

Molekulare Diagnostik: der Schlüssel zur zielgerichteten Therapie

Elisabeth Oppliger Leibundgut^{a, b}, Gabriela M. Baerlocher^{a, b}

^a Molekulare Diagnostik, Universitätsklinik für Hämatologie und hämatologisches Zentrallabor, Inselspital Bern

^b Experimentelle Hämatologie, Departement klinische Forschung, Universität Bern

Molekulargenetische Analysen erlauben den Nachweis von Genveränderungen wie Punktmutationen, kleinen Deletionen und Insertionen sowie Genrearrangements mit hoher Spezifität und Sensitivität. Die Identifizierung pathogenetischer Aberrationen dient einerseits der genauen Diagnosestellung und ermöglicht andererseits eine Prognosestellung und die Auswahl einer zielgerichteten Therapie [1, 2]. Bei einigen hämatologischen Neoplasien ersetzen oder vereinfachen molekulare Analysen die diagnostischen Algorithmen. Ein positiver Nachweis einer *JAK2-V617F*-Mutation spricht für das Vorliegen einer myeloproliferativen Neoplasie. Bei Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie ist der Nachweis einer *PML-RARA*-Genfusion beweisend für die Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie (AML) M3.

Eine zunehmende Bedeutung erhalten die molekularen Verlaufskontrollen während und nach der Therapie von Tumorerkrankungen. Die bei Diagnose nachgewiesenen genetischen Veränderungen dienen dabei als Zielmoleküle für die nachfolgenden Verlaufsuntersuchungen. Mit der sehr sensitiven Technik der Real-time-PCR können das Therapieansprechen kontrolliert und die Therapie entsprechend individuell gesteuert werden. Anhand der Verlaufskurve können Rezidive bis zu drei Monate vor der klinischen Manifestation detektiert sowie Resistenzen frühzeitig erkannt und ein Therapiewechsel initiiert werden.

Methoden

Als Ausgangsmaterial für molekulargenetische Untersuchungen wird DNA oder RNA aus Blut- oder Knochenmarkproben extrahiert. Für den Nachweis einzelner Mutationen mit verschiedenen PCR-Methoden und Sequenzierung wird DNA verwendet, während viele reziproke Translokationen aufgrund der genomisch sehr heterogenen Bruchpunkte auf RNA-Basis mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Der PCR-Nachweis erfolgt mit konventioneller PCR oder mit der sensitiven Real-time-PCR, die eine Quantifizierung von Genveränderungen bis zu einer Verdünnung von 1:100 000 erlaubt und für die Verlaufskontrolle eingesetzt wird. Für den Nachweis von Punktmutationen wird eine allel-spezifische PCR angewendet, die selektiv nur das mutierte Allel amplifiziert. Mittels Sanger-Sequenzierung der PCR-Produkte können Genveränderungen identifiziert und genau charakterisiert werden.



Elisabeth
Oppliger
Leibundgut

PML-RARA

Die erste zielgerichtete Therapie bei hämatologischen Neoplasien war die All-trans-Retinsäure (ATRA) bei Patienten mit AML M3. Das Medikament wurde vorerst ohne Kenntnis des Zielmoleküls verabreicht. Anfang der 90er Jahre wurde die Genfusion zwischen dem *PML*-Gen auf Chromosom 15 und dem Retinoic-acid-Rezeptor- α -Gen (*RARA*) als molekulares Korrelat der Translokation *t*(15;17) identifiziert. Die Retinsäure aktiviert in physiologischen Konzentrationen den RA-Rezeptor- α , was zur Differenzierung der unreifen Vorläuferzellen führt. Um den durch die Fusion mit *PML* blockierten RA-Rezeptor- α zu aktivieren, sind pharmakologische Dosen von ATRA notwendig [3]. Aufgrund der oft lebensbedrohlichen Gerinnungsstörungen ist ein sofortiger Therapiebeginn notwendig, der auch einen raschen Nachweis des Zielmoleküls *PML-RARA* verlangt. Die Analyse wird deshalb notfallmässig durchgeführt. Die verschiedenen Fusions-transkripte werden in einer Multiplex-PCR nachgewiesen. Die Verlaufskontrolle ist wichtig, da bei persistierenden residuellen *PML-RARA*-Transkripten eine hohe Rezidivwahrscheinlichkeit besteht.

Aktiviert Tyrosinkinasen

Tyrosinkinasen wie beispielsweise *ABL*, *JAK2*, *PDGFRA*, *c-kit* und *FLT3* werden durch Translokationen und Mutationen konstitutiv aktiviert und führen zu einer unkontrollierten autonomen Zellproliferation. Sie können durch Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) gezielt gehemmt werden.

