

TGA 2017 • Tumorgenetische Arbeitstagung

Akademie Humangenetik
Eine Einrichtung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik e.V.

Programm



TCA 2017 Zweibrücken

15.-17.6.2017

Tagung spr äsi dentin

Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat
Forschungslabor der Klinik
für Neurochirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes
und Medizinische Fakultät
der Universität des Saarlandes
Gebäude 30
66421 Homburg
Tel: 0049 (0)6841-16 2663 5
steffi.urbschat@uniklinikum-saarland.de

Wir danken den Sponsoren und Spendern für die freundliche Unterstützung der TGA 2017

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

Tagungsort

Festhalle Zweibrücken
Saarlandstraße 9
66482 Zweibrücken
Tel. 06332 - 80033 0
www.festhalle-zweibruecken.com

Tagungsorganisation

Dr. Christine Scholz (Leitung)
Deutsche Gesellschaft
für Humangenetik e. V.
Inselkammerstraße 5
82008 München-Unterhaching
organisation@gfhev.de

Informationen

www.tumorgenetische-arbeitsstagung.de

	Firma	Sponsoring	Leistung
	Abbott GmbH & Co. KG	2.500,00 €	Messestand, Vortrag
	ADS Biotec Ltd.	2.500,00 €	Messestand, Vortrag
	Agilent Technologies	1.500,00 €	Messestand
	AHF analysentechnik AG	1.500,00 €	Messestand
	AlphaMetrix Biotech GmbH	1.500,00 €	Messestand
	Cytocell Ltd.	1.500,00 €	Messestand
	MetaSystems Probes GmbH	2.500,00 €	Messestand, Vortrag
	Miltenyi Biotec GmbH	1.500,00 €	Messestand
	Roche Diagnostics Deutschland GmbH	2.500,00 €	Messestand, Vortrag
	Tecan Deutschland GmbH	1.500,00 €	Messestand
	ZYTOMED Systems GmbH	1.500,00 €	Messestand

Liebe Kolleginnen und Kollegen,

es ist mir eine besondere Freude, Sie als Gastgeberin der 30. Tumorgenetischen Arbeitstagung begrüßen zu dürfen. Als Veranstaltungsstätte habe ich einen Ort ausgewählt, an dem sich drei Kulturen treffen: die saarländische und pfälzische Lebensfreude sowie das französische „savoir vivre“. Wenn unmittelbar vor den legendären „Rosentagen“ der Duft von über 45.000 Rosen die Stadt erfüllt, heiße ich Sie herz(og)lich Willkommen in Zweibrücken der Stadt des Barocks, der Rosen und Rosse.

Auch für **2017** haben wir wieder ein interessantes Programm geplant mit dem seit vielen Jahren vertrauten Ablauf: wissenschaftliche Übersichtsvorträge, Vorträge über eigene Forschungsarbeiten, Fallbeispiele, Vorträge aus der Industrie und der beliebte MTA-Workshop

Darüber hinaus gibt es dieses Mal allen Grund zum Feiern: Zum 30. Mal jährt sich unsere Arbeitstagung und darüber hinaus wird die Arbeit, die das „Flomburger Forschungsleben“ bis heute prägt, 50 Jahre alt: *lang KD, Singer H: Chromosomal constitution of meningiomas. Nature 216:84-85,1967*. Deshalb werden wir den Meningeomen einen eigenen Workshop widmen.

Für den Freitagabend ist dann unsere 30th Birthday Party geplant.

Es freut mich ganz besonders, dass Prof. Dr. Klaus D. Zang, ehemaliger Leiter der human-genetischen Einrichtung in Flomburg/Saar, langjähriger Kollege und wissenschaftlicher Weggefährte von Prof. Dr. Dr. Lore Zech, den Lore-Zech-Preis überreichen wird.

Ich freue mich auf eine spannende wissenschaftliche Tagung mit vielen inspirierenden Diskussionen und freundschaftlichen Begegnungen.

Ihre



Steffi Urbschat

*Forschungslabor der Klinik für Neurochirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes und Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes*

Programmablauf

Änderungen Vorbehalten

Legende: ♦ = Vortragende(r) bewirbt sich für den TGA-Vortragspreis

**Donnerstag
15. Juni**

**Tagungsort: Festhalle Zweibrücken
Heinrich Gauf Saal // Foyer der Festhalle**

ab 13:00

Anreise und Registrierung

Mittagsimbiss

14:30

Begrüßung
Prof. Dr. med. Joachim Oertel
und
Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat,
Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum des
Saarlandes
und Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes

Vorprogramm

15:00 - 16:00

Firmenpräsentationen

Vorsitz: Dr. rer. nat. Sönke Arps, Hamburg
Dr. med. Thomas Martin, Homburg/Saar

15:00 - 15:15

- **Cytogenetics Automation, Year 2017**
Dr. Dani Klein, Abbott GmbH & Co. KG

15:15 - 15:30

- **Kundeninitiierte FISH-Sondenentwicklung
bei der MetaSystems Probes GmbH**
Dr. Thorsten Belz, MetaSystems Probes GmbH

15:30 - 15:45

- **Roche Sequencing Solutions: Today and Tomorrow**
Dr. Gregor Obernosterer,
Roche Diagnostics Deutschland GmbH

15:45 - 16:00

- **Automatisierung der Karyotypisierung und FISH -
Alles aus einer Hand**
Dr. Joachim Fischer, ADS Biotec Ltd.

16:00-16:30

Kaffeepause // Besuch der Industrieausstellung im Foyer der
Festhalle und Wintergarten

Hauptprogramm

16:30 - 17:35

Meeting 1 - Qualitätssicherung Ringversuche

Vorsitz:
Dr. rer. nat. Simone Heidemann,
Institut für Tumorgenetik Nord, Kiel
Prof. Dr. med. Harald Rieder,
Institut für Humangenetik, Düsseldorf

16:30 - 16:45

Ergebnisse der Ringversuche Tumorzytogenetik
Prof. Dr. med. Harald Rieder, Düsseldorf

- 16:45 - 17:00** Ergebnisse der Ringversuche FISH-Analyse
PD Dr. med. Claudia Haerlach,
Münchner Leukämie Labor GmbH, München
- 17:00 - 17:15** Bedeutung von Ringversuchen für akkreditierte Labore
Dr. rer. nat. Simone Heidemann, Kiel
- 17:15 - 17:35** Über 10 Jahre Ringversuche zur Chromosomenbandenanalyse
in der Leukämiezytogenetik - was haben wir gelernt?
Prof. Dr. med. Harald Rieder, Düsseldorf
- 17:35-18:00** Pause // Besuch der Industrieausstellung im Foyer der Festhalle
und Wintergarten
- 18:00 - 19:00** **Gastvortrag: "Mehr geliefert als bestellt?" -
Ethische Aspekte unerwarteter genetischer Befunde**
Prof. Dr. med. Wolfram Henn,
Institut für Humangenetik, Homburg/Saar
- ab 19:30** **Get together im Valentins Wirtshaus**
(an der Schließ, nahe des Rosengartens)
Geschwister-Scholl-Allee 13

Freitag 16. Juni 2017

- 8:30 - 8:45** **Das Tagungschromosom 22**
Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h.c. Nikolaus Blin,
Abtlg. Molekulare Genetik, Institut für Humangenetik,
Universität Tübingen
- 8:45 - 10:00** **Meeting 2 - Bedeutung der microRNA (miRNA) bei Diagnose
und Behandlung von Tumorerkrankungen**
Vorsitz:
Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese,
Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes,
Homburg/Saar
Dr. rer. nat. Silke Wemmert,
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum
des Saarlandes und Medizinische Fakultät der Universität des
Saarlandes, Homburg/Saar
- 8:45 - 9:15** **Übersichtsreferat:**
**Zur Aussagekraft von Analysen der miRNome bei Tumor-
erkrankungen**
Eckart Meese, Homburg/Saar
- 9:15 - 9:30** Identifizierung unbekannter Partner bei Leukämien mit seltenen
Translokationen mittels RNA Sequenzierung
Claudia Haerlach, München
- 9:30 - 09:45** Therapieerfolg einer Carmustin Wafer Implantation bei
Glioblastompatienten wird von der miRNA-181d vorhergesagt
Christoph Sippl, Homburg/Saar
- 9:45 - 10:00** Exosomale miRNAs: Bedeutung für invasive
Harnblasenkarzinome
Sophie Baumgart, Homburg/Saar
- 10:00-10:30** Kaffeepause // Besuch der Industrieausstellung

10:30-12:00	Meeting 3 - Akute Leukämien: Nur viele Methoden führen zum Ziel Vorsitz: Prof. Dr. med. Claudia Haferlach, MLL, München Dr. rer. medic. Brigitte Mohr, Medizinische Klinik und Poliklinik 1, Zytogenetiklabor, Universitätsklinikum Dresden
10:30 - 10:45	Übersichtsreferat: Aktuelle Empfehlungen zur Diagnostik der AML Claudia Haferlach, München
10:45 - 11:00	FISH an Knochenmarkausstrichen als zusätzliche Option im Monitoring von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie Brigitte Mohr, Dresden
11:00 - 11:15	ZNF384 positive BCP-ALL Fälle der österreichischen ALL Therapiestudien Sabrina Haslinger, Wien
◆:	Umfassende Strategie der (molekular)zytogenetischen Analyse der AML im Kindesalter Karin Nebral, Wien
11:15 - 11:30	Nachweis minimaler Resterkrankung bei AML: Vergleich dreier PCR-Methoden zur Typen-spezifischen Quantifizierung von NPM1-Mutationen Christian Paar, Linz
◆:	Varianten der Translokation t(8;21): Zwei Fallbeispiele Katharina Rittscher, Göttingen
11:30 - 11:45	Mittagsimbiss im Foyer der Festhalle // Besuch der Industrieausstellung Pause
11:45 - 12:00	Meeting 4 - Jubiläumsmeeting Vorsitz: Prof. Dr. Klaus D. Zang, Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar und Prof. Dr. Gundula Thiel, Praxis für Humangenetik, Berlin
12:00-13:00 13:00-14:00	50 Jahre Monosomie 22 - From Bench to Bedside Prof. Dr. med. Ralf Ketter, Neurochirurgische Intensivstation, Neuroonkologie, Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes und Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
14:15 - 15:00	Genetische Analysen an Glioblastom-stammzellartigen Zellen und Glioblastom-Gewebe unter Anwendung von SNP Array und Genexpression Heidrun Holland, Leipzig
14:15 - 14:30	Veränderter Metabolismus und erhöhte Abhängigkeit von NAD ⁺ -Regeneration im IDH1 R132H editierten in vitro Gliom-Modell Matthias Lehmann, Dresden
14:30 - 14:45	

