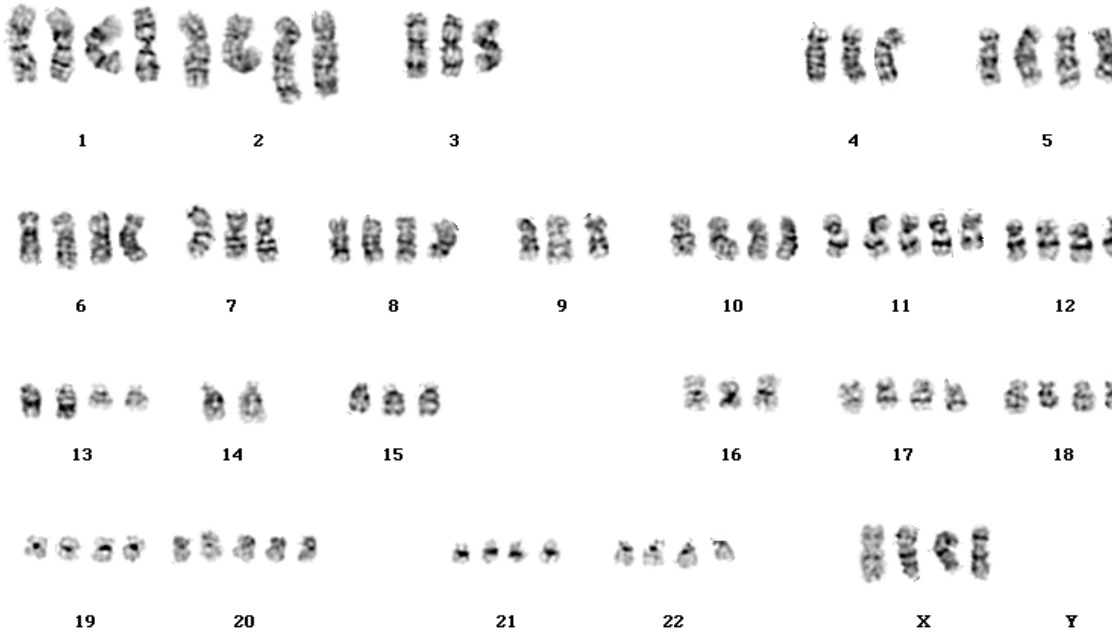


Chromosomale Veränderungen in der Tumodiagnostik: Bedeutung und neue Anforderungen an die Qualitätssicherung

**Prof. Dr. Beat Schäfer
Laborleiter Onkologie
Universitäts-Kinderkliniken Zürich**

Molekulare Diagnostik, 4. März 2010

Genetische Merkmale von Tumorzellen

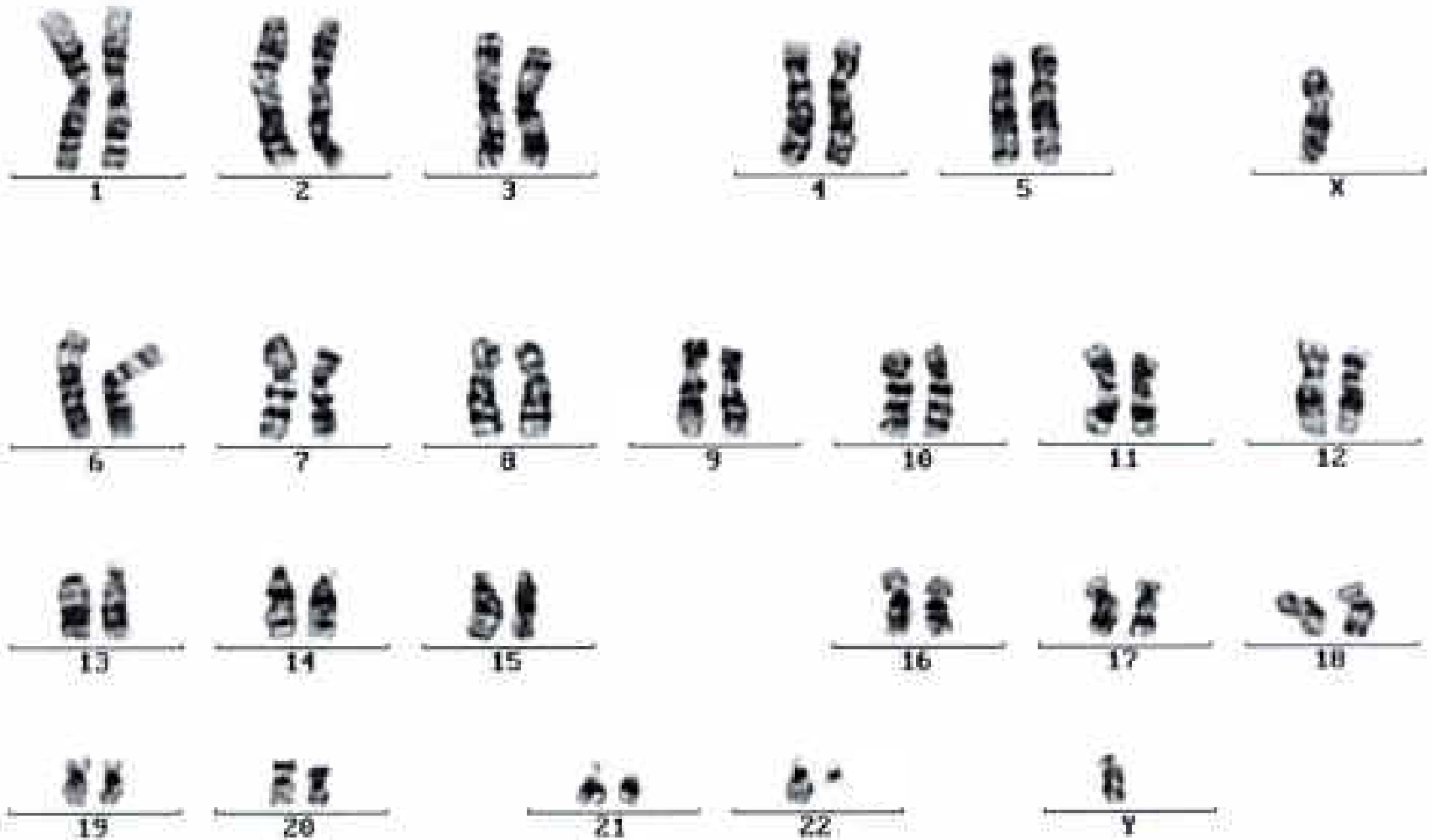


Fusion Gene Translocations

ALL	TEL/AML
RMS	PAX3/FKHR
Ewings	EWS/FLI1
Synovial	SYT/SSX
CML	BCR/ABL
APL	PML/RARA
Thyroid	RET/PTC1
Prostate	TMPRSS2/ETS



