

# Stellenwert der Molekularbiologie in der hämato-onkologischen Diagnostik



**Christine Mannhalter**  
**Klinisches Institut für Labormedizin (KILM)**  
**AKH Wien**

# Molekularbiologische Diagnostik bei AML

---

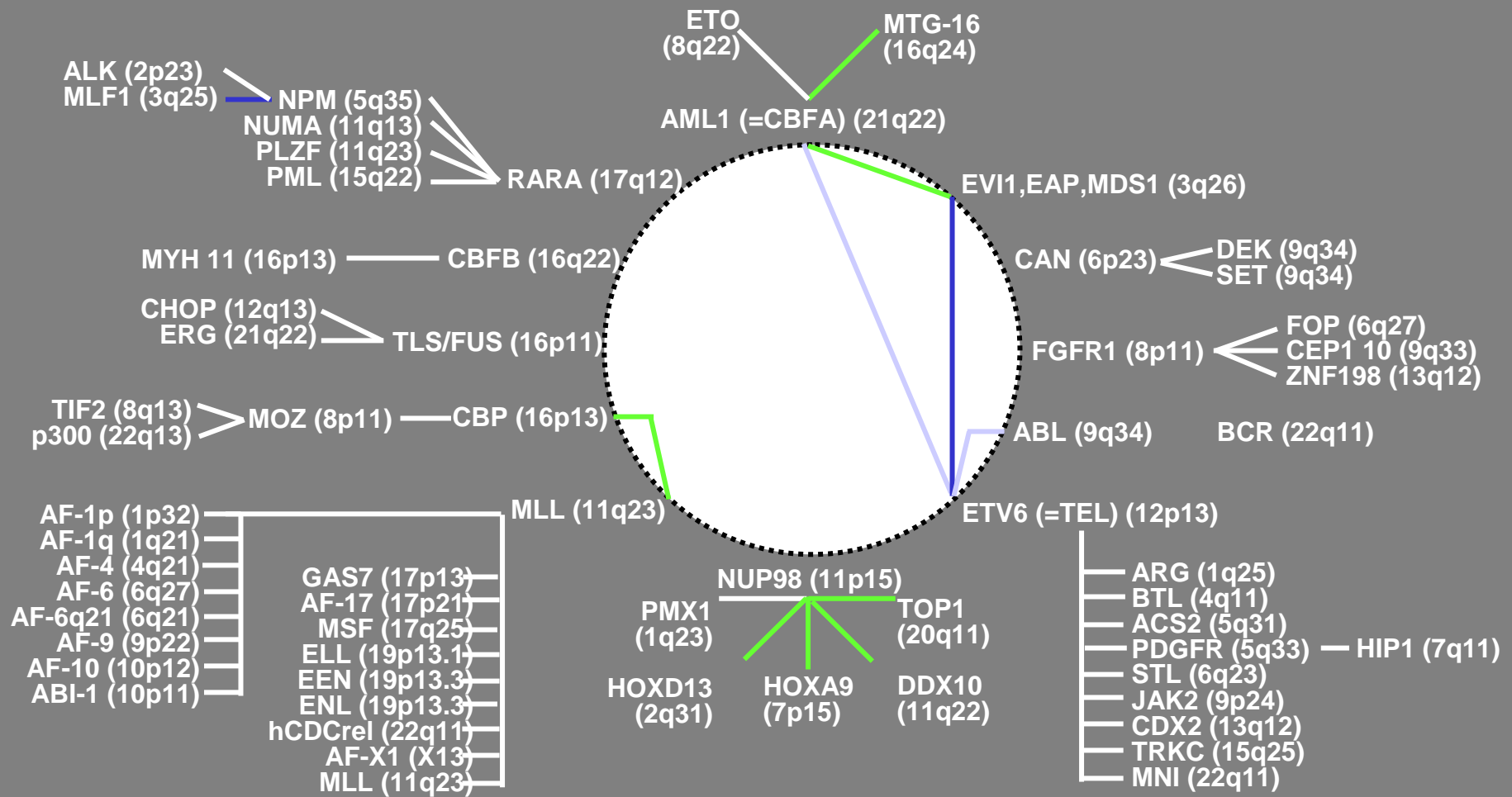
Bei ca. 60% aller Patienten mit **akuten Leukämien** findet man chromosomale Translokationen/Rearrangements

# Molekularbiologische Diagnostik

---

**Pathologisch relevante Translokationen und  
Genrearrangements meist auf bestimmte  
Genfusionen zurückzuführen**

# Chimeric Fusion Genes in Acute Leukemias



# Molekularbiologische Diagnostik

---

Die rezenten WHO Klassifikationen unterscheiden für AML, MDS, and MPD spezifische **genetische** Subkategorien

## Konsequenz

- Es sollten, wenn immer möglich, genetische Analysen durchgeführt werden
- Zum Nachweis vieler Abnormalitäten eignen sich PCR oder FISH Analysen
- Zusätzlich sollten bei Erstdiagnose und im Verlauf zytogenetische Test gemacht werden

# WHO Klassifikation 2008 - AML

---

**AML:** Chromosomale Aberrationen mit prognostischem Wert, die in der WHO Klassifikation 2008 inkludiert sind  
umfassen:

**t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1***

**inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22) *CBFB-MYH11***

**t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA***

**Gutes Therapieansprechen, gute Remissionsrate**

# WHO Klassifikation 2008 - AML

---

**AML:** Chromosomale Aberrationen mit prognostischem Wert, die in der WHO Klassifikation 2008 inkludiert sind

**t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL***

**andere *MLL* Entitäten**

**t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214***

**inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVI1***

**Schlechte Prognose**

# Molekularbiologische Diagnostik

---

**In den letzten Jahren wurden geeignete  
Analysesysteme – z.B. schnelle quantitative Real-  
Time PCR Tests – für diagnostische  
Anwendungen ausgearbeitet**

