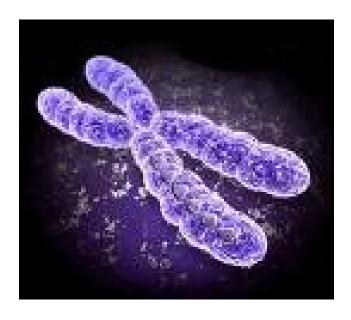






# MYELODYSPLASTISCHE SYNDROME (MDS) - EINFÜHRUNG IN DIE WELT DER GENE



Prof. Dr. med. Detlef Haase INDIGHO-Speziallabore Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie Universitätsmedizin Göttingen





# Bedeutung genetischer Untersuchungen bei MDS

- Bei ca. 50% der MDS-Patienten sind Chromosomenveränderungen in Zellen des Knochenmarks und des Blutes nachweisbar
- Bei ca. 90% der MDS-Patienten sind molekulargenetische Veränderungen in den KM-Zellen zu finden
- Praktisch jeder Patient mit MDS weist entweder Chromosomenund/oder molekulargenetische Anomalien auf
- Diese Veränderungen treten nur in den KM-Stammzellen und in den von ihnen produzierten Tochterzellen im Knochenmark und Blut auf. Sie werden nicht vererbt.
- Die Suche nach genetischen Veränderungen bei einem V.a. ein MDS sind unverzichtbar, um die Erkrankung diagnostizieren, klassifizieren und behandeln zu können.





# Was ist ein Genom, was ist ein Chromosom?

- Genom = Gesamtheit aller Gene (auf allen Chromosomen) in einer Zelle
- Jede Zelle hat 46 Chromosomen
  - 2 Geschlechtschromosomen (X und Y) und 44 sog. Autosomen
  - Jeder Mensch hat je ein Chromosom (1 bis 22) vom Vater und eines von der Mutter
- Die Chromosomen sind die Träger der Erbsubstanz (des Genoms)
- Chromosomen kann man im Mikroskop erkennen



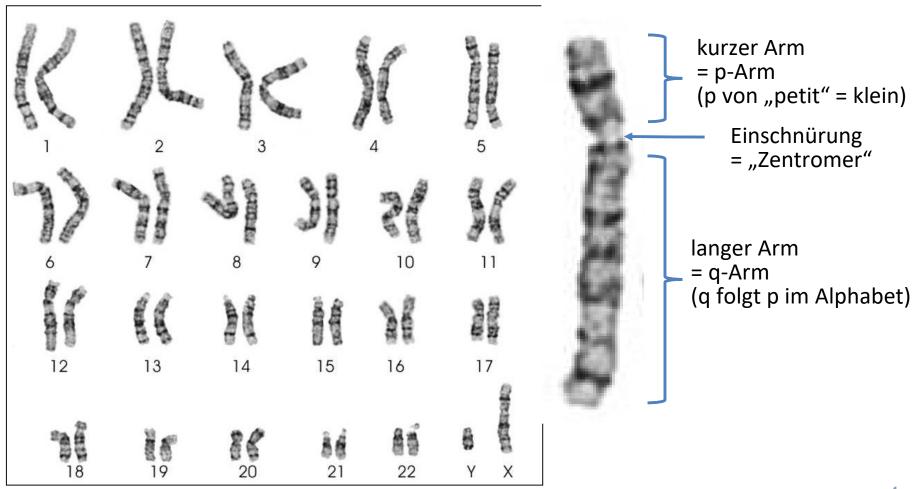
• Beispiel: 2 normale Chromosomen 5 (ein väterliches und ein mütterliches) durch das Mikroskop gesehen







Der *Karyotyp* ist das Erscheinungsbild aller Chromosomen, der in einem *Karyogramm* dargestellt wird. Im Karyogramm sind die Chromosomen nach Größe, Lage der Einschnürung (Zentromer) und Bandenmuster sortiert









### **Chromosomen und Gene**

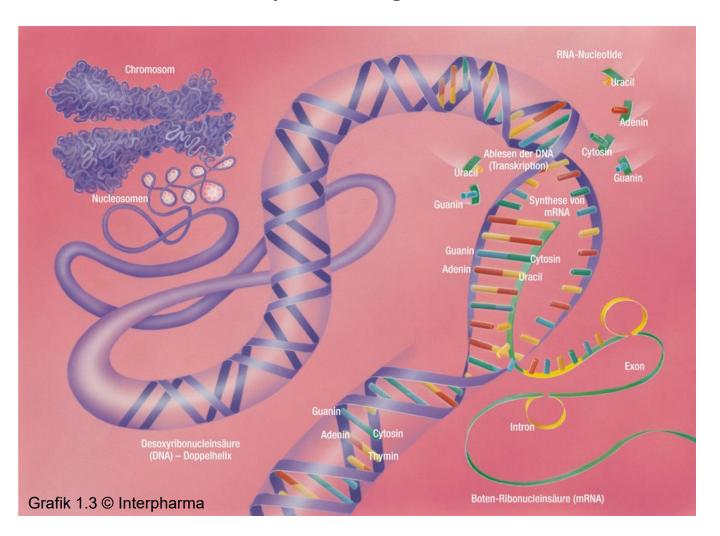
- Jedes Chromosom besteht aus einem einzelnen, einige Zentimeter langen DNS-Faden und verschiedenen Proteinen (Histonen), um welche die DNA gewickelt ist
- Auf jedem Chromosom sind mehrere hundert bis über tausend Gene verankert
- Insgesamt gibt es (in jeder Zelle) ca. 20.000 Gene
- Ein Gen ist ein Abschnitt auf der DNS (Desoxyribonukleinsäure), das den Bauplan für einen bestimmten Eiweißstoff (Protein) enthält
- DNS ist das Material, die chemische Substanz, aus welchem die Gene sind.
- Die DNS-Fäden sind gegeneinander verdreht wie eine Wendeltreppe (Doppelhelix) angeordnet
- Die kleinsten Bausteine des Genoms sind die Basenbausteine (A,T, C, G)







