

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität Ulm
Klinik für Innere Medizin III
(Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie und Infektionskrankheiten)
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

**MOLEKULARZYTOGENETISCHE ANALYSEN
ZUR ALTERSSPEZIFISCHEN INZIDENZ
GENETISCHER VERÄNDERUNGEN
BEIM MULTIPLLEN MYELOM**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der
Medizinischen Fakultät der
Universität Ulm

vorgelegt von Astrid Wille
aus Crailsheim
2007

Meiner Mutter

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hartmut Döhner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Möller

Tag der Promotion: 22. November 2007

INHALT**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Das Multiple Myelom – eine Tumorerkrankung des Älteren	1
1.2 Charakteristika der Erkrankung.....	4
1.2.1 Nosologische Einordnung.....	4
1.2.2 Epidemiologie	5
1.2.3 Klinisches Bild.....	5
1.2.4 Diagnosekriterien und Stadieneinteilung.....	6
1.3 Therapeutische Optionen	8
1.3.1 Chemotherapie und autologe Transplantationsverfahren	8
1.3.2 Neue Behandlungsansätze	8
1.4 Genetik.....	9
1.4.1 Chromosomale Aberrationen beim Multiplen Myelom.....	9
1.4.2 Pathogenetische Relevanz genetischer Veränderungen	10
1.4.3 Prognostische Relevanz genetischer Veränderungen	12
1.5 Ziele und Ausblick	13
2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Patienten.....	14
2.1 Zellpräparation	14
2.2 BAC- und PAC-Präparation.....	16
2.3 DNA-Sonden für die FISH	18
2.4 Nick-Translation	19
2.5 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH).....	20
2.5.1 Hybridisierung.....	20
2.5.2 Detektion.....	22
2.6 Auswertung und Dokumentation	24
2.7 Reagenzien und Chemikalien	24
2.8 Statistik.....	27

3. ERGEBNISSE	28
3.1 Inzidenz chromosomaler Aberrationen im untersuchten Kollektiv	28
3.2 Korrelation genetischer Veränderungen.....	32
3.3 Altersabhängigkeit genetischer Veränderungen – Datenbankanalyse	35
3 DISKUSSION	36
3.2 Inzidenz chromosomaler Aberrationen beim Multiplen Myelom	36
3.2.1 Zugewinne der Chromosomenregionen 9q, 11q und 1q.....	36
3.2.2 Deletion 13q14.....	38
3.2.3 Chromosom 17p-Veränderungen.....	38
3.2.4 Deletion 22q11.....	39
3.3 Korrelation genetischer Veränderungen.....	39
3.4 Altersabhängigkeit genetischer Veränderungen.....	41
4. ZUSAMMENFASSUNG	43
LITERATURVERZEICHNIS	43
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	
DANKSAGUNG	
LEBENS LAUF	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACG-Mix	<i>Adjusted Clinical Group</i> Mix aus dATP, dCTP + dGTP
AML	Akute myeloische Leukämie
AML1	Gen auf Bande 21q22
AMCA	7-Amino-4-Methylcoumarin-Essigsäure
ALL	Akute lymphatische Leukämie
1q	Langer Arm von Chromosom 1
1q-	Verlust des langen Armes von Chromosom 1
+1q	Zugewinn des langen Armes von Chromosom 1
17p	Kurzer Arm von Chromosom 17
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
bcr-abl	Fusionsgen auf Chromosom 22
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CISS	Chromosomale in-situ Suppression
CKS1B	Gen auf Chromosomenbande 1q21
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
DAPI	<i>4,6-diamidino-2-Phenylindole</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNAse	Desoxyribonuklease
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DKK1	Dickkopf1 - Gen
DSMM	Deutsche Studiengruppe Multiples Myelom
dATP, dCTP, dGTP	Desoxyadenosin-/cytosin-/guanintriphosphat
16-dUTP	16-Desoxyuraciltriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EFS	<i>Event Free Survival</i>
ETO	wahrscheinlich transcription activator, 8q22

FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
HHV8	Humanes Herpesvirus der Gruppe 8
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IgA, IgD, IgG, IgM	Immunglobuline der Klasse A, G und M
IgH	Immunglobulin-Schwerkette (<i>heavy</i>)
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
IRS	<i>Interspersed Repetitive Sequences</i>
κ	Kappa
Kbp	Kilobasenpaare
λ	Lambda
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
M. Hodgkin	Morbus Hodgkin
MM	Multiplres Myelom
Mbp	Megabasenpaare
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
OS	<i>Overall Survival</i>
PAC	<i>P1-Artificial Chromosome</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
p53	Tumorsuppressorgen
Rb1	Retinoblastomgen
RPMI	<i>Roswell Park Institute Memorial Zellmedium</i>
SD	<i>Standard Deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
SSC	<i>Saline sodium citrate</i>
TEL	Translocation ets leukaemia, transcription factor, 8q22
tri/tetra 1	Trisomie/Tetrasomie Chromosom 1
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1 Das Multiple Myelom – eine Tumorerkrankung des Älteren

Das Multiple Myelom ist eine hämatologische Tumorerkrankung, die typischerweise den älteren Menschen betrifft. Rund drei Viertel aller Myelompatienten sind bei Diagnosestellung älter als 60 Jahre; nur etwa 5% sind zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 40 Jahre (PALUMBO et al., 2004). Vergleicht man die Inzidenz einer Reihe hämatologischer Neoplasien bezüglich ihrer Manifestation in verschiedenen Lebensabschnitten, so zeigen sich erhebliche Unterschiede. Das Auftreten lymphoproliferativer Erkrankungen nimmt nahezu exponentiell mit dem Lebensalter zu. Eindeutig ist die Abhängigkeit insbesondere bei den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Eine klare Abhängigkeit besteht auch beim Multiplen Myelom (MM) und der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL). Weniger ausgeprägt zeigt sie sich bei den myeloischen Erkrankungen, der akuten (AML) und der chronischen myeloischen Leukämie (CML). Die akute lymphatische Leukämie (ALL) hingegen hat ihren Häufigkeitsgipfel im frühen Kindesalter. Kein Zusammenhang zwischen Lebensalter und Inzidenz ist beim M. Hodgkin erkennbar (s. Abbildung 1 und 2).

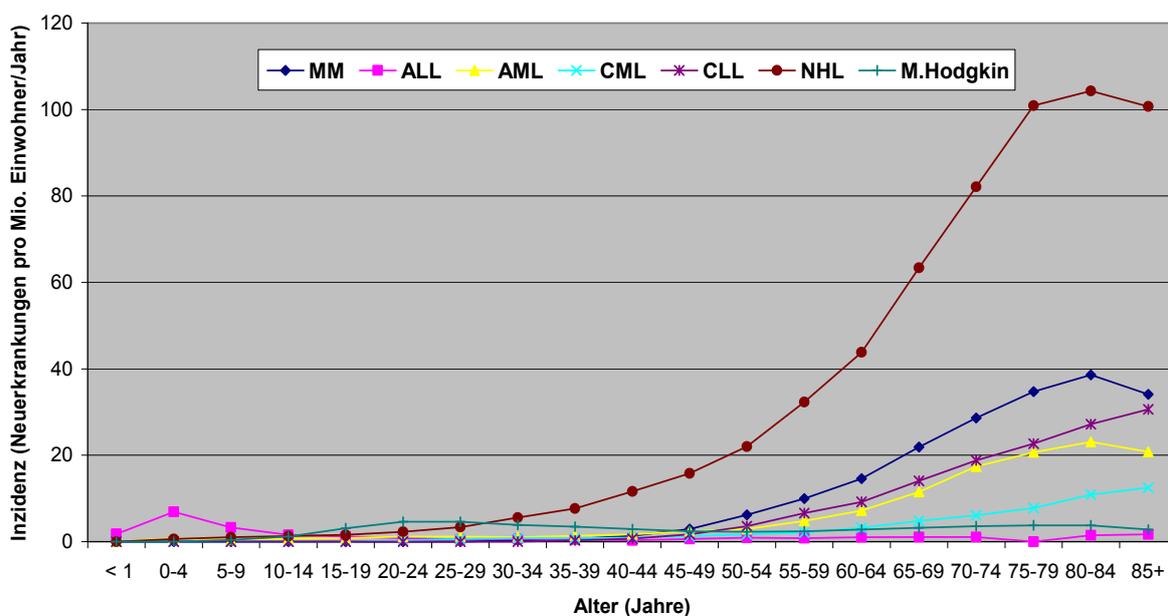


Abbildung 1: Inzidenz hämatologischer Tumorerkrankungen

(SEER-Programm, USA, 1997-2001; Quelle: Cancer Statistics Review 1975-2001, National Cancer Institute).

