

Pathologe
DOI 10.1007/s00292-015-0067-2

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015



W. Dietmaier¹ · W. Weichert² · C. Wickenhauser³ · U. Lehmann⁴

¹ Institut für Pathologie, Universität Regensburg, Regensburg, Deutschland

² Institut für Pathologie, Technische Universität München, München, Deutschland

³ Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Halle (Saale), Halle (Saale), Deutschland

⁴ Institut für Pathologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

Bericht über die Sitzungen und Mitgliederversammlung der AG Molekularpathologie

Neben der Mitgliederversammlung fanden im Rahmen der DGP-Tagung drei Sitzungen der AG Molekularpathologie statt, in denen insgesamt 20 Vorträge, 25 Poster, zwei „What’s New-Vorträge“ und eine Zusammenfassung der Posterpräsentationen präsentiert wurden.

Der erste „What’s New-Vortrag“ wurde in der ersten Sitzung gehalten und behandelte das Thema „Epigenetik in der Pathologie und Molekularen Diagnostik“ (U. Lehmann):

Unter dem Begriff „Epigenetik“ werden diejenigen Phänomene und molekularen Mechanismen zusammengefasst, die die Genexpression (und damit die Identität und den Aktivitätszustand) einer Zelle stabil und vererbbar modifizieren, ohne mit Veränderungen der primären DNA-Sequenz im Sinne einer Mutation verbunden zu sein. Bekannte physiologische epigenetische Phänomene sind die Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms in weiblichen Körperzellen und das Imprinting; molekulare Mechanismen, die dafür u. a. verantwortlich sind, sind die DNA-Methylierung und Histonmodifikationen sowie nicht-kodierende RNA-Moleküle mit regulatorischer Funktion (z. B. microRNA).

Eingang in die Routinediagnostik hat bereits die Analyse der DNA-Methylierung des Reparaturgens *hMLH1* gefunden zur Unterscheidung einer somatischen epigenetischen Inaktivierung in den Tumorzellen von einer Keimbahnmutation als Ursache des Expressionsverlusts von *hMLH1* im kolorektalen Karzinom und Endometriumkarzinom (Ausschluss von bzw. Hinweis auf Lynch-Syndrom).

In den letzten Jahren hat eine ungeheure Weiterentwicklung der Methoden zum Nachweis epigenetischer Veränderungen in menschlichen Zellen stattgefunden, so dass inzwischen das DNA-Methylierungsmuster des ganzen Genoms hochauflösend und quantitativ erfasst werden kann, allerdings mit erheblichem technischen, finanziellen und biomathematischen Aufwand. Von diesen technischen Innovationen hat deshalb bisher nur an spezialisierten Zentren der Einsatz des 450-k-Methylierungsarrays der Firma Illumina Eingang in die Routinediagnostik zur Klassifizierung von Gehirntumoren gefunden.

Trotz zahlreicher vielversprechender Kandidaten, die z. T. sogar bereits vermarktet werden, hat sich noch kein Methylierungsmarker in der molekularen Routinediagnostik durchgesetzt. Zu viele Fragen bezüglich Sensitivität, Spezifität, Kosten und Nutzen sind noch nicht abschließend beantwortet.

Die 2009 beschriebene (Wieder)entdeckung der 6. DNA-Base Hydroxymethylcytosin hat unser Bild der epigenetischen Modifikation des menschlichen Genoms deutlich bereichert und vertieft. Allerdings fehlen noch kostengünstige und robuste Verfahren zum Nachweis dieser Dann-Modifikation in Patientenproben (sei es nun genomweit oder lokusspezifisch), so dass noch nicht abzusehen ist, wann dieser Biomarker eine Anwendung in der Diagnostik finden wird.

Die Mutationsanalyse „epigenetischer Gene“, d. h. von Genen, deren Produkte in DNA-Methylierung und Chromatinmodifikationen involviert sind (wie z. B. *TET2*, *DNMT3 A* und *EZH2*), kommt

in der spezialisierten hämatopathologischen Diagnostik bereits routinemäßig zum Einsatz, lässt sich aber nur mit neuen Hochdurchsatzsequenzieransätzen „der nächsten Generation“ („next generation sequencing“) realisieren, da keine fokussierten Regionen mit hoher Mutationsfrequenz („hot spots of mutation“) in diesen Genen existieren. Im Gegensatz dazu lassen sich die allermeisten Mutationen im Histonvariantengen *H3F3 A*, welches für die präzise Diagnose pädiatrischer Gehirntumoren wichtig ist, mit einem einfachen Pyrosequenzierungsassay zuverlässig erfassen.