#### Der DNS-Faden ist vielfach kompliziert aufgewickelt und bildet die Chromosomen



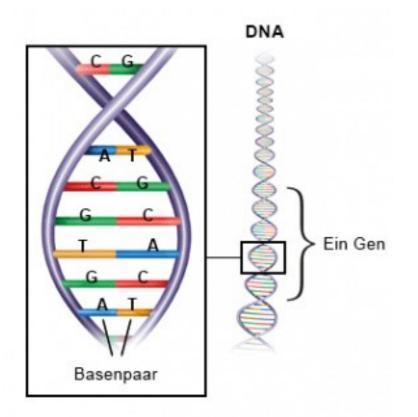






# **DNS-Faden und Genombausteine**

- Der DNS-Faden ist eine Aneinanderreihung der kleinsten Bausteine des Genoms A, C, T und G. Diese Aneinanderreihung ist der "genetische Code".
- Das Hämoglobin-Gen zum Beispiel beginnt mit: CCCTGTGGAGCCACACCCTAG... und ist insgesamt 43'000 Bausteine lang.



- Würde man alle 46 DNA-Fäden, welche in einem Zellkern auf die Chromosomen verteilt sind, aneinander reihen, wäre dieser Faden zwei Meter lang, aber nur 1 Tausendstel Mikrometer) im Durchmesser.
- Seit dem Jahr 2003 ist bekannt, dass auf dem 2 Meter langen DNS-Faden etwa 3,2 Milliarden Bausteine untergebracht sind.



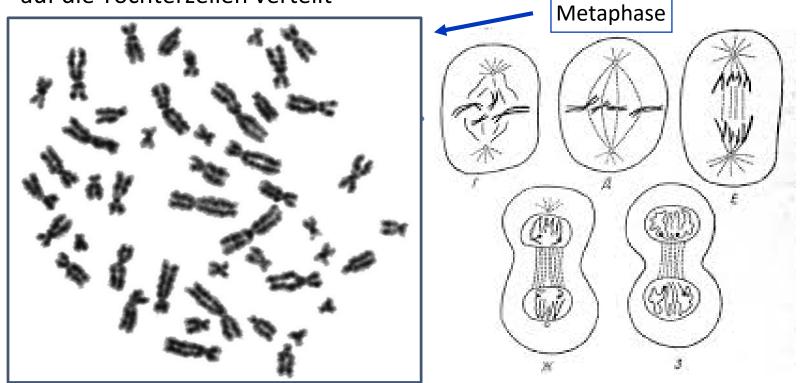




# Die Zellteilung (Mitose)

Während der Zellteilung (Mitose) werden die Chromosomen gleichmäßig

auf die Tochterzellen verteilt



 Kommt es bei der Zellteilung zu Fehlern können Chromosomenveränderungen entstehen







# Welche Formen der krankmachenden Veränderungen des Genoms gibt es?

- 1. Chromosomenveränderungen
- 2. Mutationen = Veränderungen des DNS-Fadens = molekulargenetische Veränderungen
- Beide Arten von genetischen Veränderungen kommen beim MDS vor und sind gleichermaßen wichtig
- Chromosomenveränderungen beim MDS kennt man seit Anfang der 1970 er Jahre
- Mutationen (molekulargenetische Veränderungen) bei MDS sind seit Anfang der 2000er Jahre bekannt
- Genetische Anomalien bei MDS sind nicht angeboren sondern sie entstehen im Laufe des Lebens in den Knochenmarkstammzellen und werden an Blutzellen weitergegeben
- Häufig kooperieren Chromosomenveränderungen und Mutationen

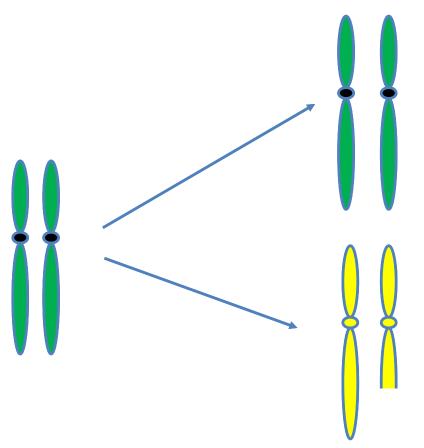






# Welche Chromosomenveränderungen (Anomalien) gibt es?

1. Verlust von Chromosomen oder Chromosomenstücken



Verlust eines ganzen Chromosoms = Monosomie

Bei MDS häufig: Monosomie 7

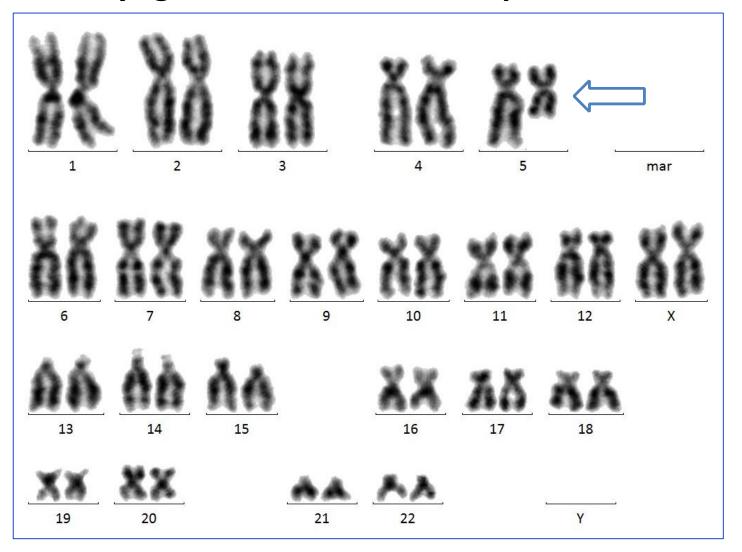
Verlust eines Chromosomenstückes = Deletion Bei MDS häufig: 5q-Deletion, 7q-Deletion, 20q-Deletion







