

# Tumorgenetische Arbeitstagung

**28.-30.5.2015**

## Tagungsleitung

Prof. Dr. Detlef Haase  
Abt. Hämatologie und Onkologie  
Universitätsmedizin Göttingen  
Robert-Koch-Str. 40  
37075 Göttingen  
Tel: 0049 (0)551-39 6313  
detlef.haase@med.uni-goettingen.de

## Tagungssekretärinnen:

Dr. med. Friederike Braulke  
PD Dr. med. Julie Schanz

## Tagungsort

Landhotel AM ROTHENBERG  
Rothenbergstraße 4  
37170 Uslar-Volpriehausen  
Tel. 055 73 959-0  
www.am-rothenberg.de

## Tagungsorganisation

Dr. Christine Scholz (Leitung)  
Sue Heine (Assistenz)  
Deutsche Gesellschaft  
für Humangenetik e. V.  
Inselkammerstraße 5  
82008 München-Unterhaching  
[heine@gfhev.de](mailto:heine@gfhev.de)

## Informationen

[www.tumorgenetische-arbeitstagung.de](http://www.tumorgenetische-arbeitstagung.de)

## Tumorgenetische Arbeitstagung 2015 – ein Kurzbericht

Die 1. Tumorgenetische / 28. Tumorzytogenetische Arbeitstagung fand nach 7 Jahren wieder in Uslar-Volpriehausen bei Göttingen statt. Mit dieser Tagung betraten wir in mehrfacher Hinsicht Neuland. Wie bereits auf der letzten Tagung in Köln diskutiert, wollten wir uns den neuen rasanten Entwicklungen vor allem im molekulargenetischen Bereich öffnen und haben deshalb versucht, die Tagung sowohl unter dem Motto „Auf zu neuen Ufern“ als auch in „Anknüpfung an die langjährige Tradition“ auszurichten. Die Entwicklung dieser Tagung ging aber weit über die neue Namensgebung – *tumorgenetisch* statt wie früher *tumorzytogenetisch* – hinaus. Es war offensichtlich geworden, dass auch die Tagungsplanung und -durchführung einer Professionalisierung bedurfte. Wie die Rückmeldung der Teilnehmer auf der Tagung selbst zeigte, war die Übernahme der Tagungsorganisation durch die Gesellschaftsstelle der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) ein voller Erfolg. Die Teilnehmer begrüßten die Planung, dass zukünftige tumorgenetische Arbeitstagungen unter dem Dach GfH ausgerichtet werden sollen. Dies führt zu einer erheblichen Arbeitsentlastung des/der jeweiligen Tagungspräsidenten/in, Haftung und Risiken liegen nicht mehr auf den Schultern eines Einzelnen bzw. seiner Einrichtung. Moderne, webbasierte Teilnehmerregistrierung, der automatisierte Versand von Punktezertifikaten und die professionelle Ausrichtung der Industrieausstellung kamen bei allen Teilnehmern gut an.

Weitere konkrete Früchte der Bemühungen, die Tagung weiterzuentwickeln, war die Etablierung des Lore-Zech-Preises (dotiert mit 1.000 €) und des Vortragspreises (dotiert mit 500 €), die zum ersten Mal auf dieser Tagung vergeben wurden.

Der **Lore-Zech-Preis** dient dem ehrenden Andenken einer herausragenden Persönlichkeit und akademischen Lehrerin unserer Faches und der Würdigung wissenschaftlicher publizierter Leistungen im Bereich der Tumor(zyto)genetik. In diesem Jahr wurde Frau **Dr. med. Friederike Braulke** für Ihre Arbeit „Validation of cytogenetic risk groups according to International Prognostic Scoring Systems by peripheral blood CD34+FISH...“ mit dem Lore-Zech-Preis ausgezeichnet.

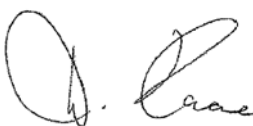
Mit dem **Vortragspreis**, der dem besten Vortrag gewidmet werden sollte, erhofften wir uns eine Stärkung der Motivation besonders jüngerer Kolleginnen und Kollegen, sich mit eigenen Vorträgen aktiv einzubringen. Die Teilnehmer selbst entschieden kurz vor Ende der Tagung in geheimer Abstimmung über die Preisvergabe für den besten Vortrag all jener ReferentInnen, die sich vorab für diesen Vortragspreis beworben hatten. Den diesjährigen Vortragspreis erhielt Frau **Dr. med. Barbara Klink** für ihren Vortrag „Kind mit Ependymblastom und vielfältigen Translokationen im peripheren Blut – Therapiefolge oder Chromosomeninstabilitätssyndrom?“

Zum Neuland gehörte auch die Berufung der GfH-Kommission „Somatische Tumorgenetik“ mit ihren Mitgliedern Oskar Haas, Detlef Haase, Claudia Haferlach, Lana Harder, Harald Rieder und Steffi Urbschat, die die Interessen aller in der Tumor(zyto)genetik Arbeitenden nicht nur gegenüber der GfH, sondern auch gegenüber anderen Fachgesellschaften und der Öffentlichkeit vertritt. Die Teilnehmer der Tagung standen dieser Neuerung absolut positiv gegenüber, sie beteiligten sich rege an den Diskussionen, für die im Tagungsprogramm ausreichend "Timeslots" vorgesehen waren.

Neben diesen vielen „politischen“ Aspekten kam die Wissenschaft nicht zu kurz. Wie von vielen gewünscht, wurden Übersichtsvorträge wiederum den einzelnen Sitzungen vorangestellt. Viele Institute beteiligten sich mit ihren Arbeitsgruppen, Laboratorien und Praxen an der inhaltlichen Gestaltung des Programms. Am Donnerstagabend diskutieren wir anhand von zwei Vorträgen aus der Klinik und aus der Pharmaindustrie, wie die Tumorgenetik den klinischen und pharmakologischen Fortschritt beflügeln kann. Frau Professor Fonatsch konnten wir dafür gewinnen, am Freitagnachmittag den Festvortrag zu halten, in dem Sie uns Ihre persönliche Sichtweise der „Meilensteine der Tumorgenetik“ nahebrachte.

Wir alle müssen uns ständig mit kritischen Nachfragen der Krankenkassen, der Gesundheitspolitiker aber auch der Presse zum Kosten-/Nutzenverhältnis der von uns durchgeführten Analysen auseinandersetzen. In einer Podiumsdiskussion am Freitagabend, eingeleitet durch kurze Impulsvorträge aus verschiedenen involvierten Bereichen, fragten wir deshalb, wie wir mit dem Thema „teure genetische Diagnostik“ umgehen können sollen und wollen. Diese Podiumsdiskussion kam sehr gut an, sorgte im Nachklang für rege Diskussionen und sollte nach Wunsch der Teilnehmer auch in den Folgejahren, mit anderen Themen bestückt, zum festen Bestandteil der TGA werden.

Neben all diesen ernsten Dingen, gab es aber auch ausreichend Raum für ein nettes Beisammensein, gutes Essen und ausreichend Zeit für das informelle freundschaftliche und kollegiale Gespräch in den Pausen.



Prof. Dr. med. Detlef Haase und Team

Abt. Hämatologie und Onkologie Universitätsmedizin Göttingen  
Georg-August-Universität Göttingen

## Wir danken den Sponsoren und Spendern für die freundliche Unterstützung der TGA 2015

### Erklärung zur Firmen- und Produktneutralität

Hiermit versichern wir, dass die Inhalte und die Darstellung der ärztlichen Fortbildung unabhängig von wirtschaftlichen Interessen Dritter sowie frei von werbenden Einflüssen sind und den aktuellen Empfehlungen der Bundesärztekammer zur ärztlichen Fortbildung entsprechen.

	Firma	Sponsoring	Leistung
	Abbott GmbH & Co. KG	2.500,00 €	Messestand, Vortrag
	Affymetrix UK Ltd.	1.000,00 €	Vortrag
	AHF analysentechnik AG	1.500,00 €	Messestand
	AlphaMetrix Biotech GmbH	1.500,00 €	Messestand
	ARIAD Pharmaceuticals	1.500,00 €	Messestand
	Celgene GmbH	3.000,00 €	Firmennennung in allen Medien
	Cytocell Ltd	1.500,00 €	Messestand
	GEPADO Software GmbH	500,00 €	Produktinformationen Beilage
	Leica Biosysteme Vertrieb GmbH	1.500,00 €	Messestand
	Miltenyi Biotec GmbH	1.500,00 €	Messestand
	MetaSystems GmbH	2.500,00 €	Messestand, Vortrag
	Novartis Pharma GmbH	2.500,00 €	Messestand, Vortrag
	Onconova Europe GmbH	4.000,00 €	Messestand, Vortrag
	Sarstedt AG & Co.	1.500,00 €	Messestand
	TECAN Deutschland GmbH	1.500,00 €	Messestand
	TRANSGENOMIC Ltd.	2.500,00 €	Messestand, Vortrag
	WaferGen Biosystems Europe S.à.R.L.	1.500,00 €	Messestand
	ZYTOMED Systems GmbH	1.500,00 €	Messestand

## Programmablauf\*

Legende: ❖ = Vortragende(r) bewarb sich für den TGA-Vortragspreis

### Donnerstag, 28. Mai 2015

ab 13.00	Anreise, Registrierung, Mittagsimbiss
14.30	<b>Begrüßung</b> (Detlef Haase, Göttingen, Lorenz Trümper, Göttingen)
14.45 – 15.45	<b>Firmenpräsentationen</b> (Vorsitz: Martin Erdel, Linz; Brigitte Mohr, Dresden)  <b>Results of a Phase III study in patients with higher risk MDS who have failed prior therapy with hypomethylating agents, with special reference to cytogenetic findings</b> Hannes Loferer, Onconova Europe GmbH  <b>Abbott FISH Diagnostik</b> Hanna Vörsmann, Abbott GmbH & Co. KG  <b>Steigerung der Qualität und Quantität in der Zytogenetik und Molekulardiagnostik – Automatisierung als Schlüssel</b> Matthias Hoja, Transgenomic Ltd., Glasgow UK  <b>Novartis Update aus dem Bereich onkologische Hämatologie</b> Oliver Leismann, Medical Head Hematology, Novartis Pharma GmbH, Business Unit Oncology  <b>Klinische Relevanz der genomweiten Erfassung krankheitsspezifischer Veränderungen mittels CGH Array Analyse in der internationalen AIEOP-BFM ALL-Therapiestudie</b> Oskar A. Haas, Forschungsinstitut für krebskranke Kinder, Wien  <b>Interpretation von Break-apart Sonden und die klinische Bedeutung</b> Ilse Chudoba, MetaSystems
15.45 – 16.15	Kaffeepause
16.15 – 17.15	<b>Sitzung I: Qualitätskontrolle</b> (Vorsitz: Simone Heidemann, Kiel; Harald Rieder, Düsseldorf)
16.15 – 16.30	Ergebnisse der Ringversuche Tumorzytogenetik (Harald Rieder, Düsseldorf)
16.30 – 16.45	Ergebnisse der Ringversuche FISH-Analysen (Claudia Haferlach, München)
16.45 – 17.05	Akkreditierung tumorzytogenetischer Labore – Erfahrungen aus Sicht von Gutachter und Labor (Simone Heidemann, Kiel)
17.15 – 17.45	Pause
17.45 – 18.30	<b>Sitzung II: Tagung/Kommission/Preise</b> (Vorsitz: Christa Fonatsch, Wien; Harald Rieder, Düsseldorf)
17.45 – 18.00	Das neue Konzept der Tagung (TZA → TGA)

