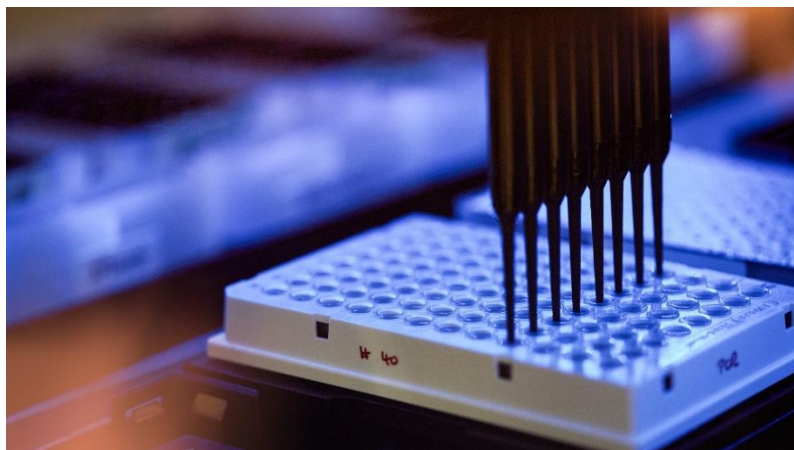
Ca. 10% aller hämatologischen Neoplasien sind Plasmazellerkrankungen wie das multiple Myelom (MM) oder Plasmazelleukämien. Auch bei der Diagnose sowie der prognostischen und therapeutischen Stratifizierung des MM ist in Analogie zu anderen hämatologischen Erkrankungen von einer zunehmenden Bedeutung molekulargenetischer Diagnostik auszugehen. Dies gilt gerade vor dem Hintergrund, dass es sich beim MM um eine genetisch äußerst heterogene Neoplasie handelt. Das MLL bietet derzeit hierzu die Untersuchung eines molekulargenetischen Panels an, das die Gene BRAF, KRAS, NRAS und TP53 umfasst.

Über 50% der Patienten mit multiplen Myelom weisen eine Mutation in einer Komponente des MEK/ERK-Signalwegs auf (Morgan et al. Leukemia 2018). So finden sich in 19 - 24% bzw. 21 - 27% der Patienten eine NRAS- bzw. KRAS-Mutation und in 4 - 9% eine BRAF-Mutation. Hierbei ist zu beachten, dass sich diese Mutationen gegenseitig nahezu ausschließen und nur bei etwa 2% der Patienten gemeinsam auftreten (Chapman et al. Nature 2011, Walker et al. JCO 2015). Obwohl die Kinase-kodierenden Gene unterschiedlich sind, haben doch alle eine ähnliche Domain-Struktur und den gleichen „downstream pathway“, was sie prinzipiell zu einem Angriffspunkt für zielgerichtete Therapien macht.

Mutationen im TP53-Gen, die initial bei 3 - 8% der Patienten gefunden werden, sind mit der del(17p) und einer ungünstigen Prognose assoziiert. Die Frequenz von TP53-Mutationen nimmt von Rezidiv zu Rezidiv bis auf 75% in fortgeschrittenen Stadien zu. Der Nachweis korreliert eng mit Resistenz gegenüber medikamentöser Therapie.

Patienten mit einer NRAS-Mutation, jedoch nicht Patienten mit einer KRAS-Mutation, sprechen schlechter auf den Proteasomeninhibitor Bortezomib an, wohingegen bei einer Therapie mit Dexamethason kein Einfluss der NRAS-Mutation auf das Ansprechen und die Zeit bis zur Progression nachgewiesen wurde (Mulligan et al. Blood 2014).

Der Nachweis einer BRAF V600E-Mutation ist beim multiplen Myelom im frühen Stadium mit einem guten Therapieansprechen auf die Standardtherapien wie Immunmodulatoren und Proteasom-Inhibitoren und alkylierende Zytostatika assoziiert (Rustad et al. Blood Cancer J. 2015). Teilweise in fortgeschrittenen Stadien bereits praktiziert - allerdings noch nicht ausreichend in klinischen Studien untersucht - ist wie bei anderen Malignomen der Einsatz von BRAF- und MEK-Inhibitoren.