# Karyogramm bei MDS mit 5q-Deletion



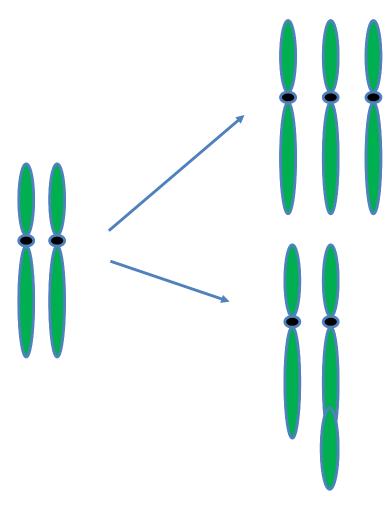






# Welche Chromosomenveränderungen (Anomalien) gibt es?

2. Hinzugewinn von Chromosomen oder oder Chromosomenstücken



Hinzugewinn eines ganzen Chromosoms = Trisomie

Am häufigsten: Trisomie 8, Trisomie 11,

**Trisomie 21** 

Verdopplung eines Chromosomenteiles

= Duplikation

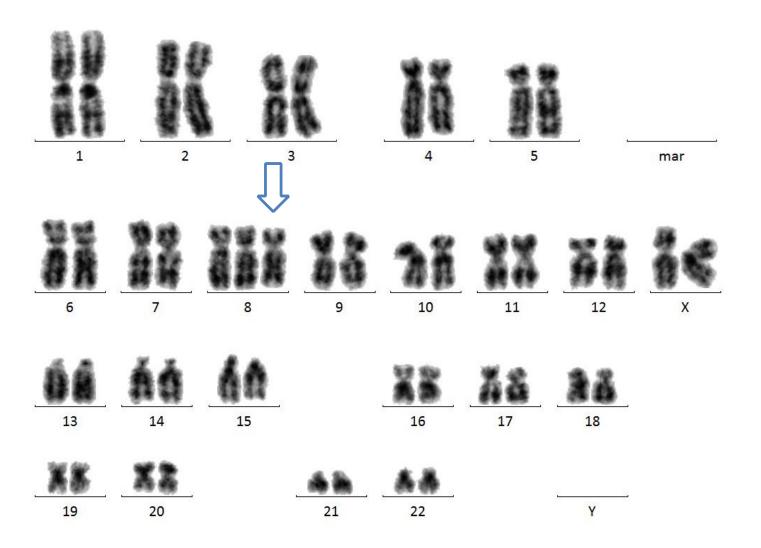
Am häufigsten: Duplikation 1q







# Karyogramm bei MDS mit Trisomie 8



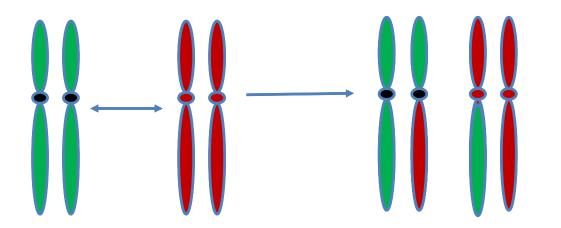






# Welche Chromosomenveränderungen (Anomalien) gibt es?

#### 3. Stückaustausch von Chromosomen



Stückaustausch = Translokation Bei MDS: selten Gene werden neu angeordnet



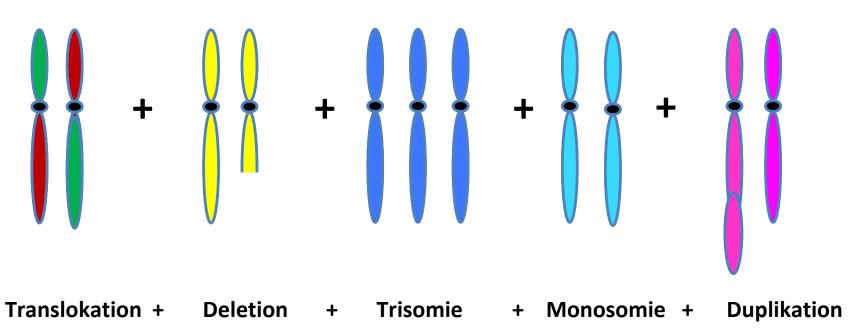




### Welche Chromosomenveränderungen (Anomalien) gibt es?

4. Komplexe (vielfältige) Chromosomenanomalien nebeneinander in einer Zelle

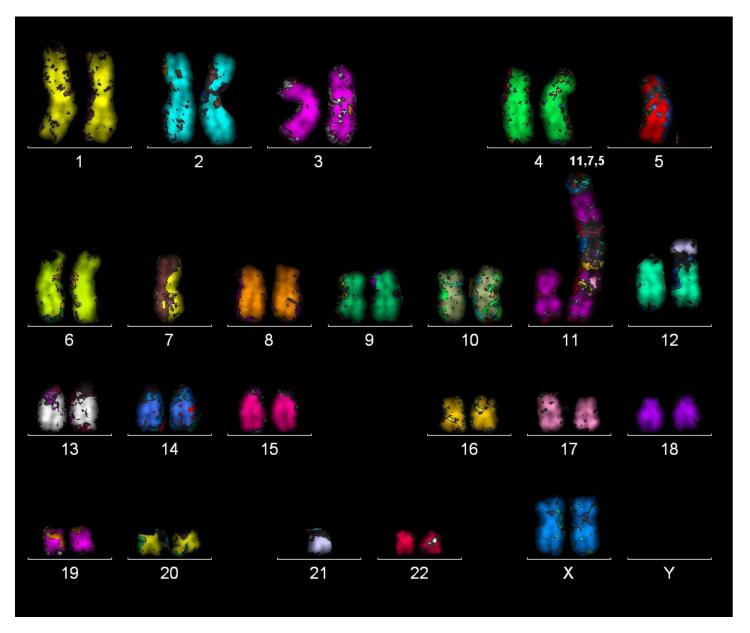
z.B.:















#### Wie wirken sich Chromosomenanomalien aus?

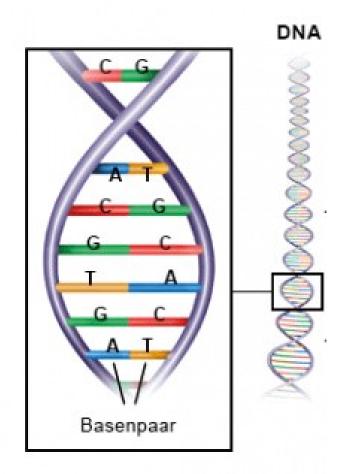
- 1. Verlust von Chromosomen oder Chromosomenstücken (Monosomien, Deletionen)
- Verlust genetischer Informationen, die vor MDS schützen, z.B. Schutz vor Vermehrung mutierter Zellen, Schutz vor Entstehung unreifer Zellen
- 2. Hinzugewinn von Chromosomen oder Chromosomenstücken (Trisomien, Duplikationen)