Chromosomale Veränderungen in Krebszellen

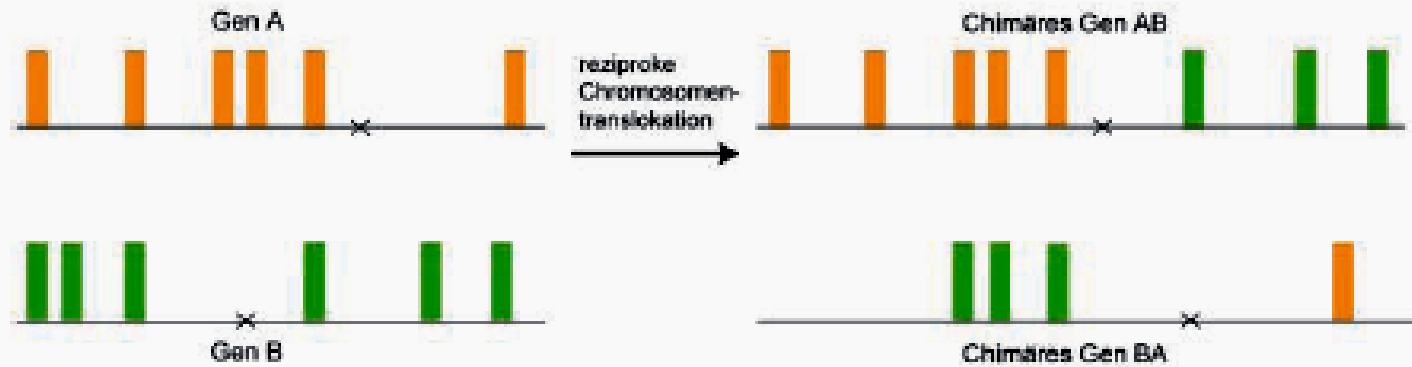


→ Chromosomale Translokationen

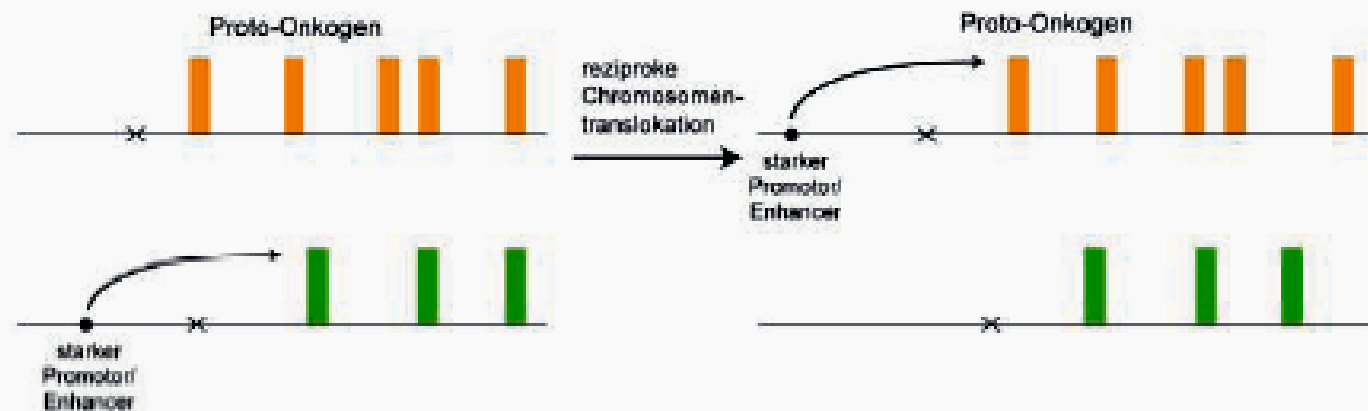


Funktionelle Auswirkungen einer Translokation

a Neuartige onkogene Fusionsgene



b Aktivierung eines zellulären Proto-Onkogens

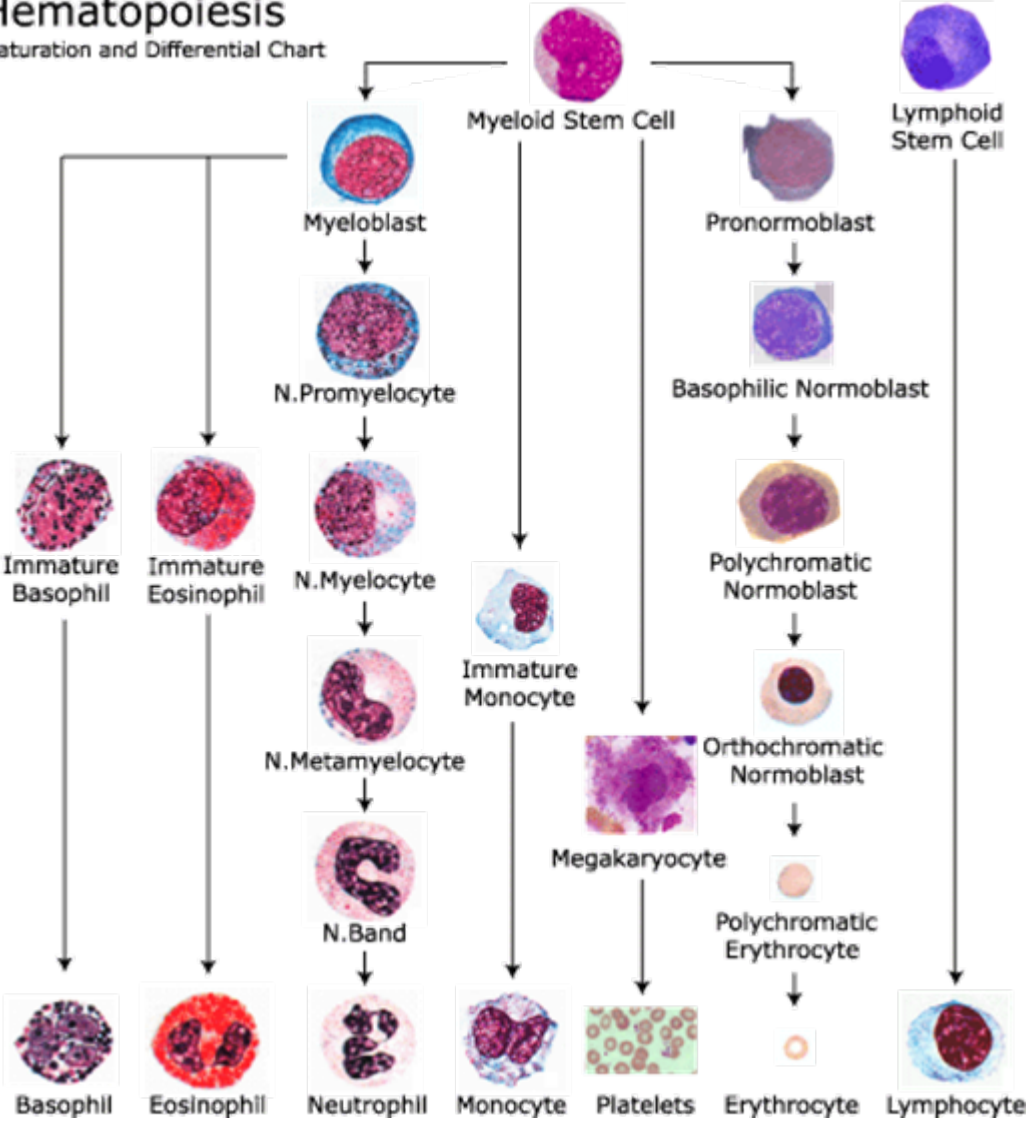


Leukämie bei Zwillingen

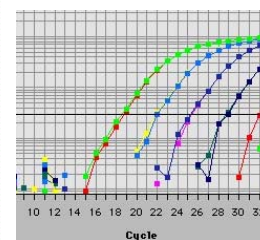
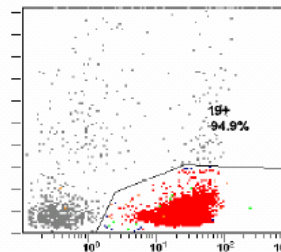
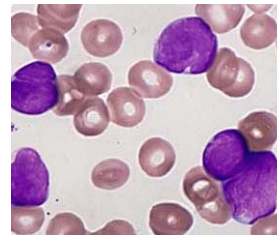
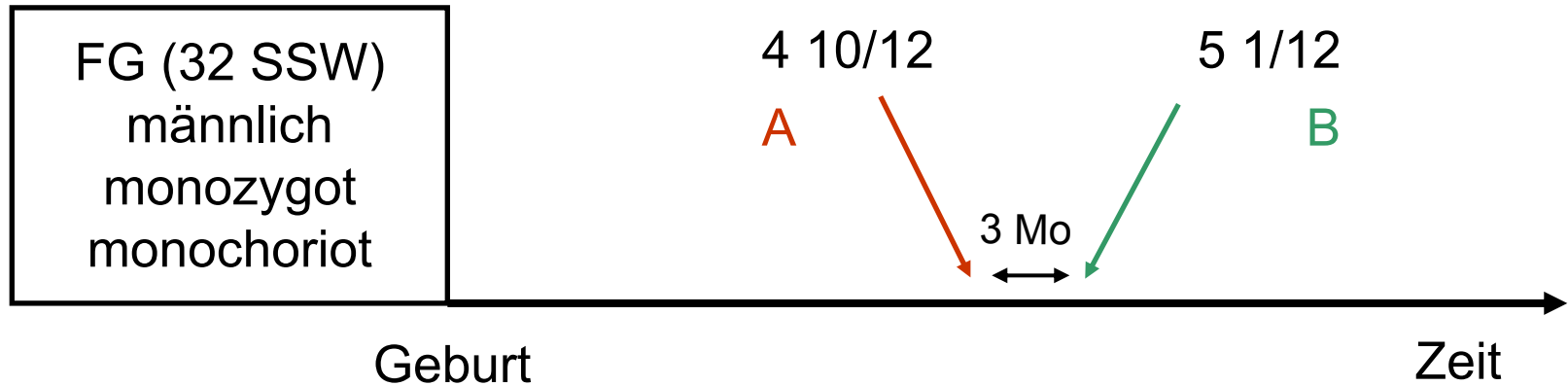
- **Diagnostik**
- **Genetische Ursachen**
- **Ursprung**

Hematopoiesis

Maturation and Differential Chart



Fallbeschreibung



akute lymphoblastische Leukämie
prä-B Immunphänotyp
TEL-AML1 Fusion

Labor-diagnostische Untersuchungen bei Leukämien

- **Histologie**
- **FACS**
- **Zytogenetik/FISH**
- **Molekulare Genetik**

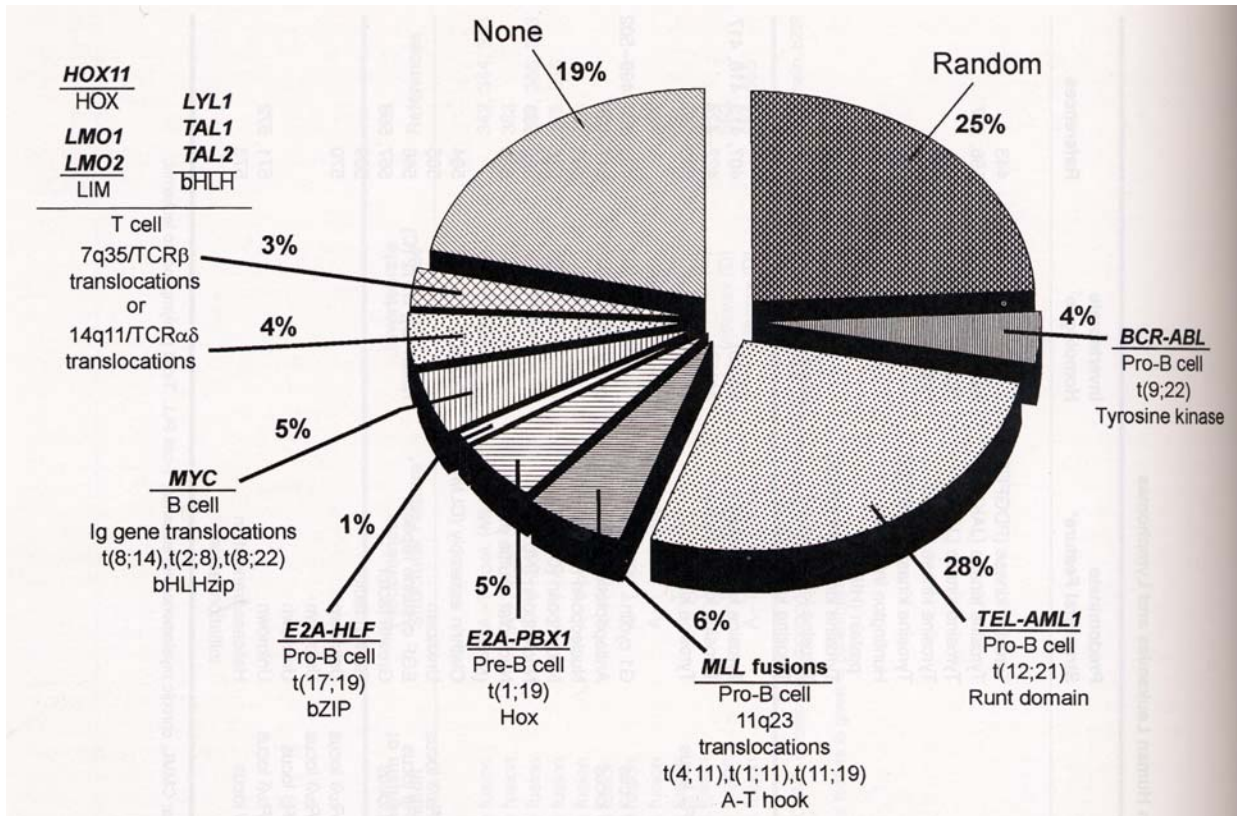


Häufigkeit der Translokationen

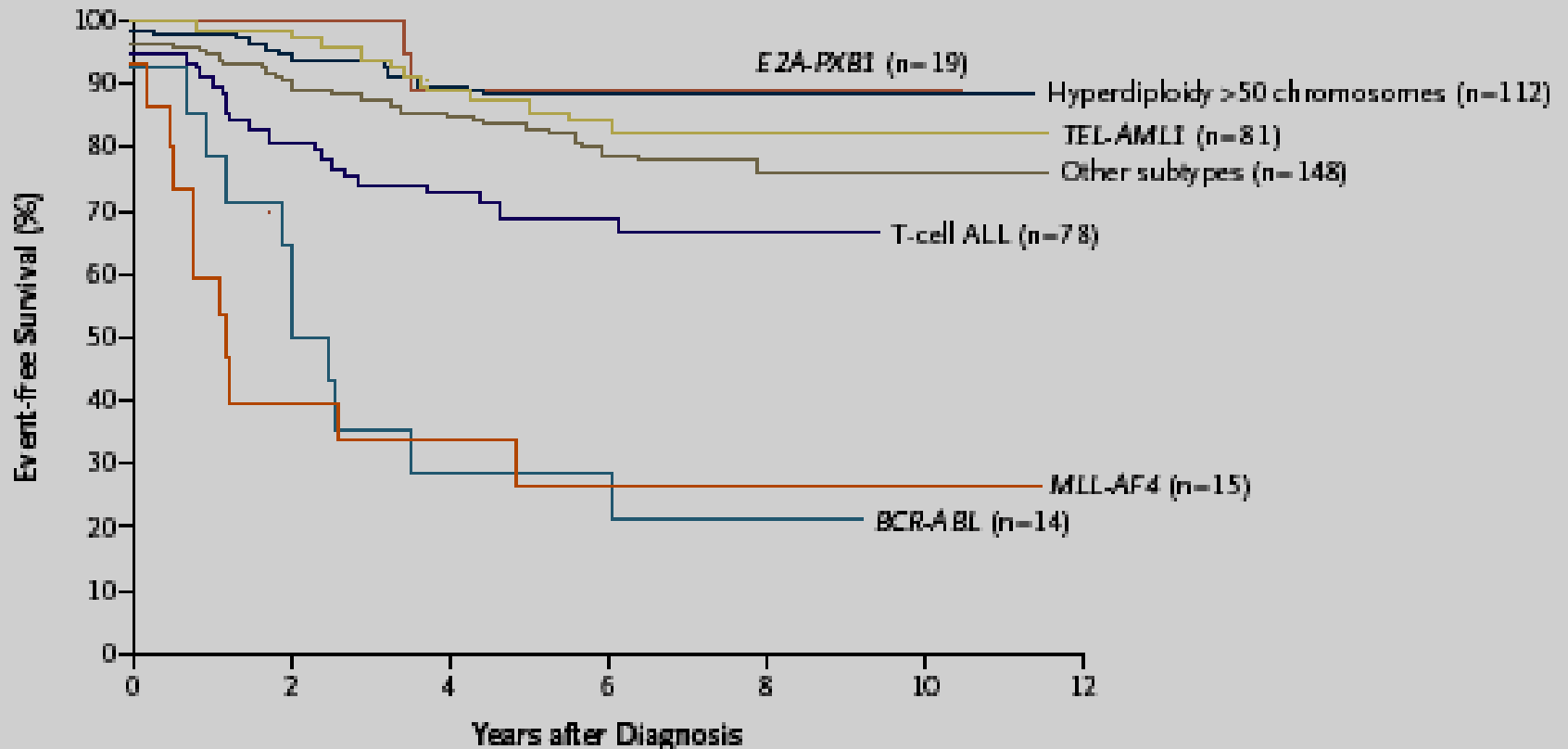
t(12;21)(p13;q22)

