

Im Fadenkreuz- Fusionsgene bei der akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter

Gudrun Göhring

Institut für Humangenetik



Medizinische Hochschule
Hannover

Institut für Humangenetik

Direktorin Professorin Brigitte Schlegelberger
leitet seit 2001 das Institut



Unser Leitbild:



Team Hämatookongenetik:

- seit 2005 zertifiziert
- seit Februar 2008 akkreditiert
- Referenzlabor für Vielzahl nationaler und internationaler Patientenstudien
- Neben Diagnostik auch wissenschaftliche Arbeiten



Hämatookongenetik- was ist das eigentlich?

- Genetische Untersuchungen sind unverzichtbarer Bestandteil hämatologischer Neoplasien
- Genetik bietet wichtige Hinweise für die Diagnostik, Prognose und Planung einer risikoadaptierten Therapie
- In letzten Jahren großer Fortschritt durch neue Methoden in Genetik- Next Generation Sequenzierung
- Extrem hoher Etablierungsaufwand (Akkreditierung)
- Aber: für Patienten von großem Nutzen- Weg der Zukunft

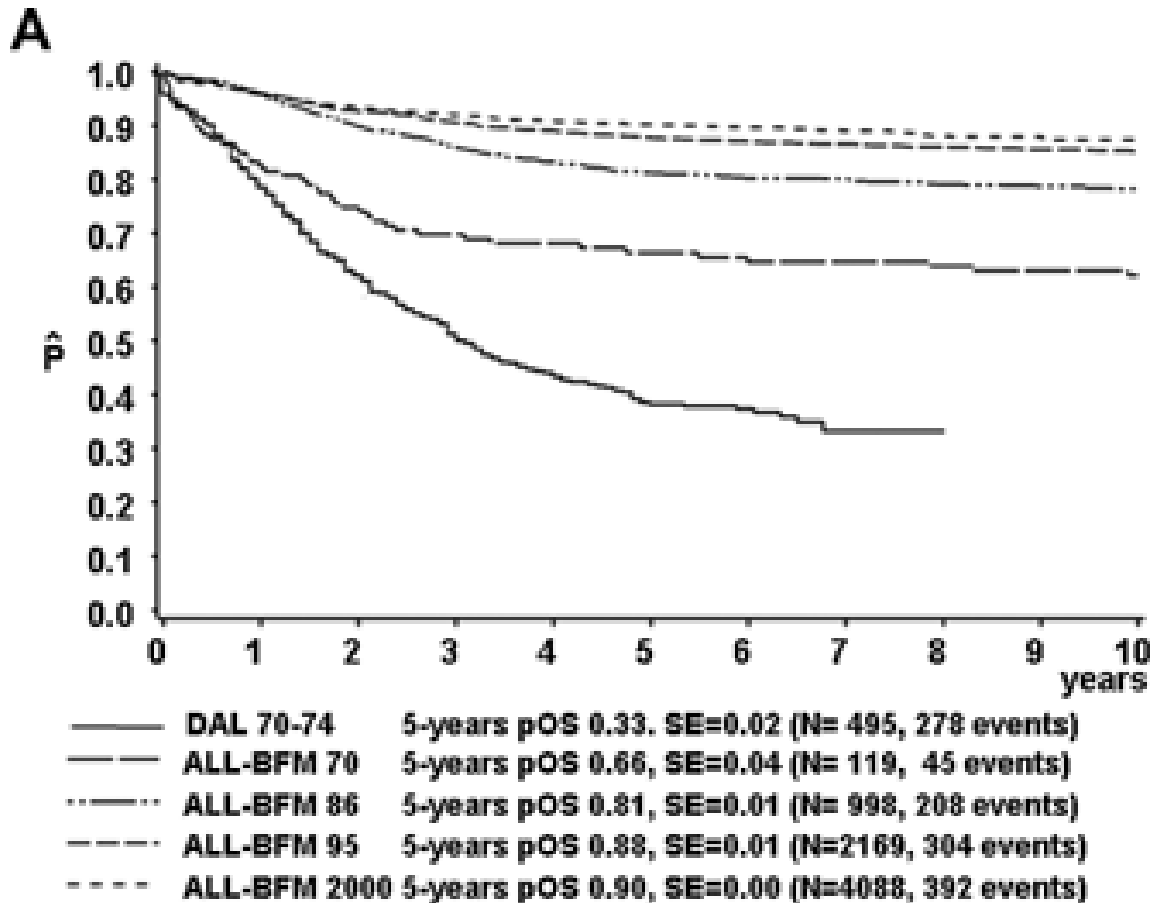
 **Personalisierte Medizin durch Hämatookongenetik !**