# **Hema Vision RT-PCR Multiplex System®**

---

**Detektionsmöglichkeit für 29 Translokationen**

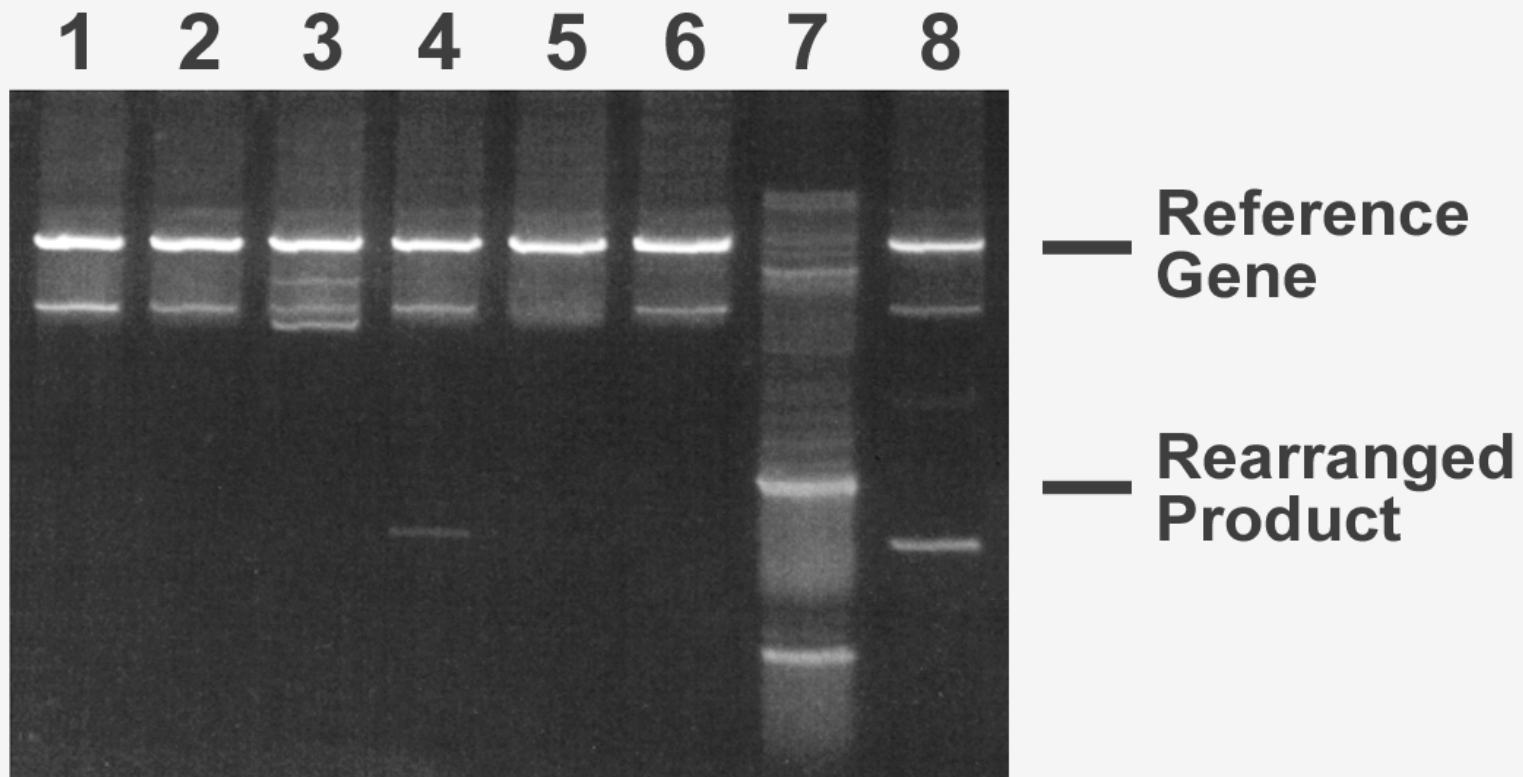
**Nachweisgrenze 1 in 100 000 Zellen**

**Simultane Analyse von 10 Patienten**

**Analysendauer – 3 Tage**

# Hema Vision RT-PCR Multiplex System<sup>®</sup>

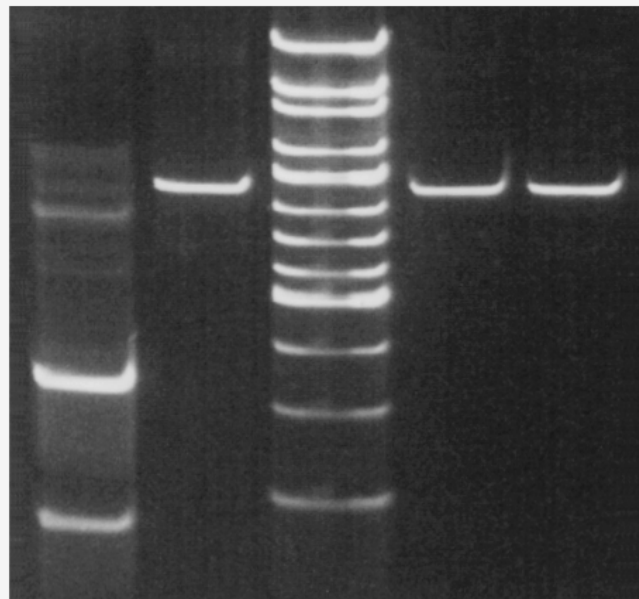
## Mastermixes



# Hema Vision RT-PCR Multiplex System

## Mastermixes

7A 7B M\* 7C 7D



— Reference Gene

— Rearranged Product

\* Size Marker

# Probenmaterial

---

**Knochenmark 5 ml**

**peripheres Blut 32 ml**

**Sondermaterial (Gewebe, Paraffinschnitte,  
Liquor, andere Körperflüssigkeiten, sortierte  
Zellen...)**

**Antikoagulans: EDTA**

**Präanalytik zu beachten:** Proben sofort nach  
Abnahme kühlen (Kühlschrank, Flockeneis,  
Kühlaggregate...) und gekühlt transportieren!

# Hema Vision RT-PCR Multiplex System

---

- 1. Numerische Abnormalitäten werden nicht erfasst**
- 2. Unbekannte Abnormalitäten können nicht gefunden werden**
- 3. Nur balancierte Abnormalitäten sind nachweisbar**

# Chromosomale Aberrationen bei AML

---

**Bei ca. 40% der Patienten mit akuter Leukämie werden keine chromosomalen Aberrationen detektiert**

**Genetische Ursachen: Punktmutationen, kleine Duplikationen**

# Molecular Abnormalities in AML Patients with Normal Karyotype

Point mutations and frequency	(%)
NPM1	50
FLT3-LM/ITD	40
CEPBA	15
MLL-PTD	11
NRAS	9
FLT3-TKD	6

T. Haferlach et al. Ann Hematol 2007; 86: 311-327

# AML and Mutations

---

**NPM1 mutations are associated with favourable prognosis**

**Flt3-ITD mutations reflect an unfavourable prognostic factor**

**CEBPA-double but not CEBPA-single mutations confer a significantly better overall survival**

**NPM1 and Flt3-ITD mutations are easily detectable by PCR analysis**

# AML and NPM1

---

- Die NPM1 Mutation stört die Hämatopoiese (Ergebnis experimenteller Modelle)
- Die NPM1 Mutation findet sich bereits in Stammzellen NPM1 positiver AML Patienten
- Die biologischen und klinischen Eigenschaften NPM1 positiver AML scheinen durch andere chromosomale Aberrationen oder Dysplasien nicht signifikant beeinflusst zu werden
- In der Regel schließen sich eine NPM1 Mutation und eine biallelische CEBPA Mutation aus

Falini B et al. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? Blood 2011

# AML and NPM1

---

**NPM1- mutationspositive AML scheint eine distinkte Leukämie-Entität zu repräsentieren, die ca. 30% aller AML Fälle ausmacht**

Falini B et al. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? Blood 2011

# **Molekulare Aberrationen bei AML**

---

**FLT3, ein Tyrosinkinase Rezeptor, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Wachstums hämatopoietischer Zellen**

**Bei 30-40% aller Patienten mit AML findet man FLT-3 Mutationen - Internal Tandem Duplikation (ITD) und Mutationen in der Tyrosinkinase Domäne (TKD)**

**Die FLT-3-ITD Expression könnte die Expression des Wilms Tumor Gens in AML Blasten aktivieren und so zur onkogenen Funktion beitragen**

# Molekulare Aberrationen bei AML

---

**Die FLT3 tandem duplication ist neben dem Alter auch ein wichtiger Prädiktor bei Patienten mit relapsierter AML und normalem Karyotyp**

