



# Aktuelle Entwicklungen in der hämato-onkologischen Diagnostik

Die größten Herausforderungen für die hämato-onkologische Diagnostik sind derzeit die Einführung von „next-generation sequencing“ (NGS) bzw. «high-throughput sequencing» (HTS) für myeloische und lymphatische Neoplasien in den Laboralltag sowie die Einführung der „liquid biopsy“ für lymphoproliferative Erkrankungen. Im Zuge der Erweiterung des Spektrums möglicher zielgerichteter Therapien etwa für die akute myeloische Leukämie (AML) und der Verfügbarkeit neuer immuntherapeutischer Ansätze (z.B. Blinatumomab für akute B-lymphatische Leukämie, ALL) wachsen die Anforderungen an die hämatologische Präzisionsdiagnostik bei Erstdiagnose sowie im Krankheitsverlauf. Beim diesjährigen Kongress der European Hematology Association (EHA) in Stockholm gab es zu vielen aktuellen Entwicklungen in der hämatologischen Diagnostik interessante Beiträge und Ausblicke in die nähere Zukunft.

## Myeloische Neoplasien

Während zytogenetische Veränderungen nur bei etwa der Hälfte aller Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) nachweisbar sind, lassen sich bei mehr als 90% der Patienten eine oder mehrere onkogene Mutationen auf molekularer Ebene nachweisen. Mutationen in den Genen *TET2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, oder *RUNX1* kommen bei jeweils 10% oder mehr Patienten mit myelodysplastischen Syndromen (MDS) vor. Darüber hinaus existiert eine Vielzahl von Mutationen in anderen Genen, welche sehr viel seltener involviert sind. Bislang hat die WHO-Klassifikation nur Mutationen im *SF3B1*-Gen einbezogen, welche für die Diagnose eines MDS mit Ringsideroblastenvermehrung eine Rolle spielen. Die aktuelle WHO-Klassifikation berücksichtigt noch keine anderen somatischen Mutationen für die Diagnose MDS, da der Überlappungsbereich mit altersassoziiierter klonaler Hämatopoese bzw. CHIP („clonal hematopoiesis of indeterminate potential“) berücksichtigt werden muss.

Ein größerer Anteil der Patienten mit ICUS („idiopathic cytopenia of undetermined significance“) oder präklinischem MDS zeigt Mutationen in Genen, die typischerweise bei MDS verändert sind. In der Regel sind die „variant allele fractions“ (VAF) als Ausdruck der Mutationslast bei Patienten mit ICUS höher als bei Trägern

von CHIP. Mutationen mit einer VAF  $\geq 0,1$  oder der Nachweis von mindestens 2 Mutationen sind mit der Diagnose einer myeloischen Neoplasie assoziiert. Der Nachweis einer Mutation mit einer VAF von mindestens 0,1 erlaubt bei Patienten mit unklaren Zytopenien die Diagnose einer CCUS („clonal cytopenia of unknown significance“) mit einem hohen Risiko für eine Transformation in ein MDS. Somit ist die NGS-Diagnostik hilfreich für die Beurteilung und Klassifikation von unklaren Zytopenien bei Patienten mit vermutetem MDS.