# MLLi:ir - Ein diagnostischer Interpretations-Report für NGS-Daten

The screenshot shows the MLLi:ir web application interface. At the top, there is a red navigation bar with the MLLi:ir logo, a 'Services...' dropdown, and a user profile for 'Kristina'. Below the navigation bar, the main content area is divided into several sections:

- MLLi:ir interpretation report:** A section with text explaining that MLLi:ir (interpretation report) evaluates NGS data and provides a manually curated final report from a trained team of expert variant scientists with a clear cohesive diagnostic statement based on detected pathogenic mutations. It also mentions that variants are interrogated by publically available somatic databases, population frequency databases in-silico algorithms to predict the severity of mutations and their own well curated in-house laboratory variant database. The goal is to help improve outcomes for patients by offering clinicians an easy solution to produce the most accurate diagnosis by harmonizing the plethora of genomic data.
- MLLi:ir a simple solution (process overview):** A section with a three-step flowchart: 1. Details (Insert information), 2. Upload (FASTQ or VCF), and 3. Report (Download Results). A red button labeled 'Upload FASTQ or VCF' is positioned below the flowchart.
- Infrastructure:** A section with an image of a laboratory and text stating that in the last 10 years, knowledge on the classification, prognosis and especially on the therapy for leukemias and lymphomas has increased significantly. The right diagnostics, the provision of the various necessary methods, and understandable findings, for doctors and patients represent a complex task.
- Optimization:** A section with an image of two scientists in a lab and text stating that MLLi:ir is an expert and clinically trained team of variant scientists. The correct and comprehensive diagnosis of leukemias and lymphomas is a basic prerequisite for choosing the best possible therapy. Our goal is to advance leukemia diagnosis and thus provide as many people as possible with access to the best possible therapy.
- Decision:** A section with an image of a doctor's hands holding a stethoscope and text stating that diagnosing a patient with a hematological disease is a complex task because not all existing genetic variants have been described or precisely annotated. Medical professionals need to obtain all available knowledge about the detected genetic variants in a patient in order to establish a possible most accurate diagnosis.
- RAW FASTQ:** A section with a red header and icons for 'QC' and 'Alignment'.
- RAW VCF:** A section with a blue header and icons for 'Filteration' and 'Pathogenicity'.
- Manual Interpretation & Diagnostic Report:** A section with a green header and icons for '1. Diagnosis' and '2. Diagnosis'.

Bei einem Patienten eine Krankheit auf Basis von Daten aus dem Next-Generation Sequencing (NGS) zu diagnostizieren, ist ein komplexes Unterfangen. Um eine exakte Diagnose stellen zu können, muss sich das medizinische Fachpersonal alle verfügbaren Kenntnisse zu den spezifischen detektierten genetischen Varianten aneignen. Dies ist mit einem immensen -auch zeitlichen- Aufwand verbunden. Zusätzlich erschwert wird dies dadurch, dass bei weitem nicht alle genetischen Varianten beschrieben oder präzise annotiert sind. Selbst eine bestehende Annotation ist mitunter nicht leicht zugänglich oder widersprüchlich zwischen verschiedenen Quellen.

Der rasche Rückgang der Sequenzierkosten ist eng verbunden mit der Einführung von Sequenziergeräten mit deutlich erhöhter Kapazität und der einhergehenden Steigerung des Sequenzierdurchsatzes. Somit stellt heute nicht mehr die Sequenzierung an sich einen Engpass dar, sondern die Interpretation der nachgewiesenen Varianten. In den vergangenen Jahren wurden leistungsstarke bioinformatische Lösungsansätze entwickelt, um diesen zu beheben. Trotz all der Anstrengungen ist die Problematik der Annotation und insbesondere der Klassifikation, d. h. der Unterscheidung zwischen gutartigen und pathogenen Varianten, bis heute ungelöst.