↑ ↑ ↑

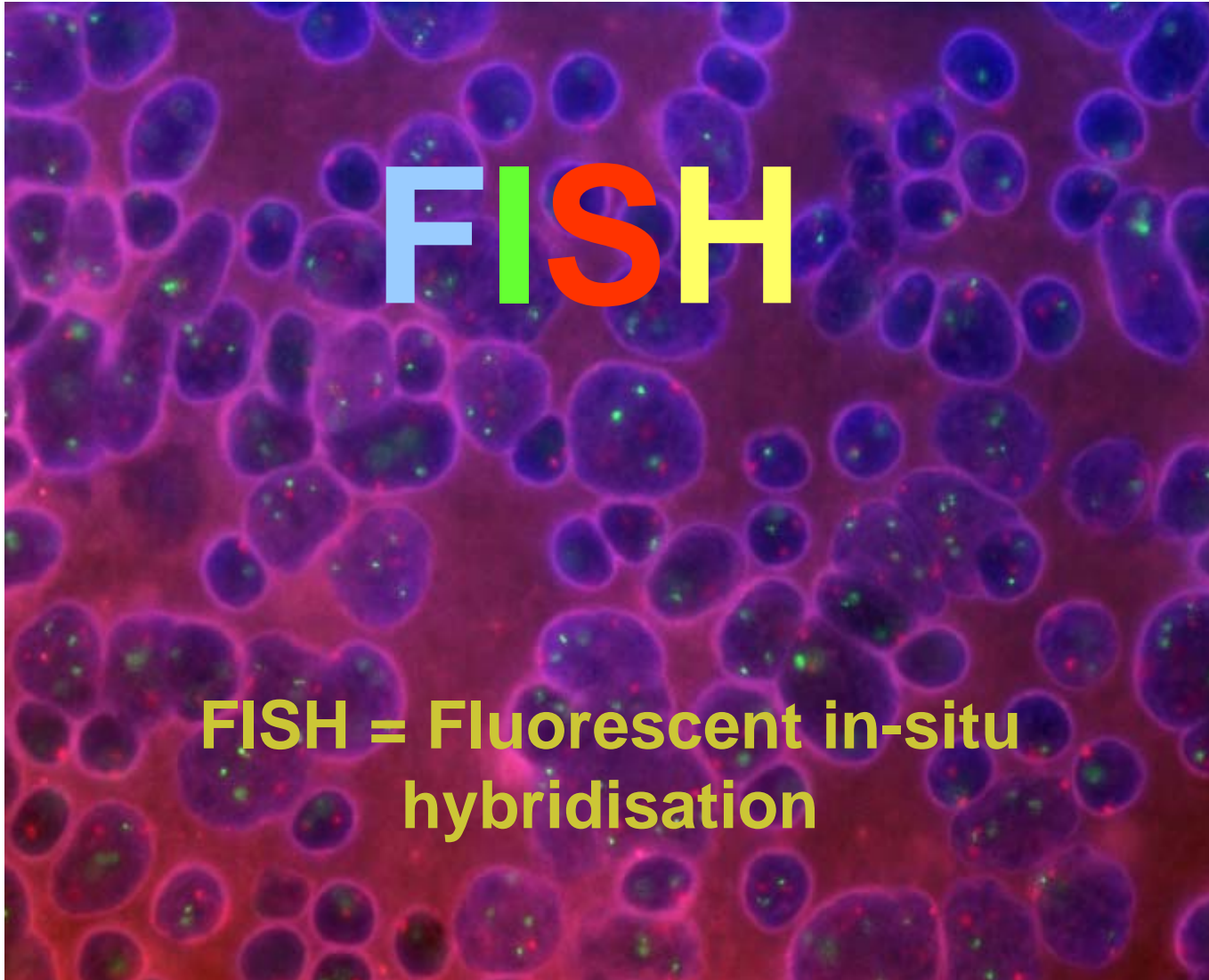
Chromosom Arm Band



Chromosomale Veränderungen und Überleben



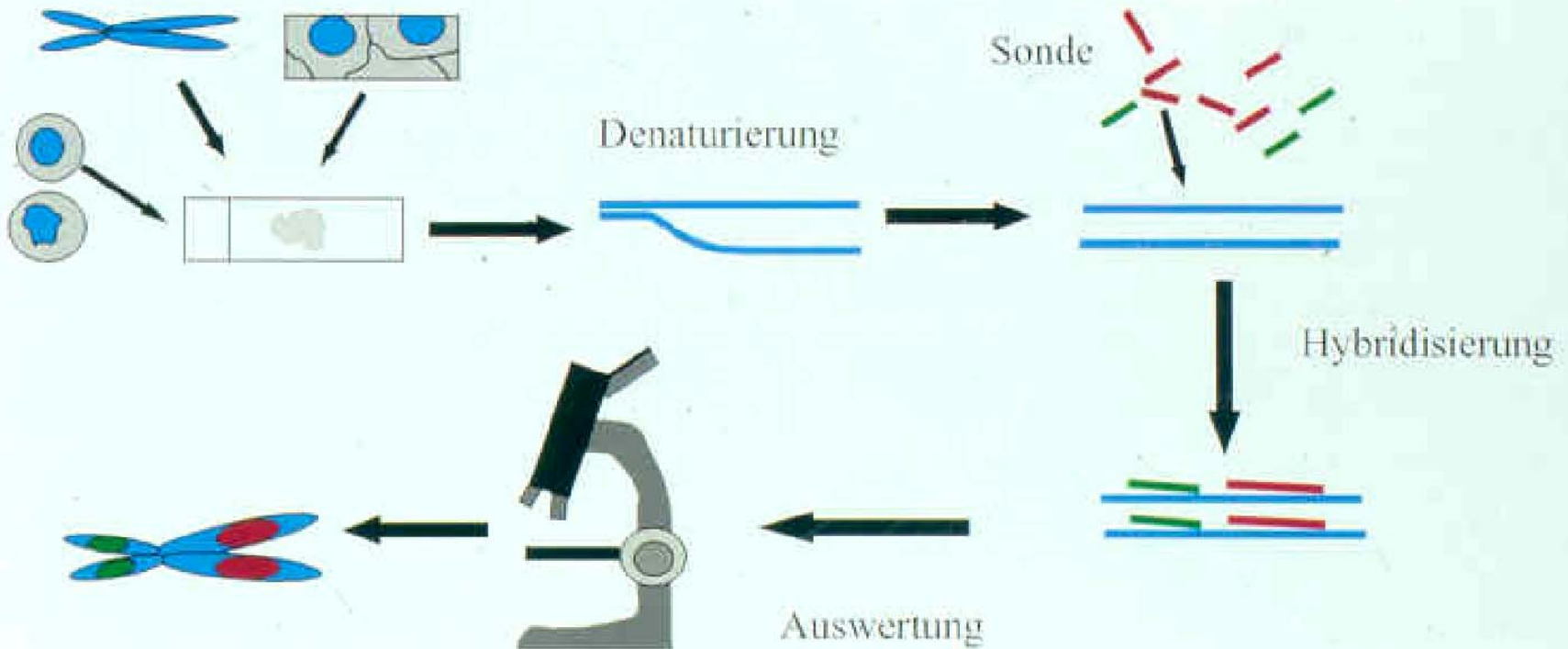
Nachweis von chromosomale Veränderungen



**FISH = Fluorescent in-situ
hybridisation**

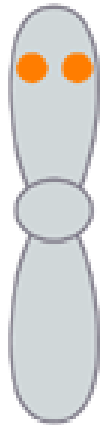
Principle of FISH

Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)



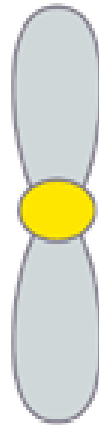
FISH probes

a



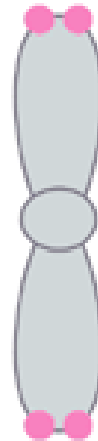
Gene-specific probe

b



Centromeric probe

c



Telomeric probe

d



Chromosome-painting probe

Repetitive-sequence probes

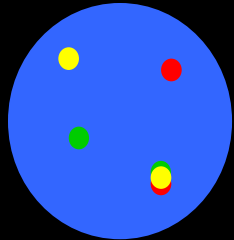
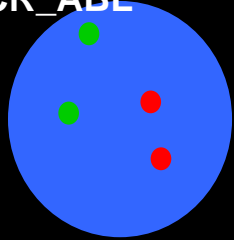
Examples of different types of fluorescence in situ hybridisation (FISH) probes

Expert Reviews in Molecular Medicine © 2000 Cambridge University Press

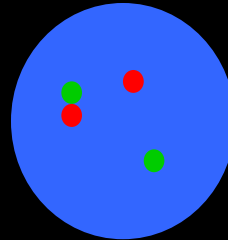
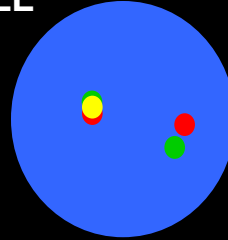


FISH-patterns

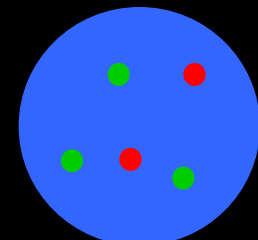
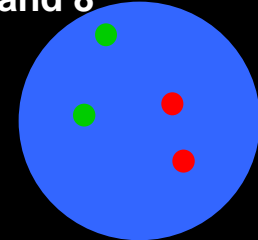
Dual color Double fusion,
i.e. BCR_ABL



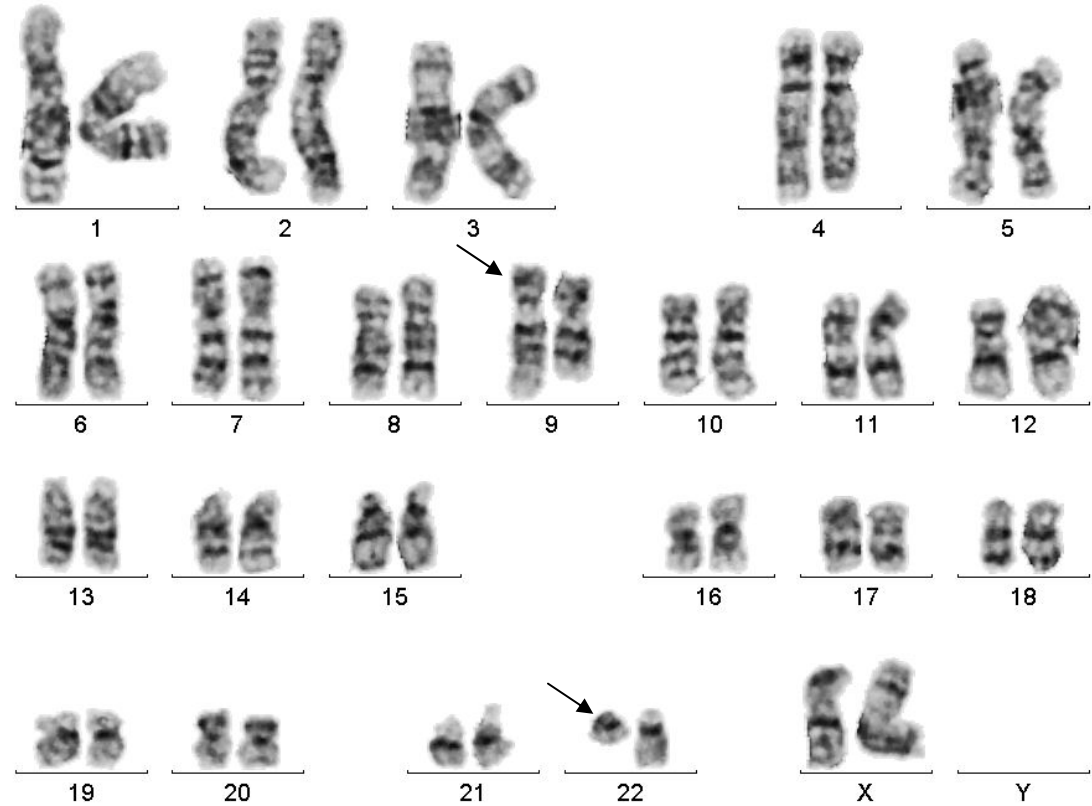
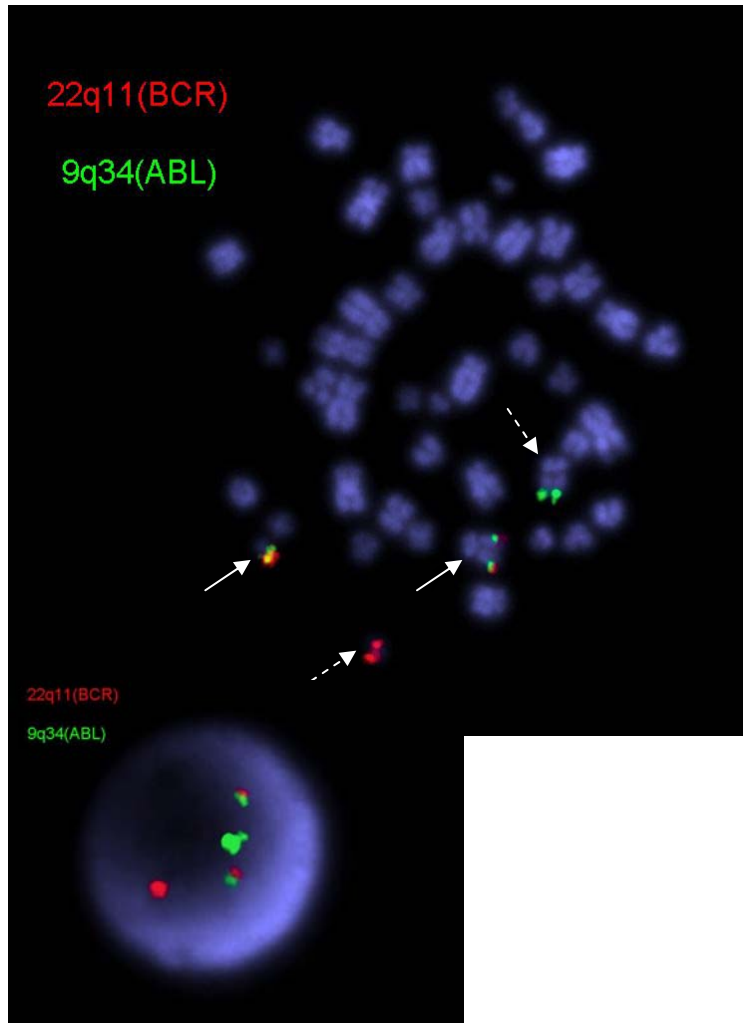
Dual color Break Apart,
i.e. MLL



