

## Immunphänotypisierung (Durchflußzytometrie)

Großes Blutbild (manuelle Differenzierung), CD-Markierung nach Anforderung/Indikation (z.B. B-Zelltypisierung, Leichtkettenrestriktion)

## Tumorzytogenetik (Karyotypisierung)

Chromosomenanalyse (Karyogramm) zur Bestimmung grobstruktureller Veränderungen in neoplastischen Zellen.

## Molekulare Tumorzytogenetik

### Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Zielgerichteter Ausschluß/Nachweis von krankheitsrelevanten Veränderungen; 24-Farben-FISH zur Bestimmung numerischer und größerer struktureller Veränderungen.

**Array-CGH (Comparative Genomic Hybridization)** nach Rücksprache Ausschluß/Nachweis kleiner Amplifikationen und Deletionen, die mittels krankheitsspezifischen FISH-Panels nicht detektiert werden. Nachweis von LOH- bzw. UPD-Regionen. Kleine Mosaik- und balancierte Veränderungen werden **nicht** erkannt.

## Molekulargenetik

### Next Generation Sequencing (NGS)

Bestimmung des Mutationsstatus krankheits-/prognoserelevanter Gene

### Qualitative bzw. quantitative RT-PCR

Qualitativer bzw. quantitativer Nachweis von Fusionstranskripten (Minimal Residual Disease)

### Droplet-DigitalPCR (ddPCR)

Hochsensitiver quantitativer Nachweis von Fusionstranskripten, Punktmutationen, Deletionen und Copy Number Variationen (CNV)

## Untersuchungsmaterial

**Immunphänotypisierung:** 5,7 ml CPDA1 / 2,7 ml EDTA-Blut

**Karyotypisierung:** mind. 5 ml Heparin-Knochenmark/-Blut

**FISH:** 2-3 ml Heparin-Knochenmark/-Blut

**Array-CGH:** 5 ml EDTA-Knochenmark/-Blut

**qRT-PCR/ddPCR:** 10 ml EDTA-Knochenmark/-Blut

**NGS:** 3 ml Knochenmark/-Blut, möglichst EDTA

## Versand

Normaler Postweg, kostenlose Probenabholung nach Rücksprache

## Dauer der Untersuchungen

Immunphänotypisierung: 2 Tage	Karyotypisierung: 5-7 Tage
FISH: 2-7 Tage	Array-CGH: 2 Wochen
qRT-PCR/ddPCR: 5-7 Tage	NGS: 5-7 Tage

## Qualitätsmanagement

Akkreditiert nach:

DIN EN ISO/IEC 17025

DIN EN ISO 15189 (DAC-ML-0258-04)

EFI-Akkreditierung

Teilnahme an Ringversuchen des BVDH zur Chromosomen- und FISH-Analyse, an Ringversuchen von UKNEQAS zur Chromosomenanalyse, FISH-Analyse sowie zu diversen molekulargenetischen Parametern sowie regelmäßige Probenaustausche, Teilnahme an Ringversuchen von INSTAND und DGKL (Immunphänotypisierung/akute Leukämien).

## Facharztbereiche

Humangenetik

Kinder- und Jugendmedizin\*

Laboratoriumsmedizin

Mikrobiologie/Virologie

Transfusionsmedizin

Pathologie

\* nicht vertragsärztlich tätig

## Wissenschaftliche Fachabteilungen

Molekulargenetik

Neurogenetik

Pharmakogenetik/Nutrigenetik

Stoffwechselgenetik

Zytogenetik

Reproduktionsgenetik

Molekulare Onkologie

Immungenetik

Immunbiologie/Klinische Chemie

Molekulare Mikrobiologie/Virologie

Abstammungsanalysen

Bioinformatik



ZENTRUM FÜR HUMANGENETIK UND LABORATORIUMSDIAGNOSTIK (MVZ)  
Dr. Klein, Dr. Rost und Kollegen

