



MLL News

14.11.2018

Münchener Leukämielabor bietet erweitertes molekulargenetisches Panel an

Seit Neuestem bietet das MLL Münchener Leukämielabor ein erweitertes molekulargenetisches Panel für Fälle mit unklarer Hypereosinophilie an. Verschiedene Publikationen (Schwaab et al. Am J Hematol 2015, Pardanani et al. Leukemia 2016, Wang et al. Mod Pathol 2016) wie auch MLL-interne Daten belegen für derartige Konstellationen einen signifikanten Anteil von Genmutationen, die mit myeloischen Neoplasien assoziiert sind. Ein Nachweis einer solchen Mutation kann zur Diagnose einer Systemischen Mastozytose (*KIT D816V*), einer MPN-eo (*JAK2 V617F*) oder auch einer Chronischen Eosinophilen-Leukämie (z.B. *ASXL1*, *DNMT3A*, *TET2*, *SRSF2*) beitragen und hat darüber hinaus therapeutische Relevanz (Einsatz von targeted therapies bei Mutationen in *KIT D816V* oder *JAK2 V617F*). Aus diesem Grund wurde das bestehende Panel, welches bisher vor allem auf den Nachweis pathognomonischer Rearrangements von z.B. *PDGFRA* oder *PDGFRB* fokussiert war, um die genannten Gene erweitert. Das MLL Münchener Leukämielabor hofft damit zu einer besseren Aufklärung der oft im Dunkeln verbleibenden Genese von Hypereosinophilien beitragen zu können.

Klonale Hämatopoese – welche Konsequenzen hat ihr Nachweis?

Seit gezeigt wurde, dass auch bei gesunden Personen Mutationen nachweisbar sind, die sonst nur bei hämatologischen Neoplasien bekannt waren, ist die „klonale Hämatopoese“ ein aktuell viel diskutierter Begriff.

Der Nachweis von Genmutationen oder chromosomalen Aberrationen in einer Zellpopulation ist ein Klonalitätsnachweis, weshalb von einer „klonalen Hämatopoese“ gesprochen wird.

Viele Begriffe wurden inzwischen eingeführt: ARCH (age related clonal hematopoiesis), **CHIP** (clonal hematopoiesis of indeterminate potential), **CCUS** (clonal cytopenia of undetermined significance).

- Der Nachweis von Genmutationen oder chromosomalen Aberrationen in einer Zellpopulation ist ein Klonalitätsnachweis, weshalb somit von einer „klonalen Hämatopoese“ gesprochen wird.
- Viele Begriffe wurden inzwischen eingeführt: ARCH (age related clonal hematopoiesis), CHIP (clonal hematopoiesis of indeterminate potential), CCUS (clonal cytopenia of undetermined significance).
- Eine klonale Hämatopoese ist selten bei jungen Menschen nachweisbar, jedoch steigt die Häufigkeit mit dem Alter (10-20% bei über 70-jährigen).
- Mit hochsensitiven Techniken, ist sogar bei nahezu jedem über 50-jährigen Menschen eine klonale Hämatopoese nachweisbar (Young et al. Nature Communications 2016).

