



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

FISH in der hämatologischen Diagnostik

Werner Emberger

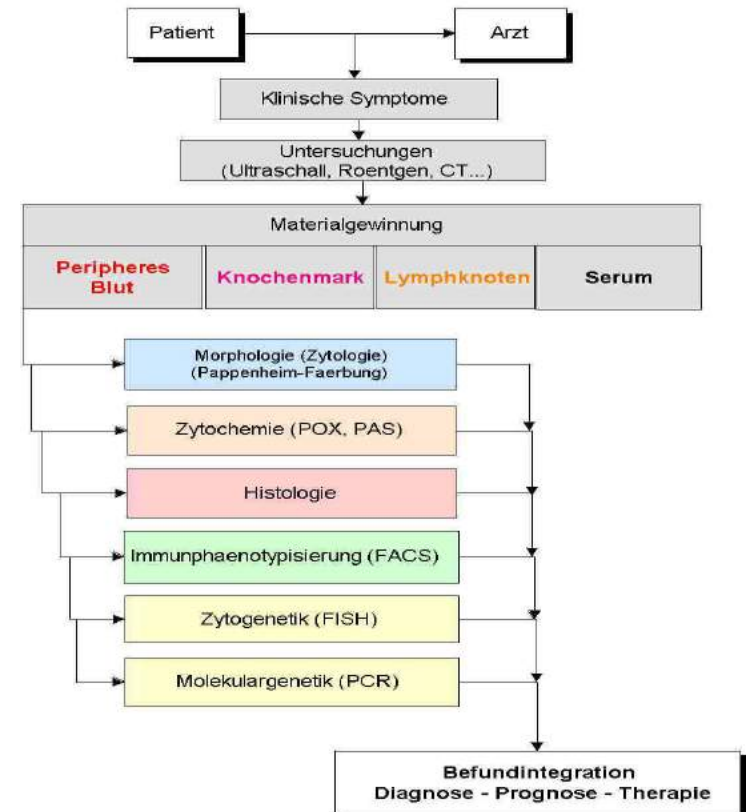
Kristina Aubel

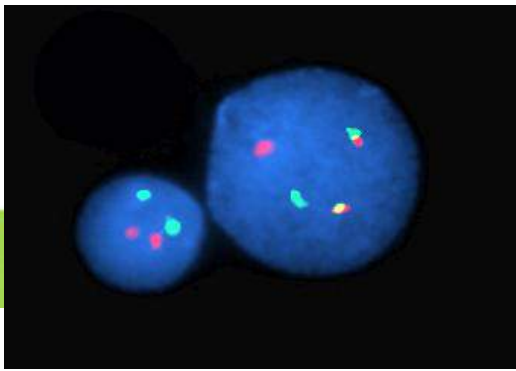
Sigrun Sodja



Diagnostische Bedeutung spezifischer Chromosomenaberrationen bei Hämoblastosen

Stufendiagnostik bei Haemoblastosen

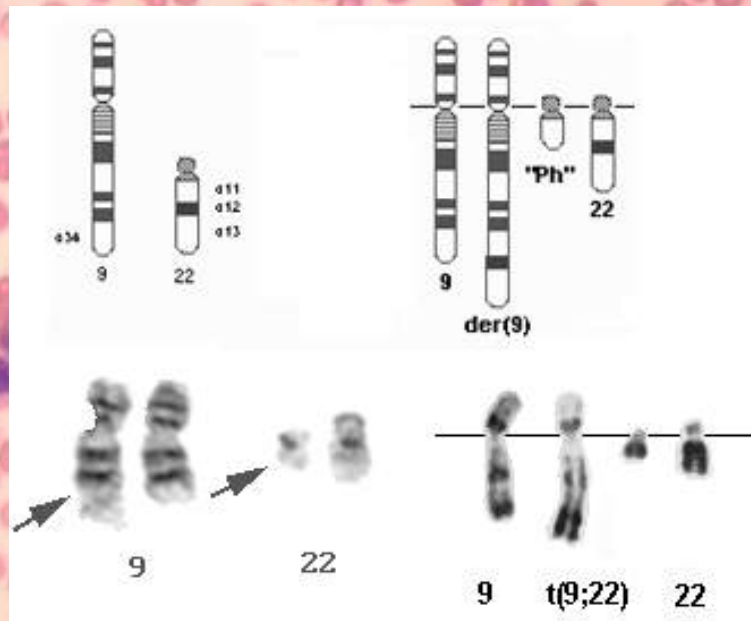




Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

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



Uniklinikum Essen Innere Klinik-Tumorforschung Medizin-Hämatologie



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Janet Rowley

5.4.1925 -
17. 12. 2013





Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

J Nat Cancer Inst. 1960 Jul;25:85-109.

**Chromosome studies on normal and
leukemic human leukocytes.**

NOWELL PC, HUNGERFORD DA.

Philadelphia-Chromosom



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Nature. 1973 Jun 1;243(5405):290-3.

A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining.

Rowley JD.



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz



J Med Genet. 1974 Jun;11(2):166-70.

**Absence of the 9q plus chromosome in
Ph1 negative chronic myelogenous
leukaemia.**

Rowley JD.



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Blood. 1979 Jul;54(1):294-5.

**Variant ph1 translocation in chronic
myeloid leukemia.**

Rowley JD, Resnick GD, Whitman
SL, Senterfit R, Silver RT.



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Lancet. 1981 Nov 7;2(8254):1020-2.

**Down Syndrome and acute leukaemia:
increased risk may be due to trisomy
21.**

Rowley JD.



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Science. 1982 May 14;216(4547):749-51.

**Identification of the constant
chromosome regions involved in
human hematologic malignant disease.**

Rowley JD.



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Nature. 1982 Dec 23;300(5894):765-7.

A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia.

de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeyer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR.

