

## **29. Tumorgenetische Arbeitstagung München**



### **Programm und Abstracts**

**19. – 21. Mai 2016**

**Leonardo Royal Hotel München**

## Liebe Kolleginnen und Kollegen,

Wir freuen uns, Sie zur 29. Tumorgenetischen Arbeitstagung vom 19. – 21. Mai 2016 im Leonardo Royal Hotel in München begrüßen zu dürfen.

Dieses Jahr soll der Schwerpunkt der vergangenen Tagung, das Zusammenspiel von Diagnostik, Therapie und Klinik, weiter vertieft werden. Ein besonderes Augenmerk wollen wir in diesem Jahr auf die Möglichkeiten von Prozessoptimierung und Automatisierung im Bereich der zytogenetischen Diagnostik legen, die den Arbeitsablauf effektiver gestalten und die Tumorgenetik gut für die Herausforderungen der Zukunft aufstellt. Der auch in diesem Jahr stattfindende TA-Workshop wird dieses Thema interaktiv aufgreifen und zur Diskussion stellen. Genetische Prädispositionen für Tumorerkrankungen sowie das Zusammenspiel von Keimbahn-Mutationen und somatischen Mutationen werden weitere Themen der Tagung sein.

Neben aller Wissenschaft soll natürlich auch der Rahmen für persönlichen Austausch geschaffen werden. Das Abendprogramm bietet Ihnen die Gelegenheit, den Charme der Münchner Altstadt kennen zu lernen.

Wir freuen uns auf Ihre zahlreichen, interessanten Beiträge, Sie in München begrüßen zu dürfen und eine spannende, inspirierende und auf die Zukunft gerichtete Tagung!

Mit herzlichen Grüßen

Claudia Haferlach und das TGA-Organisationsteam

TGA-Organisationsteam:

Andreas Jungfer, Annabell Marr & Sarah Volkert

Helena Hammerl

Annette Königsbauer & Annika Lormis

Maximiliane Oppl, Martin Schröter, Melanie Zenger & Kathleen Zieschang




Bei Fragen rund um die TGA 2016 stehen wir Ihnen während Tagung auch telefonisch unter der Nummer **+49(0) 171 479 2752** zur Verfügung.

# Tagungsprogramm

## Donnerstag, 19. Mai 2016







ab 12.30	Anreise, Registrierung
12:30 -13:30	Empfangsimbiss im Foyer
13:30 -13:45	C. Haferlach: Begrüßung
<b>13:45 -15:00</b>	<b>Neues aus der Industrie</b> Moderation: S. Arps, D. Haase
13:45-14:00	MetaSystems, I. Chudoba: Qualitätskontrolle bei der Herstellung von FISH-Sonden
14:00-14:15	A. Fasan: „Philadelphia-like“ ALL - Die diagnostische Herausforderung (für Affymetrix)
14:15-14:30	Tecan, J. Fetzner: Automationsmöglichkeiten in der Zytogenetik
14:30-14:45	Beckman Coulter, M. Braun: Methoden und Grundlagen der Zellsortierung
14:45-15:00	Thermo Fisher Scientific, C. Allen: Enabling Automation of Liquid Biopsy analysis
<b>15:00 -16:00</b>	<b>Qualitätssicherung: Von der Fragestellung bis zum Befund</b>
15:00-15:15	H. Rieder: Ringversuch Tumorzytogenetik
15:15-15:30	C. Haferlach: Ringversuch Interphase-FISH Tumor
15:30-15:45	L. Harder: Bedeutung des Befundes für den Kliniker, Schwerpunkt Interpretation des Befundes
15:45-16.00	Diskussion
16:00-16:30	Pause
<b>16:30-17:30</b>	<b>Festvortrag</b> Moderation: T. Haferlach A. Reiter: Genetik und Therapie bei <i>BCR-ABL1</i> -negativen MPN
18:00	Treffpunkt Lobby, Fahrt in die Stadt
<b>18:30-19:30</b>	<b>Stadtführung</b>
<b>19:30</b>	<b>Bayerischer Abend</b> Augustiner Keller München Arnulfstraße 52, 80335 München

## Freitag, 20. Mai 2016

- 8:30-8:45                    **Das Tagungschromosom**  
S. Volkert: Chromosom 6
- 8:45-10:00**                **AML: Es gibt immer etwas Neues**  
Moderation: C. Haferlach, B. Mohr
- 8:45-9:00                    B. Mohr: Hat eine Tetraploidie bei der Akuten Myeloischen Leukämie  
Einfluss auf die Prognose?
- 9:00-9:15                    S. Deutschbauer: Karyotypevolution bei AML – 2 Fallbeispiele
- 9:15-9:30                    J. Bradtke: Nachweis einer t(4;17)(q12;q21) bei einem Knaben mit atypischer  
APL (AML FAB M3)/JMML, Fallvorstellung
- 9:30-9:45                    S. Moshir: Progression to AML in 2 cases of myeloid neoplasm with eosinophilia  
and features of atypical 5q- syndrome due to a cytogenetically cryptic, TKI  
responsive *TNIP1-PDGFRB* fusion gene
- 9:45-10:00                 J. Lentes: Identifizierung einer kryptischen Insertion ins(11;X) resultierend in einer  
*MLL-FLNA*-Fusion bei einem Kind mit akuter myeloischer Leukämie
- 10:00-10:30                Pause
- 10:30-12:15**                **Diagnostische Herausforderungen**  
Moderation: J. Bradtke, L. Harder
- 10:30-11:00                E. Schröck: Familiäre Tumorsyndrome - Next Generation Sequencing für die  
Stratifizierung von Diagnostik, Vorsorge und Therapie
- 11:00-11:15                 Y. L. Behrens: Telomerlängenmessung in der Diagnostik: Evaluation  
verschiedener Methoden
- 11:15-11:30                L. Harder: Zytogenetische Diagnostik bei simultanen hämatologischen Neoplasien
- 11:30-11:45                M. König: FISH-ascertained abnormality patterns define distinct MDS, lymphoma  
and myeloma cell populations in two patients with concurrent diseases
- 11:45-12:00                M. Erdel: Überexpression des *ASCL1* proneuralen Transkriptionsfaktors bei einer  
CLL mit 12;14 Translokation
- 12:00-12:15                 T. Hinrichsen: Multiples Myelom mit t(11;14) und t(14;16) in unterschiedlichen  
Zellklonen (Fallbeispiel)
- 12:15-13:00**                **Lore-Zech-Preis**  
H. Rieder: Laudatio  
Preisvortrag: C. Ganster: Klonalität des isolierten Y-Verlusts bei MDS und  
morphologischer und molekulargenetischer Hintergrund
- 13:00-14:15                Mittagessen
- 14:15-15:15**                **MTA Workshop**  
Moderation: M. Zenger  
S. Kuklinski: Vergleich der Anreicherung der CD138+ Zellen mittels  
zwei MACS-Verfahren  
M. Oppl: Knifflige Fälle in der FISH Analyse  
S. Tetzl & C. Zaborsky: Fast buffer eine neue Alternative zur Schnell-FISH-  
Diagnostik  
M. Schröter: Was hat Einfluss auf die Chromosomenqualität?  
K. Zieschang: Überraschung bei der Chromosomenanalyse nach SZT

- 14:15-15:30** **Messebesuch**
- 14:15-15:15** **Sitzung der Kommission Somatische Tumorgenetik  
(geschlossene Sitzung, Raum R3)**
- 15:30-16:15** **MDS: Vom Normalen zum Komplexen**  
Moderation: D. Haase, B. Schlegelberger
- 15:30-15:45  S. Volkert: Array CGH bei MDS Patienten mit normalem Karyotyp in der Chromosomenbandenanalyse
- 15:45-16:00  S. Dierks: Molekulare Verfolgung somatischer Mutationen bei MDS-Patienten mit Monosomie 7 unter Vidaza-Therapie
- 16:00-16:15  R. Schaab: 17p Deletionen und *TP53* Mutationen bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom und komplex aberrantem Karyotyp
- 16:15-16:45 Pause
- 16:45-18:00** **CML & MPN: Vieles erreicht - Einiges offen**  
Moderation: M. Erdel, A. Fabarius
- 16:45-17:15 A. Hochhaus: Zusammenspiel zwischen genetischer Diagnostik und Therapie bei CML - Absetzstudien, Resistenzen
- 17:15-17:30 K. Shirneshan: Jumping Translokation in 1q11 und Karyotyp Evolution bei einem Fall von ET
- 17:30-18:00 B. Balk: Interaktives Quiz über CML und MPN  
(mit diesem QR-Code gelangen Sie zum interaktiven Quiz, alternativ: [www.onlineTED.de](http://www.onlineTED.de))
- 
- 18:00-19:00** **Diskussion: *TP53*-Mutationen aus Keimbahn- und somatischer Sicht**  
Moderation: C. Haferlach  
B. Schlegelberger: *TP53* Keimbahn Veränderungen  
A. Stengel: Somatische *TP53* Veränderungen
- 20:00** **BBQ mit Diskussion** gesponsert von Tecan
- anschließend Party**
-  nominiert für den Vortragspreis

## Samstag, 21.05.2016

<b>09:00-10:15</b>		<b>Solide Tumore - Wege in die Zukunft</b> Moderation: G. Thiel, S. Urbschat
9:00-9:30		E. Heitzer: Klinische Anwendbarkeit von zirkulierender Tumor DNA
9:30-9:45		L. Geldon: Genetische Charakterisierung von Paragangliomen und Phäochromozytomen – Wege zur personalisierten Medizin
9:45-10:00		H. Holland: Glioblastoma stem-like cells (GSCs): establishment, marker expression, isolation, and SNP array analyses
10:00-10:15		D. Krämer: Fall von Muir-Torre-Syndrom mit bisher unpublizierter <i>MSH2</i> -Spleissakzeptormutation und ungewöhnlichem intraindividuellem Spektrum extrakolonischer Tumoren
10:15-10:45		Pause
<b>10:45-12:00</b>		<b>ALL - von den Kindern lernen</b> Moderation: O. Haas, H. Rieder
10:45-11:00		K. Nebral: T cell acute lymphoblastic leukemia in a boy with a maternally inherited 6q duplication encompassing the <i>MYB</i> gene
11:00-11:15		F. Heldt: Identifizierung einer neuen prognostischen Gruppe bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung im Rahmen der ALL-BFM Studie
11:15-11:45		C. Kratz: Prädispositionssyndrome bei kindlichen Leukämien/ Tumorerkrankungen
11:45-12:00		K. Nebral: A FISH and array based diagnostic strategy for the comprehensive assessment of genetic abnormalities in childhood ALL
12:00-12:10		Abstimmung Vortragspreis
12:10-12:20		D. Haase: Umfrage TGA 2015
12:20-12:35		O. Haas: Tagungsrückblick 2016
12:35 -12:45		S. Urbschat: Vorschau TGA 2017
12:45-13:00		Verleihung Vortragspreis, Danksagung & Verabschiedung
13:00		Lunchboxen, Tagungsende
		nominiert für den Vortragspreis

# NimbleGen SeqCap Target Enrichment

*Discover More, Sequence Less*

## HEAT-Seq Enrichment System – coming soon!

*High Efficiency Amplification of Targets for Sequencing  
No separate library preparation, single day workflow,  
sensitive SNP detection*

## SeqCap EZ Choice

*Capture YOUR regions of interest  
regardless of size*

## SeqCap EZ MedExome

*Focus on genomic regions that really  
matter, detect SNPs with 98 % sensitivity*

## SeqCap RNA

*Achieve extraordinary depth and  
sensitivity for rare transcript detection*

## SeqCap Epi

*Discover differential methylation efficiently,  
reveal hidden epigenetic modifications*





## **Abstracts**



## Qualitätskontrolle bei der Herstellung von FISH-Sonden

**Ilse Chudoba**

MetaSystems GmbH, Altlußheim

Innerhalb der Europäischen Union werden die Herstellung und das „in den Verkehr bringen“ von in vitro Diagnostika durch das Medizinproduktegesetz geregelt (IVDD-in vitro diagnostic directive 98/79/EG). Die grundlegenden Anforderungen für die Herstellung von Produkten unter der der IVDD Richtlinie können durch ein Zertifikat nach ISO 13485 belegt werden.

DNA FISH-Sonden für die medizinische Laboruntersuchung menschlicher Zellen zählen wegen ihrer Zweckbestimmung zu dieser Gruppe von Medizinprodukten.

Besondere Anforderungen gelten für „Reagenzien und Reagenzienprodukte, die spezifisch zur Schätzung des Risikos von Trisomie 21 bestimmt sind“ (Anhang II, Liste B). Für andere DNA-FISH-Sonden gelten diese besonderen Anforderungen nicht, sondern sie unterliegen der allgemeinen Kontrolle von IVD-Produkten.

MetaSystems als Hersteller von DNA-Sonden bietet in seinem Portfolio Produkte an, die den allgemeinen Regeln unterliegen als auch Produkte, die unter die besondere Kontrolle der im Anhang II, Liste B genannten IVDs fallen.

Ich möchte Ihnen einen kurzen Einblick gewähren, wie die Anforderungen aus dem Medizinproduktegesetz bei der Herstellung von DNA-FISH-Sonden bei MetaSystems umgesetzt werden.

## „Philadelphia-like“ ALL - Die diagnostische Herausforderung

Annette Fasan, W. Kern, T. Haferlach, C. Haferlach

MLL-Münchner Leukämielabor

**Einleitung:** Die „Philadelphia-like“ ALL (Ph-like ALL) ist eine Subgruppe der B-ALL, die ein ähnliches Genexpressionsprofil wie die *BCR-ABL1*-positive ALL aufweist und mit einer eher ungünstigen Prognose assoziiert ist. Die Identifikation der Ph-like ALL ist eine diagnostische Herausforderung aber von enormer Bedeutung, da bei einem Großteil der Patienten kinase-aktivierende Läsionen vorhanden sind, die möglicherweise mit Tyrosinkinase-Inhibitoren behandelt werden könnten.

**Ziel:** Evaluierung von Häufigkeit und Prognose der Ph-like ALL bei adulten ALL Patienten.

**Patienten und Methoden:** In dieser Studie wurden 215 adulte Vorläufer B-ALL Patienten untersucht. 132/215 Patienten wiesen keine der rekurrenten Aberrationen *BCR-ABL1*, *MLL-AF4* und *E2A-PBX1* auf. Das mediane Alter betrug 54 Jahre (18-85 Jahre). Eine Vorläufer B-ALL wurde in allen Fällen mittels Immunphänotypisierung diagnostiziert. Von allen Fällen wurden Genexpressionsprofile mittels Affymetrix HG-U133 plus 2.0 erstellt. Ph-like ALL Fälle wurden anhand ihres Genexpressionsprofils gemäß Roberts et al., NEJM 2014 identifiziert.