- Vorstellung: Simone Heidemann, Kiel  
Oskar Haas, Detlef Haase, Claudia Haferlach, Lana Harder, Harald Rieder, Steffi Urbschat
- 18.00 – 18.15 Die GfH-Kommission Somatische Tumorgenetik (Kommissionsmitglieder: Oskar Haas, Detlef Haase, Claudia Haferlach, Lana Harder, Harald Rieder, Steffi Urbschat)  
Vorstellung: Harald Rieder, Düsseldorf
- 18.15 – 18.30 Der Lore Zech-Preis  
Vorstellung des Konzeptes: Harald Rieder, Düsseldorf  
Der TGA-Vortragspreis  
Vorstellung des Konzeptes: Detlef Haase, Göttingen

## Plenarsitzung

### Sitzung III:

#### **Tumorgenetik als Motor klinischen und pharmakologischen Fortschrittes**

(Vorsitz: Philipp Ströbel, Göttingen; Detlef Haase, Göttingen)

- 18.30 – 18.55 Die Sicht des Kliniklers (Ulrich Germing, Göttingen)
- 18.55 – 19.20 Die Sicht der pharmazeutischen Industrie (Angelika Hülsmans, München)
- 19.20 – 19.45 Genetische Tests als „Companion Diagnostics“ – was lehrt uns Olaparib?“ (Harald Rieder, Düsseldorf)

20.15

**Rustikales Abendessen**

## Freitag, 29. Mai 2015

- 08.30 – 08.45 **Das Tagungschromosom (Julie Schanz, Göttingen)**
- 08.45 – 10.25 **Sitzung IV: Lymphatische Neoplasien**  
(Vorsitz: Lana Harder, Kiel; Oskar Haas, Wien)
- 08.45 – 09.10 Übersichtsvortrag: Therapie der malignen Lymphome  
(Justin Hasenkamp, Göttingen)
- 09.10 – 09.25 ❖ Zytogenetische und molekulargenetische Charakterisierung der T-PLL  
(Andreas Jungfer, München)
- 09.25 – 09.40 ❖ Molecular-cytogenetic characterization of Burkitt Lymphoma of the Breast  
(Shaymaa Elgaafary, Kiel)
- 09.40 – 09.55 ❖ FISH screening for tyrosine kinase-activating gene fusions in Austrian children with high-risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL)  
(Karin Nebral, Wien)
- 09.55 – 10.10 ❖ Veränderungen im Bereich des CDK6-Gens bei Marginalzonen-Lymphomen und anderen indolenten B-Zell-Lymphomen  
(Katharina Rathjen, Kiel)
- 10.10 – 10.25 ❖ Structural variants in Germinal-Center derived B-Cell Lymphomas: Analyses in the framework of the ICGC MMML-Seq Project  
(Christina López, Kiel)
- 09.15 **Sitzung V: MTA-Workshop – Raum 4 (UG)**  
(Vorsitz: Melanie Neu und Amelie Hundertmark, Göttingen)
- 10.20 **Kaffeepause**
- 10.50 – 12.30 **Sitzung VI: Myelodysplastische Syndrome**

(Vorsitz: Claudia Haferlach, München; Julie Schanz, Göttingen)

- 10.50 – 11.15      Übersichtsvortrag: Therapie der MDS (Friederike Braulke, Göttingen)
- 11.15 – 11.30      Clinical characteristics and treatment allocations in patients with Myelodysplastic Syndromes and Monosomy 7: Results from an European Multicenter Study (Julie Schanz, Göttingen)
- 11.30 – 11.45      ❖ Seltene Anomalien beim MDS – Update zur der(1;7)(q10;p10) (Christina Ganster, Göttingen)
- 11.45 – 12.00      ❖ Molecular genetic and cytogenetic characteristics of secondary myelodysplastic syndromes in refractory multiple myeloma patients (Ulrike Paul, Kiel)
- 12.00 – 12.15      ❖ Eisenüberladungsbedingte genetische Instabilität bei MDS (Gina Westhofen, Göttingen)
- 12:15**              **Verleihung des Lore Zech-Preises an Friederike Braulke (Göttingen) durch Christa Fonatsch (Wien)**
- Anschließend**      **Vortrag der Lore Zech-Preisträgerin Friederike Braulke:**
- Validation of cytogenetic risk groups according to International Prognostic Scoring Systems by peripheral blood CD34+FISH: results from a German diagnostic study in comparison with an international control group.**
- 13.00 – 14.00      **Mittagessen**
- 14.00 – 15.40      **Besuch der Industrieausstellung**
- 14.00 – 15.40      Sitzung der Kommission Somatische Tumorgenetik (geschlossene Sitzung)
- 15.40                **Kaffeepause**
- 16.20                **Festvortrag: Meilensteine der Tumorgenetik – eine persönliche Betrachtung (Christa Fonatsch)**
- 16.50 – 18.15      **Sitzung VII: AML und MPN**  
(Vorsitz: Michael Pfeilstöcker, Wien und Friederike Braulke, Göttingen)
- 16.50 – 17.15      Übersichtsvortrag: Therapie der AML (Ulrike Bacher, Göttingen)
- 17.15 – 17.30      Betrachtungen zum komplex aberranten Karyotyp als Marker einer ungünstigen Prognose bei der akuten myeloischen Leukämie (Brigitte Mohr, Dresden)
- 17.30 – 17.45      ❖ Veränderungen im RUNX1 Gen durch Translokation, Mutation, Zugewinn oder Deletion finden sich bei 26 % aller AML Patienten (Bettina Balk, München)
- 17.45 – 18.00      ❖ Clonal evolution in accelerated CML with t(3;12)(q21;p13) during Imatinib Therapy (Christian Paar, Linz)
- 18.00 – 18.15      ❖ Vorliegen eines Mosaiks einer CALR-Mutation bei gleichzeitiger Entstehung einer CML? (Tanja Hinrichsen, Martinsried)
- 18.15                **Pause**
- 18.45 – 19.30      **Das kontroverse Thema: Können/dürfen/müssen wir uns teure genetische Diagnostik leisten – ein nicht lösbares Dilemma?**  
mit anschließender Podiumsdiskussion

Impulsreferate zur Sicht der Klinker, der pharmazeutischen Industrie, der Ethik, der Diagnostiker, der Humangenetiker und der Betroffenen

**Klinik:** Michael Pfeilstöcker, Hanusch Krankenhaus Wien

**Industrie:** Hannes Loferer, Onconova Europe GmbH, München

**Ethik:** Mark Schweda, Universitätsmedizin Göttingen

**Diagnostik:** Oskar Haas, St. Anna Spital Wien

**Abrechnungsmodelle:** Harald Rieder, Institut für Humangenetik, Düsseldorf

**Patienten:** Bergit Korschan-Kuhle, MDS-Patienten-Interessengemeinschaft, Einbeck / Göttingen

20.00 Empfang mit Abendessen und Party

## Samstag, 30. Mai 2015

- 09.15 – 10.55 Sitzung VIII: Prognose, Evolution und Kooperation molekularer und chromosomaler Mutationen**  
(Vorsitz: Anna Jauch, Heidelberg und Steffi Urbschat, Homburg/Saar)
- 09.15 – 09.40 Übersichtsvortrag: Die Rolle der Zytogenetik jetzt und in der Zukunft  
(Claudia Haferlach, München)
- 09.40 – 09.55 Die Bedeutung von Biomarkern im Rahmen der Behandlung von Glioblastom Patienten mit lokaler BCNU Chemotherapie (Steffi Urbschat, Homburg/Saar)
- 09.55 – 10.10 ❖ Fallvorstellung: Kind mit Ependymoblastom und vielfältigen Translokationen im peripheren Blut – Therapiefolge oder Chromosomeninstabilitätssyndrom?  
(Barbara Klink, Dresden)
- 10.10 – 10.25 Monosomie 7-Evolution in myeloischen Erkrankungen  
(Katayoon Shirneshan, Göttingen)
- 10.25 – 10.40 Einfluss von MYC Lokus Aberrationen auf das Überleben von Patienten mit Multiplem Myelom (Anna Jauch, Heidelberg)
- 10.40 – 10.55 ❖ Assoziationen zwischen molekularen und chromosomalen Mutationen bei MDS (Christina Ganster, Göttingen)
- Anschließend: **Anonyme Abstimmung über den Vortragspreis**
- 11.00 Kaffeepause
- 11.15 **Ergebnisse der TZA-Umfrage 2014**  
(Cristiano Krings Rocha, Köln)
- 11.30 **Der Tagungsrückblick**  
(Oskar Haas, Wien)
- 11.45 **Verleihung des TGA-Vortragspreises**  
(Detlef Haase, Göttingen)
- 12.00 **Vorschau TGA 2016 in München**  
(Claudia Haferlach, München)
- 12.15 **Danksagungen und Verabschiedung**  
(Detlef Haase, Göttingen)
- 12.30 Mittagessen oder Lunchbox
- 13.30 Tagungsende

## Lore Zech-Preisträgerin 2015

### Dr. med. Friederike Braulke

Funktionsoberärztin und Ärztliche Leiterin des Studiensekretariats  
der Abteilung Hämatologie und medizinische Onkologie, UMG;  
Fachärztin für Innere Medizin und Hämatologie und Onkologie

1998 – 2005: Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen

2005: Dissertation: Ergebnisse der paläopathologischen Untersuchungen an den Postcranien der frühneolithischen Erwachsenenenskelete aus Wandersleben, Kreis Gotha

2005: Approbation als Ärztin

2010: Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH);

2014: Heidenreich von Siebold-Stipendium: Forschungsförderprogramm der Universitätsmedizin Göttingen

### Der Lore Zech-Preis wird verliehen für die Arbeit

#### **Validation of cytogenetic risk groups according to International Prognostic Scoring Systems by peripheral blood CD34+FISH: results from a German diagnostic study in comparison with an international control group.**

**Braulke F**, Platzbecker U, Müller-Thomas C, Götze K, Germing U, Brümmendorf TH, Nolte F, Hofmann WK, Giagounidis AA, Lübbert M, Greenberg PL, Bennett JM, Sole' F, Mallo M, Slovak ML, Ohyashiki K, Le Beau MM, Tüchler H, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Shirneshan K, Aul C, Stauder R, Sperr WR, Valent P, Fonatsch C, Trümper L, Haase D, Schanz J.