...From this we conclude that in CML, c-abl sequences are translocated from chromosome 9 to chromosome 22q-. This finding is a direct demonstration of a reciprocal exchange between the two chromosomes and suggests a role for the c-abl gene in the generation of CML.



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Mol Biol Med. 1983 Jul;1(1):11-9.

The breakpoint of the Philadelphia chromosome 22 in chronic myeloid leukaemia is distal to the immunoglobulin lambda light chain constant region genes.

Rabbitts TH, Forster A, Matthews JG.



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Cell. 1984 Jul;37(3):1035-42.

An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity.

Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON.

...A structural alteration of the human c-abl protein. K562 cells may have unmasked its associated tyrosine kinase activity. This altered c-abl protein may have important implications for a mechanism of activation of this oncogene.



- EMBO J. 1985 Mar;4(3):683-6.
- **C-abl and bcr are rearranged in a Ph1-negative CML patient.**
- Bartram CR, Kleihauer E, de Klein A, Grosveld G, Teyssier JR, Heisterkamp N, Groffen J.



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Nature. 1985 Jun 13-19;315(6020):550-4.

Fused transcript of *abl* and *bcr* genes in chronic myelogenous leukaemia.

Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E.

...Characterization of an 8-kilobase RNA specific to chronic myelogenous leukaemia shows it to be a fused transcript of the two genes. The fused protein that would be produced is probably involved in the malignant process



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

- Cancer Res. 1987 Aug 1;47(15):4066-70.
 - **Reduction in protein tyrosine phosphorylation during differentiation of human leukemia cell line K-562.**
 - Richardson JM, Morla AO, Wang JY.
- ...The bcr/c-abl protein synthesis was reduced in hemin-treated K-562 cells. Thus, erythroid differentiation of K-562 cells reduces the level of the bcr/c-abl tyrosine kinase and the phosphotyrosine content of its substrate proteins.



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Haematol Blood Transfus. 1989;32:3-10.