**Ergebnisse:** Von den insgesamt 215 untersuchten ALL Fällen wurden 33 (15%) anhand ihres Genexpressionsprofils als Ph-like ALL identifiziert. Die Inzidenz der Ph-like ALL in den unterschiedlichen Altersklassen war wie folgt: 1% Jugendliche (Alter: 16-20 Jahre); 4% junge Erwachsene (Alter: 21-39 Jahre); 2% Erwachsene (Alter 40-55 Jahre) und 8% ältere Erwachsene (Alter 56-90 Jahre). Dies spricht für eine Inzidenz der Ph-like ALL von etwa 10% bei Erwachsenen  $\geq 40$  Jahren. Bezüglich genetischer Aberrationen zeigten 25/33 (76%) Ph-like ALL Patienten eine *CRLF2*-Überexpression. 16 der 25 Fälle wiesen zudem ein *IGH-CRLF2*-Rearrangement auf. Zudem wurden bei vier Patienten Rearrangements von weiteren Genen aus dem *JAK*- bzw. *ABL*- Signalweg nachgewiesen: Drei Fälle zeigten ein *EBF1-PDGFRB* Rearrangement, ein Fall ein *SNX2-ABL1* Rearrangement. Mutationen im *JAK2*-Gen wurden bei 16/33 (48%) Ph-like ALL Fällen gefunden. Drei Patienten hatten Mutationen im *NRAS*-Gen, bei einem Patienten wurde eine Mutation im *KRAS*-Gen nachgewiesen. Außerdem zeigte sich eine hohe Frequenz an *IKZF1* Deletionen ( $n=22/33$ ; 67%). Insgesamt zeigten alle Fälle mindestens eine Läsion in einem Gen des *JAK*- oder des *ABL*- Kinase-Signalweges. In Bezug auf die Prognose konnten wir zeigen, dass Patienten mit Ph-like ALL im Vergleich zu Patienten mit *BCR-ABL1* positiver ALL sowohl ein signifikant kürzeres Ereignis-freies (Median: 11 vs 28 Monate;  $p=0,04$ ) als auch ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben (Median 24 Monate vs. Median nicht erreicht;  $p=0,013$ ) haben.

### Zusammenfassung:

- 1) Die Inzidenz der Ph-like ALL beträgt etwa 10% unter Erwachsenen  $\geq 40$  Jahren.
- 2) Patienten mit Ph-like ALL zeigen ein heterogenes Bild an kinase-aktivierenden Läsionen.
- 3) Die Ph-like ALL ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert.

## **Automationsmöglichkeiten in der Zytogenetik**

**Jürgen Fetzer**

Tecan Deutschland GmbH

Karyotypisierung und Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) sind Methoden im zytogenetischen Labor mit vielen, sich wiederholenden Schritten. Automation dieser arbeitsintensiven Abläufe erhöht nicht nur die Produktivität im Labor, sondern verbessert auch die Qualität und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Tecan bietet Automationslösungen für diese Schritte an, die dabei individuell an die jeweiligen Abläufe und die Durchsätze des entsprechenden Labors angepasst werden können, so dass sowohl kleinere Labore wie auch Hochdurchsatzlaboratorien von Automation profitieren können.

Beispielhaft werden Lösungen zur Automation der hypotonen Behandlung und Fixierung von Zellen in Suspension diskutiert, zudem Auftropfen von fixierten Zellen auf Objektträger, sowie zum Aufbringen von FISH Sonden und Deckgläschen auf die Objektträger.

Weitere Automationsmöglichkeiten im Umfeld der Zytogenetik bietet Tecan für die Bereiche Nukleinsäure Extraktion, PCR Setup, (Array)-CGH und für die Probenvorbereitung von Next Generation Sequencing (NGS) Protokollen.

## **Methoden und Grundlagen der Zellsortierung**

**Michael Braun**

Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Die Sortierung von Zielzellen ist sowohl in der biologischen als auch klinischen Forschung sowie in der Immunologie und in weiteren Disziplinen mittlerweile eine großflächig eingesetzte Methode um funktionelle, morphologische und genetische Besonderheiten von Zellen zu untersuchen. Insbesondere die Möglichkeit Einzelzellablagen durchzuführen, erlaubt es die Heterogenität von Zellpopulationen besser zu verstehen und mit fortschreitenden diagnostischen Möglichkeiten und Therapien ein immer wichtigeres Werkzeug in der modernen Diagnostik, Prognostik und Therapie zur Hand zu haben.

Eine Vielzahl verschiedener Methoden ist im Einsatz und bietet je nach Zielsetzung unterschiedliche Vor- und Nachteile.

In diesem Vortrag soll ein Überblick über die unterschiedlichen Methoden und Möglichkeiten der Zellsortierung bis hin zur Einzelzellablage gegeben werden.

## **Enabling Automation of Liquid Biopsy analysis with Thermo Fisher Scientific**

**Christopher Allen**

Thermo Fisher Scientific, Life Sciences Group, Darmstadt

Ion Torrent™ LiquidBiopsy™ Platform simplifies the isolation, enumeration, and molecular analysis of circulating tumor cells (CTCs) from archived whole-blood samples. Achieving high target cell recovery and exceptional purity, the platform enables downstream molecular characterization of CTCs and cell-free DNA (cfDNA) from a single blood sample using next-generation sequencing (NGS).

## Genetik und Therapie bei *BCR-ABL1*-negativen MPN

Andreas Reiter

III. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Mannheim

Die konsekutive Entdeckung der Bedeutung des Philadelphia-Chromosoms, der reziproken Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$ , des *BCR-ABL1* Tyrosinkinase (TK)-Fusionsgens und der Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) für Pathogenese, Diagnostik und Therapie der chronischen myeloischen Leukämie (CML) hat die Gesamtgruppe der chronischen myeloischen Neoplasien zu einem einzigartigen Modell für die mögliche Etablierung einer erfolgreichen zielgerichteten molekularen Therapie gemacht. Im Zuge dieser Entwicklungen sind über 50 weitere TK-Fusionsgene, z.B. unter Beteiligung von TK wie *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*, *ABL1* oder *JAK2*, überwiegend bei Eosinophilie-assoziierten myeloproliferativen Neoplasien (MPN-eo) identifiziert worden, deren individuelle Prognose und Sensitivität gegenüber TKI jedoch trotz durchaus vergleichbarer Proteinstrukturen höchst unterschiedlich sind. Weitere Meilensteine waren die Entdeckung von Punkt- und Längenmutationen in den Genen *JAK2*, *CALR* und *MPL* in unterschiedlicher relativer Häufigkeit bei der primären Myelofibrose (PMF), der Polycythaemia vera (PV) und der essentiellen Thrombozythämie (ET) sowie der *KIT D816V* Mutation bei der systemischen Mastozytose, die eine konstitutionelle Aktivierung der *JAK*- bzw. *KIT*-Signaltransduktion zur Folge haben. Entsprechende *JAK*- und *KIT*-Inhibitoren konnten rasch für den klinischen Einsatz etabliert werden, allerdings ohne auch nur annähernd so gute und dauerhafte Remissionsraten erzielen zu können wie TKI bei Fusionsgen-assoziierten MPN. Etwa zur gleichen Zeit konnten durch moderne Sequenzierungsverfahren bei akuten myeloischen Leukämien (AML) und myelodysplastischen Syndromen (MDS) eine Vielzahl von neuen Mutationen identifiziert werden, die wichtige Funktionen für Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen haben. Im Gegensatz zu den Phänotyp-modifizierenden Aberrationen, z.B. *BCR-ABL*, *JAK2 V617F* oder *KIT D816V*, finden sich diese Mutationen in unterschiedlicher Häufigkeit bei allen Subtypen der myeloischen und teilweise sogar bei lymphatischen Neoplasien. Zudem scheinen zumindest einige von ihnen, z.B. *ASXL1* oder *SRSF2*, unabhängig vom morphologischen Phänotyp, mit einer schlechten Prognose assoziiert zu sein, die sich mitunter auch durch die verfügbaren Therapieoptionen nicht entscheidend beeinflussen lässt. Seltene MPN, z.B. chronische Neutrophilenleukämie (CNL), und MDS/MPN, z.B. atypische CML (aCML) oder chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML), zeichnen sich ebenfalls durch eine Vielzahl von Mutationen aus, die vermutlich in Abhängigkeit von Art und insbesondere auch Anzahl der Mutationen in ganz unterschiedlicher Weise Phänotyp, Progression und Prognose beeinflussen können. Zu einer ganz anderen Entwicklung kam es für die konventionelle Zytogenetik. Mit Ausnahme der  $t(9;22)(q34;q11)$  und einigen seltenen reziproken Translokationen hat die Zytogenetik lange Zeit keine entscheidend tragende Rolle für Diagnostik, Therapie und Prognose der MPN innegehabt. Dies änderte sich jedoch mit der Erkenntnis, dass bestimmte zytogenetische Aberrationen weniger für den Phänotyp, als vielmehr für die Prognose der PMF entscheidende Bedeutung haben. Zytogenetische Aberrationen sind inzwischen Bestandteil von Risikoscores (z.B. DIPSS-plus, GPSS) geworden, in denen eine Symbiose zwischen klinischen und genetischen Risikofaktoren, z.B. niedriges ( $13q-$ ,  $+9$ ) oder sehr hohes Risiko [ $inv(3)$ ,  $iso(17q)$ ,  $-7/7q-$ , u.a.m.], Überlebenszeiten zwischen 2 und über 15 Jahren differenzieren.

## Hat eine Tetraploidie bei der Akuten Myeloischen Leukämie Einfluss auf die Prognose?

Brigitte Mohr, M. Kramer, U. Ölschlägel, C. Thiede, C. Röllig, G. Ehninger, M. Bornhäuser, F. Stölzel

Universitätsklinikum Dresden, Medizinische Klinik und Poliklinik

Zytogenetische Aberrationen sind ein wichtiges Kriterium zur Prognosebeurteilung und Therapieauswahl bei Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML). Die vom Europäischen Leukämienetzwerk (ELN) sowie von der britischen MRC group vorgenommene Klassifizierung der wichtigsten rekurrenden Aberrationen in die drei Hauptgruppen (1) günstig, (2) intermediär, (3) ungünstig, hat sich in der Praxis bewährt. Seltene Marker sind in den Klassifikationen z.T. noch nicht berücksichtigt. Zu diesen seltenen Merkmalen gehört das abnormal gesteigerte Auftreten near-tetraploider Chromosomensätze (81-103 Chromosomen), die in der Laborpraxis mit einem Anteil von mehr als 10% der Metaphasen bzw. mehr als 5% der Interphasen registriert werden. Bei Durchsicht der AML Datenbanken der SAL-Studiengruppe fielen über den Zeitraum von 1996 bis 2015 nur n=17 Patienten mit klonaler Tetraploidie auf, die mit einer intensiven Chemotherapie behandelt werden konnten (Induktion, Konsolidierung). Das mediane Alter lag bei 55 Jahren, das mediane Überleben bei 18,7 Monaten. Da das zytogenetische Profil der Patienten sehr unterschiedlich war und von (A) purer Tetraploidie und (B) ein bis zwei Zusatzaberrationen bis hin zu (C) komplex aberranten Karyotypen (4 Aberrationen) und (D) mindestens einer prognostisch ungünstigen Zusatzaberration reichte, wurde dies in der Auswertung berücksichtigt. Mit einem medianen Überleben (OS) von 26,2 Monaten hatten Patienten der Gruppen A/B tendenziell einen Vorteil gegenüber den Patienten der Gruppen C/D (medianes OS: 9,6 Monate). Per COX-Regressionsanalyse war das Risiko früher zu versterben für die Gruppe C/D aber nicht signifikant erhöht (HR: 1,82, 95%-CI: 0,52-6,41, p=0,349). Das Ansprechen auf die Induktionstherapie (komplette Remission, CR) betrug für alle Patienten 71%, für A/B 80% und für C/D 57%. Literaturergebnisse bestätigen die klonale Tetraploidie als sehr seltenes Ereignis. Jedoch liegen die CR-Raten (50%) und das Gesamtüberleben (8,8 Monate) in der Literatur teilweise bei niedrigeren Werten und sind weniger durch zusätzliche zytogenetische Eigenschaften (medianes OS in A/B bzw. C/D, 9 bzw. 8,5 Monate) geprägt (Bene et al. Leukemia 2006). Neben dem Problem der kleinen Fallzahlen (mangelhafte Kompensation zufälliger Heterogenitäten) könnte der unterschiedliche Verlauf unter anderem folgende Ursachen haben: Höheres Lebensalter (Bene et al. median 64 vs. eigene Studie 55 Jahre), Zeitpunkt der Datenerhebung (1989-2003 vs. 1996-2015), Anteil an Patienten mit allogener hämatologischer Stammzelltransplantation (0% vs. 53% der Patienten). Die Möglichkeit der Integration verbesserter Therapieoptionen in den letzten Jahren sowie das geringere Alter könnte sich positiv auf unsere Analysen ausgewirkt haben. Zusammenfassend kann aus unseren Untersuchungsergebnissen für Patienten mit tetraploiden Chromosomensätzen folgende Orientierung abgeleitet werden: (i) Patienten ohne zusätzliche ungünstige Merkmale (A/B) haben mit 26,2 Monaten ein medianes Überleben, das dem von Patienten mit normalem diploiden Karyotyp (medianes Überleben: 21,2 Monate) ähnelt, weshalb eine Stratifizierung in den intermediären Risikoarm empfohlen werden kann. (ii) Patienten mit zusätzlichem, ungünstigen Merkmal (C/D) haben ein medianes Überleben von nur 9,6 Monaten und ähneln damit Patienten mit diploidem komplex aberranten Karyotyp (medianes Überleben: 5,8 Monate), weshalb eine Stratifizierung in den ungünstigen Risikoarm empfohlen werden kann.

## Karyotypeevolution bei AML – 2 Fallbeispiele

**Sabine Deutschbauer**, M. Erdel, G. Webersinke, M. Moshhammer

Labor für Molekularbiologie und Tumorzytogenetik, Linz

Der Schritt der Transformation einer myeloproliferativen Erkrankung hin zu einer akuten myeloischen Leukämie (AML) stellt in den meisten Fällen einen mehrstufigen Prozess der Pathogenese der Erkrankung dar.

Wir berichten über 2 Fallbeispiele aus unserem Labor. Im ersten Fall handelt es sich um eine 65-jährige Patientin mit einem initialen MDS. Die konventionelle Zytogenetik zeigte zu diesem Zeitpunkt eine solitäre Trisomie 8. Nach 5 Zyklen Chemotherapie befand sich die Patientin in einer kompletten zytogenetischen Remission einer mittlerweile manifestierten sekundären AML. 50 Monate nach Erstdiagnose und nach einer allogenen Stammzelltransplantation zeigte sich ein Rezidiv der Erkrankung und mittels konventioneller Zytogenetik erstmals eine Trisomie 11. Die aus dem Initialbefund bekannte Trisomie 8 war konventionell nicht, und mittels FISH noch in 5% der Interphasekerne nachweisbar. Eine retrospektive FISH Untersuchung auf Trisomie 11 am Knochenmark zum Zeitpunkt der MDS Erstdiagnose zeigte ein unauffälliges Ergebnis.

Im zweiten Fall berichten wir über eine 86-jährige Patientin mit Leuko- und Thrombopenie unklarer Genese, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und nach 6 weiteren Jahren bei der konventionellen Zytogenetik einen unauffälligen weiblichen Karyotyp ergab. 8 Jahre nach Erstdiagnose und erfolgter Chemotherapie stand weiters eine CMML mit geringgradig erhöhtem Blastenanteil von 5% bei Monozytose und trilineärer Dysplasie im Raum. Die konventionelle Zytogenetik zeigte zu diesem Zeitpunkt erstmals einen weiblichen Karyotyp mit Trisomie 8. In einer Metaphase fand sich zu diesem Zeitpunkt auch eine Deletion 7q. Bei einer weiteren Untersuchung des Knochenmarks zu einem späteren Zeitpunkt kam es zytologisch zu einer extremen Vermehrung unreifzelliger myeloischer Blasten (90%) mit hochgradig aberrantem Markerprofil, passend zu einer sekundären AML. Eine abermals durchgeführte Zytogenetik zeigte konventionell eine Deletion 7q. Mittels FISH auf Interphasekerne ließ sich die Deletion 7q in 94% der Kerne bestätigen, die aus dem Vorbefund bekannte Trisomie 8 war nur mehr in 9% der Kerne, konventionell jedoch nicht mehr nachweisbar.