Haematologica. 2014 Oct 24. pii: haematol.2014.110452. [Epub ahead of print]  
PMID: 25344522 [PubMed - as supplied by publisher]

Wir haben die Frage adressiert, ob die IPSS/IPSS-R Berechnung auch möglich ist mit Ergebnissen der FISH-Analyse aus dem peripheren Blut (CD34+FISH) statt mit der klassischen Bänderungsanalyse aus dem Knochenmark speziell für die MDS Patienten, die wegen punctio sicca kein Knochenmarkblut zur Verfügung haben bei Erstdiagnose zur Durchführung einer klassischen Chromosomenbänderungsanalyse. Für diese Patienten war bislang eine Prognoseabschätzung nach Internationalen Prognosesystemen gar nicht möglich wegen fehlender zytogenetischer Information aus dem Knochenmark.

Wir haben die FISH-Ergebnisse aus dem peripheren Blut von 328 MDS Patienten aus unserer prospektiven multizentrischen Deutschen CD34+FISH-Diagnostikstudie verglichen mit den Ergebnissen der Knochenmark-Bänderungsanalyse von 2902 früher publizierten MDS Patienten aus dem IPSS-R Zytogenetik-Score (Schanz et al. , JCO 2012) und konnten zeigen, dass die Kurven für das Gesamtüberleben und das Leukämie-freie Überleben signifikant trennten sowohl für die zytogenetischen, als auch für die prognostischen Risikogruppen. Damit ist es vertretbar, bei Patienten, bei denen keine suffiziente Knochenmarkdiagnostik bei Erstdiagnose möglich ist, dennoch das individuelle Risiko für Gesamtüberleben und AML-Transformation zu evaluieren, wenn man die Ergebnisse der FISH-Analyse an CD34+Blutzellen (mit einem entsprechend umfangreichen Sondenpanel) im IPSS bzw. IPSS-R berücksichtigt. Wir betonten aber stets, dass die FISH-Analyse aus dem peripheren Blut keinen Ersatz für die Bänderungsanalyse allgemein darstellt, sondern diese natürlich stets als der Goldstandard der zytogenetischen MDS-Diagnostik zu bevorzugen ist.



## TGA-Vortragspreisträgerin 2015

**Dr. med. Barbara Klink**

Institut für Klinische Genetik, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden,

erhielt den **TGA-Vortragspreis 2015** für die Fallvorstellung:

### **Kind mit Ependymoblastom und vielfältigen Translokationen im peripheren Blut – Therapiefolge oder Chromosomeninstabilitätssyndrom?**

der Autorengruppe

Barbara Klink<sup>1</sup>, Petra Freitag<sup>1</sup>, Ireen Schaffrath<sup>1</sup>, Arletta Käßner<sup>1</sup>, Luisa Mackenroth<sup>1</sup>, Karl Hackmann<sup>1</sup>, Andreas Rump<sup>1</sup>, Andreas Tzschach<sup>1</sup>, Brigitte Mohr<sup>2</sup>, Evelin Schröck<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Genetik, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden

<sup>2</sup>Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden

Wir stellen hier einen ungeklärten Fall zur Diskussion vor. Bei einem 3jährigen Jungen wurde ein Ependymoblastom diagnostiziert, operiert und mit Chemotherapie nach HIT 2000-BIS4 stPNET Protokoll der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) und anschließender autologer Stammzellrückgabe behandelt. Nach 6 Monaten erfolgte eine Radiotherapie bei Verdacht auf maligne Zellen im Liquor. Ein Jahr später kam es zum Rezidiv, welches palliativ mit Temozolomid behandelt wurde. Aufgrund der infausten Prognose wurden kurz vor dem Tod eine EDTA-Blut-Probe sowie Objektträger mit Metaphasechromosomen aus Heparin-Blut asserviert für ggf. spätere genetische Diagnostik. Die Blutentnahme erfolgte ca. einen Monat nach der letzten Temozolomidgabe. Die gesunden Eltern stellten sich in unserer Genetischen Ambulanz vor mit der Frage nach dem Wiederholungsrisiko. Die Familienanamnese ergab keine eindeutigen Hinweise auf das Vorliegen eines familiären Tumorsyndroms. Die Analyse der DNA aus peripherem Blut mittels Panel-Sequenzierung (Illumina TruSight-Cancer Panel) von 94 mit familiären Tumorerkrankungen assoziierten Genen, inklusive TP53 und PTCH1, war unauffällig. Die Chromosomenanalyse an kultivierten Zellen aus peripherem Blut zeigte, neben Zellen mit unauffällig männlichem Karyotyp, in ca. 30 % der Zellen auffällige Karyogramme mit zytogenetisch balanciert erscheinenden Translokationen. Die beobachteten Translokationen waren vielfältig und traten jeweils nur einmal auf. Ähnliche Befunde sind bei verschiedenen Chromosomeninstabilitätssyndromen beschrieben, wie z. B. dem Werner-Syndrom oder dem Mosaic variegated aneuploidy (MVA) syndrome. Die hierfür als ursächlich bekannten Gene sind ebenfalls auf dem TrueSight-Cancer Panel enthalten und zeigten keine pathogenen Mutationen. Neben dem Vorliegen einer genetisch bedingten chromosomalen Instabilität haben wir einen therapiebedingten sekundären Effekt bzw. ein Zweitmalignom (Leukämie?) sowie ein Kulturartefakt diskutiert. Hat jemand ähnliche Auffälligkeiten in Zusammenhang mit einem aggressiven Therapieschemata bzw. einer Stammzelltransplantation beobachtet? Gibt es andere Vorschläge zur Differentialdiagnose?

## Abstracts

(Anmerkung: Nicht alle eingereichten Vorträge wurden als Abstracts zum Druck freigegeben)

### **Veränderungen im RUNX1 Gen durch Translokation, Mutation, Zugewinn oder Deletion finden sich bei 26 % aller AML Patienten**

Bettina Balk

Co-Autoren: Niroshan Nadarajah, Wolfgang Kern, Susanne Schnittger, Torsten Haferlach, Claudia Haferlach

Der Transkriptionsfaktor RUNX1 spielt eine wichtige Rolle in der Hämatopoese. Es wurden bereits vier verschiedene Veränderungen im RUNX1 Gen bei akuter myeloischer Leukämie (AML) publiziert. Es treten Translokationen wie z. B. RUNX1-RUNX1T1, Amplifikationen, Deletionen sowie molekulare Veränderungen auf. Hier soll die Häufigkeit und Bedeutung der verschiedenen RUNX1 Veränderungen bestimmt und zusätzliche genetische Aberrationen charakterisiert werden. Dazu wurden 726 Patienten (Pat.) mit de novo AML auf RUNX1 Deletionen und Translokationen mit Sonden für das 3' bzw. 5' Ende des RUNX1 Gens untersucht. Des Weiteren wurden RUNX1 Mutationen mittels Sanger oder „Next-Generation Amplicon Deep-Sequencing“ evaluiert. Für alle Patienten mit mittlerem Alter von 67 Jahren (18 – 100 Jahre) wurde eine Chromosomenanalyse durchgeführt und der Karyotyp nach den MRC Kriterien (Grimwade et al., Blood 2010) kategorisiert. Aberrationen im RUNX1 Gen wurden bei 89 von 726 Pat. (12,3 %) durch FISH entdeckt. 10 Pat. (1,4 %) zeigten eine vollständige Deletion und weitere 9 Pat. (1,2 %) eine partielle Deletion eines RUNX1 Gens. Der Zugewinn einer RUNX1 Kopie wurde bei 45 Pat. (6,2 %) und eine das RUNX1 Gen betreffende Translokation bei 31 Pat. (4,3 %) gefunden. Bei 29 Pat. war das Partner Gen RUNX1T1 und bei je einem Patienten lag das Partnergen auf 16q13 und 18p11. Bei 110 von 726 Pat. (15,2 %) war RUNX1 mutiert. Alle RUNX1 Veränderungen schlossen sich mit NPM1 Mutationen an, traten seltener mit DNMT3A und CEBPA Mutationen auf und verhielten sich unterschiedlich bezüglich ASXL1 und TP53 Mutationen. Die Frequenz von RUNX1 Mutationen war bei der AML M0 am höchsten, wohingegen RUNX1-Translokationen am häufigsten bei dem FAB Typen M1 bzw. M2 beobachtet wurden. Während RUNX1 Mutationen am häufigsten mit der zytogenetisch intermediären Risikogruppe assoziiert waren, fanden sich RUNX1 Deletionen und Amplifikationen am meisten in der zytogenetisch ungünstigen Risikogruppe. In der Gesamtkohorte war die mittlere Überlebensdauer 18,7 Monate und unterschied sich signifikant zwischen den verschiedenen Typen von RUNX1 Veränderungen. Für RUNX1 Translokationen, Mutationen, Zugewinnen und Deletionen war sie 35,5, 14,1, 12,4 bzw. 4,3 Monate. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die unterschiedlichen RUNX1 Veränderungen mit insgesamt 26 % bei AML Patienten sehr häufig auftreten und sich bezüglich zusätzlicher genetischer Veränderungen und dem Gesamtüberleben deutlich unterscheiden.