- Vermehrung krankmachender genetischer Informationen, z.B. Krebsgenvermehrung, die dazu führt, das Zellen sich stärker und schneller teilen
- 3. Stückaustausch von Chromosomen (Translokationen)
- ➤ Krebsgene werden an Verstärkergene gekoppelt → vermehrtes Zellwachstum, Zellen werden unsterblich
- 4. Komplexe Anomalien (= mehr als 3 unterschiedl. Chromos.veränderungen)
- Machen MDS-Zellen besonders aggressiv und resistent gegen Therapien







### **WELCHE MUTATIONEN GIBT ES?**



Veränderungen der Bausteine (A, T, C und G)

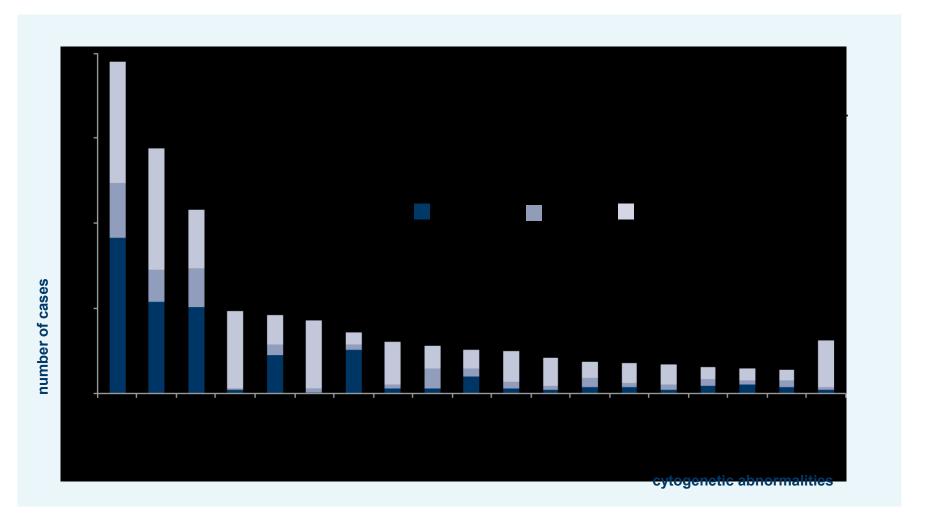
- Austausch
- Verlust (Deletion)
- Einfügung (Insertion)
- Vervielfachung (Amplifikation)
- Dadurch entstehen andere Eiweißstoffe (Proteine)
   oder sie werden gar nicht mehr oder zuviel gebildet
- Es gibt schützende Gene (Tumorsuppressor-Gene) und Krebs-antreibende Gene (Onkogene)
- Durch Mutationen werden schützende Gene abgeschaltet und Onkogene angeschaltet und verstärkt
- Je mehr Mutationen eine Zelle hat, desto aggressiver ist sie und um so schwieriger ist die Behandlung







# **ZYTOGENETISCHES PROFIL DER MDS**



Haase D, et al. Blood 2007;110:4385-95

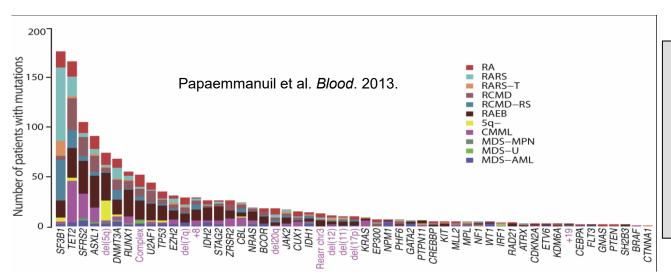




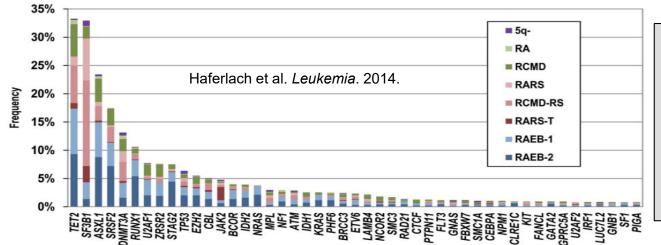




### **MUTATIONSPROFIL BEI MDS**



- > N= 603 MDS-Pat. (ges. 783)
- > 111 Gene sequenziert
- > >1 Mutation bei 78%
- Nur 4 Gene (SF3B1, TET2, SRSF2, ASXL1) häufig mutiert (>10 Pat.)
- > 43% hatten 2 oder 3 Mutationen 10% hatten 4-8 Mutationen