# Hämatonkologie

Diagnostik und Therapie

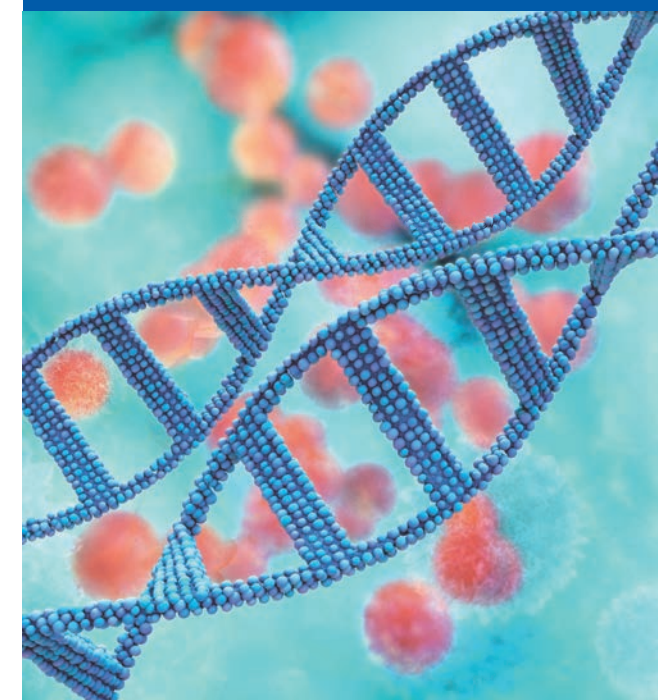
Akkreditiert nach DIN EN ISO/IEC 17025, DIN EN ISO 15189, EFI-Akkreditierung



ZENTRUM FÜR HUMANGENETIK UND LABORATORIUMSDIAGNOSTIK (MVZ)

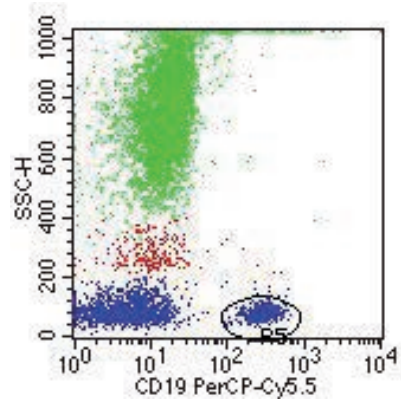
Dr. Klein, Dr. Rost und Kollegen

MVZ Martinsried  
Lochamer Str. 29  
82152 Martinsried  
DEUTSCHLAND  
Tel: +49.89.895578-0  
Fax: +49.89.895578-780  
www.medizinische-genetik.de  
info@medizinische-genetik.de



## Immunphänotypisierung (Durchflußzytometrie)

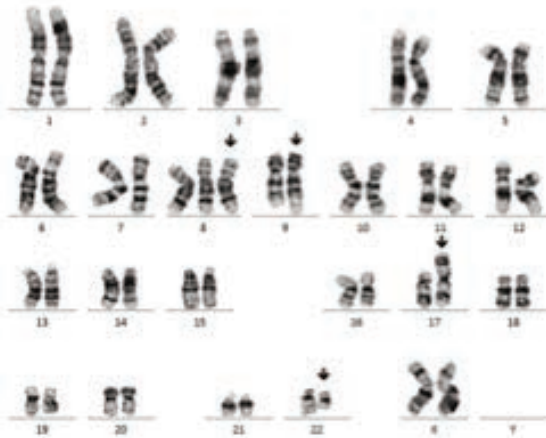
Die Durchflußzytometrie spielt durch die schnelle und präzise Bestimmung von koexprimierten zellulären Antigenen eine zentrale Rolle in der Diagnostik und bei der Verlaufskontrolle von Lymphomen, Leukämien und Myelodysplastischen Syndromen (MDS). Die Untersuchung mittels Multiparameteranalysen erlaubt darüber hinaus eine Prognoseabschätzung und exaktere Therapieplanung.