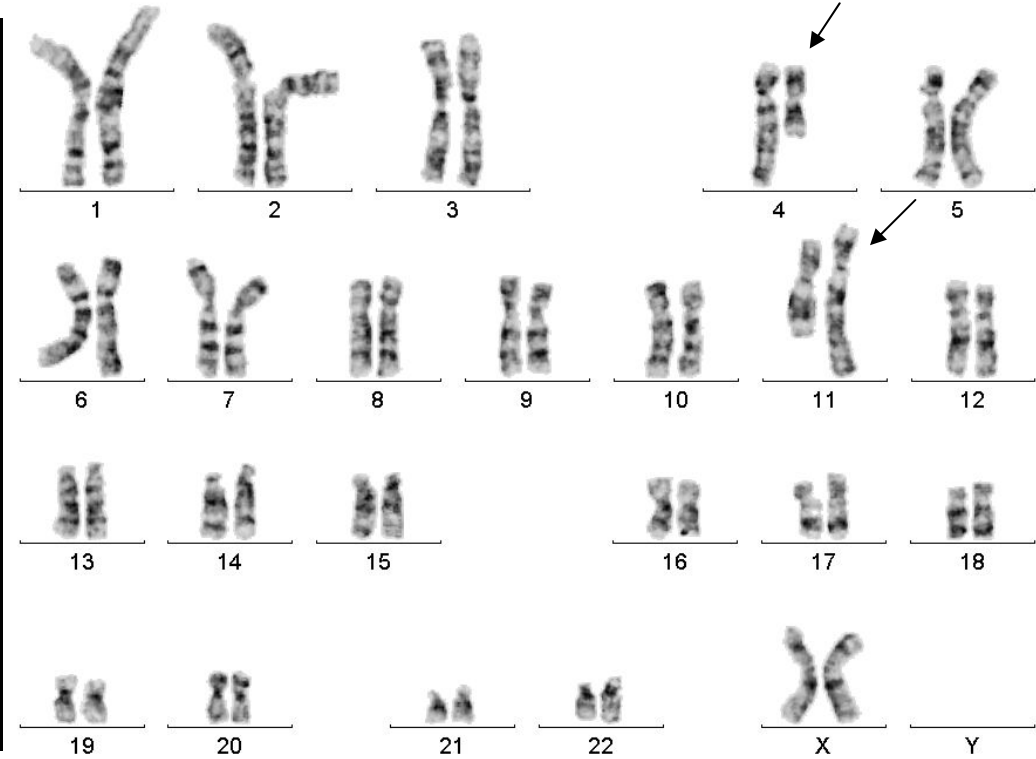
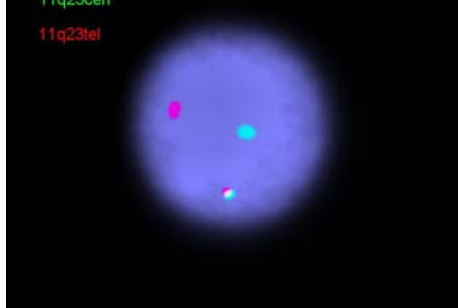
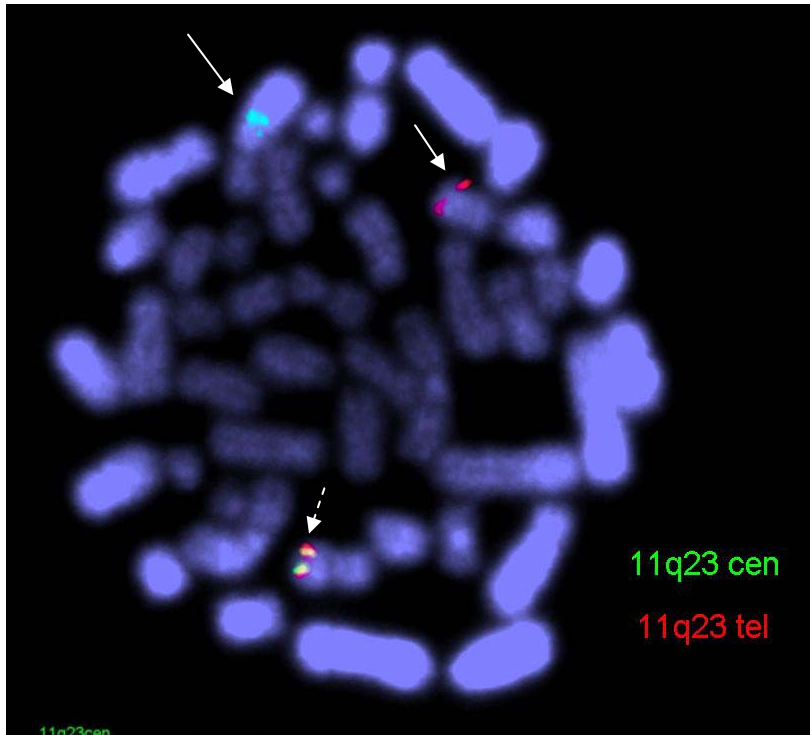
Two single color probes, i.e.
CEP7 and 8



t(9;22)(q34;q11.2)



t(4;11)(q21;q23)



Ansprechen auf die Therapie auf drei Ebenen

- **hämatologisches Ansprechen**
(Normalisierung der peripheren Blutwerte und der Milzgröße)
- **zytogenetisches Ansprechen**
(Reduktion des Anteils Translokations-positiver Metaphasen im Knochenmark)
- **molekulares Ansprechen**
(Reduktion von Translokations-spezifischer RNA oder DNA)

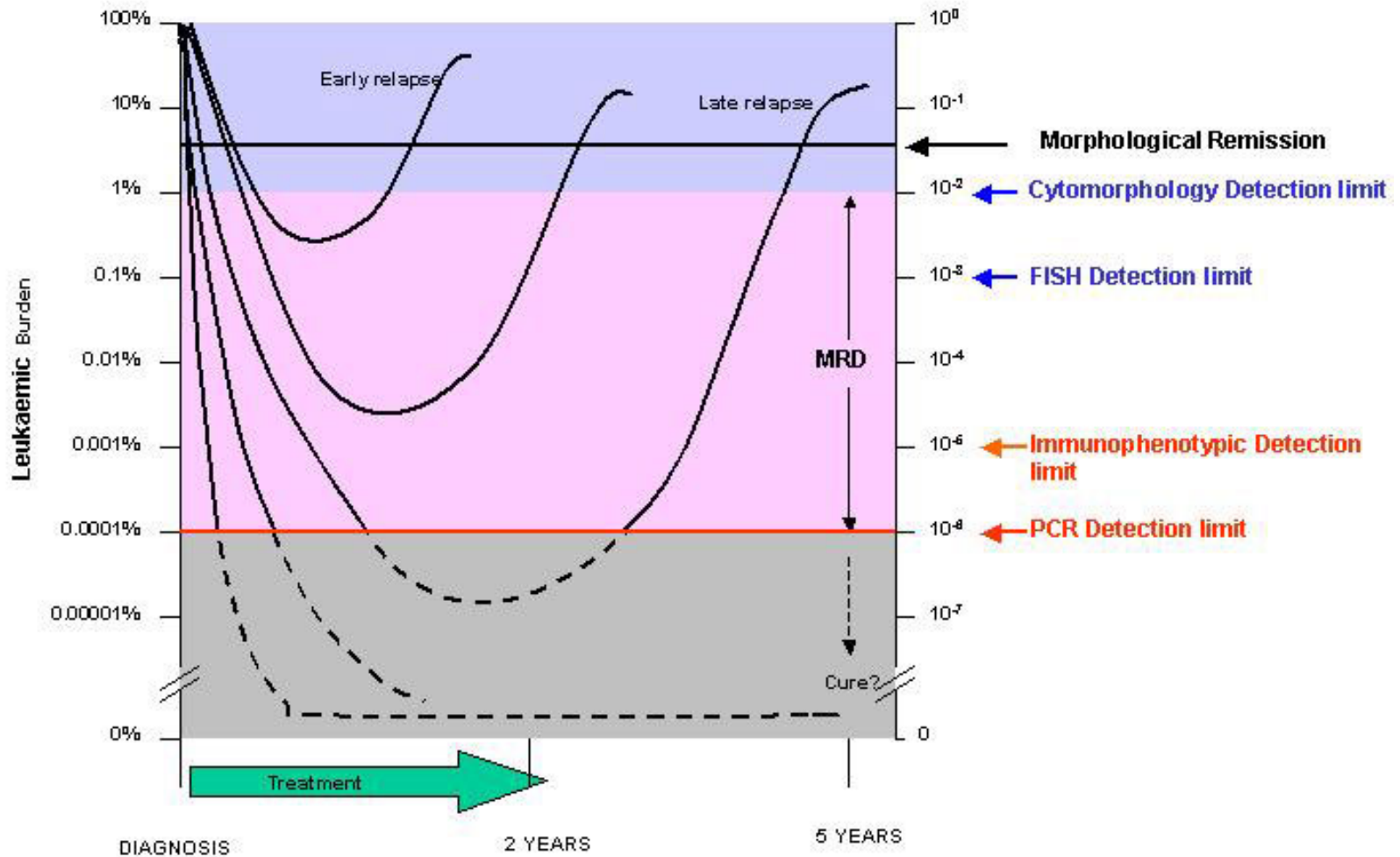


Minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD)

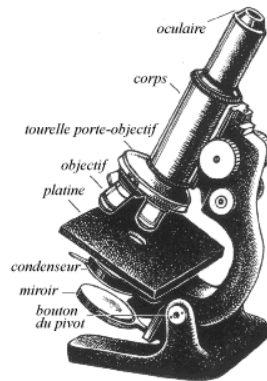
Die Messung der Resterkrankung kann zur Stratifizierung von Patienten nach dem Rezidivrisiko genutzt werden und dazu, risikostratifizierte oder individualisierte Therapieprotokolle anzuwenden.



Techniken zur Bestimmung der minimalen Resterkrankung



Sensitivität



microscope



new technique (RQ-PCR)

1 malignant cell in 100

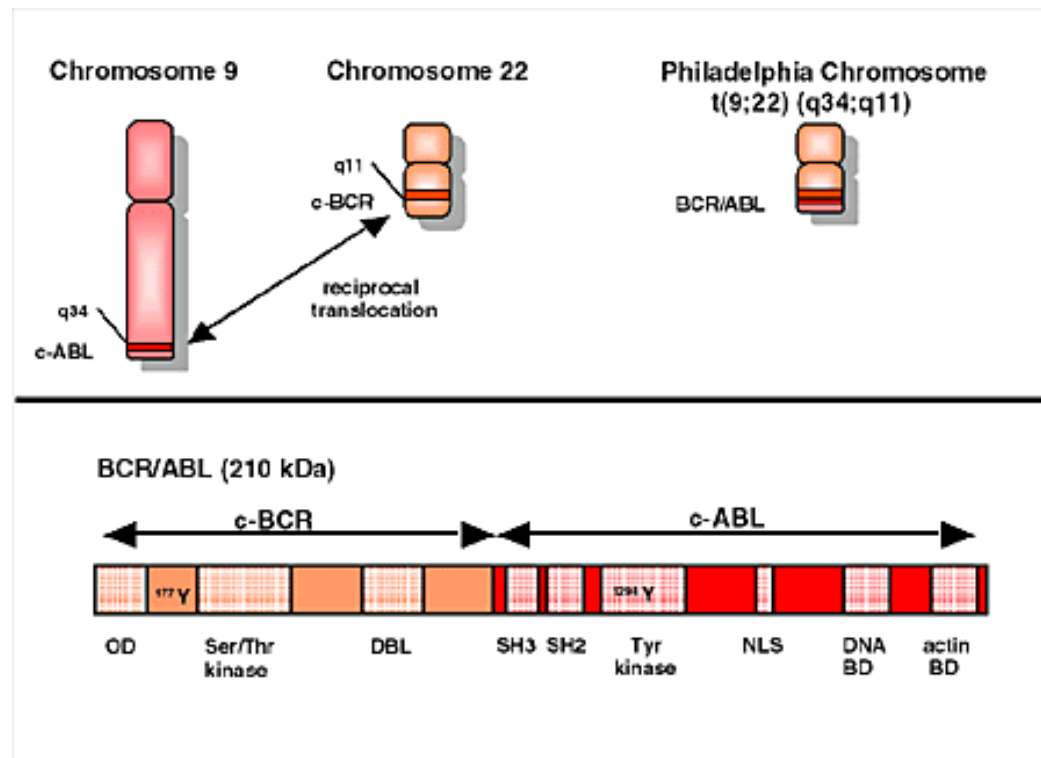
1 malignant cell in 100'000

Quantitative PCR zur Bestimmung der minimalen Resterkrankung

RNA oder DNA als Zielsequenz?