**Molecular analysis of rearrangements in
Philadelphia (Ph1) chromosome-positive
leukemia.**

Rowley JD.



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Jun;86(11):4259-63.

Unexpected heterogeneity of BCR-ABL fusion mRNA detected by polymerase chain reaction in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia.

Hooberman AL¹, Carrino JJ, Leibowitz D, Rowley JD, Le Beau MM, Arlin ZA, Westbrook CA.

We observed unexpected heterogeneity in BCR-ABL mRNA; in particular, 1 of 6 bcr-rearranged cases and 1 of 5 bcr-unrearranged cases contained none of the known fusion mRNA species, while 1 of the bcr-rearranged cases contained both.



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Cancer Res. 1996 Jan 1;56(1):100-4.

Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative.

Buchdunger E¹, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ, Lydon NB.

...Herein we describe an inhibitor (CGP 57148) of the Abl and platelet-derived growth factor (PDGF) receptor protein-tyrosine kinases from the 2-phenylaminopyrimidine class,...These findings suggest that CGP 57148 may have therapeutic potential for the treatment of diseases that involve abnormal cellular proliferation induced by Abl protein-tyrosine kinase deregulation



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Science. 2000 Sep 15;289(5486):1938-42.

Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase.

Schindler T¹, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J.

...A small-molecule inhibitor of Abl (STI-571) is effective in the treatment of CML,...Critical to the binding of STI-571 is the adoption by the kinase of an inactive conformation, in which a centrally located "activation loop" is not phosphorylated.



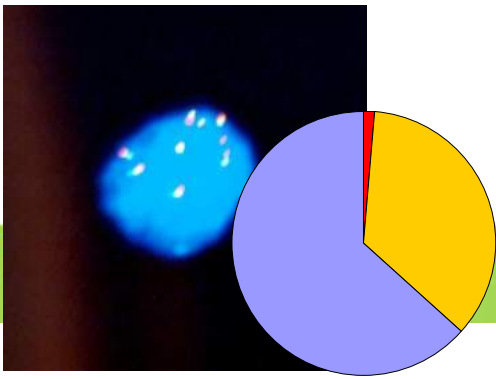
Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Science. 2001 Aug 3;293(5531):876-80. Epub 2001 Jun 21.

**Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by
BCR-ABL gene mutation or amplification.**

Gorre ME¹, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao
PN, Sawyers CL.