Darstellung CD19-positiver B-Zellen mittels Durchflußzytometrie

## Tumorzytogenetik (Karyotypisierung)

Der Nachweis charakteristischer Chromosomenveränderungen wie Translokationen, Amplifikationen und Deletionen mittels Chromosomenbänderungsanalyse nimmt nach wie vor einen hohen Stellenwert für Klassifikation, Rezidivernennung und zur Prognoseabschätzung bei Leukämien und Lymphomen ein. Die Karyotypisierung gibt einen globalen Überblick über chromosomale Veränderungen und ist vor allem bei der Erstdiagnose, aber auch im Verlauf der Erkrankung z.B. zur Detektion von Sekundärberrationen bei chronischer myeloischer Leukämie (CML) wichtig.

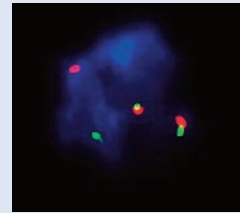


Karyogramm mit dem Karyotyp: 47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11.2),i(17)(q10) bei CML

## Molekulare Tumorzytogenetik

### Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)

Sensitiver als die Chromosomenbänderungsanalyse ist die FISH-Analyse, die sowohl an Metaphasen als auch Interphasekernen für definierte Regionen eingesetzt werden kann. Durch Anreicherung bestimmter Zellpopulationen, wie z.B. CD138+ Zellkerne beim Plasmozytom, können gezielt krankheitsrelevante Regionen untersucht werden. 24-Farben-FISH, wie Multicolor-FISH (M-FISH) an Metaphase-Chromosomen liefert einen Überblick über den Grad einer chromosomalen Instabilität bei gleichzeitiger Abklärung von numerischen und größeren strukturellen Veränderungen.



Nachweis einer Translokation t(4;14)(p16;q32) an einer CD138+ Zelle beim Plasmozytom

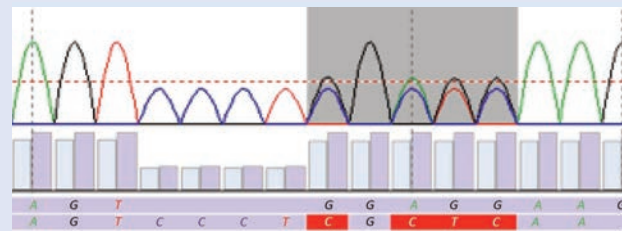
### Array-CGH (Comparative Genomic Hybridization)

Am MVZ Martinsried können mit Hilfe von SNP-Arrays Genregionen hochauflösend dargestellt werden. Durch den gesamtgenomischen Ansatz werden auch solche Veränderungen nachgewiesen, die mit dem bisher eingesetzten FISH-Panel nicht detektierbar sind. Komplexe Chromosomenveränderungen und Bruchpunktregionen können so exakt bestimmt werden.

## Molekulargenetik

### Gen-Panelanalyse mittels Next-Generation-Sequencing (NGS)

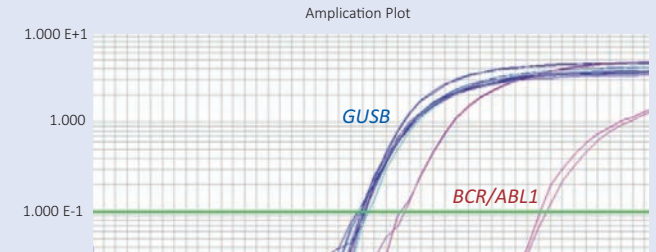
Hochdurchsatz-Sequenzierverfahren haben in den letzten Jahren entscheidende Erkenntnisse zur molekulargenetischen Basis hämatologischer Neoplasien hervorgebracht. So finden sich beispielsweise bei ca. 90% der Patienten mit MDS wiederkehrende somatische Veränderungen, die zur Sicherung der Diagnose sowie zur Prognose- und Therapieabschätzung herangezogen werden können. Mit NGS ist es möglich, durch sog. „Gen-Panelanalysen“, also der parallelen Sequenzierung vieler krankheitsrelevanter Gene mit entsprechend hoher Abdeckung, Mosaik sehr sensitiv (bis 5% Mutationslast) auch in schwer zugänglichem oder limitiertem Material nachzuweisen. Molekulargenetische Veränderungen wurden daher in die WHO-Klassifikation von 2016 noch stärker gewichtet.