- > N= 944 MDS-Pat.
- > 104 Gene sequenziert + A-CGH
- > <u>></u>1 Mutation bei **89,5%**
- > 4 am häufigsten mutierte Gene: SF3B1, TET2, SRSF2, ASXL1(jeweils bei >15%)
- Mediane Mutationsanzahl = 3 (0-12)

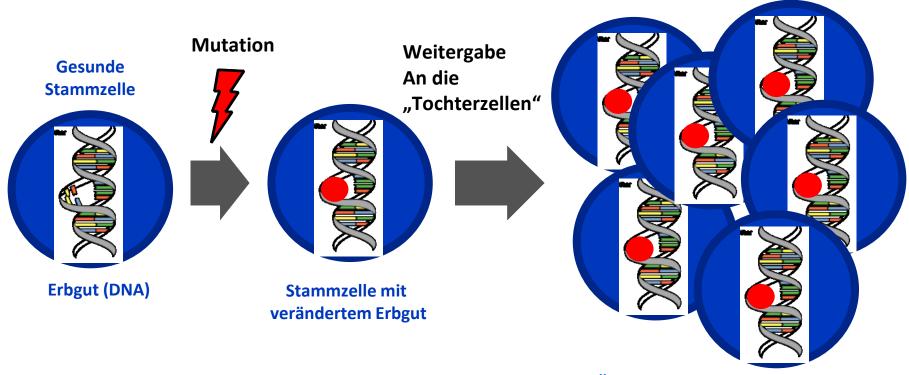






# Wie wird aus einer Mutation in einer Zelle eine Krankheit/MDS?

 Ausgangspunkt f
ür ein MDS ist h
äufig die Mutation einer Blutstammzelle im Knochenmark



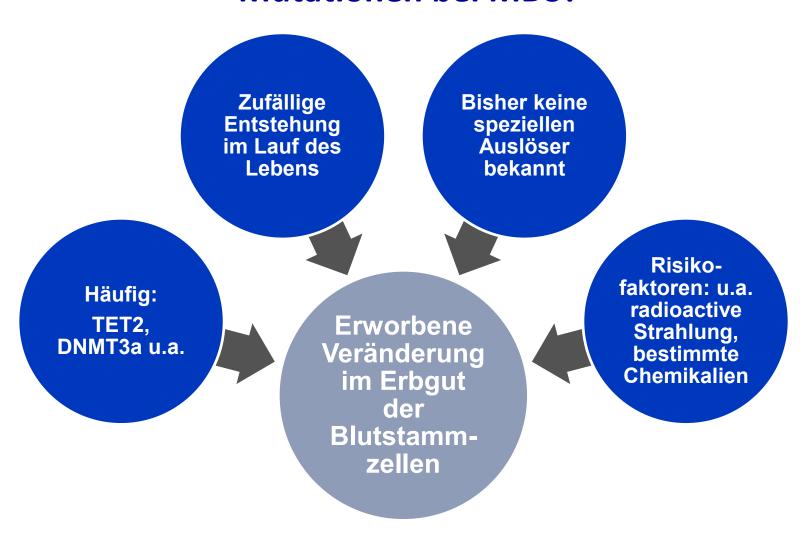
Übermäßige Vermehrung der mutierten MDS-Zellen







# Warum entstehen Chromosomenanomalien und Mutationen bei MDS?







## Warum sind die Chromosomenanalysen und die molekulargenetischen Untersuchungen so wichtig für MDS-Patienten?

- um die richtige Diagnose stellen zu können
  - -> liegt überhaupt ein MDS vor? Welche Art von MDS?
- um die Schwere des MDS einschätzen zu können
  - -> besteht ein Hoch- oder Niedrigrisiko-MDS?
  - -> ist mit einer baldigen Entwicklung eines Hochrisiko-MDS zu rechnen?
- um den Verlauf der Erkrankung besser überwachen zu können
  - -> bleibt das MDS stabil oder wird es aggressiver?
- um festlegen zu können, welche Therapie für den einzelnen Patienten die beste ist
  - -> das reicht von Abwarten über unterstützende Behandlung, Vidaza-Therapie bis hin zur Stammzelltransplantation
- um die Wirksamkeit der Behandlung besser messen zu können
  - -> sprechen die genet. veränderten Zellen an?
  - -> muss die Therapie umgestellt werden?





