

Patiententag 2010, Heidelberg, 24.10.2010

Moderne Molekulare Diagnostik beim Multiplen Myelom

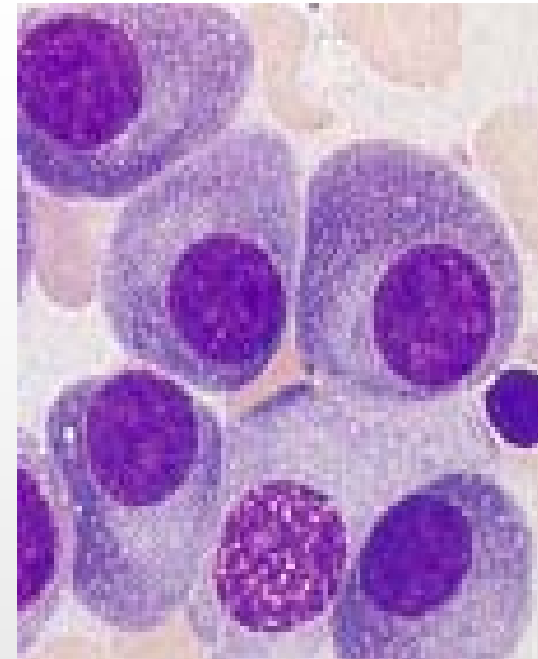
Dirk Hose

**Nationales Centrum für Tumorthherapie
Universitätsklinikum Heidelberg - Medizinische Klinik V
Sektion Multiples Myelom - Leiter: Prof. H. Goldschmidt
Labor für Myelomforschung – Leiter D. Hose**



Multiples Myelom

- **Lymphoproliferative Erkrankung** terminal differenzierter B-Zellen (Plasmazellen) → „Myelomzellen“
- **Plasmazellen sammeln sich im Knochenmark an** (→ Verdrängung der Hämatopoese, Osteopenie und Osteolysen) und sezernieren ein monoklonales Immunglobulin (→ Amyloidablagerung, Nephropathie)
- **Hauptmanifestationen:** Osteolysen, Infektionen, Anämie
- **Molekulare Heterogenität:** → Unterschiedliches Überleben





Einleitung



Molekulare-Diagnostik – Wie?



■ Knochenmarkpunktion

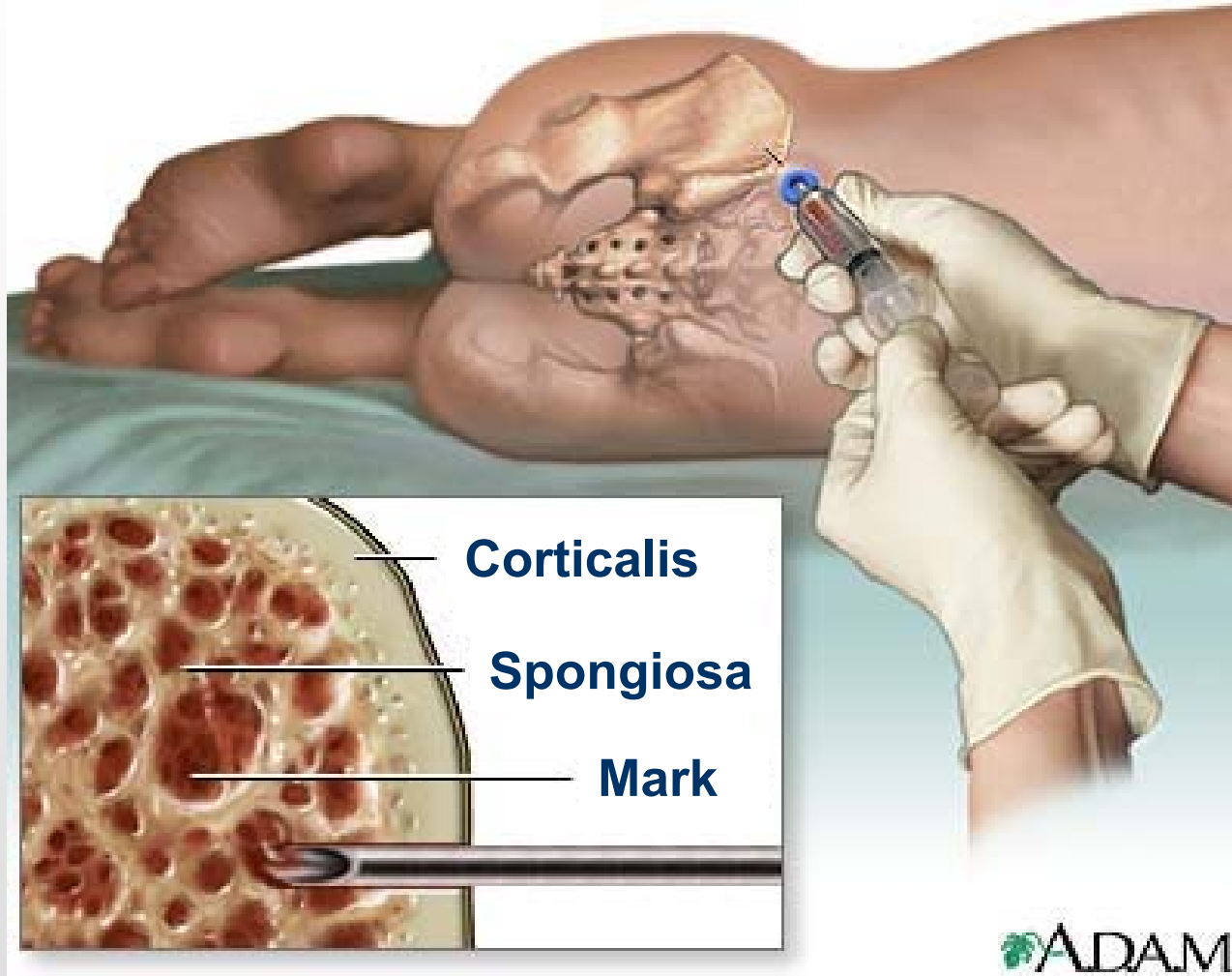
- 40-60 ml Knochenmark aus Beckenkamm
- Knochenmarkausstriche (Diagnose MM, CR)
- Aspirat für Aufreinigung

■ Myelomzellaufreinigung

■ Molekulare Diagnostik

- Fluoreszenz in situ Hybrisisierung (**FISH**) → Veränderung spezifischer Regionen auf den Chromosomen (Erbinformation in Myelomzellen)
- **Genexpressionsanalysen** („Gene expression profiling“ (**GEP**)) → Veränderung der Expression „aller“ (~30.000) Gene in Myelomzellen

Knochenmarkpunktion



Desinfektion

Örtliche Betäubung (Spritze)