Der Verlauf beider Fallbeispiele, beide mit vorausgehender Trisomie 8 gefolgt von einem zweiten unabhängigen chromosomalen Klon, spricht eher dafür, dass aus einer Vorläuferzelle mit einer zytogenetisch nicht nachweisbaren Treibermutation verschiedene Seitenlinien mit unterschiedlichen Chromosomenveränderungen hervorgehen und dass sich durch den stufenweisen Verlauf der Erkrankung verschiedene klonale Chromosomenveränderungen manifestieren. Weniger wahrscheinlich aber letztlich nicht auszuschließen ist, dass es sich bei den verschiedenen Klonen um unabhängige Ereignisse bzw. Erkrankungen handelt.



## Nachweis einer t(4;17)(q12;q21) bei einem Knaben mit atypischer APL (AML FAB M3)/JMML, Fallvorstellung

Jutta Bradtke<sup>1</sup>, S. Gattenlöhner<sup>1</sup>, D. Körholz<sup>2</sup>, W. Wößmann<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Pathologie, Onkogenetisches Labor, UKGM Gießen, <sup>2</sup>Universitäts-Kinderklinik, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Gießen

Die mit einer Inzidenz von 5-8% aller AML vorkommende Akute Promyelozytenleukämie (APL, bzw. AML FAB M3) stellt innerhalb der akuten myeloischen Leukämien eine Sonderform dar und wird nach der aktuellen WHO-Klassifikation durch das Vorhandensein der *PML/RARA*-Fusion, welche durch die t(15;17)(q22;q21) und deren Varianten zustande kommt, charakterisiert. Bei schneller Behandlung assoziiert die t(15;17) mit einer günstigen Prognose. Die *PML/RARA*-Fusion wird sowohl de novo als auch bei therapiebedingten myeloischen Neoplasien gefunden. Bei der APL sind bisher wenige Rerangements, die zu einer Fusion von *RARA* mit einem anderen Gen führen, bekannt: z.B. t(17;17) mit *STAT5B/RARA*-Fusion, t(11;17) mit *RARA/PLZF*-Fusion, t(5;17) mit *RARA/NPM*-Fusion und t(11;17) mit *RARA/NuMa*-Fusion. Bei verschiedenen myeloischen Neoplasien wurden außerdem bisher ca. 30 weitere Partnergene von *RARA* beschrieben. Unter anderen findet man in der Literatur drei Fälle mit einer t(4;17)(q12;q21) und einer *RARA/FIP1L1*-Fusion. Zwei erwachsene Patientinnen<sup>1+2</sup> mit APL (77 und 90 Jahre) ein 1-jähriger Junge<sup>3</sup> mit einer atypischen JMML (jeweils mit Bruch in *Exon 3* von *RARA* und *Exon 13* bzw. *15* von *FIP1L1*). Wir präsentieren hier den Fall eines vierjährigen Knaben mit einer atypischen APL/atypischen JMML und t(4;17)(q12;q21).

Wir erhielten Knochenmark des Patienten mit Verdacht auf eine JMML. Er zeigte eine Leukozytose, Anämie und Thrombozytopenie (WBC im KM 38488/μl, keine Blasten in Knochenmark und peripherem Blut, jedoch keine Splenomegalie), Z. n. Chemotherapie bei unklarer Diagnose vor 7 Monaten im Ausland. Zum Ausschluss einer -7/del7q, wie sie häufig bei JMML nachweisbar ist, führten wir FISH-Analysen durch (negativ). Die Chromosomenbandenanalyse (GTG Bänderung) erbrachte dann den Karyotyp: 45,X,-Y,t(4;17)(q12;q21),der(9)add(9)(p?21)del(9)(q?)[11]/46,XY[1]

Zur genaueren Abklärung der Bruchpunkte der t(4;17) wurden FISH-Analysen mit einer LSI Tricolor Rearrangement Probe (*SCFD2*, *LNX* und *PDGFRA*) und einer *RARA* Break Apart Probe von Vysis durchgeführt. Dabei wurden ein *RARA*-Rearrangement und eine Trennung von *SCFD2* und *LNX* nachgewiesen, was an eine Beteiligung des zwischen *SCFD2* und *LNX* lokalisierten *FIP1L1*-Gen denken ließ. Außerdem war mittels FISH eine homozygote Deletion des auf 9p21 lokalisierten *CDKN2A* (p16)-Gens nachweisbar. Aus der c-DNA von Knochenmarkszellen wurde eine RACE-PCR durchgeführt, mit der eine *FIP1L1/RARA* Fusion eindeutig nachgewiesen wurde. Der Bruchpunkt im *RARA*-Gen liegt dabei in *Exon 3* und im *FIP1L1*-Gen in *Exon 15*, wie bei den bisher beschriebenen Fällen. In Zusammenschau der morphologischen, pathologischen und zytogenetischen Ergebnisse und der klinischen Daten wurde die Diagnose einer atypischen JMML/AML M3 gestellt. Bei der AML-BFM Studie wurde die Behandlung des Patienten mit ATRA beantragt, auf das der Patient ein gutes Ansprechen zeigt. Eine Stammzelltransplantation ist geplant. Der hier vorgestellte Fall zeigt sowohl klinisch als auch diagnostisch Parallelen zu dem Literaturfall des einjährigen Knaben<sup>3</sup>, so dass die t(4;17)(p12;q21) als rekurrente Aberration sowohl für diese spezielle Leukämieentität als auch für die APL angesehen werden kann.

<sup>1</sup> Takeshi K. et al, haematologica, 2008; 93(9), <sup>2</sup> Menezes J. et al, haematologica, 2011; 96(10),

<sup>3</sup> Buijs A. und Bruin M., Leukemia (2007) 21, 1104-1

**Progression to AML in 2 cases of myeloid neoplasm with eosinophilia and features of atypical 5q- syndrome due to a cytogenetically cryptic, TKI responsive *TNIP1-PDGFRB* fusion gene**

Sharareh Moshir<sup>1</sup>, N. Cantoni<sup>2</sup>, J. Schoumans<sup>3</sup>, T. von Känel<sup>1</sup>, E. Levrat<sup>4</sup>, A. Huber<sup>1</sup>, B. Röthlisberger<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Labormedizin KSA, <sup>2</sup>Hämatologie / Onkologie KSA, <sup>3</sup>CHUV, Lausanne, <sup>4</sup>HFR Fribourg

The last edition of the WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues introduced a new category for myeloid and lymphoid neoplasms associated with eosinophilia and abnormalities of *PDGFRA*, *PDGFRB* or *FGFR1*. These rearrangements have become a major criterion for diagnosis and specific targeted therapies with tyrosine kinase inhibitors (TKI). To date, more than 25 different *PDGFRB* fusion genes have been identified as consequence of reciprocal translocations of chromosome bands 5q31-q33 in MPN-Eo. We hereby report two MPN-Eo patients with *TNIP1-PDGFRB* fusions resulting from an interstitial deletion of chromosome 5, who showed a response to Imatinib therapy but have developed a transformation to AML.

## Identifizierung einer kryptischen Insertion ins(11;X)(q23;q28q12) resultierend in einer *KMT2A-FLNA*-Fusion bei einem Kind mit akuter myeloischer Leukämie

Jana Lentes<sup>1</sup>, D. Rothe<sup>1</sup>, D. Schneider<sup>2</sup>, D. Reinhardt<sup>3</sup>, C. Meyer<sup>4</sup>, R. Marschalek<sup>4</sup>, B. Schlegelberger<sup>1</sup>, G. Göhring<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Humangenetik, Medizinische Hochschule Hannover, <sup>2</sup>Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Dortmund, <sup>3</sup>Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Essen, <sup>4</sup>Institut für Pharmazeutische Biologie, Goethe-Universität Frankfurt am Main

Eine Translokation unter Beteiligung des *KMT2A* (*MLL*)-Locus stellt bei der pädiatrischen akuten myeloischen Leukämie (AML) die häufigste chromosomale Veränderung dar und tritt in 15-20% der Fälle von kindlicher AML auf (Downing et al., Cancer Cell, 2002). Die prognostische Bedeutung des Rearrangements ist dabei abhängig vom Translokationspartner. Insgesamt sind über 60 verschiedene Fusionstranskripte unter Beteiligung des *KMT2A*-Gens bekannt (Balgobind et al, Blood, 2009) (Meyer et al., Leukemia, 2009).

In diesem Fallbericht beschreiben wir einen männlichen Patienten, bei welchem im Alter von 13 Monaten eine akute myelomonozytäre Leukämie mit einem Blastenanteil von 71 % im Blut diagnostiziert wurde. Eine klassische zytogenetische Bandenanalyse mittels Fluoreszenz-R-Banden zeigte einen komplex aberranten Karyotyp mit sowohl numerischen als auch strukturellen Aberrationen (ISCN Karyotyp basierend auf Banden:

48~49,-X,Y,+8,ins(11;?X)(q23;q21q27),+19,+1~2mar[cp15]).

Zur weiteren Abklärung wurden ergänzende Fluoreszenz in-situ Hybridisierungen (FISH) durchgeführt. Eine FISH-Analyse zum Ausschluss einer *KMT2A* (*MLL*)-Translokation (ABBOTT, 11q23, Vysis LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe) zeigte eine kryptische Translokation mit einem Splitsignal in 92% der Interphasekerne. Eine FISH-Analyse an Metaphasen zeigte ein Fusionssignal an dem normalen Chromosom 11 sowie ein separiertes oranges und grünes Signal, beide auf dem derivativen Chromosom 11 lokalisiert. Um die kryptische Translokation weiter abzuklären, wurde eine ergänzende multicolor FISH (mFISH) Analyse durchgeführt. Hier zeigte sich nun eine Insertion von Material eines X-Chromosoms in ein Chromosom 11 mit einer Verdopplung des derivativen X-Chromosoms, welches zuvor als Markerchromosom benannt wurde. Weiterhin bestätigten sich die Trisomie 8 und Trisomie 19. Um den *KMT2A*-Translokationspartner zu identifizieren wurde eine long-distance PCR (LDI PCR) im Diagnostic Center of Acute Leukemia (DCAL, Frankfurt) durchgeführt und eine *KMT2A-FLNA*-Fusion mit Bruchpunkt im Exon 11 des *KMT2A*- sowie im Exon 11 des *FLNA*-Gens identifiziert. Der ISCN-Karyotyp wurde dementsprechend adaptiert:

48~49,del(X)(q12)x2,Y,+8,der(11)ins(11;X)(q23;q28q12),+19[cp15].

Eine *KMT2A/FLNA*-Fusion stellt eine extrem seltene *KMT2A*-Fusion dar, wobei die hier zu Grunde liegenden chromosomalen Rearrangements sich von den publizierten Translokationen unterscheiden.

Die Identifizierung von *KMT2A*-Translokationspartnern ist aus klinischer Sicht für den Patienten von großer Bedeutung, da das Transkript im Verlauf als MRD (minimal residual disease) Marker genutzt werden kann.

## Familiäre Tumorsyndrome - Next Generation Sequencing für die Stratifizierung von Diagnostik, Vorsorge und Therapie

### Evelin Schröck

Institut für Klinische Genetik, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, TU Dresden, Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKFZ), Heidelberg, Nationales Zentrum für Tumorerkrankungen, Partnerstandort Dresden

Patienten mit dem Verdacht auf ein familiäres Tumorsyndrom erleben immer noch eine Odyssee, wenn sie nicht die Einschlusskriterien der Deutschen Konsortien für Familiären Brust- und Eierstockkrebs bzw. Darmkrebs erfüllen. Es fehlen Standards und Vorsorgestrategien für die Betreuung von Familien mit mehreren Tumorpatienten, z.B. bei Phäochromozytom und Paragangliom, *TP53*-Mutation oder *PTEN*-Mutation.

Uns liegen Daten von NGS-Analysen vor für über 1500 Patienten, für die eine Diagnostik mit dem TruSight Cancer 94-Gen-Panel (Illumina) durchgeführt wurde. Daraus ergeben sich eine Reihe von spezifischen Fragestellungen für die Bewertung von Sequenzvarianten und für die umfangreiche genetische Beratung und klinische Betreuung bei möglicher Tumorprädisposition. Außerdem ergeben sich spezielle Situationen bei Zusatzbefunden, wie beispielsweise die Anlageträgerschaft für eine schwere genetische Erkrankung.

Wir führen außerdem die Bewertung von hereditären Sequenzvarianten durch bei Tumorpatienten, für die eine Exomsequenzierung zur Stratifizierung von zielgerichteten Therapien, die über die etablierten Therapieschemata hinausgehen, durchgeführt wurde.

Wir halten es für erforderlich, dass für alle Tumorprädispositionssyndrome möglichst umfassend und interdisziplinär epidemiologische, klinische und genetische Daten erhoben, bewertet und in Datenbanken national und international gespeichert werden. Es sollten umfassende Vorsorgemaßnahmen etabliert werden und Forschungsprojekte auf den Weg gebracht werden, um pathophysiologische und funktionelle Erkenntnisse zu gewinnen. Damit wird es möglich werden, Patienten und Familien mit dem Verdacht auf ein familiäres Tumorsyndrom besser betreuen zu können.

## **Telomerlängenmessung in der Diagnostik: Evaluation verschiedener Methoden**

Yvonne Lisa Behrens, K. Thomay, M. Hagedorn, J. Ebersold, B. Schlegelberger, G. Göhring

Humangenetisches Institut, Medizinische Hochschule Hannover

**Hintergrund:** Telomere sind die Schutzkappen der Chromosomen und ihre Länge ist sehr variabel (abhängig von Alter, Geschlecht und Zellart zwischen 5 bis 18 kb). Bei jeder Zellteilung verkürzen sich die Telomere aufgrund des Endenreplikationsproblems, somit nimmt die Telomerlänge sukzessiv mit dem Alter ab. Dyskeratosis congenita (DC) ist ein seltenes, angeborenes Knochenmarkinsuffizienzsyndrom, welches durch eine Störung der Telomerbiologie entsteht. Patienten mit einer DC haben ein erhöhtes Risiko eine hämatologische Neoplasie zu entwickeln. Die Identifikation dieser Patienten mittels Telomerlängenmessung ist somit von großer diagnostischer Bedeutung. Auch im Rahmen verschiedener Leukämien spielt die Telomerlänge eine zunehmende Rolle - nicht nur im wissenschaftlichen Bereich. Wir haben aus diesem Grund verschiedene Methoden zur Telomerlängenmessung etabliert und validiert. Anhand eines Beispiels soll die am besten geeignete Methode zur Ermittlung von Telomerlängenveränderungen identifiziert werden.

**Material und Methoden:** Zur Ermittlung der Telomerlänge stehen je nach wissenschaftlicher Fragestellung und Materialverfügbarkeit unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Hierzu gehören unter anderem die Telomer Fragment Längenbestimmung (TRF) mittels Southern Blot (A), die Telomer-PCR (B), die Telomer/Centromer Fluoreszenz in situ Hybridisierung (T/C-FISH) (C) und die FlowFISH-Methode mittels Durchflusszytometrie (D). Je nach Methode wurden DNA (A+B), Metaphasen (C), bzw. vitale Zellen (D) von bis zu 100 gesunden Spendern unterschiedlichen Alters analysiert. Zusätzlich zu den gesunden Spendern wurden während dieses Validierungsprojektes drei MDS-Patienten im Verlauf, soweit möglich, mit allen Methoden gemessen.