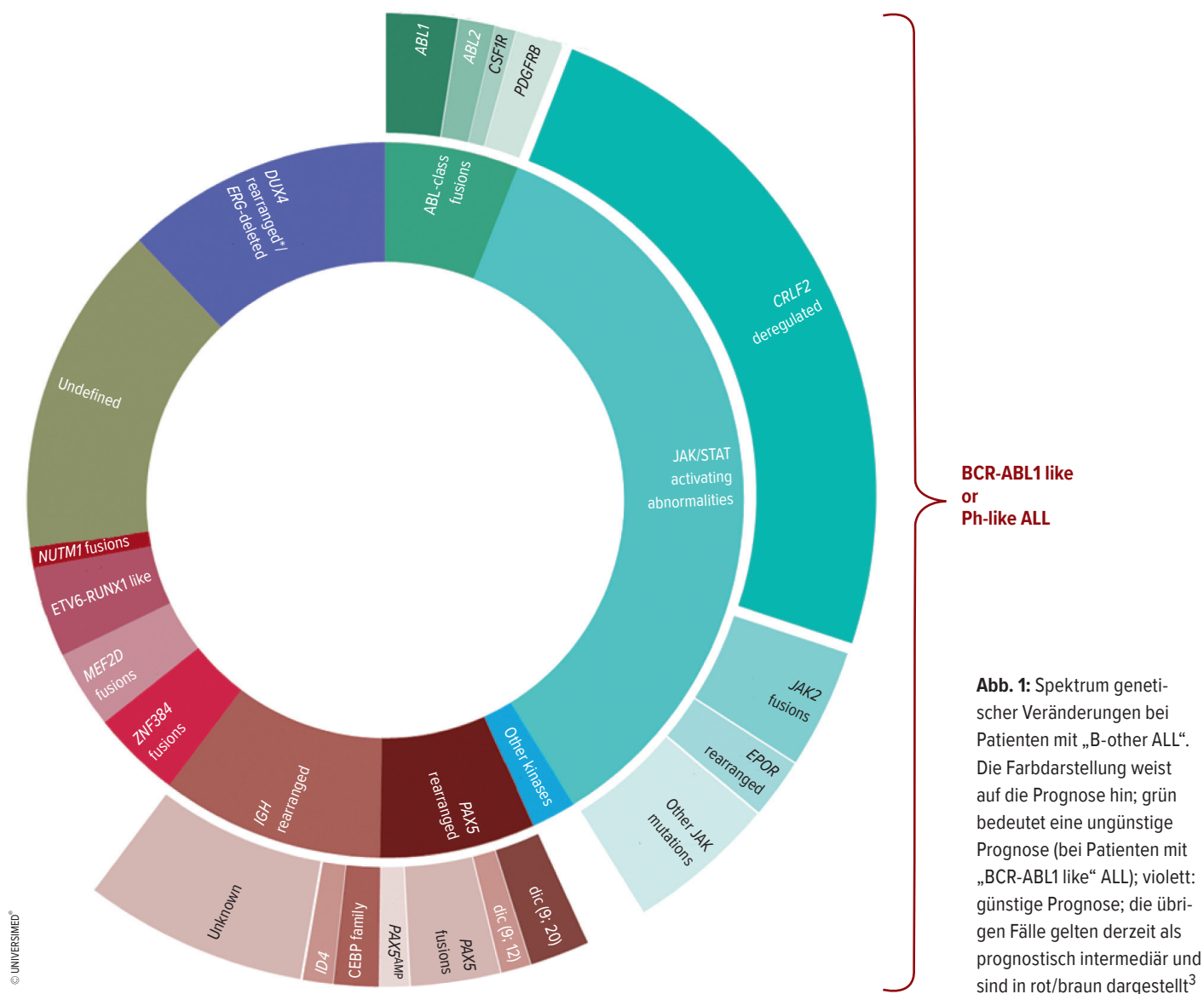
Das somatische Mutationsprofil kann bei MDS-Patienten prädiktiv für den Therapieerfolg sein. Mutationen im *TET2*-Gen mit einer hohen VAF sind mit einem verbesserten Ansprechen auf demethylierende Substanzen assoziiert. Bei Patienten mit 5q-Deletion ist der Nachweis von *TP53*-Mutationen prädiktiv für ein schlechtes Ansprechen auf Lenalidomid und für ein hohes leukämisches Transformationsrisiko. Bei Patienten mit „Lower-risk“-MDS sind *SF3B1*-Mutationen prädiktiv für eine positive Response auf das „erythropoietin maturation agent“ Luspatercept. Patienten mit Hochrisiko-MDS und *TP53*-Mutationen sprechen oftmals auf eine demethylierende Therapie mit Decitabin an.<sup>1</sup>