Desinfektion

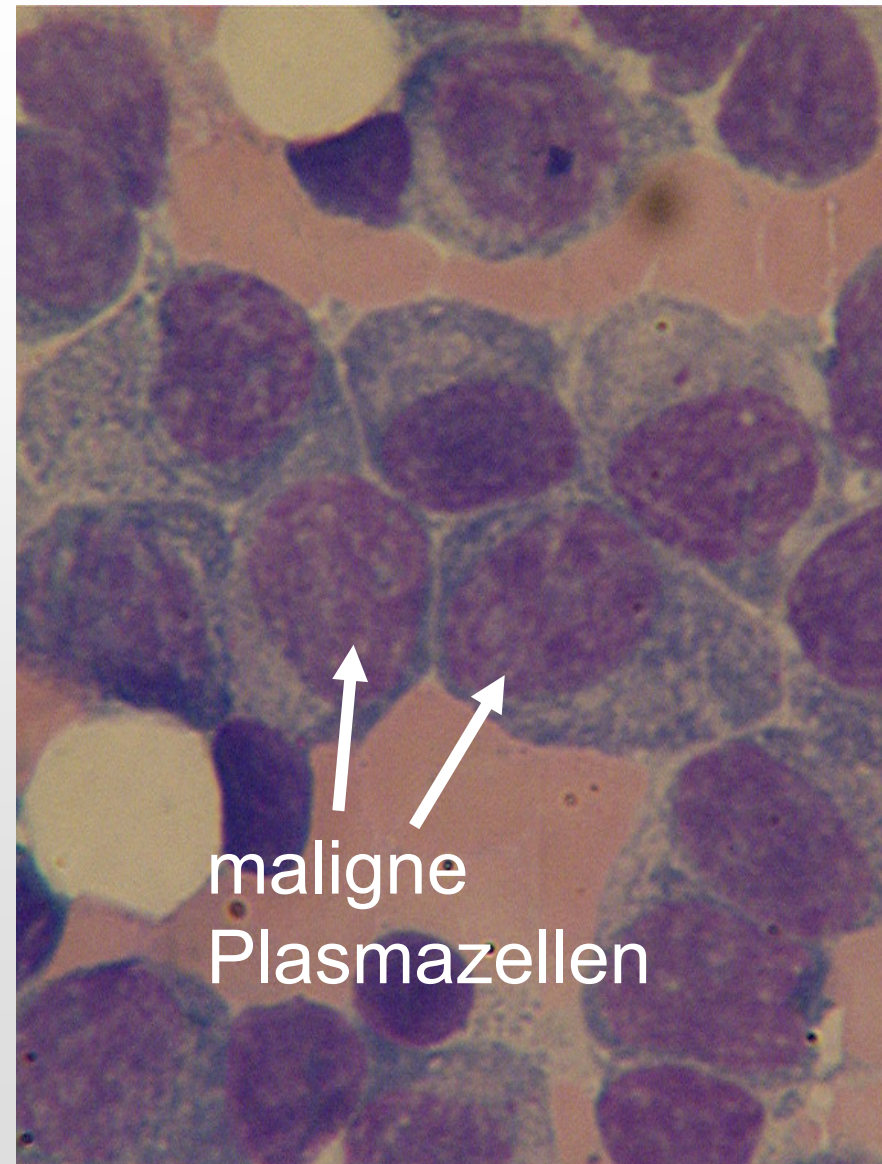
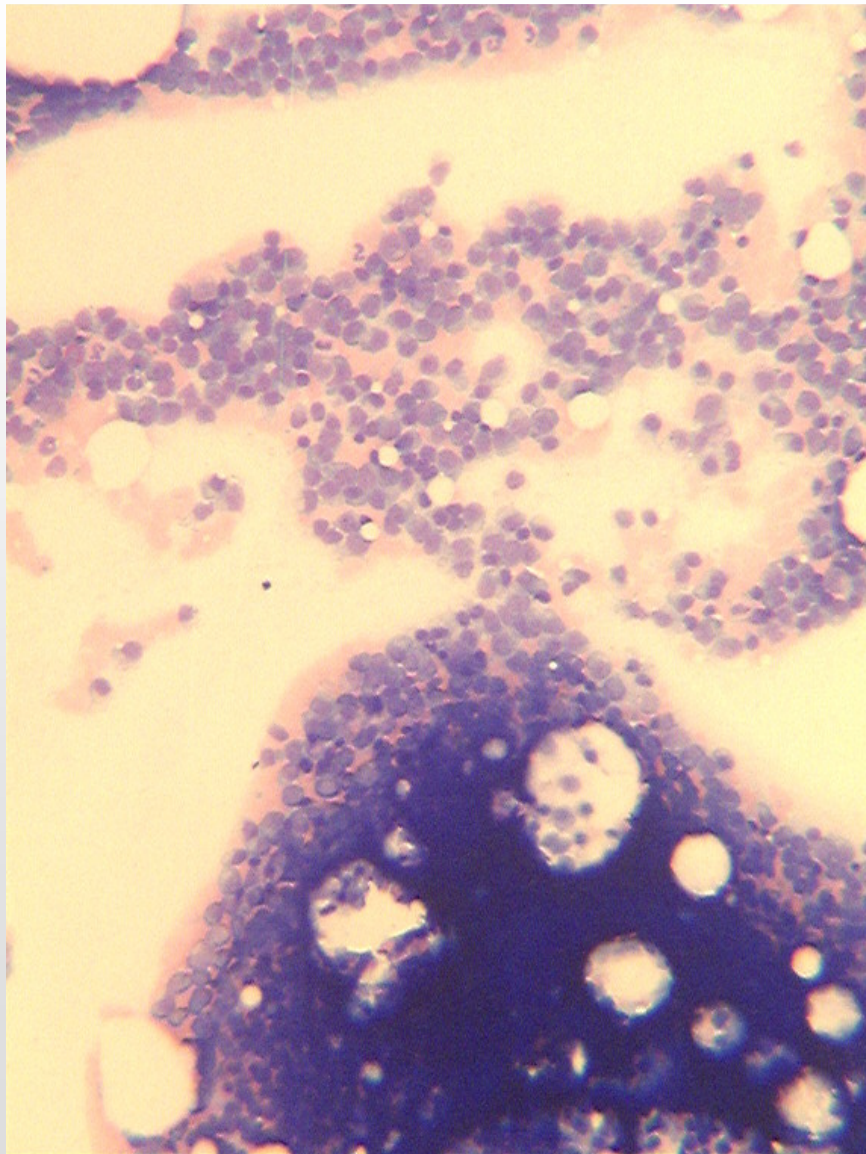
Punktion mit Hohlnadel

Knochenmark herausaugen
bzw. Stanzzyylinder entnehmen

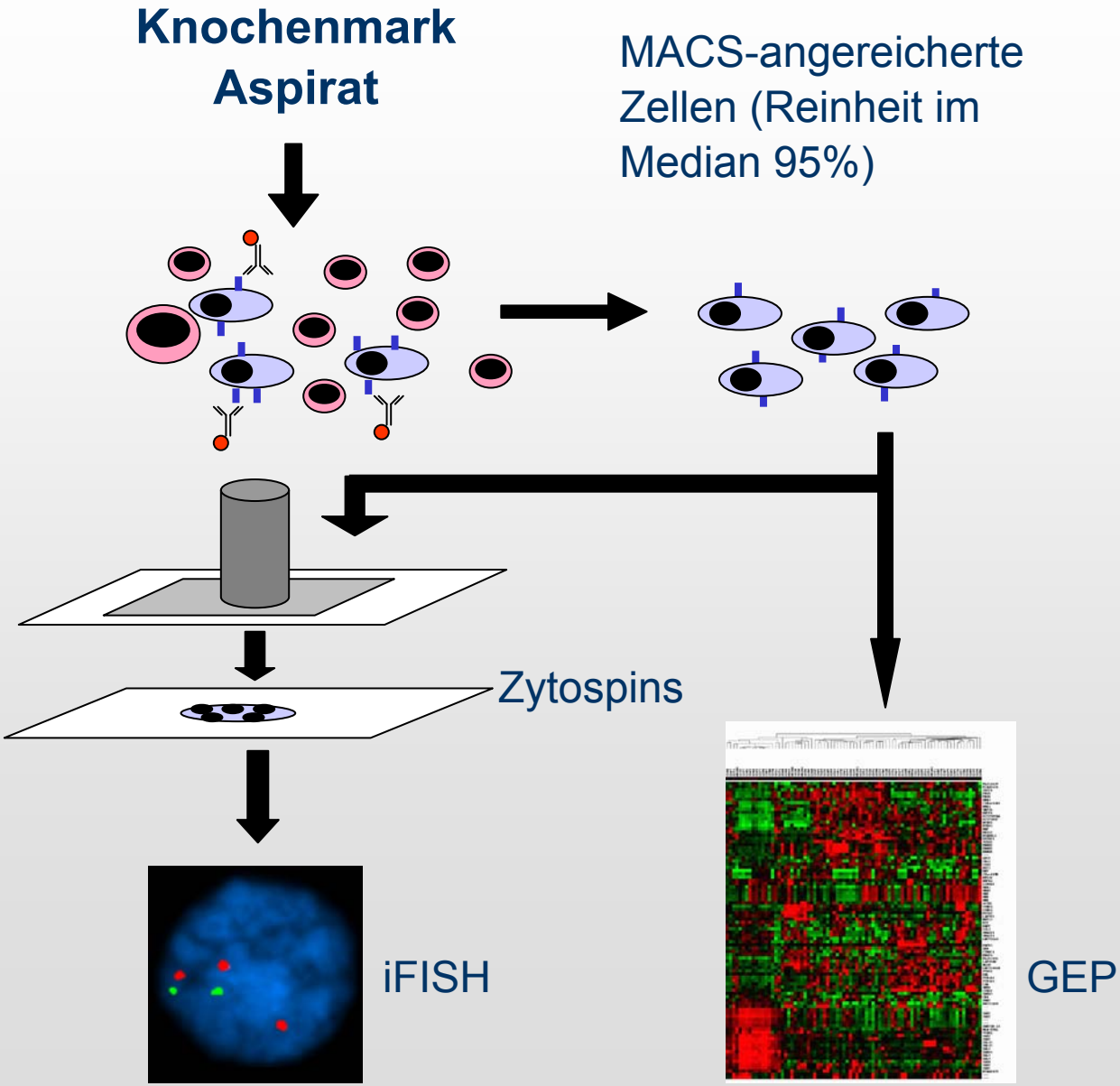
Pflaster + Sandsack (Druck)