**Ergebnisse:** Es konnten Perzentilenkurven erstellt werden welche zukünftig in der Diagnostik zur Identifizierung von Patienten mit Telomerlängenverkürzung angewendet werden können. Bei der Messung der MDS-Patienten im Verlauf war mit allen Methoden, außer der TRF-Bestimmung mittels Southern Blot, eine Messung möglich. Hierbei zeigten sich beim Vergleich der Methoden innerhalb eines Patienten keine signifikanten Unterschiede. Bei zwei MDS-Patienten nahm die Telomerlänge im Verlauf der Erkrankung ab und bei dem dritten MDS-Patienten war eine scheinbare Verlängerung der Telomere über den Verlauf zu beobachten.

**Diskussion:** Alle Methoden wurden erfolgreich etabliert und validiert. Bei der Wahl der Methode und Beurteilung müssen die jeweiligen Vor- und Nachteile bedacht werden. Die TRF-Bestimmung mittels Southern Blot (A) ermöglicht als einzige Methode die Ermittlung eines absoluten Wertes in kb, benötigt jedoch eine hohe Menge an DNA (1µg) und gibt lediglich die Menge einer Zellpopulation an. Die FlowFISH-Methode (D) ermöglicht die Analyse von einzelnen Zellpopulationen anhand von Antikörpern, jedoch wird für die Methode frisches Zellmaterial benötigt, welches nicht immer bzw. in ausreichender Qualität vorliegt. Der Vorteil der Telomer-PCR (B) liegt in der Schnelligkeit sowie dem geringen Materialaufkommen (60 ng). Der Nachteil liegt darin, dass in der Regel die mittlere Länge der gesamten Zellpopulation bestimmt wird. Die T/C-FISH(C) ist sehr zeitaufwändig und es werden Metaphasen benötigt. Insgesamt sind je nach Materialverfügbarkeit alle Methoden hinreichend verlässlich anwendbar, wobei das gleichzeitige Messen von Kontrollen unabdingbar ist.

## Zytogenetische Diagnostik bei simultanen hämatologischen Neoplasien

Lana Harder

Institut für Tumorgenetik Nord, Kiel

Durch die zunehmende Lebenserwartung der Bevölkerung steigt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens simultaner Erkrankungen. Dazu gehören sowohl gleichzeitig aufgetretene primäre hämatologische Neoplasien als auch therapieinduzierte hämatologische Neoplasien bei soliden Tumoren. Bei der Einsendung des Untersuchungsmaterials in ein zytogenetisches Labor wird häufig nicht die Verdachtsdiagnose, sondern nur die klinischen Symptomen genannt, die Ausdruck von verschiedenen, manchmal auch mehreren, Erkrankungen sein können. Als häufiges Beispiel ist eine Anämie begleitet von einer Splenomegalie zu nennen. Diese Symptome können sowohl bei fortgeschrittenen myeloproliferativen Neoplasien als auch bei indolenten B-Zell-Lymphomen auftreten. Auch das gleichzeitige Vorliegen eines MDS ist möglich. Im Falle einer monoklonalen Gammopathie kommen neben einer Plasmazellerkrankung differenzialdiagnostisch auch indolente B-Zell-Lymphome in Frage. Das gleichzeitige Auftreten dieser Erkrankungen ist, insbesondere bei älteren Patienten, ebenfalls möglich. Um ausführliche diagnostische Aussagen machen zu können, sollte die Möglichkeit des Vorliegens simultaner Erkrankungen bereits bei der Präanalytik (inklusive der Durchsicht der mitgeschickten klinischen- und Laborbefunde) berücksichtigt werden. Dazu gehört z.B. das Ansetzen einer DSP30-IL2-Kultur zusätzlich zur Untersuchung der CD138-positiven Zellpopulation beim Vorliegen einer monoklonalen Gammopathie ohne gesichertes Plasmazellmyelom. Da das Vorliegen eines Plasmazellmyeloms bei monoklonaler IgG- oder IgA-Gammopathie deutlich wahrscheinlicher ist, sollte die Analyse der DSP30-IL2-Kultur als Stufendiagnostik abhängig vom Ergebnis der Untersuchung der CD138-positiven Zellen bzw. der FACS-Untersuchung fortgesetzt werden. Bei älteren Patienten mit bereits vordiagnostizierten lymphatischen Erkrankungen und zunehmenden klinischen Symptomen sollte ein sekundär/simultan auftretendes MDS in Betracht gezogen werden. Da eine erweiterte Stufendiagnostik mit zusätzlichem Aufwand und Kosten verbunden und daher nur bei klinisch relevanten Situationen medizinisch indiziert ist, sollte sie nach Rücksprache mit behandelnden Ärzten erfolgen.

## **FISH-ascertained abnormality patterns define distinct MDS, lymphoma and myeloma cell populations in two patients with concurrent diseases**

**Margit König<sup>1</sup>, S. Mai<sup>2</sup>, H.-R. Kienzer<sup>3</sup>, N. Hölbling<sup>4</sup>, R. Ruckser<sup>4</sup>, E. Kitzweger<sup>4</sup>, O. A. Haas<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institut: St. Anna Kinderkrebsforschung, CCRI, <sup>2</sup>medgen.at GmbH, <sup>3</sup>Sozialmedizinisches Zentrum Süd - Kaiser-Franz-Josef-Spital mit Gottfried von Preyer'schem Kinderspital, <sup>4</sup>Sozialmedizinisches Zentrum Ost – Donauespital- 2. Med. Abteilung

The development of myelodysplastic syndromes in myeloma as well as lymphoma patients is an unfortunate consequence of their treatment, whereas the fact that such diseases may also coexist is much less appreciated.

We therefore report two such patients in whom FISH screening with a panel of myeloma- or lymphoma-specific probes on the one and cytogenetic analyses on the other hand produced discrepant results that required further clarification because they could only be explained by the presence of a concomitant myelodysplastic syndrome.

The first case regards an 86 years old male patient with pancytopenia and paraproteinemia. Analyses of GTG-banded chromosomes from bone marrow cultures revealed as typical MDS-associated aberrations a deletion 5q and a trisomy 21. In contrast, FISH analyses that were performed on isolated CD138-positive plasma cells identified a hyperdiploid clone with trisomies of at least chromosomes 3, 5, and 11 as well as a tetrasomy of chromosome 9. Further crosschecking with FISH proved that the respective abnormalities were indeed confined to the respective CD138-positive and CD138-negative cell fractions.

The second case regards a 63 years old patient with a relapse of a follicular lymphoma after chemo- and radiation therapy. In this case, cytogenetic analysis of bone marrow cultures identified an unbalanced translocation t(1;7). Although this abnormality is considered to be highly specific for myeloid malignancies it has apparently also occasionally been observed in myeloma and lymphoma patients. In contrast, FISH analysis that was performed on an uncultured purified mononuclear cell fraction indicated the presence of an *IGH* gene fusion with an unidentifiable partner gene together with a 17p13/*TP53* deletion in more than 70% of analyzed interphase nuclei, a finding that was compatible with the referral diagnosis of lymphoma. Further analyses with combinations of FISH probes that are specific for the centromeres of chromosomes 1 and 7 as well as 1q25 (*ABL2*) and 7q22/7q36 confirmed that the unbalanced t(1;7) was present in approximately 10% of interphase and all examined metaphase cells. Conversely, *IGH* and 17p13/*TP53* FISH was inconspicuous in the latter. Together these results unambiguously confirm the presence of distinct abnormal myeloid and lymphatic cell clones and represent two specific neoplastic diseases.

Our observations clearly underline the necessity of combining FISH screening with cytogenetic analyses especially in myeloma or lymphoma cases with concomitant and potentially MDS-associated cytopenias, because the uneven proportion and lopsided in vitro proliferation capacity of the various affected cell populations together with the preselected choice of FISH probes may otherwise fail to establish this important and clinically potentially highly relevant piece of information.

## Überexpression des *ASCL1* proneuralen Transkriptionsfaktors bei einer CLL mit 12;14 Translokation

Martin Erdel<sup>1</sup>, T. Malli<sup>1</sup>, M. Rammer<sup>1</sup>, S. Burgstaller<sup>2</sup>, R. Marschon<sup>1</sup>, W. Kranewitter<sup>1</sup>, M. Erdel<sup>1</sup>, S. Deutschbauer<sup>1</sup>, G. Webersinke<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Labor für Molekularbiologie und Tumorzytogenetik, Linz, <sup>2</sup>Interne IV, Klinikum Wels Grieskirchen

In mehr als 80% der CLL Patienten sind rekurrende Chromosomenveränderungen nachweisbar, wie die Deletionen 13q, 11q, 17p und 6q (in abnehmender Häufigkeit), oder die Trisomie 12 als häufigste numerische Veränderung. Obwohl auch Translokationen immer wieder in CLL Zellen vorkommen (ca. 30% der Fälle) sind rekurrende Translokationen eher selten (ca. 5%). Als Konsequenz führen diese meist entweder zu submikroskopischen Deletionen bei 13q14 Brüchen, oder zur Überexpression eines Protoonkogens durch einen der Enhancer der in der B-Zelle hochregulierten Immunglobulin (IG) Gene. Wir berichten hier über eine CLL mit einer neuen *IGH* Translokation t(12;14)(q23.2;q32). Eine molekulare Charakterisierung der Bruchpunkte identifizierte die Verlagerung des intronischen *IGHJ*-C $\mu$  Enhancers zum *ASCL1* Gen auf 12q23, ein Transkriptionsfaktor der achaete-scute bHLH Familie, der in der Regulation der Neurogenese eine zentrale Rolle spielt. Immunhistochemisch und mittels quantitativer PCR konnte die Überexpression von *ASCL1* in den CLL Zellen bestätigt werden. Während die Überexpression von *ASCL1* in neuroendokrinen Tumoren bekannt ist, wurde sie in hämatologischen Neoplasien bislang nicht beschrieben. Expressionsarrays der vorliegenden CLL im Vergleich zu normalen B-Zellen zeigten 11 hochregulierte Gene, die als mögliche *ASCL1* Zielgene aus der Literatur der Neurogenese bereits bekannt waren. In CLL sind 8 Kandidaten davon auch als überexprimierte Gene bereits beschrieben. Aufgrund der zusätzlichen CLL typischen Veränderungen des vorliegenden Falles - eine Mikrodeletion 13q14 und eine partielle Trisomie 12 infolge einer Duplikation des Derivatvchromosoms 12 - ist eine erste Interpretation dieser Ergebnisse jedoch schwierig. Die mögliche Bedeutung der *ASCL1* Überexpression für die Pathogenese hämatologischer Neoplasien ist daher nur durch weitere Genexpressionsdaten und durch funktionelle Studien zu klären.



## Multiples Myelom mit t(11;14) und t(14;16) in unterschiedlichen Zellklonen (Fallbeispiel)

Tanja Hinrichsen<sup>1</sup>, B. Schmidt<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik (MVZ) Dr. Klein, Dr. Rost und Kollegen,  
<sup>2</sup>Hämato-Onkologische Überörtliche Gemeinschaftspraxis Pasing und Fürstenfeldbruck

Die 75-jährige Patientin wurde wegen einer seit 6 Monaten bestehenden, langsam zunehmenden Polyneuropathie (PNP) (sensible PNP, WHO<sup>2</sup>) in Verbindung mit einer monoklonalen Gammopathie (IgG/kappa) vorstellig. Wesentliche Vorerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus) bestehen nicht. Der körperliche Untersuchungsbefund und die Oberbauchsonographie sind unauffällig. Serumwerte: M-Gradient in der Gamma-Fraktion der Elektrophorese. IgG 11,58 g/L (norm 7,0-16,0) bei erniedrigten Werten für IgA 0,29 (norm 0,7-4,0) und IgM 0,21 (norm 0,4-2,3). Freie Leichtketten: Kappa 152 mg/L (6,7-22,4), Lambda 6,5 mg/l (8,3-27), Kappa/Lambda-Ratio: 23,49 (0,31-1,56). Eine Knochenmarkpunktion ergab 8% klonale Plasmazellen sowie einen unauffälligen weiblichen Chromosomensatz.

Die angeschlossenen FISH-Analyse an CD138+ angereicherten Zellen zeigte jedoch folgende Veränderungen:

- Vysis LSI *ATM/CEP 11* : 3 r + 2 gr (40/209)
- MetaSystems XL *DLEU/TP53*: 1 r + 2 gr (31/231)
- MetaSystems XL *IGH* plus: 1 F (r/gr) + 1 r + 1 gr (35/229) sowie 2 r + 1 gr (39/229)
- MetaSystems XL t(11;14): 2 r + 3 gr (27/224) sowie 3 F (r/gr) + 1 r (88/224)
- MetaSystems XL t(14;16): 2 r + 3 gr (57/232) sowie 2 F (r/gr) + 1 r + 1 gr (51/232)

Somit fand sich in der FISH-Analyse in 13,4% der Interphasen eine Deletion der Region 13q14 (*DLEU*), in 22,0% der Interphasen eine balancierte Translokation t(14;16)(q32;q23) und in 39,3% der Interphasen eine balancierte Translokation t(11;14)(q13;q32) sowie ein verändertes Chromosom 14 aus einer unbalancierten Translokation t(11;14)(q13;q32). Durch die unbalancierte Translokation kommt es zum Verlust von Chromosomenmaterial von 14q32->14qter und zum Zugewinn von Chromosomenmaterial von 11q13->11qter (bestätigt durch Zugewinn von *ATM* (11q22.3)). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Deletion 13q14 mit der Translokation t(14;16)(q32;q23) einhergeht und die Translokation t(11;14)(q13;q32) einen unabhängigen Zellklon darstellt.

In der Computertomographie des Skelettsystems fanden sich vereinzelte kleine Osteolysen in der Schädelkalotte (differentialdiagnostisch könnte es sich auch um die physiologisch vorkommenden Pacchionischen Granulationen handeln), sowie eine Osteoporose der Wirbelsäule. Eindeutige CRAB-Kriterien (Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie, Myelomtypische Osteolysen) liegen nicht vor. Da die PNP jedoch eine Behandlungsindikation außerhalb der CRAB-Kriterien darstellt, wurde der Patientin der Beginn einer Behandlung empfohlen um das Fortschreiten der PNP aufzuhalten. Grundsätzlich gehört Bortezomib zum Standardrepertoire der Erstlinientherapie bei Patienten die für eine Hochdosistherapie und Stammzell-Transplantation nicht qualifizieren (u.a. Alter >75 Jahre). Problematisch ist jedoch, dass Bortezomib als unerwünschte Wirkung ebenfalls eine PNP induziert. Auch Thalidomid, ein weiteres wirksames Präparat der Erstlinientherapie älterer Patienten, wird aufgrund dessen kaum noch eingesetzt. Der Patientin wurde die seit einigen Monaten als Erstlinientherapie zugelassene Kombination aus Lenalidomid und Dexamethason empfohlen und mittlerweile begonnen.



