



27. Tumorzytogenetische Arbeitstagung 2014 in Köln

22. – 24. Mai 2014 Köln | Hilton Cologne Hotel

Programm & Abstracts

Tagungsprogramm

Donnerstag, den 22.05.2014

- ab 13.00 **Registrierung**
- 13.30 – 14.30 Uhr Get together & Mittagessen
- 14.30 – 14.45 Uhr **Begrüßung**
K.-A. Kreuzer, Köln
- 14.45 – 15.00 Uhr **Vorstellung des Tagungschromosoms**
S. Schneider, München
- 15.00 – 16.30 Uhr **Firmen und Stiftungen**
Moderation: C. Krings Rocha, Köln
- 1) Automating the process to improve the efficiency and quality of Cytogenetic suspension culture harvests
C. Christie, Genial Genetics
 - 2) BioView: Automatisierung der FISH Diagnostik
H. Vörsmann, Abbott
 - 3) Application of MIP SNP array technology for the examination of chromosomal alterations in rare brain tumors
V. Ruland, Affymetrix UK Ltd
 - 4) Array CGH in der molekularen Tumorgenetik am Beispiel hämatologischer Erkrankungen *M. Rußmann, Perkin Elmer*
 - 5) Advantages of Next Generation Sequencing in the field of tumor-cytogenetics *O. Menssing, Illumina*
 - 6) IGH - ein komplizierter aber interessanter Locus
M. Vetter, Metasystems
- 16.30 – 17.00 Uhr Kaffeepause
- 17.00 – 17.30 Uhr **Plenarvortrag: „Vom Chromosom zum Genom am Beispiel der CLL“** *S. Stilgenbauer, Ulm*
- 17.30 – 19.00 Uhr **Ringversuche und Qualitätssicherung**
Moderation: H. Rieder, Düsseldorf & S. Heidemann, Kiel
- 1) Ergebnisse des Ringversuchs Tumorzytogenetik - Chromosomenbandenanalyse – 2013 *H. Rieder, Düsseldorf*
 - 2) Umfrage zur Verfahrensoptimierung in der Tumorzytogenetik
H. Rieder, Düsseldorf
 - 3) Ergebnisse des FISH-QUITZ 2013 *C. Haferlach, München*
 - 4) Methodvalidierung und -verifizierung in der Tumorzytogenetik
S. Heidemann, Kiel
- 19.30 Uhr Abendessen im Brauhaus Sion
-

- 08.30 – 10.00 Uhr **Akute lymphatische Leukämie & Burkitt Lymphome**
Moderation: O. Haas, Wien & J. Bradtke, Gießen
- 1) Übersichtsvortrag *O. Haas, Wien*
 - 2) RUNX1 copy number counts and intra-chromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): a flawless criterion prone to misinterpretation *K. Nebral, Wien*
 - 3) Together we are strong: Cytogenetics, FISH, CGH array, Google and RT-PCR join forces to uncover an ETV6-INO80D gene fusion in an undifferentiated case of childhood ALL with a t(2;12)(q33;p13) *M. König, Wien*
 - 4) Clonal Evolution in Relapsed Burkitt Lymphoma/Leukemia by Cytogenetic and Molecular Cytogenetic Analyses *E. M. Murga Penas, Kiel*
 - 5) Molekularzytogenetische Analysen bei MYC-negativen hochmalignen B-Zell-Lymphomen mit Charakteristika von Burkitt-Lymphomen und 11q-Zugewinn/Verlust-Muster (high-grade B-cell lymphoma with features of BL, MYC-, with 11q-gain/loss pattern) *I. Nagel, Kiel*
- 10.00 – 10.30 Uhr Kaffeepause
- 10.30 – 12.00 Uhr **Akute myeloische Leukämie**
Moderation: C. Haferlach, München & C. Ganster, Göttingen
- 1) Übersichtsvortrag *C. Haferlach, München*
 - 2) Interessante Fälle mit Onkogen-Amplifikation aus dem Labor für Hämatologische Zytogenetik, Göttingen *M. Neu, Göttingen*
 - 3) EVI1-Amplifikation in Form von zytogenetisch kryptischen double minutes als neuer Mechanismus für die Überexpression des EVI1-Gens *M. Truger, München*
 - 4) Rekurrierende Einzelmetaphasen mit Deletion 11q bei Verlaufskontrollen einer zytogenetisch unauffälligen AML: minimaler Zellklon oder Artefakt? *M. Erdel, Linz*
 - 5) Concomitant Tetrasomy 8 and Isochromosome 5p Clonally Evolved from Trisomy 8 in a Patient with Acute Monoblastic Leukemia. *C. Paar, Linz*
- 12.00 – 13.00 Uhr Mittagessen
- 13.30 – 14.30 Uhr Besichtigung des Kölner Doms
-

Freitag, den 23.05.2014

- 15.00 – 16.30 Uhr **Methodikworkshop: Plasmazell-Neoplasien**
Moderation: F. Wenzel, Basel & A. Jauch, Heidelberg
- 1) Fallvorstellungen *L. Harder, Kiel & S. Hippler, Köln & A. Jauch, Heidelberg*
 - 2) Ergebnisse des Pilotringversuches Multiples Myelom
C. Haferlach, München
- 16.30 – 17.00 Uhr Kaffeepause
- 17.00 – 18.30 Uhr **Solide Tumoren**
Moderation: H. Schildhaus, Göttingen & S. Deutschbauer, Linz
- 1) Übersichtsvortrag *H. Schildhaus, Göttingen*
 - 2) Gangliogliomas: results of GTG, SKY, genome-wide high resolution SNP- array, and gene expression analyses *H. Holland, Leipzig*
 - 3) GlioMath-DD: Ein multidisziplinäres Konsortium zur Erforschung der Evolution von Gliomen für neue therapeutische Ziele und individualisierte Therapien *B. Klink, Dresden*
 - 4) Intraindividuelle aCGH-Analysen bei einer 33jährigen Patientin mit rekurrentem Astroblastom: Fallbericht und Literaturübersicht
D. Krämer, Homburg/Saar
 - 5) Cytogenetics of extramedullary manifestations in multiple myeloma
S. Janjetovic, Hamburg
- 17.00 – 18.30 Uhr **TA-Workshop**
Moderation: S. Hippler, Köln & S. Jenni, Basel
- 1) Anreicherung von CD138+-Zellen
 - 2) Zytomorphologie von Plasmazellen
 - 3) Mikroskopie von Plasmazellen nach Isolierung mittels MACS-Methode
- 19.00 Uhr Empfang und Abendessen in den Rheinterrassen
-

- 08.45 – 10.00 Uhr **Myelodysplastisches Syndrom**
Moderation: D. Haase, Göttingen & M. Erdel, Linz
- 1) Übersichtsvortrag *D. Haase, Göttingen*
 - 2) Klonalität des Y-Verlusts bei MDS *C. Ganster, Göttingen*
 - 3) Karyotypevolution im Rahmen der Lemon5 Studie
K. Shirneshan, Göttingen
 - 4) How to determine chromosome banding resolution in tumor cytogenetics? *H. Rieder, Düsseldorf*
- 10.00 – 10.30 Uhr Kaffeepause
- 10.30 – 12.00 Uhr **B-Zell Lymphome und Plasmazell-Neoplasien**
Moderation: L. Harder, Kiel & C. Krings Rocha, Köln
- 1) Übersichtsvortrag *L. Harder, Kiel*
 - 2) Comparison of Conventional Cytogenetic Analysis and Whole Genome Sequencing in Germinal-Center derived B-Cell Lymphomas in the Framework of the ICGC MMML-Seq Project
C. Lopez, Kiel
 - 3) Chromosomenveränderungen der Marginalzonen-Lymphome
L. Harder, Kiel
 - 4) High Prevalence of Immunoglobulin Light Chain Gene Aberrations as Revealed by FISH in Multiple Myeloma and MGUS
S. Türkmen, Berlin
 - 5) Conventional cytogenetic analysis of MM patients using DSP30 in combination with new mitogens *A. Gerlach, Berlin*
- 12.00 – 12.45 Uhr **Ergebnisse der TZA-Umfrage 2013**
S. Heidemann, Kiel & C. Haferlach, München
- 12.45 – 13.00 Uhr **Tagungsrückblick**
F. Wenzel, Basel
- 13.00 – 13.30 Uhr **Vorschau TZA 2015 und Verabschiedung**
D. Haase, Göttingen & K.-A. Kreuzer, Köln
- 13.30 – 14.15 Uhr Mittagessen (Lunchbox)
- 14.15 Uhr Tagungsende
-

Abstracts

Akute lymphatische Leukämie & Burkitt Lymphome

Moderation: O. Haas, Wien & J. Bradtke, Gießen

RUNX1 copy number counts and intra-chromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): a flawless criterion prone to misinterpretation

1) Nebral K., 2) König M., 1) Kritz A., 3) Attarbaschi A., 2) Haas OA.,

1) Medgen.at GmbH, Vienna, Austria

2) CCRI, Children's Cancer Research Institute, Vienna, Austria

3) St. Anna Children's Hospital, Medical University, Vienna

Referent/in:

Name: Karin Nebral

Institution: Medgen.at GmbH, Vienna, Austria

E-Mail: karin.nebral@medgen.at

The intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) denotes a particular form of complex rearrangement that affects a single chromosome 21, which has some resemblance to a homogeneously stained region. It is a clinically relevant abnormality that occurs in approximately 2% of childhood B-cell precursor ALL (BCP-ALL). Children with an iAMP21 are in general older have a low white blood cell count and compared to other patients an increased relapse risk and thus an overall inferior outcome. The diagnostic hallmark of this unique genetic sub-group is the presence of three or more copies of the RUNX1 gene that by definition resides within a repetitive part of a single chromosome, which in interphase translated to a cluster of at least five RUNX1 copies per cell nucleus. Cytogenetically an iAMP21 usually appears as a peculiarly enlarged chromosome 21, although its verification depends on other methods that allow the unequivocal quantification of RUNX1 gene copy numbers, such as FISH, MLPA or CGH array analyses. The lack of appropriate metaphase spreads, on the other hand, can however also significantly hamper the correct interpretation of the otherwise distinct defining parameter. Based on the unique case of 4-year old boy with a constitutional trisomy 21 and a BCP-ALL whose leukemia originally fulfilled the diagnostic criteria of containing an iAMP21, we therefore demonstrate the necessity of even sub-optimal metaphase spreads for the clear-cut discrimination of this specific abnormality. The fact that in a series of 530 iAMP21 cases (Harrison et al, Leukemia 2013) only a single case was found with a constitutional trisomy 21 indicated that these two abnormalities are mutually excluding each other, a finding that prompted us to investigate this rather unusual coincidence in our patients in considerable more detail.

The diagnostic problem arose because cytogenetic analysis revealed only metaphases with the syndrome-inherent trisomy 21 alone. FISH analysis with specific RUNX1 and ETV6 probes, on the other hand, revealed the presence of more than five RUNX1 signals as well as a mono-allelic deletion of ETV6 in the vast majority of interphase cells. Having excluded the presence of hyperdiploidy with various centromere-specific FISH probes, this pattern was therefore compatible and indicative of an underlying iAMP21, especially also because several other chromosome 21 control probes produced only the expected three signals. SNP array analysis (Affymetrix SNP 6.0) of material from the patient and his parents proved that the constitutional trisomy 21 resulted from a maternal meiosis I nondisjunction error. Moreover, in the leukemic sample we identified several copy number abnormalities (CNA), the most important of which in this context were three regions on chromosome 21, namely a 24,6 Mb segment with six copies that contained RUNX1, a 7,5 Mb segment with three copies as well as a 3,2 Mb one that had only two copies because the paternal allele had been lost. Of further interest were also two CNAs that affected the short arm of the paternal chromosome 12. They consisted of a 23,8 Mb large deletion that encompassed ETV6 as well as five copies of the adjacent 6,9 Mb telomeric segment. A rigorous search finally revealed two abnormal metaphases with which we were finally able to confirm the existence of two derivative t(12;21) isochromosomes and with that to exclude the existence of an iAMP21.

Together we are strong: Cytogenetics, FISH, CGH array, Google and RT-PCR join forces to uncover an ETV6-INO80D gene fusion in an undifferentiated case of childhood ALL with a t(2;12)(q33;p13)

1) König M., 4) Grimm B., 1) Strehl S., 1) Denk D., 2)3) Attarbaschi A., 1)2) Haas O.A.

1) CCRI, Children's Cancer Research Institute, Vienna, Austria, 2) St. Anna Children's Hospital, Vienna, 3) Medical University, Vienna, 4) LabDia Labordiagnostik, Vienna

Referent/in:

Name: Margit König

Institution: CCRI, Vienna, Austria

E-Mail: margit.koenig@ccri.at

Apart from a diagnostic laboratory's task to delineate, sort out and classify all the different types of already known and established disease-specific genetic markers of clinical relevance, its other important duty is to define, decipher and interpret exceptionally rare, hitherto unknown but nevertheless potentially interesting chromosome abnormalities as well as their associated underlying molecular lesions. Based on an instructive example, we will show in our presentation how the combination of different diagnostic procedures together with thorough database and internet searches nowadays enables the fast, economic and efficient identification and characterization of unique translocation-associated gene fusions. Our case concerns a nearly 4-year old girl with an undifferentiated form of acute leukemia in whom interphase FISH screening with different types of ETV6/RUNX1 FISH probes uncovered an involvement of the ETV6 but not the RUNX1 gene. Such a configuration suggests the presence of an ETV6 fusion with a partner gene that remains to be identified. Hybridization of the only abnormal metaphase with ETV6 split-apart probes and successive confirmation with a whole chromosome painting probe proved that the translocation affected the long arm of chromosome 2, but also that the der(2) was duplicated. Because a comprehensive database and literature search did not reveal any other case with a similar form of translocation, we performed CGH array analysis, which owing to the unbalanced nature of this translocation was very well suited to accurately define the respective breakpoint regions. Based on the available characteristics and features of the three possible candidate genes, we selected INO80D as the most likely ETV6 fusion partner. This gene encodes a putative regulatory component of the chromatin remodeling INO80 complex, which is involved in transcriptional regulation, DNA replication and probably DNA repair. A subsequent Google search immediately revealed that an ETV6-INO80D gene fusion had indeed already been identified with whole genome sequencing in a single childhood case

with an early pre-T acute lymphoblastic leukemia (Zhang et al, Nature 481:157;2012). The supplied primer sequence information was then used for RT-PCR to conclusively proof in a single attempt that we had indeed identified another case in which exon 5 of the ETV6 was fused to exon 11 of the INO80D gene. Thus, our little diagnostic excursion was rewarded by the identification of the responsible genetic lesion, a t(2;12)(q33;p13) together with its corresponding molecular equivalent, the ETV6-INO80D gene fusion, but also confirmed that this rare abnormality is recurrent and defines a particular form of undifferentiated acute leukemia in childhood.

Clonal Evolution in Relapsed Burkitt Lymphoma/Leukemia by Cytogenetic and Molecular Cytogenetic Analyses

1) Aukema SM., 1) Theil L., 2) Rohde M., 3) Burkhardt B., 4) Klapper W., 5) Kluin PM., 1) Nagel I., 1) Siebert R., 1) Murga Penas EM.

1) Institute of Human Genetics, University Hospital Schleswig-Holstein Campus Kiel/Christian-Albrechts University, Kiel, Germany, 2) Department of Pediatric Hematology and Oncology, Justus Liebig University, Giessen, Germany, 3) Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Children's Hospital, Münster, Münster, Germany, 4) Institute of Hematopathology, University Hospital Schleswig-Holstein Campus Kiel/Christian-Albrechts University, Kiel, Germany, 5) Department of Pathology & Medical Biology, University of Groningen / University Medical Center Groningen, Groningen, Netherlands

Referent/in:

Name: Eva Maria Murga Penas

Institution: Institute of Human Genetics, University Hospital Schleswig-Holstein Campus Kiel/Christian-Albrechts University, Kiel, Germany

E-Mail: emurga@medgen.uni-kiel.de

Burkitt lymphoma/leukemia (BL/leukemia) is a highly aggressive B-cell lymphoma and the most common lymphoma in children. The biological hallmark of BL/leukemia is the overexpression of the oncogene MYC on chromosome 8 due to its juxtaposition to the immunoglobulin heavy chain (IGH) locus on chromosome 14 in the translocation t(8;14)(q24;q32) or, in its variants, to the IG light chain loci on chromosomes 2 and 22 in the translocations t(2;8)(p12;q24) and t(8;22)(q24;q11). In contrast to other MYC-translocation positive lymphomas, BL/leukemia is typically characterized by an overall low chromosomal complexity and favorable prognosis with only few relapses. The prognosis, however, for relapsed patients or those with progressive disease is still poor. In addition to MYC rearrangements, secondary chromosomal changes (SCCs) may be present contributing to the disease evolution and progression. As sequential cytogenetic studies are rarely performed still little is known about the underlying genetics of disease progression and relapse in BL/leukemia.

We herein report the characterization of the karyotype complexity and karyotypic evolution of 6 BL/leukemia sequential samples using conventional cytogenetic techniques and FISH. In addition, the published cytogenetic literature was explored using the Mitelman database as comprehensive cytogenetic resource. We calculated a complexity score (CS) for each karyotype by counting the number of numerical and structural chromosomal aberrations.

Karyotypes were considered complex (complex karyotype) if showing ≥ 3 aberrations (including IG-MYC).