**Bei Vorhandensein einer FLT3 tandem duplication ist die Chance auf eine zweite komplette Remission nach Auftreten eines Rezidivs signifikant kleiner**

**Wagner K et al. FLT3-internal tandem duplication and age are the major prognostic factors in relapsed acute myeloid leukemia with normal karyotype. Haematologica 2011**

# WHO Klassifikation 2008 - AML

---

**AML:** Molekulare Punktmutationen, die in der WHO Klassifikation von 2008 inkludiert sind:

**NPM1 Mutationen**

**CEBPA Mutationen**

**FLT3 Mutationen**

**Noch nicht inkludiert sind bisher:**

**c-KIT Mutationen, partielle Duplikationen von MLL und FLT3,  
abnormale Expression von EVI1, WT1, BCL2, MDR1, BAALC, und  
ERG**

# WHO Klassifikation 2002 - MPD

## WHO Klassifikation chronisch myeloproliferativer Erkrankungen – Unterscheidung von 7 Entitäten:

- Chronic myelogenous leukemia [CML, Ph chromosome, t(9;22)(q34;q11), *BCR/ABL* positive]
  - Chronic neutrophilic leukemia
  - Chronic eosinophilic leukemia
  - Polycythemia vera
- Chronic idiopathic myelofibrosis (with extramedullary hematopoiesis)
  - Essential thrombocythemia
- Chronic myeloproliferative disease, unclassifiable

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100:2292–2302.

# WHO Klassifikation 2002 - MPD

---

**Die CML ist durch**

- **morphologische und klinische Eigenschaften charakterisiert**
- **und durch die genetische Abnormalität, mit der die Erkrankung assoziiert ist – das Philadelphia Chromosome bzw. das *BCR/ABL* Fusions Gen**

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100:2292–2302.

# Chromosomale Abnormalität bei CML

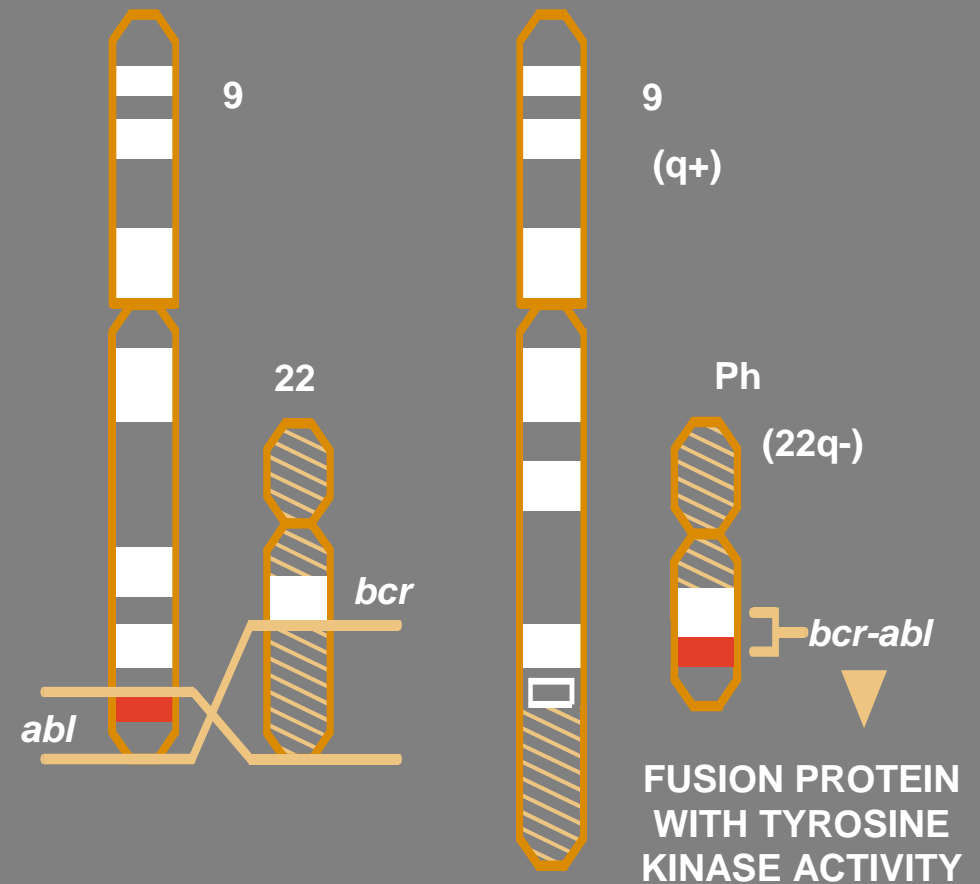
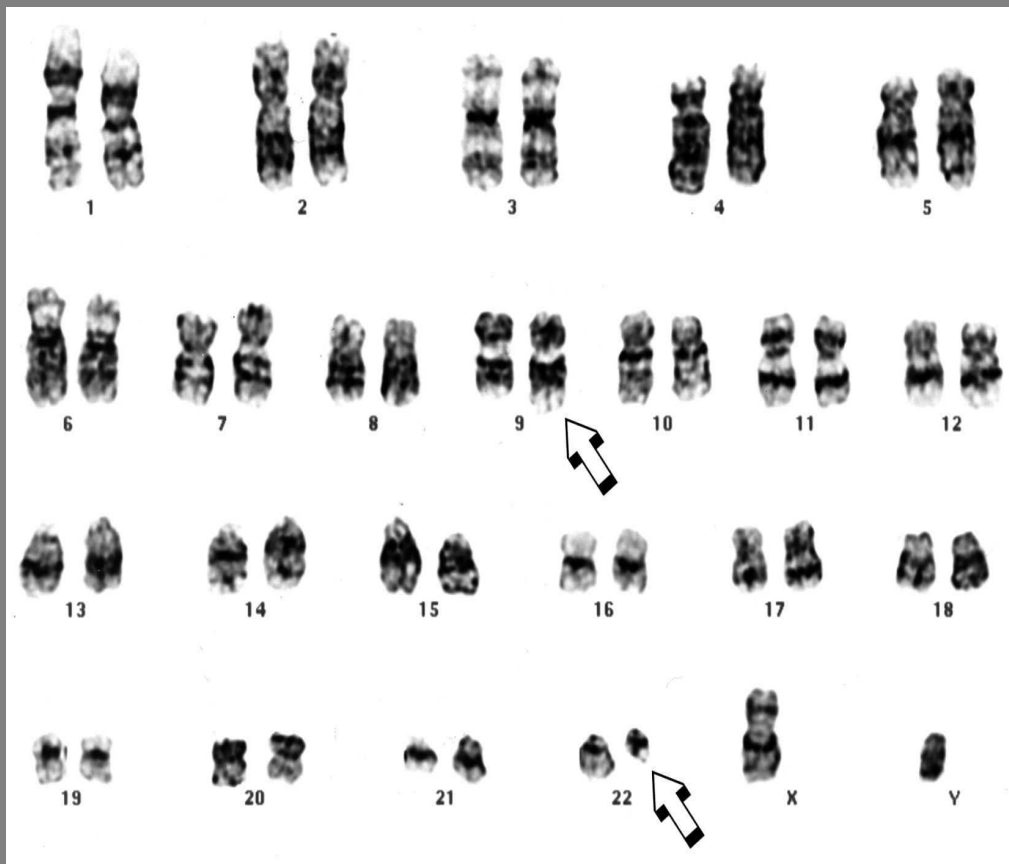
---