Knochenmarkpunktion ≠ Rückenmarkpunktion

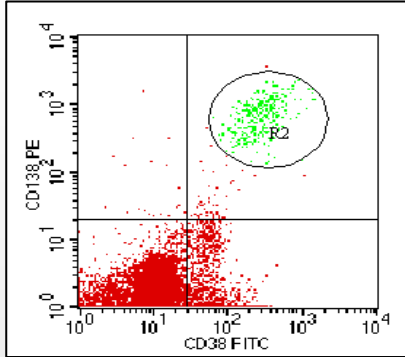
Myelomzellen im Knochenmarksausstrich



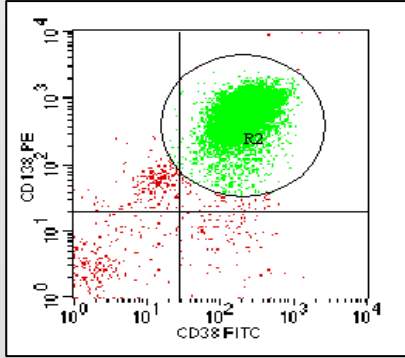
Aufreinigung von Myelomzellen



FACS-Analyse

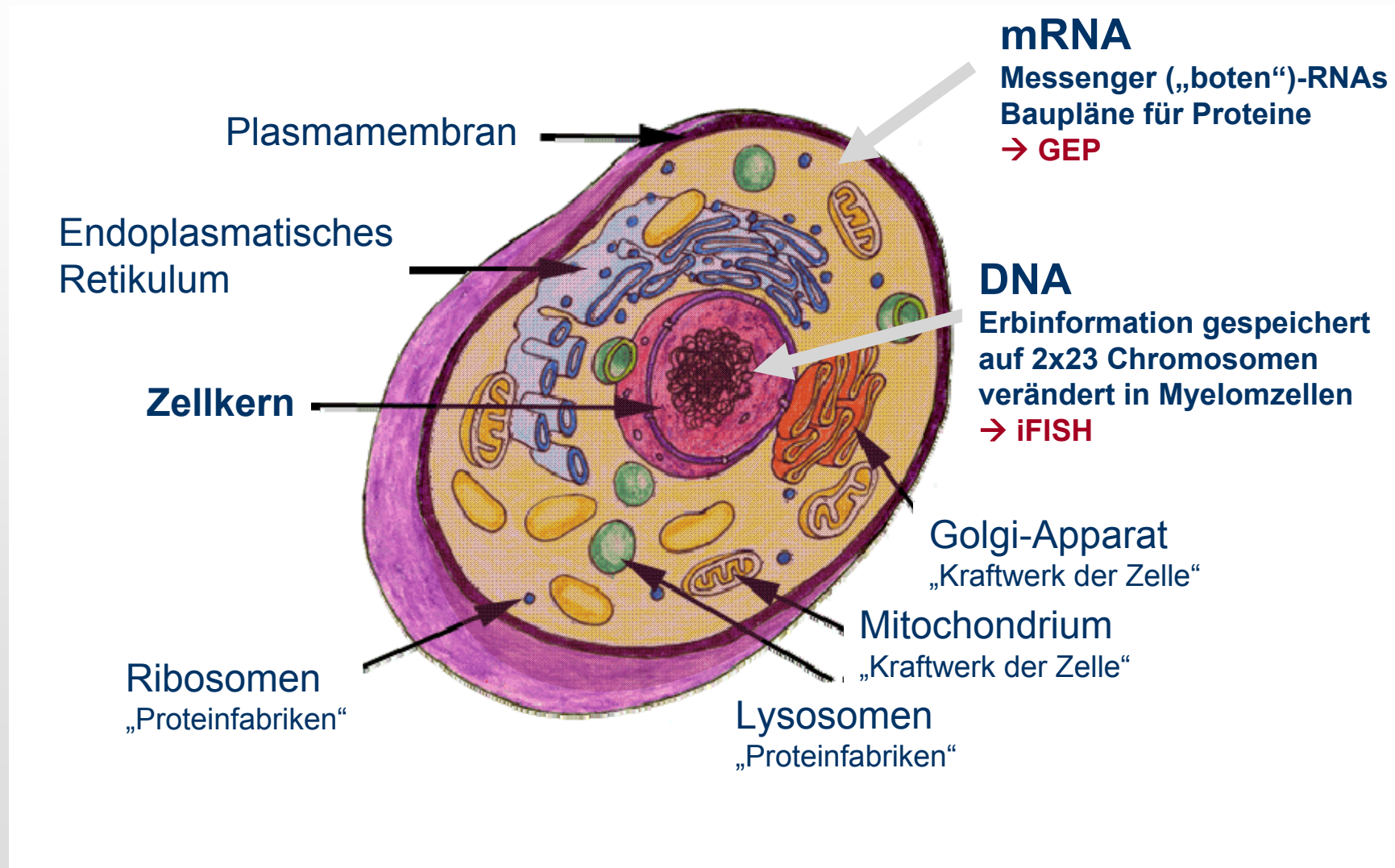


3,8% CD138+



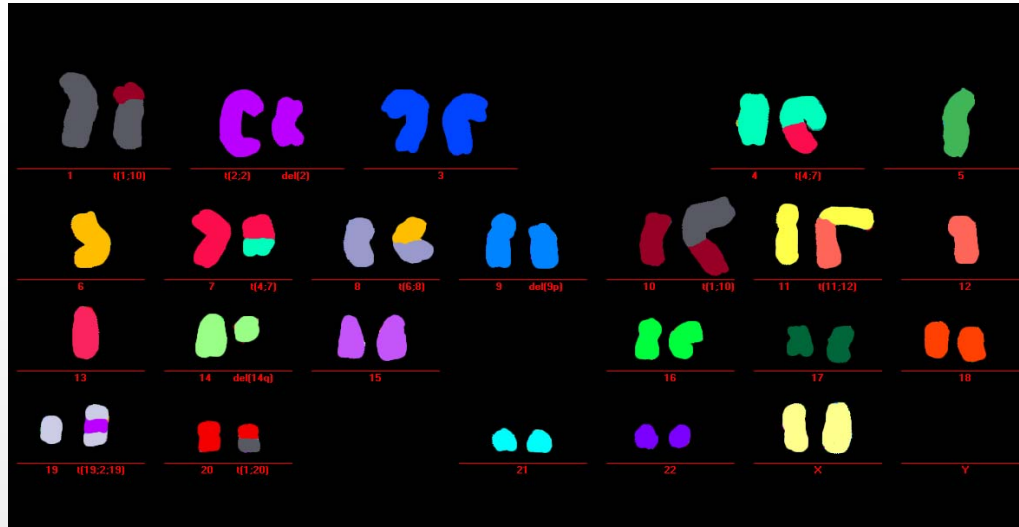
97,2% CD138+

(Myelom)-Zelle

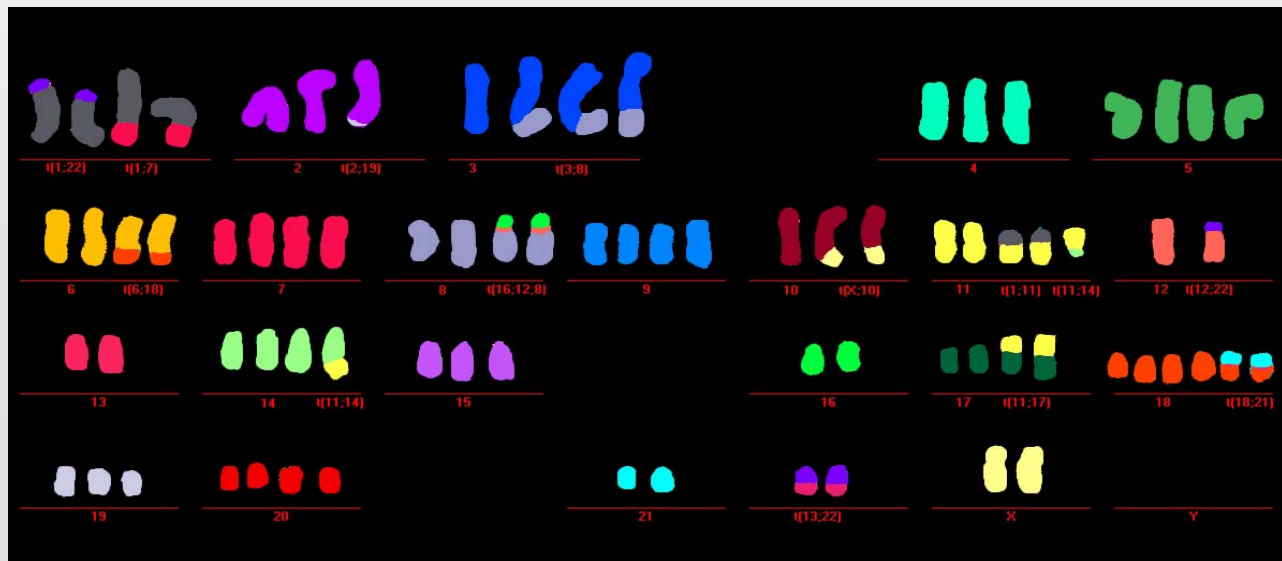


B iFISH

Veränderte Chromosomen in Myelomzellen

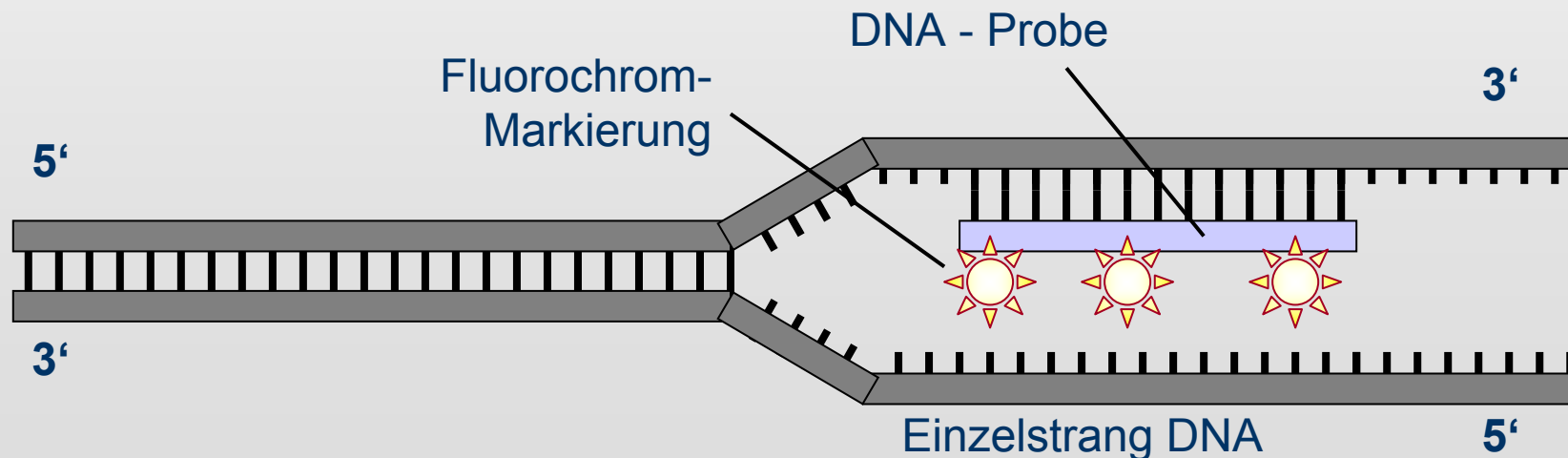


Multicolor FISH



iFISH - Prinzip

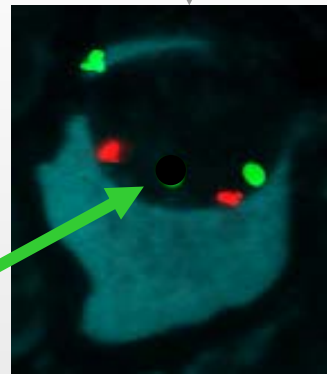
- **iFISH = interphase fluorescence in situ hybridization**
- **In situ = „on slide“ = auf dem Objektträger**