The BL/leukemia cases included in this study comprised 5 pairs of initial diagnosis and sequential samples (one sequential sample $n=4$; two sequential samples $n=1$) and one patient at time of first relapse, blast crisis and secondary relapse. A search of the Mitelman database and the literature yielded additionally 18 pairs, including 2 patients with more than one follow up sample. All samples were positive for the IG-MYC translocation and consisted of a $t(8;14)(q24;q32)/IGH-MYC$ in 20/24 cases (83%) and $IGK/L-MYC$ in 4/24 (17%). The initial diagnostic samples showed a $CS=2$ (which is similar to other primary BL cases). Secondary investigations had a $CS=5$ and third investigations a $CS=9$. In fact, for the 4 patients with multiple follow-up samples available a mostly linear increase of karyotype complexity could be observed. Complex karyotypes were more frequently observed in sequential samples than in primary samples. Furthermore, we found strong evidence for clonal evolution since 19/24 of the sequential samples contained abnormalities already present at diagnosis with new acquired aberrations. Frequently observed SCCs at diagnosis and sequential samples included (partial) gains of chromosome 1q and 7q as well as (partial) losses of 13q, all being more frequent in the latter group. In contrast, loss of 17p and trisomy 21 were exclusively present in secondary cytogenetic samples, pointing to a role in disease progression. In conclusion, by analyzing paired BL/Leukemia samples, we found increasing karyotype complexity, specific SCCs, and clonal evolution that might reflect the underlying mechanism of disease progression or relapse and the dismal outcome of such cases.

Supported in the framework of MMML-MYC-SYS by the German Ministry of Health (grant 0316166).

Molekularzytogenetische Analysen bei MYC-negativen hochmalignen B-Zell-Lymphomen mit Charakteristika von Burkitt-Lymphomen und 11q-Zugewinn/Verlust-Muster (high-grade B-cell lymphoma with features of BL, MYC-, with 11q-gain/loss pattern)

1) Inga Nagel, 1) Rabea Wagener, 1) Inga Vater, 2) Wolfram Klapper, 2) Ilske Oschlies, 3) Elaine Jaffe, 1) Reiner Siebert

1) Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel/Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Deutschland;

2) Institut für Pathologie/Sektion für Hämathopathologie und Lymphknotenregister, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel/Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Deutschland;

3) Laboratory of Pathology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD

Referent/in:

Name: Inga Nagel

Institution: Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel/Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Deutschland

E-Mail: inagel@medgen.uni-kiel.de

Bei den allermeisten Burkitt-Lymphomen lässt sich zytogenetisch eine t(8;14)(q24;q32) oder eine ihrer Varianten bzw. molekularzytogenetisch eine IG-MYC Fusion nachweisen. In MYC-negativen Burkitt-Lymphomen gilt es zunächst, variante Bruchpunkte im Bereich insbesondere des MYC-Gens aber auch kryptische Insertionen von IG-Sequenzen in den MYC-Genort und umgekehrt auszuschließen. Wir konnten kürzlich zeigen, dass 3% aller über Genexpressions-Analysen definierte Burkitt-Lymphome keine MYC-Translokation tragen und auch sonst das MYC-Gen in diesen Fällen nicht dereguliert ist. Diese MYC-negativen Burkitt-Lymphome gehören zu einer Subgruppe von MYC-negativen hochmalignen B-Zell-Lymphomen mit Ähnlichkeit zu Burkitt-Lymphomen, die sich durch ein spezifisches chromosomales Aberrationsmuster mit einem Zugewinn in 11q23.2-q23.3 und einem Verlust in 11q24.1-qter auszeichnen (Salaverria et al., Blood, 2014).

Basierend auf den von uns publizierten Daten haben wir einen spezifischen Dreifarb-FISH-Assay für den Nachweis des Aberrationsmusters in 11q entwickelt. Mit diesem Assay konnten wir in fünf bislang unpublizierten MYC-negativen Lymphomen, bei denen der Verdacht auf ein Burkitt-Lymphom bestand, das typische Aberrationsmuster in 11q nachweisen. Nachfolgende Oncoscan (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA; n = 3) bzw. Array-

CGH (Human Genome CGH Microarray Kit 244A, Agilent, Santa Clara, CA, USA; n = 1)-Analysen bestätigten in allen untersuchten Fällen die FISH-Diagnose.

Die erhobenen Befunde belegen, dass bei Verdacht auf ein Burkitt-Lymphom und bei sicherem Ausschluss einer MYC-Translokation das Vorliegen eines „high-grade B-cell lymphoma with features of BL, MYC-, with 11q-gain/loss pattern“ differentialdiagnostisch in Erwägung gezogen werden sollte.

Akute myeloische Leukämie

Moderation: C. Haferlach, München & C. Ganster, Göttingen

Interessante Fälle mit Onkogen-Amplifikation aus dem Labor für Hämatologische Zytogenetik, Göttingen

Neu M., Künzel AK., Gutermuth A., Ganster C., Shirneshan K., Haase D.

Labor für Hämatologische Zytogenetik, Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie.
Universitätsmedizin Göttingen

Referent/in:

Name: Melanie Neu

Institution: Labor für Hämatologische Zytogenetik, Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie. Universitätsmedizin Göttingen

E-Mail: mel.neu@med.uni-goettingen.de

Onkogen-Amplifikationen gehören zu den seltenen aber rekurrent bei myeloischen Neoplasien auftretenden Hochrisiko-Anomalien, die besonders häufig die Onkogene C-MYC, MLL und RUNX1 betreffen können.

Wir stellen 8 interessante Fälle aus unserem Labor vor, bei denen wir mit unterschiedlichen Analyseverfahren (CBA, IP-FISH/CID-FISH, M-FISH, SNP-Array-Analysen) in unterschiedlichen Kombinationen versucht haben, die Proben möglichst umfassend zu charakterisieren. Die Diagnosen waren: MDS (n=3), AML aus MDS (n=2) und AML (n=3). Die Karyotypveränderungen verteilten sich wie folgt: Komplexe Anomalien (n=4); isol. Trisomie 4 (n=1); isol. del(5q) n=1; nur dmin/min bei sonst normalem Karyotyp (n=1); multiple Subklone mit unterschiedl. Chromosom 21-Anomalien (n=1). Die Kopienzahlen lagen zwischen 5 und >50.

Bei den Fällen konnten wir unterschiedliche Manifestationen von Onkogen-Amplifikationen mit unterschiedlichen Nachweisverfahren beobachten: CBA (hsr) + IP-FISH: n=2; CBA (minutes/double minutes) + IP-FISH: n=1; CBA (minutes/double minutes) + IP-FISH + SNP-A: n=1, nur SNP-A: n=1, CBA (Ringchromosom) + IP-FISH + SNP-A: n= 1, M-FISH + IP-FISH + SNP-A (n=1) und CBA (Ringchromosom) + SNP-A: n=1. Die nachgewiesenen Amplifikationen lagen in den Chromosomenregionen: 11q23/MLL (n=2), 8q24(MYC) (n=2), 11q24 (n=1), 21q22/RUNX1 (n=3). Weitere SNP-Analysen werden derzeit noch fertiggestellt. Daten zur genauen Ausdehnung/Lokalisation der amplifizierten Bereiche werden präsentiert. Hierbei ist besonders die Frage interessant, wie die Ausdehnung der Amplifikationen in Bezug auf bekannte Onkogene einzuschätzen ist. Hier wollen wir versuchen, die Frage zu

beantworten, ob die Onkogene komplett amplifiziert sind, nur Teilbereiche, nur Bereiche in ihrer Nähe oder Regionen ohne Bezug zu typischen Onkogenen. Im Rahmen des Vortrages soll auch der sequenzielle Einsatz der verschiedenen Analyseverfahren (von der CBA bis hin zur SNP-Analyse) dargestellt werden.

Tabelle: Kurzzusammenfassung relevanter zytogenetischer – und SNP-Befunde (nicht ISCN-konforme Darstellung)

Dg.	Fall	CBA-Daten+	IP-FISH-Daten*	M-FISH-Daten*	SNP-A Daten*
AML aus MDS	13-0719	komplex aberrant hsr(11q23)	4x MLL in 82% 5x MLL in 10%	Vergrößertes, strukturell verändertes Chr. 11	folgen
AML	14-0981	isolierte Trisomie 4 2~41 min/dmin/N	5x - >20x MYC in 86%	Trisomie 4 min/dmin nicht zuordenbar	folgen
AML	13-1536	5~25 dmin/N	>5x MYC in 89%	dmin, Anfärbung wie Chr. 8	arr[hg19] 8q24.13q24.21(126,437,443-130,724,556)x15
MDS RAEB-2	13-0480	komplex aberrant hsr(11q23)	>4x MLL in 32%	Markerchromosom (derivative chr.22) mit hsr	folgen
AML aus MDS	13-1330	isolierte Deletion 5q/N	unauffällig	n.d.	arr[hg19] 11q24.3q25(128,108,506-131,848,638)x5-11
MDS	12-1236	komplex aberrant Ringchromosom, Markerchromosomen	4x RUNX1 in 44%	Ringchromosom 21 „Zebrachromosom“: 21::22::21::22::21::22	arr[hg19] 21q11.2q22.3(15,006,457-48,097,372)x2~3
AML	12-1364	komplex aberrant multiple Marker #21-artig	>4x RUNX1 in 53%	der(21)dup(21q) unterschiedl. Größe in bis zu 11 Kopien	arr[hg19] 21q22.12(36,284,501-37,009,914)x5
MDS RCMD	12-0235	dup(21)(q21q22), r(21)(p11q22)/N	RUNX 1 nicht amplifiziert	21q+ Chromosom Ringchromosom(en) 21	arr[hg19] 21q22.12q22.2(37,773,163-41,412,643)x3-5

+ = Übersichtsangaben und Daten bezogen auf die Amplifikation, * = bezogen auf die Amplifikation; CBA= Chromosomenbänderungs Analyse; IP= Interphase; hsr= homogeneously staining region; N=normale Metaphasen; min=minutes; dmin=double minutes; n. d. = nicht durchgeführt

EVI1-Amplifikation in Form von zytogenetisch kryptischen double minutes als neuer Mechanismus für die Überexpression des EVI1-Gens

Truger M., Volkert S., Schnittger S., Zenger M., Kern W., Haferlach T., Haferlach C.