**1960 Entdeckung des Philadelphia Chromosoms  
bei einem Patienten mit CML**

**1973 Nachweis der balancierten Translokation  
t(9;22)**

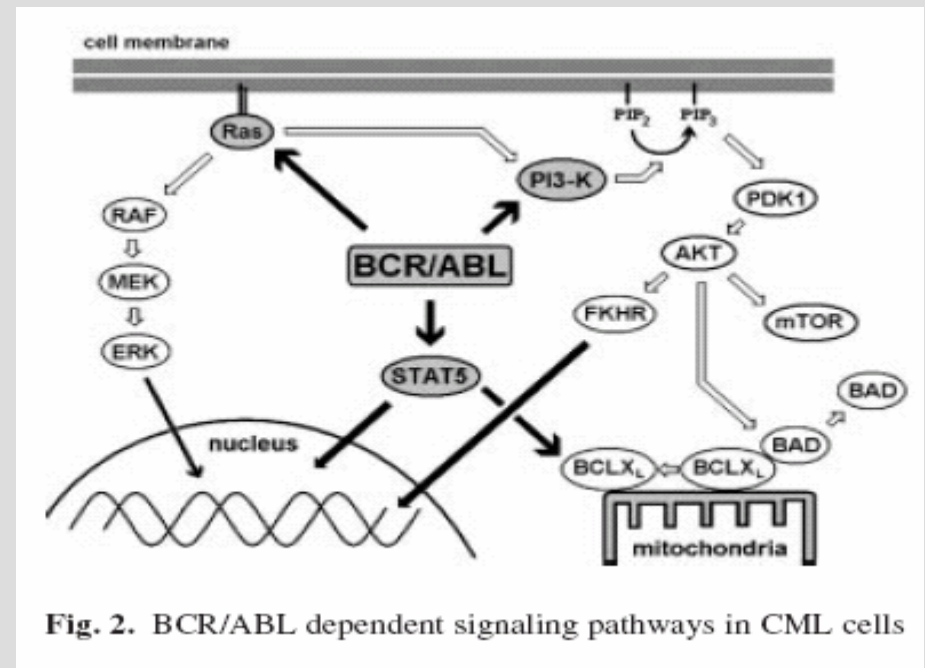
**Detektion der Fusion von zwei Genen – BCR und  
ABL durch t(9;22)**

# Chronisch Myeloische Leukämie Philadelphia Chromosom - t(9;22)



# BCR-ABL Fusions-Gen

- Deregulierte Tyrosin-Kinase Aktivität
- Antiapoptotische und mitotische Aktivität
- Autonomes Zellwachstum, Entstehung der CML



# Real-Time Quantitative PCR

- ◆ Real-time quantitative RT-PCR erlaubt die rasche und spezifische Amplifikation und Quantifizierung von Zielmolekülen
- ◆ Fusionstranskripte können bis zu einer Konzentration von  $10^{-4}$  -  $10^{-6}$  detektiert und quantifiziert werden
- ◆ Intra- und inter-assay Variationskoeffizienten: 10% - 20%

# Quantitative Analysis of BCR-ABL

---

**Quantität des BCR-ABL Fusionsprodukts  
reflektiert den Therapieeffekt**

**Quantifizierung ermöglicht Unterscheidung  
zwischen**

- Patienten mit hohem Relapsrisiko**
- Patienten, die in Remission bleiben**

# Molecular Monitoring using qPCR

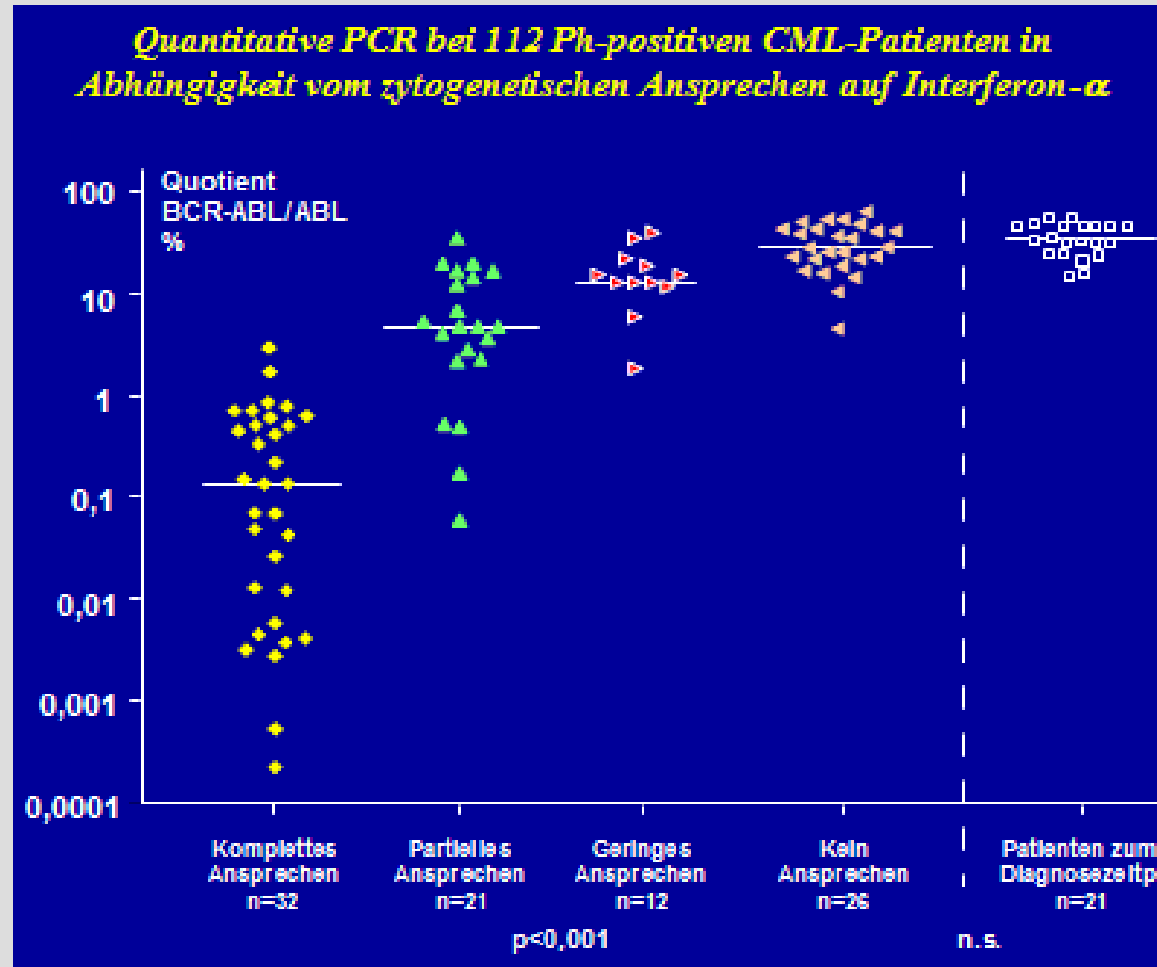
---

## Reduction BCR-ABL

Major Response	$\geq 3$ log
Good/Partial Response	2-3 log
Minor Response	1-2 log
No Response	$<1$ log