## Klonalität des isolierten Y-Verlusts bei MDS und morphologischer und molekulargenetischer Hintergrund

Christina Ganster<sup>1</sup>, U. Bacher<sup>1</sup>, U. Germing<sup>2</sup>, K. Shirmeshan<sup>1</sup>, S. Dierks<sup>1</sup>, R. Martin<sup>1</sup>, J. Flach<sup>1</sup>, J. Schanz<sup>1</sup>, L. Harder<sup>3</sup>, D. Haase<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, <sup>2</sup>Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, <sup>3</sup>Institut für Tumorgenetik Nord, Kiel

Ein Verlust des Y-Chromosoms (LOY) wird als normales, altersassoziiertes Phänomen beschrieben, kann aber bei hämatopoetischen Erkrankungen auch den neoplastischen Klon kennzeichnen. Ziel unseres Projektes war es, mittels FISH Analyse an CD34+ peripheren Blutzellen (CD34+PB-FISH) für Patienten mit myelodysplastischen Syndromen (MDS) einen verlässlichen Schwellenwert für einen krankheitsassoziierten LOY zu finden. Auch in unserer Kohorte war LOY mit höherem Alter assoziiert und der Anteil an Zellen mit LOY war bei älteren MDS Patienten, aber auch älteren Kontrollpersonen ohne hämatologische Erkrankung, höher als bei Männern unter 35 Jahren. Beim Vergleich der Anteile der Zellen mit LOY in CD3+ T-Zellen und in CD34+ Zellen zeigte sich, dass CD34+ Zellen sowohl bei MDS Patienten als auch bei älteren Kontrollpersonen „anfälliger“ für LOY waren als CD3+ Zellen. Basierend auf dem vom LOY betroffenen Prozentsatz an CD34+ peripheren Blutzellen haben wir mit 21,5% LOY einen Schwellenwert ermittelt, der die Unterscheidung eines altersbedingten von einem klonalen LOY mittels CD34+PB-FISH ermöglicht. In unserem Modell der Pathogenese von MDS mit LOY könnte ein altersbedingter LOY in CD34+ Zellen die Prädisposition für das Auftreten weiterer somatischer Veränderungen schaffen, die dann die Entstehung eines MDS begünstigen könnten.

Daher war es das Ziel unseres Folgeprojekts zu untersuchen, welche für MDS typischen molekularen Mutationen Patienten mit LOY haben. Außerdem wollten wir prüfen, ob diese Patienten typische zytomorphologische Merkmale aufweisen. Dazu wurden die Ergebnisse der Sanger-Mutationsanalyse der 17 bei MDS am häufigsten mutierten Gene von 17 Patienten mit isoliertem LOY und zwei Patienten mit LOY und Trisomie 15 mit denen einer Kontrollgruppe von 197 Patienten mit MDS und sAML und anderen zytogenetischen Veränderungen oder Normalkaryotyp verglichen. Außerdem wurden Knochenmarkaspirate von 41 Patienten mit isoliertem LOY zytomorphologisch anhand der Standards des Düsseldorfer MDS Registers untersucht (Germing et al, 2012).

Das am häufigsten mutierte Gen der molekular untersuchten Patienten (LOY in  $\geq 50\%$  der Metaphasen bei morphologisch gesichertem MDS bzw. in  $\geq 75\%$  bei vermutetem MDS) war *TET2* (n=7/19). Weitere Mutationen wurden in *CBL* (n=2/15), *ZRSR2* (2/15), *ASXL1* (1/19) und *SRSF2* (1/19) identifiziert. Insgesamt war der Anteil der Patienten mit molekularen Mutationen mit 53% bei Patienten mit LOY niedriger als in der Kontrollgruppe (72%). Zytomorphologisch wurde das Vorliegen eines MDS nach WHO-Kriterien (2008) bei 36/41 Patienten (19x LOY in  $\geq 75\%$  der Metaphasen, 22x in  $< 75\%$ ) bestätigt. Abgesehen davon, dass der Blastenanteil im Knochenmark in 40/41 Fällen  $< 5\%$  betrug, zeigte sich eine heterogene Verteilung der MDS-Subtypen. Die peripheren Blutwerte und die Dysplasien der einzelnen Zellreihen (Erythro-, Granulo-, Megakaryopoese) unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen mit einer LOY-Klongröße  $\geq 75\%$  bzw.  $< 75\%$ .

Aus unserem Folgeprojekt lässt sich ableiten, dass eine Blastenvermehrung  $\geq 5\%$  im Knochenmark und molekulare Hochrisikomarker (Mutationen in *TP53*, *RUNX1*, *EZH2*) bei Patienten mit isoliertem LOY selten vorkommen und dass diese Patienten eine signifikant niedrigere Anzahl an molekularen Mutationen aufweisen. Für MDS mit klonalem LOY spezifische zytomorphologische oder molekulare Eigenschaften haben wir bisher nicht gefunden. Insgesamt passen unsere Ergebnisse jedoch zur bekanntermaßen sehr günstigen Prognose dieser Patientengruppe nach dem IPSS und dem IPSS-R (Schanz et al, 2012; Greenberg et al, 2012).

## Array CGH bei MDS Patienten mit normalem Karyotyp in der Chromosomenbandenanalyse

Sarah Volkert<sup>1</sup>, T. Haferlach<sup>1</sup>, J. Holzwarth<sup>1</sup>, M. Zenger<sup>1</sup>, W. Kern<sup>1</sup>, M. Staller<sup>1</sup>, Y. Nagata<sup>2</sup>, K. Yoshida<sup>2</sup>, S. Ogawa<sup>2</sup>, S. Schnittger<sup>1</sup>, C. Haferlach<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MLL – Münchner Leukämie Labor, <sup>2</sup>Department of Pathology and Tumor Biology, Kyoto University

**Einleitung:** Bei MDS Patienten spielen zytogenetische Aberrationen eine wichtige Rolle für die Klassifikation und Prognose. Der IPSS und der überarbeitete IPSS haben den prognostischen Einfluss von bestimmten zytogenetischen Aberrationen deutlich gemacht. Der überwiegende Anteil von chromosomalen Aberrationen bei MDS sind Zugewinne und Verluste, balancierte Rearrangements treten selten auf. Jedoch zeigen mehr als die Hälfte der MDS-Patienten einen normalen Karyotyp. Mit der Chromosomenbandenanalyse können Zugewinne und Verluste die größer als 10 Mb sind nachgewiesen werden. Außerdem ist die Methode abhängig von der Proliferation des MDS-Klons in vitro. Array CGH hingegen hat eine wesentlich höhere Auflösung und benötigt keine proliferierenden Zellen.

**Ziel:** In dieser Studie gingen wir der Frage nach, ob MDS Patienten mit normalem Karyotyp zytogenetisch kryptische Zugewinne und Verluste aufweisen.

**Patienten und Methoden:** 520 MDS Patienten mit normalem Karyotyp wurden mit Array CGH untersucht (Human CGH 12x270K Whole-Genome Tiling Array, Roche NimbleGen, Madison, WI). Bei allen Patienten wurden eine zytomorphologische Untersuchung und eine Chromosomenanalyse durchgeführt. Anschließend wurden rekurrente Deletionen, die mittels CGH nachgewiesen wurden, durch FISH-Analysen bestätigt. Für 487 Patienten lagen Überlebensdaten vor. Die Kohorte bestand aus folgenden MDS Subgruppen: RA (n=22), RARS (n=43), RARS-T (n=27), RCMD (n=124), RCMD-RS (n=111), RAEB-1 (n=104), und RAEB-2 (n=89). Das mittlere Alter betrug 72,2 Jahre.

**Ergebnisse:** Bei 56/520 (11%) Patienten wurden durch Array CGH Kopienzahlveränderungen nachgewiesen. Lediglich 9 Patienten (2%) wiesen Kopienzahlveränderungen größer als 10 Mb auf, die normalerweise mit der Chromosomenanalyse erfasst werden. Sie wurden mittels Chromosomenanalyse aufgrund kleiner Klonegröße (n=2), unzureichender in vitro Proliferation (n=3) oder suboptimaler Chromosomenqualität (n=4) nicht erfasst. Bei 47 Patienten wurden 19 submikroskopische Zugewinne und 34 submikroskopische Verluste detektiert. Rekurrent deletierte Regionen, die mit Interphase FISH bestätigt wurden, betrafen die Gene *TET2* (4q24; n=9), *DNMT3A* (2p23; n=3), *ETV6* (12p13; n=2), *NF1* (17q11; n=2), *RUNX1* (21q22; n=2), und *STAG2* (Xq25, deletiert bei 2 Patientinnen). Kein rekurrenter submikroskopischer Zugewinn wurde nachgewiesen. Außerdem wurden Überlebensanalysen durchgeführt. Unabhängig davon, ob der normale Karyotyp (n=433) mit CGH bestätigt wurde oder mittels CGH ein aberranter Karyotyp (n=54) nachgewiesen wurde, zeigte sich kein Unterschied im Gesamtüberleben der Patienten. Jedoch war das Gesamtüberleben der 31 Patienten mit submikroskopischen Deletionen signifikant kürzer, verglichen mit dem Gesamtüberleben aller anderen Patienten (mittleres Gesamtüberleben: 71 vs. 43 Monate, p=0.024).

**Zusammenfassung:** Array CGH detektiert Kopienzahlveränderungen bei 11% der MDS Patienten mit einem normalem Karyotyp in der Chromosomenbandenanalyse. Die meisten der gefundenen Aberrationen sind submikroskopische Deletionen, die die Gene *TET2*, *ETV6*, *DNMT3A*, *NF1*, *RUNX1* bzw. *STAG2* umfassen. Diese Deletionen können auch mittels Interphase-FISH-Analysen nachgewiesen werden. Angesichts der Tatsache, dass Patienten mit submikroskopischen Deletionen in dieser Studie ein kürzeres Gesamtüberleben zeigen, ist dies eine sinnvolle Möglichkeit in der Routinediagnostik von MDS Patienten mit normalem Karyotyp in der Chromosomenbandenanalyse.

## **Molekulare Verfolgung somatischer Mutationen bei MDS-Patienten mit Monosomie 7 unter Vidaza®-Therapie**

**Sascha Dierks**, R. Martin, E. Shumilov, C. Ganster, K. Shirneshan, J. Flach, U. Bacher, D. Haase

Universitätsmedizin Göttingen – Hämatologie; Med. Onkologie – INDIGHO

Myelodysplastische Syndrome (MDS) bilden eine heterogene Gruppe hämatologischer Stammzell-Erkrankungen, welche u.a. durch eine ineffektive, dysplastische Hämatopoese, daraus resultierende periphere Zytopenien und ein beträchtliches Risiko einer leukämischen Transformation charakterisiert sind. Derzeit stellt allein die allogene Stammzelltransplantation einen kurativen (allerdings aber auch toxischen) Ansatz dar.

Klonale zytogenetische Anomalien sind in ca. 50% aller MDS Fälle zu beobachten. Neben den charakteristischen zytogenetischen Aberrationen wie 5q Deletion oder Monosomie 7 ließen sich in aktuellen Studien somatische molekulare Genmutationen bei ca. 80% der MDS Patienten detektieren. Diese Mutationen betreffen u.a. Gene, die bei Prozessen wie RNA-Splicing, Chromatinmodifikation oder DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle spielen. Der Einsatz von demethylierenden Substanzen wie 5-Azacytidin (Vidaza®) bei Hochrisiko MDS-Patienten stellt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar. Jedoch ist das Ansprechen auf diese Therapie sehr variabel und zumeist zeitlich limitiert. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, die mit einem Ansprechen oder einer primären oder sekundären Resistenz assoziiert sind sowie die Rolle möglicherweise beteiligter molekularer Mutationen blieben bislang ungeklärt.

Die beiden dargestellten Fallbeispiele (MDS RAEB-2 und MDS RCMD) waren aufgrund klinischer Charakteristika und der Zytogenetik (beide mit isolierter Monosomie 7) in die Gruppe der Hochrisiko MDS-Patienten einzuordnen. Zusätzlich waren bei beiden Patienten mittels Sanger-Sequenzierung molekulare Mutationen nachweisbar. Indikationsgerecht erhielten beide Patienten eine Therapie mit Vidaza®. In retrospektiven Next-Generation-Sequencing (NGS) Analysen zu Zeitpunkten vor, während und nach Therapie mit Vidaza® wurde darüber hinaus eine molekulare Evolution neuer Klone, die unter bzw. nach demethylierender Therapie auftraten und verschwanden, sensitiv detektiert und rekonstruiert. Dabei ließ sich beobachten, dass bestimmte Subklone mit Mutationen in Genen wie *RUNX1*, welche mit den Monosomie 7-Klonen assoziiert waren, auf Vidaza® ansprachen und im Verlauf nicht mehr oder nur gering nachweisbar waren, während andere Mutationen in Genen wie *CUX1* erst nach Absetzen von Vidaza® neu auftraten. Die Progression unter Vidaza® schien daher mit der Entwicklung eines veränderten oder neuen Mutationsmusters zusammenzuhängen. Die Auswertung dieser Mutationsmuster könnte die Beurteilung und Prädiktion des Therapieansprechens auf Vidaza® verbessern. Weiterhin können solche molekulargenetischen Verlaufsuntersuchungen eine Rolle bei der Entschlüsselung der Resistenzmechanismen gegenüber Vidaza® spielen.

Somit stellt die Überwachung des molekularen Verlaufs unter Vidaza®-Therapie mittels NGS einen neuen Schritt zu einer stärker individualisierten Medizin bei Hochrisiko MDS-Patienten dar, um das Auftreten einer genetischen Evolution frühzeitig zu erkennen, das Therapieansprechen frühzeitig abzuschätzen und die Therapieentscheidungen frühzeitig anzupassen.

## 17p Deletionen und *TP53* Mutationen bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom und komplex aberrantem Karyotyp

Roxana Schaab<sup>1</sup>, C. Ganster<sup>1</sup>, S. Dierks<sup>1</sup>, M. Tallo Parra<sup>1</sup>, R. Martin<sup>1</sup>, U. Germing<sup>2</sup>, U. Platzbecker<sup>3</sup>, K. Shirmeshan<sup>1</sup>, F. Lange<sup>4</sup>, N. Kröger<sup>5</sup>, K. Döhner<sup>6</sup>, B. Glaß<sup>7</sup>, U. Bacher<sup>1</sup>, D. Haase<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Universitätsmedizin Göttingen, <sup>2</sup>Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Dresden, <sup>4</sup>Hufeland Klinikum, Mühlhausen, <sup>5</sup>Klinik für Stammzelltransplantation, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, <sup>6</sup>Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Ulm, <sup>7</sup>Klinik für Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, Asklepios Klinik St. Georg

**Einführung:** Veränderungen des *TP53* Gens durch molekulare Mutationen oder zytogenetische Deletionen sind bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen (MDS) mit komplex aberrantem Karyotyp ( $\geq 3$  zytogenetische Aberrationen (CA)) häufig und mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Ziel dieser Studie war es, bei Patienten mit MDS/AML mit komplex aberrantem Karyotyp die Abhängigkeiten zwischen dem Mutationsstatus von *TP53* (hetero- vs. homozygot, zytogenetische Deletion vs. molekulare Mutation), dem Ausmaß der genetischen Instabilität und der Prognose genauer zu untersuchen.

**Methoden:** Wir haben 123 Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp ( $\geq 3$  Aberrationen) in die Studie eingeschlossen (91x MDS, 15x sAML nach MDS, 17x *de novo* AML). Die Patienten wurden mittels Chromosomenbänderungsanalyse (CBA), Interphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) einschließlich des 17p13/*TP53*- Locus, multicolor FISH (mFISH), *TP53* Sequenzierung und SNP-Array Analyse (SNP-A) analysiert. Das Ausmaß der genetischen Instabilität wurde anhand der Anzahl der CA, der Anzahl der Fusionen im mFISH und der mittels SNP-A bestimmten Größe der gesamten genomischen Imbalancen (total genomic aberrations (TGA), gemessen in Megabasen) quantifiziert.