### Warum sind die Chromosomenanalysen und die molekulargenetischen Untersuchungen so wichtig für MDS-Patienten?

#### **Generell gilt:**

- Genetische Untersuchungen sind zuverlässiger und aussagekräftiger als andere Verfahren
- Veränderungen des genetischen Profils zeigen sich meist deutlich vor einer allgemeinen Verschlechterung oder Verschlechterungen der Blutwerte oder des Zellbildes im Knochenmark
- Dadurch gewinnt man Zeit, um durch Therapieumstellung auf die neue Situation zu reagieren







# Wie kann besser abgeschätzt werden, welchen Verlauf ein MDS wahrscheinlich nehmen wird? = Prognoseeinschätzung

#### Hierfür sind wichtig:

- Zellarmut (Zytopenie) der 3 Zellarten (weiße Blutkörperchen = Leukozyten, rote Blutkörperchen = Erythrozyten und Gerinnungszellen = Thrombozyten)
- Anzahl der Leukämiezellen = Blasten im Knochenmark und Blut
- Art und Anzahl der Chromosomenveränderungen

#### In Zukunft zusätzlich:

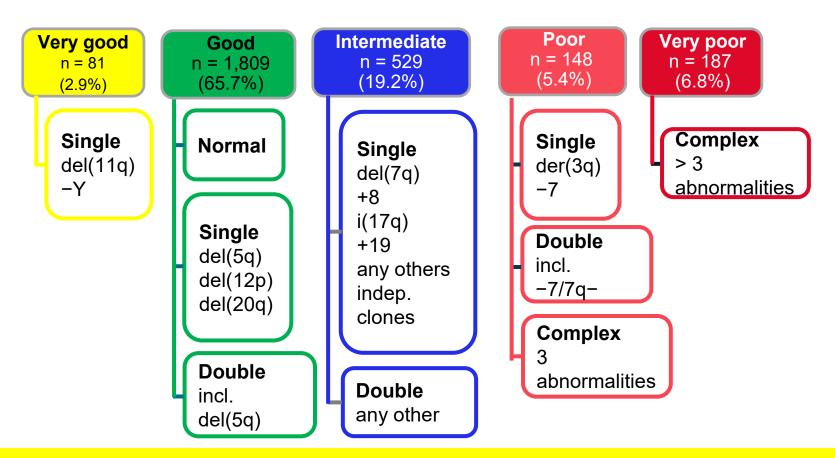
Art und Anzahl der molekulargenetischen Veränderungen







# **NEUES ZYTOGENETISCHES PROGNOSESYSTEM**



>90% aller MDS-Fälle können prognostisch zugeordnet werden









# blood

Prepublished online June 27, 2012; doi:10.1182/blood-2012-03-420489

#### Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for myelodysplastic syndromes

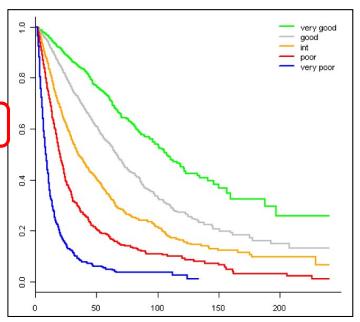
Peter L. Greenberg, Heinz Tuechler, Julie Schanz, Guillermo Sanz, Guillermo Garcia-Manero, Francesc Solé, John M. Bennett, David Bowen, Pierre Fenaux, Francois Dreyfus, Hagop Kantarjian, Andrea Kuendgen, Alessandro Levis, Luca Malcovati, Mario Cazzola, Jaroslav Cermak, Christa Fonatsch, Michelle M. Le Beau, Marilyn L. Slovak, Otto Krieger, Michael Luebbert, Jaroslav Maciejewski, Silvia M.M. Magalhaes, Yasushi Miyazaki, Michael Pfeilstöcker, Mikkael Sekeres, Wolfgang R. Sperr, Reinhard Stauder, Sudhir Tauro, Peter Valent, Teresa Vallespi, Arjan A. van de Loosdrecht, Ulrich Germing and Detlef Haase

#### 7012 Patienten aus 18 nationalen Datenbanken

	Prognostic Variable	0	0.5	1	1.5	2	3	4
	Cytogenetics	Very good		Good		Int	Poor	Very poor
	BM blasts (%)	<u>&lt;</u> 2		>2 - <5%		5 – 10%	>10%	
Ī	Hemoglobin (g/dl)	<u>&gt;10</u>		8 - <10	<8			
Ī	Platelets/nl	<u>≥</u> 100	50 - <100	<50				
	ANC/nl	<u>≥</u> 0.8	<0.8					

#### Prognost. Bedeutung in der Reihenfolge der Wichtigkeit:

- 1. Chromosomen
- 2. Blasten
- 3. Zytopenien











# **GENMUTATIONEN BEI MDS** (n=16 ausgewählte Gene) (QUELLE: ONKOPEDIA, Version vom Februar 2020)

Funktion	Mutation	Prognose	Frequenz
Splicing	SF3B1	gut	15-30 %
	SRSF2	schlecht	5-10 %
	U2AF1	schlecht	5-10 %
	ZRSR2	-	5 %
Methylierung	DNMT3A	schlecht	5-10 %
	TET2	-	15-25 %
Methylierung/ Histon-Modifikation	IDH1/ IDH2	-	4-5 %
Histon-Modifikation	ASXL1	schlecht	10-20 %
	EZH2	schlecht	3-7 %
Transkriptionsfaktor	RUNX1	schlecht	5-10 %
	TP53	schlecht	5-10 %
	BCOR	schlecht	5-6 %
	ETV6	schlecht	3%
Signaltransduktion	NRAS/KRAS	schlecht	5-10 %





# Was ist eine genetische Evolution?

- MDS-Erkrankungen sind dynamisch, d.h. sie verändern sich im Laufe der Zeit
- Die Veränderung kann sehr schnell (innerhalb von Wochen) oder ganz allmählich (über Jahre) vonstatten gehen.
- Die Veränderung im Krankheitsbild (Blutwerte, Blasten im Knochenmark, Funktion der KM- und Blutzellen) wird verursacht durch eine Zunahme genet. Anomalien in den KM-Stammzellen.
- Dieses nennt man genetische Evolution
- Die genetische Evolution kann sich auf Ebene der Chromosomen abspielen (Karyotypevolution) und/oder auf Ebene der Gene (molekulare Evolution)
- Sie bedeutet immer, dass die Erkrankung mehr oder weniger schnell aggressiver wird. Häufig muss dann die Therapie umgestellt werden