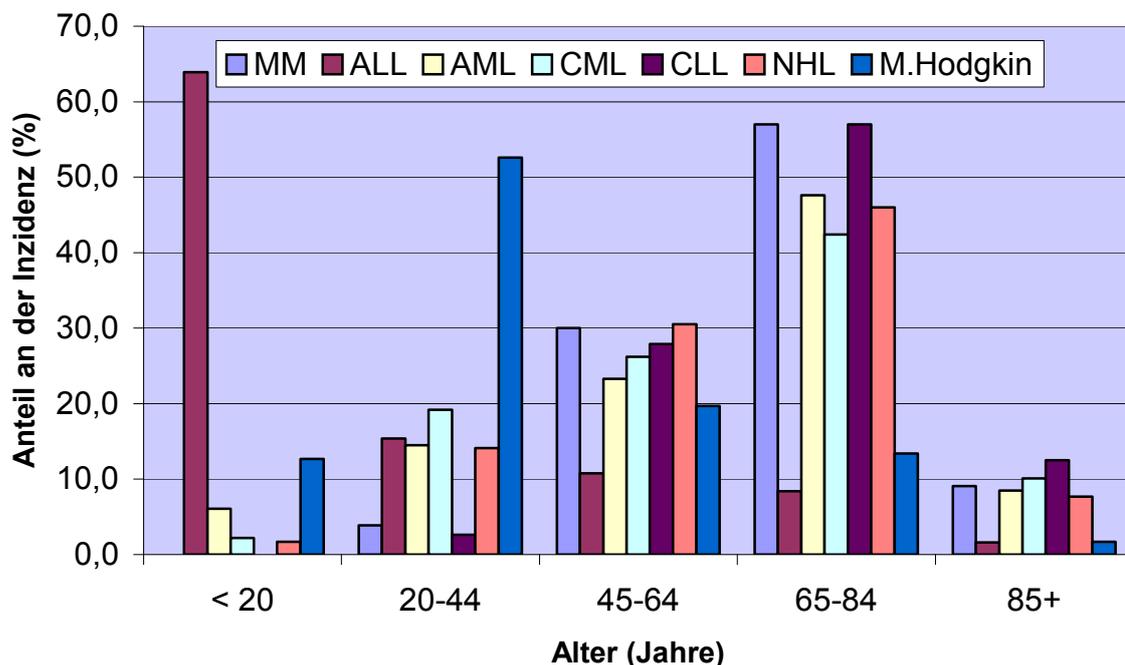


Abbildung 2: Altersverteilung hämatologischer Neoplasien

(SEER-Programm, USA, 1997-2001; Quelle: Cancer Statistics Review 1975-2001, National Cancer Institute).

Angesichts des steigenden Durchschnittsalters der Bevölkerung, vor allem in den westlichen Industrieländern, nimmt insbesondere in der Gruppe der älteren Patienten die Bedeutung hämatologischer Tumorerkrankungen als Ursache für Morbidität und Mortalität zu. Dies gilt auch für das Multiple Myelom. Dem Anspruch auf eine optimale Therapie, sowohl im Hinblick auf die klassischen Überlebensparameter wie auch hinsichtlich der Lebensqualität, stehen häufig zum einen eine limitierte Erfahrung des Behandlers und zum anderen die oftmals begrenzten Möglichkeiten in der Behandlung dieses stetig wachsenden Patientenkollektivs gegenüber. Ältere Patienten qualifizieren zum einen häufig aufgrund vorhandener Komorbidität nicht für intensivere Therapiemaßnahmen im Rahmen von klinischen Studien, zum anderen werden sie im Gegensatz zu jüngeren Patienten oft auch wegen bestehender Vorbehalte des Behandlers nicht in spezialisierte Zentren überwiesen. Dies hat zur Folge, dass die klinische Erprobung und der Einsatz neuer Erfolg versprechender Therapiemodalitäten häufig auf „jüngere“ Patienten, also Patienten bis zu einem Alter von etwa 60-65 Jahren, beschränkt sind. (WESTIN et al. 2004)

Aus aktuellen Studien, wenn auch in begrenztem Ausmaß vorhanden, lassen sich Erklärungsansätze bezüglich „altersspezifischer“ biologischer Prozesse in der Tumorigenese ableiten. Die Entschlüsselung altersbezogener Unterschiede in der Pathogenese von Tumorerkrankungen auf molekularbiologischer Ebene könnte demnach einen wichtigen Beitrag in der Entwicklung krankheitsspezifischer Behandlungsmodalitäten leisten.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die unterschiedliche Prävalenz hämatologischer Neoplasien in verschiedenen Altersgruppen ist der Zusammenhang zwischen zeitabhängiger Zellalterung und Tumorentstehung. Hochaktive Zellproliferation, beispielsweise bei der physiologischen Regeneration des Darmepithels wie auch im Rahmen der Hämatopoese, beeinflusst direkt das Genom der pluripotenten Ursprungszelle: innerhalb des Zellzyklus entstehen dabei während der DNA-Replikation eine Vielzahl somatischer Mutationen, darunter solche, die potentiell krebserrelevante Gene involvieren können (SHARPLESS et al. 2004).