MLL Münchner Leukämie Labor, München

Referent/in:

Name: Marietta Truger

Institution: MLL Münchner Leukämie Labor

E-Mail: marietta.truger@mll.com

Bei Patienten mit AML und MDS ist eine Überexpression von EVI1 (3q26) mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Bei EVI1 handelt es sich um eine Spleißform des Locus MECOM, welcher aus den Genen MDS1 und EVI1 besteht. Meist führt ein chromosomales Rearrangement unter Involvierung der Chromosomenbande 3q26 zu einer EVI1-Überexpression, wobei die paracentrische Inversion $inv(3)(q21q26)$ die häufigste Chromosomenveränderung darstellt. Auch zytogenetisch kryptische 3q26-Rearrangements wurden als Ursache für die Überexpression von EVI1 beschrieben. Jedoch kann eine EVI1-Überexpression auch ohne das Vorliegen eines 3q26-Rearrangements auftreten, weshalb der aberranten Expression weitere Mechanismen zugrunde liegen müssen.

In vier von 2242 AML- und 1381 MDS-Patienten wurde mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Interphasekernen eine Amplifikation des EVI1-Gens nachgewiesen. Durch Fluoreszenz in situ Hybridisierungen an Metaphasen konnte gezeigt werden, dass diese Patienten eine EVI1-Amplifikation aufweisen, welche in Form von double minutes vorliegt. Double minutes sind kleine azentrische Chromosomenstrukturen, die bei etwa 1 % der AML- und MDS-Patienten beobachtet werden. In den meisten Fällen findet sich eine Amplifikation der Gene MYC (8q24) oder MLL (11q23). Während die Amplikons bei Patienten mit double minutes mit einer MYC-Amplifikation eine Größe von 4,29 - 7,83 Mbp aufweisen, umfassen die hier beschriebenen Amplikons bei Patienten mit double minutes mit einer EVI1-Amplifikation entsprechend der durchgeführten Array CGH-Analysen lediglich 0,49 - 0,78 Mbp. Aufgrund dieser geringen Größe sind sie in der Chromosomenanalyse nicht sichtbar. Eine EVI1-spezifische quantitative Realtime PCR zeigte in allen vier Patienten eine Überexpression (mediane Ratio % EVI1/ABL 88,9), wie sie bei Patienten mit $inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)$ bzw. anderen 3q26-Rearrangements beobachtet wird (mediane Ratio % EVI1/ABL 86,1 bzw. 83,2).

Zytogenetisch kryptische double minutes mit einer EVI1-Amplifikation stellen einen seltenen neuen Mechanismus dar, welcher bei AML- und MDS-Patienten ohne 3q26-Rearrangement zu einer Überexpression des EVI1-Gens führt.

Rekurrierende Einzelmetaphasen mit Deletion 11q bei Verlaufskontrollen einer zytogenetisch unauffälligen AML: minimaler Zellklon oder Artefakt?

Erdel M, Deutschbauer S, Breitenfellner S, Berger M, Heinen M, Kriegner S, Webersinke G

Labor für Molekularbiologie und Tumorzytogenetik, Krankenhaus der Barmherzigen Schwestern, Linz

Referent/in:

Name: Martin Erdel

Institution: Labor für Molekularbiologie und Tumorzytogenetik, Krankenhaus der Barmherzigen Schwestern, Linz

E-Mail: martin.erdel@bhs.at

Wir berichten über einen männlichen Patienten mit akuter Leukämie. Bei Erstdiagnose 07/2012 fanden sich im Knochenmark zytologisch und durch FACS 60 % bzw. 80 % Blasten mit CD34 negativem myelomonozytärem Immunophänotyp (AML M4). Initial war molekulargenetisch eine NPM1 Mutation nachweisbar, bei nicht-mutiertem FLT3 Gen und unauffälligem Karyotyp. Unter Chemotherapie (2x Induktion A-ICE und 3x Konsolidierung) war die NPM1 Mutation bereits nach einem Monat nicht mehr nachweisbar (Teilpopulation?). Nach 4 Monaten (11/2012) erlangte der Patient eine komplette Remission. Die Vollremission mit konventionell zytogenetischem Normalbefund hält im weiteren Krankheitsverlauf bei engmaschigen Kontrollen über den Zeitraum von 15 Monaten bis heute an. Nach 5 Monaten und 7 unauffälligen Karyotypanalysen fand sich jedoch erstmals eine zunächst unbeachtete einzelne Metaphase mit einer Deletion 11q. Die Deletion trat danach in insgesamt 5 von 7 unabhängigen Proben im Zeitraum 12/2012 bis 2/2014 wieder als einzelne (nicht klonale) Aberration in einer Metaphase auf. Durch FISH mit 3 unterschiedlichen Sonden für die Region 11q13-q23 (CCND1, ATM, MLL/KMT2A) konnte ein Klon mit 11q Deletion nicht nachgewiesen werden (getestet wurden 2 von den betroffenen KM-Proben und das initiale Material mit 80 % Blasten). Die auffälligen Metaphasen und der Klonalitätsbegriff nach ISCN werden zur Diskussion gestellt.

Concomitant Tetrasomy 8 and Isochromosome 5p Clonally Evolved from Trisomy 8 in a Patient with Acute Monoblastic Leukemia

1) Paar C., 1) Herber G., 2) Voskova D., 2) Fridrik M., 1) Stekel H., 1) Berg J.

1) Institute of Laboratory Medicine, and 2) Department of Medicine III, General Hospital Linz, Linz, Austria

Referent/in:

Name: Christian Paar

Institution: Institut f. med. und chem. Labordiagnostik, Molekularbiologie

E-Mail: christian.paar@akh.linz.at

Trisomy 8 is a frequent numerical chromosomal aberration in myeloid malignancies. In contrast, tetrasomy 8 is a rare event and reported in few cases mostly in AML of monocytic lineage. Tetrasomy 8 seems to be associated with poor prognosis. The clonal relationship between trisomy and tetrasomy 8 is not clear in the cases described. Gain of isochromosome 5p represents a very rare abnormality in AML and seems to concomitantly occur with a complex karyotype. Response to chemotherapy was reportedly poor in those patients.

We report on a patient (male, age 67) with acute monoblastic leukemia. At diagnosis conventional karyotyping (GTG-banding) showed trisomy 8 and an unbalanced translocation $\text{der}(19)\text{t}(17;19)(\text{q}23;\text{p}13)$ as sole chromosomal abnormalities in four of 20 metaphases. Abnormalities were confirmed by multicolor FISH analysis. NPM1 was found mutated and FLT-3 internal tandem duplications were not detected. After induction chemotherapy (Daunorubicin and Cytarabine) the patient achieved complete cytogenetic remission and was further followed up with consolidation therapy. A first relapse occurred 14 months thereafter. Karyotyping then showed tetrasomy 8 and gain of an isochromosome 5p concomitant with the previously noted $\text{der}(19)\text{t}(17;19)$. Thus, clonal evolution had occurred. Induction chemotherapy was repeated and led to complete remission. At 19 months a second relapse occurred. In addition to the previously observed abnormalities karyotyping then showed a second $\text{der}(19)\text{t}(17;19)$ in 16 of 22 metaphases analyzed. Interphase-FISH analysis confirmed tetrasomy 8 and isochromosome 5p in 21% [46/219] of the cells. Interestingly, trisomy 8 without isochromosome 5p was found in 15% [32/219] of the cells, indicating persistence of the primary clone in this patient.

By using the derivative chromosome 19 as clonal marker we clearly showed that tetrasomy 8 has evolved from trisomy 8 in this case of AML. In addition, this case represents the first description of concomitant tetrasomy 8 and isochromosome 5p in AML together with a

translocation der(19)t(17;19). The patient's course of disease is in line with previous case reports, which indicated that these abnormalities represent factors of poor prognosis.

Solide Tumoren

Moderation: H. Schildhaus, Göttingen & S. Deutschbauer, Linz

Gangliogliomas: results of GTG, SKY, genome-wide high resolution SNP- array, and gene expression analyses

1) Holland H., 1+2) Xu L., 1+2+3) Kirsten H., 1+3) Ahnert P., 5) Koschny R., 6) Bauer M., 6) Schober R., 6) Mueller W., 2) Meixensberger J., 2) Krupp W.