### **Ist die zytogenetische Risikoklassifikation bei MDS-Patienten nach IPSS/IPSS-R möglich aus dem peripheren Blut? Ergebnisse der Deutschen prospektiven multizentrischen CD34+PB-FISH-Diagnostikstudie im Vergleich mit einer internationalen Kontrollgruppe**

Friederike Bräulke

Co-Autoren: U. Platzbecker, C. Müller-Thomas, K. Götze, U. Germing, T.H. Brämmendorf, F. Nolte, W.-K. Hofmann, A.A.N. Giagounidis, M. Lübbert, P.L. Greenberg, J.M. Bennett, F. Solé, M. Mallo, M.L. Slovak, K. Ohyashiki, M.M. Le Beau, H. Tüchler, M. Pfeilstöcker, T. Nösslinger, B. Hildebrandt, K. Shirmeshan, C. Aul, R. Stauder, W.R. Sperr, P. Valent, C. Fonatsch, L. Trümper, D. Haase und J. Schanz

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind heterogene erworbene Stammzellerkrankungen, die zu peripheren Zytopenien führen und mit einem erhöhten Leukämie-Risiko einhergehen. Chromosomenanomalien treten in 50-80% der Patienten auf und spielen eine wichtige Rolle für die Diagnose, die Prognose und zunehmend für Therapieentscheidungen. Zur Berechnung des individuellen Risikos dienen etablierte internationale Prognosesysteme (IPSS/IPSS-R), die

den Knochenmark (KM)-Blastengehalt, Anzahl und Tiefe der Zytopenien im peripheren Blut (PB) und das zytogenetische Risiko berücksichtigen. Bei 5-20% der MDS-Patienten ist bei Erstdiagnose keine klassische Chromosomenbänderungsanalyse aus dem KM möglich bei punctio sicca oder insuffizienter Metaphasenzahl. Für diese Patienten konnte bislang keine individuelle Prognoseevaluation gemäß IPSS/IPSS-R erfolgen. Wir präsentieren Ergebnisse unserer Deutschen multizentrischen prospektiven CD34+PB-FISH-Diagnostikstudie (Clinicaltrials: NCT01355913), in der MDS-Patienten mittels sequentieller Fluoreszenz-in-situ-Hybridisation (FISH)-Analysen mit umfangreichen Sondenpanels an immunomagnetisch angereicherten CD34+ myeloischen Progenitorzellen des PB prospektiv über 5 Jahre beobachtet wurden. Um die Frage zu beantworten, ob eine valide Prognosebewertung basierend auf FISH-Analysen an CD34+ Blutzellen anstelle der Chromosomenbänderungsanalyse aus dem KM möglich ist, verglichen wir die Ergebnisse der CD34+PB-FISH-Analysen von 328 MDS-Patienten unserer Studie mit publizierten KM-Bänderungs-Daten von 2902 MDS-Patienten aus einer internationalen Kooperation (Schanz et al., JCO 2012): Für das zytogenetische Risiko nach IPSS/IPSS-R mittels CD34+PB-FISH trennten die Gruppen signifikant für Gesamt- und Leukämie-freies Überleben in uni- und multivariaten Analysen ohne signifikante Unterschiede zwischen therapierten und unbehandelten Patienten. Wurden zur Berechnung des Gesamt-IPSS die CD34+PB-FISH-Daten (statt der KM-Bänderungsanalyse) berücksichtigt, war eine signifikante Differenzierung der prognostischen Gruppen für Gesamt- und Leukämie-freies Überleben möglich. Grundsätzlich kann und sollte die FISH-Analyse aus dem PB die Bänderungsanalyse als Goldstandard der zytogenetischen MDS-Diagnostik nicht ersetzen. Unsere Daten zeigen aber, dass mittels CD34+PB-FISH mit umfangreichen Sondenpanels eine verlässliche Risikostratifizierung und eine individuelle Patientenberatung auch dann möglich sind, wenn keine KM-Bänderungsanalyse machbar ist.

## **Molecular cytogenetic Characterization of Burkitt Lymphoma of the Breast**

Shaymaa Elgaafary

Co-Autor/en: Sietse Martin Aukema, Inga Vater, Suzanne Bens, Monika Szczepanowski, Christiane Stuhlmann-Laeisz C2, Inga Nagel, Wolfram Klapper and Reiner Siebert

Lymphomas of the breast represent approximately 0.5% of all malignant breast tumors (Cheah et al., 2014). Among primary breast lymphomas the most frequent subtypes are diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), marginal zone and follicular lymphoma. Burkitt-(like) lymphomas (BL) constitutes 5-10% of lymphomas of the breast (Jennings et al., 2007). Recently, immunophenotypic and cytogenetic analyses have been shown to define the diagnostic challenging grey zone between BL and DLBCL. The biologic hallmark of BL is an IG-MYC translocation involving the MYC locus and either the immunoglobulin heavy chain (IGH) or one of the immunoglobulin light chain (IGL or IGK) loci. However, yet in very few breast BL reported in the literature, the diagnosis of BL has been supported by (molecular) cytogenetic investigations. Thus, we performed a comprehensive molecular cytogenetic and histopathological analysis of 32 formalin-fixed paraffin embedded breast biopsies in which between 1973 and 2014 a histopathological diagnosis of BL or a related mature aggressive B-cell lymphoma (BCL) was made. Fluorescence in situ hybridization was performed with probe sets for the detection of the Burkitt translocations t(8;14)(q24;q32)/MYC-IGH, t(8;22)(q24;q11)/MYC-IGL or t(2;8)(p12;q24)/IGK-MYC as break-a-part probes for the BCL2, BCL6, MALT1 and IGH loci. Cases with MYC breaks without additional BCL2 and/or BCL6 breaks were classified as "MYC single hit"(SH) and those with additional BCL2 and/or BCL6 breaks as "double hit"(DH) lymphoma. A total of 11/32 cases were IG-MYC positive (10/32 cases t(8;14)/MYC-IGH, and 1/32 t(8;22)/MYC-IGL), with only 4 of them (4/11) fulfilling the histopathological and immunophenotypic criteria of BL. The other IG-MYC positive lymphomas were reclassified as DLBCL (2/11), BCL, unclassifiable (2/11) or NOS (1/11) or as BCL with features intermediate between DLBCL and BL (2/11). 7/10 of the IG-MYC positive cases evaluable for the BCL2 and BCL6 probes had no additional breaks in BCL2 and BCL6 and hence cl!

classified as IG-MYC SH while 3/10 cases as DH lymphomas Genome wide analyses of copy number abnormalities of IG-MYC positive cases is ongoing. In conclusion the histopathological and molecular cytogenetic characterization of 32 cases of lymphomas of the breast indicates that many of those historically classified as Burkitt lymphomas might not anymore fulfill the current criteria for this diagnosis.

## **Seltene Anomalien beim MDS – Update zur der(1;7)(q10;p10)**

Christina Ganster

Co-Autor/en: Claudia Haferlach, Peter Vandenberghe, Ulrich Germing, Christel Müller, Brigitte Schlegelberger, Sophie Raynaud, Francesc Solé, Detlef Haase, Julie Schanz

Bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen (MDS) liegen Veränderungen des Chromosoms 7 häufig als partielle (7q-) oder totale Monosomie vor. Das Chromosom 7 ist aber auch an der seltenen Anomalie der(1;7)(q10;p10) beteiligt, bei der neben einer Trisomie 1q eine Deletion 7q vorliegt. Von dieser unbalancierten Translokation sind weniger als 1% der Patienten mit primärem MDS betroffen (Schanz et al. JCO 2012). Das Ziel dieser Datensammlung war es, die prognostischen Bedeutung der der(1;7) im Vergleich zur Deletion 7q und zur Monosomie 7 an einer multizentrischen Kohorte von MDS Patienten zu untersuchen. Seit unserer letzten Präsentation der Daten im Rahmen der tumorzytogenetischen Arbeitstagung 2013 konnten wir die Anzahl der Patienten von 35 auf 68 erhöhen. Eingeschlossen wurden Patienten aus 8 Zentren (München, Leuven, Düsseldorf, Dresden, Nizza, Barcelona, Hannover, Göttingen). Wir haben uns in der aktuellen Auswertung auf die 43 Patienten mit einer isolierten Anomalie und den typischen Bruchpunkten der(1;7)(q10;p10) und morphologisch gesichertem MDS konzentriert. Zusätzlich wurden 107 Patienten mit 7q- (n=45) und -7 (n=62) analysiert (Schanz et al. EHA 2012) von denen 64% bzw. 66% mehr als eine Anomalie hatten. Bei Patienten mit der(1;7) wurde im Vergleich zu Patienten mit 7q- und -7 ein signifikant höherer Hämoglobinwert (10,6 g/dl; 9,7 g/dl; 8,7 g/dl; p=0,02) und eine signifikant höhere Laktatdehydrogenase (LDH) (276 U/l; 260 U/l; 237 U/l; p=0,008) nachgewiesen. Das mediane Gesamtüberleben betrug bei Patienten mit der(1;7) 53 Monate, 24 Monate bei Patienten mit 7q- und 14 Monate bei Patienten mit -7 (p<0,001). Das mediane AML-freie Überleben betrug bei Patienten mit der(1;7) 155 Monate, 10 Monate bei Patienten mit 7q- und 6 Monate bei Patienten mit -7 (p<0,001). Die Datengrundlage für die Überlebensdaten wurde durch Ergänzung um weitere Fälle bedeutend verbessert. Obwohl auch bei Patienten mit der(1;7) ein Verlust des langen Arms des Chromosoms 7 vorliegt, haben die MDS Patienten unserer Datensammlung eine signifikant bessere Prognose als MDS Patienten mit 7q- oder -7. Analog zur prognostischen Klassifikation im Rahmen des IPSS-R sollte diese Anomalie als prognostisch günstig eingestuft werden.