RNA als Zielsequenz: BCR/ABL (CML) als Beispiel



Leukemia (2008) 22, 96–102

© 2008 Nature Publishing Group All rights reserved 0887-6924/08 \$30.00

www.nature.com/leu

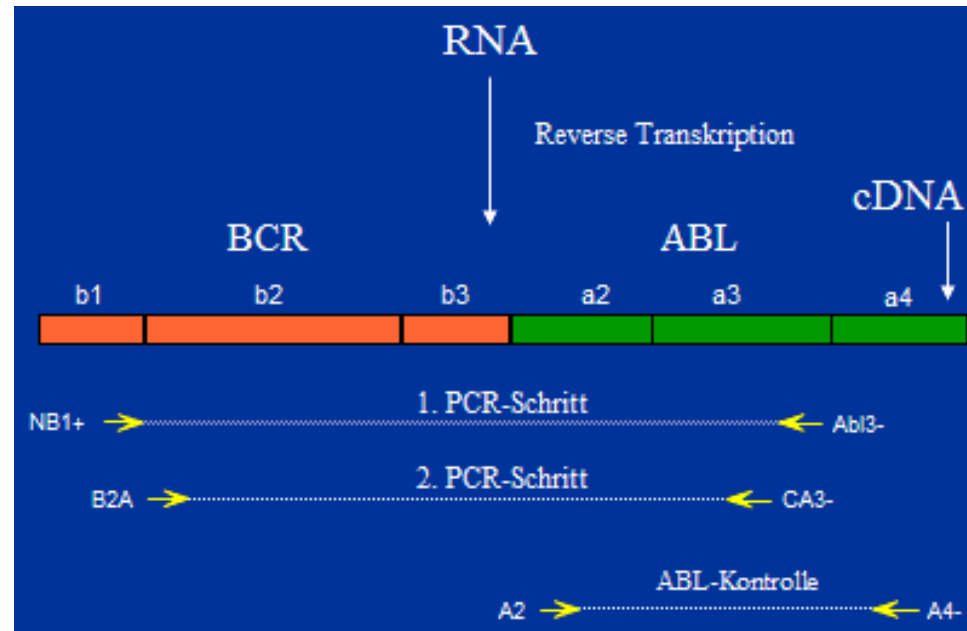
ORIGINAL ARTICLE

Harmonization of BCR-ABL mRNA quantification using a uniform multifunctional control plasmid in 37 international laboratories

MC Müller^{1,4}, P Erben^{1,4}, G Saglio², E Gottardi², CG Nyvold³, T Schenk¹, T Ernst¹, S Lauber¹, J Kruth¹, R Hehlmann¹ and A Hochhaus¹, on behalf of the European LeukemiaNet

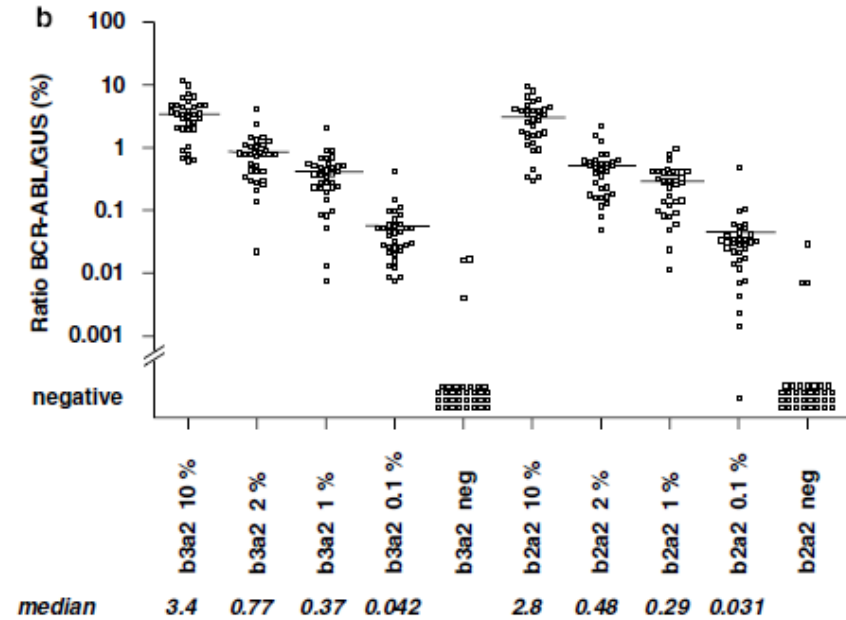
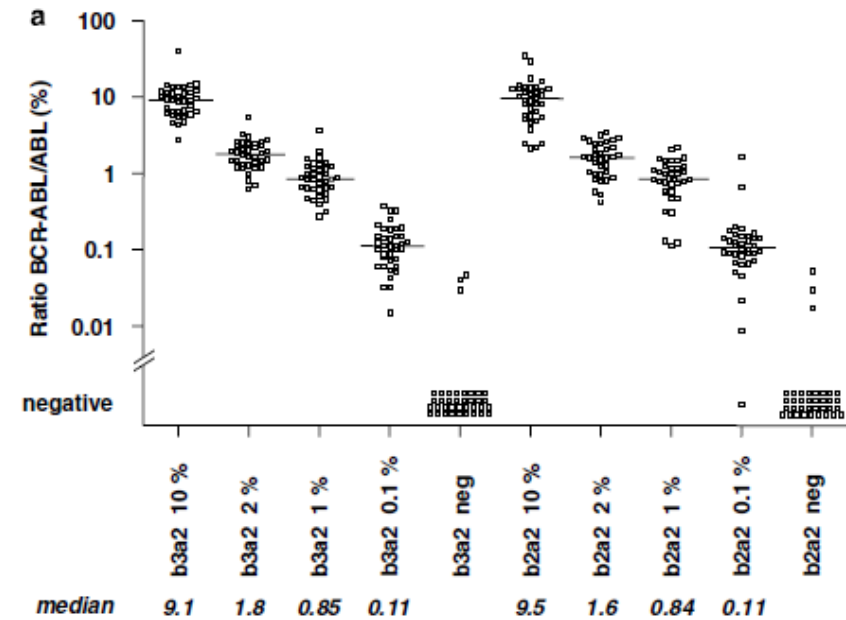


I. Quantifizierung mittels Kontrollplasmid



Kontrollplasmid

pCR 2.1-TOPO Vector ~3900 bp	b3a2 BCR-ABL Exons b1-a4 815bp	GUS Exons 10-12 487bp
---------------------------------	-----------------------------------	--------------------------



I. Quantifizierung mittels Kontrollplasmid : Vergleichbarkeit

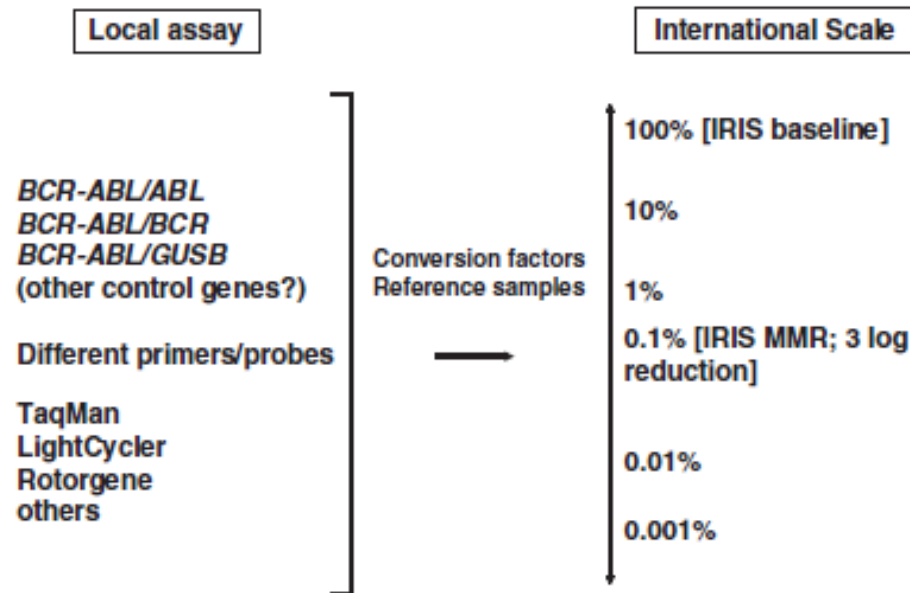
Leukemia (2009) 23, 1957-1963
© 2009 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0887-6924/09 \$32.00
www.nature.com/leu

SPOTLIGHT REVIEW

Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe

MC Müller¹, NCP Cross², P Erben¹, T Schenk¹, B Hanfstein¹, T Ernst^{1,2}, R Hehlmann¹, S Branford³, G Saglio⁴ and A Hochhaus^{1,5}

¹III. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany; ²National Genetics Reference Laboratory, Salisbury District Hospital and University of Southampton School of Medicine, Salisbury, UK; ³Institute of Medical and Veterinary Science, Adelaide, Australia; ⁴Divisione di Medicina Interna e di Ematologia, Ospedale Università di Torino, Turin, Italy and ⁵Department Hematology/Oncology, Universitätsklinikum Jena, Jena, Germany



Schweizer Referenzlabor PD Dr. Elisabeth Oppliger, Inselspital Bern (SMH)

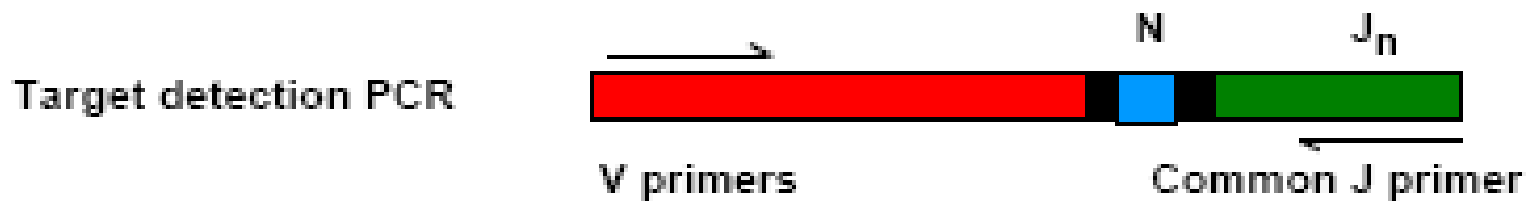
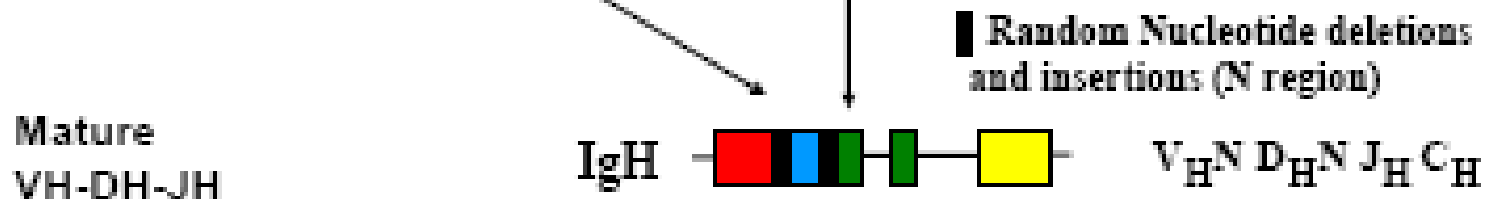
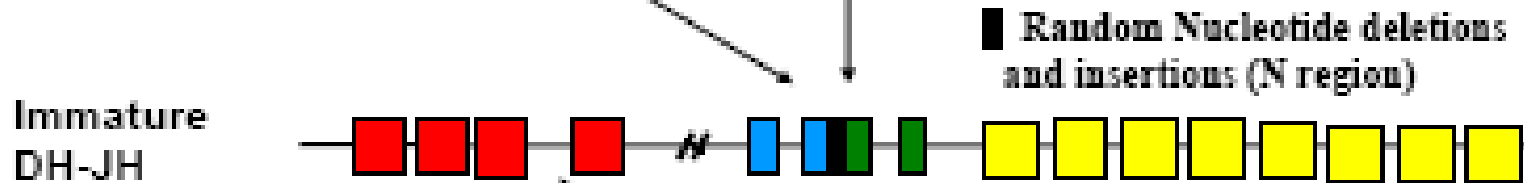
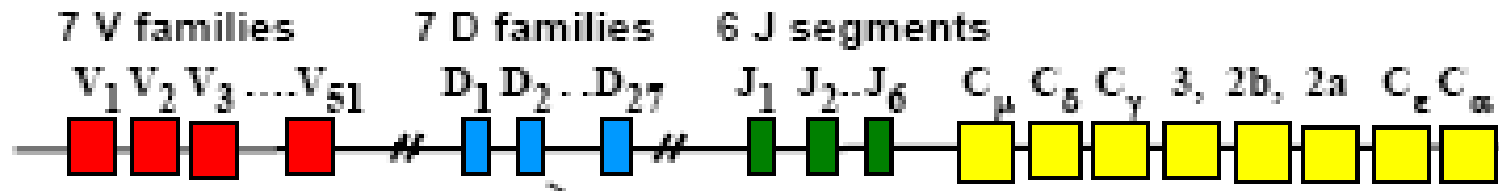
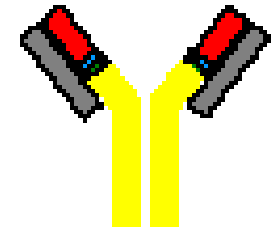