Akute lymphoblastische Leukämie (ALL) bei Kindern

- Häufigste kindliche Krebserkrankung
- Medianes Erkrankungsalter 4,7 Jahre
- ~600 Erkrankungen/Jahr in Deutschland
- Symptome sind Folgen der Knochenmarkinsuffizienz und möglichen Organbefalls:
 - Infektionen (Granulozytopenie)
 - Blutungen (Thrombopenie)
 - Anämie
 - Atemnot (Mediastinaltumor)
 - Schmerzen in Beinen und Bauch (Hepatosplenomegalie)
- Überleben- abhängig von Risikofaktoren: ~85%

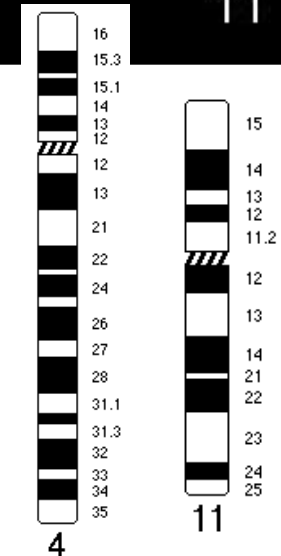
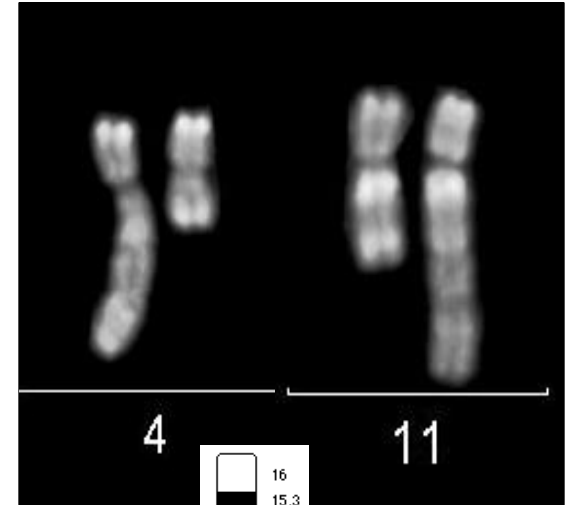
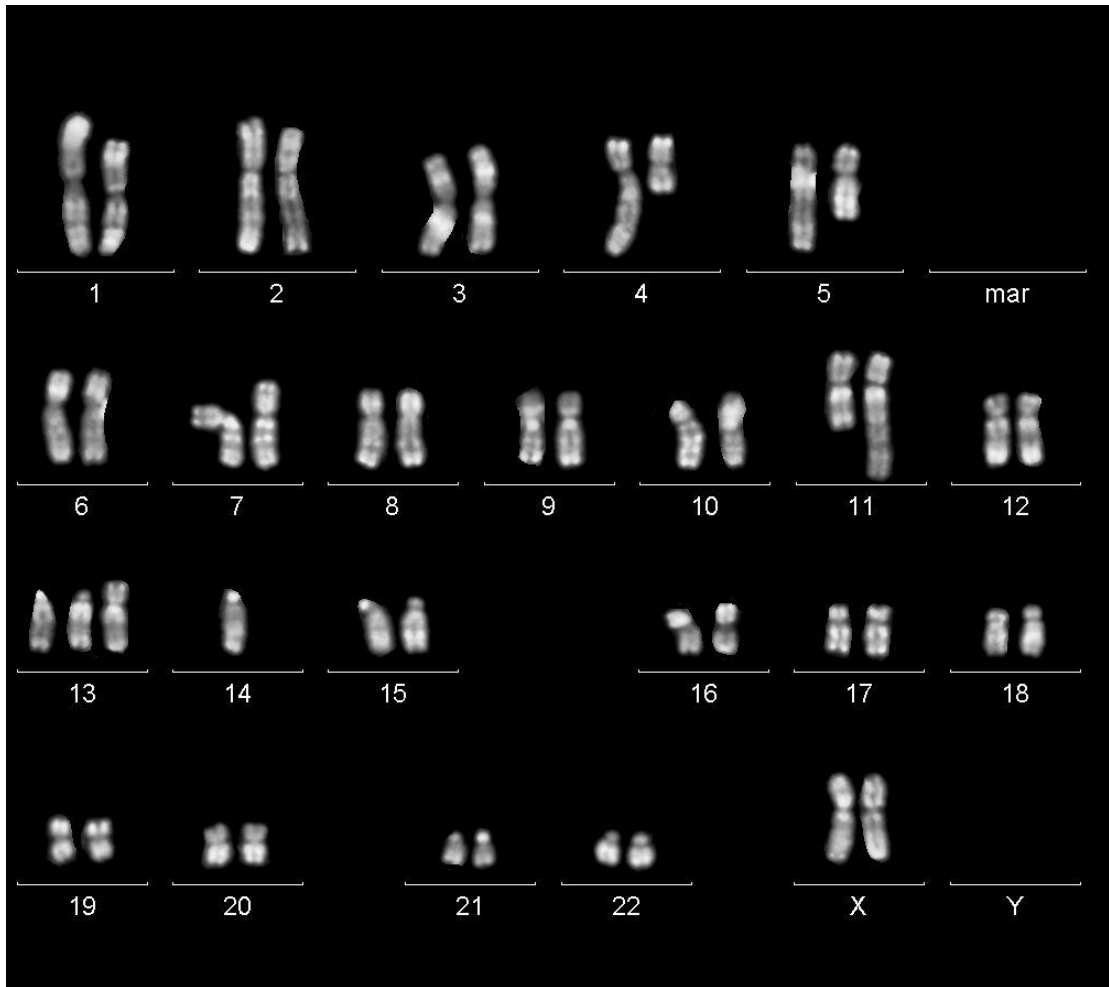
Bartram et al, Dts. Ärzteblatt, 2012