Der Herausforderung der Varianteninterpretation stellt sich das MLL Münchner Leukämie Labor Tag für Tag, seit NGS 2010 als Methode in der Routinediagnostik in einem akkreditierten Umfeld (ISO 15189, ISO 17025) etabliert wurde. Die Erfahrung und das Wissen, das sich Wissenschaftler des MLL dabei angeeignet haben, sowie einige der Methoden, die hier entwickelt wurden, werden nun als Dienstleistung MLLi:ir der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt. MLLi:ir steht dabei für „interpretation report“, der Nutzern in Form einer einfach zu



bedienenden und übersichtlichen Web-Anwendung zugänglich gemacht wird. Jede über MLLi:ir erstellte Interpretation erfordert vom Nutzer einen minimalen (Zeit-)Aufwand, da die komplette Bewertung der Sequenziererergebnisse von Wissenschaftlern des MLL übernommen wird, die auf einen reichen Wissens- und Erfahrungsschatz in der Auswertung von NGS-Daten zurückgreifen können.

Über MLLi:ir werden die erhaltenen NGS-Daten evaluiert und der Nutzer erhält eine umfassende Interpretation, die von einem geschulten Team aus Wissenschaftlern mit großer Expertise in der Varianten-Bewertung manuell kuratiert wurde. Die Interpretation beinhaltet eine klare und schlüssige Aussage basierend auf den nachgewiesenen pathogenen Varianten. Zur Interpretation werden öffentlich zugängliche Datenbanken somatischer Mutationen und Populationsfrequenzen sowie in silico Algorithmen zur Vorhersage des Schweregrades einer Mutation ebenso abgefragt wie die MLL-eigene, gut gepflegte Varianten-Datenbank. MLLi:ir ermöglicht damit die Harmonisierung der Fülle der genomischen Daten und erleichtert Ärzten die Stellung einer exakten Diagnose. Das Ziel des MLL Münchner Leukämielabors ist es, mit dieser Dienstleistung durch eine verbesserte Diagnostik zum Patientenwohl beizutragen.

Weitere Informationen finden Sie unter <http://www.mlli.com>

---

## Die Bedeutung der erweiterten Molekulardiagnostik bei Zytopenie und (Verdacht auf) MDS

Das *Next-Generation Sequencing* (NGS) hat sich rasch zu einer unentbehrlichen Methode in der molekulargenetischen Diagnostik entwickelt. Wie Patienten mit unklaren Zytopenien oder der (Verdachts-)Diagnose eines MDS von dem diagnostischen Potenzial des NGS konkret profitieren, damit beschäftigt sich ein kürzlich in Blood erschienener Artikel (Steensma Blood 2018). Grund für das MLL Münchner Leukämielabor, die Bedeutung einer erweiterten molekularen Diagnostik bei (Verdacht auf) MDS genauer zu betrachten, unter besonderer Berücksichtigung von Fällen, in denen ein MDS nicht über konventionelle Methoden gesichert werden kann.

Auch in der AML-Diagnostik besitzt das NGS heute schon einen hohen Stellenwert und wird zukünftig weiter an Bedeutung gewinnen. Daher wird sich der kommende Newsletter (2/2019) mit der zentralen Rolle der erweiterten Molekulardiagnostik bei (Verdacht auf) AML beschäftigen.

Innerhalb weniger Jahre hat die Methode des *Next-Generation Sequencing* (NGS) wesentlich zu unserem Verständnis der Leukämien und Lymphome beigetragen. Das liegt neben der hohen Sensitivität von 1-3% Mutationslast vor allem auch an der massiven Parallelisierbarkeit der Sequenzierung, so dass eine Vielzahl von Patientenproben bzw. eine große Anzahl von genomischen Loci in einem Sequenzierlauf untersucht werden kann. Für das sogenannte *Panel-Testing* werden beispielsweise alle Genabschnitte analysiert, die mit einer bestimmten Entität assoziiert werden.