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

**Wert der molekularen Zytogenetik und
Multiplex RT-PCR in der Risikostratifizierung
der akuten myeloischen Leukämie**

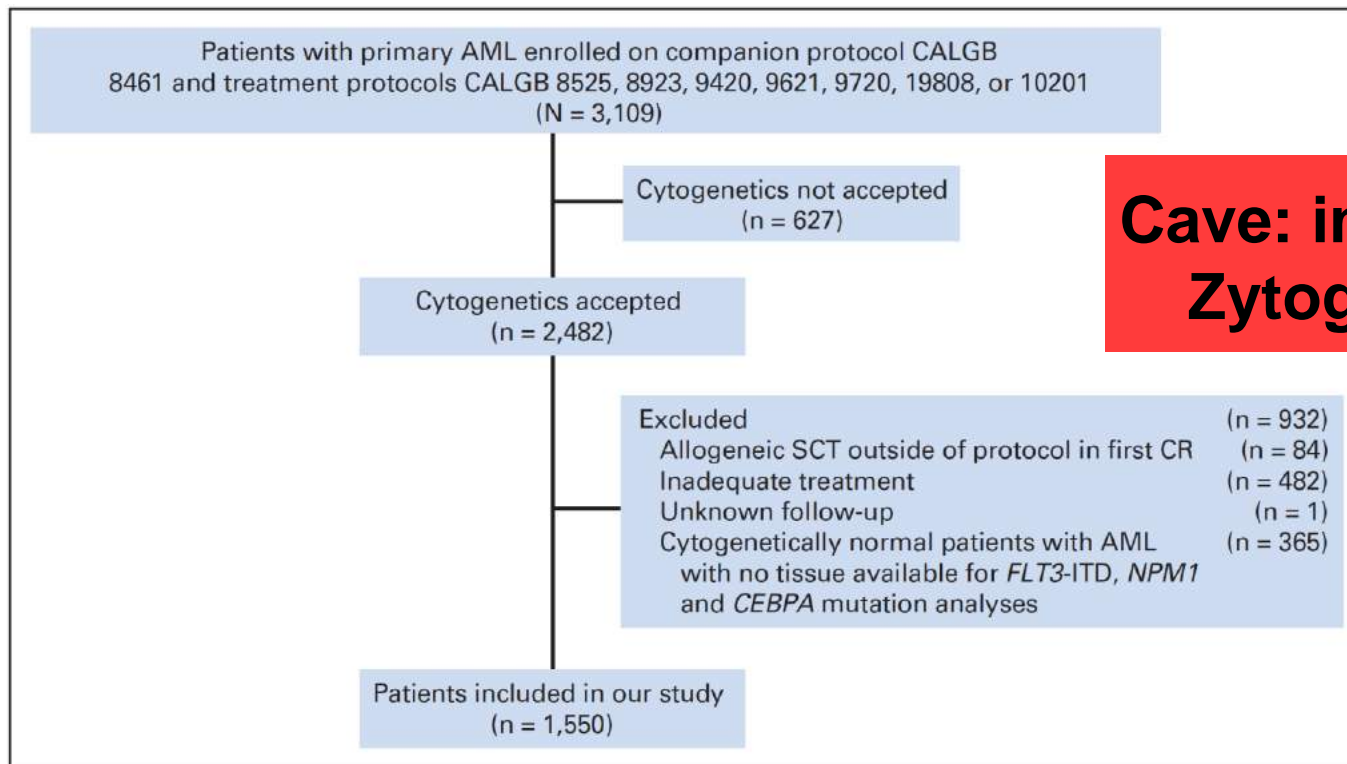


Akute myeloische Leukämie (AML)

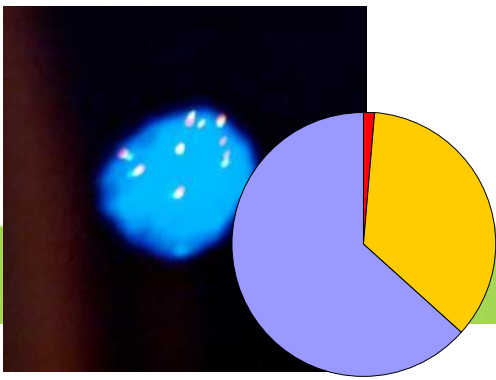
- **maligne (bösartige) Erkrankung des blutbildenden Systems (myeloische Vorläuferzellen)**
- **Inzidenz: ~ 3-4 / 100.000 Neuerkrankungen/Jahr**
- **Subklassifizierung:**
 - **morphologische, immunologische, zytochemische und zytogenetische Kriterien**



Genetische Risikostratifizierung des European LeukemiaNet



**Cave: in 20% keine
Zytogenetik !!!**



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

AML zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (n=131) **(01/2007 – 08/2012)**

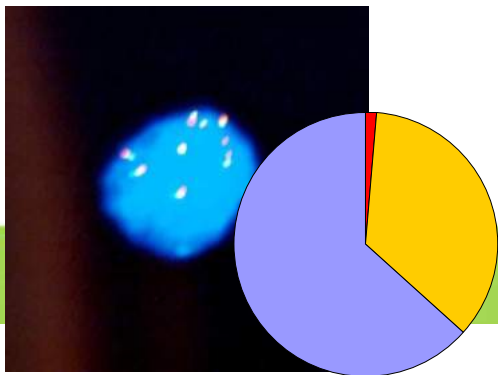
Zytogenetik (ZG) + FISH
HemaVision® (HV)