Zu der seit Jahrzehnten diskutierten Frage, ob epigenetische Aberrationen nur Folge genetischer Veränderungen sind oder selbst primär kausal Krebs verursachen können, bestätigen neueste Arbeiten unterschiedliche Modelle: In experimentellen Systemen der chronischen myeloischen Leukämie (CML) oder von Gehirntumoren induzieren genetische Läsionen epigenetische Veränderungen, während eine experimentell induzierte Hypermethylierung des Zellzyklusregulatorgens *p16^{INK4A}* in Versuchstieren primär kausal tumorigen wirken kann. Abhängig vom zellulären Kontext und der Erkrankung beschreiben also beide Szenarien wahrscheinlich komplementäre Aspekte der Tumorbiologie.

Ob die in eukaryoten Modellorganismen wie z. B. *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila* jüngst nachgewiesene DNA-Modifikation Methyladenosin auch in menschlichen Zellen eine Rolle spielt, muss noch erforscht werden.

Inhibitoren von Enzymen, die DNA methylieren oder Histone modifizieren (Acetylasen, Methylasen u. a.) haben schon Eingang in die klinische Praxis gefunden (zugelassenen Präparate: Vidaza, Decitabine, Vorinostat, Panobinostat). Insbesondere Fragen der langfristig auftretenden unerwünschten Nebenwirkungen sind aber noch ungeklärt. Wegen der deutlich verzögerten Wirksamkeit dieser Medikamente sind sie für den akuten Einsatz (fortgeschrittene Leukämie oder hoch aggressiver Tumor) weniger geeignet.

Der zweite „What’s New-Vortrag“ wurde im Rahmen der zweiten AG-Sitzung gehalten und befasste sich mit einem weiteren aktuellen Thema „Der individuelle Patient“ (W. Weichert):

Die molekulare Ursache für Tumorerkrankungen ist molekular von Patient zu Patient oft sehr unterschiedlich. Sie kann u. a. auf verschiedene Mutationen, Translokationen, Kopienzahlveränderungen oder epigenetische Veränderungen im Erbgut – oft in Kombination – zurückgehen. Eine Entwicklung hin zu einer umfassenden molekularen Charakterisierung jedes Patienten erlaubt inzwischen einen Einblick in dieses individuelle Geschehen, und immer öfter auch eine individuell zusammengestellte Therapie, mit optimalem Nutzen und minimierten Nebenwirkungen. Gerade im Hinblick darauf, dass derzeit zunehmend Wirkstoffe auf den Markt kommen, die sich zielgenau gegen bestimmte Veränderungen in Tumorzellen richten, die durch genomische Alterationen ausgelöst werden, erlaubt eine Kenntnis dieser Veränderungen prinzipiell zielgerichtete Therapieansätze.

Darüber hinaus lassen neue technische Entwicklungen in der Sequenzierung die Kosten der Charakterisierung eines ganzen Exoms/Genoms fallen und rücken eine solche Analytik zunehmend in das Blickfeld der klinischen Diagnostik. Zwar ist der Weg bis zu einer flächendeckenden Anwendung in der klinischen Praxis noch weit, jedoch ist eine Erforschung der Möglichkeiten und Grenzen einer umfassenden Hochdurchsatzsequenzierung in der unmittelbaren klinischen Anwendung sinnvoll und notwendig. Aus diesem Grund wurden am Nationalen Zentrum für Tumorerkrankungen (NCT) in Heidelberg ein NCT-MASTER benann-