DNA als Zielsequenz: ALL als Beispiel

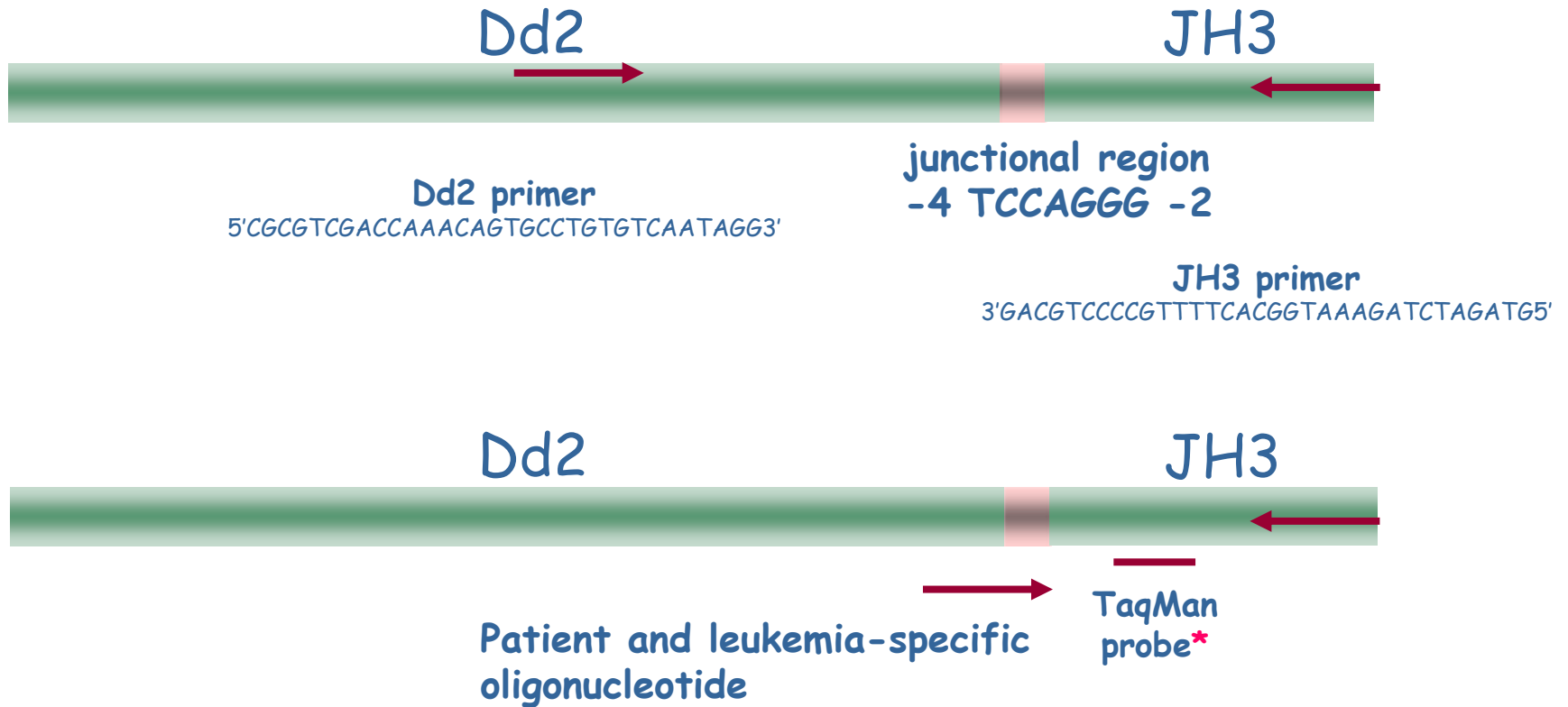
Welche chromosomalen Veränderungen können als Zielsequenzen für ein qPCR benutzt werden?



Immunoglobulin heavy chain gene (IGH) rearrangements and their PCR detection



Patienten- und Leukämie-spezifische Rearrangements



Zeitbedarf für MRD Analyse pro Patient

1. DNA preparation

(2-3 days)

- a. BM sampling at diagnosis (≥ 5 ml)
- b. MNC-density gradient separation (1×10^7 cells)
- c. Genomic DNA extraction ($\geq 10 \mu\text{g}$)

2. MRD PCR target identification

(1-2 weeks)

- a. PCR-heteroduplex analysis
- b. Sequencing of clonal rearrangements
- c. Sequence interpretation
- d. Selection of MRD-PCR targets

3. RQ-PCR design and sensitivity testing

(1-2 weeks)

- a. Design of allele-specific oligonucleotide primers
- b. RQ-PCR analysis of dilution series of diagnostic sample
- c. RQ-PCR data interpretation

4. MRD analysis of follow-up samples

(1-2 weeks)

- a. RQ-PCR analysis of follow-up samples (control gene)
- b. RQ-PCR analysis of follow-up samples (Ig/TCR targets)
- c. RQ-PCR data interpretation
- d. Calculation of MRD level



II. Quantifizierung relativ zum Diagnosezeitpunkt

Leukemia (2007) 21, 604-611

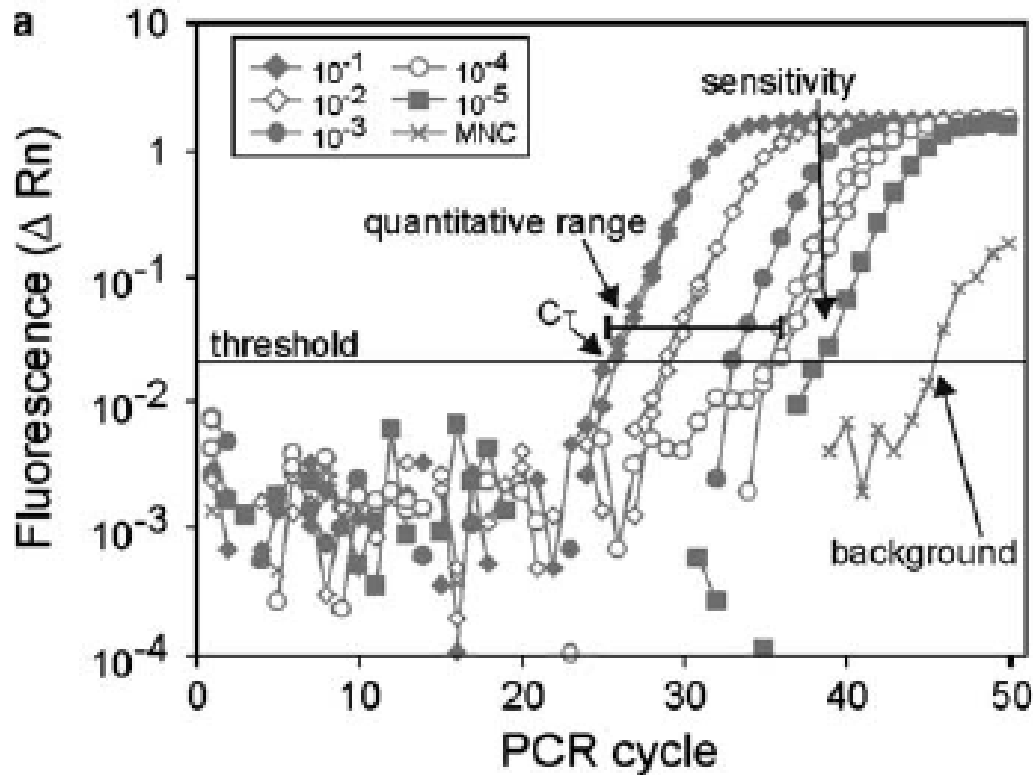
© 2007 Nature Publishing Group All rights reserved 0887-6924/07 \$30.00

www.nature.com/leu

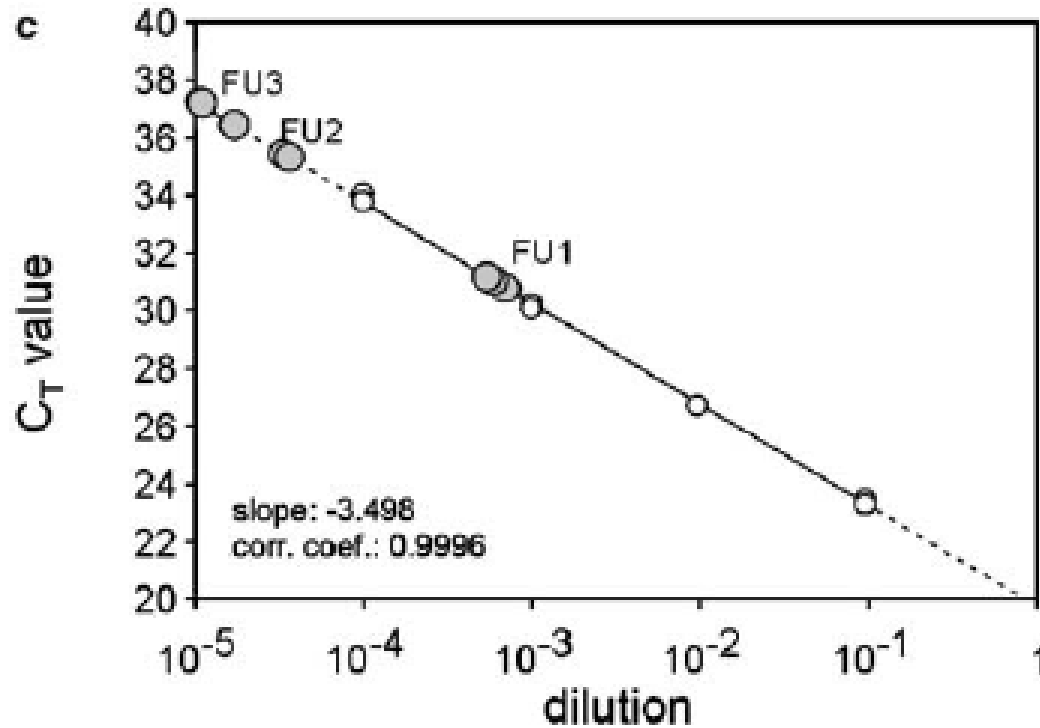
LEADING ARTICLE

Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data

VHJ van der Velden¹, G Cazzaniga², A Schrauder³, J Hancock⁴, P Bader⁵, ER Panzer-Grumayer⁶, T Flohr⁷, R Sutton⁸, H Cave⁹, HO Madsen¹⁰, JM Cayuela¹¹, J Trka¹², C Eckert¹³, L Foroni¹⁴, U zur Stadt¹⁵, K Beldjord¹⁶, T Raff¹⁷, CE van der Schoot¹⁸ and JJM van Dongen¹, on behalf of the European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL)



II. Quantifizierung relativ zum Diagnosezeitpunkt: Standardkurve



II. Quantifizierung relativ zum Diagnosezeitpunkt: Kriterien zur Bestimmung des quantitativen Bereichs

Quantitativer Bereich

- Spezifische Amplifikation
- Reproduzierbare Amplifikation = $\Delta C_T \leq 1.5$
- Alle C_T Werte ≥ 3.0 kleiner als kleinster Wert des Backgrounds
- Muss im Bereich 2.6 – 4.0 der letzten 10fach oder 0.5 – 1.5 der letzten 2fach Verdünnung liegen
- Die abgeleitete **Standardkurve** muss:
 - drei Verdünnungsstufen
 - mindestens 2 log Stufen umfassen
 - mit einer Steigung von -3.1 bis -3.9
 - und einem Korrelationskoeffizient von ≥ 0.98



II. Quantifizierung relativ zum Diagnosezeitpunkt: Kriterien zur Bestimmung der Sensitivität

Sensitivität des Assays

- Spezifische Amplifikation
- Mindestens ein positives Replikat
- der niedrigste C_T Werte ≥ 1.0 kleiner als kleinster Wert des Backgrounds