Nachweis einer seltenen Mutation im *NPM1*-Gen: c.869\_873delinsCCCTCGCTC; p.W290Sfs\*10

## Quantitative RT-PCR (qPCR)

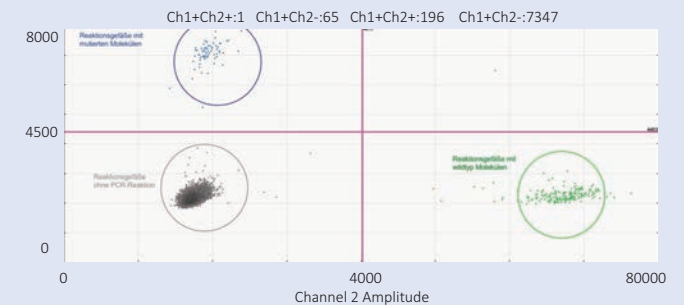
qPCR wird eingesetzt, um Amplifikationen oder Überexpression von bestimmten (Fusions-)Genen oder Transkripten nachzuweisen. Dies kann für das Monitoring hämato-onkologischer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Hierdurch kann z.B. das Ansprechen auf die Behandlung einer *BCR/ABL1*-positiven Leukämie mit Imatinib oder einer *PML/RARα*-positiven Promyelozyten-Leukämie mit ATRA überwacht werden. Auch aberrante Zellklone im Sinne einer Minimal Residual Disease (MRD) können sehr sensitiv detektiert werden.



Relative Quantifizierung der *BCR/ABL1*-Fusionstranskripte bei CML im Vergleich zur Expression des Housekeeping-Gens *GUSB*. Mittels qPCR (TaqMan-Assay) können *BCR/ABL1*-Fusionstranskripte in 1 von  $10^6$  Zellen nachgewiesen werden

## Droplet Digital PCR (ddPCR)

Bei der ddPCR handelt es sich um ein sehr sensitives Verfahren, welches vor allem zum gezielten Mutationsnachweis, zur MRD-Diagnostik und zur Analyse von Copy Number Variationen (CNVs) eingesetzt wird. Nach Vereinzelung der DNA-Moleküle durch Verdünnen erfolgt eine Amplifikation der Zielregion mittels PCR und Quantifizierung der PCR-Produkte. Hierzu werden wie bei einer real-time PCR Fluoreszenzsignale von positiven Reaktionen einer spezifischen Mutation zu positiven Reaktionen der entsprechenden Wildtyp-Sequenz ins Verhältnis gesetzt. Positive Reaktionen werden mit einer „1“, negative Reaktionen mit einer „0“ gekennzeichnet; daher auch der Name „digital“ PCR. Die hohe Zahl an Reaktionskammern (> 20.000) und starke Vereinzelung der Proben-DNA wird eine sehr hohe Sensitivität mit absoluten quantitativen Werten erreicht (bis zu 0,01% Mutationslast im Wildtyp-hintergrund). Effekte wie z.B. schlechte Amplifikationseffizienz oder Probleme mit PCR-Inhibitoren rücken dabei in den Hintergrund.



2-D-Plot eines Duplex-Experiments, bei dem Mutation und Wildtyp PCR-amplifiziert wurden. Dabei wird für jedes Droplet Kanal 1 (FAM, in der Regel Mutation) gegen Kanal 2 (HEX, in der Regel Wildtyp) aufgetragen