BCR-ABL1 – chronische myeloische Leukämie

Der Nachweis des Fusionsgens *BCR-ABL1* als molekulares Korrelat der Philadelphia-Translokation *t*(9;22) erfolgt mittels einer Multiplex-PCR. Damit können neben den häufigen auch seltene *BCR-ABL1*-Transkripte nachgewiesen werden. Aufgrund der 5% zytogenetisch nicht nachweisbaren, kryptischen *BCR-ABL1*-Fusionen ist ein molekulargenetischer Nachweis bei einer Leukozytose immer indiziert. Die molekulare Verlaufskontrolle unter TKI-Therapie mit Imatinib, Nilotinib und Dasatinib (in Studien auch Bosutinib und Ponatinib) wird alle drei Monate im peripheren Blut durchgeführt.

Für die Quantifizierung von *BCR-ABL1* wurde kürzlich im Rahmen einer weltweiten Standardisierung eine internationale Skala eingeführt (*BCR-ABL IS%*) [4, 5]. Auf dieser entspricht die «major molecular response» (MMR) einem Äquivalent von 0,1% *BCR-ABL*-Transkripten. Ge-

Tabelle 1
Molekulare Aberrationen und zielgerichtete Therapie der hämatologischen Neoplasien.

Erkrankung	Chromosomale Aberration	Fusionsgen oder Mutation	Zielgerichtete Therapie
APL, AML M3	t(15;17)(q22;q21)	<i>PML-RARA</i>	ATRA (Vesanoid®)
CML	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	Imatinib (Glivec®) Nilotinib (Tasigna®), Dasatinib (Sprycel®), Bosutinib (Bosulif®, in den USA für Zweitlinientherapie zugelassen) Ponatinib (in Studien)
MPN	–	<i>JAK2 V617F</i>	Ruxolitinib (Jakafi®)
CEL	–	<i>FIP1L1-PDGFR</i>	Imatinib (Glivec®)
Mastozytose	–	<i>KIT D816V</i>	Resistent auf Imatinib
AML	–	<i>FLT3 ITD</i>	Sorafenib (Nexavar®)

mäss den europäischen Empfehlungen von 2009 ist die MMR nach 18 Monaten Imatinib-Therapie zu erreichen. Neue Daten zeigen, dass das frühe molekulare Ansprechen auf Imatinib nach 3 (<10% *BCR-ABL1*) bzw. 6 Monaten (<1% *BCR-ABL1*) prognostisch ist für ein besseres progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben [6]. Diese Meilensteine sind für die stärker wirksamen neueren TKI noch zu etablieren. Die molekulare Verlaufskontrolle erlaubt zudem die frühe Erkennung von Resistenzen, die häufig durch Mutationen im *ABL*-Anteil des *BCR-ABL1*-Gens verursacht werden. Mittels Sequenzierung werden diese Mutationen identifiziert, und ein Therapiewechsel wird anhand von *in vitro*-Resistenzdaten evaluiert [7, 8].

JAK2 V617F – myeloproliferative Neoplasien

Die *JAK2-V617F*-Punktmutation findet sich bei 95% der Patienten mit Polyzythämia vera und bei über 50% der Patienten mit essenzieller Thrombozythämie und primärer Myelofibrose (PMF). Die *JAK2-V617F*-Mutation als klonaler Marker grenzt eine myeloproliferative Neoplasie von einem reaktiven Geschehen ab. Der Nachweis erfolgt qualitativ oder quantitativ mittels allel-spezifischer PCR. Mehrere *JAK2*-Inhibitoren befinden sich in klinischen Studien, jedoch fehlt diesen Wirkstoffen bisher die Spezifität für die mutierte Sequenz. Die simultane Hemmung des nicht-mutierten *JAK2* führt zu Zytopenien, die eine optimale Dosierung verhindern. Ruxolitinib, in der Schweiz für PMF zugelassen, erzielt unabhängig vom *JAK2*-Mutationsstatus eine Reduktion der Splenomegalie und eine Verbesserung der konstitutionellen Symptome [9]. Die Verlaufskontrolle der mutierten *JAK2*-Allele zeigt jedoch nur ein geringes molekulares Ansprechen.