tes Programm zur Exom- und Transkriptomsequenzierung individueller Patienten etabliert, welches zum Ziel hat auf der Basis von Hochdurchsatzdaten bei Tumorpatienten ohne verbliebene etablierte therapeutische Alternativen Ansatzpunkte für zielgerichtete Therapien aufzuzeigen. Eingeschlossen werden in diesem Programm insbesondere junge Patienten, sowie Patienten mit unerklärlicher Krankheitsbeschleunigung und Patienten mit überraschend erfolgreichem Therapieansprechen. In dieses Programm wurden mittlerweile mehr als 300 Patienten aus ganz Deutschland inkludiert. Für das Programm wurde ein kompletter paralleler Workflow von Gewebeentnahme, histologischer Beurteilung des Kryomaterials, Exom- und Transkriptomsequenzierung, bioinformatischer Auswertung, molekularpathologischer Validierung und onkologisch-translationaler Interpretation am Standort etabliert. Ein regelmäßiges molekulares Tumorboard am NCT dient schließlich dazu, den einzelnen Patienten abschließend in Zusammenschau aller Daten nochmals zu würdigen. Das Board ist interdisziplinär besetzt und bringt so die Expertise der Kliniker, Pathologen, Wissenschaftler, Ethiker, Bioinformatiker und Sequenzierspezialisten zusammen. In >50 % der Fälle wird auf Basis der molekularen Daten im Tumorboard eine Therapieempfehlung ausgesprochen, eine tatsächliche Behandlung in diesem Sinne erfolgt allerdings zurzeit nur in knapp 20 % der Fälle. Eine Erhöhung dieser Prozentzahl, gegebenenfalls über eine Erhöhung der Anzahl von Patienten, die auch in moderne stratifizierende molekulare Studien eingeschlossen werden, sowie auch eine Erhöhung des Patientendurchsatzes sind Nahziele, die verwirklicht werden sollen. „Erfolgreich“ behandelte Patienten sollen als „Signal/Signatur“ genutzt werden, um in den entsprechenden Entitäten sowohl quantitativ-phänomenologisch als auch funktionell nach einer Generalisierbarkeit der gesehenen Effekte zu forschen.

Abschließend bleibt zu sagen, dass derartige moderne, jedoch relativ kosten- und ressourcenintensive molekulare Patientenstratifizierungsprogramme sicherlich nicht zeitnah deutschlandweit in die breite Routineanwendung in der Onkologie überführt werden können, dass der-

artige moderne „experimentelle“ Therapiestrategien jedoch als Leuchtturmprogramm an selektierten Zentren ausgebaut werden sollten.

Neben den „What’s New-Vorträgen“ fanden auch die regulären Vorträge ein breites Interesse.

Die **erste AG-Sitzung** begann mit einem Vortrag von C. Wickenhauser (Halle), die über Exon-6-Skipping der MD-MX-pre-mRNA in Ovarialkarzinomzellen berichtete. F. Hildebrandt (Göttingen) zeigte molekulare Daten zu FGFR1-4-Rezeptoren beim Thymuskarzinom (keine aktivierende Genmutationen, seltene Genamplifikation); E.E. Holmes (Bonn) präsentierte Daten zur DNA-Methylierung von Homeobox-Genen bei Kopf-/Halstumoren (prognostisch günstiger Marker); N. Sojka (Göttingen) berichtete über Kinaseinhibitionsprofile für Sunitinib beim malignen Thymom und Thymuskarzinomen (bei Patientenproben Cluster mit zwei Gruppen: klinische Responder und Non-Responder; In-silico-Prädiktionsmodell: Schlüsselkinasen über Upstream-Kinasen-Analysen entscheidend); B. Benderska (Erlangen) zeigte interessante Daten zur miRNA-26b Expression beim kolorektalen Karzinom, UC-assoziierten- und sporadischen CRC. M. Ihle (Köln) zeigte einen KIT-mutationsunabhängigen Zusammenhang von miRNA-221- und -222-Expression und reduzierter Viabilität, induzierter Apoptose bei GIST mit Signaltransduktion unter Beteiligung von KIT, AKT und BCL2. K.-F. Becker (München) gab einen interessanten Bericht über den Weg von wissenschaftlichen Forschungsergebnissen bis hin zu ISO-Standards (relevant für z. B. Biobanken, Akkreditierung, molekulare Pathologie, Biomarkerentwicklung etc.) und ermutigte alle Kollegen, selbst auch an solchen Standardisierungsaktivitäten zu arbeiten. M. Jesinghaus (Heidelberg) zeigte Daten zu Mutationsanalysen (PGM-NGS, 30 Genanalysen) beim MSS-CRC und syn- und metachron auftretenden Metastasen. Hier zeigte sich eine hohe Konkordanz, die auf einen gemeinsamen Stamm von Primärtumor und Metastasen hinweist und Primärtumor oder Metastasen für Mutationsanalysen gleichermaßen geeignet darstellt. Das Thema NGS („next generation sequencing“) wurde auch von

M. Rechsteiner (Zürich) aufgegriffen, der Ergebnisse eines NGS-Ringversuchs darstellte (16 DNA-Proben als Ausgangsmaterial, Teilnehmer: 12× PGM, 1× IonProton, 2× MiSeq, verschiedene „cancer panels“, Auswertung von BAM-Files mit IonReporter4.2). Es zeigte sich eine hohe Übereinstimmung, aber auch wenige nicht erkannte Varianten (Sensitivität 95–100%). Abschließend folgte der „What’s New-Vortrag“ von U. Lehmann (s. oben).