- **dort: Denaturierung (Aufspaltung) der ds-DNA**
- **Hybridierung mit der interessierenden Region mit einer für diese spezifischen „DNA-Probe“, die mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt ist.**
- **Detektion mittels Fluoreszenz Mikroskopie**



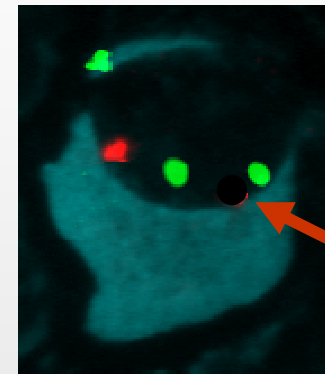
iFISH - Wie sieht das Ergebnis aus?

Normal: 2 homologe Chromosomen → 2 Spots

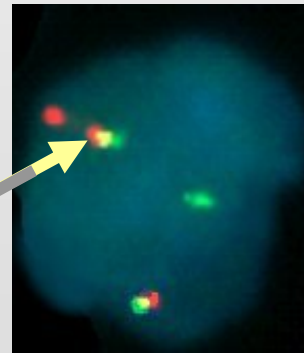
Zusätzliche
Kopie 11q13



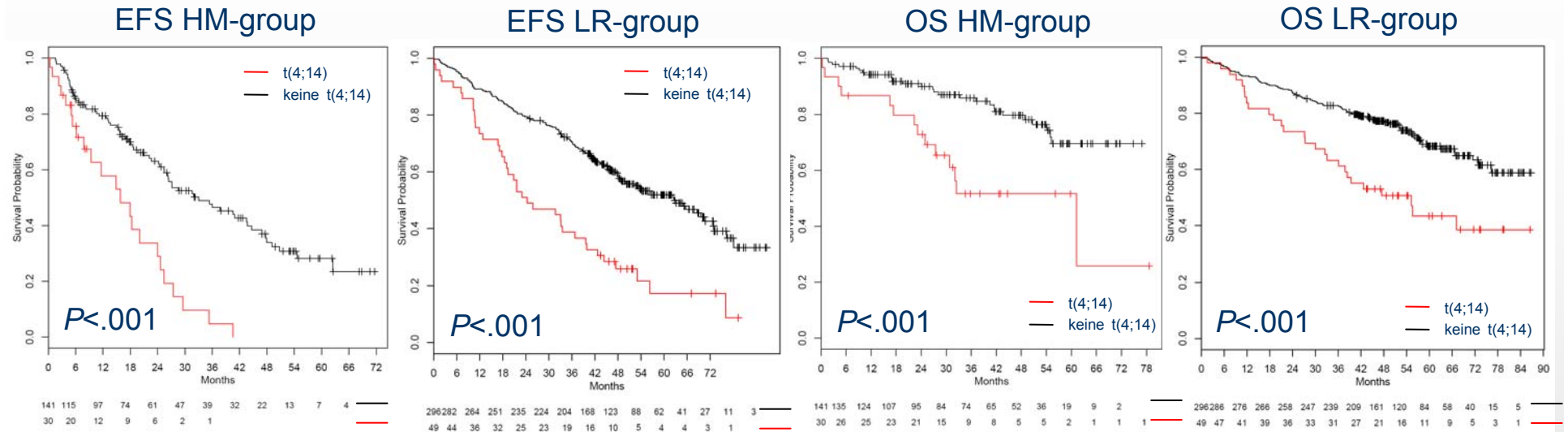
Deletion
14q32



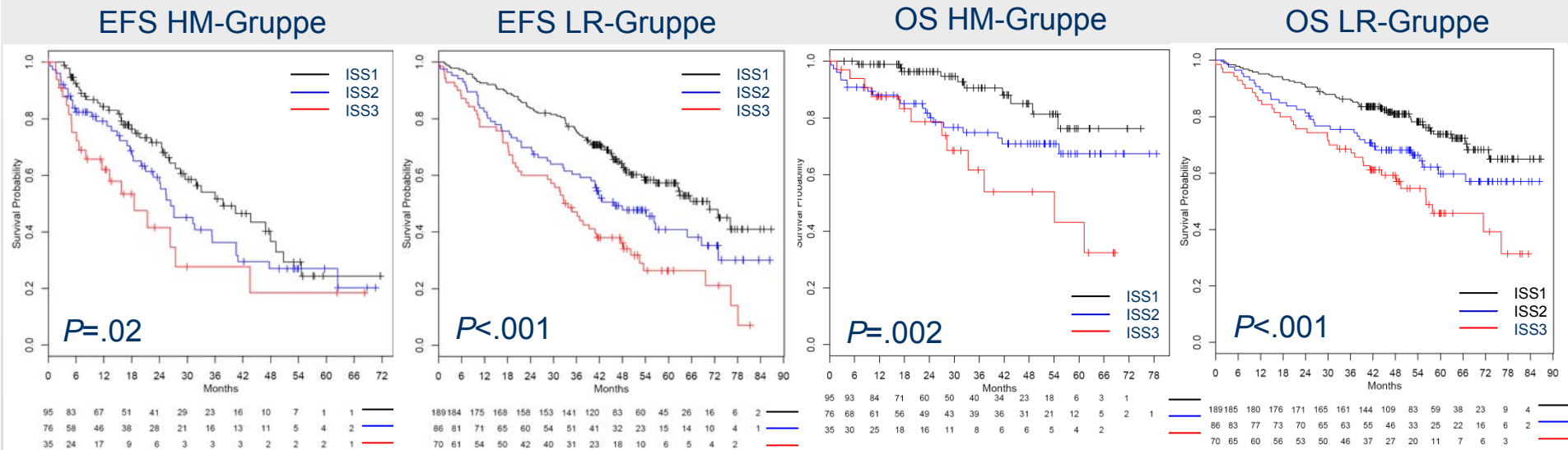
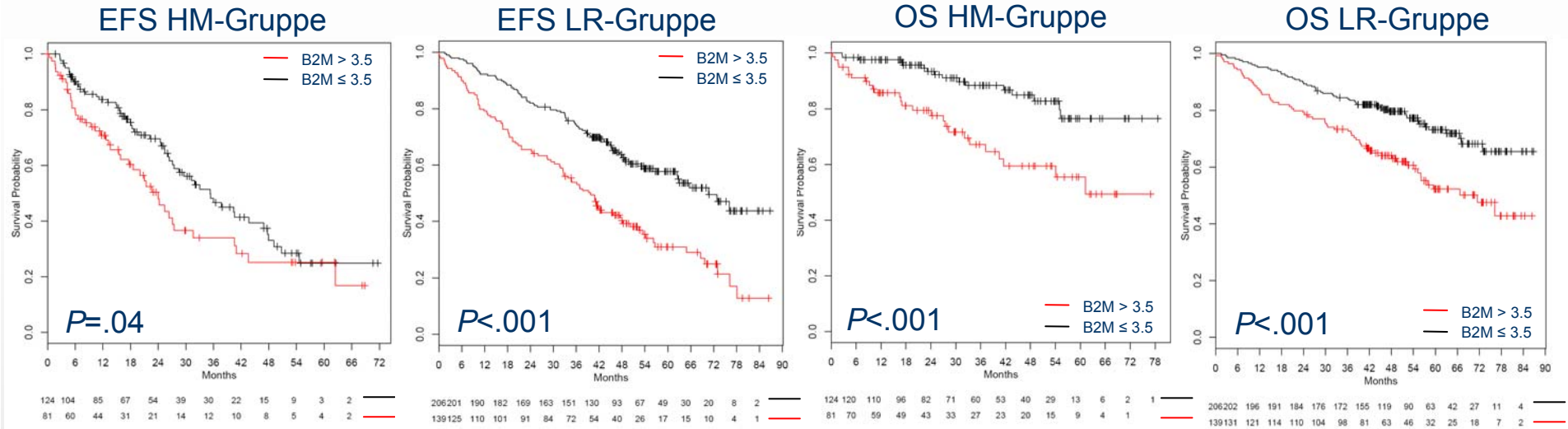
Translokation
t(11;14)