Parallelmeetings // Science to Business Meeting // mit integrierten Kaffeepausen

15:15 - 16:15 (geschlossene Sitzung)	Sitzung der GfH Kommission Somatische Tumorgenetik
15:15 - 16:15	MTA-Sitzung im Heinrich-Gauf-Saal
15:15 - 16:15	Science to Business Meeting (S2B) im Foyer

Gemeinsam weiter im Heinrich Gauf Saal

- 16:20 - 17:00** **Verleihung des Lore Zech Preises**
 durch Prof. Dr. med. Klaus D. Zang,
 Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes,
 Homburg/Saar und anschließend
Vortrag des Preisträgers Dr. Reza Abbasi
- 17:00 - 18:00** **Gastvorträge: Nomenklatur der Hirntumore**
 Dr. med. Felix Sahm,
 Neuropathologie des Universitätsklinikums Heidelberg
- Nomenklatur der hämatologischen Neoplasien**
 Prof. Dr. med. Wolfram Klapper,
 Sektion für Hämatopathologie und Lymphknotenregister,
 Institut für Pathologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
 Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
- ab 18:00 Tagungsfoto
- ab 20:00 Abendveranstaltung: festliches Essen im Heinrich-Gauf-Saal

Samstag 17. Juni 2017

- 8:30 - 9:15** **Meeting 5 - Molekulare (Zyto-)Genetik Solider Tumoren**
 Vorsitz:
 Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat, Homburg/Saar
 Prof. Dr. med. Oskar Haas, Wien
- 8:30 - 8:45 Die Performance der DNA-Polymerasen - ein scheinbar
 relevanter Faktor für die Variationen der Allelfrequenz?
 Sascha Dierks, Göttingen
- 8:45 - 9:00 Tumordisposition in syndromalem Kontext - retrospektive
 monozentrische Analyse des Mutations- und Phänotyp-
 spektrums beim pädiatrisch manifesten PTEN-Hamartom-
 Tumor-Syndrom
 Dennis Kraemer, Zürich
- 9:00 - 9:15 Identische BRIP1 Deletion in zwei nicht verwandten Familien
 mit familiärem Brustkrebs
 Laura Geldon, Dresden
- 9:15-9:45 Kaffeepause// Besuch der Industrieausstellung

9:45 - 11:30	Meeting 6 - Außergewöhnliche Befunde in der Diagnostik von hämatologischen Neoplasien Vorsitz: Dr. med. Lana Harder, Kiel Dr. agr. Antje-Friederike Pelz, Magdeburg
9:45 - 10:00	Fallbeispiel einer Philadelphia-Translokation und BCR-ABL1 FISH positiven CML ohne molekulare Nachweisbarkeit eines der häufigen Fusionstranskripte Martin Erdel, Linz
10:00 - 10:15	Molekulargenetische Charakterisierung von myeloischen Neoplasien mit isolierter 7q Deletion Luise Hartmann, München
10:15 - 10:30	Genetische Evolution durch kryptische Anomalien beim MDS: 4 Fallbeispiele Christina Ganster, Göttingen
10:30 - 10:45	Bei MDS liefert die Hochdurchsatzsequenzierung an CD34+ zirkulierenden Blutzellen und Knochenmarkzellen vergleichbare Ergebnisse Roman Martin, Göttingen
10:45 - 11:00	Chromosomen Insertionen bei 2 Patienten mit CLL Katayoon Shirneshan, Göttingen
11:00 - 11:15	Bedeutung von 1p Deletionen bei Myelodysplastischen Syndromen und sekundären AML nach MDS Janine Müller, München
11:15 - 11:30	Oktasomie 21 bei einem Patienten mit sekundärer AML nach CMML: die Rolle von erworbenen NRAS Mutationen in der Entstehung von Aneuploidie Kathrin Thomay, Hannover
11:30 - 12:45	Abschlussveranstaltung Abstimmung Vortragspreis Tagungsrückblick 2017 Vorschau TGA 2018 Verleihung Vortragspreis Danksagung und

12:45 **Ende der Tagung**

ab 13:00

Es besteht die Möglichkeit zum Mittagessen im Rosengartenhotel auf Selbstzahlerbasis

oder ab 13:00

Es besteht auch die Möglichkeit zum Shopping im Designer Outlet Center Zweibrücken evtl. Bustransfer vom Rosengartenhotel; Mittagessensmöglichkeit im Outlet Center Zweibrücken auf Selbstzahlerbasis. Öffnungszeiten samstags bis 19 Uhr.



Dr. M. Reza Abbasi

CCRI, Children's Cancer Research Institute, St. Anna, Kinderkrebsforschung, Zimmermannplatz 10, A-1090 Vienna, Austria (reza.abbasi@ccri.at)

1997 - 2005: MD: Zahedan University of Medical Science, Zahedan, Iran.
Thesis: Association between Chlamydia pneumoniae, Cytomegalovirus and Helicobacter pylori seropositivity; and coronary heart disease and cardiovascular risk factors.

2011 - 2016: PhD: Medical University of Vienna, Children's Cancer Research Institute, Vienna, Austria (Clinical and Experimental Oncology).
Thesis: Genomic analysis of bone marrow-derived disseminated neuroblastoma cells

2011 - present: Postdoc Children's Cancer Research Institute (CCRI), Vienna, Austria

Der Lore Zech-Preis wird verliehen für die Arbeit

Impact of disseminated neuroblastoma cells on the identification of the relapse-seeding clone

M. Reza Abbasi¹, Fikret Rifatbegovici, Clemens Brunnen, Georg Manm, Andrea Zieglen, Ulrike Pötschgen, Roman Crazzolar³, Marek Ussowicz⁴, Martin Beneschs, Georg Ebetsberger-Dachs⁶, Godfrey C.F. Cham, Neil Joness, Ruth Ladensteim,⁹ Inge M. Ambrosi, Peter F. Ambrosia

- 1 CCRI, Children's Cancer Research Institute, Vienna, Austria;
- 2 St. Anna Children's Hospital, Vienna, Austria;
- 3 Department of Pediatrics, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria;
- 4 Department of Pediatric Hematology and Oncology, Wroclaw Medical University, Wroclaw, Poland;
- 5 Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria;
- 6 Department of Pediatrics, Kepler University Clinic Linz, Linz, Austria;
- 7 Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, University of Hong Kong, Hong Kong;
- 8 Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Paracelsus Medical University, Salzburg, Austria;
- 9 Department of Pediatrics, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

Purpose: Tumor relapse is the most frequent cause of death in stage 4 neuroblastomas. Since genomic information on the relapse precursor cells could guide targeted therapy, our aim was to find the most appropriate tissue for identifying relapse-seeding clones.

Experimental design: We analyzed 10 geographically and temporally separated samples of a single patient by SNP array and validated the data in **154** stage 4 patients.

Results: In the case study, aberrations unique to certain tissues and time points were evident besides concordant aberrations shared by all samples. Diagnostic bone marrow-derived disseminated tumor cells (DTCs) as well as the metastatic tumor and DTCs at relapse displayed a 1q deletion, not detected in any of the seven primary tumor samples. In the validation cohort, the frequency of 1q deletion was 17.8%, 10%, and **27.5%** in the diagnostic DTCs, diagnostic tumors, and DTCs at relapse, respectively. This aberration was significantly associated with 19q and ATRX deletions. We observed a significant increased likelihood of an adverse event in the presence of 19q deletion in the diagnostic DTCs.

Conclusions: Different frequencies of 1q and 19q deletions in the primary tumors as compared with DTCs, their relatively high frequency at relapse, and their effect on event-free survival (19q deletion) indicate the relevance of analyzing diagnostic DTCs. Our data support the hypothesis of a branched clonal evolution and a parallel progression of primary and metastatic tumor cells. Therefore, searching for biomarkers to identify the relapse-seeding clone should involve diagnostic DTCs alongside the tumor tissue.

Abbasi MR, Rifatbegovic F, Brunner C, Mann G, Ziegler A, Pötschger U, et al. Impact of Disseminated Neuroblastoma

Cells on the Identification of the Relapse Seeding Clone. Clin Cancer Res. 2017

Legende: ♦ = Vortragende(r) bewirbt sich für den TGA-Vortragspreis

♦Exosomale miRNAs: Bedeutung für invasive Harnblasenkarzinome

Sophie Baumgart

Email: sophie.baumgart@uks.eu

Klinik für Urologie, Homburg (Saar)

Co-Autor/en: Joana Heinzelmarm, Philipp Edelmann, Rainer Bohle, Michael Stöckle,

Marie Stampe Ostenfeld, Kerstin Junker

Klinik für Urologie, Homburg (Saar)

Einleitung: In der Tumorgenese/-metastasierung von Tumoren spielen neben intrazellulären Veränderungen auch die Interaktion zwischen Tumorzelle und Tumormikroumgebung (TME) eine entscheidende Rolle. Kleine extrazelluläre Vesikel (Exosomen, EVs) und die darin verpackten miRNAs sind dabei von großer Bedeutung, da sie schnell, effektiv Prozesse beeinflussen. EVs spiegeln die molekulare Signatur ihrer Ausgangszellen wieder und können in Körperflüssigkeiten detektiert werden, wodurch sie als diagnostische Biomarker geeignet sein können.

Ziel dieser Studie war die Identifizierung invasionsabhängiger miRNA Signaturen in Zelllinien und deren EVs. Die Übertragung dieses Modells für die klinische Anwendung wurde durch die Analyse von Tumor- und Urinproben muskelinvasiver (MIBC) und nicht-muskelinvasiver (NMIBC) Tumore geprüft. Weiterhin wurde die funktionelle Bedeutung von Tumor-assoziierten EVs in der Tumor-TME-Interaktion des Harnblasenkarzinoms (BC) untersucht.

Methodik: Gesamt-RNA wurde aus invasiven und nicht invasiven BC-Zellen und ihren EVs sowie aus Tumorproben (FFPE-Gewebe (n=50), Urin-EVs (n=20)) isoliert. Die miRNA-Expression von Geweben (MIBC, NMIBC), sowie BC-Zellen und ihren EVs wurde mittels Mikroarray analysiert und die Validierung spezifischer miRNAs erfolgte mit qPCR. Der funktionelle Einfluss von Tumor-assoziierten EVs auf naive Harnblasenfibroblasten (HBF) wurde mittels Proliferations- und Migrationsassay untersucht. **Ergebnisse:** MIBC unterscheiden sich in ihrem miRNA Muster in Zelllinien (37 miRNAs), aber auch in Tumorgeweben (57 miRNAs) signifikant von NMIBC. EVs von invasiven BC-Zellen sind durch 15 signifikant deregulierte miRNAs charakterisiert, die zum Teil die miRNA-Muster der Tumorzellen widerspiegeln. In Urin-EVs von MIBC wurde eine differenzielle Expression ausgewählter miRNAs detektiert. Weiterhin konnten wir zeigen, dass Tumor-assoziierte EVs eine erhöhte Proliferation und Migration von HBF induzieren, welche unabhängig von der Invasivität der Ausgangszellen ist.