Durch Studien konnte das 5-Jahres-Überleben von Kindern mit ALL von 33% auf 90% gesteigert werden

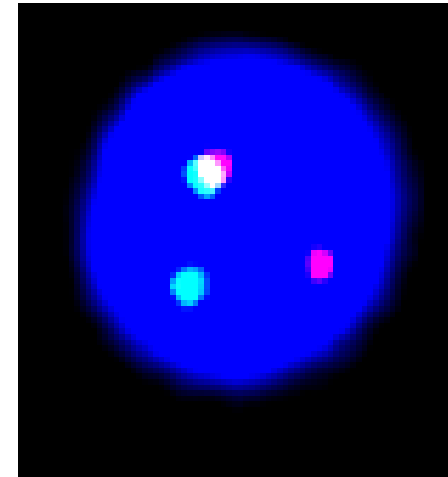
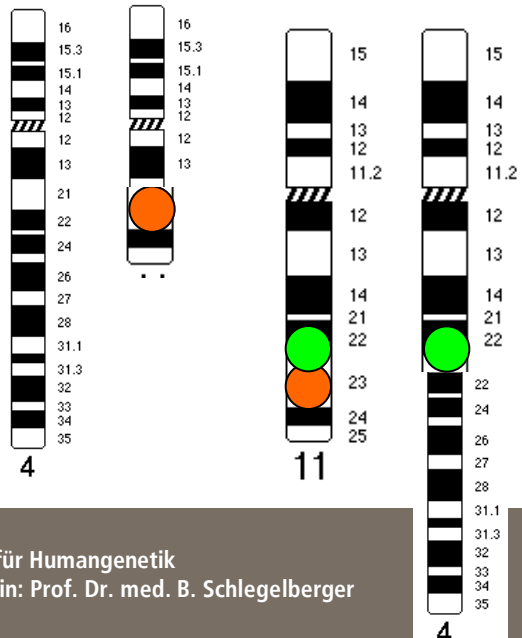
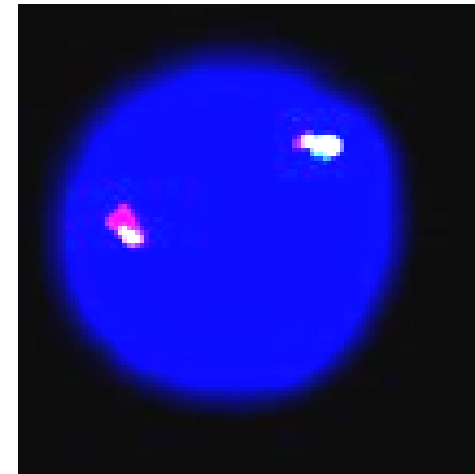
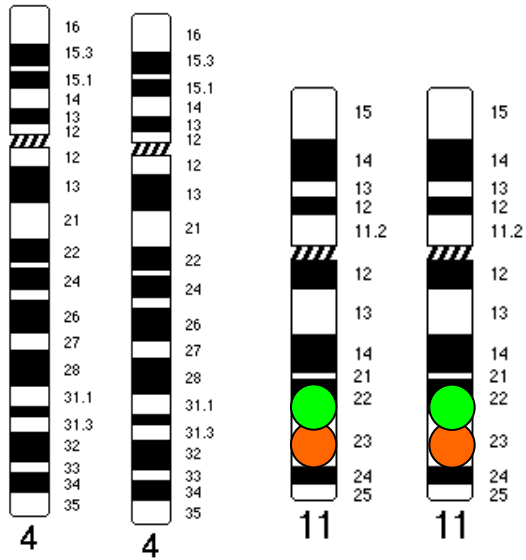


Rossig et al, Pediatric Blood & Cancer, 2013

Klassische Zytogenetik: Translokation t(4;11)(q21;q23)