## **Die Rolle der Zytogenetik jetzt und in der Zukunft**

Claudia Haferlach

Die Chromosomenanalyse und die Fluoreszenz in situ Hybridisierung gehören zu den etablierten Methoden in der Routine-Diagnostik hämatologischer Neoplasien. Beide Techniken evaluieren genetische Veränderungen auf Einzelzell-Ebene. Dieses hat Vorteile beim Nachweis unabhängiger Klone sowie klonaler Evolution. Auf der anderen Seite wird hierdurch jedoch die Sensitivität limitiert, die von der Anzahl ausgewerteter Zellen abhängig ist. Heute spielt der Karyotyp eine entscheidende Rolle bei der Klassifikation, der Einordnung der Prognose und hat Einfluss auf Therapie-Entscheidungen. Im folgenden sollen nur einige Beispiele exemplarisch aufgeführt werden. Die WHO Klassifikation 2008 erfordert die Kenntnis des Karyotyps für die Klassifikation zahlreicher Entitäten. Bei Patienten, die eine der folgenden Veränderungen t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) oder t(15;17)(q22;q12) aufweisen, wird die Diagnose einer AML unabhängig vom Blastenanteil gestellt. Häufiger trägt der Karyotyp zusammen mit der Morphologie zur Klassifikation bei, wie z.B. bei MDS, MPN und ALL. Die prognostische Bedeutung des Karyotyps wurde bei zahlreichen Entitäten eindrucksvoll gezeigt, z.B. bei der AML und bei MDS in Form von detaillierten prognostischen Scores. Der Nachweis der

t(9;22)(q34;q11) ist nicht nur für die Diagnostik entscheidend sondern auch notwendig, um eine Therapie mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor einzuleiten. Ferner ist bei MPN der Nachweis von Rearrangements unter Beteiligung von PDGFRA oder PDGFRB sehr wichtig, da diese Patienten ebenfalls von einer Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren profitieren. Die Chromosomenanalyse und FISH sind hierbei sehr wertvolle Methoden, da diese Gene mit verschiedenen Partnergenen rearrangieren, was die Etablierung von PCR-basierten Assays kompliziert gestaltet. Die neuen Möglichkeiten, das gesamte Genom zu sequenzieren, werfen die Frage auf, ob der "Chromosomale Karyotyp" durch einen "Molekularen Karyotyp" ersetzt werden wird. Die Perspektiven sowie die derzeit noch vorhandenen Limitationen werden diskutiert werden. Eine optimale Positionierung der verschiedenen Techniken für eine umfassende und effektive Diagnostik ist erforderlich. Dabei ist zu beachten, dass die diagnostischen Notwendigkeiten vor dem Hintergrund therapeutischer Möglichkeiten zu bewerten sind. Nach dem aktuellen Stand werden die Chromosomenanalyse und die FISH auch in Zukunft eine wichtige Rolle in der Diagnostik hämatologischer Neoplasien spielen.

## **Vorliegen eines Mosaiks einer CALR-Mutation bei gleichzeitiger Entstehung einer CML?**

Tanja Hinrichsen

Co-Autor/en: Oliver Wachter (MVZ), Irina Bonzheim, Barbara Mankel, Falko Fend, Leticia Quintanilla-Fend (alle Insitut für Pathologie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen), Peter Klapthor (Gemeinschaftspraxis Hämato-Onkologie, München-Pasing)

Die Essentielle Thrombozythämie (ET) zählt zu den „BCR-ABL1-negativen Myeloproliferativen Neoplasien (MPN)“ und zeigt in 65% der Fälle eine JAK2 V617F-Mutation, in ca. 4% der Fälle eine MPL-Mutation sowie in 15-24% der Fälle eine CALR-Mutation [1]. Die chronische myeloische Leukämie (CML) hingegen ist charakterisiert durch das Vorliegen eines BCR-ABL1-Fusionsgens. Das gleichzeitige Vorliegen der JAK2 V617F-Mutation und des BCR-ABL1-Fusionsgens ist in wenigen Fällen beschrieben [2], während dies für MPL- oder CALR-Mutationen bisher noch nicht beobachtet wurde.

Im Dez. 2010 wurde bei einem 26 Jahre alten Patienten eine JAK2-, MPL- ET diagnostiziert. Eine Nachuntersuchung der Blutprobe ergab eine CALR-Mutation (c.1154\_1155insTTGTC) mit einer Mutationslast von 24% (38% in angereicherten Granulozyten). Im Aug. 2014 zeigte der Patient eine Leukozytose und BCR-ABL1-Fusionstranskripte im peripheren Blut. Die zugehörigen Knochenmarkproben wurden morphologisch beurteilt und zeigten eine Verschiebung von normozellulär (2010) zu hyperzellulär mit erhöhter M:E Ratio (2014) und einer Veränderung der Megakaryozyten mit stark gelapptem Zellkern (2010) zu schwach gelapptem Zellkern (2014). Während sowohl in der Knochenmarkprobe von 2010 als auch 2014 die CALR-Mutation detektiert werden konnte, fand sich kein BCR-ABL1-Fusionsgen in der Probe von 2010, jedoch in nahezu 100% der Zellen eine BCR-ABL1-Fusion mittels in FISH in der Probe von 2014. Zum Nachweis bzw. Ausschluß einer CALR-Keimbahnmutation bzw. eines Mosaiks wurden sowohl die Wangenschleimhaut, als auch Haarwurzeln des Patienten auf die CALR-Mutation getestet. Während die Haarwurzeln negativ für die CALR-Mutation waren, konnte in zwei unabhängigen Wangenschleimhautabstrichen die CALR-Mutation mit einer Mutationslast von 21% nachgewiesen werden. Zusammenfassend zeigt sich hier erstmalig das gemeinsame Vorliegen einer CALR-Mutation (c.1154\_1155insTTGTC) mit einem BCR-ABL1-Fusionsgen. Vermutlich handelt es sich bei der CALR-Mutation um ein Mosaik, das nicht auf das hämatopoetische System beschränkt ist. Leider konnten bisher noch keine weiteren Kompartimente, wie z.B. Fibroblasten, Urin oder Sperma untersucht werden. Das Vorliegen der CALR-Mutation begünstigt wahrscheinlich die Entstehung der ET und erklärt möglicherweise das junge Erkrankungsalter. Die hinzugewonnene Translokation t(9;22)(q23;q11.2) führt zu einer Veränderung der Morphologie von ET zu CML. Bei gutem Ansprechen der CML auf eine Behandlung mit Imatinib, zeigt sich nun wieder der ET-Phänotyp.

[1] Tefferi A, Barbui T, Am J Hematol. 2015 Feb;90(2):162

[2] Pieri L et al, Blood. 2011 Sep 22;118(12):3445

## Zytogenetische und molekulargenetische Charakterisierung der T-PLL

Andreas Jungfer

Co-Autor/en: Anna Stengel, Wolfgang Kern, Melanie Zenger, Susanne Schnittger, Torsten Haferlach, Claudia Haferlach

Die T-Zell-Prolymphozyten Leukämie (T-PLL) stellt eine seltene postthymische T-Zell-Neoplasie mit meist aggressivem Verlauf und kurzer Überlebensdauer dar. Bedingt durch die Seltenheit der Krankheit sind genetische Daten bisher nur aus Einzelfallberichten oder kleinen Kohorten bekannt. Diese Studie zeigt die Ergebnisse zytogenetischer und molekulargenetischer Analysen in einer großen Kohorte von T-PLL Patienten. Die Kohorte setzt sich aus 51 Patienten (33 Männer, 18 Frauen) im Alter zwischen 33 und 87 Jahren (Medianes Alter: 70 Jahre) zusammen. Die Knochenmark- oder peripheren Blutproben wurden auf zytomorphologische und immunphänotypische Merkmale hin untersucht und anschließend mittels Chromosomenanalyse, Fluoreszenz in situ Hybridisierung, array CGH sowie einem Mutationsscreening auf die Gene ATM, BCOR, TP53, JAK1 und JAK3 charakterisiert. Genetische Veränderungen wurden in allen 51 untersuchten Fällen beobachtet, wobei am häufigsten der Locus der T-Zellrezeptoren TCA/D involviert war (86%). Deletionen betrafen vorwiegend die Gene ATM (69%) und TP53 (31%). Diese beiden Gene sowie die Gene JAK1 und JAK3 zeigten zudem hohe Mutationsraten (ATM: 73%, TP53: 14%, JAK1: 6%, JAK3: 21%). Erstmals konnten zudem Mutationen im Gen BCOR in lymphatischen Neoplasien nachgewiesen werden (8%). Daten zum Karyotyp nach Chromosomenbanden-Analysen waren für 44 von 51 Patienten verfügbar. Hier von zeigten 41 Fälle einen komplex aberranten Karyotyp (>3), wobei sich  $inv(14)(q11q32)$  bzw.  $t(14;14)(q11;q32)$  klar als häufigste Aberrationen fanden. Des Weiteren konnte in 3 Fällen (7%)  $t(X;14)(q27;q11)$  detektiert werden. Eine weitere häufige Aberration stellt der Zugewinn der Region 8q (64%) dar, meist als  $i(8)(q10)$  bzw.  $idic(8)(p11)$ . Anhand der Studie ließ sich die Kohorte in zwei Untergruppen mit differenziertem genetischem Profil unterteilen. Der Großteil der Patienten (86%) zeigte Aberrationen unter Involvierung des TCA/D Locus. Diese führen zur Aktivierung der Proto-Onkogene TCL1 (14q32) bzw. MTCP1 (Xq27); daraus resultiert die Aktivierung der Proteinkinasase Akt und eine gesteigerte Proliferationsrate. Zudem zeigte diese Untergruppe eine hohe Mutationsrate der Gene ATM und JAK3. Dahingegen grenzte sich die kleinere Untergruppe der Kohorte durch eine hohe Mutationsrate des TP53-Gens ab und zeigte eine negative Korrelation mit TCA/D-Rearrangements sowie ein höheres medianes Alter.

## Structural Variants in Germinal-Center derived B-Cell Lymphomas: Analyses in the Framework of the ICGC MMML-Seq Project

Cristina López

Co-Autor/en: Stephanie Sungalee, Stephan H Bernhart, Matthias Schlesner, Eva M. Murga Penas, Andrea Haake, Julia Richter, Ole Ammerpohl, Monika Szczepanowski, Markus Kreuz, Wolfram Klapper, Jan Korbel, Reiner Siebert on behalf of the ICGC MMML-Seq project

Germinal-center-derived B-cell lymphomas (GCB-lymphomas) are the most common B-cell lymphomas. They include follicular (FL), diffuse large B-cell (DLBCL) and Burkitt (BL) lymphomas. The detection of new chromosomal abnormalities in these lymphomas could provide new potential prognostic marker. Somatic structural Variants (SVs) comprise unbalanced forms of variation, like deletions, duplications, and insertions and balanced forms, such as inversions and balanced translocations. These changes to cancer genomes can have important effects such as oncogene amplification, tumor suppressor gene disruption, or fusion gene formation. In the framework of the German BMBF-funded ICGC MMML-Seq-Project, we aimed at identifying such structural changes. To this end, we combined data from whole genome and transcriptome sequencing. A total of 103 GCB-lymphomas (22 BL, 35 FL, 13 FL/DLBCL, 2 Intermediate and 31 DLBCL) were included in the present analysis. These were analyzed by

fluorescence in situ hybridization (FISH), using the probes for LSI BCL6, LSI MYC (DC, BA), LSI IGH/MYC, CEP8 Tri-color, LSI IGH, LSI BCL2, (all from Abbott Molecular), as well as, whole genome (WGS) and transcriptome sequencing according to the standards of the ICGC ([www.icgc.org](http://www.icgc.org)). From the WGS data, approximately 4000 somatic SVs were detected by DELLY (Rausch et al., 2012) in the 103 GCB-lymphomas, including 1621 deletions, 1249 duplications, 684 inversions and 443 translocations. While WGS was less efficient than conventional FISH in detecting translocations of the BCL2, MYC, BCL6, or IGH locus due to their association with repetitive regions, it facilitated the discovery of genes recurrently involved in SV, like, ARID5B, ANKS1A, CD58, PTPRD, GPC5 and GNA13. Selected SVs were verified by PCR and Sanger sequencing. In addition, to further validate the incidence of these SVs, FISH analysis was performed in an independent cohort of GCB tumor samples. In summary, whole genome sequencing reveals a complex landscape of SVs in GCB-lymphomas. The combination of genomic and transcriptomic analysis allows the discovery of potential new fusion transcripts. However, whole genome sequencing might miss some somatic changes detectable by molecular cytogenetics, in particular those lying in complex repetitive areas of the genome. The ICGC MMML-Seq project is funded by the Federal Ministry of Education and Research in Germany (BMBF) within the Program for Medical Genome Research (01KU1002A to 01KU1002J).