**Key Marker: Major molecular response (MMR) originally classified as reduction by  $\geq 3$  log below baseline level**

# qPCR in Hämato-Onkologie



A. Hochhaus et al. Methoden zur zytogenetischen und molekularen Diagnostik und zur Verlaufskontrolle der CML: Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mannhalter OKP2011

# **Selektive Inhibition von Tyrosin Kinasen bei CML**

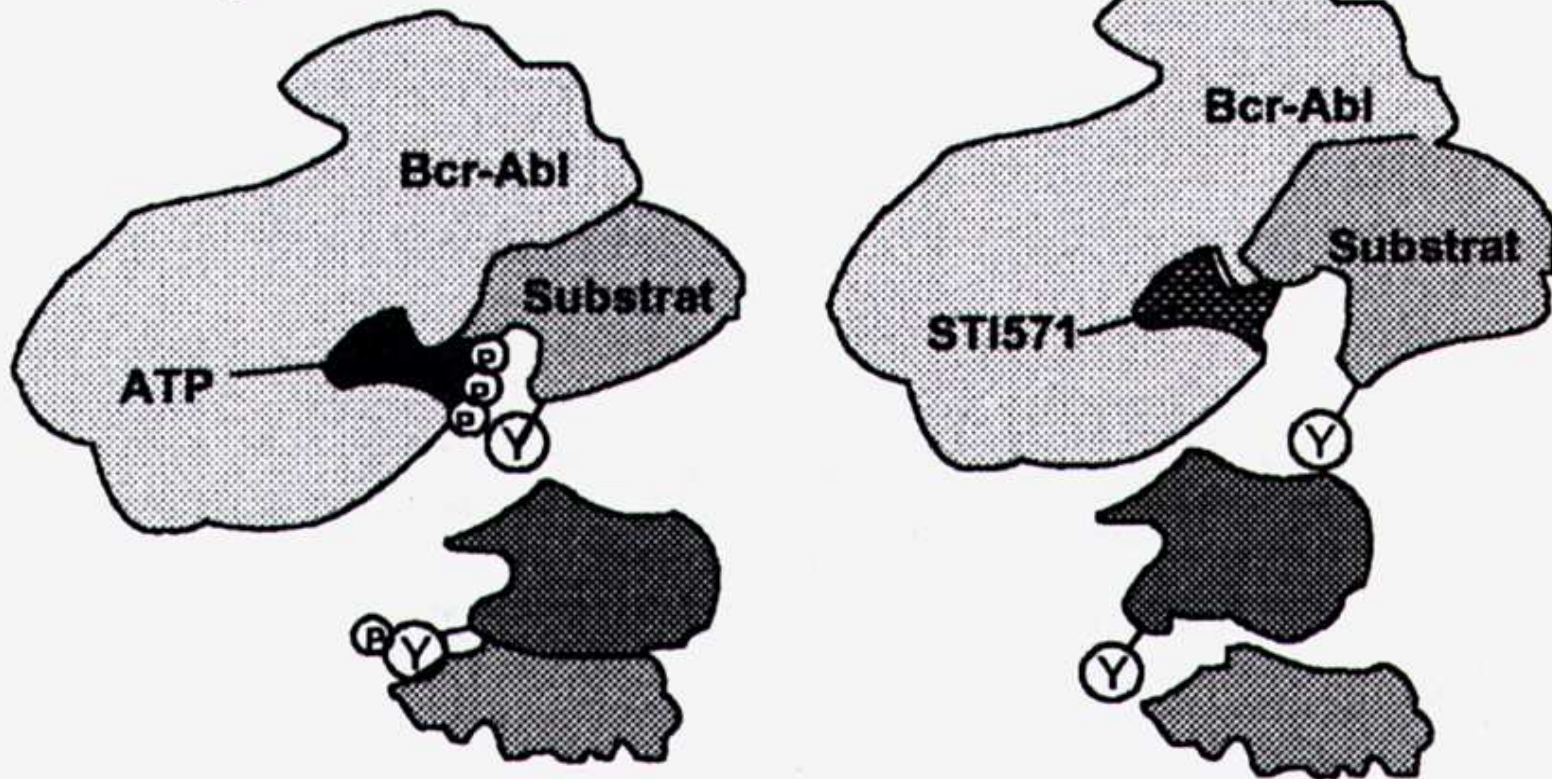
---

**Imatinib (Glivec®) seit November 2001  
verfügbar  
abl-spezifischer Tyrosin-Kinase Inhibitor**

**Hemmt abl und BCR-ABL Tyrosin-Kinasen  
durch kompetitive Interaktion mit der ATP-  
Bindungstasche**

# Mechanism of Action of Gleevec®

Y = Tyrosin  
P = Phosphat



# Therapieresistenz gegen Gleevec/Glivec®

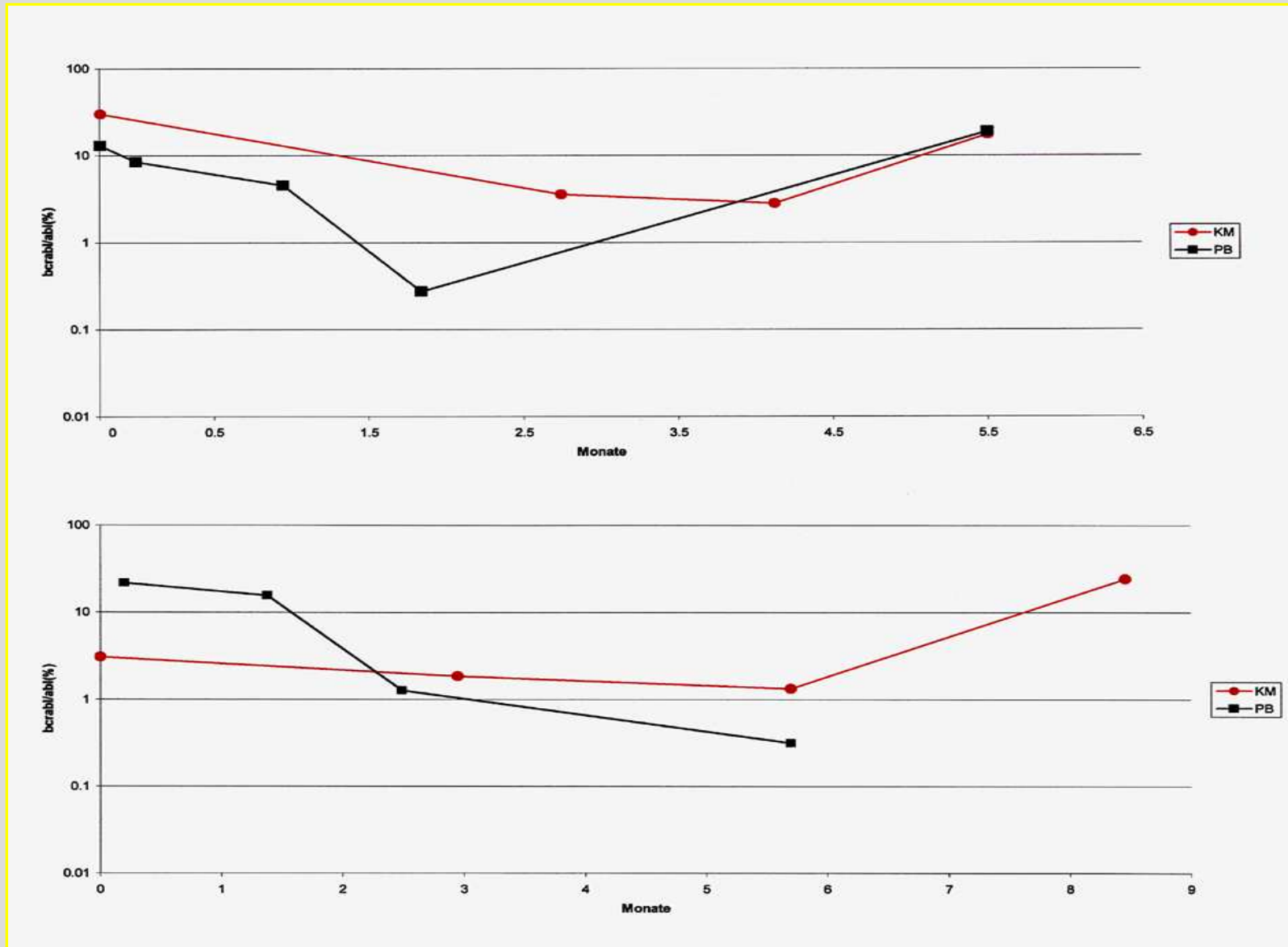
---

**Großteil der CML Patient zeigt guten  
Therapieeffekt**

**Subgruppe von Patienten (Blastenkrise) spricht  
nicht an oder relapsiert bald**

**qPCR Analyse ermöglicht Früherkennung der  
Zunahme von Fusionstranskripten**

# Real Time PCR in CML Patients



# Therapieresistenz gegen Gleevec/Glivec®

---

**Ursache:** Mutationen innerhalb der BCR-ABL Kinase Domäne

**Nachweis:** qPCR mit anschließender Sequenzierung der Fusionstranskripte

# **Identifikation molekularer Grundlagen - Entwicklung neuer Medikamente**

---

**Entwicklung neuer Tyrosinkinase-Inhibitoren die  
durch die Mutationen nicht beeinflusst werden  
(Dasatinib®, Nilotinib®)**

- Höhere Wirksamkeit**
- Wirksamkeit gegen Gleevec/Glivec resistente  
Klone**

# Zusammenfassung

---