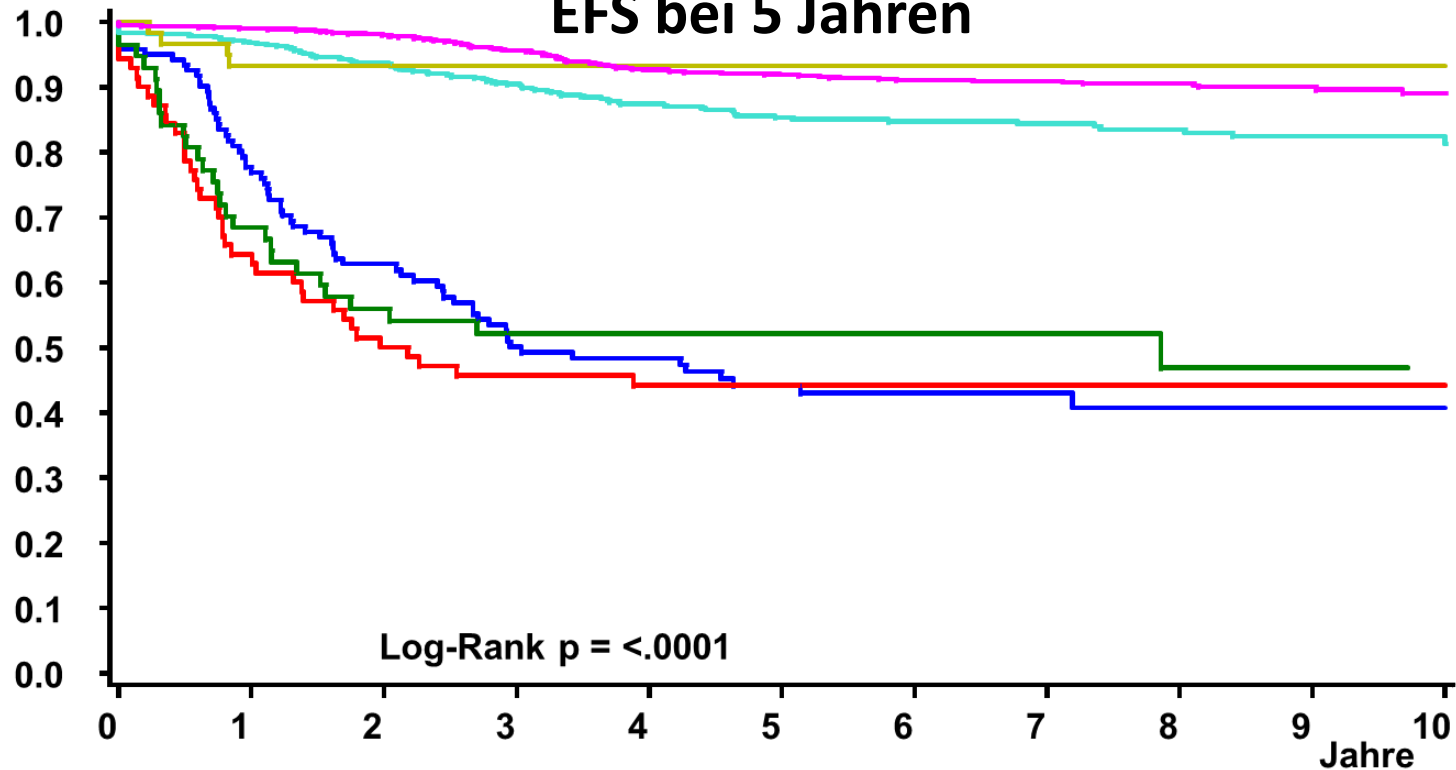


FISH: Nachweis einer MLL-Translokation



ALL-BFM 95+2000, Onkogenetik

EFS bei 5 Jahren

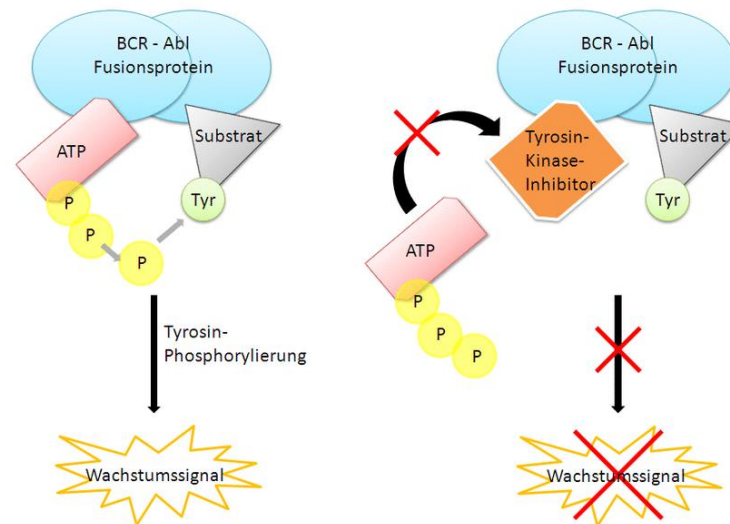


— t(9;22)	0.44, SE=0.05 (N= 121, 68 Ereignisse)
— t(4;11)	0.44, SE=0.06 (N= 71, 39 Ereignisse)
— other MLL	0.52, SE=0.07 (N= 57, 28 Ereignisse)
— high-hyperdiploid	0.85, SE=0.02 (N= 600, 89 Ereignisse)
— t(1;19)	0.93, SE=0.03 (N= 59, 4 Ereignisse)
— t(12;21)	0.92, SE=0.01 (N=1171, 102 Ereignisse)