Hinweise auf die Häufigkeit und die Bedeutung dieser molekularen Veränderungen im Genom ergeben sich aus einer Untersuchung zur Leukämogenese an Nabelschnurblut. Rund 1% der von MORI et al. (2002) mittels PCR und FISH untersuchten Nabelschnurblutproben enthielten signifikante Mengen myeloischer Klone, die genomische Rearrangements wie die leukämieassoziierten Fusionsgene TEL-AML1 und AML-ETO aufwiesen. Dies entspricht etwa dem hundertfachen des kumulativen Risikos, an der entsprechenden Leukämie zu erkranken. In einer Untersuchung an Lymphozyten aus peripherem Blut von gesunden Probanden sowie im Rahmen von Autopsien gewonnenen Milzbiopsaten (n= 31) waren mittels PCR bei mehr als einem Drittel des Kollektives reziproke IgH-BCL2-Translokationen nachweisbar, wobei die Inzidenz der t(14;18)(q32;q21)-Translokation – entsprechend dem steigenden relativen Risiko an einem Non-Hodgkin-Lymphom zu erkranken – mit dem Alter zunahm (LIU et al. 1994). Die Translokation t(14;18)(q32;q21), welche charakteristisch für das folliculäre Lymphom ist, resultiert in einer Dysregulation des BCL2-Gens durch regulatorische Sequenzen des IgH-Locus (chromosomale Bande 14q32) mit Inhibition des programmierten Zelltods (Apoptose). 14q32-Translokationen stellen bekanntermaßen ein entscheidendes genetisches Ereignis in der Pathogenese der Non-Hodgkin-Lymphome dar. Da die Prävalenz der Non-Hodgkin-Lymphome in der Bevölkerung jedoch nur ca. 10 pro 100.000 Einwohner/Jahr beträgt, scheinen

potente Tumorsuppressor-Mechanismen die Entwicklung und das Wachstum von Zellen mit IgH-Rearrangements zu kontrollieren.

Der Zelle stehen eine Reihe von Reparaturmechanismen zur Verfügung, um Schäden am Genom und somit eine potentielle maligne Entartung zu verhindern. Dazu zählen Tumorsuppressorgene wie beispielsweise das p16^{INK4a}-Retinoblastoma-Protein (Rb1) und p53 sowie Telomere. Letztere sind Nukleoprotein-komplexe an den Chromosomenenden, deren Länge und Struktur eine wichtige Rolle für die Unversehrtheit der Chromosomen spielen. Eine Telomerverkürzung kann ebenso wie andere mit der Tumorentstehung assoziierte Stimuli, etwa DNA-Schäden oder die Aktivierung bestimmter Onkogene, über die beiden oben genannten Tumorsuppressorgene und deren Regulatoren zum G1-Arrest, einem Stillstand im Zellzyklus, oder direkt zur Apoptose der geschädigten und für den Gesamtorganismus potentiell schädlichen Zelle führen. Störungen in dem komplexen Zusammenspiel dieser Tumorsuppressor- und Regulationsmechanismen, etwa eine Telomerdysfunktion oder die Überexpression von Telomerase, dem Enzym für die de novo-Synthese von Telomeren, können ihrerseits jedoch wiederum zur Tumorentstehung beitragen (SHARPLESS et al. 2004 und dortige Referenzen).

1.2 Charakteristika der Erkrankung

1.2.1 Nosologische Einordnung

Das Multiple Myelom wird nach der WHO-Klassifikation den Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe zugeordnet. Ausgangspunkt der Erkrankung ist eine maligne entartete Plasmazelle. Im Rahmen der klonalen Expansion der Tumorzellen im Knochenmark kommt es typischerweise zum Auftreten von Osteolysen und einer Verdrängung der normalen Hämatopoese. Myelomzellen bilden identische Immunglobuline eines Idiotyps (meist IgG oder IgA, selten auch IgD oder IgM), die aus zwei schweren und zwei leichten Ketten aufgebaut sind. In einem Viertel der Fälle produzieren die entarteten Plasmazellen nur monoklonale Leichtketten vom Typ Kappa oder Lambda. Ungefähr 3% der Multiplen Myelome sezernieren kein Paraprotein („asekretorisches Myelom“).