**Ergebnisse:** Bei 62/123 (50,4%) Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp zeigte sich eine molekulare *TP53* Mutation (mut). Eine *TP53*-Deletionen (del) wurde mittels FISH-Analyse bei 31/89 (34,8%) Patienten nachgewiesen. Insgesamt haben wir bei 50/89 Patienten (56,2%) eine *TP53* Veränderung gefunden (mut und/oder del). Bei 28/89 Patienten (31,5%) lag ein heterozygoter *TP53*-Status vor (mut oder del), bei 22/89 Patienten (24,7%) ein homozygoter (mut+del). In 39/89 (43,8%) der Fälle lag keine *TP53*-Veränderung vor. Bei Vorliegen einer mut war die Anzahl der CA signifikant größer (Median 7; Range 1-41; vs. 4; 3-23;  $p=0,014$ ). Ebenso war die Größe der TGA sowie die Anzahl der Fusionen im mFISH (Median 2; Range, 0-17; vs. 3,5; 0-13;  $p=0,093$ ) tendenziell höher verglichen mit Patienten ohne mut (Median 362 Mb; Range; 97-981 Mb; vs. 163 Mb; 64-600 Mb;  $p=0,135$ ). Analog dazu war die CA und die Anzahl der Fusionen signifikant höher bei Patienten mit homozygotem *TP53*-Mutationsstatus (CA: Median 8; Range 3-41; Fusionen: 5; 0- 13) und heterozygotem *TP53*-Mutationsstatus (CA: 8; 1-25; Fusionen: 3; 0-10) gegenüber Patienten ohne *TP53*-Veränderung (CA: 4; 3-23;  $p=0,001$ ; Fusionen: 2; 0- 17;  $p=0,012$ ). Erste Überlebensanalysen deuten auf einen zusätzlichen Einfluss der CA auf das Überleben von Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp und einer *TP53* Mutation hin. Zur Bestätigung dieser Beobachtung sammeln wir weitere Überlebensdaten.

**Zusammenfassung:** Wir konnten zeigen, dass ein hoher Anteil der MDS/AML-Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp (56,2%) eine mut oder del von *TP53* aufweist. Bei Patienten mit komplexem Karyotyp und einer *TP53* Aberration fanden wir eine größere genetische Instabilität im Gegensatz zu Patienten ohne *TP53*- Veränderung gemessen an der Anzahl der CA, der Fusionen im mFISH und der Größe der TGA. Das Ausmaß der zytogenetischen Komplexität könnte für Patienten mit komplex aberrantem MDS/AML bei vorliegender *TP53* Mutation zusätzlich prognostisch relevant sein. Um dies zu überprüfen, sammeln wir weitere Daten. Insgesamt fand sich bei 43,8% der Patienten mit einem komplex aberranten Karyotyp gar keine *TP53* Aberration. Es stellt sich die Frage, ob Mutationen anderer Gene des *TP53* Signalweges einen "*TP53*-ähnlichen" Phänotyp verursachen könnten.

## Zusammenspiel zwischen genetischer Diagnostik und Therapie bei der CML - Absetzstudien, Resistenzen

Andreas Hochhaus

Klinik für Innere Medizin II, Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinikum Jena, Jena

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine klonale Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle und stellt biologisch, diagnostisch und therapeutisch ein Modell von Neoplasien dar. Die Beschreibung des Philadelphia-Chromosoms 22q- als zytogenetisches Korrelat der CML war die wichtigste Voraussetzung für die Entwicklung zielgerichteter Therapien. Das Produkt der t(9;22)(q34;q11)-Translokation ist *BCR-ABL* mit gesteigerter Tyrosinkinase (TK)-Aktivität, welche für die unkontrollierte Zellproliferation und Reduktion der Apoptose verantwortlich ist. Daraus ergab sich der Therapieansatz, durch Hemmung der gesteigerten Enzymaktivität die Krankheitsprogredienz zu verringern. Die Überlegenheit von Imatinib über Interferon alpha (IFN) wurde in der IRIS-Studie mit einer 7-Jahres-Überlebensrate von 86% belegt. Bei einer jährlichen CML-bedingten Mortalität von ca. 0,5–1% und einer Sterberate an CML-unabhängigen Ursachen von 1% steigt die Prävalenz der CML stetig.

Nach dem Erfolg von Imatinib wurden weitere TK-Inhibitoren entwickelt. Nilotinib wirkt *BCR-ABL*-spezifischer, inhibiert wie Imatinib auch die TK *PDGFR* und *KIT* und zeigt eine bessere zelluläre Bioverfügbarkeit. Dasatinib ist ein Multikinase-Inhibitor mit Wirkung auf *ABL*, *SRC*, *PDGFR* und *KIT*. In der Erstlinientherapie zeigten sowohl Nilotinib als auch Dasatinib gegenüber Imatinib eine deutlich verbesserte Effektivität mit höheren Raten und rascherem Eintritt molekularer Remissionen. Bosutinib ist ebenfalls ein *SRC/ABL*-Inhibitor ohne signifikante Wirksamkeit auf die *PDGF*-Rezeptoren und *KIT*. Ponatinib ist ein Multikinaseinhibitor mit Wirkung auf die bisher resistente *T315I-BCR-ABL*-Mutation und Aktivität u.a. gegen *KIT*, *PDGFR*, *FLT3*, *FGFR* und *VEGFR*.

Optimale Therapieergebnisse der CML können nur bei systematischer Bestimmung des therapeutischen Ansprechens und drohender Rezidive durch Metaphasen-Zytogenetik und quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erreicht werden. Die Bestimmung des *BCR-ABL*-Transkripttyps zur Diagnose durch Multiplex-PCR ist entscheidende Voraussetzung für die korrekte Verlaufskontrolle. Vom Europäischen Leukämienetz (ELN) wird eine drei- bis sechsmonatliche zytogenetische Untersuchung des Knochenmarks bis zur kompletten zytogenetischen Remission empfohlen. Danach sollte eine dreimonatliche standardisierte quantitative PCR-Untersuchung erfolgen.

Zytogenetische Zusatzaberrationen vom „major route“ Typ (+8, +19, +Ph, iso(17)) sind wichtige Parameter zur Klassifikation als Hochrisiko-CML und Planung einer allogenen Stammzelltransplantation. Aberrationen der Ph-negativen Hämatopoese spielen nur bei hämatologischen Zeichen eines zusätzlich vorliegenden myelodysplastischen Syndroms und/oder der Monosomie 7 eine Rolle.

Prognostische Marker zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit einer tiefen molekularen Remission und der Überlebenswahrscheinlichkeit sind die Geschwindigkeit der molekularen Remission in den ersten drei Therapiemonaten, die optimal über den *BCR-ABL/GUS*-Quotienten gemessen wird. Alternativ kann das Unterschreiten des *BCR-ABL*-Wertes von 10% nach 3 Monaten als prognostisch günstig betrachtet werden.

Im Falle einer zytogenetischen oder molekularen Resistenz wird die Sequenzierung der *ABL*-TK mit Quantifizierung der mutierten Klone zur Wahl der weiteren Therapie empfohlen. Die alternative Bindungsstelle des neuen allosterischen *ABL*-TK-Inhibitors *ABL001* verlangt die zusätzliche Sequenzierung dieses Bereiches von *ABL*.

Bei Patienten mit langjähriger TK-Inhibitor-Therapie und Stabilität einer tiefen molekularen Remission ist (noch im Rahmen von Studien) ein Absetzen der Therapie möglich. Die Kenntnis des initial dominierenden *BCR-ABL*-Transkripttyps, die Angabe der Sensitivität der individuellen PCR, häufige PCR-Untersuchungen im ersten Jahr nach dem Absetzen und die rasche Befundübermittlung sind entscheidende Voraussetzung für den Erfolg und die Sicherheit nach dem Absetzen. Moderne Standardisierungsmethoden und der Einsatz der digitalen PCR werden die Verlaufskontrolle unter und nach Therapie erleichtern. Die Bedeutung klonaler molekularer Aberrationen der Ph negativen Hämatopoese für die Pathogenese der CML und die Heilungschancen nach dem TKI-Absetzen ist noch ungeklärt. Die Rolle der Aktivierung der Immunantwort durch IFN für den Erfolg der Absetzversuche wird zur Zeit im Rahmen klinischer Studien, z.B. der TIGER-Studie, geprüft.

## Jumping Translocation in 1q11 und Karyotyp Evolution bei einem Fall von ET

Katayoon Shirneshan, E. Rietkötter, U. Bacher, D. Haase

Universitätsmedizin Göttingen

Als „jumping translocation“ (JT) bezeichnet man die Translokation eines „donor“-Chromosomenarms oder -abschnitts auf zwei oder mehrere unterschiedliche Empfänger-Chromosomen innerhalb verschiedener Zelllinien bei einem Individuum, wodurch mehrere zusammenhängende Klone oder ein Mosaik-Karyotyp entstehen. Erworbene JT lassen sich nur sehr selten bei hämatologischen Neoplasien detektieren. In der Literatur finden sich einzelne Berichte über Patienten mit JT im Rahmen verschiedener Leukämien oder Lymphome, zumeist im Sinne einer sekundären Aberration im Krankheitsverlauf mit 1q als Donorchromosom.

Wir berichten hier über eine JT - ausgehend von 1q - als sekundäre zytogenetische Aberration bei einer 54-jährigen Patientin mit einer myeloproliferativen Neoplasie (MPN), im Sinne einer Essentiellen Thrombozythämie (ET). Primär wurde ein normaler Karyotyp festgestellt. Eine spätere Mutationsanalyse zeigte eine *CALR*-Mutation, gut passend zur Diagnose einer ET. Zwölf Jahre nach Erstdiagnose detektierte die Chromosomenbänderungsanalyse (GTG) erstmalig eine JT mit Involvierung von 1q, wobei im Detail die Banden 1q10 und 1q11 beteiligt waren. Diese waren in drei verschiedenen Klonen mit jeweils einer zusätzlichen Kopie von 1q nachweisbar. Rezipienten der JT waren die zentromerischen und telomerischen Regionen der Chromosomen 13, 17 und 21. Nach weiteren vier Monaten wurden mehrere Klone mit zusätzlichen Empfängerchromosomen im Sinne einer weiteren klonalen Evolution nachgewiesen.

JT mit Beteiligung von 1q (1qJT) wurden in der Literatur bereits bei Patienten mit Multiplem Myelom in Assoziation mit einer ungünstigen Prognose beschrieben. Bei Patienten mit MDS und MPN wurde der Nachweis einer 1qJT mit einem hohen Transformationsrisiko in eine sekundäre akute myeloische Leukämie (s-AML) in Verbindung gebracht (Najfeld et al., 2010). Somit kann eine „Jumping Translocation“ mit Involvierung von 1q eine relevante Rolle für die Progression und leukämische Transformation von chronischen myeloischen Entitäten spielen. Es sollten zentral weitere Fälle chronischer myeloischer Neoplasien mit diesem Phänomen gesammelt werden, um die Einblicke in das Risikoprofil und etwaige therapeutische Konsequenzen für Patienten mit dieser seltenen zytogenetischen Konstellation zu verbessern.



## **TP53 Keimbahnveränderungen**

**Brigitte Schlegelberger, G. Göhring**

Institut für Humangenetik (Medizinische Hochschule Hannover), Hämatonkogenetik

Das Tumorsuppressorgen *TP53*, auch Wächter des Genoms genannt, ist auf Chromosom 17p13 lokalisiert und ist als Transkriptionsfaktor p53 u.a. an der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt. Keimbahnmutationen treten mit einer Prävalenz von 1 in 5.000 auf und können sowohl de novo entstehen als auch vererbt werden. Träger einer *TP53* Keimbahnmutation haben ein stark erhöhtes Krebsrisiko, wobei Frauen aufgrund von Brustkrebs ein deutlich höheres Risiko tragen (80% Risiko für Krebs bei 50jährigen Frauen und 40% Risiko für Krebs bei gleichaltrigen Männern) (Malkin D et al. Science 1990:250:1233-1238; Srivastava S et al. Nature 1990:348:747-749).

Das Li-Fraumeni Syndrom (LFS) stellt ein Krebsprädispositionssyndrom dar, welches durch klinische Kriterien diagnostiziert wird. In etwa 70-80% der Patienten mit LFS kann eine *TP53* Keimbahnmutation identifiziert werden. Diese entsteht in 7-20% de novo und wird autosomal dominant vererbt. Das LFS ist assoziiert mit dem Auftreten von Sarkomen, Brustkrebs, Hirntumoren, adrenokortikalen Tumoren und Leukämien. Bis zu 30% aller Kinder mit *TP53* Mutation erkranken an Krebs, wobei diese Kinder auch ein erhöhtes Risiko für multiple Krebserkrankungen haben. Ein Risikofaktor stellt hier die Bestrahlung dar, was sich durch die Rolle von *TP53* erklären lässt (Mai PL et al. Cancer Genet 2012:205:479-487).

*TP53* Keimbahnmutationen kommen auch vor, ohne dass die klinischen Kriterien bei diesen Patienten für ein LFS gegeben sind. Aufgrund der immer häufiger angewandten Next Generation Sequencing Panel-Analysen wird die Detektionsrate von Veränderungen in *TP53* immer höher. Eine extrem wichtige Frage für die Zukunft ist es nun, wie man bisher unklare Varianten als Polymorphismus ohne klinische Bedeutung bzw. als pathogene Mutation identifizieren kann.

Sollte der Verdacht eines Krebsprädispositionssyndroms bzw. einer *TP53* Keimbahnmutation vorliegen, sind eine humangenetische Beratung sowie besondere Früherkennungsuntersuchungen empfohlen.

## Somatic *TP53* alterations

Anna Stengel

MLL – Münchner Leukämie Labor

*TP53* is the most frequently mutated gene in human cancer, alterations in *TP53* have been detected in basically all cancer types. Alterations include mutations and deletions and are generally associated with advanced stages of disease, insufficient therapy-response and poor prognosis. The transcription factor *TP53* has a central regulatory function in various signalling pathways, such as cell cycle arrest, apoptosis and DNA repair. Due to its central role in conserving genome stability, p53 has been described as "the guardian of the genome". *TP53* deletions are often found to be associated with *TP53* mutations of the second allele, supporting the "two-hit" hypothesis which suggests that alteration of both copies of a tumor-suppressor gene is required to induce and/or drive cancer development. Mutations and deletions in *TP53* have been described in hematological malignancies, however with lower frequencies than in solid tumors, where mutation frequencies of up to 90% have been observed e.g. in uterine and ovarian cancer. In most cancer types, *TP53* alterations constitute later events in tumorigenesis and are thus associated with disease progression, although early events involving *TP53* are found as well.