1) Translational Centre for Regenerative Medicine (TRM), Leipzig, Germany

2) Department of Neurosurgery, University of Leipzig, Leipzig, Germany

3) Institute for Medical Informatics, Statistics and Epidemiology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

4) Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, Leipzig, Germany

5) Dept. of Internal Medicine, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

6) Division of Neuropathology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Referent/in:

Name: Heidrun Holland

Institution: Universität Leipzig, Translationszentrum für Regenerative Medizin

E-Mail: Heidrun.Holland@medizin.uni-leipzig.de

According to the World Health Organization gangliogliomas are classified as well differentiated, slowly growing rare neuroepithelial tumors, composed of neoplastic mature ganglion and glial cells. This is the most frequent tumor entity observed in patients with long-term epilepsy. Comprehensive cytogenetic and molecular cytogenetic analyses including high-resolution genomic profiling (SNP-array) of gangliogliomas are not currently found in the literature but are necessary to better understand this tumor entity. The literature lists 10 gangliogliomas investigated by GTG and sometimes additionally by spectral karyotyping (SKY) and 64 studies applying comparative genomic hybridization (CGH). By CGH, frequent chromosomal aberrations are (partial) losses of chromosomes 9, 10, 13, 16, 17, 18, and 22 and (partial) gains of chromosomes 5, 7, 8, and 12. For detailed characterization at the single cell and cell population levels, we analyzed genomic alterations of gangliogliomas using SNP-array, combined with GTG-banding, SKY, and locus-specific FISH. By GTG and SKY, we could confirm frequently detected chromosomal aberrations (losses within chromosomes 10, 13, and 22; gains within chromosomes 5, 7, 8, and 12), and identified not previously described genetic aberrations. Interestingly, we could verify a second case of ganglioglioma with ringchromosome 1. Using the presented methods, we detected a not previously documented unbalanced non reciprocal translocation $t(18;1)(q21;?)$ in 4/40 metaphases of

one ganglioglioma. Analyses of SNP- array data from two of the tumors and respective germline DNA (peripheral blood) identified a number of copy neutral regions with loss of heterozygosity (LOH) in germline as well as in tumor tissue. In comparison to germline DNA, tumor tissues did not show substantial regions with significant losses or gains or with LOH. Gene expression analyses of tumor-specific genes revealed similarities in the profile of the analysed samples across different relevant pathways. We described rare cases of three gangliogliomas with overlapping but also distinct and not previously described genetic aberrations.

GlioMath-DD: Ein multidisziplinäres Konsortium zur Erforschung der Evolution von Gliomen für neue therapeutische Ziele und individualisierte Therapien

1) Klink B., 1) Abou-El-Ardat K., 2) Wiedemuth R., 3)4) Seifert, M., 4) Köhn-Luque A., 5) Ingargiola M., 6) Stirnagel K., 1)5) Krüger A., 4) Nagel W., 6) Geiger K., 3) Beyer A., 5) Kunz-Schughart L.A., 2) Schackert G., 2) Temme A., Schröck E., 4) Deutsch A.

1) Institute für Klinische Genetik, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Dresden,

2) Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden, Dresden,

3) Biotechnologisches Zentrum (BIOTEC), Technische Universität Dresden, Dresden,

4) Zentrum für Informationsdienste und Hochleistungsrechnen (ZIH), Technische Universität Dresden, Dresden,

5) OncoRay - National Center for Radiation Research in Oncology, Technische Universität Dresden, Dresden,

6) Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden, Dresden

Referent/in:

Name: Barbara Klink

Institution: Institut für Klinische Genetik, TU Dresden

E-Mail: barbara.klink@tu-dresden.de

Der häufigste und gleichzeitig bösartigste primäre Hirntumor des Erwachsenenalters ist das Glioblastom (GBM). Die Prognose ist infaust. Die Überlebenszeit beträgt trotz multimodaler Therapiestrategien im Durchschnitt weniger als ein Jahr. GBM können entweder de novo auftreten (ohne erkennbare Vorstufen), oder sich durch maligne Progression aus niedriggradigen Gliomen entwickeln (sogenannte sekundäre GBM). Vorangegangene Studien zeigen, dass sich sekundäre GBM von de novo GBM genetisch unterscheiden. Bisher fehlen Studien, welche die Veränderungen eines individuellen Tumors im Verlauf seiner Progression verfolgen, obwohl in den letzten Jahren viel dazu beigetragen wurde, die zeitlichen Abläufe des Auftretens von Mutationen im Zusammenhang mit der Progression von Gliomen aufzuklären. Zwar kennt man häufige Aberrationen, welche mit unterschiedlichen Malignitätsgraden von Gliomen assoziiert sind, jedoch ist es schwer vorherzusagen, welche Veränderungen für den individuellen Tumor und dessen Progression entscheidend sind.

Das GlioMath-DD-Konsortium ist ein interdisziplinärer Zusammenschluss aus sieben Forschergruppen an der Technischen Universität Dresden, mit dem Ziel, die Progression von Gliomen zu studieren und mathematische Modelle zur Gliomentstehung zu entwickeln. Dazu werden von denselben Patienten Tumorproben von sekundären GBM und zugehörigen niedriggradigen Vorläufergliomen gewonnen und umfassend analysiert. Alle Tumorproben werden durch einen Neuropathologen evaluiert, hochqualitative DNA und RNA werden extrahiert. Die Detektion von Kopienzahlvarianten (copy number variations – CNVs) erfolgt mittels Array-CGH. Durch Hochdurchsatzsequenzierung von RNA und DNA (RNA-Seq und Exom-Seq) werden Veränderungen in der Genexpression sowie kleine Mutationen ermittelt. Die integrative Datenanalyse erfolgt mittels bioinformatischer Methoden. Für die Entwicklung mathematischer Modelle der Tumورprogression werden Schlüsselveränderungen in Genen und Signalnetzwerken verwendet. In diese Modelle fließen Informationen aus in vitro Studien zu Zellwachstum und Spheroidformation in 2D- und 3D-Zellkulturen ein.

Dieses für zweieinhalb Jahre geplante Projekt zielt letztendlich auf die Entwicklung eines umfassenden Modells der Gliomentstehung und –progression. Außerdem sollen tumorrelevante, sogenannte Driver-Mutationen identifiziert werden, welche zur malignen Progression beitragen und somit mögliche Biomarker für die Prognose und Therapie von Gliomen sind. Während der Arbeitstagung werden wir vorläufige genetische Daten unserer laufenden Studie vorstellen.

Danksagung: Das GlioMath-DD-Projekt (SAB-Nummer 100098214) wird gefördert durch den Europäischen Sozialfonds (ESF) und den Freistaat Sachsen.

Intraindividuelle aCGH-Analysen bei einer 33jährigen Patientin mit rekurrentem Astroblastom: Fallbericht und Literaturübersicht

1) Kraemer D.*, 2) Klink B.*, 1) Ketter R., 1) Oertel J., 2) Schröck E., 1) Urbschat S.

*gleichberechtigte Erstautoren

1) Klinik für Neurochirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

2) Institut für Klinische Genetik, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, TU Dresden

Referent/in:

Name: Dennis Kraemer

Institution: Klinik für Neurochirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

E-Mail: dennis.kraemer@uniklinikum-saarland.de

Einleitung: Astroblastome sind sehr seltene neuroepitheliale Hirntumoren von noch nicht definitiver Histogenese mit weitgehend ungesicherter Prognose und unzureichend validiertem zugehörigen Therapieregime. Die Altersinzidenzverteilung ist bimodal mit prominenten Gipfeln in der Kindheit und im jungen Erwachsenenalter. Astroblastome machen lediglich 0,45–2,8% aller pädiatrischen primären Hirntumoren aus. Bildmorphologisch erscheinen sie als großflächige, solid-umschriebene, meist frontal-hemisphärisch lokalisierte Raumforderungen. Über die der Tumorigenese und Progression zugrundeliegenden genetischen Alterationen ist nur sehr wenig bekannt. Erstmals untersuchten wir bei einer Patientin Astroblastomläsionen intraindividuell mittels Array-CGH-Analyse. Die Ergebnisse werden im Vergleich zu der limitierten Literatur diskutiert.

Falldarstellung/Methoden: Wir berichten von einer zum Zeitpunkt des neurochirurgischen Ersteingriffs 33jährigen weiblichen Patientin mit multirezidivierendem und multifokalem rechtshemisphärischem Astroblastom. Nach der primären Exstirpation eines rechts parieto-okzipital gelegenen Herdes musste sich die Patientin infolge meningeal disseminierten Tumorwachstums sechs weiteren Rezidivoperationen u. a. an sekundären, rechts frontal lokalisierten Herden unterziehen. Histopathologisch ging die sekundäre Herdbildung mit einem Tumorprogress von „low-grade“ zu „high grade“ einher. Für die zweite („low-grade“, Primärherd) und sechste Rezidivmanifestation („high grade“, Sekundärherd) wurde eine aCGH-Analyse mit einer kombinierten CGH+SNP 2X400 K-Plattform (Agilent, Santa Clara, CA) durchgeführt.