**Molekulares Monitoring der BCR-ABL Transkripte mittels qPCR gehört heute zur „State of the Art“ Diagnostik bei Patienten mit CML**

**Das Monitoring erlaubt die Einschätzung des Therapieansprechens auf Imatinib und die Früherkennung einer erworbenen Therapieresistenz**

**Zunahmen von BCR-ABL weisen auf ein Vorliegen von Mutationen in der Kinase Domäne hin**

**Die qPCR dient dem Vorscreening für eine nachfolgende Mutationsanalyse**

# WHO Klassifikation - Klassische MPD

---

Chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1 positive  
(CML)

**Polycythemia vera (PV)**

**Primary myelofibrosis (PMF)**

**Essential thrombocythemia (ET)**

# Molecular Diagnostic Markers in Myeloproliferative Disorders (MPD)

---

## Mutations in activating tyrosine kinases (TK)

### JAK2

- amino acid substitution (V617F)
- exon 12 mutation

# JAK2 und Myeloproliferative Erkrankungen

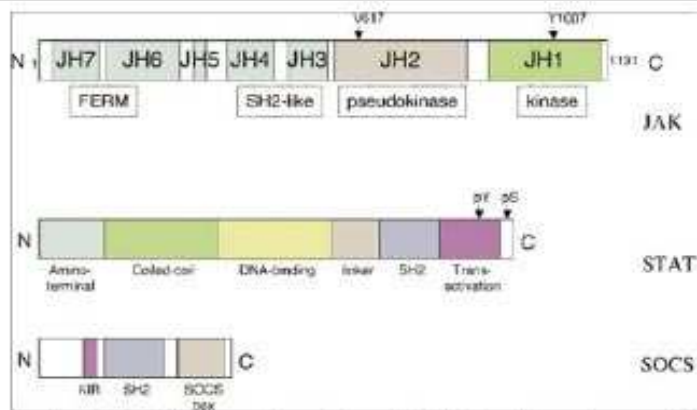


Fig. 1 : Overall scheme of Janus kinase (JAK), signal transducers and activators of transcription and suppressor of cytokine signalling family members showing important domains. The JAK2 mutation (V617F) found in myeloproliferative disorders and the key regulatory phosphorylation site (Y1007) are shown. (Reproduced with permission from Khuwaja A. Br J Hematol 2006;134:366-384).

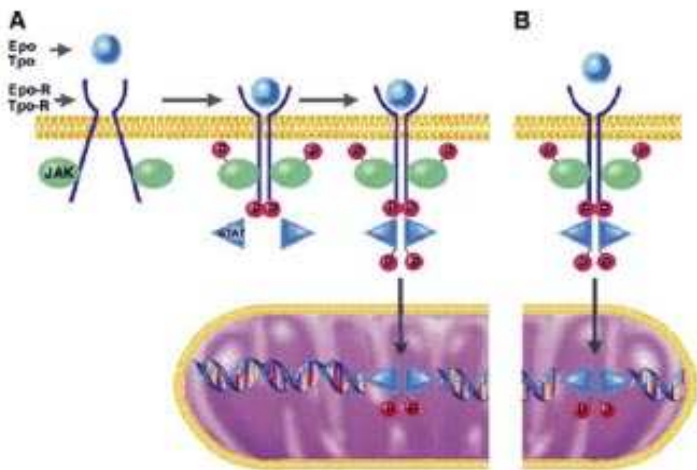


Fig. 2 : JAK/STAT signal transduction pathway in responses to haematopoietic growth factors. (A) : Normally, erythroid and megakaryocytic progenitors require binding of EPO or TPO to their respective receptors to initiate activation. In patients with MPDs having JAK2-V617F mutation (B), the signal transduction pathway is constitutively activated (Reproduced with permission from Schafer AI. Blood 2006;107:4214-4222).