Die Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS) gilt als „Präkanzerose“ des Multiplen Myeloms. Die jährliche Progressionsrate von der MGUS zum Multiplen Myelom beträgt in Abhängigkeit von der Menge des serologisch nachgewiesenen Paraproteins zwischen 0,5-3% (KYLE et al., 2002). Unterschieden werden weiterhin das sogenannte indolente Myelom mit einem in der Regel über Jahre stabilen, asymptomatischen Verlauf, sowie das solitäre und das extramedulläre Plasmozytom. Die Plasmazell-Leukämie tritt sowohl primär als auch als Endstadium eines Multiplen Myeloms auf und ist durch die Möglichkeit der Plasmazellen, unabhängig vom Knochenmarkmilieu zu proliferieren, gekennzeichnet.

1.2.2 Epidemiologie

Systematischen Erhebungen von Daten zur Inzidenz von Tumorerkrankungen aus den USA (SEER-Programm, Cancer Statistics Review 1975-2001, National Cancer Institute) zufolge macht das Multiple Myelom ungefähr 1% aller malignen Erkrankungen in der weißen Bevölkerung und 2% bei Afro-Amerikanern aus. Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen (RIES et al. 1991). Der Anteil des Multiplen Myeloms an den lymphoretikulären Neoplasien beträgt 13% bei Weißen und 31% bei Afro-Amerikanern. Die Inzidenz liegt in der weißen Bevölkerung bei ca. 4 pro 100.000 und steigt im Alter stark an (auf 30-40 pro 100.000 bei 80-jährigen, RIEDEL et al., 1992). Allein in den USA sterben jährlich etwa 12.000 Menschen an einem Multiplen Myelom. Das entspricht 2% aller Todesfälle durch Tumorerkrankungen und nahezu 20% aller Todesfälle durch hämatologische Neoplasien (MALPAS et al., 1998).

Als Faktoren, die das Risiko einer Myelomerkrankung erhöhen, gelten radioaktive Strahlung, verschiedene Umwelttoxine sowie virale Infektionen (HHV-8, HIV) (DURIE, 2001). Ein gehäuftes familiäres Auftreten des Multiplen Myeloms gilt als gesichert, jedoch ohne eindeutige Evidenz für eine hereditäre Erkrankung (LYNCH et al., 2001).

1.2.3 Klinisches Bild

Häufige Symptome von Patienten mit Multiplem Myelom sind Knochenschmerzen, speziell Rückenschmerzen, und eher unspezifische Symptome wie Müdigkeit

und Leistungsminderung, oft in Folge einer Anämie. Typische Komplikationen der Erkrankung sind pathologische Frakturen aufgrund von Osteolysen, eine erhöhte Infektanfälligkeit sowie eine eingeschränkte Nierenfunktion durch die Ablagerung von Immunglobulin-Leichtketten oder -Schwerketten. Die exzessive Produktion monoklonaler Immunglobuline („Paraprotein“) kann außerdem durch eine Erhöhung der Serumeiweißkonzentration zu einem Hyperviskositätssyndrom führen. Das Multiple Myelom weist einen sehr variablen klinischen Verlauf auf. Die Überlebenszeit von Patienten nach Diagnosestellung kann zwischen wenigen Monaten und vielen Jahren betragen.

1.2.4 Diagnosekriterien und Stadieneinteilung

Zur Unterscheidung zwischen einer reaktiven und einer neoplastischen Plasmazellvermehrung sowie zur Abgrenzung verschiedener Gammopathien untereinander wurden eine Reihe von Diagnosekriterien definiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: *Diagnosekriterien des symptomatischen MM (International Myeloma Working Group, 2003)*

alle 3 Kriterien müssen erfüllt sein:

- 1 Plasmazellen im Knochenmark > 10% und/oder histologisch gesichertes Plasmozytom^a
- 2 Monoklonales Protein im Serum und/oder Urin
- 3 Mindestens einer der folgenden Befunde:
 - Hyperkalzämie (Serum-Kalzium > 10.5 mg/dl)
 - Niereninsuffizienz (Serum-Kreatinin > 2 mg/dl)
 - Anämie (Hämoglobin < 10 g/dl oder 2 g/dl < Norm)
 - Osteolysen oder Osteoporose^b

^a Bei asekretorisches Myelom Plasmazellanteil > 30% und/oder histologisch gesichertes Plasmozytom gefordert

^b Bei Osteoporose ohne Wirbelkörperfrakturen ist ein Plasmazellanteil im Knochenmark von > 30% gefordert

Die Stadieneinteilung erfolgt nach Salmon und Durie (Tabelle 2).