Resultate: Als potentiell tumorrelevante Kopiezahlveränderungen (CNV) wurden konsistent in beiden Rezidivläsionen Verluste in den Regionen von 6q23 und 9p22 registriert. Daneben

zeigten sich neben dem Verlust eines X-Chromosoms, jeweils Monosomien der Chromosomen 10 und 18. Zugewinne von Chromosom 7 wurden zudem in beiden metachronen Astroblastomen detektiert. Als mögliche progressionsassoziierte Aberrationen traten bei der „High-grade-Manifestation“ Verluste von 4p14 und 19q13.33 hinzu. Ferner wies die Analyse auf eine zusätzlich zum Verlust eines homologen Chromosoms 10 getretene Deletion in 10q23 hin.

Diskussion: Trotz erheblicher Differenzen im klinischen Verhalten legt das Aberrationsprofil des untersuchten Astroblastoms eine mögliche genetische Verwandtschaft mit höhergradigen Gliomen nahe. Das konkomitante Auftreten der numerischen Veränderungen +7 und -10 sowie Deletionen der den Tumorsuppressor PTEN beherbergenden 10q23-Region gelten nämlich als zytogenetisch charakteristisch für Glioblastome. Weitere molekularzytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen werden sich anschließen, um für das Astroblastom onkobiologisch potentiell relevante Kandidatengene genauer zu evaluieren.

Cytogenetics of extramedullary manifestations in multiple myeloma

Janjetovic S. 1, Dierlamm J. 1, Schmidt-Hieber M. 2, Lohneis P. 3, Marx A. 4, Matschke J. 5, Bokemeyer C. 1, Schilling G. 1

1Department of Oncology and Hematology, BMT with section of Pneumology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

2HELIOS Clinic Berlin-Buch, Clinic for Hematology, Oncology and Tumorimmunology, Berlin, Germany

3Institute of Pathology, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

4Institute of Pathology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

5Institute of Neuropathology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany,

Referent/in:

Name: Snjezana Janjetovic

Institution: Department of Oncology and Hematology, BMT with section of Pneumology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

E-Mail: s.janjetovic@uke.de

Introduction: Extramedullary disease (EMD) of multiple myeloma (MM) is defined by the presence of extraskelatal clonal plasma cells infiltrates. It occurs in up to 40% of all MM patients either at initial diagnosis or at relapse, and it is accompanied with a poor outcome.

The prognostic factors predicting the development of EMD have not yet been defined. There are limited numbers of studies that address the cytogenetics of extramedullary myeloma, showing increased incidence of 17p13 deletion, MYC-overrepresentation and translocation t(4;14).

Material: Sixty paraffin-embedded tissues from the patients with primary extramedullary plasmocytoma (EMP), skeletal EMD, and the „true“ EMD were collected retrospectively. EMP represents the cases with isolated plasma cell tumors without signs of systemic disease dissemination. Skeletal EMD are defined as plasma cell tumors arising from bone disease, whereas „true“ EMD develop throughout haematogenous spread.

Methods: For cytogenetic investigation of the paraffin-embedded samples, we combined fluorescence in situ hybridization with stains for cytoplasmatic light chains (clg-FISH).

The following panel of FISH probes were used: c-MYC (8q24), TP53 (17p13); FGFR3/IGH for t(4;14); 13q14, IGH/CCND1 for t(11;14), and IGH/MAF for t(14;16).

Results: The samples of 8 patients were analyzed up to now. 13q deletion was found in five (62,5%), 17p in two (25%), t(11;14) and t(4;14) in one analyzed case (12,5%), respectively. We did not find t(14;16) in any of the analyzed samples.

Further perspectives: The aim of our study is to compare the cytogenetic aberrations between EMP, skeletal EMD and „true“ EMD patients, assuming that EMD represents an aggressive course of disease. Further, we want to compare the bone marrow cytogenetics from myeloma with cytogenetics of EMD in order to determine the possible changes at cytogenetic level preceding the EMD development.

Myelodysplastisches Syndrom

Moderation: D. Haase, Göttingen & M. Erdel, Linz

Klonalität des Y-Verlusts bei MDS

1) Ganster C., 1) Shirneshan K., 1) Braulke F., 2) Kämpfe D., 3) Machherndl-Spandl F., 4) Süßner S., 5) Koziolk M., 1) Haase D., 1) Schanz J.

1) Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, 2) Praxis für Hämatologie und Onkologie, Lüdenscheid, 3) Krankenhaus der Elisabethinen, Linz, 4) Österr. Rotes Kreuz, Landesverband OÖ, Linz, 5) Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen

Referent/in:

Name: Christina Ganster

Institution: Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Universitätsmedizin Göttingen

E-Mail: christina.ganster@med.uni-goettingen.de

Der Verlust des Y-Chromosoms ist ein normales altersbedingtes Ereignis und tritt auch bei älteren Männern ohne hämatologische Erkrankung auf. Es ist aber unklar, ob und wann der Verlust des Y-Chromosoms ein Marker für einen neoplastischen Klon ist. Bei myelodysplastischen Syndromen (MDS) könnte der Verlust des Y-Chromosoms als klonales Ereignis betrachtet werden, da MDS-Patienten mit einem Verlust des Y-Chromosoms als alleinige Anomalie eine sehr günstige Prognose (besser als ein normaler Karyotyp) haben. Auch wenn es Hinweise darauf gibt, dass ein größerer Klon mit MDS assoziiert ist, ist der Y-Verlust bei Patienten ohne sichere morphologische Anzeichen für ein MDS kein Beweis für eine hämatologische Erkrankung. Ziel dieser Studie war es zu überprüfen, ob der Verlust des Y-Chromosoms mit MDS assoziiert ist und den Schwellenwert festzulegen, ab welcher Klongröße ein Y-Verlust MDS-assoziiert ist. Unser Ansatz basiert auf der Hypothese, dass der Y-Verlust in normalen CD3+ T-Zellen altersassoziiert - und in klonalen CD34+ Zellen mit der Krankheit assoziiert ist.

Bei Männern ohne hämatologische Erkrankung und Patienten mit gesichertem MDS wurden CD34+ Zellen und CD3+ Zellen immunomagnetisch angereichert. Die Klongröße der Zellen mit Y-Verlust wurde mittels FISH Analyse bestimmt. In die Auswertung inkludiert wurden nur Männer, bei denen die Klongröße in den CD34+ Zellen größer als unser laborinterner Schwellenwert (7,7%) war. Das Alter der 11 gesunden Männer unterschied sich nicht von dem der 33 Patienten mit gesichertem MDS (78 (61-87) Jahre vs. 77 (49-92) Jahre, $p > 0,05$). Bei den Patienten war die Klongröße in den CD34+ Zellen signifikant größer als bei den Kontrollen (47% (8%-97%) vs. 13% (9%-42%), $p = 0,0013$). Die Klongröße in den CD3+

Zellen unterschied sich zwischen Patienten und Kontrollen nicht (5% (0%-33%) vs. 5% (0%-11%), $p > 0,05$). Bei der Differenz der Klongröße (Klongröße in CD34+ Zellen minus Klongröße in CD3+ Zellen) zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen (36% (8%-84%) vs. 9% (6%-36%), $p = 0,0002$). Mittels Grenzwertoptimierungskurven (ROC Kurven) wurde überprüft, ob die Klongröße geeignet ist, zwischen gesunden Kontrollen und MDS Patienten unterscheiden zu können. Mit Hilfe der Klongröße in CD3+ Zellen kann zwischen gesunden Kontrollen und MDS Patienten nicht unterschieden werden (AUC (Fläche unter der Kurve) = 55% (34%-77%). Die Klongröße in CD34+ Zellen ist hingegen ein guter Klassifikator zwischen gesunden Kontrollen und MDS Patienten (AUC = 82% (69%-95%)). Der optimale Schwellenwert, bei dem möglichst wenig gesunde Kontrollen und MDS Patienten falsch eingeteilt werden, liegt bei 20%. Mit Hilfe der Differenz zwischen der Klongröße in CD34+ Zellen und in CD3+ Zellen verbessert sich die richtige Einteilung in die beiden Gruppen nicht signifikant (AUC = 89% (78%-100%), Schwellenwert = 12%, $p < 0,05$).

Unsere Daten weisen darauf hin, dass der Y-Verlust bei MDS nicht nur altersbedingt sondern oft auch klonal oder eine Kombination von beiden ist. Der Schwellenwert für einen MDS-assoziierten Y-Verlust in CD34+ Zellen aus dem peripheren Blut liegt bei 20%. Diese Information hat Bedeutung für die Bestimmung der Klonalität, der Vorhersage der Prognose und kann als Marker für das Therapieansprechen verwendet werden.

Karyotypevolution im Rahmen der Lemon5 Studie

1) Shirneshan K., 2) Platzbecker U., 3) Nolte F., 4) Giagounidis A., 5) Götze K., 1) Bräulke F, 1) Schanz J., 6) Germing U., 1) Haase D.