Schlussfolgerung: MIBC sind sowohl intra- als auch extrazellulär durch spezifische miRNA-Signaturen charakterisiert. Spezifische exosomale miRNAs könnten auch als potentielle diagnostische Biomarker für die Identifizierung von MIBC im Urin verwendet werden. Darüber hinaus konnten wir erstmals belegen, dass Tumor-assoziierte EVs die Proliferation und Migration naiver HBF stimuliert, was auf eine wichtige Rolle in der Tumor-TME-Interaktion während der Tumorgenese schließen lässt.

❖Die Performance der DNA-Polymerasen - ein scheinbar relevanter Faktor für die Variationen der Allelfrequenz ?

Sascha Dierks

Email: sascha.dierks@med.uni-goettingen.de

Klinik für Hämatologie & med. Onkologie INDIGHO, Göttingen

Co-Autor/en: Roman Martin, Katayoon Shirneshan, Katharina Rittscher, Johanna Flach, Christina Ganster, Detlef Haase

Das Next Generation Sequencing hat die molekulare Diagnostik revolutioniert und ist nun auf dem Weg in die personalisierte Medizin kaum noch wegzudenken. Neben den vielen Vorteilen bringt die Technologie auch einige Herausforderungen mit sich. Theoretisch können mit Hilfe des „deep sequencing“ geringe DNA Subpopulationen aus einer Anzahl von DNA-Molekülen bestimmt werden, solange die absolute Molekülzahl nur groß genug ist. Jedoch bringt die NGS-Technologie einige Limitationen mit sich, die aus der hohen Frequenz der fehlerhaft bewerteten Basen hervorgehen. Diese aktuellen Limitationen der Methodik stehen den ambitionierten Applikationen des NGS wie z.B. der Detektion von ctDNA aus dem peripheren Blut oder dem Therapie-Monitoring im Sinne einer MRD-Erfassung entgegen. In unserem Labor haben wir die Variation der Varianten Allel Frequenz (VAF) durch verschiedene Ansätze hindurch untersucht. Dabei haben wir die VAF Unterschiede, die bedingt durch die verwendeten Polymerasen während der Library-Präparation auftraten von drei verschiedenen Polymerasen, welche teilweise auch über eine 5'-3' Exonuklease Aktivität verfügen (Illumina myeloid Panel, NEB 05 High-Fidelity Polymerase and NEB Phusion High-Fidelity Polymerase), verglichen. Hierbei ergab sich eine geringere VAF bei Proben die mit einer der High-Fidelity (HF) Polymerasen amplifiziert wurden im Vergleich zu den Proben aus dem Illumina Myeloid Panel. So wurde eine Mutation im SETBP1 Gen durch das Illumina Myeloid Panel mit einer VAF von 48,2% detektiert, während diese Mutation im PCR-Ansatz der HF-Polymerasen eine VAF von 38,7% aufwies. Weiterhin zeigte sich, dass die HF Polymerasen ebenfalls geringere VAFs bei der Sequenzierung von Homopolymeren detektieren. Worin genau dieser Unterschied der VAFs liegt bleibt aktuell noch unklar, auch da die im Illumina Myeloid Panel verwendete Polymerase uns nicht bekannt ist. Folglich lässt sich die Schwankung der VAF unter anderem auf die Fehlerrate der verwendeten Polymerase zurückführen. Dies ist ein relevanter Punkt der in der Verlaufsdiagnostik mittels NGS, aber auch in der Detektion von geringen DNA-Subpopulationen eine Rolle spielen könnte.

Fallbeispiel einer Philadelphia-Translokation und BCR-ABL1 FISH positiven CML ohne molekulare Nachweisbarkeit eines der häufigen Fusionstranskripte

Martin Erdel

Email: martin.erdel@ordensklinikum.at

Labor für Molekularbiologie und Tumorzytogenetik, I. Interne Abtlg., Ordensklinikum, Linz

Co-Autoren: W Kranewitterl, S Deutschbauerl, P Bettelheim², J Pumbergerl, S Breitenfellnerl, M Bergen, M Heinenl, S Kriegnerl, G Webersinkel

¹Labor für Molekularbiologie und Tumorzytogenetik, I. Interne Abtlg., Ordensklinikum, Linz

²Laborgemeinschaft für Spezialdiagnostik, Linz

Die zytogenetisch nachweisbare Philadelphia-Translokation mit Chromosomenbruch in 9q34 und 22q11 charakterisiert die hämatologischen Erkrankungen CML und Ph-positive ALL und führt molekular zu einer reziproken Fusion der bruchpunktüberspannenden Gene ABL1 und BCR. Bislang sind 3 verschiedene Bruchpunktregionen im BCR Gen auf 22q11 bekannt, die, bei konstantem Bruchpunkt im ABL1 Gen auf 9q34, zu Chimären BCR-ABL1 Fusionstranskripten mit folgenden Exon-Übergängen führen: e13-a2 (major), e1-a2 (minor), e19-a2 (mikro). Diese molekular mittels RT-PCR nachweisbaren Fusionstranskripte enthalten somit unterschiedlich

kleine 5' BCR Anteile und einen konstant großen 3' ABL Anteil und kodieren für drei onkogene Proteine mit einer Molekülmasse von **210, 190, und 230** kDa. Wir berichten hier über eine Patientin mit initialer Leukozytose und deutlich vermehrter und linksverschobener Granulopoese im Knochenmark. Aufgrund einer zytogenetisch sichtbaren Philadelphia-Translokation (alle Metaphasen) und einer mittels FISH nachweisbarer BCR-ABL1 Fusion auf dem Philadelphia-Chromosom (92% im Knochenmark, atypisch, mit Deletion des reziproken Produkts auf der 9q34) wurde die Diagnose CML gestellt. Eine RT-PCR für die major, minor und mikro Bruchpunktregion ergab kein BCR-ABL1 Produkt, sodass Verlaufskontrollen in weiterer Folge mit Zytogenetik und FISH erfolgten. Die Patientin zeigte auf Glivec ein deutliches Ansprechen (normale Hämatopoese und komplette zytogenetische Remission im peripheren Blut nach **5** Monaten). Eine nähere molekulare Charakterisierung des vorliegenden Bruchpunktes ergab, dass bei der Patientin ein komplexes BCR-ABL1-Fusionstranskript vorliegt, bei dem BCR Exon 8 mit dem (vollständigen) Exon 14 von SPECCIL (genomisch 1Mb telomerisch von BCR liegend) und daran anschließend mit dem Exon 2 von ABL1 fusioniert ist. Der an sich inkompatible Leseraster von BCR Exon 8 und ABL1 Exon 2 wird durch die dazwischen liegende SPECCIL-Sequenz korrigiert, weshalb von einem funktionalen BCR-ABL1-Fusionsprotein auszugehen ist. Mehrere Fälle mit einem Fusionstranskript von BCR Exon 8 mit ABL1 Exon 2 und einem dazwischenliegenden Insert sind publiziert, wobei auch mindestens 2 Fälle mit einem Insert einer Sequenz aus SPECCIL beschrieben sind (Demehri et al 2005, Leukemia 19:681-4; Huet et al 2015, Genes Chromosomes Cancer 54:595-605).

Genetische Evolution durch kryptische Anomalien beim MDS: 4 Fallbeispiele

Christina Ganster

Email: christina.ganster@med.uni-goettingen.de

Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie, INDIGHO, Göttingen

Co-Autoren: Katayoon Shirneshan, Roman Martin, Sascha Dierks, Detlef Haase

Im Verlauf eines MDS erworbene genetische Anomalien sind eng mit einem Progress der Krankheit assoziiert. Mittels Bänderungsanalyse (CCB) aus Knochenmarkblut wird bei ~20% der MDS Patienten eine klonale Evolution (KE) innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 12 Monaten nachgewiesen. Die Untersuchung CD34+ peripherer Blutzellen (PB) mittels FISH- und/oder SNP-Array Analysen (SNP-A) erlaubt eine noch engmaschigere Beobachtung und den Nachweis kryptischer Anomalien (kopienzahlneutraler Verluste der Heterozygotie (CN-LOH) und Mikrodeletionen) und kann daher zu einem besseren Verständnis der KE beitragen. Über die Bedeutung kryptischer Anomalien bei der KE ist wenig bekannt. Daher haben wir vier im Rahmen des MDS-Verbundprojektes analysierte Patienten mit kryptischen Anomalien ausgewählt und mittels CCB, CD34+PB-FISH und SNP-A beobachtet und die Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf abgeglichen.

Bei Patient 1 (MDS-RAEB-2, +8, CN-LOH in 7p, Mutationen in ASXL1 (20q11.21), U2AF1 (21q22.3), ETV6 (12p13-2), IKZF1 (7p12.2)) wurde unter Behandlung mit einem DNA-Methyltransferase-Inhibitor (DMTI) in Monat 10 eine KE mit i(16)(p10) nachgewiesen, der rasch die AML-Transformation folgte.

Patient 2 wurde initial mit MDS-RCUD und Normalkaryotyp diagnostiziert. Beim ersten Progress 28 Monate nach der Erstdiagnose (ED) wurde ein MD5-RAEB-1 mit +8, del(2p23 3) (DNMT3A), CN-LOH in 2p und Mutationen in TET2 (4q24) und U2AF1 (21q22.3) nachgewiesen. Der Klon mit +8 hat auf den DMTI angesprochen, der Klon mit den Veränderungen in 2p nicht. Bei der AML-Transformation in Monat 47 hat sich die +8 Klongröße mehr als verdoppelt.

Patient 3 zeigte bei ED ein MDS-RAEB-1, eine kryptische del(21q22.12) mit Bruchpunkt in RUNX1 und Mutationen in SRSF2 (17q25.1), TET2 und ASXL1. Im Verlauf wurde ein fluktuierender Klon mit +8 beobachtet. Beim Progress zu RAEB-2 in Monat 16 war die 21q- Klongröße von 20% auf 30% gestiegen.

Patient 4 wurde mit MDS-RARS und +8 diagnostiziert und zeigte 72 Monate lang keine KE. 87 Monate nach der ED wurde erstmalig eine CN-LOH in 4q und Mutationen in DNMT3A und TET2 nachgewiesen. Bisher (Monat 117) liegt kein weiterer Progress vor.