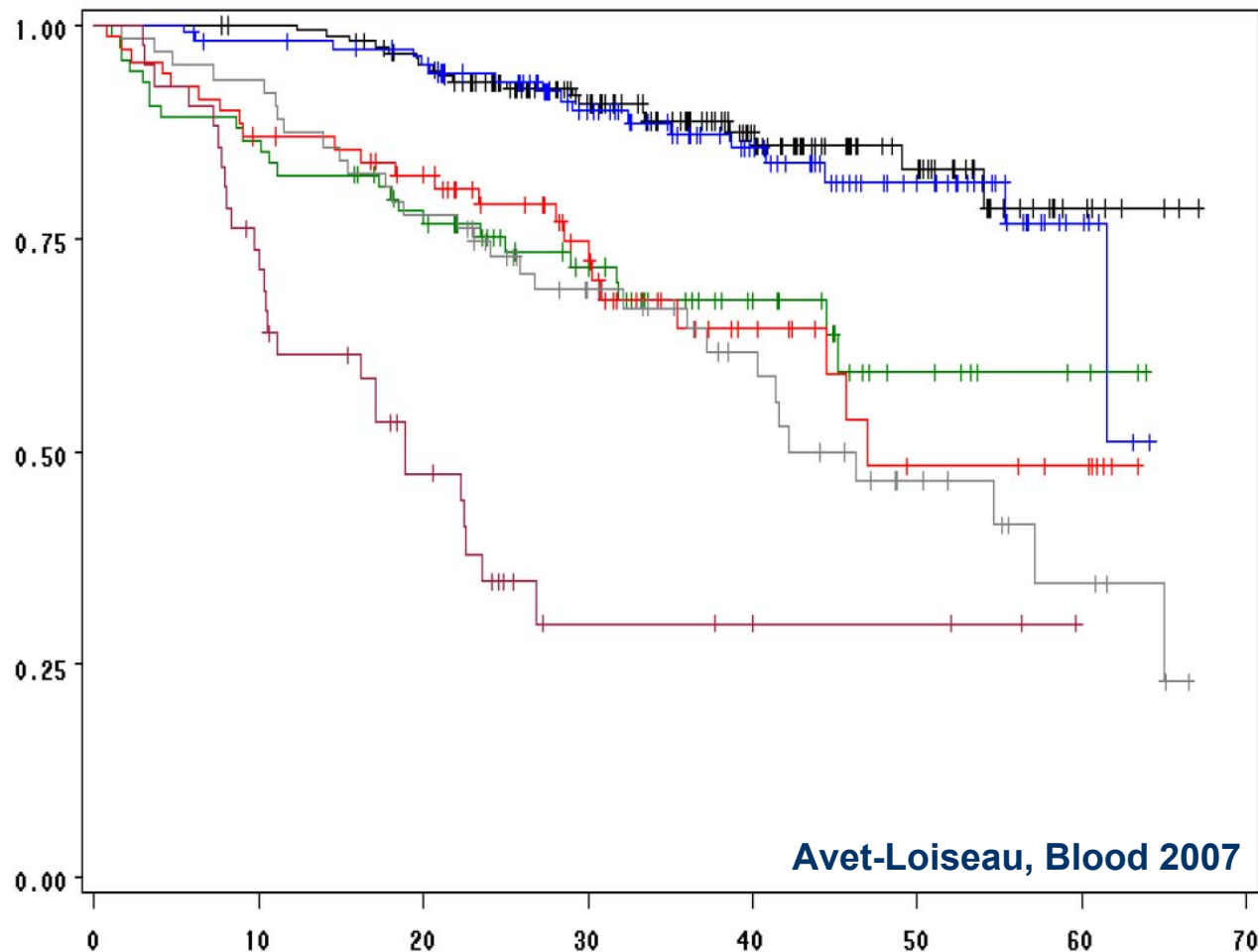
iFISH: t(4;14) & Prognose



Konventionelle Faktoren: B2M und ISS



Metascore: t(4;14), del17p, del13q und B2M



Mehrere prognostische Faktoren
- Wie ist nun die Prognose?

Metascore (Zusammenfassung
unterschiedlicher prognostischer
Informationen)

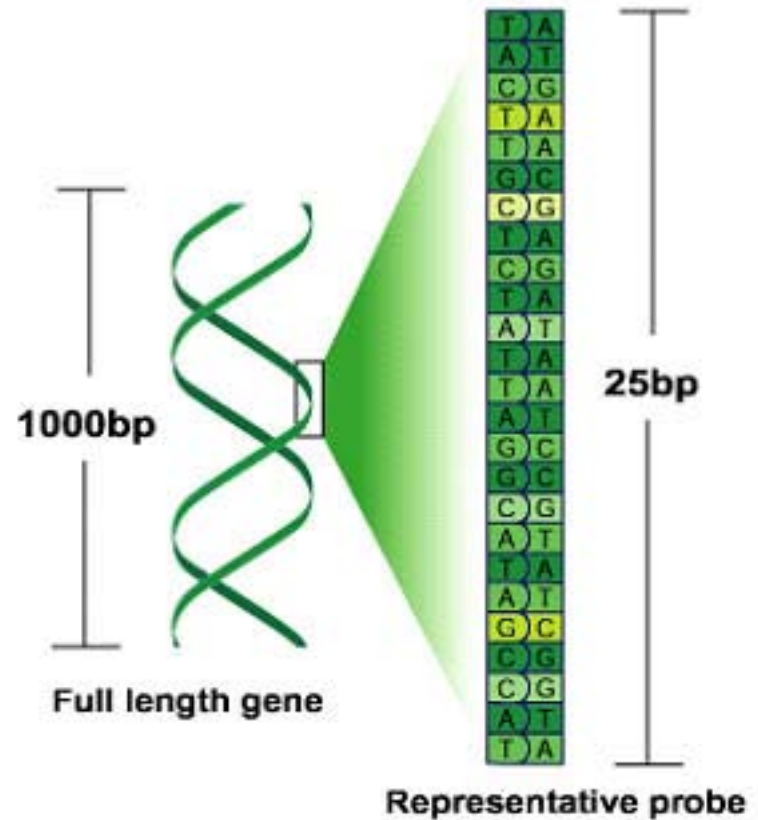
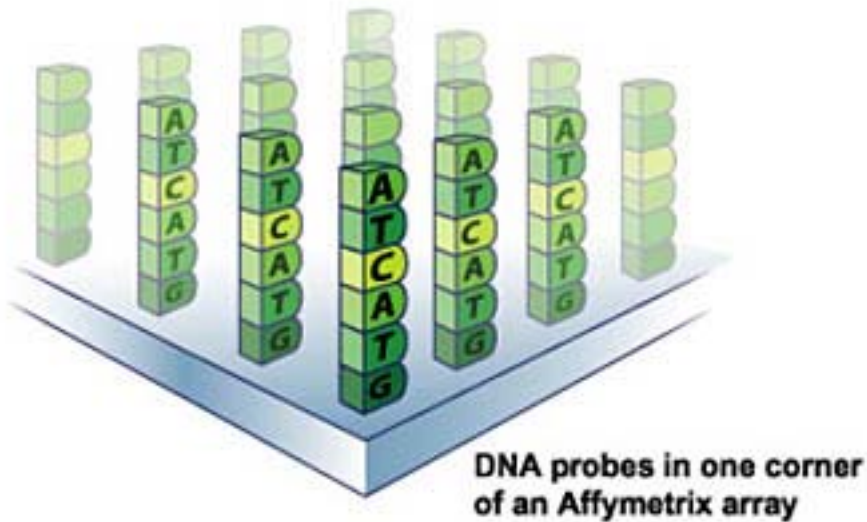
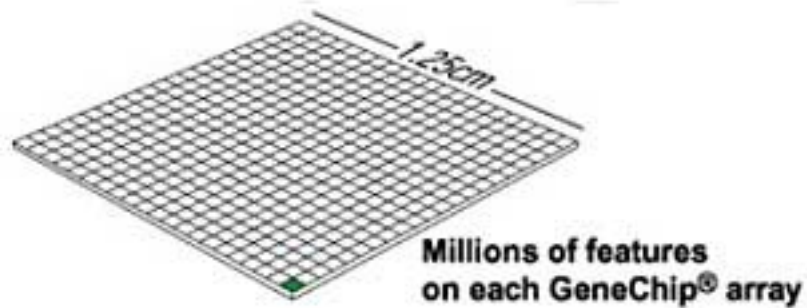
Schwarz 155 Patienten ohne del(13), t(4;14), del(17p), mit $\beta 2$ -Mikroglobulin < 4 mg/l. **Grün** mit $\beta 2$ -Mikroglobulin > 4 mg/l. **Blau** Patienten ohne t(4;14), del(17p), mit $\beta 2$ -Mikroglobulin < 4 mg/l, aber del(13). **Rot** 69 Patienten ohne t(4;14) oder del(17p), hohes $\beta 2$ -Mikroglobulin, und del(13). **Grau** 63 Patienten mit t(4;14) oder a del(17p) und niedrigem $\beta 2$ -Mikroglobulin. **Pink** 42 Patienten mit t(4;14) oder del(17p), und hohem $\beta 2$ -Mikroglobulin.