1) Department of Hematology and Oncology, University of Goettingen, Goettingen, 2) Medical Clinic I, University Hospital, Dresden, 3) University Medicine Mannheim, Mannheim, 4) Marien Hospital, Düsseldorf, 5) Tech. University of Munich, Munich, 6) Heinrich-Heine-University, Duesseldorf

Referent/in:

Name: Katayoon Shirneshan

Institution: Klinik für Hämatologie und Onkologie Universitäts Medizin Göttingen

E-Mail: shirneshan@med.uni-gottingen.de

In der LeMon5- Studie war es unser Ziel, herauszufinden, ob eine Lenalidomid-Behandlung bei Patienten mit IPSS low- oder Intermediate-I-Risk MDS eine Karyotyp evolution (KE) fördern und somit das Risiko einer leukämischen Transformation erhöhen kann. Somit ist es ein wichtiges Ziel der LeMon5-Studie, die zytogenetischen Verläufe unter der Behandlung mit Lenalidomid zu untersuchen.

Um eine isolierte 5q Deletion sicherzustellen, wurde beim initialen Screening eine Chromosomenbänderungs- (CBA) sowie eine FISH-Analyse an Knochenmark Aspirat durchgeführt. Ebenfalls initial und im Verlauf alle zwei bis drei Monate wurde zusätzlich eine FISH-Analyse an immunomagnetisch angereicherten CD34+ Zellen des peripheren Blutes (PBC) mit ein FISH-Panel von 8 bis 13-Sonden für die häufigsten Aberrationen MDS (Bräulke et al. Leuk Res, 2010, 2013) durchgeführt. Dieser Methode erlaubt eine zuverlässige Überwachung der zytogenetische Veränderungen während der Therapie. Eine komplette zytogenetische Remission (CCR) wurde wie folgt definiert: keine Metaphasen mit del(5q) und ein EGR1 Verlust in CD34+ PBC unterhalb der Laborschwelle von 5%. Eine partielle zytogenetische Remission (PCyR) wurde definiert als: > 50% Reduktion der Klongröße (bezogen auf den initialen Wert), hierzu wurden auch Fälle gezählt mit einer CCR an nur einem Zeitpunkt und solche, die eine CCR mit entweder nur CBA oder nur in der FISH-Analyse erreicht hatten.

Von den 84 eingeschlossenen Patienten stehen derzeit Follow-up-Daten für 71 Patienten (mindestens 2 verschiedene Zeitpunkte) zur Verfügung.

Eine zytogenetische Response wurde nach einem Median von 6 (2-12) Monaten nach Beginn der Therapie für eine mediane Dauer von 14 (2-28) Monaten beobachtet. Die mediane del (5q)-Klongröße war zu Beginn der Therapie 60% bei den Respondern. Nach 10

Zyklen war die maximale Klonegrößenreduktion erreicht (auf im Median 2,6%). Bei 10 von 67 Patienten (15%) kam es zu einer KE im del(5q)-Klon nach einer medianen Zeit von 18 Monaten (6-42). Im Vergleich zum Anteil der spontanen KE (13%) in einer repräsentativen MDS Kohorte (n = 729 mit 13% KE) war der Anteil an Fällen mit KE unter Lenalidomid nicht erhöht (Cevik et al. DGHO 2013).

Unsere vorläufigen Ergebnisse zeigen, dass ein zytogenetisches Ansprechen auf Lenalidomid bei >80% der Patienten mit isolierter del (5q) und Low Risik-MDS erreicht werden kann.

Die Chromosombänderungsanalyse kann mit der CD34+ FISH-Analyse aus peripherem Blut für eine zuverlässige Überwachung der Response und einer möglichen KE sinnvoll ergänzt werden. In der untersuchten Patientengruppe unter der Behandlung mit Lenalidomid ist die Rate an KE im Vergleich mit einer repräsentativen MDS-Kohorte nicht erhöht.

How to determine chromosome banding resolution in tumor cytogenetics?

Harald Rieder, Gerrit Kasper, Barbara Hildebrandt, Ina Bachmann

Institute for Human Genetics, University Hospital, Düsseldorf

Referent/in:

Name: Harald Rieder

Institution: Univeritätsklinikum Düsseldorf

E-Mail: harald.rieder@uni-duesseldorf.de

The detection of chromosome aberrations in leukemias depends on the quality of the chromosome preparation. Apart from the very basic necessity to get the leukemic cells into metaphase, the spreading and banding resolution of the metaphase chromosomes determine the quality and, thus, the informative value of the chromosome analysis.

In current interlaboratory tests in leukemia cytogenetics, karyotypes of the respective participating laboratories are being collected to check if the chromosome aberrations described in the reports are represented in the chromosomes. So far, a very heterogeneous pattern of chromosome quality has been found in these karyotypes.

In pre- and postnatal cytogenetics, systems for the measurement of the quality of the chromosome preparations including the number of crossing chromosomes, banding resolution, and the number of grey levels have been developed. However, it has not been tested if these systems may also be used in leukemia cytogenetics so that a valid system to measure chromosome quality in leukemia cytogenetics still is missing.

To address this problem, we analysed the banding patterns in G-banded chromosomes from leukemic cells with defined chromosome aberrations and determined the number of bands of each chromosome. A system for the evaluation of the chromosome banding resolution has been developed which will be discussed.

B-Zell Lymphome und Plasmazell-Neoplasien

Moderation: L. Harder, Kiel & C. Krings Rocha, Köln

Comparison of Conventional Cytogenetic Analysis and Whole Genome Sequencing in Germinal-Center derived B-Cell Lymphomas in the Framework of the ICGC MMML-Seq Project

1) Lopez C., 2) Sungalee S., 3) Bernhardt SH., 4) Schlesner M., 1) Murga-Penas EM., 1) Haake A., 1) Richter J., 1) Ammerpohl O., 5) Borkhardt A., 6) Brors B., 7) 8) Burhardt B., 9) Claviez A., 10) Dreyling M., 11) Eberth S., 6) Eils J., 6) Eils R., 12) Haas S., 13) Hansmann ML., 5) Hezaveh K., 5) Hoell J., 3) Hoffmann S., 14) Hummel M., 15) Karsch D., 16) Klapper W., 17) Kostezka U., 18) Kreuz M., 11) Kube D., 19) Küppers R., 3) Langenberger D., 6) Lawrenz C., 20) Leich E., 14) Lenze D., 6) Lichter P., 18) Loeffler M., 21) Möller P., 6) Radlwimmer B., 6) Radomski S., 8) Rohde M., 22) Rosenstiel P., 20) Rosenwalds A., 18) Rosolowski M., 22) Schillhabel M., 23) Schreiber S., 24) Stadler PF., 16) Szczepanowski M., 11) Trümper L., 19) Weniger M., 2) Korb J., 1) Siebert R.

1) Institute of Human Genetics, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany, 2) EMBL Heidelberg, Genome Biology, Heidelberg, Germany, 3) Transcriptome Bioinformatics, Leipzig, Germany, 4) Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ), Division Theoretical Bioinformatics, Heidelberg, Germany, 5) Dpt. of Pediatric Oncology, Hematology a. Clinical Immunology, H.-Heine-University, Düsseldorf, Germany, 6) German Cancer Research Heidelberg (DKFZ), Heidelberg, Germany, 7) University Hosp. Münster - Pediatric Hematology a. Oncology, Münster, Germany, 8) University Hosp. Giessen - Pediatric Hematology a. Oncology, Giessen, Germany, 9) Dpt. of Pediatrics, Univ. Med. Centre, Kiel, Germany, 10) Dpt. of Medicine III, University Hosp., Munich, Germany, 11) Dpt. of Hematology a. Oncology, University Göttingen, Göttingen, Germany, 12) F.-Ebert-Hospital, Neumuenster, Germany, 13) Senckenberg Inst. of Pathology, University of Frankfurt, Frankfurt a.M., Germany, 14) Inst. of Pathology, Charité, Berlin, Germany, 15) Dpt. Of Int. Medicine II, Univ. Med. Centre, Kiel, Germany 16) Hematopathology Sect., University Kiel, Kiel, Germany, 17) CCCU, University Hosp. Ulm, Ulm, Germany, 18) Inst. for Med. Informatics Statistics and Epidemiology, Leipzig, Germany, 19) Inst. of Cell Biology, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany, 20) Inst. of Pathology, University of Würzburg, Würzburg, Germany, 21) Inst. of Pathology, Ulm University, Ulm, Germany, 22) Inst. of Clin. Mol. Biology, University Kiel, Kiel, Germany, 23) Dpt. of General Int. Medicine, University Kiel, Kiel, Germany, 24) Dpt. of Computer Science a. Interdiscip. Center of Bioinformatics, Leipzig, Germany.

Referent/in:

Name: Cristina Lopez

Institution: Institut für Humangenetik, Kiel

E-Mail: clopez@medgen.uni-kiel.de

Background:

Germinal-center derived B cell lymphomas (GCB-lymphomas) represent the most common B-cell lymphomas. They include follicular (FL), diffuse large B-cell (DLBCL) and Burkitt (BL) lymphomas. The detection of numerical and structural chromosomal abnormalities in these lymphomas, provides essential diagnostic, prognostic and treatment-related information. Moreover, breakpoints of chromosomal translocations can point to genes deregulated in the pathogenesis of lymphomas.