Patientenalter \geq 18 Jahre



AML – FISH Panel

Aberration	Chromosomale Regionen	Gene
Deletion 5q/Monosomie 5	5p15.2, 5q31	-
Deletion 7q/Monosomie 7	7p11.1-7q11.1, 7q31	-
Deletion 20q	20q12	-
MLL Rearrangement	11q23	<i>MLL</i>
Inversion 3	3q26	<i>EVI1</i>
Inversion 16	16q22	<i>CBFB</i>
Translokation 15/17	15q22;17q21.1	<i>PML/RARA</i>
Translokation 8/21	8q22;21q22	<i>AML1/ETO</i>

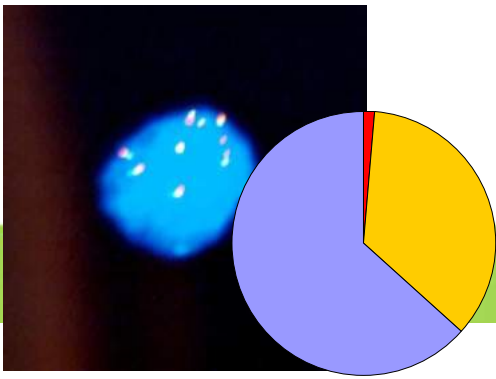


Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

AML – HemaVision® Panel

Aberration	Bruchpunkte	Gene	Aberration	Bruchpunkte	Gene
Translokation X/11	Xq13.1;11q23	MLL1/AFX1	Translokation 3/21	3q26;21q22.3	AML1/MDS1
Translokation 6/11	6q27;11q23	MLL1/AF6	Translokation 16/21	16p11;21q22	TLS/ERG
Translokation 11/19	11q23;19p13.1	MLL1/ELL	Translokation 15/17	15q22;17q21.1	PML/RARalpha
Translokation 10/11	10p12;11q23	MLL1/AF10	Inversion 16	16p13.11;16q22	CBFβ/MYH11
Translokation 1/11	1p32;11q23	MLL1/AF-1p	Translokation 9/22	9q34;22q11.2	BCR/ABL
Translokation 1/11	1q21;11q23	MLL1/AF-1q	Translokation 9/12	9q34.1;12p13	TEL/ABL
Translokation 11/17	11q23;17q21	MLL1/AF-17	Translokation 5/12	5q33;12p13	TEL/PDGFRβ
Translokation 11/19	11q23;19p13.3	MLL1/ENL	Translokation 12/22	12p13;22q12.1	TEL/MN1
Translokation 9/11	9p22;11q23	MLL1/AF9	Translokation 6/9	6p23;9q34	DEK/CAN
Translokation 4/11	4q21.3;11q23	MLL1/AF4	Translokation 9/9	9q34;9q34	SET/CAN
Translokation 1/19	1q23.3;19p13.3	E2A/PBX1	Translokation 3/21	q26;q22	AML1/EAP
Translokation 17/19	17q22;19p13.3	E2A/HLF	Translokation 11/17	11q23;17q12	PLZF/RARalpha
Translokation 12/21	12p13;21q22.3	TEL/AML1	Translokation 3/21	3q26;21q22.3	AML1/EV11
Deletion 1p	1p32;1p32	SIL1/TAL1	Translokation 5/17	5q35;17q12	NPM/RARalpha
Translokation 8/21	8q22;21q22	AML1/MGT8	Translokation 3/5	3q25;5q35	NPM/MLF1



nur ZG/FISH positiv
n = 45 (64%)