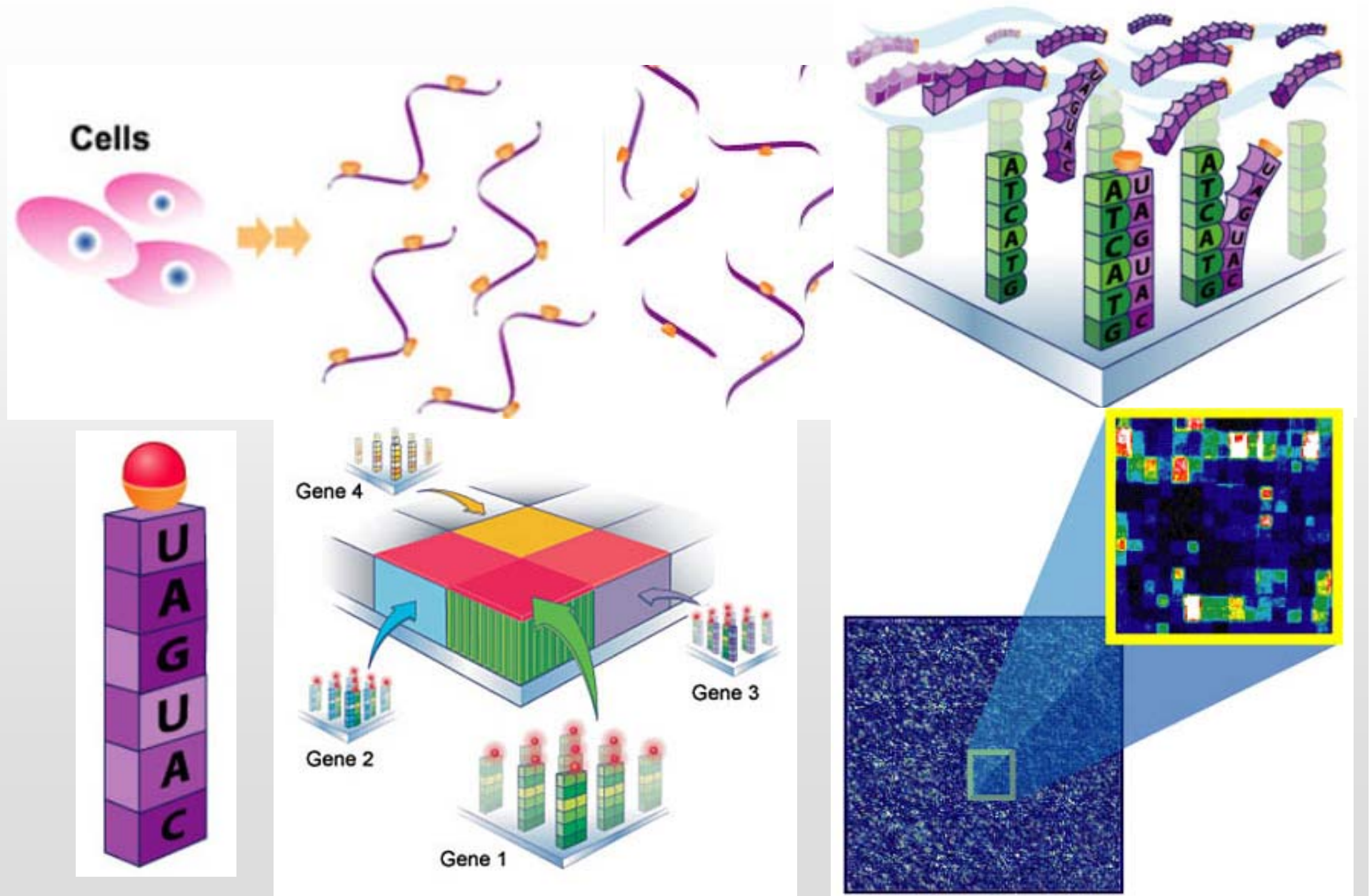
Global Expression Profiling (GEP)



„DNA-microarrays“ – Wie funktioniert das?

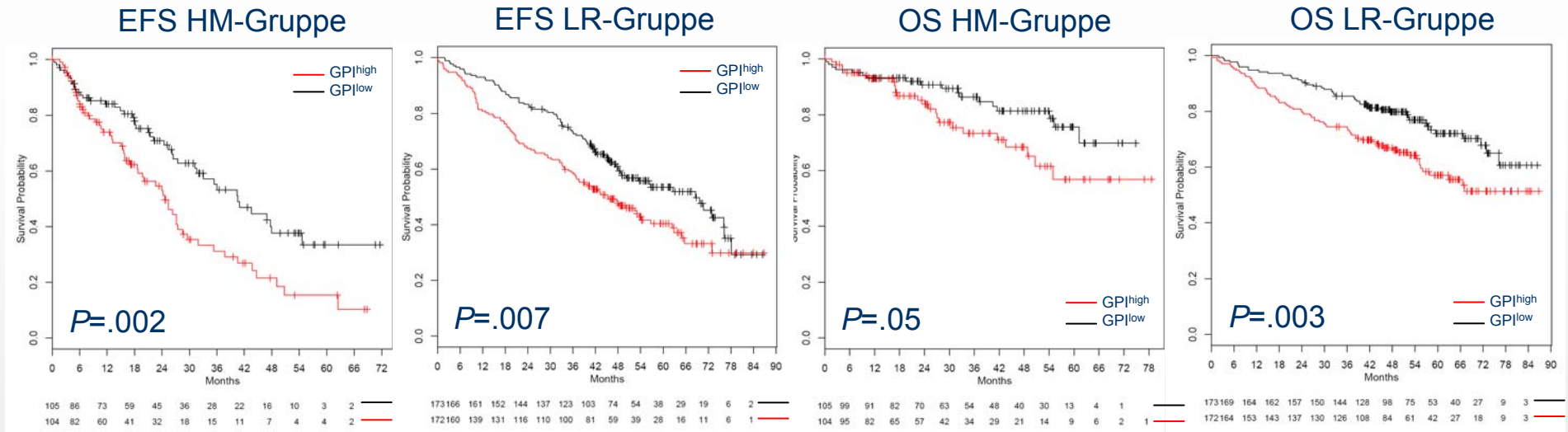


„DNA-microarrays“ – Wie funktioniert das?