Aims:

In the framework of the German BMBF-funded ICGC MMML-Seq-Project, the aim of this study is to compare the detection of chromosomal abnormalities by conventional cytogenetics (CC) and whole genome sequencing. In addition, combined whole genome and transcriptome sequencing is applied to detect hitherto unknown fusion genes.

Methods:

Fourteen GCB lymphomas with aberrant karyotype by conventional cytogenetics were analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH) (LSI BCL6, LSI MYC (DC, BA), LSI IGH/MYC, CEP8 Tri-color, LSI IGH, LSI BCL2, all from Abbott Molecular), single nucleotide polymorphism (SNP)-arrays (Affymetrix 6.0), whole genome sequencing and transcriptome sequencing according to the standards of the ICGC (www.icgc.org).

Results:

A total of 80 chromosomal abnormalities were detected by conventional cytogenetics in the 14 GCB lymphomas. For further analyses, these abnormalities were classified into those detected by sequencing and conventional cytogenetics (group 1; n=28), those detected by conventional cytogenetics but not by sequencing (group 2; n=52) and a third group comprising abnormalities suggested by sequencing but not by cytogenetics (n=960). Comprehensive verification analyses in group 2 were done by SNP arrays and FISH techniques to check breakpoints of abnormalities. This led us to stratify the abnormalities of that group again into two subgroups: aberrations redefined by sequencing (n=29) and abnormalities not detected by sequencing (n=23). The latter subgroup contained somatic changes involving breakpoints in pericentromeric regions, immunoglobulin V gene

breakpoints and subclonal abnormalities. Validation of the aberrations in group 3 is ongoing. From 26 abnormalities yet subjected to validation a total of 19 were verified, from which 8 were associated with fusion transcripts.

Conclusion:

Complete genomic sequencing reveals a complex landscape of somatic mutations and structural aberrations 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 conventional cytogenetics, in particular if these are subclonal or affecting repetitive regions.

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).

Chromosomenveränderungen der Marginalzonen-Lymphome

1) Harder L., 2) Gesk S.

Institut für Tumorgenetik Nord, Kiel

Referent/in:

Name: Lana Harder

Institution: Institut für Tumorgenetik Nord

E-Mail: harder@tumorgenetik-nord.de

Klassifikation: Marginalzonen-Lymphome (MZL) stellen eine Gruppe von Erkrankungen dar, die aus reifen B-Lymphozyten entstehen und in nodale, splenische und Mucosa-assoziierte (MALT) Subgruppen unterteilt wird. Da der Immunphänotyp der MZL nicht spezifisch und eine histologische Abgrenzung gegenüber chronischen Entzündungen zum Teil schwierig ist, spielt die zytogenetische Diagnostik bei einem Verdacht auf ein MZL eine wichtige Rolle.

Zellkultivierung: Die Zugehörigkeit der MZL zu reifzelligen B-Zell-Neoplasien erklärt die ansteigende Proliferationsrate der klonalen Zellen bei der Kultivierung mit DSP30 und IL2. Aber auch die Kultivierung mit TPA zeigt eine ausreichende Menge an Metaphasen und erleichtert nicht selten durch bessere Bänderungsqualität im Vergleich zur DSP30-Kultivierung die Auswertung. Bei fortgeschrittenen Erkrankungsstadien ist die Verwendung von unstimulierten Kulturen ebenfalls sinnvoll.

Rekurrente Chromosomenaberrationen: Die bei MALT-Lymphomen wiederkehrenden Translokationen t(11;18), t(1;14), t(14;18) (mit Beteiligung der Gene IgH und MALT1) und t(3;14) stellen Chromosomenveränderungen dar, die bei anderen hämatologischen Neoplasien in der Regel nicht vorkommen und somit die Interpretation der zytogenetischen Befunden erleichtern. Die bei nodalen MZL oft auftretende Trisomien 3, 18 und 7 und die bei splenischen MZL u.a. oft auftretende Deletionen in 7q und 6q, Trisomien 12 sowie 14q-Translokationen können jedoch auch bei verschiedenen anderen indolenten sowie aggressiven B-Zell-Lymphomen vorkommen, was die zytogenetische Abgrenzung dieser MZL-Subgruppen erschwert. Der Nachweis eines Bruchereignisses im CDK6-Genort scheint unter lymphatischen Neoplasien für splenische MZL charakteristisch zu sein, kann, wenn auch sehr selten, allerdings auch bei myeloischen Neoplasien auftreten. Die Betrachtung der zytogenetischen Befunde unter Berücksichtigung der immunphänotypischen (wie z.B. CD5-Positivität) und klinischen (z. B. Splenomegalie) Eigenschaften kann auch beim Nachweis von nicht spezifischen Chromosomenveränderungen zur genauen Typisierung eines MZL beitragen.

FISH-Untersuchungen sind insbesondere zum Nachweis eines Bruchereignisses im CDK6-Genort, zur Identifizierung des Translokationspartners des IgH-Genortes oder bei eingeschränkter Zellproliferation eine hilfreiche Ergänzung.

Prognostische Bedeutung: Komplexe Veränderungen, Translokationen mit Beteiligung des IGH-Gens sowie Deletionen in 17p sind bei MZL mit einem aggressiven Erkrankungsverlauf assoziiert. Die prognostische Bedeutung von isolierten Deletionen in 7q wird zurzeit noch kontrovers diskutiert und sollte durch weitere Studien geklärt werden.

High Prevalence of Immunoglobulin Light Chain Gene Aberrations as Revealed by FISH in Multiple Myeloma and MGUS

Seval Türkmen^{1,2*}, Anastasia Binder², Antje Gerlach¹, Sylke Niehage¹, Maria Theodora Melissari^{1,2}, Nihal Inandiklioglu², Bernd Dörken³, and Thomas Burmeister^{3,4}

1 Labor Berlin, Tumorzytogenetik, Berlin, Germany

2 Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik, Charité, CVK, Berlin, Germany

3 Medizinische Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumormimmunologie, Charité, Berlin, Germany

4 Labor Berlin, Molekulare Tumorgenetik, Berlin, Germany

Referent/in:

Name: Seval Tuerkmen

Institution: Labor Berlin

E-Mail: seval.tuerkmen@laborberlin.com

Multiple myeloma (MM) is a malignant B-cell neoplasm characterized by an uncontrolled proliferation of aberrant plasma cells in the bone marrow. Chromosome aberrations in multiple myeloma are complex and represent a hallmark of the disease, involving many chromosomes that are altered both numerically and structurally. Nearly half of the cases are non-hyperdiploid and show IGH translocations with the following partner genes: CCND1, FGFR3 and MMSET, MAF, MAFB and CCND3. The remaining 50% are grouped into a hyperdiploid group that is characterized by multiple trisomies involving chromosomes 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, and 21. In this study we analyzed the immunoglobulin light chain kappa (IGK, 2p12) and lambda (IGL, 22q11) loci in 150 cases, mostly with multiple myeloma but in a few cases monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), without IGH translocations. We identified aberrations in 27% (= 40 patients) including rearrangements (12%), gains (12%), and deletions (4.6%). In 6 of 18 patients with IGK or/and IGL rearrangements, we detected a MYC rearrangement which suggests that MYC is the translocation partner in the majority of these cases.

Conventional cytogenetic analysis of MM patients using DSP30 in combination with new mitogenes

Antje Gerlach¹, Janine Faber¹, Jenny Gerlich¹, Marija Kanduc¹, Sylke Niehage¹, Gabriela Scholz¹, Christiane Bommer^{1,2}, Seval Türkmen^{1,2}

¹Labor Berlin Charité Vivantes

²Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik

Referent/in:

Name: Antje Gerlach

Institution: Labor Berlin

E-Mail: antje.gerlach@laborberlin.com

Multiple myeloma (MM) is a plasma cell malignancy characterized by complex cytogenetic and molecular cytogenetic aberrations. In many newly diagnosed patients, the abnormal clones have a low proliferative activity and, therefore, most of the analyzable metaphase cells are derived from normal hematopoiesis. The detection of an abnormal metaphase karyotype is generally correlated with an elevated plasma cell labeling index and tumor burden, which is reflected by a higher mitotic rate. Thus, finding abnormal metaphase mitoses in a patient can be regarded, in a certain respect, as a surrogate marker for stroma-independent cells and more advanced disease. The low proliferative activity of the tumor cells early in the disease is an important limitation of conventional cytogenetics, since only dividing cells can be analyzed. Several studies have attempted to improve the culture conditions to allow karyotyping of myeloma cells. The interleukins such as IL-2, IL-3, IL-4 and IL-6 have been tested but there is still little consensus regarding the optimal technique.

The aim of this work was to test the DSP30 in combination of new mitogenes for chromosome analysis in patients with MM to see if it is possible to improve the in vitro cell growth to detect chromosome aberrations and to discuss if this new combination can be an alternative culture method for the MM patients.