2x



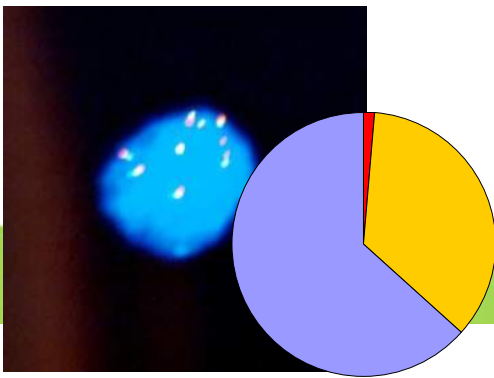
komplex

	Fälle
komplex	20
+8	6
del7q/-7	3
del5q	2
-Y, +6	1
+4	1
+11, -21	1
+14	1
+mar	1

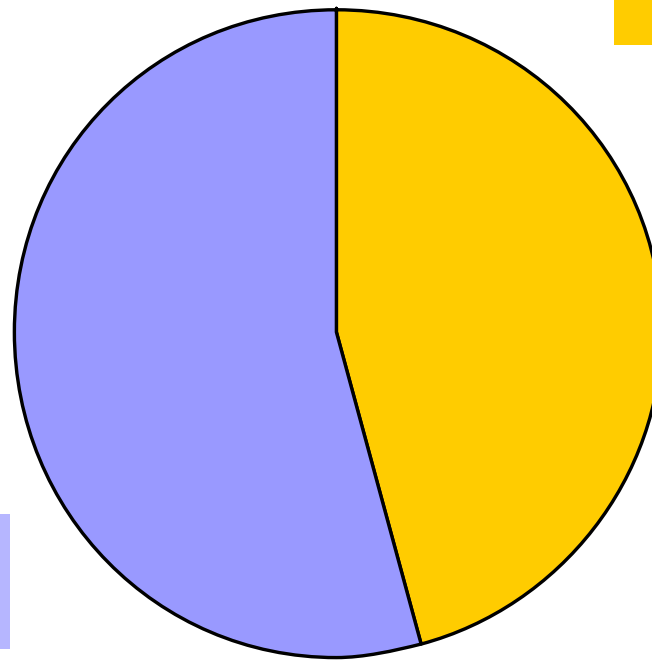


-Y, t(8;21)

	Fälle
-Y, t(8;21)	1
t(2;3),-7	1
Signalvermehrung 3q26, -7	1
irregulär für inv3	1
ins(4;11),+8	1
del7q, der(7)t(7;11)	1
der(7)t(3;7)	1
add8q	1
del16q, add17p	1

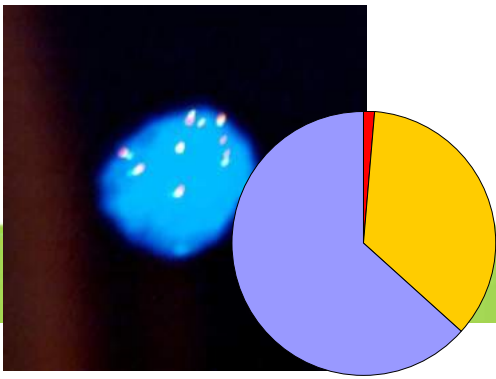


keine klonale Aberrationen
n = 60 (46%)



klonale Aberrationen
n = 71 (54%)