In more detail, when patients with AML, MDS, ALL and CLL were analyzed for *TP53* mutations and deletions, the highest frequency of *TP53* alterations was observed in patients with ALL (total: 19%; mut+del: 6%; mut only: 8%; del only: 5%) and AML (total: 13%; mut+del: 5%; mut only: 7%; del only: 1%). However, *TP53* alterations occurred less frequently in patients with CLL (total: 8%; mut+del: 4%; mut only: 3%; del only: 1%) and MDS (total: 7%; mut+del: 1%; mut only: 5%; del only: 1%). *TP53* alterations were correlated with a complex karyotype in AML, ALL, MDS. Regarding age dependency of *TP53* alterations, *TP53*mut was significantly more frequent in patients  $\geq 60$  vs  $< 60$  years in AML (9% vs. 2%,  $p < 0.001$ ) and ALL (12% vs. 6%,  $p < 0.001$ ). By contrast, no such differences were observed for patients with CLL and MDS and for cases with *TP53* deletions in all entities. Moreover, *TP53*mut+del had a significant negative impact on OS in all entities (AML (36 vs. 2 months,  $p < 0.001$ ), ALL (not reached vs. 11 months,  $p < 0.001$ ), CLL (not reached vs. 32 months,  $p < 0.001$ ), MDS (65 months vs. 4 months,  $p < 0.001$ )). However, differences were observed regarding *TP53*mut only and *TP53*del only: *TP53*mut only impacted survival in AML (36 vs. 9 months,  $p < 0.001$ ) and MDS (65 vs. 19 months,  $p < 0.001$ ), *TP53*del only in CLL (not reached vs. 64 months,  $p = 0.008$ ) and MDS (65 vs. 24 months,  $p = 0.011$ ).

In summary, *TP53* mutations and deletions play important roles in all hematological entities, although the general alteration frequency is clearly lower than in many solid tumors. Differences between the malignancies are observed not only regarding the alteration frequencies but also in terms of association with age and the influence on survival: although in all entities analyzed a *TP53* mutation and an accompanying *TP53* deletion in the second allele ("double hit") is always associated with an adverse outcome, differences were detected regarding OS for patients with mutation only or deletion only ("single hit"). Thus, *TP53* mutations and deletions should both be evaluated and their presence needs further investigation in the future, especially regarding their clinical impact in different hematological entities.

## Klinische Anwendbarkeit von zirkulierender Tumor DNA

**Ellen Heitzer**

Institute of Human Genetics, Medical University Graz, Austria

Durch die zunehmende Anzahl an zielgerichteten Therapien, die anhand Tumor-spezifischer Veränderungen bzw. aberranter Signaltransduktionswege verabreicht werden, kommt es zu einem Paradigmenwechsel in der Krebstherapie und man entfernt sich zunehmend vom „One fits all“ Ansatz. Gleichzeitig bedeutet dies, dass die molekulargenetische Diagnostik einen immer größeren Stellenwert zur Charakterisierung onkologischer Erkrankungen bekommt, da genetische Veränderungen, ob Mutationen, Kopienzahlveränderungen, strukturelle oder epigenetische Aberrationen, als Therapieziele herangezogen werden. Eine enge Überwachung der Tumore unter Therapie wird somit immer wichtiger, wobei die klassischen Tumormarker immer mehr an Bedeutung verlieren und von "genetischen" beziehungsweise "molekularbiologischen" Markern abgelöst werden. Im Laufe der Tumorphiliferation sterben immer wieder Tumorzellen ab, deren Genome dann in Form von DNA-Fragmenten, der sog. zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA), in die Blutbahn gelangen. Die Analyse der ctDNA aus dem Blut wird häufig als Flüssigbiopsie (engl. Liquid Biopsy) bezeichnet. Dabei können Veränderungen im Tumorgenom in Echtzeit während des gesamten Therapieverlaufs und darüber hinaus überwacht werden. Dadurch können Kliniker sicherstellen, dass eine relevante Veränderung mit der Therapie erreicht wird und die verabreichte Therapie wirkt. Gleichzeitig können aufkommende Resistenzmechanismen frühzeitig erkannt werden, noch bevor die Progression klinisch manifest wird. Somit könnten den Patienten unnötige Nebenwirkungen erspart bleiben, sobald sie nicht mehr von einer spezifischen Therapie profitieren. Hinzu kommt, dass im Laufe der Progression neue therapierbare Ziele aufkommen können, die ohne eine strenge Überwachung unerkannt bleiben würden. Im Rahmen der Präsentation wird das Potential der zirkulierenden Tumor DNA anhand von Beispielen aus den Praxis diskutiert.

## Genetische Charakterisierung von Paragangliomen und Phäochromozytomen – Wege zur personalisierten Medizin

Laura Geldon<sup>1</sup>, S. Richter<sup>2</sup>, K. Hackmann<sup>1</sup>, E. Betscheva-Krajcir<sup>1</sup>, A. Rump<sup>1</sup>, A. Tzschach<sup>1</sup>, G. Eisenhofer<sup>2,4</sup>, E. Schröck<sup>1,3</sup>, B. Klink<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Genetik, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, <sup>2</sup>Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, <sup>3</sup>Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), Dresden; Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg; Nationales Centrum für Tumorerkrankungen (NCT), Dresden, <sup>4</sup>Medizinische Klinik und Poliklinik III, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden

Phäochromozytome und Paragangliome (PPGL) sind eine genetisch sehr heterogene Gruppe von in der Regel gutartigen Tumoren, was sich in unterschiedlichen (biochemischen) Phänotypen und einem unterschiedlichen klinischen Verhalten widerspiegelt. Bei über 35 % der PPGL-Patienten liegt ein familiäres Tumoprädispositionssyndrom vor, bei jungen Patienten findet man sogar in bis zu 80 % der Fälle eine Keimbahnmutation. Bis heute wurden mehr als 18 PPGL-Suszeptibilitätsgene identifiziert, viele dieser Gene sind in den letzten 5 Jahren bekannt geworden. Jedoch kann nicht in allen Fällen die zugrundeliegende Mutation identifiziert werden und weitere bisher nicht bekannte Krankheitsgene werden vermutet. Die Identifizierung der zugrundeliegenden Veränderung hat eine große Bedeutung für die Betreuung des einzelnen Patienten, aber auch für weitere Familienangehörige. So ist z.B. der Nachweis einer pathogenen Mutation im *SDHD*-Gen mit dem Auftreten maligner PPGLs assoziiert, welche ein hohes Risiko zur Metastasierung haben, sodass eine engmaschige Betreuung der Betroffenen unerlässlich ist.

Aufgrund der genetischen Heterogenität bietet sich für die genetische Diagnostik die Untersuchung mittels NGS-basierter Multi-Genpanelanalyse an. Am Institut für Klinische Genetik wird das TruSight Cancer® Panel von Illumina® für die Untersuchung von PPGL-Patienten hinsichtlich Keimbahnmutationen eingesetzt, welches insgesamt 94 Gene bekannter familiärer Tumorsyndrome enthält. Derzeit etablieren wir die Untersuchung von Tumorgewebe mittels Multi-Genpanels für die Routinediagnostik. Unsere Erfahrungen und mögliche Fallstricke möchten wir anhand von klinischen Fallbeispielen vorstellen. Im Rahmen laufender Forschungsprojekte suchen wir außerdem nach neuen Kandidatengenen bei PPGL-Patienten ohne Nachweis einer Mutation in einem der bekannten PPGL-Suszeptibilitätsgene. Dazu wird sowohl Tumorgewebe als auch Blut mittels Exom-Sequenzierung analysiert und das genetische Profil wird mit biochemischen und metabolischen Daten abgeglichen. Identifizierte Kandidaten werden in funktionellen Studien und vorhandenen Patientenkohorten validiert. Die genetische Stratifizierung von PPGLs ist Grundlage für eine individualisierte Vor- und Nachsorge und soll zu einer verbesserten Betreuung von Patienten mit PPGLs führen.

## **Glioblastoma stem-like cells (GSCs): establishment, marker expression, isolation, and SNP array analyses**

Heidrun Holland<sup>1,2</sup>, M. Wallenborn<sup>1</sup>, P. Ahnert<sup>1,3</sup>, J. Meixensberger<sup>4</sup>, W. Krupp<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universität Leipzig SIKT, <sup>2</sup>Universität Leipzig Medizinische Fakultät, <sup>3</sup>Universität Leipzig IMISE, <sup>4</sup>Universität Leipzig Abteilung für Neurochirurgie

**Objective:** There is ample evidence of a very considerable level of heterogeneity among glioblastomas, more than listed in the current WHO classification system. The cancer stem cell (CSC) model has been proposed as an alternative to explain tumor heterogeneity. Glioblastoma stem-like cells (GSCs) are described to be responsible for tumor initiating, maintaining, chemo- and/or radiotherapy resisting and recurrence due to the stem cell features they carry. The genetic and genomic data of this small group of cells are still limited. Therefore, genetic analyses and genomic profiling should be carried out in further investigations of GSCs. The aim of this ongoing study is to establish, characterize and isolate the GSCs, combined with genetic analyses.

**Material and methods:** Fresh primary glioblastoma tumor tissue and peripheral blood were obtained from patient. Tumor tissue derived explant cell culture (supplemented with serum) and serum-free culture (supplemented with serum-free supplements and growth factors) were established. From the serum-free culture, cell subpopulations were isolated by two stem cell markers CD15 and CD133 through multi-parameter magnetic-activated cell sorting (MACS) technique. The tumor tissue, blood, serum-free culture, marker-positive cells and marker negative cells were sent for SNP array analyses.

**Results:** We have successfully established serum-free culture of five tumor specimens. GSCs in the serum-free culture were preliminarily characterized by the expression of stem cell markers: Nestin, SOX2, and CD133. We established the particular protocol for the separation of the stem cell marker positive and negative cells from the serum-free culture by CD15 and CD133. The result of isolation was confirmed by Flow Cytometry. The following SNP array analyses showed unique genetic profile (tumor tissue and cell subpopulations, e.g. gain of chromosome 7, loss of 10q23.31, loss of 10q11.1->q26.3, and complete loss of chromosome 10), such as distinct genetic differences between the cell subpopulations and tumor tissue (e.g. loss of chromosome 4, and segmental uniparental disomy of 9p24.3->p21.3, only in cancer stem- like cell subpopulations).

**Conclusion:** By increasing the markers for isolation of GSCs, we were able to compare GSCs and related tissues more specifically. The finding of genetic aberrations on GSCs in comparison with tumor tissue and blood can help to further understand the tumor heterogeneity of glioblastoma and may be of help to identify novel potential targets for therapy development.

## **Fall von Muir-Torre-Syndrom mit bisher unpublizierter *MSH2*- Spleissakzeptormutation und ungewöhnlichem intraindividuellem Spektrum extrakolonischer Tumoren**

Dennis Kraemer, T. Herget, S. Azzarello-Burri, A. Baumer, A. Rauch

Institut für Medizinische Genetik, Universität Zürich

Das Muir-Torre-Syndrom (MTS) ist eine sehr seltene Genodermatose mit extrakutanen Manifestationen und gilt als phänotypische Variante des allelischen autosomal-dominanten hereditären nichtpolypösen kolo-rektalen Karzinoms (HNPCC, Lynch-Syndrom). Bezüglich der Ätiopathogenese des MTS dominieren bei weitem Keimbahnmutationen des Mismatch-Reparatur-Gens *MSH2*, gefolgt von germinalen *MLH1*-Mutationen. Als charakteristische Markerläsionen des MTS werden multiple benigne und maligne Talgdrüsentumoren beschrieben; unter den extrakutanen Läsionen werden bei der Hälfte der MTS-Patienten kolorektale Karzinome gesehen und in absteigender Frequenz treten Karzinome des Endometriums, des hepatobiliären Systems und des Urothels sowie Hirntumoren auf, seltener Mammakarzinome und myeloproliferative Neoplasien.

Wir berichten von einer 82-jährigen Patientin mit molekulargenetisch gesichertem MTS mit Manifestation multipler metachroner extrakutaner Tumoren und rezidivierenden Talgdrüsenadenomen mit Zellatypien. Bei der Patientin wurden ein Colon-ascendens-Karzinom (Dukes BII), ein multilokuläres rezidivierendes Blasenkarzinom, ein Mammakarzinom (pT2 N0), ein papilläres Nierenbeckenkarzinom sowie ein malignes Melanom (pT1a) operativ therapiert. Zwischenzeitlich wurde bei der Indexpatientin ein Lungenkarzinom mit bis anhin weitgehend stabilem Verlauf diagnostiziert. Vereinbar mit der Diagnose eines MTS ergab die molekularpathologische Begutachtung schließlich im letzten Jahr nach Exzision der anamnestisch schon länger bestehenden Talgdrüsenadenome einen immunhistochemischen Expressionsverlust von *MSH2* und *MSH6* bei *MLH1*-Positivität, die Mikrosatellitenanalyse zeigte Instabilitäten in 4/5 untersuchten Markern (MSI-H-Phänotyp). Als molekulargenetisches Korrelat konnten wir mittels Next-Generation-Sequencing (NGS)-basierter (TruSight Cancer, MiSeq-Plattform, Illumina) Multi-Gen-Paneldiagnostik in der Keimbahn eine bis anhin noch nicht publizierte Spleissakzeptormutation am Intron-Exon-Übergang 15 (NM\_000251.2) des *MSH2*-Gens identifizieren, die möglicherweise zum Skipping des betroffenen Exons 15 führt. Familienanamnestisch ließ sich bei der Schwester der Indexpatientin ein vergleichbarer, mit einem Lynch-Syndrom vereinbarer klinischer Verlauf mit der Manifestation mehrerer HNPCC-assoziiierter Tumorentitäten und beim frühverstorbenen Vater eine Darmkrebserkrankung eruieren.

Im Fall der vorgestellten Patientin imponiert das MTS durch ein ungewöhnliches, unserem Wissen nach in dieser Form bisher nicht beschriebenes intraindivuelles Spektrum multipler extrakolonischer Tumoren. Weitere Analysen zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation sind intendiert.

## T cell acute lymphoblastic leukemia in a boy with a maternally inherited 6q duplication encompassing the *MYB* gene

Katrin Nebral<sup>1,2,3</sup>, M. König<sup>1,2</sup>, G. Pass<sup>1,2</sup>, G. Kropshofer<sup>4</sup>, R. Crazzolaro<sup>4</sup>, O. A. Haas<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>St. Anna Kinderkrebsforschung, <sup>2</sup>CCRI, <sup>3</sup>medgen.at GmbH, <sup>4</sup>Department für Kinder- und Jugendheilkunde, Medizinische Universität Innsbruck

A variety of constitutional syndromes and genetic abnormalities increase the risk for neoplastic diseases in children. Many enlightening examples already illustrate that investigating specific associations not only provide important insights into the disease process itself but also into the physiological routes of normal development.

Along this line we present the case of a five years old boy with a T-ALL. In addition to several other abnormalities, cytogenetic analysis revealed a deletion 6q, which is found in approximately 20 to 30% of such cases. Confusion arose when the referral center subsequently informed us that the boy had inherited a partial duplication 6q from his mother. This duplication contained also the *MYB* gene, which is an essential regulator of hematopoiesis and especially T-cell differentiation and proliferation. Moreover, somatic duplications of this gene are found in approximately 8% of T-ALLs and define a sub-form that preferentially occurs in young children. We therefore set out to investigate this case in more detail, on the one hand to resolve these discrepant findings and, on the other hand, to evaluate *MYB* copy numbers and their allelic distribution in the leukemic cells.