Mit der Option von NGS verbessert sich die Einsicht in die hereditäre Prädisposition zu myeloischen Neoplasien. Es ist davon auszugehen, dass viele Patienten mit

## KEYPOINTS

- Die Einführung von „next-generation sequencing“ (NGS) in die hämatologische Diagnostik eröffnet neue Möglichkeiten der Detektion und Definition von Targets für die Therapie myeloischer und lymphoproliferativer Neoplasien sowie für die Verlaufsdagnostik.
- Gleichzeitig sind die hämatologischen und molekulargenetischen Labore mit einem wachsenden Anforderungsprofil an die Markervielfalt bei sämtlichen hämatologischen Neoplasien konfrontiert.
- Bisherige diagnostische Algorithmen in der Hämatologie müssen hinsichtlich der Integration von NGS modifiziert und erweitert werden.
- Die Entwicklung und Etablierung der „liquid biopsy“ für lymphoproliferative Erkrankungen wird zu einer besseren Therapiesteuerung und einem besseren Monitoring für Patienten mit Lymphomen beitragen.

einer hereditären Prädisposition durch aktuelle diagnostische Algorithmen nicht erfasst werden. Der unterschiedliche Phänotyp der Neoplasien, die oftmals lange Latenz bis zur Erkrankung, Unterschiede in der Penetranz bei den Mutationsträgern sowie das Fehlen diagnostischer und klinischer Leitlinien dürften bislang mit einer hohen Dunkelziffer hereditärer Fälle einhergehen. Mit NGS-Panels für das Screening auf Keimbahnmutationen werden am häufigsten Veränderungen in den Genen *ANKRD26*, *DDX41*, *GATA2*, sowie *RUNX* detektiert. Jedoch sind bereits jetzt Mutationen an mehr als 13 Genloci bekannt, welche mit familiären myeloischen



Neoplasien in Zusammenhang stehen. Allerdings sind derzeit im Falle eines umfassenden molekularen Screenings bei etwa der Hälfte der Patienten mit suspekter Familienanamnese keine Mutationen identifizierbar. Ferner ist der signifikante Überlappungsbereich zwischen sporadischen und hereditären Leukämieformen zu bedenken, wie dies am Beispiel der *CEBPA*-mutierten AML demonstriert werden kann. In jedem Fall ist eine sorgfältige Familienanamnese bei allen Patienten mit myeloischen Neoplasien von Bedeutung. Dies gilt in besonderem Maße bei Patienten, bei welchen eine allogene Stammzelltransplantation angestrebt wird und bei

denen ein HLA-identer Familienspender zur Verfügung steht. Screenings mit NGS-Panels auf rekurrente Keimbahnmutationen werden sicherlich weiter an Bedeutung für die Abklärung myeloischer Neoplasien gewinnen.<sup>2</sup>

### Akute lymphatische Leukämie

Für Patienten mit ALL ist die zyto- und molekulargenetische Risikostratifizierung diagnostisch und prognostisch äußerst relevant. Beispielsweise ist ein hyperdiploider Karyotyp prognostisch günstig, der Nachweis eines Philadelphia-Chromosoms bzw. eines *BCR-ABL1*-Rearrangements pro-

gnostisch ungünstig. Fälle von B-Linien-ALL, welche sich nicht diesen großen zytogenetischen Subgruppen zuordnen lassen, werden „B-other ALL“ genannt. Bislang galt etwa ein Drittel aller Fälle von „B-other ALL“ als prognostisch intermediär, da diese nicht genauer eingestuft werden konnten. Mittlerweile können innerhalb der „B-other ALL“-Patientengruppe zahlreiche seltene zyto- und molekulargenetische Veränderungen distinkten Verläufen zugeordnet werden (Abb. 1). Ein Beispiel ist *iAMP21*-ALL, ein abnorm großes Chromosom 21, welches man selten bei pädiatrischen B-Vorläufer-ALL-Patienten findet; das mediane Alter der betroffenen