n = 131



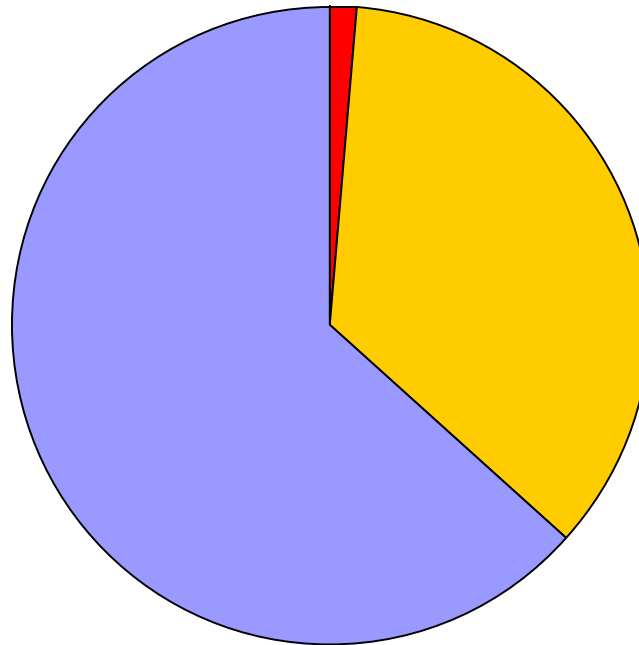
Institut für
Humangenetik

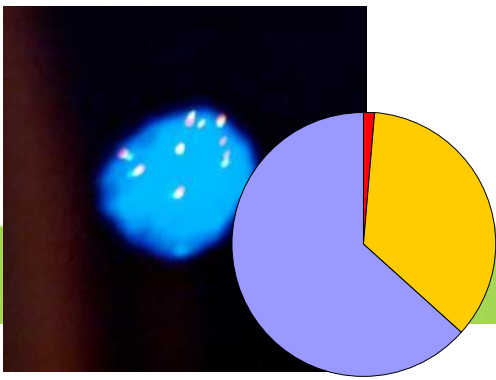
Medizinische Universität Graz

nur HV positiv
n = 1 (1%)

HV und ZG/FISH positiv
n = 25 (35%)

nur ZG/FISH positiv
n = 45 (64%)





Technische Limitationen

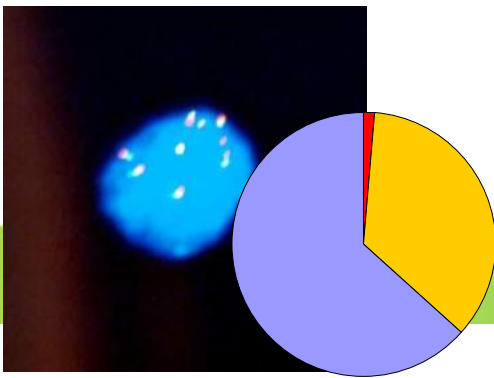
keine Zytogenetik, da kein Zellwachstum

n = 17 (13%)

**keine HemaVision® wegen mangelnder RNA
Qualität**

n = 4 (3%)

I-FISH immer durchführbar



Fall: -Y, t(8;21)

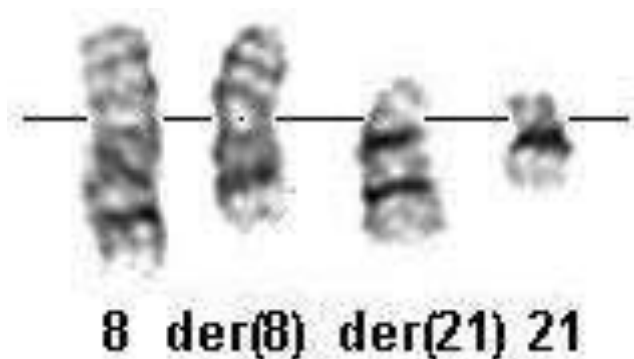
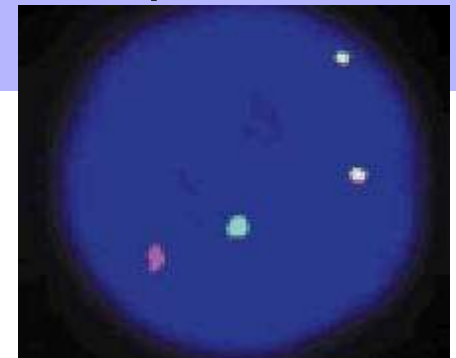
untersuchtes Material : **Knochenmark**