## **Betrachtungen zum komplex aberranten Karyotyp als Marker einer ungünstigen Prognose bei der akuten myeloischen Leukämie.**

Brigitte Mohr

Co-Autor/en: Stölzel F, Kramer M, Röllig C, Oelschlägel U, Bochtler T, Krämer A, Middeke JM, Thiede C, Platzbecker U, Schaich M, Schetelig J, Bornhäuser M, Ehninger G

In den Therapiekonzepten zur Behandlung von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie ist der Karyotyp als wichtiges diagnostisches Kriterium zur Prognosebeurteilung integriert. Ein komplex aberranter Karyotyp gehört zu den zytogenetischen Hochrisikomerkmale. Unter konventioneller Chemotherapie haben die betroffenen Patienten fast keine Heilungschancen, sodass eine frühzeitige Orientierung auf alternative Therapiekonzepte wie Stammzelltransplantation, Einbeziehung immunmodulatorischer oder signalwegspezifischer Moleküle notwendig ist. Definitionsgemäß besteht ein komplex aberranter Karyotyp aus multiplen zytogenetischen Aberrationen. Aktuell existiert kein einheitlicher Schwellenwert für die Mindestanzahl an Aberrationen, die eine Hochrisikokonstellation implizieren. Das europäische Leukämienetzwerk (ELN) definiert als cut-off  $\geq 3$  und die britische MRC Group  $\geq 4$  Aberrationen. Unser Ziel war es, den Schwellenwert der Komplexität für die Vorhersage eines Hochrisikos ( $3$  vs.  $\geq 4$ ) retrospektiv anhand der Daten von drei multizentrischen AML-Studien der SAL-Gruppe (Gesamtpatientenzahl  $n=3526$ ) zu überprüfen. Als Einflussgrößen wurden dabei nicht nur die Anzahl der Veränderungen an sich sondern auch Einzelmerkmale (Niedrigrisiko: sog. CBF-Leukämien mit  $t(8;21)$ ,  $inv(16)/t(16;16)$  / rekurrende Aberrationen: z.B.  $t(9;11)(p21\sim22;q23)$  / Hochrisiko: z.B.  $del(5q)$ ,  $-7$ ,  $17p-$  / „monosomaler Karyotyp“) berücksichtigt. In Anlehnung an die ALL, bei der Patienten mit hyperdiploidem Karyotyp mit einer günstigen Prognose assoziiert sind, wurde das Merkmal „hyperdiploider Karyotyp“ (HDK) besonders integriert, wobei dieser Entität nur Patienten mit Zugewinnen vollständiger Chromosomen zugeordnet wurden. Patienten mit zusätzlichen Strukturaberrationen oder Monosomie wurden ausgeschlossen. Patienten mit normalem Karyotyp (NK), und damit intermediärem Risikoprofil, fungierten als Vergleichsgruppe. In der Überlebensstatistik zeigte sich, dass komplex aberrante Patienten mit  $t(9;11)$  sich mit einem Gesamtüberleben (OS) nach 5 Jahren von 27% [CI 0-56] nicht signifikant von der NK-Gruppe (OS nach 5 Jahren: 34% [CI 32-37] unterschieden. Damit haben Patienten mit  $t(9;11)$  unabhängig von der Karyotypkomplexität ein intermediäres Risikoprofil, was die ELN-Einstufung dieses Merkmals (Döhner et al. Blood 2010) reproduziert. Patienten mit insgesamt 3 Aberrationen (exkl. zytogenetisches Hochrisikomerkmale, spezielle Entität HDK, CBF,  $t(9;11)$ ) unterschieden sich mit einem 5 Jahres OS von 32% [CI 11-53] ebenso nicht signifikant von der NK-Vergleichsgruppe, sodass auch bei diesen Patienten eher von einer intermediären Prognose auszugehen ist. Eine signifikante Ver-

schlechterung gegenüber NK war für die Patienten folgender komplex aberranter Subgruppen zu erkennen: (1) „hyperdiploider Karyotyp“ (OS nach 5 Jahren: 10%, CI 0-32, p=0.007); (2)  $\geq 4$  Aberrationen (exkl. CBF, t(9;11)(p21;q23)). In letzterer Gruppe lag bereits für Patienten ohne weiteres Hochrisikomerkmals das 5-Jahres-OS bei 15% (CI 2-28, p<0,0001). Das niedrigste Gesamtüberleben nach 5 Jahren mit 6% [CI 4%-9%] hatten komplex aberrante Patienten, die zusätzlich ein zytogenetisches Hochrisikomerkmals aufwiesen (dies gilt jedoch nicht für Patienten mit CBF-Aberration oder t(9;11)). Das beste Gesamtüberleben nach 5 Jahren hatten komplex aberrante CBF-Leukämien mit 67% [CI 53-80]. Insgesamt reproduzieren unsere Ergebnisse den von der MRC-Group empfohlenen cut-off für eine ungünstige Prognose von  $\geq 4$  (Grimwade et al. Blood 2010). Die Kategorie „monosomaler Karyotyp“, hier angewendet in der komplex aberranten Situation, lieferte keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn und versagte im Erkennen von Patienten mit eher intermediärem Risikoprofil.

## **FISH screening for tyrosine kinase-activating gene fusions in Austrian children with high-risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL)**

Karin Nebral

Co-Autor/en: Margit König, Andische Attarbaschi, Georg Mann, \*Oskar A. Haas, \*Sabine Strehl

Tyrosine kinase (TK) activating gene fusions define a group of biologically and clinically distinct cases of childhood BCP-ALLs. They recently attained much interest, because these genetic lesions provide unique targets for therapeutic interventions with various fusion type-specific tyrosine-kinase inhibitors. Consequently, there is also a pressing demand to unambiguously identify all these rare and diverse fusions in a fast and cost efficient way. Since, apart of those involving CRLF2 and IGH, they all are mutually exclusive primary changes, this can currently be best achieved with a hierarchical multi-step FISH screening assay, in which the preponderant proportion (>60%) of cases with all known specific abnormalities, such as those with an ETV6/RUNX1+, BCR1/ABL1+, KMT2A+, TCF3+ and IGH+ rearrangement as well as a hyper- or hypodiploid karyotype, iAMP21 and dic(9;20) are identified first. These can then be excluded from further screening, because all cases with a TK fusion are almost exclusively found in the remaining cohort, which is referred to as "B-others". Although the fusions of interest are rather heterogeneous, the relevant rearrangements always affect one of the few TK-activating hub genes, namely ABL1, ABL2, CRLF2, CSF1R, JAK2, PDGFRB or EPOR. The potential involvement of the one or the other gene can be easily detected with the respective 3'-5' dual-color split apart FISH probes. To evaluate this approach, we started our analyses with a special group of 50 high-risk "B-others" patients who were enrolled in the Austrian BFM 2000 treatment study and defined according to the above criteria. We screened these cases for the presence of TK-activating gene fusions with all the currently commercially available PDGFRB/CSF1R, JAK2, CRLF2 and (the non-TK) PAX5 FISH split-apart FISH probes. Specific rearrangements were identified in so far 13/50 (26%) cases. Three had a PDGFRB/CSF1R, two a JAK2, seven a CRLF2 and one an ABL1 rearrangement, the latter of which was discovered with a BCR/ABL1 probe. With the help of metaphase, CGH array and RT-PCR analyses we were able to identify the fusion partner already in 11/13 of them. The results of these preliminary analyses demonstrate that FISH screening is a simple, elegant and efficient approach to establish the involvement of a particular TK activating fusion gene component, which subsequently can be supplemented with the identification of the fusion partner with a variety of other methods.

## **Clonal Evolution in Accelerated CML with t(3;12)(q21;p13) during Imatinib Therapy**

Paar Christian

Co-Autor/en: Brigitte Schartner, Daniela Voskova, Jörg Berg

Translocations involving the 3q21 breakpoint region are rare rearrangement events in hematologic malignancy. These translocations occur in up to 2% of cases with AML and occasionally in MDS and CML, and are mostly associated



with disturbances of thrombopoiesis. 3q21 rearrangements represent factors of very poor prognosis. We report on a patient (male, age 38) with chronic myeloid leukemia. At diagnosis total WBC count was 253 G/L with a PLT count of 397 G/L. The bone marrow presented with 5% blasts markedly increased granulopoiesis, and, interestingly, with some micro-megakaryocytes. Conventional karyotyping showed t(9;22)(q43;11), which was confirmed by FISH analysis with a micro-deletion of *abl1* on the derivative chromosome 9. In the periphery *bcr-abl1* PCR exhibited a ratio of 62% (international scale, IS). The patient was treated with Imatinib 400 mg/d. WBC and PLTs gradually declined within the first weeks of treatment. After five months WBC count was reduced to 11 G/L, but PLTs amounted to 884 G/L. BCR-ABL ratio only minimally decreased to 26% (IS). The bone marrow presented with 12% blasts, increased granulopoiesis and increased thrombopoiesis with micro-megakaryocytes. Karyotyping of bone marrow cells showed t(3;12)(q21;p13) concomitantly with t(9;22)(q34;q11). The micro-deletion in *abl1* was still observed by FISH. Sequencing of *bcr-abl1* did not result to mutations conferring Imatinib resistance. Initial interphase ETV6 DCBA FISH analysis showed normal signals indicating that this region might not be involved in this translocation. At the time of writing the patient has been switched to Dasatinib and, in parallel, is being prepared for potential bone marrow transplantation. Thus, in this case of CML clonal evolution has occurred during Imatinib therapy, and failed response to Imatinib did not appear to relate to *bcr-abl* kinase domain mutations.