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Durie und Salmon (1975)

Stadium I

Alle Kriterien:

- Hämoglobin > 10 g/dl
- Serum-Kalzium normal
- max. eine Osteolyse
- Niedriges monoklonales Protein im Serum (IgG < 50 g/l, IgA < 30 g/l)
- Bence-Jones-Proteinurie < 4 g/24 h (Elektrophorese)

Stadium II

Weder Stadium I noch Stadium III

Stadium III

Eines oder mehrere der folgenden Kriterien:

- Hämoglobin < 8.5 g/dl
- Serum-Kalzium > 12.0 mg/dl
- fortgeschrittene Osteolysen
- hohes monoklonales Protein im Serum (IgG > 70 g/l, IgA > 50 g/l)
- Bence Jones-Proteinurie > 12 g/24 h (Elektrophorese)

Zusatz:

A: Serum-Kreatinin < 2.0 mg/dl

B: Serum-Kreatinin > 2.0 mg/dl

Das Stadium IA nach Salmon/Durie entspricht nach der Klassifikation der IMWG dem indolenten/asymptomatischen Myelom.

1.3 Therapeutische Optionen

1.3.1 Chemotherapie und autologe Transplantationsverfahren

Die Standardbehandlung von Patienten mit symptomatischem Multiplem Myelom, war jahrzehntelang die orale Chemotherapie mit dem Alkylanz Melphalan und dem Kortikosteroid Prednison (ALEXANIAN et al. 1969). Aufgrund ihrer vergleichsweise guten Verträglichkeit ist diese Kombination für ältere Patienten, die aufgrund entsprechender Begleiterkrankungen für intensivere Behandlungskonzepte nicht in Frage kommen, auch heute noch Therapie der Wahl.

Eine Hochdosistherapie, gefolgt von einer autologen Blutstammzelltransplantation, wie sie seit Mitte der 90er Jahren verfügbar wurde, verbessert die Krankheitskontrolle und das Überleben von Patienten mit Multiplem Myelom im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie signifikant (ATTAL et al. 1996, CHILD 2003). Für Patienten bis zu einem Alter von etwa 60 Jahren gilt der Stellenwert dieser Behandlungsform als gesichert. Derzeit werden Hochdosiskonzepte auch für die Gruppe der über 60-jährigen Patienten evaluiert. Erste Daten zeigen, dass eine altersadaptierte Hochdosistherapie auch bei älteren Patienten sicher durchführbar ist, sofern der Allgemeinzustand und die Komorbidität der Patienten dies zulassen, und der konventionellen Chemotherapie hinsichtlich der Überlebensparameter signifikant überlegen ist (PALUMBO et al. 2004).

1.3.2 Neue Behandlungsansätze: allogene Stammzelltransplantation, Bortezomib

Im Rahmen klinischer Studien werden zur Zeit neue therapeutische Konzepte geprüft, von denen man sich eine Verbesserung der Lebenserwartung oder gar eine mögliche Heilung erhofft. Dazu zählen allogene Blutstammzell-Transplantationsstrategien, die wegen derzeit noch hoher therapieassoziierter Mortalität aufgrund immunologischer Komplikationen (*Graft-versus-Host* Reaktion) sowie Infektionen wiederum hauptsächlich bei Patienten unter 60 Jahren eingesetzt werden (GAHRTON et al. 2001, HUFF et al. 2002). Dosisreduzierte Konditionierungsschemata kommen in jüngster Zeit jedoch auch bei zunehmend älteren Patienten in relativ gutem Allgemeinzustand und ohne schwere Begleiterkrankungen mit vergleichbar geringer therapiebedingter Toxizität und Mortalität zur Anwendung (KRÖGER et al. 2002 und 2003). Das Therapieprinzip der

allogenen Transplantation basiert auf dem sogenannten „*Graft-versus-Myeloma*“-Effekt, eine gegen die Tumorzellen gerichtete immunologische Reaktion der Spender-T-Lymphozyten.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe neuer Substanzen wie beispielsweise Thalidomid und der Proteasomeninhibitor Bortezomib (Velcade™) in die Therapie des Multiplen Myeloms eingeführt und zunächst vor allem bei Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem Myelom eingesetzt. Durch diese Behandlung konnten Ansprechraten von rund einem Drittel bei intensiv vorbehandelten Patienten erzielt werden (SINGHAL et al. 2003, RICHARDSON et al. 2003).