Analysis of leukemic as well as normal cells were performed with Affymetrix CytoScan® HD and Illumina's HumanCytoSNP arrays, respectively. The size of the constitutional 6q22.31q24.1 duplication was approximately 21 Mb and encompassed overall 114 annotated genes. In addition to this specific duplication we identified in the leukemic cells also acquired alterations, namely a 10p15.3p11.21 duplication and five heterozygous deletions, comprising an approximately 60 Mb large one at 6q12q22.1, and four others at 7q34q36.3, 10q25.2q26.3, 11q14.1q14.3 and 14q23.1q32.2. The region 14q11.2q23.1 contained altogether 16 chromothripsis-like segments in which the copy numbers fluctuated three- to five-fold. This complex change together with the 7q deletion probably occurred during the formation of a cytogenetically visible t(7;14). We clarified the allelic relationship of the two chromosome 6 copy number aberrations on metaphase spreads with FISH probes that were able to identify and distinguish the deleted and the duplicated regions. These analyses revealed that the leukemia-associated deletion affected the non-duplicated chromosome 6 and therefore the paternal homologue.

In summary, we were able to successfully allocate the constitutional and the acquired chromosome 6 copy number changes and thereby also to prove that the additional copy of the *MYB* gene was retained in the leukemic cells. Although unproven and highly speculative but given all the circumstantial evidence and role of the *MYB* gene one could nevertheless envision that the presence of an extra copy in the germline may still have triggered leukemia development in this instance. On a more practical level, this instructive case also teaches us not only that constitutional abnormalities may easily be mistaken in complexly rearranged karyotypes but also that one always needs to take into account the possibility of preexisting constitutional variants or abnormalities when interpreting "obvious" array and FISH results.

## Identifizierung einer neuen prognostischen Gruppe bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung im Rahmen der ALL-BFM Studie

Frederik Heldt<sup>1</sup>, A. Schienke<sup>1</sup>, J. Ebersold<sup>1</sup>, M. Meyer<sup>1</sup>, G. Cario<sup>2</sup>, M. Stanulla<sup>3</sup>, D. Steinemann<sup>1</sup>, M. Schrappe<sup>4</sup>, B. Schlegelberger<sup>1</sup>, G. Göhring<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Humangenetisches Institut, Medizinische Hochschule Hannover, <sup>2</sup>Klinik für Allgemeine Pädiatrie – Campus Kiel, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, <sup>3</sup>Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover, <sup>4</sup>Klinik für Allgemeine Pädiatrie – Campus Kiel, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

**Einführung:** Ohne charakteristische (zyto-)genetische Marker ist die Stratifizierung kindlicher ALL in Risiko-Gruppen in der Regel schwierig. Um die Stratifizierungskriterien zu verbessern, ist die Identifikation neuer Marker von größter Bedeutung. 2009 wurde eine *BCR-ABL1*-like ALL Subgruppe identifiziert, welche charakterisiert ist durch ein Expressionsmuster ähnlich dem der *BCR-ABL1+* ALL. Ca. 15% der Kinder mit prä-B ALL können dieser neuen „high risk“ Gruppe zugeordnet werden. Ziel dieser Arbeit ist es, diese Gruppe mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zu detektieren.

**Material und Methoden:** Eine Kohorte von 100 B-Other Patienten der ALL-BFM Studie wurde retrospektiv identifiziert. Die Kriterien der B-Other Gruppe war der Ausschluss von Patienten mit den Translokationen *t(9;22)(q34;q11)*, *t(12;21)(p13;q22)* und *t(4;11)(q21;q23)* oder Hypodiploidie. In einem Vorscreening wurden bereits Patienten mit *CRLF2*-Translokation identifiziert. Die hier zu untersuchende Kohorte enthielt somit B-Other Patienten ohne *CRLF2*-Translokation. FISH Sonden für *IGH* und *PDGFRbeta* waren kommerziell erhältlich (Abbott Molecular und KreaTech). Sonden zur Detektion von Translokationen von *JAK2*, *ABL1*, *ABL2* und *EPOR* wurden gemeinsam mit internationalen Referenzlaboratorien der ALL-BFM Studie als Break-Apart Sonden nach den in der Literatur beschriebenen Translokationen entworfen. FISH-Analysen wurden nach diagnostischem Standard an vital eingefrorenen Zellen durchgeführt. Es wurden die Cut-off Level für alle Sonden an vital weggefrorenen Zellen sowie an in Methanol-Eisessig fixierten Zellen bestimmt. Zur Auswertung der Signale wurde ein Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Deutschland) benutzt und es wurden 200 Zellen pro FISH Probe analysiert.

**Ergebnis:** Die Cut-off Level aus fixierten Zellen lagen für die Sonden für *PDGFRbeta*, *ABL1*, *ABL2*, *JAK2*, *EPOR* und *IGH* jeweils bei 5%, 10%, 4%, 6%, 8% und 7%. Cut-off Level aus vital weggefrorenen Zellen lagen für die Sonden für *PDGFRbeta*, *ABL1*, *ABL2*, *JAK2*, *EPOR* und *IGH* jeweils bei 10%, 12%, 11%, 14%, 27% und 15%. Somit waren alle Cut-off Level für die FISH-Sonden an den vital weggefrorenen Zellen um ein vielfaches höher als an in Methanol-Eisessig fixierten Zellen. 8/100 (8%) der Patienten zeigten eine Translokation der untersuchten Gene. Jeweils ein Patient konnte mit *PDGFRbeta*, *ABL2* und *JAK2*-Translokation identifiziert werden, zwei Patienten zeigten eine Translokation in *ABL1* und drei Patienten in *IGH*. Weiterhin zeigten etwa die Hälfte der Patienten eine abweichende Signalkonstellation hinweisend auf eine Hyper- bzw. Hypodiploidie.

**Diskussion:** Ziel ist es, eine neue prognostisch relevante Gruppe von Kindern innerhalb der ALL-BFM Studie mittels FISH zu identifizieren. Diese Patienten sind eventuell sensitiv gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren. Nachdem dieser Ansatz validiert wurde, könnte er in die Zytogenetische Routinediagnostik implementiert werden, um B-Other ALL Patienten zu identifizieren mit dem finalen Ziel die Stratifizierung zu unterstützen und potentiell das Outcome von Kindern mit ALL weiter zu verbessern.



## Prädispositionssyndrome bei kindlichen Leukämien/Tumorerkrankungen

Christian P. Kratz

Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg Str. 1, 30625 Hannover

In Deutschland erkranken pro Jahr etwa 2000 Kinder und Jugendliche an Krebs. Trotz erheblicher Fortschritte in der kinderonkologischen Forschung bleiben Krebsrisikofaktoren in dieser Altersgruppe weitestgehend unklar. Eine Ausnahme bilden genetische Keimbahn-Varianten, die ursächlich an der Krebsentstehung beteiligt sind. Mittlerweile sind über 100 Krebs-Prädispositions-Gene (KPG), die zugleich ein definiertes Krebs-Prädispositions-Syndrom (KPS) verursachen, identifiziert worden. In ersten Studien zeigte sich, dass Keimbahnveränderungen in KPGs häufiger sind, als bisher angenommen. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl von Neoplasien im Kindes- und Jugendalter und Beispiele relevanter KPG. Bei allen Krebserkrankungen finden sich zudem somatische Mutationen, die das pathologische Verhalten der Krebszellen determinieren und zunehmend klinische Bedeutung als diagnostische und prognostische Marker sowie therapeutische Zielstrukturen bekommen.

**Tabelle 1.** Beispiele von Krebsarten im Kindes- und Jugendalter und ausgewählte prädisponierende Faktoren

Diagnose	Beispiele prädisponierender Faktoren
Akute lymphatische Leukämie	Trisomie 21, <i>TP53</i> , <i>ETV6</i> , <i>PAX5</i> , <i>ATM</i> , <i>NBS</i>
Akute myeloische Leukämie	Trisomie 21, <i>RUNX</i> , <i>CEBPA</i>
Myelodysplastisches Syndrom	<i>GATA2</i>
Juvenile myelomonozytäre Leukämie	<i>NF1</i> , <i>CBL</i> , <i>PTPN11</i> , <i>KRAS</i>
Medulloblastom	<i>SUFU</i> , <i>TP53</i> , <i>APC</i> , <i>BRCA2</i> , <i>PTCH1</i>
Glioblastom	<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>PMS2</i> , <i>TP53</i> (Strahlentherapie-induziertes Glioblastom)
Pilozytisches Astrozytom	<i>NF1</i>
Osteosarkom	<i>TP53</i>
Neuroblastom	<i>ALK</i> , <i>PHOX2B</i>
Nephroblastom	<i>WT1</i> , <i>REST</i>
Rhabdomyosarkom	<i>TP53</i> , <i>DICER1</i> , <i>HRAS</i> , <i>PTCH1</i>
Rhabdoid Tumor	<i>SMARCB1</i> , <i>SMARCA4</i>
Pleuropulmonales Blastom	<i>DICER1</i>
Zystisches Nephrom	<i>DICER1</i>
Hepatoblastom	<i>APC</i>
Retinoblastom	<i>RB1</i>

Die meisten KPG agieren als Tumorsuppressorgene und tragen inaktivierende Mutationen, jedoch sind inzwischen auch aktivierende Keimbahnmutationen in Onkogenen bekannt (z.B. *HRAS*, *RET*). Einige DNA-Reparaturgene (FANC Gene, MMR Gene) agieren sowohl als dominante als auch als rezessive KPG, je nachdem, ob ein oder beide Allele in der Keimbahn mutiert sind. Das Neoplasiespektrum unterschiedlicher KPG variiert erheblich und einige Mutationen führen zu einem breiten Krebspektrum (z.B. *TP53*), andere erhöhen das Risiko für nur eine Neoplasieart (z.B. *PAX5*). Das präzise Krebsrisiko variiert ebenfalls erheblich und ist oftmals nur unzureichend untersucht. Besonders sollte in folgenden Situationen an ein KPS gedacht werden: (1) bei Patienten mit familiärer Krebshäufung, (2) bei Patienten mit spezifischen Krebsmerkmalen (z.B. Isochromosom 7 beim Shwachman Diamond Syndrom), (3) adulten Krebsarten (z.B. Darmkrebs) bei Kindern, (4) seltenen Tumoren sowie (5) Vorliegen anderer physischer Veränderungen. Das Wissen um KPG ist klinisch hoch relevant, da die optimale Versorgung der Betroffenen durch die Mutation beeinflusst wird.

## A FISH and array based diagnostic strategy for the comprehensive assessment of genetic abnormalities in childhood ALL

Katrin Nebral<sup>1,2,3</sup>, M. König<sup>1,2</sup>, S. Haslinger<sup>1,2,4</sup>, A. Inthal<sup>1,2</sup>, A. Attarbaschi<sup>5</sup>, G. Mann<sup>5</sup>, O. A. Haas<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup>St. Anna Kinderkrebsforschung, <sup>2</sup>CCRI, <sup>3</sup>medgen.at GmbH, <sup>4</sup>Labdia Labordiagnostik GmbH, <sup>5</sup>St. Anna Kinderspital, Medizinische Universität Wien

In childhood ALL the detailed definition of genomic alterations is not only an indispensable prerequisite for its predictive and prognostic subdivision but increasingly also one, on which individualized treatment approaches are based on.

Apart from the already well established genetic categories, the recent identification of several classes of potentially relevant genomic features together with novel therapeutic options makes it necessary to rethink and adapt our current diagnostic analytical tools with the aim to better serve the ensuing clinical needs. The two classes of genomic features emerging lately that are of particular interest in this context are the therapeutically targetable rare and heterogeneous but recurrent tyrosine kinase and *JAK2*-pathway activating gene fusions and the more elusive cohort of patients with vaguely defined combinations of lesions - mainly in form of gene region-specific copy number alterations (CNA) – being potentially considered for elevated risk of relapse. We recently proposed that these diagnostic requirements nowadays are best covered with a systematic hierarchical FISH screening for the identification of all relevant gene fusions together with array (combined SNP and non-polymorphic probes) analyses of multi-level CNA.

We have evaluated the feasibility of such a workflow in a prospective manner in so far 60 cases. They comprise 52 newly diagnosed and three relapsed BCP- as well as five TCP-ALL patients. Taken together we were able to unambiguously subcategorize all cases. FISH screening was positive in 54/60 cases and provided already the most essential diagnostic clues in most of them. Of note, three of four FISH-negative BCP-ALL cases had an *IKZF1* deletion and two FISH-negative TCP-ALLs harbored small deletions in either *LEF1* or *PTEN*. CNA were identified in all but one case that had a *KMT2A(MLL)-AFF1* gene fusion. Array analysis was indispensable for the exact definition of CNA, including ploidy patterns, secondary abnormalities as well as distinct submicroscopic changes that otherwise would have been impossible to ascertain efficiently to such an extent in a simultaneous fashion with any other method. *IKZF1* deletions were identified in altogether nine cases, one each with a *BCR-ABL1*, *MLL-AFF3* and *ETV6-RUNX1* fusion as well as in six "B-other" cases (among them one each *P2RY8-CRLF2* and *IGH* rearranged one), four of which also harbored additional B-cell development associated gene deletions. Some of the other noteworthy relevant abnormalities comprise dic(9;20), *PAX5*-rearranged, *PAX5*-amplified and *ERG*-deleted cases. Specific abnormalities that were encountered in the TCP-ALL included one case each with a *MYB* duplication, an *ABL1* fusion with an unidentified partner, a *PTEN* and *LEF1* deletion and a pseudotetraploid karyotype. In all instances, cytogenetic preparations served as backup. Metaphase spreads were merely used for further FISH clarification of otherwise unresolvable complex rearrangements or ploidy patterns.

In consideration of the amount of achievable information, the proposed approach has also several additional advantages. Both procedures require only little amount of material, are highly standardized, reproducible, and robust technologies. Arrays deliver DNA-sequence-based data, the coordinates of which can be efficiently stored, processed, and analyzed. As such, they not only serve as pure diagnostic but also as discovery platforms.

Unser besonderer Dank gilt den Sponsoren

Platin Sponsor:



Gold-Sponsoren:



**Abbott**



**Agilent Technologies**



MetaSystems



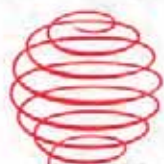
**BECKMAN  
COULTER**

*Life Sciences*



NOVARTIS  
ONCOLOGY

Silber-Sponsoren:



ARIAD®



**PAN**™  
**BIOTECH**

	Tecan	9.000 €	Vortrag, Messestand, Exklusiv-Sponsor des "BBQ mit Diskussion"
	Beckman Coulter	5.000 €	Vortrag, Messestand
	MetaSystems	5.000 €	Vortrag, Messestand
	Abbott	4.000 €	Messestand, Flyer
	Agilent Technologies	4.000 €	Messestand, Flyer
	Agilent Life Science and Diagnostics Group LDG		
	Novartis	4.000 €	Messestand, Flyer
	Roche	4.000 €	Anzeige im Abstractbook
	Zeiss	4.000 €	Messestand, Flyer
	Thermo Fisher	3.750 €	Vortrag, Messestand
	Alphamatrix	3.000 €	Messestand
	Zytomed	3.000 €	Messestand
	Affymetrix	2.500 €	Vortrag

 ARIAD®	Ariad	2.500 € Flyer
	Celgene	2.500 € Flyer
	Pan Biotech	2.500 € Flyer
	AHF	2.000 € Messestand
	Cytocell	2.000 € Messestand
	Illumina	2.000 € Messestand
	Miltenyi Biotec	2.000 € Messestand
	Stefan-Morsch-Stiftung	2.000 € Messestand, Flyer
	Leica	2.000 € Messestand
	ADS Biotec	1.550 € Messestand
	NuGEN Technologies	1.500 € Messestand
	Sarstedt	800 € Tagungstaschen