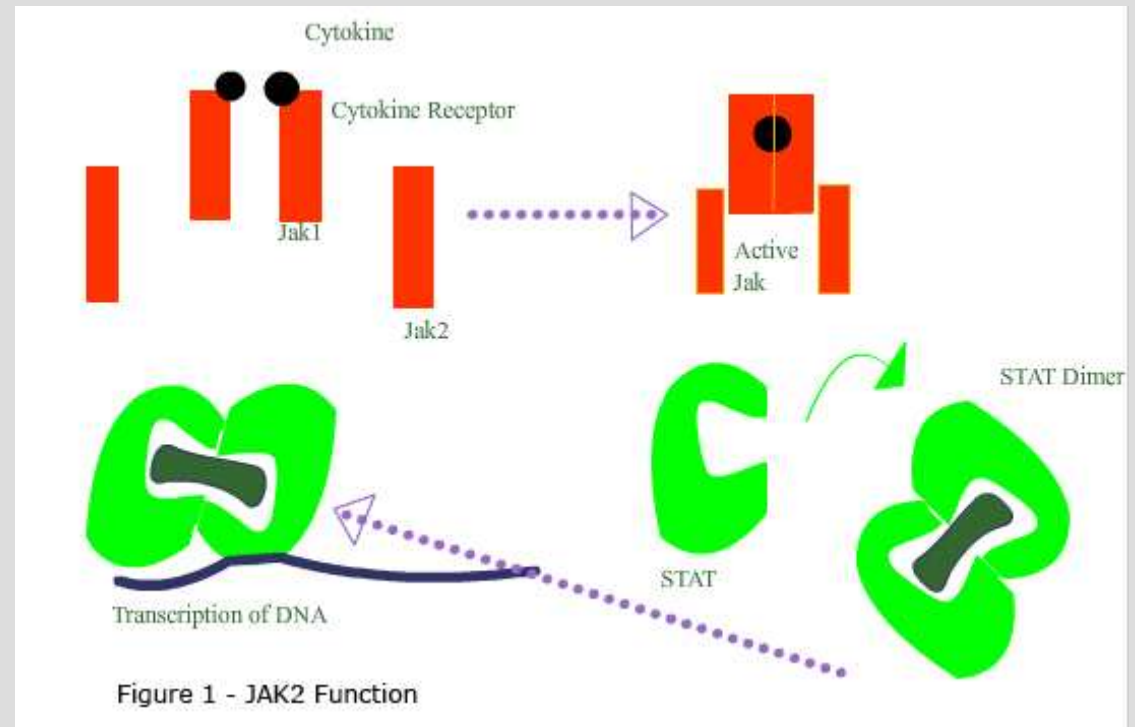


Figure 1 - JAK2 Function

# JAK2 Mutationen

---

## Häufigkeit der JAK2 Mutationen

### PV

JAK2 V617F ~95%  
JAK2 Exon 12 ~3%

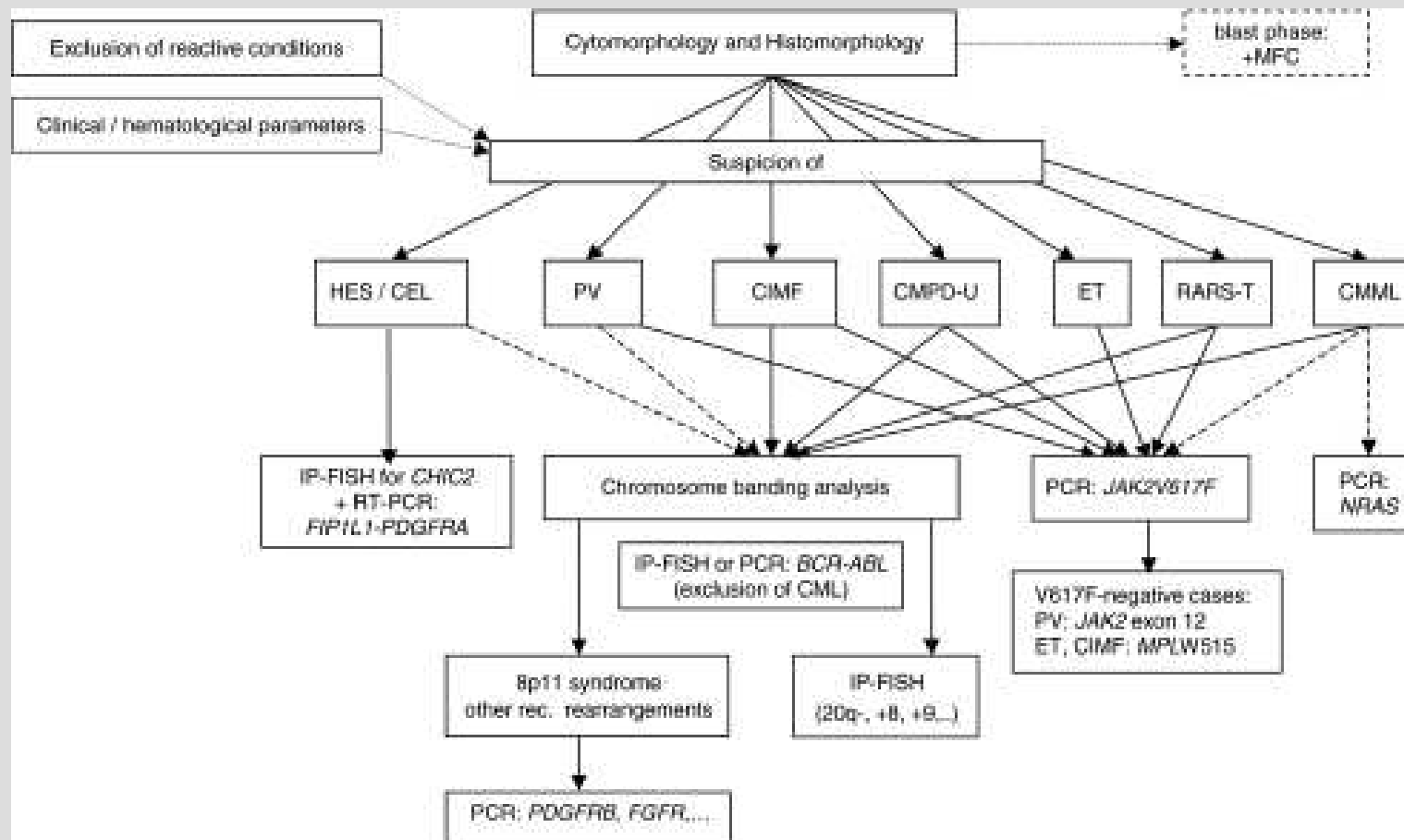
### ET

JAK2 V617F ~55%

### PMF

JAK2 V617F ~65%

# Diagnostic Algorithms in BCR-ABL Negative Chronic Myeloproliferative Disorders (CMPD)



# **Molekularbiologische Diagnostik der JAK2 Mutation**

---

**Die Bestimmung kann nicht zwischen einer Polycythämie, einer essentiellen Thrombozytose oder einer Myelofibrose unterscheiden**