Die kryptischen Anomalien unserer Fallbeispiele liegen in bei MDS häufig mutierten Regionen und führen in einigen Fällen zu einem Verlust der Heterozygotie, ein offensichtlich wichtiger Progressionsschritt, der zum raschen klinischen Progress bei MDS Patienten mit ansonsten günstigen oder intermediären Anomalien beitragen kann.

❖ Identische BRIP1 Deletion in zwei nicht verwandten Familien mit familiärem Brustkrebs

Laura Gieldon¹²

Em ail: laura.gieldon@tu-dresden.de

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

Co-Autoren: Andreas Rump¹², Gudrun Göhring³, Zarah Kowalzyk¹², Franziska Stübner¹², Alexander Krüger², Anne-Karin Kahlert¹², Joseph Porrmann¹², Karin Käst⁴, Andreas Tzschach¹², Evelin Schröck¹², Barbara Klink¹², Karl Hackmann¹⁻²

- 1) Institut für Klinische Genetik, Medizinische Fakultät Carl Gustav Cams, Technische Universität Dresden, Dresden
- 2) Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), Dresden; Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg; Nationales Centrum für Tumorerkrankungen (NCT), Dresden, Dresden
- 3) Institut für Humangenetik, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover
- Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Carl Gustav Cams, Technische Universität Dresden, Dresden

Das DNA-Reparaturgen BRIP1 kodiert für eine Helikase, die mit BRCA1 im Rahmen der Doppelstrangbruchreparatur interagiert. Biallelische Funktionsverlustmutationen führen zur Ausprägung einer Fanconi-Anämie. Die klinische Relevanz heterozygoter BRIP1 Keimbahnmutationen für die Entstehung von familiärem Brust- und Eierstockkrebs hingegen wird kontrovers diskutiert.

Wir berichten hier über zwei nicht verwandte Familien mit familiärem Brustkrebs, in denen exakt dieselbe Deletion der terminalen Exons 17-20 im BRIP1-Gen mittels Custom-Array-CGH entdeckt und per „Targeted Locus Amplification“ (PMID 25129690) basengenau charakterisiert wurde [Chr17(GRCh37):g.59722704-59807864del8516]. Die Hochdurchsatzsequenzierung weiterer tumordispositionsrelevanter Gene erbrachte in beiden Familien keine Mutationen.

Die Indexpatientin 1 war im Alter von 55 Jahren an Brustkrebs erkrankt, ihre Großmutter väterlicherseits litt im Alter von 47 Jahren an einem Mammakarzinom. Indexpatientin 2 war im Alter von 48 Jahren an triple-negativem Brustkrebs erkrankt und ihre Mutter war, im Alter von 71 Jahren, ebenfalls an triple-negativem Brustkrebs erkrankt. Fälle von Eierstockkrebs hingegen waren in beiden Familien nicht aufgetreten.

Ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Ovarialkarzinomen bei Trägern einer pathogenen BRIP1-Mutation wurde beschrieben und auch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Mammakarzinomen wird diskutiert. Eine eindeutige Korrelation konnte bisher jedoch nicht dargestellt werden. Die hier beschriebene Deletion ist offenbar selten. In einer Kohorte von über 400 Familien mit familiärem Brust- und Eierstockkrebs in Dresden wurde die Deletion nur in den hier beschriebenen Fällen gefunden.

Das Auftreten triple-negativer Brusttumore in einer der Familien kann als hinweisend auf eine zugrunde liegende genetische Ursache gedeutet werden (PMID 24000781). Ähnlich anderer gering-penetranter genetischer Alterationen, traten die Krebserkrankungen in den hier vorgestellten Familien erst nach dem 45. Lebensjahr auf. Gerade bei geringer Penetranz und hoher phänotypischer Variabilität ist jedoch eine Zuordnung genetischer Veränderungen als Ursache familiärer Krebserkrankungen erschwert, was kontroverse Ergebnisse erklären kann. Die Relevanz der hier beschriebenen BRIP1 Mutation wird durch eine Untersuchung auf Expressionsebene und einer Analyse von Tumormaterial mit Suche nach einem „second hit“ weiter abgeklärt.

Aktuelle Empfehlungen zur Diagnostik der AML

Claudia Haferlach

MLL Munich Leukemia Laboratory, Max-Lebsche-Platz 31, 81377 Munich, Germany

Die Ziele der modernen AML Diagnostik sind zum einen die Sicherung der Diagnose einer Leukämie, Abgrenzung zu anderen Entitäten wie z.B. ALL, die Klassifikation der AML nach der aktuellen WHO-Klassifikation, die Identifizierung prätherapeutischer prognostischer Parameter, die Identifizierung von therapierelevanten Parametern, die Bestimmung von Parametern mit Eignung zur Beurteilung des Therapie-Ansprechens sowie Evaluation des Therapie-Ansprechens zur weiteren Therapie-Steuerung. Dieses kann aktuell nur durch eine Kombination verschiedener Methoden erreicht werden. Für eine umfassende Diagnostik werden die Methoden Zytomorphologie, Immunphänotypisierung, Chromosomenanalyse, FISH, RT-PCR und Sequenzierung benötigt.

2016 wurde die WHO Klassifikation der AML aktualisiert (D.A. Arber et al., Blood, 127, 2391-2405, 2016). Im Vergleich zu 2008 wurde jetzt die AML mit *NPM1* Mutation von einer provisorischen Entität zu einer „vollständigen“ Entität erhoben. Die 2008 als provisorische Entität eingeführte AML mit *CEBPA* Mutation wurde ebenfalls zur Entität und genauer spezifiziert als AML mit biallelischer Mutation von *CEBPA*. 2016 neu eingeführt als provisorische Entitäten wurden die AML mit *BCR-ABL1* und AML mit mutiertem *RUNX1*.

Ferner wurden als neue Gruppe myeloische Neoplasien mit Keimbahn Prädisposition eingeführt. Hierzu sind bereits einige wichtige Publikationen erschienen, die Empfehlungen zum diagnostischen Vorgehen geben (Blood **2016**; **128**:1800-1813, J.E. Churpek et al. Blood **2015**; 126:2484-2490).

Die genetische Heterogenität der AML wurde durch große Sequenzierungsstudien intensiv untersucht (The Cancer Genome Atlas Research Network NEJM 2013; 368: 2059-2064, E. Papaemmanuil et al, NEJM, 374, 2209-21, 2016) Hieraus ergeben sich Klassifikationsvorschläge, die über die der WHO-Klassifikation hinausgehen.

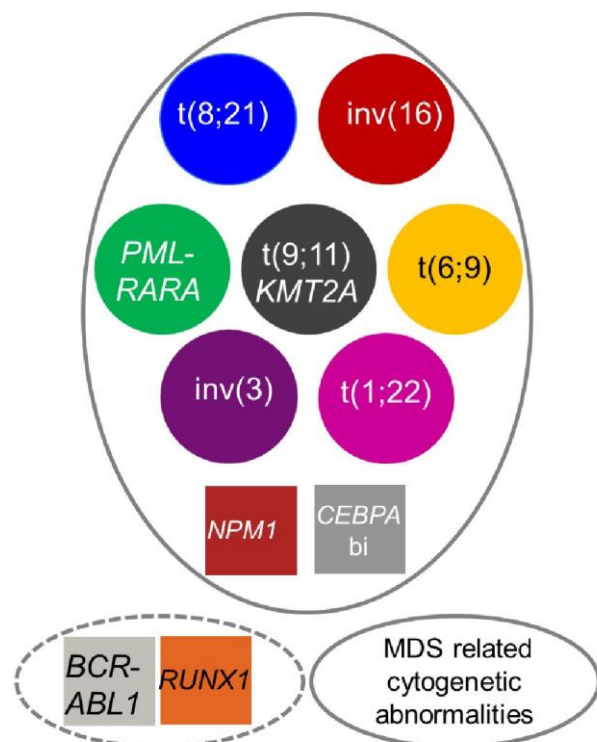
Die prognostische Kategorisierung der AML erfolgte ganz überwiegend anhand des Karyotyps. In den letzten Jahren wurden Prognose-Systeme vorgestellt, die neben zytogenetischen Veränderungen zusätzlich molekulargenetische Veränderungen mit einbeziehen (D. Grimwade et al, Blood, 127, 29-41, 2016, H. Döhner et al. Blood 2017; 129:424-447). Es gibt hier viele Übereinstimmungen in der Zuordnung jedoch auch einige Unterschiede.

Die aktualisierten Empfehlungen des Europäischen Leukämienetzes (ELN) (H. Döhner et al. Blood 2017; 129:424-44) geben detaillierte Informationen zum aktuellen Stand der AML Diagnostik. Zusammengefasst werden folgende Methoden empfohlen:

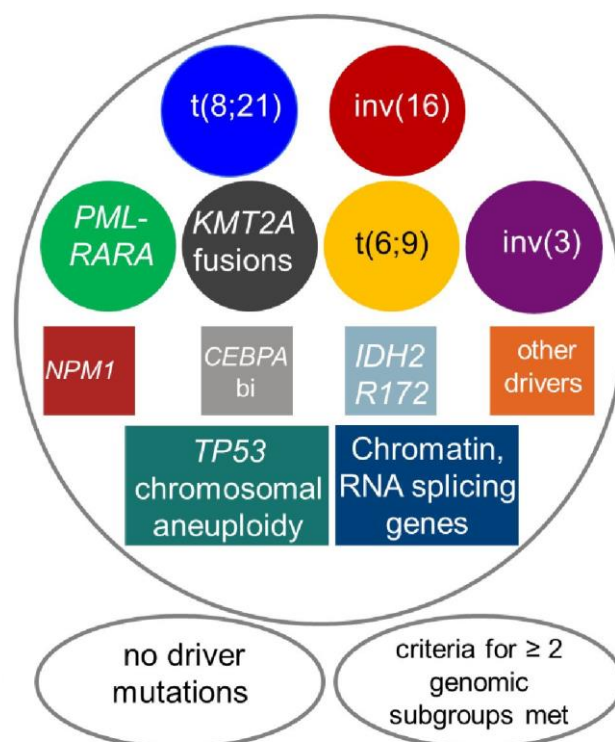
- Zytomorphologie
- Immunphänotypisierung
- Zytogenetik

Chromosomenanalyse, wenn Chromosomenanalyse ohne Ergebnis: FISH mit Sonden zum Nachweis von *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, Rearrangements von *KMT2A* (*MLL*) und *MECOM*, Verlusten von 5q, 7q, 17p

Molekulargenetik: Mutationsscreening: *NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1*, *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD, *TP53*, und *ASXL1*, ggfs. RT-PCR Screening auf rekurrente Fusionen



D.A. Arber et al., Blood, 127, 2391-2405, 2016



E. Papaemmanuil et al, NEJM, 374, 2209-21, 2016

Risk Category ^a	Genetic Abnormality
Favorable	- t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> - inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> - Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i>^{low(c)} - Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	- Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i>^{high(c)} - Wild type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i>^{low(c)} (w/o adverse-risk genetic lesions) - t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i>^d - Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	- t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> - t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged - t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> - inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EV11)</i> -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) - Complex karyotype,^e monosomal karyotype^f - Wild type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i>^{high(c)} - Mutated <i>RUNX1</i>^g - Mutated <i>ASXL1</i>^h - Mutated <i>TP53</i>^h

^a Frequencies, response rates and outcome measures should be reported by risk category, and, if sufficient numbers are available, by specific genetic lesions indicated.