II. Quantifizierung relativ zum Diagnosezeitpunkt: Kriterien zur Bestimmung der Positivität

Positivität bei Therapiereduktion (keine falsch-negativen)

- ein C_T Wert ≥ 1.0 kleiner als kleinster Wert des Backgrounds
- der C_T Wert ist nicht weiter als 4.0 vom höchsten Wert der Sensitivität entfernt

Positivität bei Therapieintensivierung (keine falsch-positiven)

- ein C_T Wert ≥ 3.0 kleiner als kleinster Wert des Backgrounds
- der C_T Wert ist nicht weiter als 4.0 vom höchsten Wert der Sensitivität entfernt





41 Laboratorien
17 Länder
Seit 8 Jahren (QC 17)

Leukemia (2007) 21, 604–611
© 2007 Nature Publishing Group All rights reserved 0887-6924/07 \$30.00

www.nature.com/leu

LEADING ARTICLE

Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data

VHJ van der Velden¹, G Cazzaniga², A Schrauder³, J Hancock⁴, P Bader⁵, ER Panzer-Grumayer⁶, T Flohr⁷, R Sutton⁸, H Cave⁹, HO Madsen¹⁰, JM Cayuela¹¹, J Trka¹², C Eckert¹³, L Foroni¹⁴, U zur Stadt¹⁵, K Beldjord¹⁶, T Raff¹⁷, CE van der Schoot¹⁸ and JJM van Dongen¹, on behalf of the European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL)

Zielsequenzen:

- **B-ALL** IGH > IGK > TCRD > TCRG
- **T-ALL** TCRD/TCRB > IGH (D-J) > TCRG

Klinische Studien:

- **AIEOP-BFM 2000**
- **GRAALL 2005**
- **AIEOP-BFM 2009**



Quantitatives PCR zur Bestimmung der minimalen Resterkrankung

Klinische Bedeutung



Stratifizierung auf der Basis von PCR-MRD

Identifizierung von MRD Zielsequenzen



Mindestens 2 Zielsequenzen identifiziert



2 sensitive Ziele (≤ -4)



Genügend Material für Quantifizierung
Zeitpunkt 1 (Tag 33) und 2 (Woche 12)

ZP1 und ZP2:
negativ

SR

ZP1: positiv
ZP2: MRD < -3

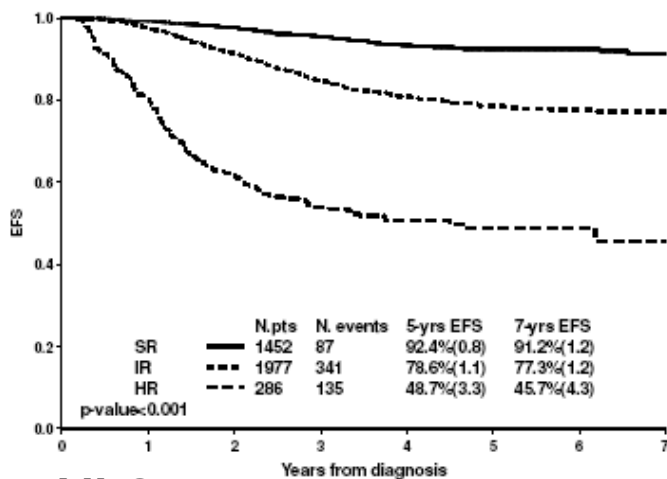
IR

ZP2: MRD ≥ -3
mit mind. 1 Ziel

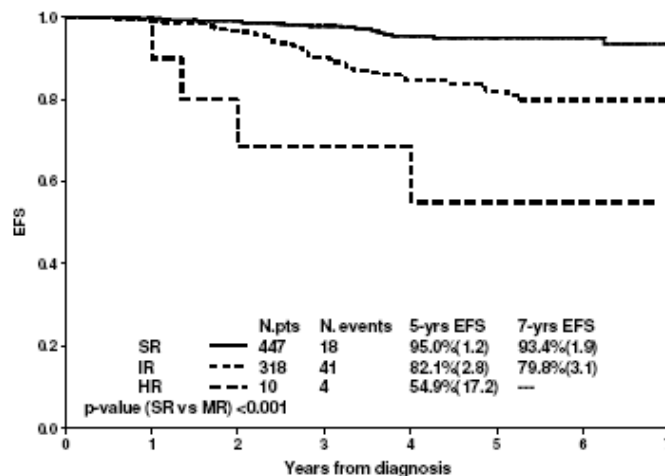
HR



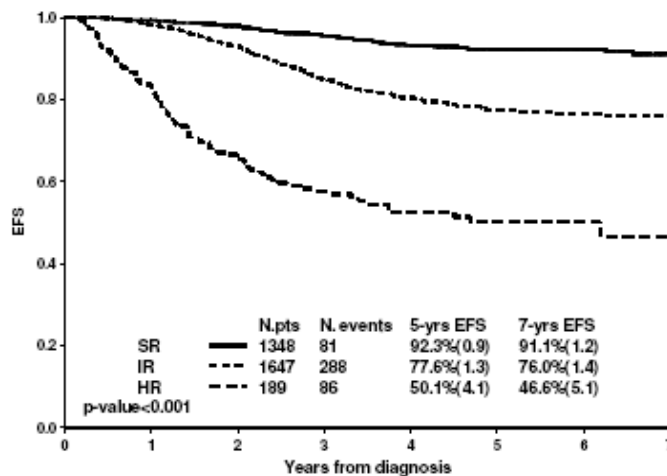
Prognose der MRD Gruppen in der Studie AIEOP-BFM ALL 2000 (prospektiv; Conter et al Blood 2010, February)



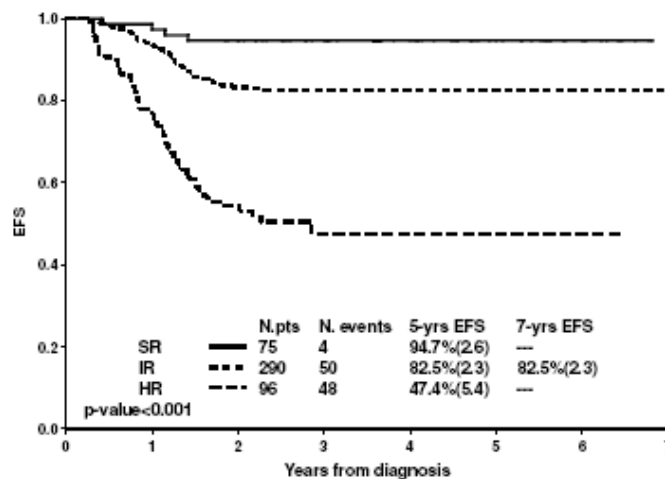
All Gruppen



TEL/AML1



B-ALL



T-ALL



Quantitatives PCR zur Bestimmung der minimalen Resterkrankung

MRD in soliden Tumoren??



MRD in soliden Karzinomen

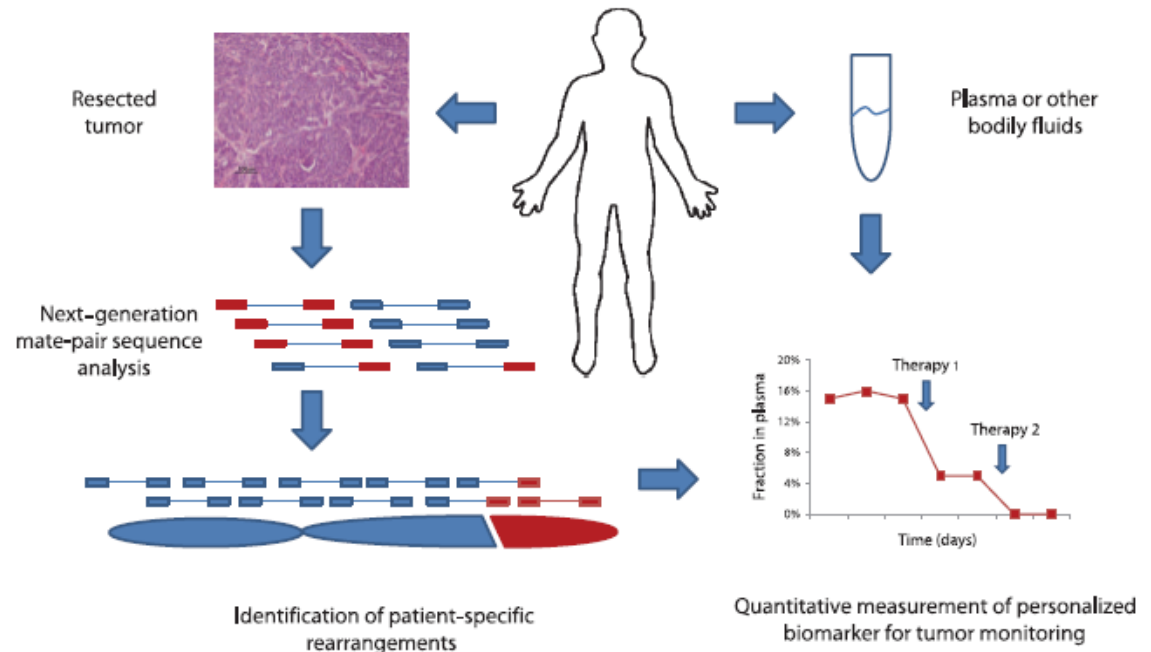
Science translational medicine:

Development of Personalized Tumor Biomarkers Using Massively Parallel Sequencing

Rebecca J. Leary,¹ Isaac Kinde,¹ Frank Diehl,¹ Kerstin Schmidt,¹ Chris Clouser,² Cisilya Duncan,² Alena Antipova,² Clarence Lee,² Kevin McKernan,² Francisco M. De La Vega,³ Kenneth W. Kinzler,¹ Bert Vogelstein,¹ Luis A. Diaz Jr.,¹ Victor E. Velculescu^{1*}

(Published 24 February 2010; Volume 2 Issue 20 20ra14)

Fig. 1. Schematic of PARE approach. The method is based on next-generation mate-paired analysis of resected tumor DNA to identify individualized tumor-specific rearrangements. Such alterations are used to develop PCR-based quantitative analyses for personalized tumor monitoring of plasma samples or other bodily fluids.



198 Mio 25 bp reads

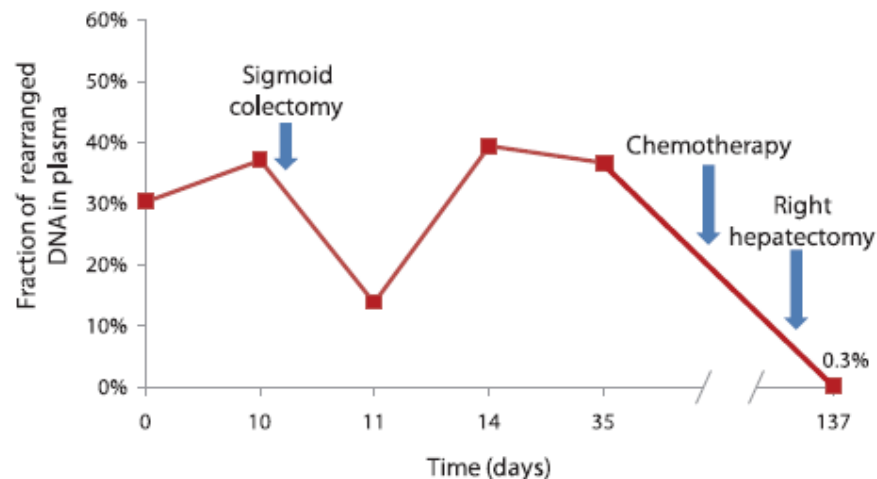


Chromosomale Veränderungen bei Brust und Darmkrebs

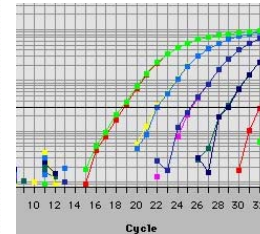
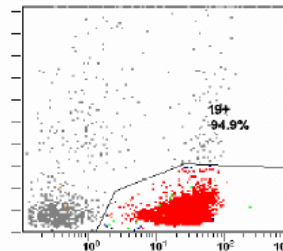
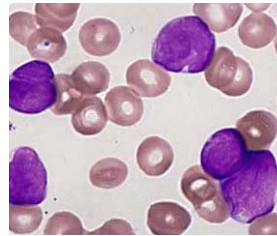
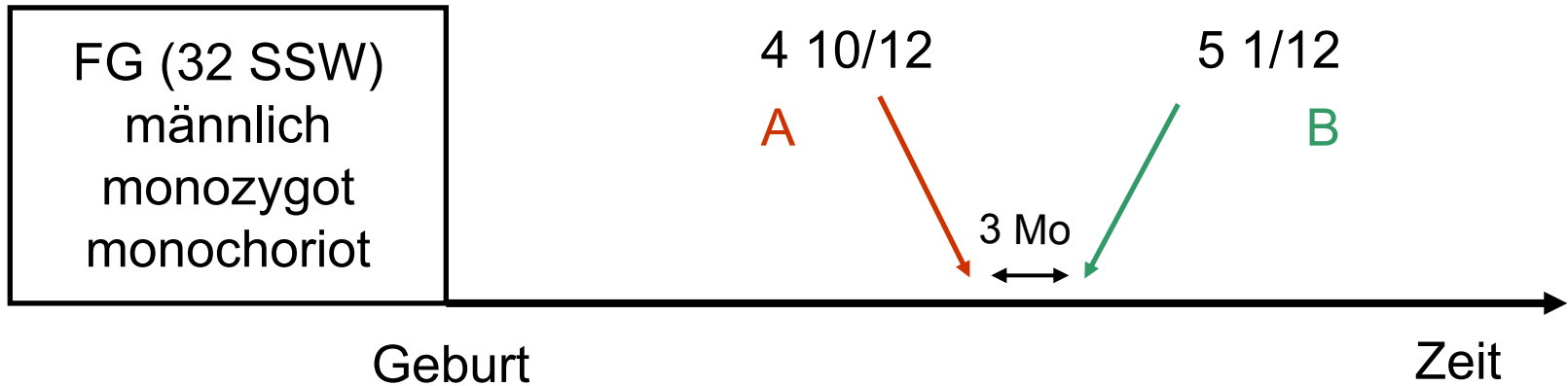
Table 2. Summary of rearrangements identified in tumor samples.