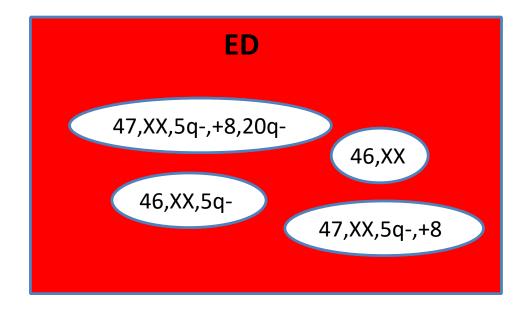






# Beispiel für eine Karyotypevolution

Preclinical







# Muss für Untersuchungen im Verlauf immer Knochenmark punktiert werden?

- Nein, viele Untersuchungen können inzwischen aus dem Blut gemacht werden. Das ist weniger belastend für den Patienten
- In unserem INDIGHO-Labor haben wir ein Verfahren entwickelt, um MDS-Stammzellen aus dem Blut mittels Magnetismus herausfiltern und anschließen genetisch untersuchen zu können.
- Das ermöglicht eine wenig belastende, engmaschige Untersuchung im Verlauf
- Diese Untersuchungen sollten alle 3 bis 6 Monaten gemacht werden, um keine Veränderungen des MDS (genetische Evolution) zu verpassen.









# **CD34-FISH-METHODE**

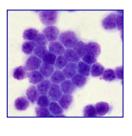
Material: ~ 20ml peripheres Blut

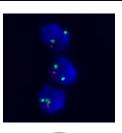
MACS CD 34+: 40.000 – 400.000 Zellen

FISH: Panelanalyse mit 8 bis 13 FISH-Proben





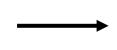




рВ

CD34+ Macs







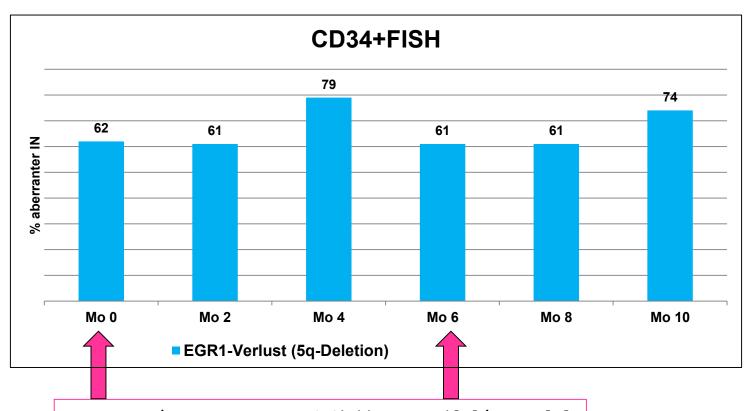
- verlässlich und repräsentativ für das KM
- wenig belastend und engmaschig durchführbar
- gut geeignet für Therapiemonitoring
- genetische Evolution wird erfasst
- funktioniert auch mit NGS







10/2008 Start CD34+FISH-Studie



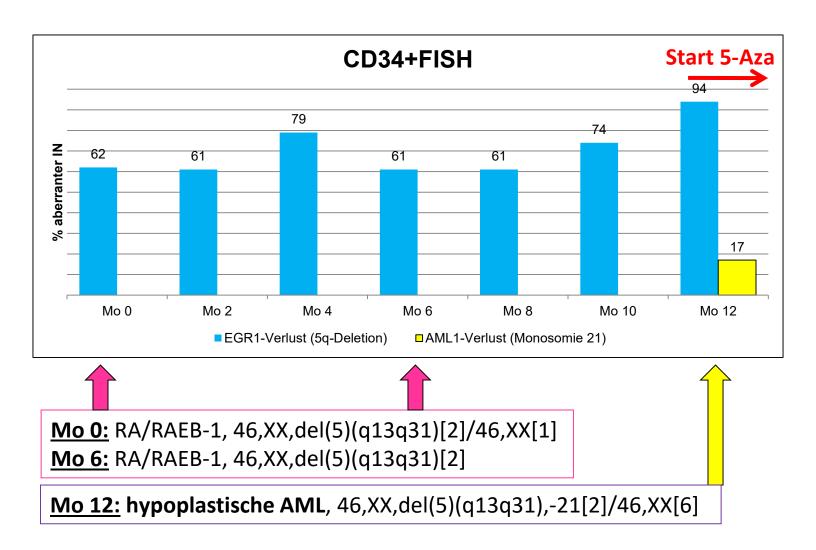
**Mo 0:** RA/RAEB-1, 46,XX,del(5)(q13q31)[2]/46,XX[1]