^b Prognostic impact of a marker is treatment-dependent and may change with new therapies.

^c Low, low allelic ratio (<0.5); high, high allelic ratio (≥0.5); semi-quantitative assessment of *FLT3-ITD* allelic ratio (using DNA fragment analysis) is determined as ratio of the area under the curve (AUC) "FLT3-ITD" divided by AUC "FLT3-wild type"; recent studies indicate that acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation and *FLT3-ITD* low allelic ratio may also have a more favorable prognosis and patients should not routinely be assigned to allogeneic hematopoietic-cell transplantation.^{21,22}

^d The presence of t(9;11)(p21.3;q23.3) takes precedence over rare, concurrent adverse-risk gene mutations.

^e Three or more unrelated chromosome abnormalities in the absence of one of the World Health Organization-designated recurring translocations or inversions, i.e., t(8;21), inv(16) or t(16;16), t(9;11), t(v;11)(q23.3), t(6;9), inv(3) or t(3;3); AML with *BCR-ABL1*.

^f Defined by the presence of one single monosomy (excluding loss of X or Y) in association with at least one additional monosomy or structural chromosome abnormality (excluding core-binding factor AML).¹⁹

^g These markers should not be used as an adverse prognostic marker if they co-occur with favorable-risk AML subtypes.

^h *TP53* mutations are significantly associated with AML with complex and monosomal karyotype.^{17,20,23}

Risk group	Cytogenetic/molecular genetic abnormality
Favorable	- t(15;17)(q22;q21)/<i>PML-RARA</i> - t(8;21)(q22;q22)/<i>RUNX1-RUNX1T1</i> - inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22)/<i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutation (in absence of <i>FLT3-ITD</i> or <i>DNMT3A</i> mutation) - Biallelic <i>CEBPA</i> mutation
Intermediate	Cytogenetic/molecular genetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	In the absence of favorable risk cytogenetic/molecular genetic abnormalities: - abn(3q) [excluding t(3;5)(q21~25;q31~35)/<i>NPM1-MLF1</i>], - inv(3)(q21;q26)/t(3;3)(q21;q26)/ <i>GATA2/EV11</i> - add(5q)/del(5q), -5 - t(5;11)(q35;p15.5)/<i>NUP98-NSD1</i> - t(6;9)(p23;q34)/<i>DEK-NUP214</i> - add(7q)/del(7q), -7 - t(11q23) [excluding t(9;11)(p21~22;q23) and t(11;19)(q23;p13)] - t(9;22)(q34;q11)/<i>BCR-ABL</i> -17/abn(17p)/<i>TP53</i> mutation - Complex karyotype (≥4 unrelated abnormalities) <i>ASXL1</i> mutation <i>DNMT3A</i> mutation <i>FLT3-ITD</i> <i>MLL-PTD</i> <i>RUNX1</i> mutation

H. Döhner et al. Blood 2017; 129:424-447

D. Grimwade et al, Blood, 127, 29-41, 2016

◆ZNF384 positive BCP-ALL cases in Austrian ALL treatment studies

Sabrina Haslinger

Em ail: sabrina.haslinger@ccri.at

CCRI, St. Anna Kinderkrebsforschung; Wien, Österreich

Co-Autoren: Karin Nebral, Andrea Inthal, Margit König, Dagmar Schinnerl, Andishe Attarbaschi, Sabine Strehl, Oskar A. Haas

About 75% of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) cases fall in distinct genetic subgroups such as t(12;21)/ETV6-RUNX1, t(1;19)/TCF3-PBX1, t(9;22)/BCR-ABL1, llq23/KMT2A (MLL) fusions and specific hyper- and hypodiploidy patterns. The remaining 25% of cases comprise the so-called "B-other" group, a variety of so far rather ill defined but potentially highly relevant sub-entities. These currently build the main focus of interest and are scrutinized with genome-wide copy number, sequencing and expression analyses. One of these recently delineated novel subgroups is defined by in-frame fusions of the ZNF384 gene. This entity makes up about 4% of childhood BCP-ALL (circa 10% of B-others) and 7-12% of adolescence and adult cases. The apparently characteristic features of such ZNF384-positive leukemias are their very early pro B-ALL immunophenotype (BI), which is commonly CD10-negative with expression of myeloid markers, and their activation of the JAK-STAT pathway. The ZNF384 (zinc-finger protein 384) gene encodes a transcription factor that regulates expression of extra-cellular matrix genes. So far, nine in-frame fusion partners were identified - TCF3 (the most recurrent one), TAF15, EWSR1, EP300, CREBBP, SYNRG, ARID1B, BMP2K and SMARCA2. Since ZNF384 resides in 12p13, ensuing translocations may remain cytogenetically undetectable. Investigating a cohort of Austrian B-other cases with a special emphasis on those with a suggestive immunophenotype with SNP/CGFH array and a ZNF384-specific dual color break apart FISH probe set revealed seven positive cases so far: 4 with an unbalanced ZNF384 gene fusion discovered originally by array and 3 by FISH. Until now, we were able to identify the partner gene in five of them: three had an EP300-ZNF384 and two a TCF3-ZNF384 fusion. All of them had a pro-B/BI immunophenotype. The remaining two ZNF384-positive cases had a pre-B (BI1) and a BI/II-MPAL immunophenotype, respectively. In contrast to the literature, three of our seven cases had an IKZF1 deletion.

All but one are in remission, supporting the notion that ZNF384 positive cases seem to respond well to current therapies. To enable systematic identification of this subgroup and to define their distinct genome-wide copy number alteration pattern in a retro- and prospective manner on a cohort of patients within the international AIEOP-BFM treatment study, we developed a ZNF384 break apart FISH assay and successfully combined it with SNP/CGFI array.

Genetic analyses on glioblastoma stem like cells and glioblastoma tissue using SNP array and gene expression

Heidrun Holland¹

Email: Heidrun.Holland@medizin.uni-leipzig.de

Saxonian Incubator for Clinical Translation, University of Leipzig

Co-Autoren: Marco Wallenborn^{1,2}, Holger Kirsten^{3,4}, Li-Xin Xu^{1,2}, Peter Ahnert^{1,3}, Jürgen Meixensberger², Wolfgang Krupp²

1) Saxonian Incubator for Clinical Translation (SIKT) and Translational Centre for Regenerative Medicine (TRM), University of Leipzig

2) Department of Neurosurgery, University of Leipzig

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

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

Glioblastoma stem like cells (GSCs) are considered to be responsible for tumor initiating, maintaining, recurrence and chemo- and/or radiotherapy resisting. Only few information exist about genetic and genomic data of this small group of GSCs, in comparison with primary tumor tissue. Therefore, genetic analyses and genomic profiling should be carried out in further studies of GSCs. Main focus of the present study was genetic analyses on GSCs and glioblastoma tissue using SNP array and gene expression to find novel selective markers of GSCs and improve therapy possibilities.

Tumor tissue and peripheral blood were obtained from the patients. Tumor tissue derived explant cell culture and serum-free culture were established. From serum-free culture, cell subpopulations were isolated by the two stem cell markers CD15 and CD133 through multi-parameter magnetic-activated cell sorting technique. Tumor tissue, serum-free culture, and the isolated cell subpopulations as well as blood were analyzed by SNP array and gene expression (excluding blood) in a paired design.

SNP array analyses showed unique genetic profile between tumor tissue and serum-free culture based cells, e.g. gain of chromosome 7, loss of 10q23.31, loss of 10q26.3, and complete loss of chromosome 10. We also detected distinct differences in the genetic profile between tumor tissue and serum-free culture based cells, e.g. loss of chromosome 4, and segmental uniparental disomy of 9p24.3—>p21.3, only in serum-free culture based cells.

Gene expression analyses showed clear differences between tumor tissue and serum-free culture based cells. In comparison between tumor tissue and CD133+/CD15+ cells, we detected strong up- and downregulated genes (418 genes downregulated in CD133+/CD15+ cells, 44 genes upregulated in CD133+/CD15+ cells). Pathway analyses showed that upregulated genes in CD133+/CD15+ cells vs tumor tissue have mostly influence on regulation of cell cycle processes and cancerogenesis. In contrast, upregulated genes in tumor tissue vs CD133+/CD15+ cells may influence pathways of immunity and diseases due to immunodeficiency.

In comparison between GSCs and tumor tissue using SNP array and gene expression, minor differences in the genetic and genomic profile were detected. Our results may help to get more information about the molecular pathomechanisms of glioblastoma. It still needs more investigations on this field to identify novel potential targets for therapy development.

Tumordisposition in syndromalem Kontext - retrospektive monozentrische Analyse des Mutations- und Phänotypspektrums beim pädiatrisch manifesten PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom

Dennis Kraemer

Institut für Medizinische Genetik, Universität Zürich, Zürich, Schweiz

Co-Autoren: Silvia Azzarello-Burri, Ruxandra Bachmann, Theresia Herget, Julie De Geyter, Laura Gogoll, Eva Wey, Beatrice Oneda, Alessandra Baumer, Katharina Steindl, Anita Rauch

Institut für Medizinische Genetik, Universität Zürich, Zürich, Schweiz

Das PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom (PHTS) umfasst ein Spektrum verschiedener phänotypischer Varianten, deren gemeinsame molekulare Ätiogenese auf germinalen PTEN-Mutationen beruht und die durch multiple Hamartome charakterisiert sind. Die Subklassifizierung in Cowden-Syndrom (CS), Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Syndrom (BRRS), PTEN-assoziiertes Proteus-(like-)Syndrom, welche ursprünglich als separate nosologische Entitäten angesehen wurden, ist mit der unifizierenden Diagnose PHTS weitgehend obsolet geworden. Als klassische Symptome des traditionell bei pädiatrisch manifesten Patienten diagnostizierten BRRS gelten unter anderem Makrozephalie, Hashimoto-Struma, Lipomatose, vaskuläre Malformationen und fleckförmige Lentiginose des Penis. Das PHTS disponiert insbesondere für Neoplasien der Brustdrüse, der Schilddrüse, der Niere, des Endometriums und des Kolorektrums, die sich aber mehrheitlich erst in der dritten Lebensdekade manifestieren.