## **Molecular genetic and cytogenetic characteristics of secondary myelodysplastic syndromes in refractory multiple myeloma patients**

Ulrike Paul

Co-Autor/en: Christiane Pomplun, Inga Nagel, Claudia Becher, Martin Gramatzki, Reiner Siebert, Andreas Günther, Eva Maria Murga Penas

Multiple Myeloma (MM) is a neoplastic disorder caused by the clonal proliferation of malignant plasma cells. The development of novel treatments based on high-dose chemotherapy combined with autologous stem cell transplantation and novel immunomodulatory drugs and proteasome inhibitors has achieved a significant improvement of overall survival for MM patients. However, improvement in survival has led to increasing risk of secondary malignancies in MM especially for myelodysplastic syndromes (MDS).

We herein report the investigations of 3 cases of MM diagnosed with a secondary MDS using karyotyping, fluorescence in situ hybridization (FISH), and next-generation sequencing (NGS). At time of MM diagnosis, case 1 was a 49-years-old female (stage IIIA), case 2 a 60-years-old male (stage IIIA), and case 3 a 55-years-old male (stage IIIA). All three patients were treated with alkylating agent-based chemotherapy (all melphalan and cyclophosphamide, case 1 and 3 bendamustine). Case 1 and 3 were treated with lenalidomide while case 2 never got an immunomodulatory drug. Secondary MDS was diagnosed 7-, 8-, and 4-years after MM diagnosis in case 1, 2, and 3 respectively. Based on FISH analyses of CD138-positive cells at time of diagnosis/relapse, case 1 with a complex karyotype and a t(4;14)(p16;q32) was classified into the subgroup of non-hyperdiploid MM and cases 2 and 3 with gains of chromosomes 5, 11, and 21 into the hyperdiploid MM. Cytogenetic analyses on cultures from bone marrow aspirates or from CD138-negative cell fractions at time of MDS diagnosis revealed monosomy 7 (-7) in all three cases. In the two hyperdiploid MM -7 was part of complex karyotypes with additionally -5/-5q and -12. NGS was performed on DNA from CD138-negative cells using the MiSeq benchtop sequencer and the MiSeq Reporter and Illumina VariantStudio 2.2 for data analyses. By NGS, case 1 showed a heterozygous T>A mutation in the RUNX1 gene. Cases 2 and 3 showed both heterozygous mutations in splice sites of the TP53 gene, A>G and T>G, respectively. All detected mutations by NGS were validated using Sanger sequencing.

In conclusion, our results revealed that mutations of the TP53 gene occur recurrently in MDS of hyperdiploid MM patients and confirm that cytogenetically -7 and -5/5q- are recurrent chromosomal changes in secondary MDS in both hyperdiploid and non-hyperdiploid MM. However, the screening of larger series of MM patients with secondary MDS is necessary to confirm these findings.

# Clinical Characteristics and Treatment Allocations in Patients with Myelodysplastic Syndromes and Monosomy 7: Results from an European Multicenter Study

Julie Schanz

Co-Autor/en: Friederike Braulke, MD2, Ghulam J Mufti, FRCP, FRCPATH3, Elena Crisà4, Austin Kulasekararaj, MD, PhD5, Kathrin Nachtkamp, MD6, Ulrich Germing, MD, PhD7, Stefan Schmitz, MD, PhD8, Peter Haas, MD9, Michael Lübbert, MD, PhD10, Catharina Müller-Thomas, MD11, Katharina Götze, MD, PhD12, Uwe Platzbecker, MD13, Florian Nolte, MD, PhD14, Wolf-Karsten Hofmann, MD, PhD15 and Detlef Haase, MD, PhD2

In MDS, monosomy 7 is the second frequent abnormality. The present study was designed to analyze clinical features, prognosis and response to different therapeutic strategies in patients with -7 or del(7q) in a European study cohort. 471 patients with MDS/AML following MDS were registered and retrospectively analyzed. Inclusion criteria were defined as follows: Morphologic diagnosis of MDS/AML following MDS, bone marrow blast count  $\leq 30\%$  and presence of -7 or 7q- proved by chromosome banding analysis (CBA) or fluorescence in situ hybridization (FISH). The data was coalesced from 8 centers in Germany and the UK. The treatment was classified as follows: Best supportive care (BSC), low-dose Chemotherapy (LDC), high-dose chemotherapy (HDC), hypomethylating agents (HMA; either 5-azacytidine or decitabine), and others. The abnormality was detected by CBA±FISH in 440 (93.4%) and by FISH only in 31 (6.6%). 147 patients (31.2%) showed 7q-, 313 (66.5%) -7 and 11 (2.3) patients showed both abnormalities at the first cytogenetic examination. Untreated patients with an isolated 7q- as compared to an isolated -7 show a better prognosis regarding OS (median: 4.0 vs. 0.7 years;  $p < 0.01$ ) as well as AFS (median not reached vs. 2.3 years;  $p = 0.062$ ). Best supportive care was performed in 195 (41%) patients. The remaining 276 (58.6) patients received 1-5 sequential therapies (one therapy: 31.6%; more than 1 therapy: 27.0%). 81 patients received an allogeneic bone marrow transplantation (ATX). As the first line therapy, 122 patients (25.9%) received HMA, 50 (10.6%) HDC, 28 (5.9%) ATX, 28 (5.9%) 11 (2.3%) LDC, and 28 (5.9%) were treated with other therapies. Patients eligible for ATX showed a significantly better prognosis as compared to any other therapy strategy: The median OS in was 2.1 years as compared to 1.1 years in non-transplanted patients ( $p < 0.01$ ). In patients not eligible for ATX, treatment with HMA at any course of their disease as compared to a BSC strategy was associated with a better OS (1.4 vs. 0.8 years,  $p = 0.014$ ). In patients classified as very high risk according to IPSS-R, the median OS was significantly prolonged in patients receiving HMA as compared to BSC (1.1 vs. 0.6 years,  $p < 0.01$ ). To our knowledge, the study describes the largest patient cohort with MDS/AML and monosomy 7 published to date. The study suggests that hypomethylating agents significantly improve overall- and AML-free survival in patients classified as very high risk by IPSS-R.

## Monosomie 7-Evolution in myeloischen Erkrankungen

Katayoon Shirneshan

Co-Autor/en: Julie Schanz, Detlef Haase

Monosomie 7 und die Deletion des langen Arms von Chromosom 7 (7q) gehören zu den häufigsten Chromosomen Anomalien bei Patienten mit AML und MDS. Es wurde bereits gezeigt, dass eine isolierte 7q Deletion im Vergleich zur isolierten Mon(7) als prognostisch günstiger zu werten ist (Corduba et al. 2012, Schanz et al. 2012) und nicht als ungünstig, wie im IPSS beschrieben. In 2% der MDS-Patienten beobachteten wir eine Koexistenz von mon(7) und del(7q) mittels FISH-Analyse an CD34+ peripheren Blutzellen. Zwei Patienten zeigten im Progress eine Zunahme der mon(7) Klone parallel zu einem Rückgang der 7q- Klone. Hier berichten wir über drei weitere MDS Fälle, die mehrere Klone mit verschiedenen Chromosom 7 Aberrationen zeigen. Erster Fall (A.M.): Ein 72-jähriger Mann mit Verdacht auf MDS. Die Analyse des Knochenmarks

ergab ein MDS RA. Bänderungsanalysen von Knochenmarkzellen zeigten drei Klone mit verschiedenen Chromosom 7 Anomalien: del(7q) in 22%, Ring-Chromosom 7 in 22% und Mon(7) in 11% der Metaphasen. Zweiter Fall (A.L.): Eine 62 Jahre alte Frau mit Verdacht auf eine hämatologische Erkrankung. Die Karyotypisierung von Knochenmarkzellen zeigte: Eine del(7q) in 12% und r(7) in 15% der Metaphasen. Dritter Fall (K.B.): Eine 64 Jahre alte MDS Patientin mit den folgenden Karyotypanomalien: del(7q) in 3%, Mon(7) und nur noch ein „nacktes“ Zentromer von Chr. 7 in 47% und eine komplette mon(7) in 20% der Knochenmarkzellen. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die mon(7) durch eine Karyotypevolution bei MDS Patienten während der Progression entsteht. Aufgrund der Existenz des dritten Klons mit r(7) und eines Klons mit ausschließlich Chromosom 7-Zentromer vermuten wir, dass ein Ringchromosom 7 ein Übergangsstadium der Karyotypevolution zwischen Deletion 7q und vollständiger Monosomie 7 ist. Es ist bekannt, dass Ringchromosomen während der Zellteilung anfällig sind verloren zu gehen, woraufhin es schließlich zur vollständigen mon(7) kommt. Eine spezifische Telomer FISH-Analyse bestätigte die Deletion der Telomere in r(7). Unsere Hypothese könnte auch erklären, warum del(7q) eine bessere Prognose als mon(7) aufweist: del(7q) treten früher im Verlauf der Erkrankung auf, da es der erste Schritt im Verlauf der mon(7)-Evolution ist. Um diese Hypothese zu beweisen, muss nun eine größere Anzahl von Patienten mit Karyotypevolution und Chr. 7 Anomalien in weiteren Untersuchungen analysiert werden. In dieser Beziehung wären wir für Kooperationen sehr dankbar.

## **Die Bedeutung von Biomarkern im Rahmen der Behandlung von Glioblastom Patienten mit lokaler BCNU Chemotherapie**

Steffi Urbschat

Co-Autor/en: Christoph Sippl, Jana Engelhardt, Kai Kammers, Joachim Oertel, Ralf Ketter

Objective: Clinical protocols combining local chemotherapy with BCNU-wafers and concomitant radio-chemotherapy have shown improvement of survival for patients with newly diagnosed malignant glioma. Furthermore molecular genetic data becomes more and more important because of the potential to analyze the biological behaviour and growth potential of gliomas in a clinically helpful manner. Our aim is to determine chromosomal imbalances as well as the methylation status of MGMT, CDKN2A (p16), CDKN2B (p15) and RB1 in order to analyse their influence on radio- and chemotherapy response and survival time. Material, Methods and Patients: In our trial 72 patients with histological confirmed glioblastoma were included. Patients will be divided in two treatment groups: group A (36 patients) were treated according the EORTC- Study of Stupp et al. 2005 and group B (36 patients) were treated also according the EORTC-Study and receive additional local chemotherapy with Gliadel. CGH (comparative genomic hybridisation) analysis and MS-PCR (methylation-specific PCR) were done as described in standard protocols. Results: Univariate cox regression showed a prolonged survival time of patients with tumors harboring deletions on chromosome 9p and 10q under chemotherapy treatment. No significant effect was observed for e.g. gains on chromosome 7p. Promotor methylation of the DNA repair protein O6-methylguanine DNA-methyltransferase (MGMT) in tumor tissue was associated with prolonged overall survival. Whereas Promotor hypermethylation of p16 (CDKN2A) was not correlated with prolonged overall survival. The results of RB1 and p15 (CDKN2B) are not yet available. Conclusion: These first results underline that the investigated genes and chromosomal regions can act as attractive prognostic candidates for therapeutic approaches in glioblastomas.