1.4 Genetik

1.4.1 Chromosomale Aberrationen beim Multiplen Myelom

Das Genom der Myelomzellen ist bei nahezu allen Patienten komplex verändert. Abhängig von der Untersuchungsmethode sind chromosomale Veränderungen in unterschiedlicher Häufigkeit nachweisbar.

a) Konventionelle Bänderungsanalyse:

Aufgrund der in der Regel niedrigen Proliferationsrate maligner Plasmazellen können mittels konventioneller Bänderungsanalyse nur bei rund 30-50% der Patienten mit Multiplem Myelom chromosomale Veränderungen identifiziert werden. Sind informative Metaphasen vorhanden, lassen sich bei ungefähr 40% der Patienten mehr als 10 Aberrationen nachweisen (TRICOT et al. 1997). Die Bänderungsanalyse erlaubt zwar einerseits eine Beurteilung des gesamten Genoms, der Nachteil der klassischen Zytogenetik liegt jedoch in ihrem limitierten Auflösungsvermögen. In zytogenetischen Studien betrug die Inzidenz der Monosomie 13/13q-Deletion etwa 15-20% (ZOJER et al. 2000 und dortige Referenzen).

b) Molekularzytogenetische Techniken (CGH und FISH):

Mit weitaus sensitiveren molekularzytogenetischen Untersuchungsmethoden wie der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH), (LIEBISCH et al. 2003a und dortige Referenzen) oder der Fluoreszenz in-situ

Hybridisierung (FISH) gelingt der Nachweis genetischer Veränderungen in über 90% der Myelompatienten (PÉREZ-SIMON et al. 1998, LIEBISCH et al 2003b). Im Gegensatz zur konventionellen Bänderungsanalyse können CGH- und FISH- Analysen unabhängig von sich aktiv teilenden Zellen durchgeführt werden und sind somit gerade für die wissenschaftliche Untersuchung von Tumoren mit niedriger Proliferationsrate, wie etwa dem Multiplen Myelom, geeignet. Der Vorteil der CGH gegenüber der FISH besteht im Wesentlichen in der Möglichkeit der pangenomischen Analyse bei jedoch begrenztem Auflösungsvermögen. Genetische Veränderungen mit einer Größe von weniger als etwa 10 Mbp sowie balancierte Translokationen und Polyploidie können mittels CGH nicht erfasst werden (BENTZ et al., 1998). Die FISH-Analyse ermöglicht dagegen auch die Identifikation kleinerer genomischer Zugewinne und Verluste in einer Größenordnung von einigen Kbp sowie den Nachweis balancierter Aberrationen. Allerdings können pro Experiment bei der FISH nur wenige, in der Regel zwei genomische Loci, bewertet werden. Umfangreiche molekularzytogenetische Untersuchungen ergaben als häufigste numerische Aberrationen Zugewinne der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 sowie Verluste von Chromosom 13, seltener der Chromosomen 14, 16 und 22 (AVET-LOISEAU et al. 2002). Rekurrente strukturelle Veränderungen betreffen vor allem den langen Arm von Chromosom 1 und den IgH-Locus (14q32) im Rahmen primärer oder sekundärer Translokationen (HALLEK et al. 1998).

1.4.2 Pathogenetische Relevanz genetischer Veränderungen

Genetische Veränderungen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese hämatologischer Tumorerkrankungen. Klassisches Beispiel ist die reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 mit Ausbildung eines Fusionsgens (*bcr-abl*) bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML), welches für eine Tyrosinkinase mit pathologisch gesteigerter Aktivität kodiert. Dieses genetische Rearrangement kann in nahezu allen Fällen einer CML nachgewiesen werden (JOHANSSON et al. 2002).