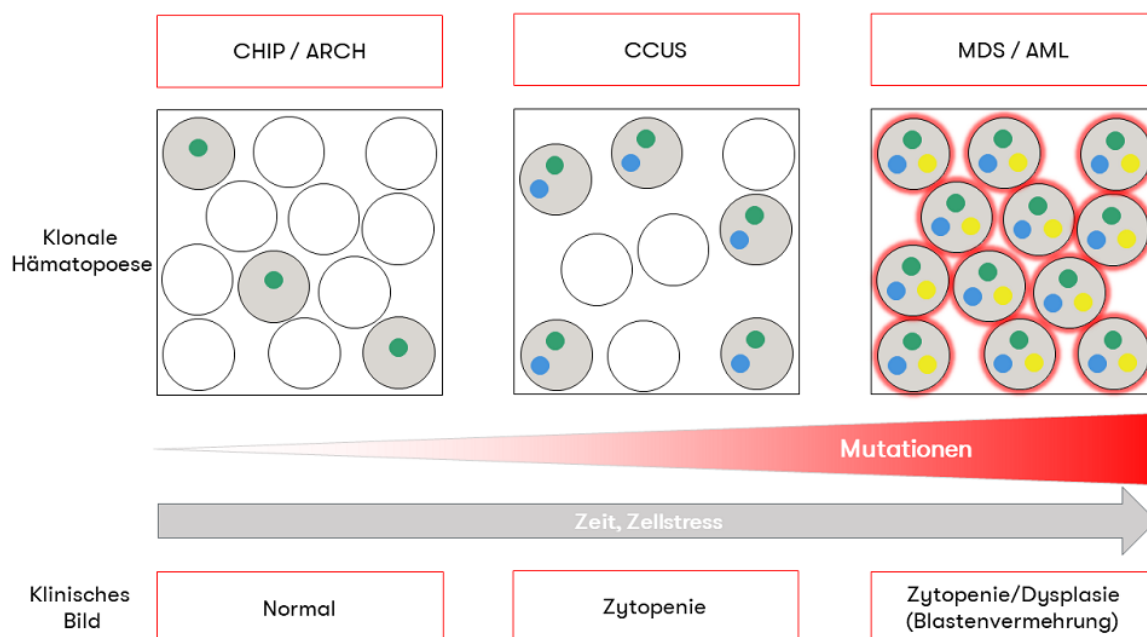


Was bedeutet das für die Diagnostik? Hier stellt sich die Frage, welche klinische Relevanz das Vorliegen einer klonalen Hämatopoese hat. Kann eine klonale Hämatopoese der Ausgangspunkt für eine hämatologische Neoplasie wie z.B. ein MDS oder eine AML sein? Gibt es Faktoren, die die Entstehung eines MDS oder einer AML aus einer klonalen Hämatopoese begünstigen?

Wichtig ist zu unterscheiden, ob eine Untersuchung bei einem klinisch Gesunden – hierfür gibt es aktuell gar keine Indikation – oder bei einem Patienten mit einer Zytopenie durchgeführt wird. Bei Patienten mit Zytopenie konnte gezeigt werden, dass anhand der Anzahl und Muster der Mutationen sowie der Klonegröße die Wahrscheinlichkeit abgeschätzt werden kann, eine hämatologische Neoplasie wie z.B. ein MDS zu entwickeln (Malcovati et al. Blood 2017). Es gibt Bestrebungen auf ähnliche Weise einen Prädiktionsalgorithmus zu entwickeln, der das Auftreten einer AML vorhersagen kann. Erste Schritte in diese Richtung stellen zwei retrospektive Studien dar, die zeigen, dass ein AML-„Prodrom“ Jahre vor einer tatsächlichen Diagnose einer AML nachweisbar ist (Desai et al. Nat Med 2018, Abelson et al. Nature 2018). Die Ergebnisse dieser beiden Studien und zukünftiger prospektiver Studien könnten eines Tages den Weg für einen Screening-Test für hämatologische Neoplasien ebnen.

Ein solches Screening wäre besonders sinnvoll, wenn therapeutische Optionen vorhanden sind, die bei frühzeitiger Intervention entweder das Überleben verlängern oder im besten Fall präventiv sein könnten.

Zwei weitere Aspekte könnten ein Screening auf klonale Hämatopoese relevant machen. Zum einen wurde gezeigt, dass bei Patienten mit soliden Tumoren der prätherapeutische Nachweis von bestimmten Mutationen in der Hämatopoese das Risiko erhöht, eine therapieassoziierte myeloische Neoplasie zu entwickeln (Gillis et al. Lancet Oncology 2017). Des Weiteren legen erste Fallberichte nahe, dass ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Spenderzell-Leukämien und einer klonalen Hämatopoese des Spenders besteht (Gondek et al. Leukemia 2016).





MLLi - Mit Technologie Zukunft schaffen

Um für die Zukunft optimal aufgestellt zu sein, hat das MLL Münchner Leukämielabor zum 31.08.2017 das Schwesterunternehmen MLLi (,i' steht für ,innovation') mit Technologiespezialisierung gegründet. Da Innovation mehr und mehr von Software geprägt wird, widmet sich das neu gegründete Unternehmen der digitalen Aufarbeitung von Daten aus der Leukämiediagnostik. MLLi wird Wissenschaftlern, Forschern, Ärzten und Biologen u.a. webbasierte Tools zur Interpretation von molekularen, zytogenetischen und immunphänotypischen Daten zur Diagnostik in der Hämatologie zur Verfügung stellen.

Durch abnehmende Sequenzierkosten und Einführung von Geräten mit signifikant höherer Datenkapazität und der damit einhergehenden Steigerung des Sequenzierdurchsatzes, verlagert sich der Flaschenhals weg von Sequenzierung hin zu Dateninterpretation. Zur Beseitigung dieses Problems wurden über die Jahre hinweg viele verschiedene Bioinformatiklösungen entwickelt. Die ersten Schritte unmittelbar nach der Sequenzierung, genannt Alignment (die Lesefragmente der Sequenzierung an eine Referenz DNA ausrichten) und Variant Calling (Auffinden von Unterschieden zwischen den ausgerichteten Lesefragmenten und der Referenz DNA), brachten initial heterogene Ergebnisse hervor, behaftet mit vielen Artefakten. Diese sind jedoch mittlerweile zu stabilen Algorithmen mit einer hohen Reproduzierbarkeit gereift. Obwohl beträchtliche Bemühungen aufgewandt wurden, verbleiben aber die Annotation und insbesondere Klassifikation, d.h. die Unterteilung in benigne und pathogene Varianten, verbesserungswürdig.

Es existiert heute eine Auswahl an verschiedenen Verfahren zur Datenanalyse, jede mit eigenen Stärken und Schwächen. Eine der ersten und einfachsten Ansätze ist der Aufbau einer Datenbank zur Sammlung von Varianten inkl. ihrer Klassifikation. Typischerweise geschieht dies durch freiwillige Einreichung der Daten in eine Datenbank, häufig leider ohne klare Standardisierung und Offenlegung, wie sie erhoben und klassifiziert worden sind, wodurch es zu Konsistenzproblemen kommen kann. Um dies zu entschärfen, wurden in silico Mutationsvorhersagewerkzeuge entwickelt, die ein algorithmisches Verfahren benutzen, um die Intensität einer Veränderung auf den Organismus zu bestimmen. Jedoch tendieren auch diese Verfahren in einem gewissen Anteil zu Fehlklassifikationen.