Die zweite AG-Sitzung begann mit dem „What’s New-Vortrag“ von W. Weichert (s. oben). Anschließend berichtete N. Valtcheva (Zürich) über Mausmodellexperimente zur Untersuchung von Treibermutationen (NGS, 99 Gene) bei der Entwicklung vom Endometriumkarzinom. Hier zeigten sich keine gemeinsamen „single nucleotide variants“ (SNV), aber eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Deletionen, Insertionen und LOH-Ereignisse. T.P.G. Grünwald (Paris/München) zeigte anhand von Deep-sequencing-Daten vom EGR2-Lokus einen regulatorischen GG(A/T)T-SNP (flankiert von GGAA-Mikrosatelliten; A als Risikoallel), der zu einer erhöhten EWSR1-FLI1 abhängigen Enhanceraktivität und damit zu einer erhöhten EGR2-Expression beim Ewing-Sarkom führt.

Zu Beginn der dritten AG-Sitzung wurde in einem Poster-Review von C. Wickenhauser ein Überblick über die 24 präsentierten Poster, die aus 18 Standorten stammten, gegeben: 7 Beiträge befassten sich dabei mit rein methodischen Themen, 9 Arbeiten waren funktionell bzw. aus der Grundlagenforschung, 8 Poster hatten direkten klinischen Bezug. Das Spektrum der verwendeten Methoden war erwartungsgemäß sehr breit und umfasste „reverse phase protein array“, Immunhistochemie, In-silico-Datenanalysen, „next generation sequencing“ (3 Arbeiten aus 3 Instituten), Zellkultur/Transfektionen/Knockdown-Experimente, Zytotoxizitätsassays, FACS-Analysen („fluorescence activated cell sorter“), „western blot“, Immunpräzipitation, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), „scanner laser optical tomography“, „proximity ligation assay“ (PLA), Sanger-Sequenzierung, „vision array chip hybridization“, „DNA content based ploidy sorting“,

„high resolution cgh microarrays“ und Methylierungsanalysen.

Im Verlauf der dritten AG-Sitzung folgten interessante Vorträge zur Proteinanalytik von K.F. Becker, München („reverse phase protein array“), T. Gou, Zürich („pressure cycling technology-SWATH mass spectrometry“, ermöglicht quantitative Analyse einer sehr hohen Anzahl von Proteinen aus „Fresh-frozen-“ und FFPE-Biopsien), F. Klauschen, Berlin (NGS und Phosphoproteomics an Zellkulturen und „computer network modelling“ zur Vorhersage von Resistenzmechanismen und wirkungsvollen Kombinationstherapien) und U. Wagner, Zürich (SystemX-Project: integrativer Ansatz von Exom-/RNA-Sequenzierung, „copy number microarrays“, PCT-SWATH („pressure cycling technology coupled with sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra“) und Computerberechnung zur verbesserten Stratifizierung von Intermediate-grade-Prostatakarzinompatienten). Einen interessanten Ansatz zur Genkopienzahlbestimmung (CNV, Deletionen/Gains) an FFPE-Material auf Basis von NGS („ion torrent PGM“) und einem einfach ausführbaren Algorithmus stellte N. Pfarr, Heidelberg, vor. Beendet wurde die Vortragsreihe mit einem Beitrag von J. Budczies, Berlin, der einen neuen Algorithmus zum Nachweis von CNV auf Basis eines „customer designed 154 amplicon-panel“ und NGS am Beispiel der *HER2*-Genamplifikation vorstellte.

Am Ende der dritten AG-Sitzung erfolgte im Rahmen der Mitgliederversammlung turnusgemäß die Neuwahlen der AG-Sprecher und Stellvertreter. W. Dietmaier (Regensburg) als erster Sprecher und S. Merkelbach-Bruse (Köln) sowie R. Penzel (Heidelberg) als stellvertretende Sprecher stellten sich zur Wiederwahl. Aus dem Auditorium gab es keine weiteren Wahlvorschläge. Sprecher und Stellvertreter wurden ohne Gegenstimme wieder gewählt und nahmen die Wahl jeweils an.

Abschließend wurde noch darauf hingewiesen, dass das nächste (und dritte) Herbsttreffen der AG Molekularpathologie am 12./13.11.2015 in Münster stattfinden wird.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. W. Dietmaier
Institut für Pathologie
Universität Regensburg
93053 Regensburg
wolfgang.dietmaier@klinik.uni-regensburg.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. W. Dietmaier, W. Weichert, C. Wickenhauser und U. Lehmann geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag enthält keine Studien an Menschen oder Tieren. The supplement this article is part of is not sponsored by the industry.