Martin Schrappe, ALL-BFM Studienleitung

Neue prognostische Subgruppe identifiziert

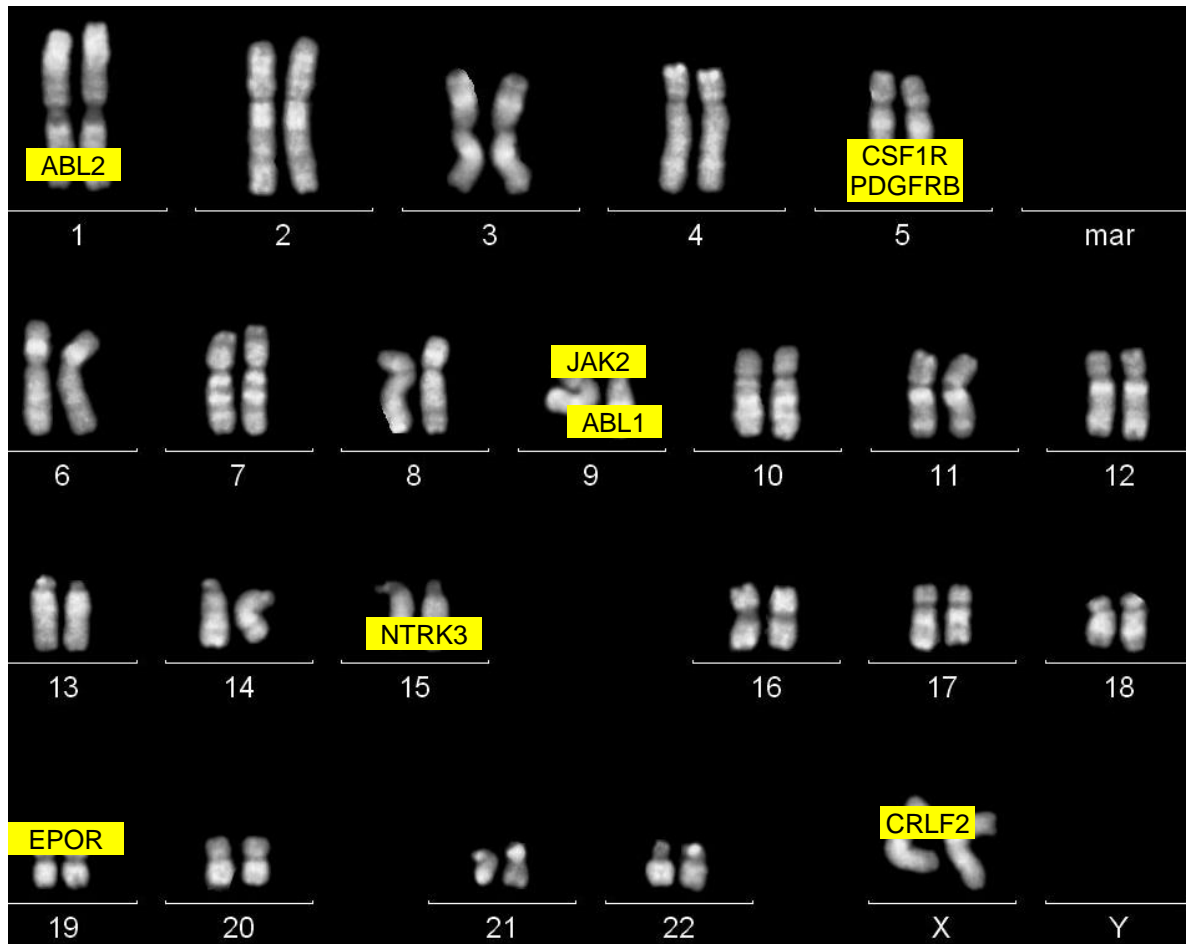
- neue genetische Subgruppe bei Kindern mit ALL identifiziert
- mit sehr ungünstiger Prognose assoziiert
- Kinder tragen Translokationen, die zur Fusion von 2 Genen führt
- Bisher mehrere Gene bekannt, die hier involviert sind
- Alle Genfusionen führen zu einer Aktivierung einer Tyrosinkinase



- Es gibt Tyrosinkinase-Inhibitoren-Medikamente, die in ersten Studien vielversprechend zu sein scheinen