## **Eisenüberladungs-bedingte genetische Instabilität bei MDS**

Gina Westhofen

Co-Autor/en: C. Ganster, H.K. Al-Ali, R. Stuhlmann, U. Germing, D. Haase

Einleitung: Klinische -, in vitro Daten und ein Mausmodell haben gezeigt, dass eine Eisenüberladung bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS)

das Fortschreiten der Erkrankung und die AML-Transformation beschleunigt. Bei MDS ist eine genetische Instabilität ein wichtiger Risikofaktor für eine raschere Entwicklung einer AML. Diese genetische Instabilität kann durch Doppelstrangbrüche (DSB) in der DNA provoziert werden, welche sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie als  $\gamma$ H2AX-Foci darstellen lassen. Da die Entstehung und auslösenden Faktoren von DSB bei MDS noch nicht ausreichend exploriert sind, ist es das Ziel unserer Studie, die Korrelation von Serumferritinwerten mit dem Ausmaß der DSB in zirkulierenden CD34+ Stammzellen bei MDS-Patienten zu zeigen. Methoden: Immunmagnetisch angereicherte CD34+ periphere Blutzellen wurden mittels H2AX- und CD34-Antikörpern gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die Auswertung erfolgte anhand der Prozentzahl der Zellen mit  $\gamma$ H2AX-Foci (qualitative Auswertung), der Anzahl an sichtbaren  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle (quantitative Auswertung) und CD 34-Positivität. Ergebnisse: Bisher sind 52 Patienten in die Studie eingeschlossen, deren Zellfärbungsergebnisse mit klinischen und labordiagnostischen Parametern verglichen wurden (Eisenüberladung, Blastenzahl und Karyotyp). Hierbei wurden 46 Patienten nach der qualitativen Methode ausgewertet, wobei im Median 14 % der Zellen  $\gamma$ H2AX-Foci aufwiesen (range: 0%-52%). Die quantitative Auswertung wurde für 19 Patienten durchgeführt, von welchen 11 einen normalen Karyotyp und 8 einen veränderten Karyotyp mit folgenden Anomalien haben: +8 (n=2), -Y (n=2), 5q- (n=2), +12 (n=1) und +1, der(1;13) (n=1). Die quantitative Auswertung erbrachte einen Median von 3,4  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle, während Patienten mit normalem Karyotyp weniger  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle zeigen (median=2,5) als Patienten mit verändertem Karyotyp (median=6,4). Die Ergebnisse beider Methoden lassen einen Trend zur positiven Korrelation der Anzahl der Zellen mit  $\gamma$ H2AX-Foci zu erhöhter Blastenzahl, wie auch zu erhöhten Serumferritinwerten erkennen. Zusammenfassung: Unsere ersten Ergebnisse bestätigen einen möglichen Zusammenhang zwischen DSB, Serumferritinwerten und zytogenetischen Veränderungen. Um den Einfluss der Eisenüberladung auf genetische Veränderungen bei MDS weiter zu entschlüsseln, werden wir zusätzliche klinische und genetische Daten unserer Patienten in die Auswertung mit einbeziehen.

## Abstracts zu den Firmenpräsentationen

### Interpretation von Break-apart Sonden und die klinische Bedeutung

Ilse Chudoba, MetaSystems

Mit der Einführung von Crizotinib (Xalkorim Pfizer) zur Behandlung von fortgeschrittenen Stadien einer speziellen Unterform des Bronchialkarzinoms hat die FISH-Detektion eines ALK-Rearrangement als ‚Companion Diagnostic‘ an Bedeutung gewonnen.

ALK-Translokationen sind schon lange bekannt und wurden vor allem in Form einer t(2;5)(p23;q35) ALK/NPM1 beim Anaplastischen Large Cell Lymphom gefunden. Für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom ist aber ein ALK-EML4 Rearrangement typisch, bei dem es sich um eine Inversion handelt, da ALK und EML4 beide auf dem p-Arm von Chromosom 2 liegen. Da der Abstand zwischen diesen beiden Loci bei nur ca. 12 MB liegt, stellt die Interpretation eines ALK-Rearrangements mit einer Break-apart Sonde auf Gewebeschnitten eine besondere Herausforderung dar. Im Vortrag wird auf die Schwierigkeiten eingegangen, mit denen bei der FISH Auswertung eines ALK Rearrangement zu rechnen ist.

### Klinische Relevanz der genomweiten Erfassung krankheitsspezifischer Veränderungen mittels CGH-Array Analyse in der internationalen AIEOP-BFM ALL-Therapiestudie

Oskar A. Haas, Forschungsinstitut für krebskranke Kinder, Wien

Die diagnostische und prognostische Kategorisierung kindlicher akuter lymphatischer Leukämien anhand spezifischer genetischer Merkmale ist eine unumgängliche Voraussetzung für deren gezielte und damit erfolgreiche Behandlung. In der internationalen AIEOP-BFM Therapiestudie, an der sieben Länder (Deutschland, Österreich, Schweiz, Tschechische Republik, Italien, Israel und ein Teil Australiens) beteiligt sind, erfolgt die Behandlung der jährlich etwa 1.000 rekrutierten Patienten nach einem einheitlichen Konzept. Dies gewährleistet daher eine gute differenzierte Auswertung der Therapieergebnisse. Neben der Überwachung des Therapieerfolges mittels der Bestimmung der minimalen Resterkrankung ("minimal residual disease"; MRD), welche auf dem hochsensitiven quantitativen Nachweis klonaler Immunglobulin und T-Zellrezeptor Genrearrangements beruht, spielen derzeit allerdings nur sehr wenige genetische Parameter tatsächlich eine therapieentscheidende Rolle, nämlich die Hyper- und Hypodiploidie sowie die Translokationen bzw. Genfusionen t(12;21)/ETV6-RUNX1, t(9;22)/BCR-ABL1 und t(4;11) KMT2A/AFF1. Nicht zuletzt auf Grund intensiver Forschung und verbesserter Nachweismethoden wurden in den letzten Jahren allerdings laufend neue Veränderungen entdeckt, welche zum Teil bereits jetzt zu Therapieadaptierungen in den betroffenen Patientengruppen führen und daher natürlich auch in der Planung neuer Therapiestudien und –strategien Berücksichtigung finden müssen. Daraus ergibt sich, dass die diagnostischen Vorgehensweise den neuen technologischen Gegebenheiten und klinischen Erfordernissen entsprechend angepasst und optimiert werden müssen. Eine demgemäße Neuorientierung beruht im Prinzip vor allem auf zwei methodischen Säulen, nämlich dem effizienten systematischen Nachweis aller Therapierelevanten Translokationen bzw. Genfusionen im Rahmen eines hierarchischen Mehrstufen FISH Screenings sowie der hochauflösenden Genomweiten Erfassung von quantitativen als auch qualitativen (d.h. Kopienneutraler Verlust der Heterozygotie in Form von partiellen und kompletten erworbenen uniparentalen Disomien) Veränderungen mittels CGH Array Analyse. In meinem Vortrag gebe ich vor allem einen komprimierten Überblick über die vielfältigen Möglichkeiten der Array Analyse, die weit über den simplen Nachweis quantitativer Veränderungen hinaus gehen, und berichte welche relevan-

ten Erkenntnisse sich aus den Ergebnissen solcher Untersuchungen für die klinische Praxis tatsächlich ableiten lassen, anhand derer dann die Behandlung entsprechend optimiert und individuell adaptiert werden kann.

## **Steigerung der Qualität und Quantität in der Zytogenetik und Molekulardiagnostik – Automatisierung als Schlüssel**

Matthias Hoja, Transgenomic Ltd., Glasgow UK

Laboratorien in der Diagnostik sind einem Rationalisierungsdruck ausgesetzt: Bei steigendem Zeitdruck und stabilem oder abzusenkendem Personalbestand ist ein gleichbleibendes oder sich erhöhendes Probenaufkommen zu bearbeiten.

Diese Arbeitsverdichtung versucht Transgenomic Ltd durch den Einsatz von Automatisierungslösungen zu kompensieren:

So lässt sich durch den Einsatz der Hanabi Chromosome Harvesters die Qualität der Aufarbeitungen steigern. Durch den Einsatz von Chromosome Harvesters sinken sowohl die inter- als auch die intrapersonellen Varianzen bei der Gewinnung von Metaphasenzellen. Dies wird durch Studien renommierter Einrichtungen bestätigt.

Dabei kann Transgenomic Ltd auch auf die unterschiedlichen Bedürfnisse bezüglich des Probenaufkommens durch unterschiedliche Gerätedimensionierung reagieren.

Auch weiterführende Arbeiten, wie das Auftropfen der Metaphasenzellsuspension, lassen sich durch den Einsatz von technischen Lösungen der Transgenomic Ltd. automatisieren: Transgenomic bietet mit den Spreadern der Hanabi Produktlinie zwei verschiedene Gerätegrößen, um die Metaphasenzellsuspensionen auf die Objektträger aufzubringen. Damit wird gewährleistet, dass zum einen eine gleichbleibende Qualität der getropften Objektträger zu verzeichnen ist und zum anderen eine sich anschließende, automatisierte Metaphasensuche zeitsparend programmiert werden kann, da die Tropfen auf gleichbleibenden Koordinaten aufgebracht werden.

Metaphasensuche oder FISH-Signale in Interphasezellkernen oder Metaphasen:

Beides lässt sich mit den Softwarelösungen von Applied Spectral Imaging (ASI) automatisieren.

Transgenomic Ltd vertreibt und betreut im Nachgang im deutschsprachigen Raum die Produkte von ASI.

Dabei ist hervorzuheben, dass hier die Freiheit des Anwenders bei der Wahl des Sondenherstellers ebenso gewahrt ist, wie seine Unabhängigkeit vom Technischen Support hinsichtlich des Aufsetzens zur Detektion einer neuen Sonde. Die Optimierung und Implementierung einer neuen Sonde kann anwenderfreundlich mit einem speziellen Userinterface vom Anwender selbst durchgeführt werden.