Mittels eines entsprechenden NGS-Panels konnten Malcovati et al. 2017 zeigen, dass der molekulargenetische Klonalitätsnachweis bei Patienten mit einer unklaren Zytopenie einen wesentlichen Risikofaktor für die Progression in eine myeloische Neoplasie darstellt (Malcovati et al. Blood 2017). So vermittelte die Anwesenheit mindestens einer Mutation, in einem der 40 untersuchten und mit myeloischen Neoplasien assoziierten Gene, ein 13,9-fach höheres Progressionsrisiko. Zur individuellen Risikoabschätzung sollte daher zwischen einer idiopathischen Zytopenie unklarer Signifikanz (**ICUS**, *idiopathic cytopenia of undetermined significance*) und einer **klonalen** Zytopenie unklarer Signifikanz (**CCUS**, *clonal cytopenia of undetermined significance*) unterschieden werden.

In dem in Blood erschienenen Artikel „How I use molecular genetic tests to evaluate patients who have or may have myelodysplastic syndromes“ illustrieren zwei der insgesamt vier Fallbeispiele die klinische Relevanz dieser Unterscheidung (Steensma Blood 2018). Die molekulargenetische Untersuchung mittels NGS war in der Lage, eine reaktive Veränderung von einer MDS-Vorstufe



(CCUS) abzugrenzen. Bei dem Patienten mit Klonalitätsnachweis entwickelte sich im Verlauf der Nachbeobachtung binnen zwei Jahren ein MDS mit Blastenexzess.

Während bereits die grundsätzliche Anwesenheit einer Mutation einen Risikofaktor für die Progression in ein MDS darstellt, konnte die Studie von Malcovati et al. hoch-prädiktive Mutationsmuster identifizieren (Mutationen in Genen des Spleißosoms, oder auch Mutationen in *ASXL1*, *DNMT3A* oder *TET2* in Kombination mit mindestens einer weiteren Mutation). Träger eines solchen Mutationsprofils zeigten in der Überlebensanalyse keinen Unterschied zu Patienten mit Myelodysplasie und vergleichbarem Mutationsprofil. Daneben fanden sich insbesondere auch Mutationen in den Genen *RUNX1* und *JAK2* mit einem erhöhten Risiko assoziiert (Malcovati et al. Blood 2017).

Auch in der Risikostratifizierung eines mit konventionellen Methoden gesicherten MDS ist abzusehen, dass die erweiterte Diagnostik mittels NGS-Panel in Zukunft eine bedeutende Rolle spielen wird. Wenngleich die Mutationsanalyse in dem überarbeiteten *International Prognostic Scoring System* (IPSS-R) nicht berücksichtigt wird (Greenberg et al. Blood 2012), konnte in einer Studie nachgewiesen werden, dass die Anwesenheit einer Mutation in *TP53*, *CBL*, *EZH2*, *RUNX1*, *U2AF1* oder *ASXL1* unabhängig von der IPSS-R-Risikostufe mit einem kürzeren Überleben assoziiert war (Bejar et al. Blood 2015).

Aufgrund der zentralen Bedeutung der Risikoeinschätzung bei MDS für die Therapiewahl ist die molekulargenetische Diagnostik unter Berücksichtigung dieses prognostischen Panels eine wichtige Ergänzung zum IPSS-R. Speziell bei jüngeren Patienten können neben zytogenetischen auch molekulargenetische Aberrationen (wie eine Mutation in *TP53* oder *ASXL1*) über Risikoeinstufung und Therapiewahl einschließlich Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation entscheiden. Insbesondere zu nennen ist auch die Analyse des *TP53*-Mutationsstatus bei MDS mit *del(5q)*, da bei Mutationsnachweis ein früher Progress unter Lenalidomid droht (Jädersten et al. JCO 2011). Beide Aspekte sind dementsprechend in den deutschen Leitlinien im Sinne einer Empfehlung abgebildet (Hofmann et al. Onkopedia 2018). Der Nachweis einer *TP53*-Mutation kann aufgrund ungünstiger Überlebensdaten (Lindsley et al. NEJM 2017) unter Standard-Konditionierungsschemata sogar ausschlaggebend für die Wahl eines alternativen Konditionierungsprotokolls sein (Steensma Blood 2018).