FIP1L1-PDGFR – chronische eosinophile Leukämie

Bei der chronischen eosinophilen Leukämie (CEL) kann die *FIP1L1-PDGFR*-Genfusion vorliegen. Diese intrachromosomale Translokation auf Chromosom 4 entsteht

aufgrund einer zytogenetisch nicht nachweisbaren Deletion von 800 Kilobasenpaaren. Da meist mehrere Fusionstranskripte gleichzeitig vorliegen, wird die Methode der «nested PCR» angewendet, eine zweistufige PCR-Reaktion mit höherer Sensitivität. Patienten mit der *FIP1L1-PDGFR*-Genfusion zeigen ein gutes Ansprechen auf Imatinib 100 mg/Tag und erreichen eine langanhaltende komplette Remission. Analog zur CML kann unter Imatinib-Therapie eine Resistenz auftreten. Als Ursache wurde die T674I-Mutation im *PDGFR*-Gen nachgewiesen, die der T315I-Mutation im *BCR-ABL1*-Gen entspricht. Beide auf Imatinib, Nilotinib und Dasatinib hochresistenten Mutationen zeigen ein gutes Ansprechen auf den neuen TKI Ponatinib [10]. Kürzlich wurden bei *FIP1L1-PDGFR*-negativer CEL Imatinib-sensitive aktivierende Punktmutationen im *PDGFR*-Gen nachgewiesen [11].

c-kit – Mastozytose

Die D816V-Mutation im *KIT*-Gen liegt bei einer Mastozytose vor. Der Nachweis erfolgt aus einer Knochenmarkspröbe, da im peripheren Blut oft zu wenig Mastzellen vorliegen. Zur Vermeidung falsch negativer Resultate sollte eine sensitive, allel-spezifische Real-time-PCR eingesetzt werden. Ein D816V-mutiertes c-kit ist resistent auf Imatinib [12].

FLT3 ITD – akute myeloische Leukämie

FLT3 ITD (internal tandem duplications) sind Verdopplungen eines Genstücks von variabler Grösse (3–400 Basenpaare) in den Exonen 14 und 15 des *FLT3*-Gens. Sie liegen bei 25–30% der erwachsenen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) vor und sind damit neben den *NPM1*-Mutationen die häufigsten Genveränderungen bei AML. Häufig sind es sekundäre Aberrationen, die oft mit sehr hohen Leukozytenzahlen einhergehen. *FLT3*-ITD+-Klone oder -Subklone können im Verlauf der Krankheit verschwinden oder neu auftreten. *FLT3* ITD sind mit einer ungünstigen Prognose und einer hohen Rezidivrate assoziiert; dies gilt auch in Gegenwart der häufig gleichzeitig vorliegenden prognostisch günstigen *NPM1*-Mutation [13, 14].

Der Nachweis der *FLT3* ITD bei Diagnose und im Verlauf erfolgt mittels qualitativer PCR. Aufgrund der Heterogenität der ITD steht ein sensitiver Nachweis mittels Real-time-PCR zurzeit nicht zur Verfügung, da für jeden Patienten eine individuelle PCR-Reaktion etabliert werden müsste. Es hat sich gezeigt, dass ein Anstieg mutierter *FLT3*-Moleküle ein guter Indikator für ein drohendes Rezidiv ist. Der TKI Sorafenib wird in Kombination mit Chemotherapie bei therapierefraktären und rezidivierenden Patienten mit *FLT3* ITD eingesetzt und bietet als Monotherapie eine Therapieoption für ältere Patienten, für die eine Hochdosis-Chemotherapie nicht in Frage kommt [15, 16].

Ausblick

Mit der neuen Technik des «Next Generation Sequencing» kann nun recht einfach und preisgünstig ein ganzes Exom oder Genom sequenziert werden. Bereits sind un-

zählige neue Mutationen identifiziert worden, die potentiell als molekulare Marker für Diagnose, Prognose und Verlaufskontrolle verwendet werden können. Dabei sind interessante neue pathogene Mechanismen entdeckt worden, wie zum Beispiel die Mutationen des Spliceosoms beim myelodysplastischen Syndrom [17]. Diese neuen Marker dienen als Zielmoleküle für neue spezifische Medikamente und werden in Kürze in der molekularen Diagnostik Einzug halten.

Korrespondenz:

Dr. pharm. Elisabeth Oppliger Leibundgut
Universitätsklinik für Hämatologie
Universitätsspital Bern
Freiburgstrasse 4
CH-3010 Bern

[Elisabeth.OppligerLeibundgut\[at\]jinsel.ch](mailto:Elisabeth.OppligerLeibundgut[at]jinsel.ch)

Die vollständige nummerierte Literaturliste finden Sie unter www.medicalforum.ch.