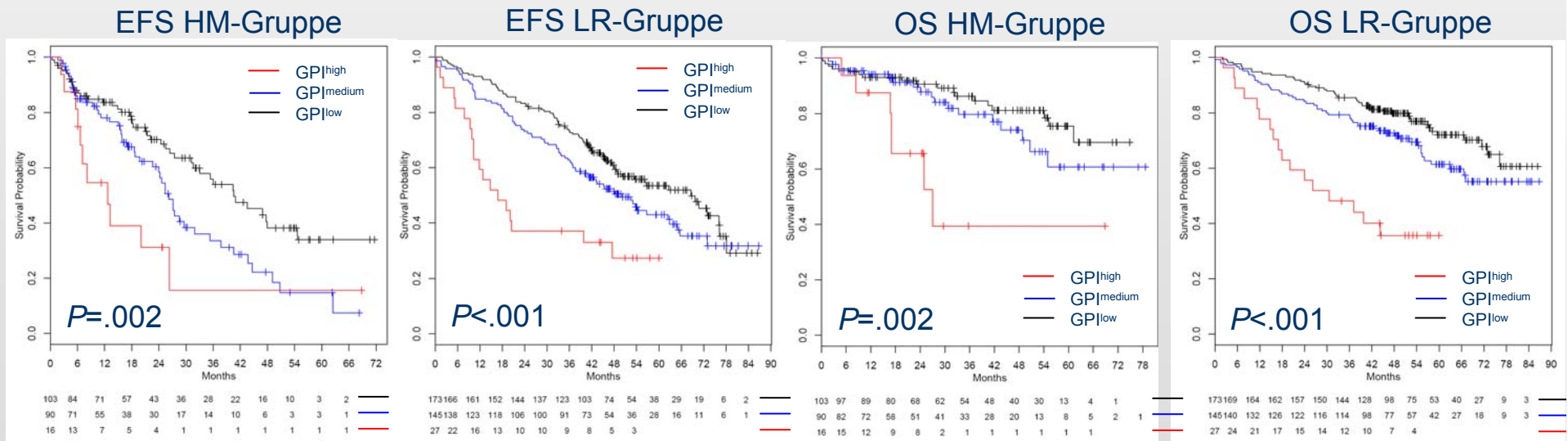


GEP: Proliferation & Prognose

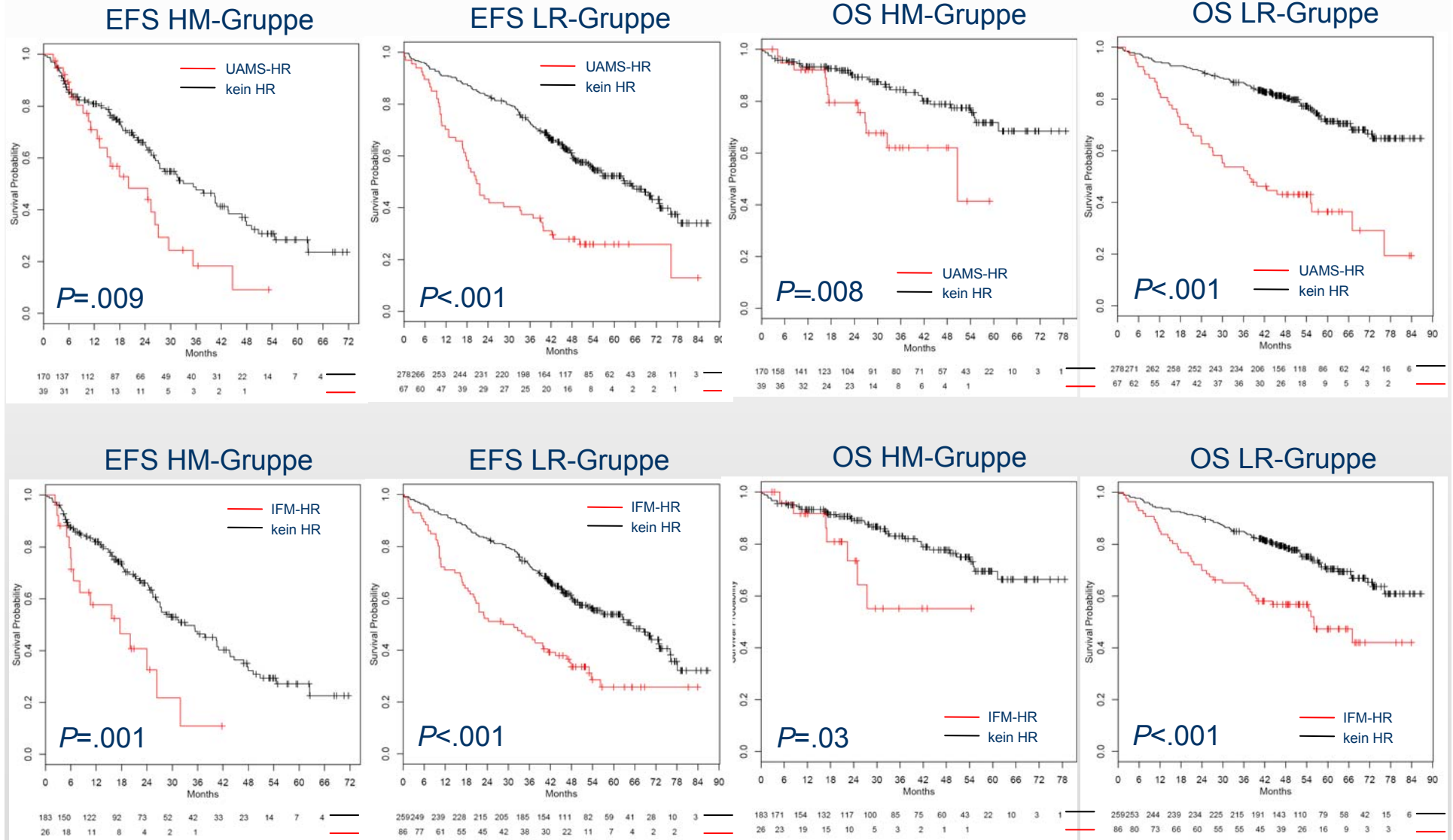
A



B

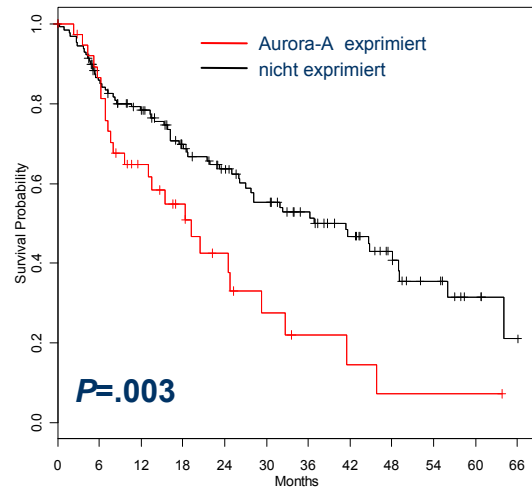


GEP: GEP-Hochrisiko-Scores & Prognose



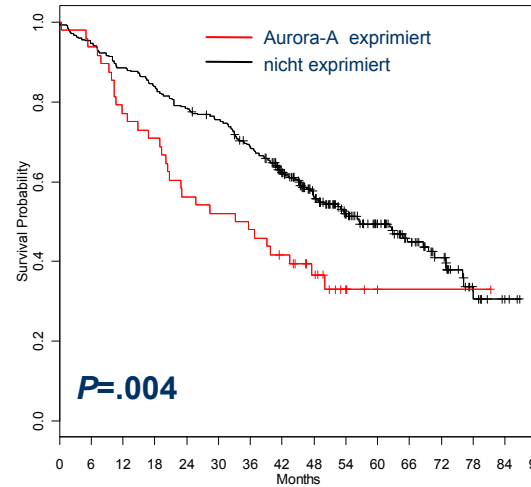
GEP: Aurora-kinase Expression & Prognose

EFS HM-Gruppe



129	105	89	69	57	47	38	29	18	11	5	1	0
39	32	20	14	9	5	3	2	1	1	1	1	1

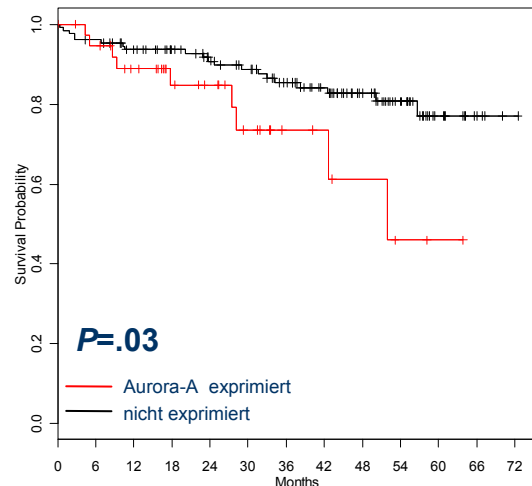
EFS LR-Gruppe



297	281	263	249	233	222	200	165	120	87	65	44	29	11	3
48	45	37	34	27	25	23	19	13	6	1	1	1	1	1

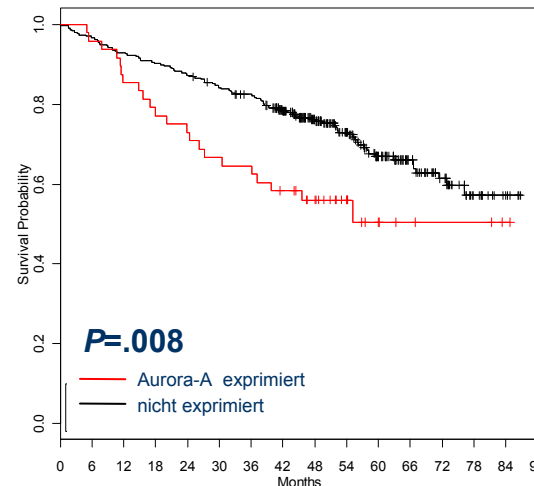
**Aurora-Kinase A →
Therapeutisches Target und
prognostischer Faktor**

OS HM-Gruppe



129	122	113	102	92	85	73	60	44	30	13	5	1	0
39	35	29	21	18	12	7	6	4	2	1			1

OS LR-Gruppe

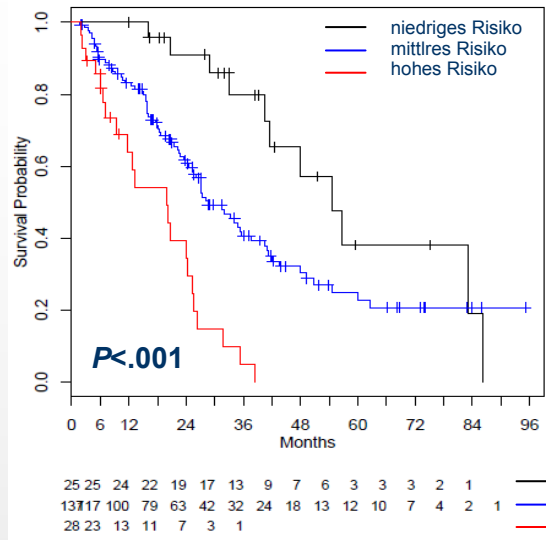


297	287	276	268	259	248	239	209	160	122	89	63	42	15	5
48	46	41	37	35	32	31	27	22	14	6	4	3	3	1

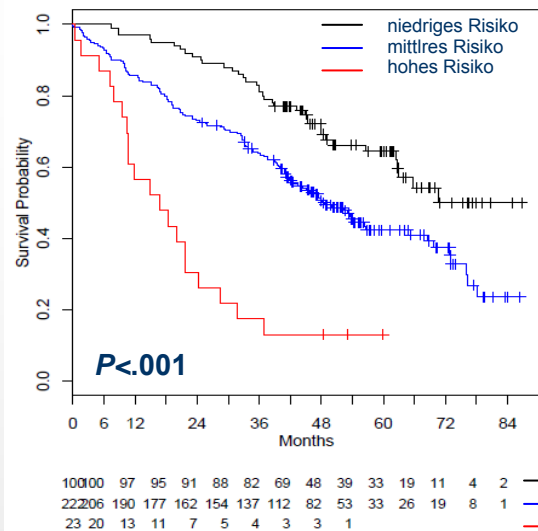
Hose et al. Blood, 2009

GEP: Meta-Score (HM-score)

EFS HM-Gruppe



EFS LR-Gruppe

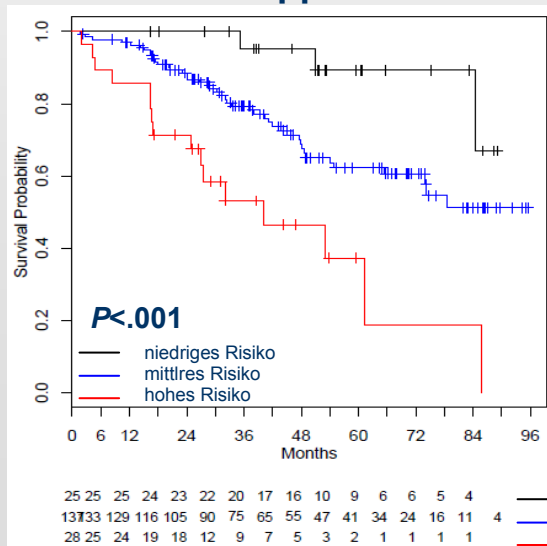


Viele prognostische Faktoren
- Wie ist nun die Prognose?