Kinder liegt bei 9 Jahren. Die Prognose von Kindern mit dieser zytogenetischen Veränderung ist im Fall einer Standardtherapie ungünstig. Diese Patientensubgruppe hat nun sehr von einer Therapieintensivierung profitiert. Innerhalb der Gruppe der Patienten mit „BCR-ABL1 like“-ALL wurden Rearrangements zahlreicher Kinasegene identifiziert. Zum Teil haben diese ABL1-Klasse-Funktionen; andere verstärken das JAK-STAT-Signaling. Dieses neue Verständnis kann eine Therapieoptimierung ermöglichen: Beispielsweise profitieren Patienten mit einem *EBF1-PDGFRB*-Rearrangement von einer Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI). Dies ist ein echter Fortschritt, da diese Patientengruppe auf Standardinduktion bislang schlecht angesprochen hat. Patienten mit *JAK2*-Rearrangements könnten ggf. vom Einsatz von JAK-Inhibitoren profitieren.<sup>3</sup>

Für pädiatrische Patienten mit ALL wurde im Rahmen der UKALL203-Studie ein neuer prognostischer Index entwickelt, welcher die Parameter MRD-Status, Gesamtleukozytenzahl, „good risk genetics“ (*ETV6-RUNX1*, „high hyperdiploidy“), „high risk abnormalities“ (*KMT2A*, Haploidie, „low hypodiploidy“) enthält. Damit gelang eine Optimierung der Prädiktion der klinischen Verläufe.<sup>4</sup>

### Lymphome und multiples Myelom

Chiappella et al. untersuchten anhand der Sanger-Sequenzierung den Mutationsstatus von *TP53* bei >100 Patienten mit diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL), welche im Rahmen der FIL-DLCL04-Studie behandelt wurden. Jüngere Erwachsene mit Hochrisiko-DLBCL erhielten in der Erstlinientherapie ein verkürztes CHOP-Regime mit intensivierten Rituximab-Gaben gefolgt von einer Konsolidierung mit Rituximab, Hochdosischemotherapie und autologer Stammzelltransplantation. Der zweite Therapiearm bestand aus einem vollständigen CHOP-Protokoll ebenfalls mit intensivierter Rituximab-Therapie, allerdings ohne Konsolidierung. Ein Anteil von 9% der Patienten zeigte Mutationen im *TP53*-Gen anhand der Sanger-Sequenzierung. Die Patienten mit mutiertem *TP53*-Status wiesen ein signifikant kürzeres OS („overall survival“) und FFS („failure free survival“) auf. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug 37% für *TP53*-Mutationsträger versus 84% bei Pa-

Methode (MRD)	Sensitivität	AML	ALL	CML	CLL	Myelom
Multi-Parameter-Flow-Zytometrie	1:10 <sup>4</sup> – 1:10 <sup>6</sup>	+	+	–	+	+
Molekulare Ansätze	1:10 <sup>4</sup> – 1:10 <sup>6</sup>	+	+	+	–	–

**Tab. 1:** Diagnostische Methoden und die dabei erreichte Sensitivität zur Bestimmung der „minimal residual disease“ (MRD) bei verschiedenen Entitäten (nach Haferlach T)<sup>9</sup>

tienten mit *TP53*-Wildtyp. Ein positiver *TP53*-Mutationsstatus war prognostisch ungünstig, und dies war unabhängig von der COO („cell of origin“-)Klassifikation als ABC- versus CGB-Lymphomsubtyp, vom Befund der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und den Ergebnissen der Immunhistochemie. Das zeigt, dass innovative Therapieansätze für Patienten mit DLBCL und *TP53*-Mutationen notwendig sind. Die betroffenen Patienten könnten beispielsweise von einer frühzeitigen Therapieintensivierung profitieren. Ferner weist diese Untersuchung auf die notwendige Integration neuer prognostischer und prädiktiver Parameter für Patienten mit DLBCL hin.<sup>5</sup>