Klinisch imponiert beim (kindlichen) PHTS eine stark variable Expressivität, gerade jenseits der typischen BRRS-Stigmata, ohne dass valide Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zu existieren scheinen. Zur weiteren Abgrenzung des Mutations- und Phänotypspektrums in bereits neonatal/frühkindlich symptomatischen PHTS-Patienten evaluierten wir dahingehend retrospektiv das Patientengut des Zürcher IMG (2009-2017). Wir präsentieren eine monozentrische konsekutive Serie von insgesamt sechs pädiatrischen und zwei zum Zeitpunkt der Evaluation im jungen Erwachsenenalter stehenden Patienten, bei denen aber konnatal/frühkindlich bereits typische PHTS-assoziierte Symptome zu eruieren waren. Molekulargenetisch liess sich bei sieben Patienten eine bereits als pathogen beschriebene PTEN-Keimbahnmutation identifizieren; in einem Fall mit für PHTS ungewöhnlichem Medulloblastom zeigte sich zytogenetisch die begleitende paternale, offensichtlich balanzierte Translokation **46,XX,t(6;10)(?p12;?p11)**. Eine mögliche kausale Rolle bei der Ätiogenese des Medulloblastoms wird diskutiert. Zuletzt berichten wir von einem frühkindlichen Patienten, für den in der molekularen Karyotypisierung (Affymetrix Cytogenetics 2.7 M Array, annot. v. 30.1) eine PTEN in toto umfassende Deletion von 6.3 Mb im Sinne eines 10q23-Mikrodeletionssyndroms detektiert werden konnte. Vorliegend imponiert das 10q23-Mikrodeletionssyndrom durch eine akzentuierte phänotypische Überschneidung zum PHTS.

❖ An IDH1R132H edited glioma *in vitro* model reveals altered metabolism and enhanced dependence on NAD⁺-regeneration

Matthias Lehmann

Email: Matthiaslehmann@uniklinikum-dresden.de

Institut für Klinische Genetik, Dresden

Co-Autoren: Clausing Maximilian¹, Julia Biedermann¹, Cindy Hahn¹, Luzie Gawehn¹, Nadin D. Exner¹, Susan Richter², Achim Temme^{3,4}, Rump Andreas¹, Schröck Evelin¹⁴, Klink Barbara¹⁴

1 Institute for Clinical Genetics, Faculty of Medicine Carl Gustav Carus, TU Dresden, Dresden

2 Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Hospital Carl Gustav Carus, Dresden

3 Department of Neurosurgery, University Hospital Carl Gustav Carus, Dresden

4 German Cancer Consortium (DKTK), Dresden, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg; National Center for Tumor Diseases (NCT), Dresden

Gliomas present the major group of neoplasia in the central nervous system. They typically show invasive growth and high recurrence rate and are currently not curable. IDH mutations are detected in nearly 70% of low grade gliomas and are considered to play a key role in low grade glioma development. While it is known that IDH1/2 mutation leads to high-levels of 2-Hydroxyglutarate (2-HG) that functions as an oncometabolite, little is known about the influence of IDH1/2 mutations on energy metabolism and metabolic reprogramming in the tumor cells. Since patient derived IDH mutant cells do not grow in cell culture, previous studies from our group and others used transduced cell lines that overexpress IDHi. In order to develop *in vitro* models with reduced side effects, we used CRISPR/Cas to introduce the IDH1^{R132H} mutation in a patient derived glioblastoma cell line. The edited cells expressed IDHi^{R132H} in Western Blot and expression levels of IDHi were comparable to the expression in wild type cells. The mutation was stable in long time culture experiments, without signs of senescence. Moreover we found elevated 2-HG levels, proving that the IDH1^{R132H} neoenzymatic function is present in our cell lines. Thus, we were able to edit and culture genomic IDH1^{R132H} mutated glioma cells for the functional analysis of the IDHi^{R132H} mutation for the first time without the effects of overexpression models. We found enhanced ATP-levels that could be a consequence of decreased ATP consumption. Additionally, the cells showed reduced viability compared to wildtype cells when cultivated in glycolysis inhibiting media, pointing out the enhanced dependency on glycolysis in IDH1^{R132H} cells. These results indicate changes in tumor cell metabolism and energy household induced by the IDH1^{R132H} mutation. Since we and others could show that IDH1^{R132H} can alter NAD⁺ and NADPH levels, we tested if the IDHi^{R132H} mutated cells are more susceptible to selective inhibition of NAD/P regenerating enzymes. esiRNA-Silencing of NAMPT specifically decreased cell viability in IDHi^{R132H} but not wildtype cells with a concomitant increase of dead cells. In conclusion, we developed a suitable *in vitro* model to study the effect IDH1^{R132H}. We currently test different treatment strategies that selectively target the metabolism of IDH1^{R132H} in our model system. Our results indicate a potential treatment against IDH1^{R132H} mutated glioma utilizing the impaired NADV/NADPH-regeneration of the tumor cells.

Potentials and Limitations of miRNomes in the Cancer Context

Nicole Ludwig, Andreas Keller, [Eckart Meese](#)

Department of Human Genetics and Chair for Clinical Bioinformatics
Saarland University, Germany

Small non-coding microRNAs are involved in the regulation of a manifold of biological processes including proliferation, apoptosis, and differentiation. Abnormal tissue-derived miRNA profiles have been associated with many human pathogenic processes. Since miRNAs show a rather high cellular stability, they offer themselves also as attractive biomarker candidates. There is ample evidence that circulating miRNA from serum have a high potential diagnostic value for various cancers and non-cancer diseases. Our work is focusing on miRNA profiles derived from whole peripheral blood. We show why whole blood as source for miRNAs helps to minimize miRNA expression changes due to environmental influences and how whole blood derived miRNA pattern allow attributing miRNA changes to their cells of origin like B-cells and T-cells. There are still numerous obstacles that need to be overcome toward clinical applications of circulating miRNAs. We will give an overview on both technical challenges and difficulties associated with the source and the nature of miRNAs. We will also emphasize the role of potential confounding factors, like age and gender on circulating miRNAs.

❖Bei MDS liefert die Hodidurdisatzsequenzierung an CD34+ zirkulierenden Blutzellen und Knochenmarkzellen vergleichbare Ergebnisse

Roman Martin

Em ail: Roman.Martin@med.uni-goettingen.de

Universitätsmedizin Göttingen, Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Göttingen

Co-Autoren: Palomo L, Ganster C, Acha P., Dierks S., Mallo M., Adema V., Fuster-Tormo F., Gomez-Marzo P., De Haro N., Jimenez-Garda F., Solanes N., Zamora L, Xicoy B., Kominowski A., Stromburg M., Brockmann A., Truemper L., Sole F., Haase D.

Universitätsmedizin Göttingen, Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Göttingen

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind klonale Erkrankungen des Knochenmarks, die durch periphere Zytopenien sowie Dysplasien gekennzeichnet sind. Als Auslöser von MDS gelten erworbene Mutationen, welche auch wichtige diagnostische und prognostische Marker darstellen. Standard beim Nachweis erworbener Mutationen ist die Analyse von Knochenmark. Unsere Resultate deuten darauf hin, dass eine adäquate Identifikation und Quantifizierung von krankheitsrelevanten Mutationen durch die hohe Sensitivität von Next-Generation Sequencing (NGS) auch aus dem peripherem Blut möglich ist.

Analysiert wurde Blut (PB) und Knochenmark (KM) von 42 MDS Patienten. Aus beiden Ausgangsmaterialien wurden durch Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen gewonnen (PB-MZ, KM-MZ). Im Blut zirkulierende myeloische Vorläuferzellen (PB-CD34+) wurden immunomagnetisch aus mononukleären Blutzellen angereichert. Als Negativkontrolle dienten Zellen der lymphatischen Reihe (CD3+). Die Identifikation von molekularen Aberrationen erfolgte mittels NGS an 54 in myeloischen Erkrankungen häufig mutierten Genen mit dem Myeloid Sequencing Panel (Illumina) und anschließender bioinformatischer Datenanalyse.

Molekulare Veränderungen konnten in 37 (88%) der 42 untersuchten Patienten nachgewiesen werden. Dadurch konnte der Anteil der informativen Fälle im Vergleich zur Zytogenetik (51%) deutlich gesteigert werden. Insgesamt konnten in unserer MDS-Kohorte 96 potentiell krankheitsrelevante somatische Varianten detektiert werden. Die Häufigkeit des Auftretens der Mutationen in den betroffenen Genen ist vergleichbar mit Daten aus den „Milestone“-Publikationen von Papaemmanuil et al. 2013 und Haferlach et al. 2014. Fast alle Varianten waren in den drei untersuchten Probenmaterialien nachweisbar. Die mittlere Allelfrequenz (AF) der Vari-

anten aus KM-MZ (40.0%) und CD34+ zirkulierenden Blutzellen (41.3%) korrelierten sehr gut ($p=0.774$), wohingegen die AF der Varianten aus PB-MZ (30.1%) signifikant niedriger waren als die Werte aus KM-MZ ($p=0.007$) und PB-CD34+ ($p=0.027$).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine adäquate Identifikation krankheitsrelevanter Mutationen bereits aus peripherem Blut, ohne weitere Anreicherung möglich ist. Um mit Knochenmark vergleichbare Werte für die Mutationslast (AF) zu erhalten, ist jedoch eine Anreicherung von CD34+ Zellen aus dem peripheren Blut nötig. Speziell bei Verlaufsuntersuchungen könnte unseren Patienten somit ein Teil der belastenden Knochenmarkpunktionen erspart werden.