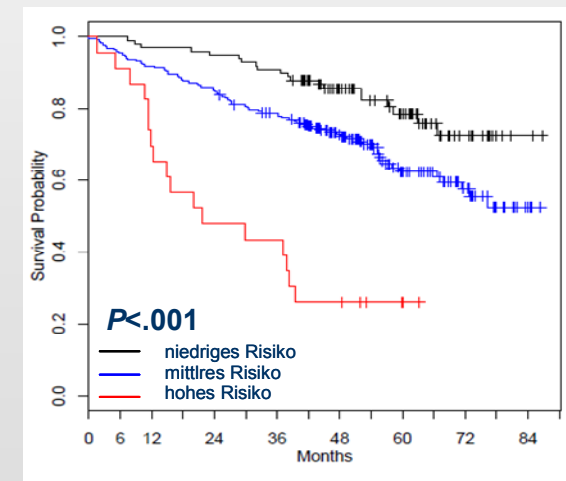
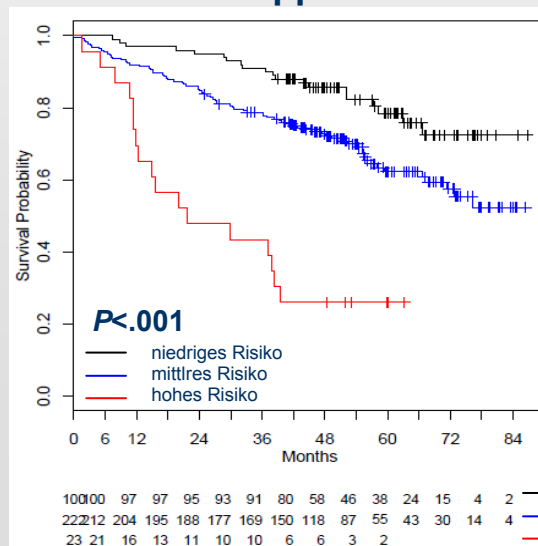
Metascore (Zusammenfassung unterschiedlicher prognostischer Informationen)

Genexpressionsbefund (Enthält GEP und metascore-Information)

OS HM-Gruppe



OS LR-Gruppe



GEP: Genexpressionsbefund



UniversitätsKlinikum Heidelberg

Universitätsklinikum Heidelberg | INF 410 | 69120 Heidelberg

An Herrn
Dr. Gregory House
Med. Klinik V
INF 410
69120 Heidelberg

Medizinische Klinik V
(Schwerpunkte: Hämatologie,
Onkologie und Rheumatologie)

Ärztlicher Direktor:
Prof. Dr. med. Anthony D. Ho
Tel. +49 (0) 6221-56 8001
Fax +49 (0) 6221-56 5813

Leiter der Sektion Multiples Myelom:
Prof. Dr. med. Hartmut Goldschmidt
Tel. +49 (0) 6221-56 8003
Fax +49 (0) 6221-56 5647
hartmut.goldschmidt@med.uni-
heidelberg.de

Leiter Labor für Myelomforschung:
Dr. med. Dipl. phys. Dirk Hose
Tel. +49 (0) 6221-56 6140
Fax +49 (0) 6221-56 6238
dirk.hose@med.uni-heidelberg.de

Genexpressionsbefund (GEP-R)

Name: Frau Anasthasia Muster, *21.07.1959
Adresse: Czerny Str. 123, 69120 Heidelberg

Klinische Diagnose: Multiple Myeloma Salmon-Durie Stadium: IIIA
Datum der Erstdiagnose: Mai 2010
Klinische Daten: IgH-type: G IgL-type: kappa

Datum der Probenentnahme (KM):	20.07.2010
Probenvolumen:	60 ml
CD-138 Anreicherung (autoMACS):	posseld2
CD-138 Reinheit (flow cytometry):	98.04 %
CD-138 Reinheit (iFISH):	NA %
Menge der zur Analyse verwendeten RNA:	NA ng
Array-Typ:	Affymetrix U133 plus 2.0
Anzahl analysierter Probesets:	54675
Anzahl analysierter Gene und EST:	ca. 39 000
RNA Amplifikations / Markierungs-Protokoll:	double amplification
Normalisierung:	GC-RMA

Im Neuenheimer Feld 410
69120 Heidelberg

www.klinikum.uni-heidelberg.de



2

Befund

1. Qualitätskontrolle bestanden.
2. Identitätskontrolle bestanden.
3. Gene über- oder aberrant exprimiert
TP53 (aberrant), Zyklin D1 (aberrant), HM1.24 (überexprimiert), MUC1 (aberrant), Aurora-Kinase A (aberrant), IGF1R (aberrant)
4. Klassifikationen
Molekulare Klassifikation (UAMS): PR TC-Klassifikation (Bergsagel et al.): 4p16 EC-Klassifikation (Hose et al.): EC11
5. Risikoklassifizierungen
IFM: Hochrisiko UAMS: Hochrisiko GPI: Hochrisiko.
6. Zielantigene für Immuntherapie
Expression von HM1.24 und MUC1
7. Zielantigene für gruppenspezifische Therapie
Expression von Aurora-Kinase A, FGFR3, IGF1R
8. Chromosomale Aberrationen
Keine Translokation t(4;14)

Beurteilung

Genexpressionsbasierte Risikostratifikation. Der 70-Gen Score der UAMS identifiziert 10-15% der Patienten als Hochrisiko (Shaughnessy et al. 2007); der IFM-Score 25% (Decaux et al. 2007) und der genexpressionsbasierte Proliferationsindex 42% als von mittlerem und 8% als von hohem Risiko (Hose et al. 2010). Zusammengefasst ergibt die genexpressionsbasierte Klassifikation eine Hochrisikosituation für Frau Muster. Maligne Plasmazellen von Frau Muster exprimieren Aurora-Kinase A und IGF1R die alle mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind (Hose et al. 2009, Sprynski et al. 2009).

Zusammengefasst (Metascore) ergibt sich unter Einbeziehung des Fehlens einer Translokation t(4;14) und des ISS-Stadiums ein mittleres Risiko.

Zielstrukturen für Immuntherapie. Sog. „Cancer-testis-antigens“ sind häufig auf malignen Plasmazellen aberrant oder überexprimiert. Von den untersuchten Antigenen CTAG1, HM1.24, MAGEA1, MAGEA3, MUC1 und SSX2 werden HM1.24 und MUC1 exprimiert.

Zielstrukturen für individualisierte Therapie. Abhängig von der klinischen Situation und dem Therapieansprechen kann eine zusätzliche Behandlung mit Aurora-Kinase Inhibitoren bzw. IGF1R-Inhibitoren erwogen werden.

Prof. Dr. med. H. Goldschmidt
Leiter, Sektion Multiples Myelom

Dr. med. Dipl. phys. D. Hose
Leiter, Labor für Myelomforschung

www.med.uni-heidelberg.de



Zusammenfassung



Molekulare-Diagnostik – Warum?



■ Prognose

- **iFISH** (t(4;14), del17p)
- **Globale Genexpressionsanalysen „GEP“** (Microarrays)
 - Proliferation (Genexpressions-basiert)
 - Risiko-Score (UAMS, IFM)
 - prognostisch relevante Gene (Aurora-kinase, IGF1R)

■ Klinische Konsequenz

- **iFISH**: t(4;14) → Chemotherapie + Bortezomib (Lenalidomid)
- **GEP**: UAMS-Niedrigrisiko und del17p → TT3 (Einzelfall)
- Riskoadaptierte Therapie (Zukunft)
- personalisierte Therapie z.B. Aurora-Kinase (Zukunft)

■ Wissenschaftliche Fragestellungen

- Pathogenese des Myeloms
- Neue therapeutische Zielstrukturen

Merci bien! Vielen Dank!



UK Heidelberg

**D. Hose
A. Seckinger
T. Meißner
K. Heimlich
G. Hoock
M. Dörner
A. Herm-Götz
T. Oberle
M. Heintz
J. Schlenzka
K. Neben
U. Bertsch
H. Goldschmidt**



**Biostatistics
Bioinformatics**

**A. Benner
T. Hielscher
C. Heiß
L. Edler**

iFISH



**I. Buck
A. Möbus
H. Holtgreve
B. Schöll
M. Brough
A. Jauch**



UAMS

**B. Barlogie
J. Shaughness**



Montpellier

**K. Mahtouk
J. Moreaux
M. Condomines
V. Pantesco
T. Rème
J.F. Rossi
B. Klein**



Montpellier

**J. DeVos
J.F. Rossi**



**J. Zimmermann
V. Benes
J. Lewis
J. Blake**