Für die Verlaufsdagnostik und Therapiesteuerung für Patienten mit Lymphomen und multiplem Myelom wird derzeit die Technik der „liquid biopsy“ untersucht. Zirkulierende zellfreie DNA aus dem peripheren Blut wird entweder auf somatische Mutationen oder auf Immunglobulinmutationen untersucht, zumeist anhand von NGS. Dies ermöglicht die Detektion von klonalen Evolutionsprozessen sowie ein neues Konzept einer sensitiven Verlaufsdagnostik. In Studien war bei Patienten mit DLBCL eine gute Response auf die Immunchemotherapie mit einer „Clearance“ der zirkulierenden DNA mit den Lymphom-spezifischen Mutationen aus dem peripheren Blut assoziiert. Die Prognose von Patienten mit einer kompletten „Clearance“ der alterierten DNA im peripheren Blut war ferner mit verbesserten Ergebnissen hinsichtlich des Gesamtüberlebens und der Zeit bis zum Progress verbunden. Neue Resistenzmutationen können im Krankheitsverlauf detektiert werden.<sup>6, 7</sup> Ein weiterer Vorteil der „liquid biopsy“ ist die Nichtinvasivität, da die Untersuchungen aus dem peripheren Blut mit höherer Frequenz durchgeführt werden können.

Bislang hatte die FISH-Diagnostik bei der Prognoseeinschätzung für das multiple Myelom Priorität. So sind etwa die

Translokationen t(4;14) und t(14;16), 17p-Deletionen oder ein Zugewinn am Chromosomenabschnitt 1q prognostisch ungünstig. Anhand von NGS wurden nun beim multiplen Myelom rekurrente Mutationen umfassend beschrieben, welche die Krankheitsprogression charakterisieren. Und anderem sind der MAPK-Signalweg zu nennen, welcher durch Mutationen in *KRAS*, *NRAS* und *BRAF* gekennzeichnet ist, der NFκB-Signalweg, ferner der Zellzyklus-Signalweg (mit Mutationen in *TP53* und *RBI*), der DNA-Reparatur-Signalweg (mit Mutationen in *TP53*, *ATM* und *ATR*) sowie Mutationen in Genen mit einer Rolle für die B-Zell-Differenzierung (z.B. *IRF4*). Mutationen im DNA-Reparatur-Signalweg sind prognostisch ungünstig, Mutationen in *IRF4* hingegen günstig.<sup>8</sup> Diese umfassende molekulare Charakterisierung von Patienten mit multiplem Myelom eröffnet ein neues Verständnis der Pathogenese und der Progressionsmechanismen und zeigt Wege für neue zielgerichtete Therapien auf. Beispielhaft ist der *BRAF*-Inhibitor Vemurafenib zu nennen, welcher bei Patienten mit fortgeschrittenem multiplem Myelom bereits jetzt in Einzelfällen bei mutiertem *BRAF*-Status eingesetzt werden kann.

### „Minimal residual disease“ (MRD)

Im Zuge der Expansion der Therapieoptionen beispielsweise mit IDH1/IDH2-Inhibitoren bei AML gewinnt die Etablierung einer sensitiven und eindeutigen Verlaufsdagnostik zur Therapiesteuerung weiter an Bedeutung. Anhand der „real-time PCR“ ist bereits für einige genetische Subtypen, z.B. für AML mit *NPM1*-Mutationen, MRD-Diagnostik mit hoher Sensitivität möglich. Allerdings eignet sich die „real-time PCR“ nur für rekurrente Hotspot-Mutationen, sodass das verwendbare Markerspektrum limitiert bleibt. Derzeit werden NGS und digitale PCR auf ihren Einsatz in der MRD-Diagnostik untersucht. Anhand von NGS können vielfältige