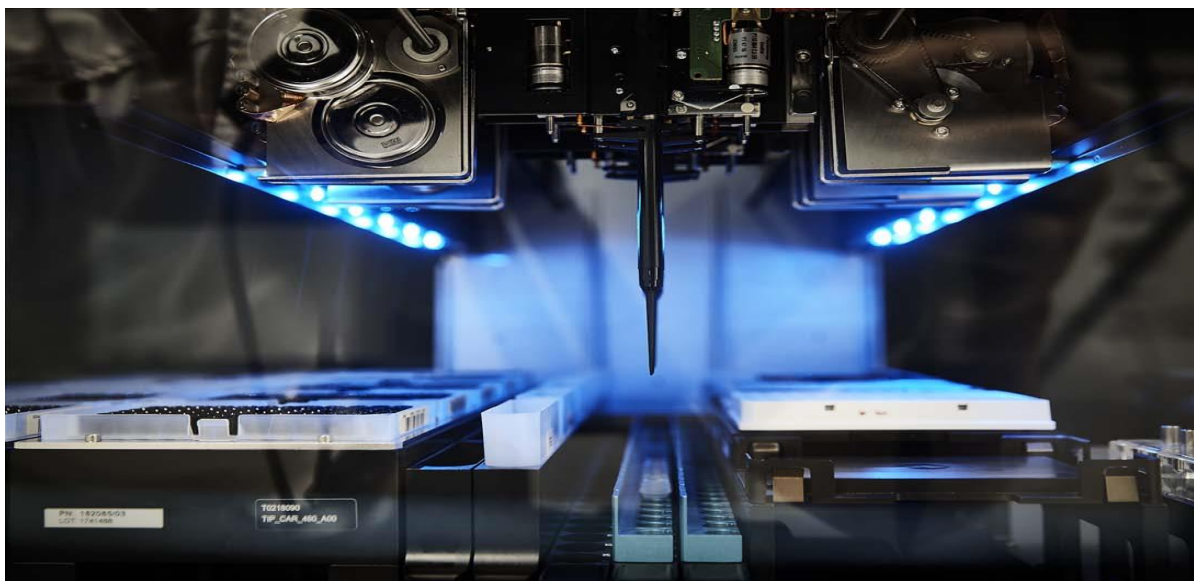
Populationsfrequenzdatenbanken, die mithilfe von Sequenzierprojekten in großen Populationsstudien entstanden sind, sind mittlerweile eine gute Möglichkeit, um häufige, benigne Varianten zu identifizieren. Im Laufe der Zeit und durch Zunahme von Datenbanken und verschiedenen Verfahren, hat sich der Zugang zu diesen Ressourcen von einem Segen zu einem Fluch gewandelt. Die Landschaft ist unübersichtlich geworden, insbesondere für Neueinsteiger im Bereich der NGS Sequenzierung. Oft sind Informationen in (verschiedenen) Datenbanken widersprüchlich und es gibt keine einfache Methode, diese aufzulösen. Auf der einen Seite gibt es große, öffentlich zugängliche Datenbanken, deren Validität nicht einfach zu bestimmen ist: hier stellt sich beispielsweise die Frage, wie die Daten erhoben wurden. Auf der anderen Seite gibt es gut kuratierte, laborinterne Datenbanken, die jedoch für die Öffentlichkeit meist unzugänglich sind.

Hier setzt das neue MLLi an, indem wir mit dem Projekt MLLi:db (,db' für ,database') manuell kuratierte Daten anonym veröffentlichen, die in den letzten 12 Jahren durch Sequenzierung von Proben in der Diagnostik in einem ISO 15189 akkreditierten Umfeld am MLL erhoben wurden. Jede Variante in MLLi:db hat eine Klassifikation in einem 3-stufigen System



(„pathogen“, „benign“ oder „Variante mit unbekannter Signifikanz (VUS)“), welche in mindestens fünf verschiedenen Patienten gesehen wurde und unzweideutig von einem Experten im MLL in Zusammenhang mit den anderen diagnostischen Verfahren und der Diagnose des Patienten klassifiziert wurde. Der Zugang zu den Daten wird über eine Webapplikation unter <https://mlli.com> bereitgestellt und ist nur mit einem eigenen Account zugänglich. Neben Frequenzdaten der laboreigenen Datenbank wird auch ein bequemer Zugriff auf folgende Quellen ermöglicht: COSMIC, dbSNP, gnomAD, ClinVar und dbNSFP.

Die Datenbank wird quartalsweise mit neuen und aktualisierten Informationen veröffentlicht. Die erste Veröffentlichung in einer Betaphase besteht aus 1.452 Varianten in 103 Genen, die aus Daten von 189.753 Proben erhoben wurden.



© 2018 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

Internet: www.mll.com