FISH an Knochenmarksausstrichen als zusätzliche Option im Monitoring von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie

Brigitte Mohr

Em ail: brigitte.mohr@uniklinikum-dresden.de

Universitätsklinikum Dresden, MKI

Co-Autoren: Oelschlägel U, Kroschinsky F, Kramer M, v. Bonin M, Middeke M, Röllig C, Bornhäuser M, Ehninger C, Stölzel F

Universitätsklinikum Dresden, MKI

Bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) erreichen nach intensiver Induktionschemotherapie 70%-80% der unter 60-jährigen Patienten eine komplette hämatologische Remission (CR). In vielen Fällen ist die Beseitigung der Leukämiezellen aber nur scheinbar vollständig. Im weiteren Verlauf erleiden ca. 50% dieser CR-Patienten ein Rezidiv, sodass dem Nachweis von Resterkrankung große Bedeutung in der Therapieoptimierung zukommt. In 55%-60% der AML kann zur Diagnosestellung eine zytogenetische Aberration nachgewiesen werden. Für viele AML-typische Karyotypveränderungen sind FISFI-Sonden kommerziell verfügbar, die die Überprüfung der genetischen Integrität in Interphasen (iFISFI) ermöglichen. Ziel unserer Untersuchungen war es deshalb, iFISFI an Knochenmarksausstrichen mit dem Resultat der hämatologischen Remissionskontrolle zu vergleichen. Eine Fokussierung erfolgte auf folgende Zeitpunkte: (1) 15-Tage nach Beginn der Induktionschemotherapie (ITa), n=38 Patienten, (2) bei dokumentierter CR, n=18 Patienten, (3) vor allogener Stammzelltransplantation, n=32 Patienten sowie (4) bei punctio sicca zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf, n=31 Patienten. Eine 100%-ige Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden lag interessanterweise zu keinem Zeitpunkt vor. Entweder (A) waren Leukämiezellen nur zytomorphologisch nachweisbar bzw. (B) nur mit iFISFI oder (C) fanden beide Methoden übereinstimmend Leukämiezellen bzw. (D) übereinstimmend keine. Konkret lag der Nachweis von AML-Zellen per iFISFI zu den o.g. Zeitpunkten bei 68% (1), 11% (2), 44% (3) und 23% (4) der Patienten bzw. von Blästen per Zytomorphologie bei 66% (1), 0% (2), 41% (3), 0% (4). Die Palette der nachweisbaren zytogenetischen Aberrationen reichte von Merkmalen der Kategorie „favorable risk“ (z.B. inv(16), t(8;21)) bis zu „adverse risk“ (z.B. komplex aberrant). Besonders auffällig war, dass bei Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp, einem sehr ungünstigen Risikomerkm al, die Leukämiezellen nach ITI übereinstimmend (iFISFI, Zytomorphologie) noch nachweisbar waren. Des Weiteren zeigten Einzelfallbetrachtungen unserer Patientenkohorte, dass es möglich ist, trotz dokumentierter zytomorphologischer CR per iFISFI sowie Durchflußzytometrie noch übereinstimmend Leukämiezellen nachzuweisen. Mit dem Ziel eine möglichst langanhaltende Remission von AML Patienten zu erzielen, wird die personalisierte Medizin von der Integrierung weiterer diagnostischer Methoden wie iFISFI profitieren.

❖ Impact of 1p Deletions in Myelodysplastic Syndromes and secondary AML Arising from Myelodysplastic Syndromes

Janine Müller

Email: janine.mueller@m11.com

MLL Münchner Leukämielabor, München

Co-Autoren: Claudia Haferlach, Anna Stengel, Manja Meggendorfer, Wolfgang Kern, Torsten Haferlach

MLL Münchner Leukämielabor, München

Background: Deletions in the short arm of chromosome 1 are rare, recurrent abnormalities in Myelodysplastic syndromes (MDS) and are observed as the sole abnormality in 0.2% (Schanz et al. JCO **2012**). So far no comprehensive characterization of this subset has been performed. **Aim:** The aim of this study was to characterize MDS and secondary AML evolving from MDS harboring a 1p deletion with respect to 1) accompanying cytogenetic and molecular genetic abnormalities, 2) the size of the 1p deletion and the minimal deleted region. **Patients and Methods:** 50 cases with MDS (de novo MDS: n=38, t-MDS: n=8) and secondary AML evolving from MDS (n=4) harboring a 1p deletion were selected for analysis. All cases were evaluated by chromosome banding analysis. From 30 cases sufficient material was available to perform genomic array analysis and amplicon sequencing. **Results:** 62% were male and median age was 75 years (range: 35 - 91). The 1p deletion was the sole chromosomal abnormality in 5/50 cases (10%) and was accompanied by one, two and more than two additional aberrations in 12 (24%), 15 (30%), and 18 (36%) cases, respectively. In total **129** chromosome abnormalities were observed in addition to the 1p deletion. Of these only **10** were balanced, while **119** were unbalanced abnormalities leading to gain or loss of chromosomal material. Loss of 1p was most frequently accompanied by del(5q) (n=24; 48%), +8 (n=20; 39%), 7q-/7 (n=11; 22%), del(17p) (n=5; 10%), and -Y (n=3; 6%). In 15 cases (29%) a duplication of the short arm of chromosome 1 harboring the 1p deletion was observed. Genomic array analyses revealed a median size of the 1p deletion of 25 MB (range: 13-34 MB). A minimal deleted region encountered in all 30 evaluable patients ranged from genomic position 17,872,935 to **24,285,861** encompassing **72** genes (e.g. E2F2, ID3, PAX7, UBR4, ZBTB**40**) and 10 micro RNAs. One, 2, 3, and 4 mutations were present in 10 (33%), 8 (26%), 5 (17%) and 2 (7%) cases, respectively. No mutations in any of the analyzed genes were observed in 5 cases (17%). **Conclusions:** 1) Interstitial deletions in the short arm of chromosome 1 are rare recurrent abnormalities in MDS. 2) 5q deletion, +8, -7/7q- are frequently observed in addition to 1p deletion. 3) Both MDS with a 1p deletion as the sole abnormality and MDS with a duplication of deleted chromosome 1 are associated with very favorable outcome. 4) Accompanying abnormalities, especially -7/7q- have a negative impact on outcome.

❖Comprehensive strategy for the (molecular) cytogenetic evaluation of childhood AML

Karin Nebral

Em ail: karin.nebral@ccri.at

CCRI, St. Anna Kinderkrebsforschung, Wien und ²Medgen.at GmbH, Vienna, Austria

Co-Autoren: Karin Nebral¹², Margit König¹, Sabrina Haslinger¹, Andrea Inthal¹, Sabine Strehl¹, Michael Dworzak¹³, Oskar A. Haas¹²³

¹CCRI, Children's Cancer Research Institute, Vienna; ²Medgen.at GmbH, Vienna; ³St. Anna Children's Hospital, Medical University, Vienna Austria

Acute myeloid leukemia (AML) terms a group of genetically heterogeneous diseases with overall survival rates up to 70% in children. Apart from several forms that are also seen in adults, there are others that occur only within this age group. This fact has to be taken into consideration in the diagnostic work-up of these patients, since the identification of the underlying genetic defect is an important prerequisite for their accurate prognostic classification and subsequent treatment decisions. So far, risk group assignment was primarily based on a limited number of cytogenetic and molecular markers in combination with the response to induction therapy. The accurate identification of known as well as new molecular alterations provide indicators that may eventually be exploited for the advancement of individually modified treatment approaches. However, this development necessitates also an accordingly adapted and improved diagnostic evaluation process that becomes particularly relevant in the context of the recently devised new AML treatment study for children and adolescents (AML-BFM 2012 study). To accommodate these specific diagnostic requirements, we supplemented karyotyping and targeted mutation screening with systematic hierarchical FISH screening that allows the identification of all relevant gene fusions as well as DNA array analyses that detects in a genome-wide fashion all quantitative (copy number alterations) and qualitative (copy number neutral loss of heterozygosity, CN-LOH) changes. In addition to the retrospective examination of specifically interesting cases, we analyzed Austrian AML patients in a prospective manner since June 2016 (in total 15 cases). We were able to identify key genomic lesions in 12 of them (80%); two KMT2A (MLL) fusions, two KMT2A (MLL)-partia I tandem duplications, one DEK-NUP214, one EVI1 rearrangement, one NUP98-KDM5A, one inv(16)/CBFA2T3-GLIS2, one inv(16)/CBFB-MYH11, one PML-RARA, one somatic trisomy 21/GATA1 mutated, and, one trisomy 8/complex karyotype. Two of the remaining three patients showed acquired CN-LOH and mutations, although these were not relevant for risk stratification. Despite the small number of patients investigated so far, our first preliminary results already prove that the proposed workflow is a worthwhile endeavor that not only significantly alleviates and improves the ascertainment of genetic risk factors but also provides additional insights into the genetic landscape of childhood AML.

MRD Detection in AML: Comparison of three PCR Methods for the Type Specific Quantification of Mutated *NPM1*

Christian Paar

joerg.berg@kepleruniklinikum.at

Kepler Universitätsklinikum, Institut für Med.-Chem. Labordiagnostik, Linz, Österreich

Co-Autoren: Gregor Hörmann², Jörg Berg¹

1) Kepler Universitätsklinikum, Med. Campus 3. Institut für Med.-Chem. Laboratoriumsdiagnostik, Linz, Österreich

2) Medizinische Universität Wien, Klinisches Institut für Labormedizin, Wien, Österreich

AML with mutated *NPM1* is a novel entity in the 2016 WHO classification of hematological malignancies. Mutated *NPM1* is detected in approximately 50% of AML patients with normal karyotype. PCR based assays have been established for the detection of mutated *NPM1*. For the assessment of MRD, quantification of mutated *NPM1* is required to great sensitivity. More than 80 different *NPM1* mutations have been described. For the frequent mutations A, B and D commercial assays (*Ipsogen NPM1 MutaQuant* Kits (Qiagen)) are available, not however for the remainder of mutation types, which require qPCRs for *NPM1* mutation type specific quantification. Digital droplet PCR (ddPCR) may offer such an approach, as quantification is performed by Poisson statistics obviating the need for standard curves. The use of standard curves can also be obviated in qPCR by applying relative quantification, i.e. by calculating the ratio of crossing point values (^{AA}Ct method) of two gene transcripts.

A tool box of *NPM1* mutation type specific reverse primers was devised to match one *NPM1* forward primer and a respective Taqman probe for use in ddPCR (Bio-rad) and Taqman-PCR on the Cobas z480 (Roche) for the ^{AA}Ct method. The PCRs were performed after reverse transcription. *ABL1* was used as reference and the ratios *NPM1/ABL1* were calculated. Quantification results of 83 clinical samples were compared with results from the *Ipsogen NPM1 MutaQuant* Kit as reference.

The lower limit of *NPM1* quantification was found at 0.01% for mutation type A in ddPCR and Taqman-PCR. The *NPM1/ABL1* ratios of the clinical samples yielded to highly correlating results (Spearman rank test, $r=0.95-0.98$) among the three assays. The Friedman test to compare the three assays with each other resulted to $\chi^2=3.1$ implying that they were not different from each other.

ddPCR was found to be a feasible method for the assessment of *NPM1/ABL1* ratios without quantification standards. The results were significantly correlated with the *Ipsogen NPM1 MutaQuant* Kit as reference. Also, highly correlated *NPM1/ABL1* ratios were obtained with the Taqman-PCR and relative quantification. Our results suggest that ddPCR as well as Taqman-PCR with relative quantification may be used for *NPM1* quantification and MRD detection in the clinical routine laboratory.