**Mo 6:** RA/RAEB-1, 46,XX,del(5)(q13q31)[2]





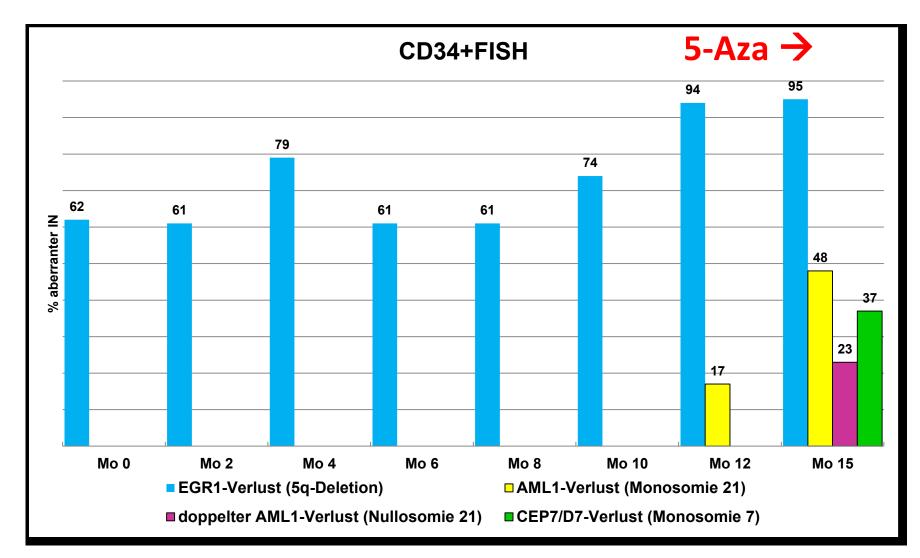








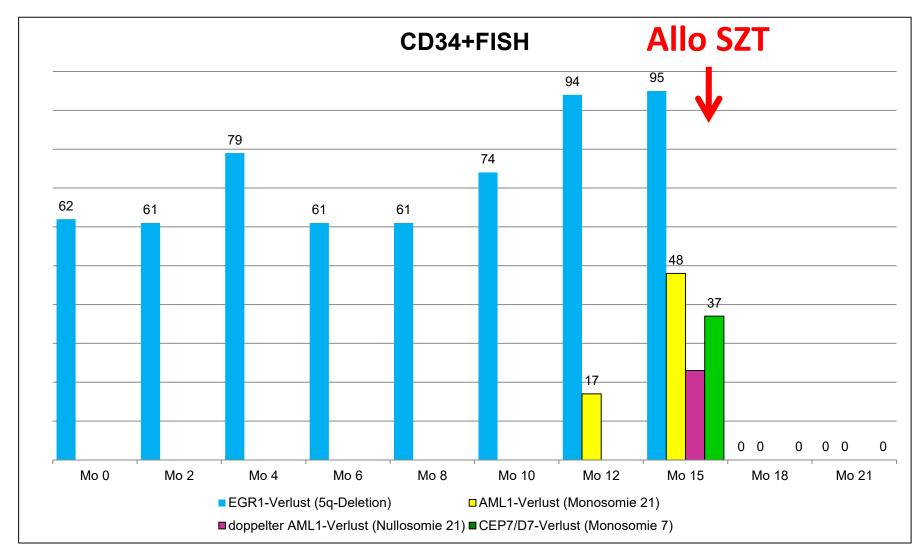


















# **Fazit in diesem Fall**

Diese Patientin konnte durch eine Transplantation geheilt werden, weil wir die Verschlechterung des MDS ganz frühzeitig durch die FISH-Analyse aus dem Blut erfassen und dann ganz schnell therapeutisch reagieren konnten.















# Was habe ich als Patient noch von den genetischen Untersuchungen?

Immer mehr Medikament kommen auf den Markt, die bei ganz bestimmten Veränderungen besonders gut wirken.

- Z.B. Revlimid bei 5q-Deletion
- Epo bei normalem Karyotyp (keine Chromosomenanomalien)
- Immununterdrückungstherapie bei normalem Karyotyp
- Luspatercept (verhindert das vorzeitige Absterben roter Blutkörperchen) bei SF3B1-Mutationen

Sog. gezielte (targeted) Medikamente zerstören Zellen mit Mutationen, die ganz bestimmte Gene betreffen, wie TP53, IDH1 und IDH2, EZH2, RAS und andere









#### Das beste Medikament

- Wirksamkeit
- Verträglichkeit

#### für den richtigen Patienten

- Fitness/Alter
- Eigenschaften der Erkrankung/Zielzellen

#### zum richtigen Zeitpunkt

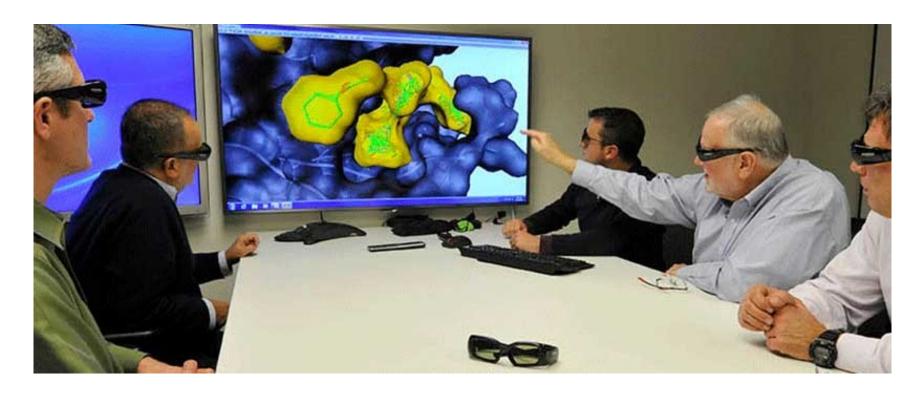
- Therapiebedarf
- Erkrankungsphase







# KONSTRUKTION DES MEDIKAMENTES AM "REIßBRETT"



Dafür muss man unbedingt genau wissen, welche genetischen Veränderungen vorliegen







# Wie kann eine personalisierte Therapie erreicht werden?

- Aufschlüsselung von Krankheitsmechanismen (Genetik, Immunologie)
- Entwicklung gezielter Medikamente gegen bestimmte Krankeitsmechanismen
- Genaue und umfassende Charakterisierung bösartiger (maligner) Zellen (Genetik, Immunologie)



Aufgabe des INDIGHO-Labors