HemaVision®: unzureichende RNA Qualität

I-FISH: in 90% Hinweis auf AML1/ETO

Zytogenetik: 44~45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[cp10]

nur ZG/FISH
positiv





Fall: „komplex“ (1)

untersuchtes Material : **Knochenmark**

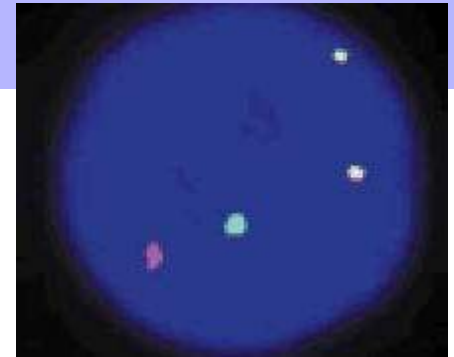
HemaVision®: unzureichende RNA Qualität

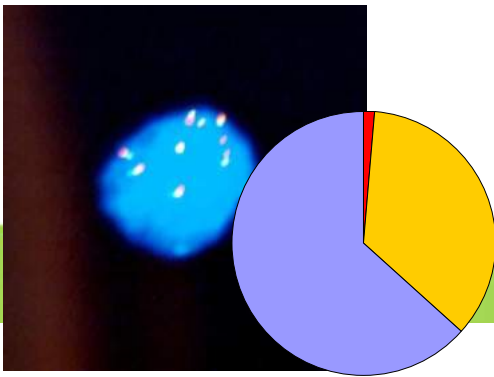
I-FISH: in 48% Hinweis auf AML1/ETO

Zytogenetik:

45~46,X,Y,der(8)t(8;21)(q22;q22),der(14)t(8;14)(q13;q11),der(21)t(8;21)(q22;q22)add(21)(p11)[cp19]/46,XY[2]

nur ZG/FISH
positiv



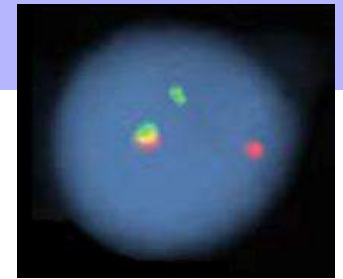


Fall: „komplex“ (2)

untersuchtes Material : **Knochenmark**

HemaVision®: unauffällig

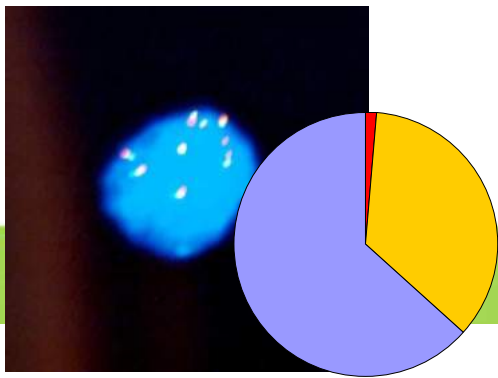
nur ZG/FISH
positiv



**I-FISH: in 81% Hinweis auf TL mit MLL
Beteiligung in 62% Signalvermehrung für
8q22**

Zytogenetik:

46~50,XY,+8,t(10;11)(p11.2~12;q23),+13,+14,+19[cp7]/46,XY[11]



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Genetische Risikostratifizierung bei AML

Ergänzung der Zytogenetik durch definiertes FISH Panel in der initialen Diagnostik

Multiplex RT-PCR erst als 2.Schritt, wenn ZG/FISH nicht aussagekräftig

Sinnhaftigkeit von Asservierung leukämischer Zellen

Orendi et al., J Clin Oncol 2013



Institut für
Humangenetik

Medizinische Universität Graz

Danke für Ihre Aufmerksamkeit !

Dank an:

Cytogenetik und molekulare Zytogenetik Diagnostik und Forschungsgruppe :

Gössler Sabine, Gruber Gertrude, Guggi Michaela, Lechner Petra, Köppl Katharina, Lang Nicole,
Pacher Ruth, Ozelberger Sabine, Randig Andrea, Renner Andrea, Scheiber Gabriele, Schunko Helga,
Seidl Claudia, Tschepper Petra, Wiltgen Ingrid, Winkler Reinhild