<http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=imatinib>

Bei Fusion ist nur ein Genpartner rekurrent- Fusionspartner kann variieren



Kinase	5' gene
ABL1	<i>CENPC, ETV6, LSM14A, NUP214, NUP214, RCSD1, RANBP2, SNX2, ZMIZ1</i>
ABL2	<i>PAG1, RCSD1, ZC3HAV1</i>
CSF1R	<i>SSBP2, TBL1XR1</i>
PDGFR B	<i>EBF1, ETV6, TNIP1, ZEB2</i>
CRLF2	<i>IGH, P2RY8</i>
JAK2	<i>ATF7IP, BCR, EBF1, ETV6, PAX5, PCM1, RFX3, PPFIBP1, SSBP2, STRN3, TERF2, TPR, USP25, ZNF274</i>

Bisher nicht alle
Fusionspartner
bekannt!

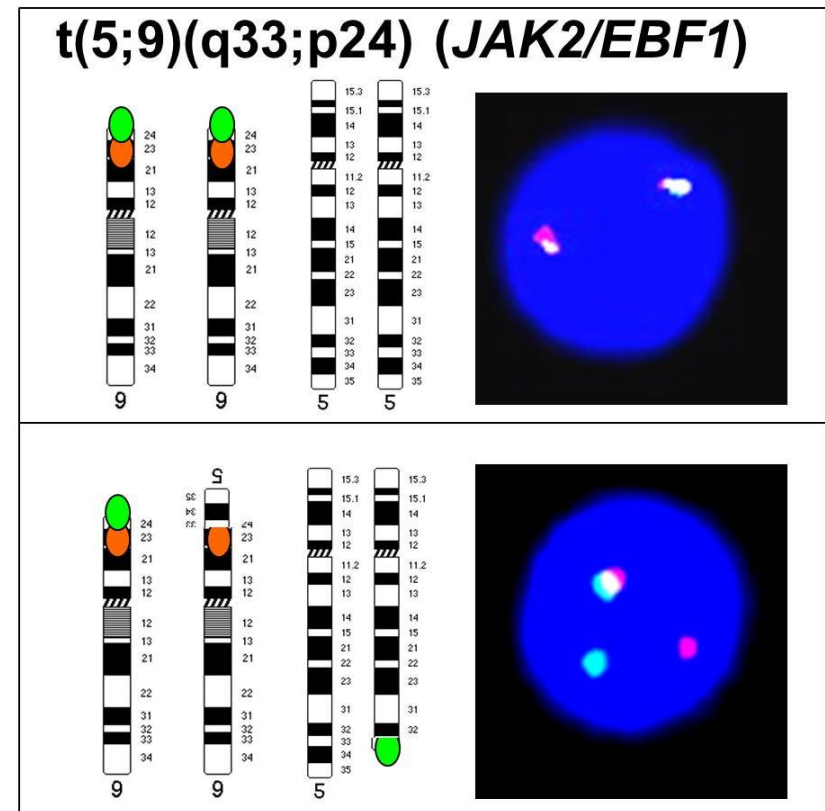
Roberts et al, NEJM, 2014

Retrospektive Studie: Identifizierung der Kinder mit therapierrelevanter Gen-Fusion

Kohorte:

100 Kinder mit ALL aus ALL-BFM 2009 Studie, die keine anderen Therapierlevanten bekannten Genveränderungen haben

Detektion mittels FISH:
Translokationssonden



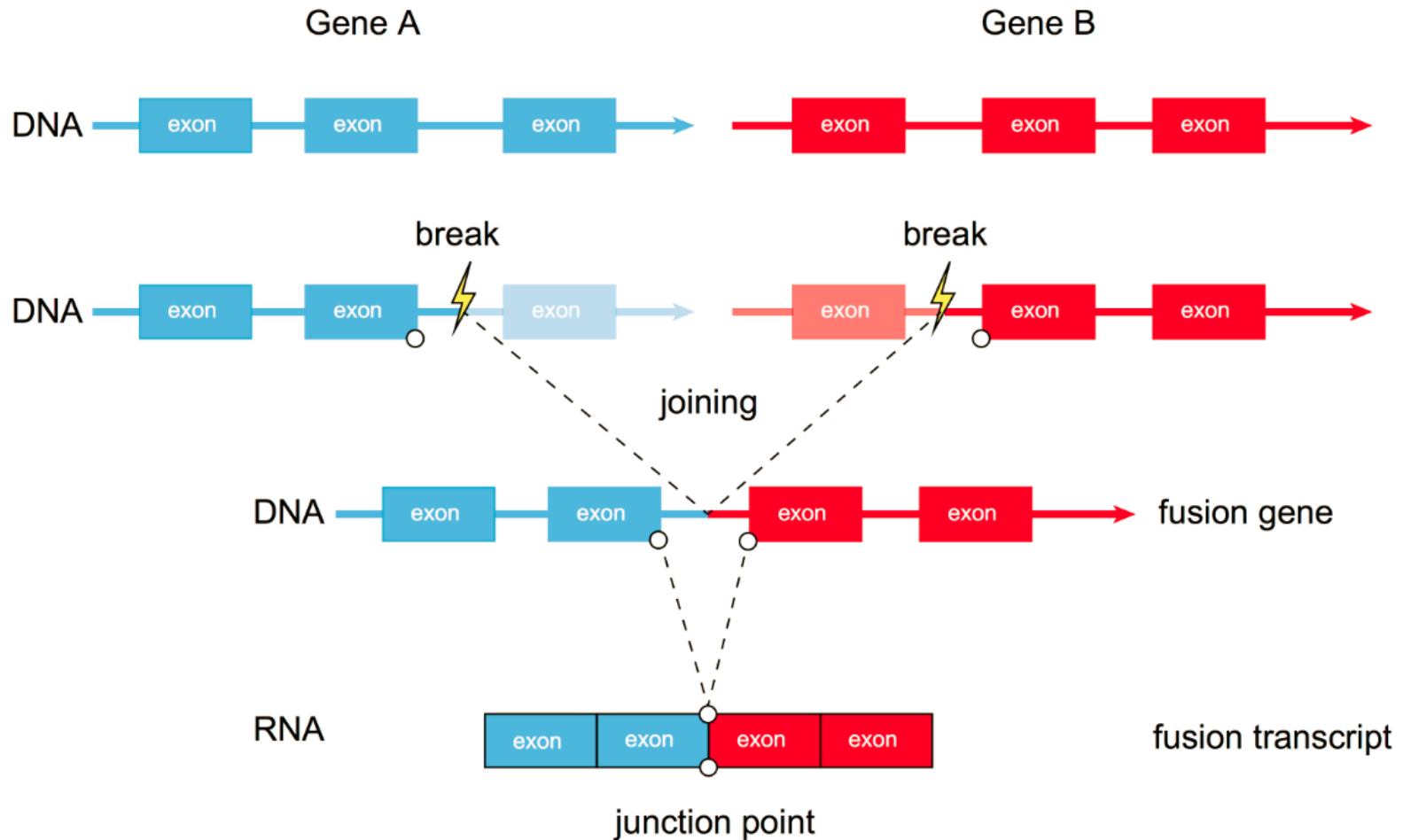
Frederik Heldt

3 Patienten mit Translokation aus neuer Subgruppe identifiziert

FISH Translokation	Fusionspartner
JAK2 (9p24)	unbekannt
ABL2 (1q25)	unbekannt
PDGFR β (5q32)	unbekannt

- Translokationspartner können mit der FISH- Analyse nicht detektiert identifiziert werden
- Identifizierung der Translokationspartner mittels **RNASequenzierung**

Next Generation Sequencing (NGS): Nachweis von Fusionen mittels RNA Sequenzierung



Torres-Garcia et al, PRADA: bioinformatics, 2014

TruSight™ RNA Pan-Cancer Panel

Targeted RNA Sequencing:

1385 “Krebs-Gene” und Fusionen



Einsatz von Robotik zur Vorbereitung der RNA
(Library Preparation)

Library Preparation



Targeted
RNA libraries

Sequencing



Highly sensitive
targeted sequencing

Analysis



Data analysis and gene fusion
calling using BaseSpace
RNA Alignment App



Kathrin Thomay

Identifizierung der Fusionsgene mittels RNASequenzierung

FISH probe	RNA Fusion
JAK2 (9p24)	JAK2-PAX5
ABL2 (1q25)	ABL2-ZC3HAV1
PDGFR β (5q32)	SSBP2-CSF1R