Ein weiteres Fallbeispiel von Steensma zeigt eindrücklich, wie eine erweiterte molekulardiagnostische Untersuchung zur Differenzialdiagnostik beitragen kann. Nach Sicherung der Diagnose CMML-1 wurde bei dem vorgestellten Patienten eine molekulargenetische Analyse zur Abklärung einer hepatischen Fibrose durchgeführt, die Mutationen in *ASXL1* und *TET2* sowie eine *KIT*-D816V-Mutation identifizierte. Die Anwesenheit der *KIT*-Mutation war Anlass für eine weiterführende immunhistologische Untersuchung, die die Diagnose einer systemischen Mastozytose mit assoziierter hämatologischer Neoplasie ermöglichte. Unter der angepassten Therapie verbesserte sich die Symptomatik des Patienten deutlich.

Zusätzlich zu den erwähnten Publikationen belegen weitere Studien die hohe diagnostische und prognostische Relevanz von molekulargenetischen Analysen mittels NGS bei Patienten mit **unklaren Zytopenien** und **MDS**.

---

## Hochmodern und innovativ – MLL stellt eigenen Konferenzbereich vor

Seit Mai 2018 verfügt das Münchner Leukämielabor über einen hauseigenen Konferenzbereich mit einer Fläche von 500 qm. Hier befindet sich ein helles und geräumiges Foyer, welches Platz für Empfänge und Veranstaltungen jeglicher Art bietet. An der Stirnseite des Foyers erhält man Zutritt zum „großen Kursraum“, welcher Platz für 190 Personen bietet und mit einer 6,70m x 1,71m großen LED-Wand, mehreren Kameras sowie



einem integrierten Ton- und Lautsprechersystem ausgestattet ist und als einer der größten Videokonferenzräume Deutschlands gilt.

Mittels einer fahrbaren Trennwand, lässt sich der "große Kursraum" in zwei separat nutzbare Räume (dem "Seminarraum" und dem "kleinen Kursraum") unterteilen. Der "Seminarraum" ist für 56 Personen, der "kleine Kursraum" für 98 Personen ausgelegt. Drei zusätzliche Konferenzräume bieten Platz für bis zu 11 Personen und eignen sich ideal für Meetings und Besprechungen.

Alle Räume sind mit modernster und intuitiver Technik ausgestattet. So befinden sich neben den großflächigen Screens, den Kameras und den eingebauten Mikrofon- und Lautsprecheranlagen in allen Räumen iPads, die zur Steuerung des Lichts, der Rollos oder der abdimmbaren Smart Glass Wände dienen.

Die Räumlichkeiten werden sowohl für interne Schulungen und Konferenzen genutzt, können jedoch auch von externen Unternehmen gebucht werden.

Wenn Sie Interesse an der Anmietung unserer Räumlichkeiten haben, kontaktieren Sie uns gerne unter: T: +49 (0)89 99017-0 oder per Mail an [info@mll.com](mailto:info@mll.com)  
Weitere Informationen und Bildmaterial finden Sie [hier](#).



© 2019 MLL Münchner Leukämielabor GmbH

**MLL Münchner Leukämielabor GmbH**

Max-Lebsche-Platz 31  
81377 München  
Telefon: +49 89 990 17 0  
Telefax: +49 89 990 17 111  
E-Mail: [info@mll.com](mailto:info@mll.com)  
Internet: [www.mll.com](http://www.mll.com)