Marker wie *RUNX1*, *EZH2* oder Spliceosom-Mutationen im Verlauf myeloischer Neoplasien untersucht werden, wenn gleich allerdings die geringere Sensitivität im Vergleich zur „real-time PCR“ berücksichtigt werden muss. Mithilfe von NGS gelingt es bei praktisch allen Patienten mit AML, eine molekulare MRD-Diagnostik durchzuführen. Oftmals können mehrere Marker quantitativ verfolgt werden. Die MRD-Diagnostik wird an Stellenwert etwa für die Entscheidung pro versus contra allogene Stammzelltransplantation bei Patienten in erster kompletter Remission (CR1) einer AML gewinnen.

Ferner bietet sich die Immunphänotypisierung bzw. Flowzytometrie für die MRD-Diagnostik an (Tabelle 1). Auch für diese wird der verstärkte Einbezug in die Steuerung der Post-Remissions-Strategien für Patienten mit einer AML gefordert. Effizientere Durchflusszytometer, Techniken wie Bulk-Lyse mit der Generierung höherer Zellzahlen zur Auswertung der Verlaufspuren und die Möglichkeit der Kombination einer höheren Anzahl von Fluorochromen bzw. Antikörpern in einem Assay ermöglichen bereits jetzt eine verbesserte Sensitivität der Flowzytometrie für die MRD-Diagnostik.

Weiterhin bleibt die molekulare Verlaufsdagnostik bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) Goldstandard für andere hämatologische Neoplasien. Bei der CML hat die Definition einer tiefen molekularen Response zur Entscheidung bezüglich des Versuchs einer Unterbrechung der Therapie mit TKI einen hohen Stellenwert erlangt. Im Setting der allogenen Stammzelltransplantation bewährt sich die molekulare Verlaufsdagnostik zur Steuerung der adaptiven Immuntherapie und zur Entscheidung bezüglich der Verabreichung von DLI („donor lymphocyte infusion“).<sup>9</sup> ■

Autoren:

Prof. Dr. **Vera Ulrike Bacher**, MHBA  
Klinik für Hämatologie und Hämatologisches  
Zentrallabor

Prof. Dr. **Thomas Pabst**  
Universitätsklinik für Medizinische Onkologie

Inselspital, Universitätsspital Bern,  
Universität Bern

Korrespondenz:

veraulrike.bacher@insel.ch

■1508

#### Literatur:

- 1** Cazzola M: Molecular genetics in clinical decision making for patients with myelodysplastic syndromes or related myeloid disorders. *HemaSphere* 2018; 2(S2): 131-4  
**2** Machin AR et al.: Inherited predisposition to MDS/AML. *HemaSphere* 2018; 2(S2): 12-4  
**3** Harrison CJ et al.: Advances in acute lymphoblastic leukemia genomics. *HemaSphere* 2018; 2(S2), 5-7  
**4** Moorman A et al.: A novel, integrated and validated prognostic index for predicting outcome in acute lymphoblastic leukaemia provides new approach for risk stratification. *HemaSphere* 2018; 2(S1): pp. 362-3; abstract S826  
**5** Chiappella A et al.: TP53 mutation had a negative prognostic impact in untreated young patients with diffuse large B-cell lymphoma at high-risk: a sub-analysis of FIL-DLCL04 study. *HemaSphere* 2018; 2(S1): 711-2; abstract S1549  
**6** Rossi D: Liquid biopsy in lymphoma. Educational session 235C; Annual Meeting of the European Hematology Association (EHA), Stockholm, 2018  
**7** Trudel S: CfDNA and circulating tumor cells and their potential for clinical application in multiple myeloma. Educational session 235C; Annual Meeting of the European Hematology Association (EHA), Stockholm, 2018  
**8** Pawlyn C et al.: Molecular profiling in myeloma. *HemaSphere* 2018; 2(S2): 118-20  
**9** Haferlach T: Methods to detect minimal residual disease. *HemaSphere* 2018; 2(S2): 160-1