Sample	Rearrangement type		Total rearrangements	Tested rearrangements	Confirmed somatic rearrangements
	Intrachromosomal	Interchromosomal			
Tumor and normal libraries					
B5	7	4	11	7	5 (71%)
B7	17	4	21	16	15 (94%)
Co84	0	7	7	6	4 (67%)
Co108	6	12	18	13	11 (85%)
Tumor libraries					
Hx402	7	2	9	9	4 (44%)
Hx403	17	0	17	12	7 (58%)

PCR aus
peripherem Blut
(zirkulierende DNA)

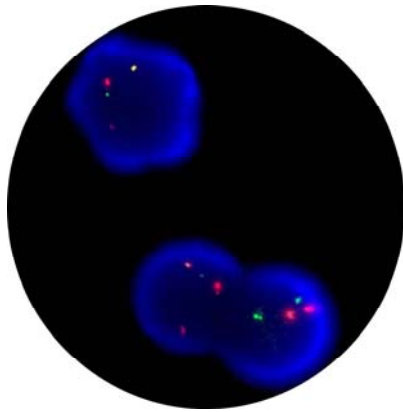


Leukämie bei Zwillingen

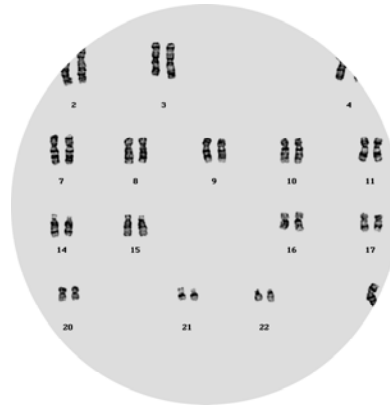


akute lymphoblastische Leukämie
prä-B Immunphänotyp
TEL-AML1 Fusion

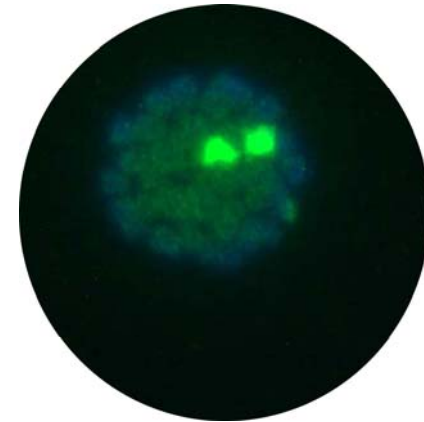
Zytogenetik



FISH



Karyotyp



Chr. 12 Färbung

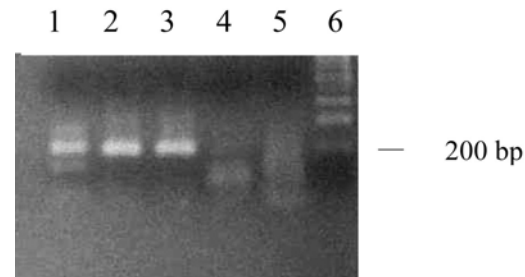
A: *TEL-AML1*, t(12;21)
46,XY,add(6)(q14~16)

B: *TEL-AML1*, t(12;21)
46,XY,del(12)(p13),add(19)(q13)

Das zweite, nicht-rearrangierte *TEL* Allel ist nur bei einem Zwilling deletiert

Die Leukämien haben die gleiche Ursprungszelle

<i>TEL</i>	gggttttgaagtggagtgaacttctattat
A + B	gggttttgaagtggagtgaacttctattatttcagttcctacataaaacctaaagttaagacctc
<i>AML1</i>	aaagttaagacctc

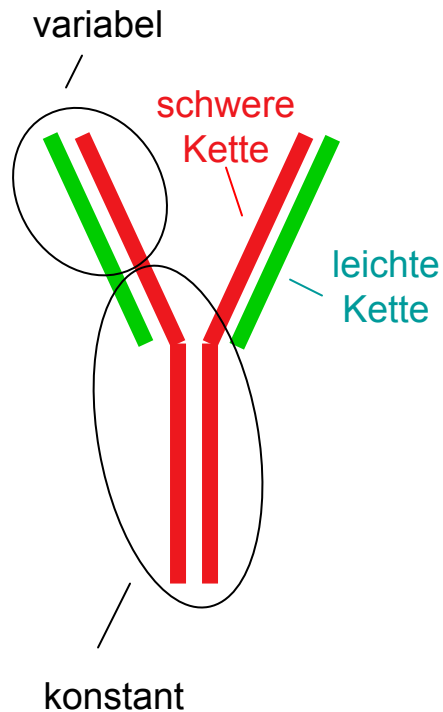


Guthrie-Karten

Die Zwillinge haben den identischen chromosomalen Bruchpunkt

Die Leukämien sind unterschiedliche Klone

Rearrangements von Immunglobulin-Genen sind klonale Marker einer Leukämie



A

IGH1

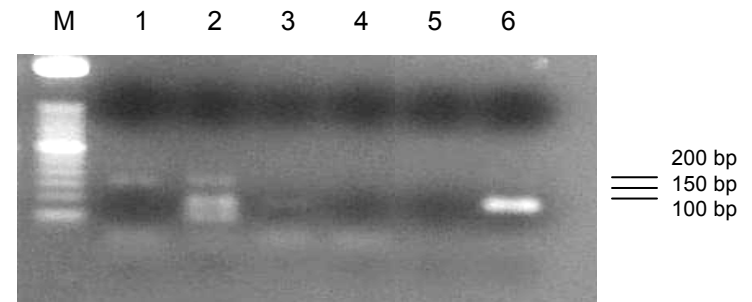
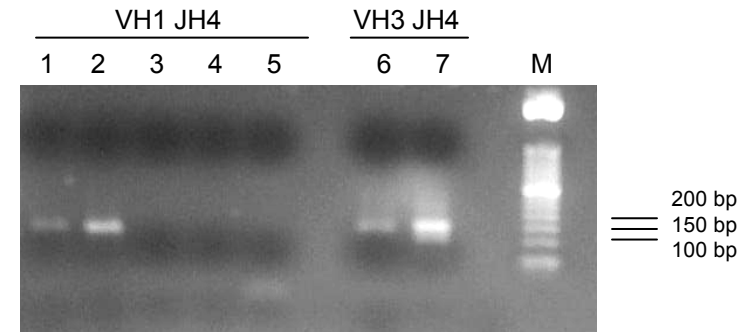
IGH2

IGK2

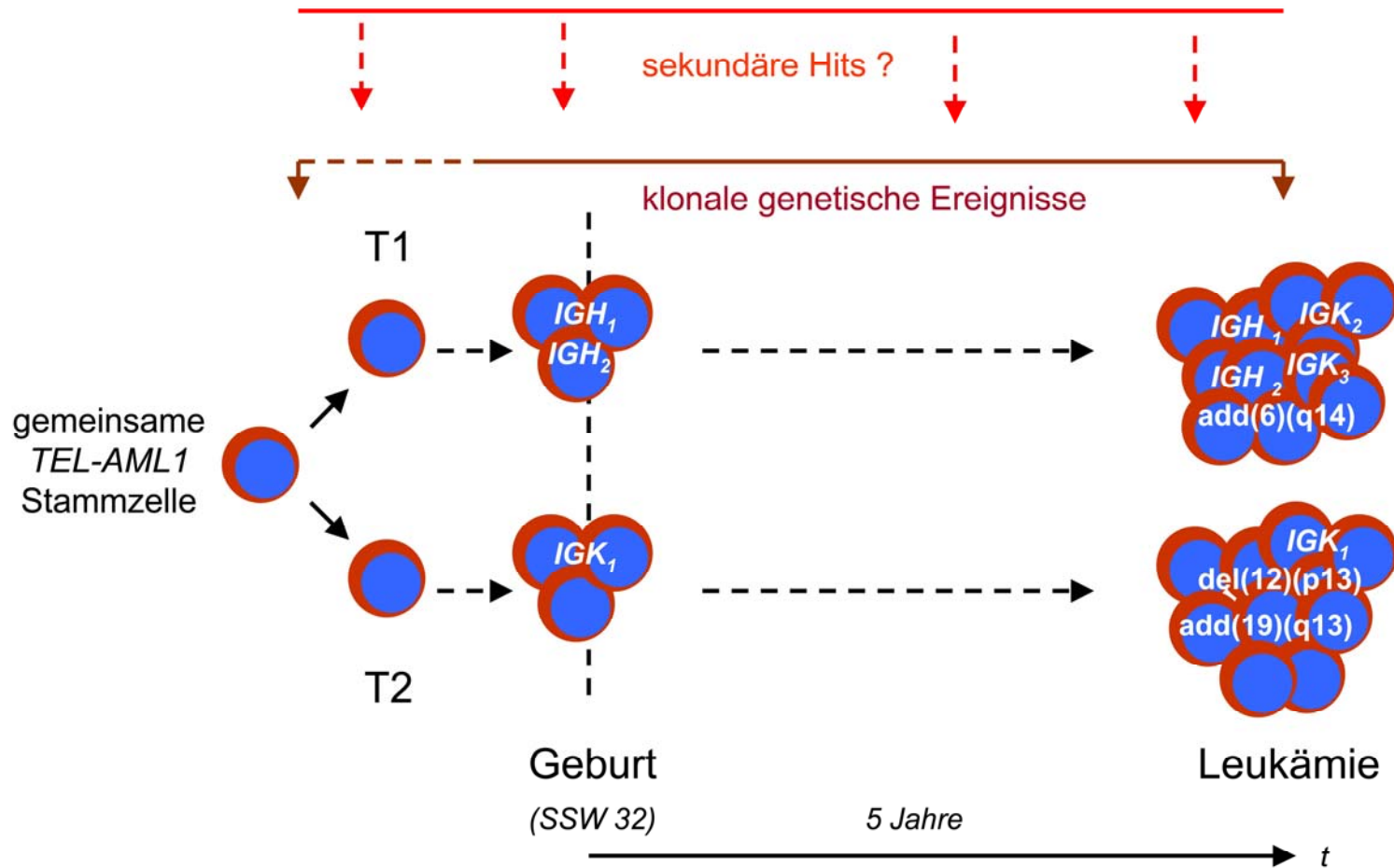
IGK3

B

IGK1



Modell der Leukämie-Entstehung



Schlussfolgerungen

- Das individuelle Therapieansprechen ist der bedeutendste bekannte Prognosefaktor („personalized medicine“).
- Chromosomale Veränderungen erlauben sensitiven Nachweis auf Ebene RNA oder DNA.
- Die Entwicklung von international anerkannten Guidelines ist notwendig, um vergleichbare Resultate zu erzielen.
- Qualitätskontrollen in diesem spezialisierten Bereich der molekularen Diagnostik müssen international durchgeführt werden.
- In Zukunft wird die Methodik an Bedeutung gewinnen, da Ausdehnung von Leukämien/Lymphomen auf solide Karzinome absehbar.
- „Third generation sequencing“ inkl. dazugehöriger Bioinformatik wird zur neuen Schlüsseltechnologie



Das MRD Team



Dr. habil. Joëlle Tchinda, FAMH
Leitung Zytogenetik/FISH



Dr. Susanne
Kubetzko

Silvia
Van Essen
Renate
Siegenthaler