Varianten der Translokation t(8;21): Zwei Fallbeispiele

Katharina Rittscher

Email: Katharina.Rittsclier@med.uni-goettingen.de

Universitätsmedizin Göttingen

Co-Autoren: Katayoon Shirneshan, Thomas Liehr, Detlef Haase

Die Translokation t(8;21) unter Beteiligung von RUNX1 (AML1) auf Chromosom 21q22 und RUNXIT1 (ETO) auf Chromosom 8q22 ist in 10% der Fälle von akuten myeloischen Leukämie (AML), meist mit dem FAB Subtyp M2 nachweisbar. Diese Translokation führt zur Entstehung des RUNX1/RUNXIT1 Fusionsgens, welches für die leukämische Transformation der Zellen verantwortlich ist. AML mit t(8;21) spricht in der Regel gut auf eine konventionelle Chemotherapie an und geht laut WHO mit einer günstigen Prognose einher. In etwa 3% bis 4% der Fälle von AML mit t(8;21) wird von Varianten Translokationen berichtet, die zusätzlich andere Chromosomen als 8 und 21 involvieren.

Wir demonstrieren zwei AML M2 Fälle mit Varianten der Translokation t(8;21). In beiden Fällen wurde eine FISH- Analyse mit einer lokusspezifischen Sonde LSI RUNX1/RUNXIT1 durchgeführt und eine 1F2R2G Signalkonstellation festgestellt. Dabei wurde jeweils das Fusionssignal auf dem derivativen Chromosom 8 detektiert. Die Bänderungsanalyse ergab im Fall 1 eine Drei-Wege-Translokation unter Beteiligung von Chromosomen 7, 8 und 21 und zusätzlich ein strukturell verändertes Chromosom 7. Im Fall 2 fand sich eine Variante, die vier Chromosomen 1, 8, 20 und 21 involvierte. In beiden Fällen wurde eine weiterführende FISH-Diagnostik durchgeführt um alle Bruchpunkte zu charakterisieren. Beide Fälle verdeutlichen die Relevanz der Kombination von klassischer Bänderungsanalyse und der FISH bei hämatologischen Systemerkrankungen.

Chromosomen Insertionen bei 2 Patienten mit CLL

Katayoon Shirneshan

Email: shirneshan@Tned.uni-goettingen.de

Universitätsmedizin Göttingen

Co-Autoren: Katharina Rittscher, Christina Ganster, Sascha Dierks, Detlef Haase

Universitätsmedizin Göttingen

Mit der traditionellen zytogenetischen Bänderungsanalyse ist die Nachweisbarkeit von Chromosomeninsertionen sehr limitiert, da diese lichtmikroskopisch häufig nicht erfasst werden können. Durch eine Kombination mit verschiedenen FISH-Techniken können Insertionen allerdings wesentlich häufiger nachgewiesen werden.

Bei Patienten mit Chronischen lymphatischen Leukämien (CLL) wurde eine Vielzahl von zytogenetischen Anomalien beschrieben. Sie spielen eine wichtige Rolle als Prognosefaktoren in der CLL. Die häufigsten Chromosomen Anomalien der CLL sind Trisomie 12, IGH Rearrangements, und Deletionen von 6q21, 11q22.3 (ATM), 13q14 (D13S25 und D13S319), und 17p13 (TP53).

In 2 Fallbeispielen berichten wir über Chromosomeninsertionen bei Patienten mit gesicherter CLL bzw. Verdacht auf CLL. Im ersten Patienten wurde neben einer Trisomie 12 eine kryptische Insertion ins(14;18) nachgewiesen, wodurch es zu einer Fusion des IgH-Schwerketten-Gen Locus mit dem BCL2-Locus in 18q21 gekommen ist. Molekulargenetisch entspricht dieses einer Translokation t(14;18). Die Translokation t(14;18)(q32;q21) ist ein zytogenetisches Merkmal des folliculären Lymphoms und tritt auch bei etwa 20% der diffusen großen B-Zell Lymphome des Follikel-Zentrums auf. Bei CLL ist eine Translokation t(14;18) ein relativ seltenes Ereignis. Bei dem zweiten Patienten wurde eine Insertion ins(13;1) in beiden Chromosomen 13 neben einem ATM-Verlust und weiteren Chromosomenaberrationen festgestellt

und konnte mit verschiedene Methoden (Interphasen und Metaphasen-FISH, M-FISH und SNP-array Analyse) verifiziert und aufgeschlüsselt werden. Hierbei kam es zur partiellen Deletion des DLEU-Locus in 13q14.

Del(13q) ist die häufigste zytogenetische Anomalie, die in mehr als 50% der CLL-Patienten mit FIS FH erkannt wird und mit einer guten Prognose assoziiert ist. Del(13q) als isolierte Aberration tritt im hemizygoten Zustand in etwa 75-80% der Fälle und im homozygoten Zustand in den verbleibenden 20-25% auf (Migliazza et al., 2001). Jedoch muss bei gleichzeitigem Vorliegen einer 13q Deletion und einer ATM-Deletion von einer ungünstigen Prognose ausgegangen werden.

Diese beiden Fälle zeigen erneut das faszinierende Zusammenspiel von Bänderungsanalyse und FISFH Techniken für den Aufschluss von Aberrationen und besseren Prognoseeinschätzung. Unter anderem können die kryptischen Insertionen eine wesentliche Bedeutung für die Diagnosestellung und Prognoseeinschätzung haben

◆miR-181d predict therapy response to carmustine wafer implantation in glioblastoma patients

Sippl C¹, Ketter R¹, Braun L¹, Bohr L¹, Schoeneberger L¹, Oertel J\ Urbschat S¹

¹ Department of Neurosurgery, University of Saarland, Faculty of Medicine, 66424 Flomburg/Saar, Germany, Kirrbergerstr.

Objective: Glioblastoma is the most aggressive form of brain cancer. The prognosis is poor with an average overall survival little over one year. Standard therapy protocol includes surgery and radio-chemotherapy. As an additional local therapy carmustine eluted wafer can be implanted after tumor resection into the resection cavity. It was our goal to evaluate miRNA-181d as a prognostic marker for therapy response to carmustine wafer implantation.

Material & Methods: We included 80 glioblastoma patients in a matched pair analyse, 40 patients in each group. One group (carmustine wafer group) received a concomitant radio-chemotherapy with carmustine wafer implantation. The second group (control group) received a concomitant radio-chemotherapy only. Using PCR based comparative 2^{-ΔCt} CT method, we analyzed the expression level of miRNA-181d in all tumor specimen. All tumors were tested for MGMT promoter methylation and IDH1 R132H mutation status. The results were correlated with the individual clinical data as well as with progression-free and overall survival.

Results: The patients of the carmustine wafer group with a low expression of miR-181d showed a significantly longer overall (HR, 4.08 [95% CI: 1.88-8.891, $P = 0.001$]) and progression-free survival (HR, 2.88 [95% CI: 1.35-6.151, $P = 0.004$]) than patients of the same group with a high expression of miR-181d. In the carmustine wafer group 28 patients showed a low expression of miR-181d (28/40, 70%). These 28 patients with carmustine wafer implantation showed a significant longer PFS (HR, 1.67 [95% CI: 1.002-2.811, $p = 0.049$]) and OS (HR, 1.717 [95% CI: 1.04-2.851, $P = 0.034$]) compared to the patients of the control group. Gross total resection was significantly correlated with a longer overall survival ($p = 0.023$).

Conclusion: MiRNA-181d expression have a significant impact on the treatment response of carmustine wafer implantation. Therefore, continuing studies should follow to evaluate miR-181d as a prognostic marker in combined therapy strategies for glioblastoma.

❖Octasomy 21 in a Patient with Secondary AML after CMML: the Role of acquired NRAS Mutations in triggering Aneuploidy

Kathrin Thomay

Em ail: thomay.kat1irin@m1i-1iannover.de

Institut für Humangenetik, Hannover

Co-Autoren: Behrens Yvonne Lisa, Lentjes Jana, Wittner Nicole, Wittig Verena, Rothe Doreen, Steinemann Doris, Schlegelberger Brigitte; Göhring Gudrun

Department of Human Genetics, Hannover Medical School, Hannover

Chronic myelomonocytic leukemia is an aggressive myeloid malignancy with features of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm (MDS/MPN) and a propensity of transformation into an AML.

We here describe a male 72-year-old patient that was diagnosed with a cytogenetically normal CMML-1, positive for a mutation in the JAK2-gene. At the age of 80 years a secondary acute myeloid leukemia (AML) was diagnosed. At that time additional numerical aberrations including an octasomy of the chromosome 21 were detected. (56,XY,+13,+19,+21,+21,+21,+21,+21,+21,+21,+21,+21,+21[14]/46,XY[1]).

This raised the question, what triggered the aneuploidy in this cytogenetically normal CMML during progression of the disease. We therefore performed retrospective analyses 64 months (= time point 2) and 99 months (=time point 3) after initial diagnosis (time point I). This included array-CGH as well as mutational hotspot analysis via a next-generation sequencing-based panel analysis (TruSight™ Myeloid Sequencing Panel, Illumina).

NGS Panel analysis at time point 2 revealed the known JAK2-mutation as well as three further pathogenic variants in TET2, GNAS and SRSF2. The most commonly mutated genes in CMML are SRSF2, TET2 and/or ASXL1 in >80 % of cases. Therefore, the mutations detected at time point 2 very likely did not promote the massive aneuploidy detected later on. At time point 3, a 700 Kb microdeletion leading to the loss of the TET2 gene (4q24 (105863013-106533881)) and two different mutations in the gene NRAS were detected (c.34G>T;p(Gly12Cys) and c.38G>A;p(Gly13Asp)). These mutations occurred into two independent clones with a variant allele frequency of 25% and 10%. According to the hypothesis of Kamata et al. (Am J Cancer Res, 2011 Mechanisms of aneuploidy induction by RAS and RAF oncogenes) the evolution of numerical chromosomal aberrations in cancer cells requires two distinct intertwined characteristics: chromosomal heterogeneity that likely arises through RAS-driven chromosome mis-segregation and a compensatory mechanism for avoiding aneuploidy-induced growth inhibition.

In our patient the development of two different NRAS mutations in the course of transformation into AML strongly suggests that they have a cooperating or even triggering effect in causing aneuploidy.