**Der Hauptnutzen der JAK2 Bestimmung liegt in der Bestätigung einer myeloproliferativen Erkrankung**

# Molekulare Diagnostik

---

Hämatologischen Systemerkrankungen

**Onkologie**

Pharmakogenetik

# Diagnostik des Prostatakarzinoms

---

**Derzeit**

**1. Invasive Prostatabiopsie**

**2. Bestimmung des PSA-Wertes**

**nicht Prostatakarzinom spezifisch**

**Kann auch bei gutartiger Vergrößerung der Prostata  
sowie bei Entzündung der Prostata erhöht sein**

**Bei ca. 70-80% der Patienten mit erhöhten PSA Werten  
wird kein Prostatakarzinom gefunden**

# Diagnostik des Prostatakarzinoms

---

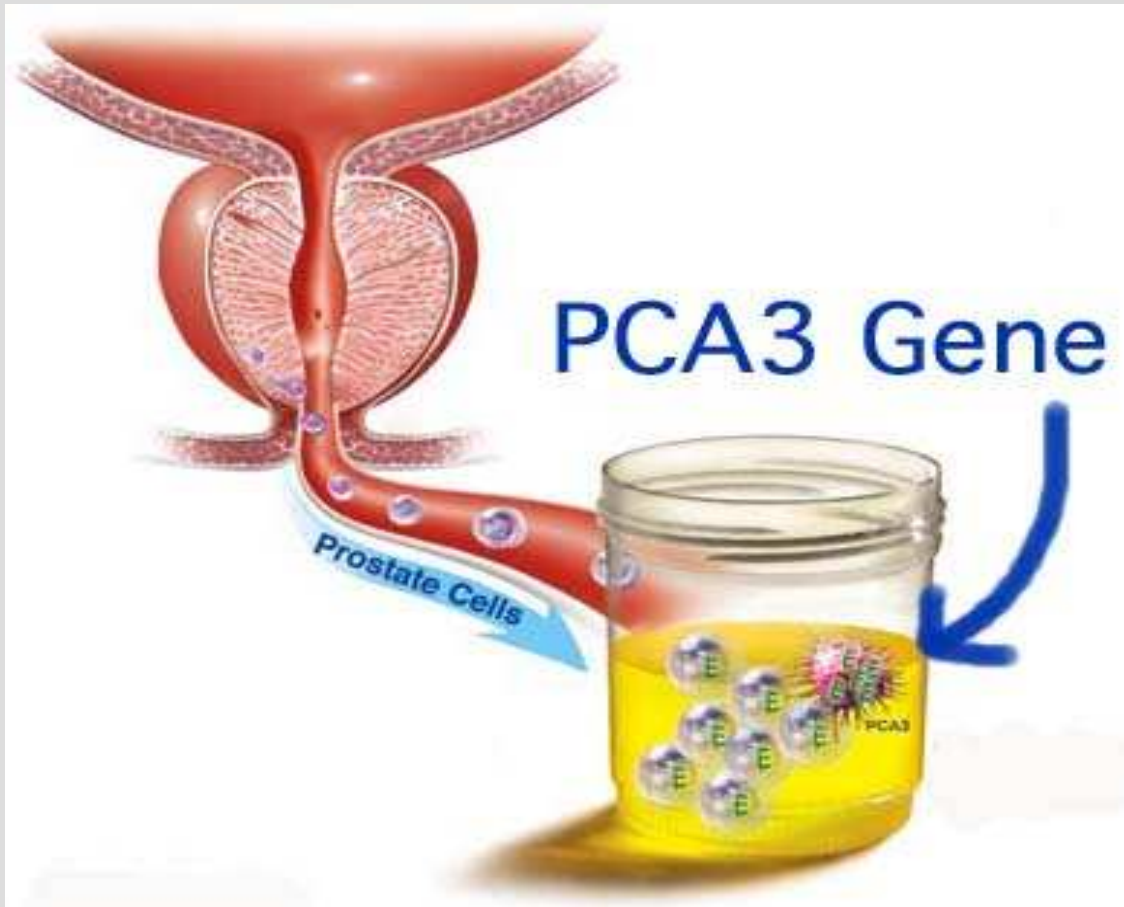
## Neuer genetischer Test –

### Prostata Carcinom Gen 3 Bestimmung

Das Prostatakrebs-Gen 3 (PCA3) mRNA ist bei mehr als 95% der Prostatakarzinom-Patienten im Vergleich zu gutartigen Prostataerkrankungen **spezifisch** erhöht exprimiert

Der Test wird mit RNA aus Harn durchgeführt

# Detection of Prostate Cancer Cells in Normal Cell Background



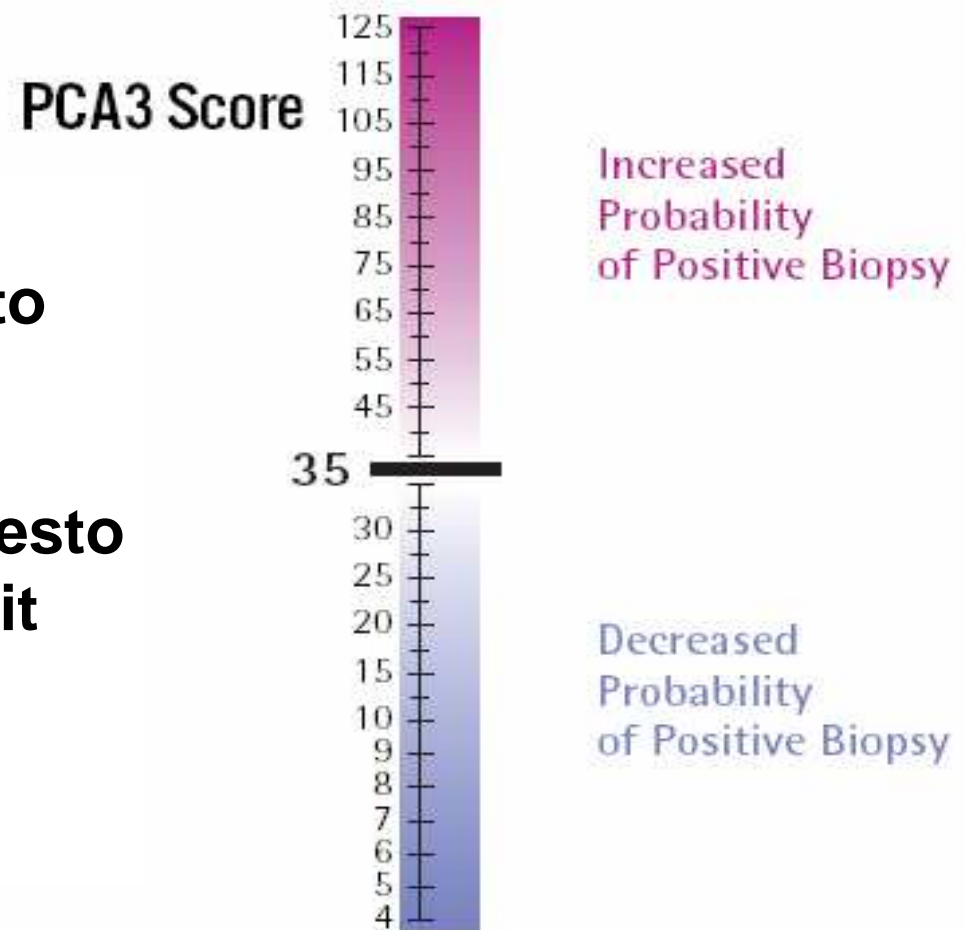
- PCA3 is only expressed by prostate cells
- The PCA3 signal is normalized against the presence of PSA mRNA
- This produces the **PCA3 Score**

$$\frac{\text{PCA3 c/ml}}{\text{PSA c/ml}} \times 1000 = \text{PCA3 Score}$$

# Interpretation des PCA3 Score

**Je höher der PCA3 Score, desto höher die Wahrscheinlichkeit einer positiven Biopsie**  
**Je niedriger der PCA3 Score desto geringer die Wahrscheinlichkeit einer positiven Biopsie**

**Beste Cut off laut Studien: 35**



# PCA3 Test

---

- wertvolles Werkzeug zur Unterstützung der Diagnostik und zur Einschätzung der Wahrscheinlichkeit einer positiven Biopsie
- kostspielige Nachkontrollen sowie potentiell gefährdende Biopsien in einem hohen Prozentsatz der Patienten vermeiden
- Verbesserung der diagnostischen Spezifität!

# PCA3 Test

---

**In the setting of prior negative biopsies, PCA3 was independently associated with prostate cancer in a multivariable model.**

**PCA3 is a valuable tool in assessing the risk of prostate cancer on repeat biopsy.**

**Wu AK et al. Utility of PCA3 in patients undergoing repeat biopsy for prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2011**

**Rückfragen:**

**christine.mannhalter@meduniwien.ac.at**

**Danke für Ihre Aufmerksamkeit!**