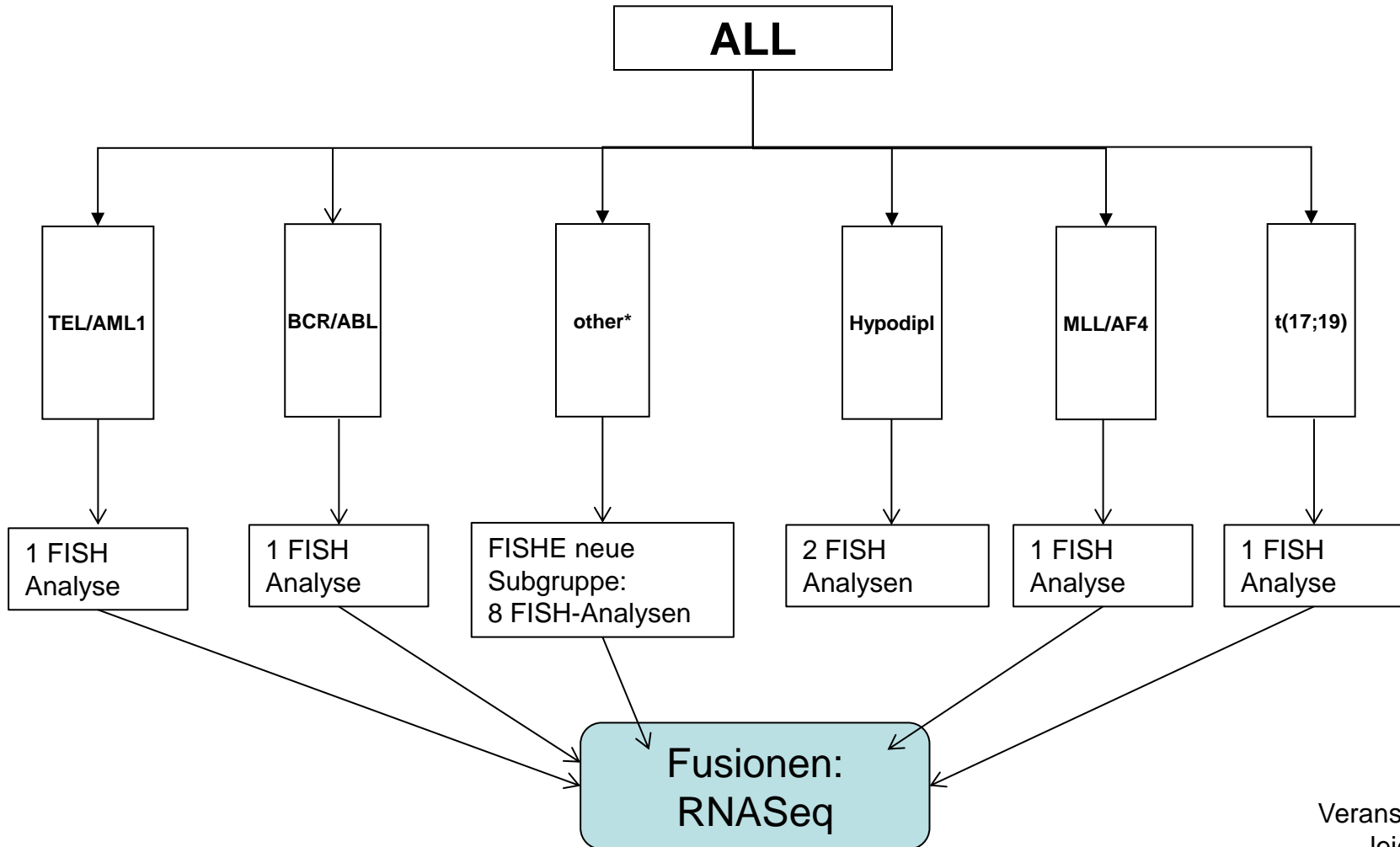
In 3% der Kinder ohne zuvor bekannte prognostischer Subgruppe konnte eine Fusion identifiziert werden, die optional mit einem TKI-Inhibitor behandelt werden könnten

Vorsicht! Bisher wenige Fälle- sorgfältiges Vorgehen nur in Zusammenschau mit weiteren Aspekten durch Studienzentrale

Unser Ziel: Akkreditierung der RNASequenzierung für die klinische Diagnostik

- mit FISH nur *eine* Fusion/ Analyse möglich
- Mittels RNA-Sequenzierung können *mehrere* Fusionen in nur einer Analyse detektiert werden
- und die Partnergene identifiziert werden
- Gewinn zusätzlicher Informationen für die Wissenschaft

Risikostratifizierung der ALL*: bis zu 13 FISH-Analysen können durch RNASeq ersetzt werden



* Zur Veranschaulichung leicht adaptiert

Validierung der RNASeq und Einbindung in die Diagnostik

Dauer- 1 Woche:

3 Tage Probenvorbereitung

1 Tag Sequenzierung

1 Tag Auswertung

- pro Lauf- 8 Patienten in Doppelbestimmung
- Validierung läuft- SOPs werden aktuell erstellt
- Teilweise sensitiver als FISH- kryptische Translokation t(17;19) konnte nicht mit FISH aber mit RNASeq identifiziert werden

Nutzen nicht nur für ALL- auch für andere hämatologische Neoplasien ist der Nachweis von Fusionsgenen diagnostisch relevant, z-Bsp. AML

Nicht alle Fusionen sind mittels RNASeq nachweisbar- sollte im Rahmen von Diagnostik nur in akkreditierten Laboren mit entsprechender Expertise durchgeführt werden!

Vielen Dank!!



Team Hämatonkogenetik

Martin Schrappe
sowie gesamte AIEOP-BFM-ALL
Studie

Gianni Cazzaniga, Monza, Italien
Grazia Fabio, Monza, Italien

Kathrin Thomay, MHH
Juliane Ebersold, MHH
Maike Hagedorn, MHH
Frederik Heldt, MHH
Winfried Hofmann, MHH
Doris Steinemann, MHH
Bernd Auber, MHH

Brigitte Schlegelberger, MHH