Nach einer in den letzten Jahren entwickelten Modellvorstellung zur Pathogenese klonaler Plasmazellerkrankungen stellen sogenannte primäre Translokationen mit konsekutiver Onkogendysregulierung im Rahmen der Plasmazellontogenese ein initiales und entscheidendes Ereignis dar. IgH-Translokationen sind mutmaßlich frühe pathogenetische Ereignisse, da die Inzidenz der t(14q32) bei der MGUS etwa der beim Multiplen Myelom entspricht. Primäre Translokationen entstehen durch DNA-Doppelstrangbrüche während der B-Zell-Entwicklung im Rahmen des physiologischen Isotypenwechsels sowie der somatischen Hypermutation, durch die eine hohe Antikörperdiversität gewährleistet werden soll. Im Gegensatz zu anderen B-Zell-Neoplasien ist eine Heterogenität der Translokationspartner, von denen bis heute ca. 40 verschiedene bekannt sind, für das Multiple Myelom charakteristisch. Die häufigsten rekurrenten 14q32-Translokationen mit den zugehörigen dysregulierten Onkogenen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: *Inzidenz primärer IgH-Translokationen bei Patienten mit Multiplem Myelom und dysregulierte Onkogene (FONSECA et al. 2004)*

Genlocus	Onkogen	Inzidenz
11q13	Cyclin D1	15-20%
4p16.3	FGFR3 und MMSET	ca. 12%
16q23	c-MAF	5-10%
6p21	Cyclin D3	ca. 5%
6p25	MUM1/IRF4	ca. 5%
20q11	MAFB	ca. 5%

In der immortalisierten Plasmazelle kann es im weiteren Verlauf zu einer Akkumulation zusätzlicher genetischer Aberrationen mit einer Dysregulation weiterer krankheitsrelevanter Gene, z.B. *c-myc*, kommen. Zu diesen Veränderungen gehören Zugewinne und Verluste chromosomalen Materials, Mutationen und sekundäre Translokationen. Diese sekundären Veränderungen stehen in

engem Zusammenhang mit der weiteren Malignisierung und Expansion des Plasmazellklons (FONSECA et al. 2004 und dortige Referenzen).

1.4.3 *Prognostische Relevanz genetischer Veränderungen beim Multiplen Myelom*

Bei vielen hämatologischen Tumorerkrankungen spielen genetische Veränderungen als Prognosemarker eine wichtige Rolle. Auch beim Multiplen Myelom konnten erste genetische Aberrationen mit prognostischer Bedeutung identifiziert werden:

a) Aberranter Karyotyp

Der Nachweis genomischer Aberrationen mittels Bänderungsanalysen ganz allgemein ist mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert (SEONG et al. 1998).

b) Hyplodiploider Chromosomensatz

Patienten, die einen hyperdiploiden Karyotyp ($> 46/47$ Chromosomen) aufweisen, haben eine bessere Prognose als solche mit einem hypodiploiden Chromosomensatz ($< 44-45$ Chromosomen) (SMADJA et al. 1998 und 2001).

c) Verluste von Chromosom 13

Die Deletion 13q/Monosomie 13 konnte als unabhängiger, negativ prognostischer Parameter identifiziert und in einer Reihe retrospektiver Studien bestätigt werden (KÖNIGSBERG et al. 2000, ZOJER et al. 2000). Sowohl im Hinblick auf das ereignisfreie Überleben wie auch das Gesamtüberleben haben Patienten mit 13q-Verlusten sowohl nach konventioneller Chemotherapie als auch nach Hochdosistherapie eine signifikant ungünstigere Prognose (DESIKAN et al. 2000).

Eine Reihe anderer genetischer Aberrationen wurde bezüglich ihrer prognostischen Wertigkeit diskutiert, waren jedoch in multivariablen Analysen keine unabhängigen Prognosemarker. Vor dem Hintergrund einer Vielzahl rekurrenter genetischer Veränderungen einerseits und der ausgeprägten klinischen Hetero-

genität andererseits ist es allerdings sehr wahrscheinlich, dass noch weitere Aberrationen prognostische Relevanz beim Multiplen Myelom besitzen.

1.5 Ziele und Ausblick

Durch Korrelation chromosomaler Veränderungen mit klinischen Variablen gelang in den letzten Jahren die Identifikation erster genetischer Risikofaktoren beim Multiplen Myelom. Diese Analysen erfolgten jedoch überwiegend an Kollektiven „jüngerer“ Patienten bis 60 Jahre. Umfangreichere Datensätze zu genetischen Veränderungen älterer Myelompatienten stehen aus Chromosomen-Bänderungsanalysen zur Verfügung, die einen Nachweis chromosomaler Veränderungen technisch bedingt jedoch nur bei weniger als der Hälfte aller Patienten mit malignen Plasmazellerkrankungen erlaubt. Zusammenfassend fehlen in der Altersgruppe der Patienten über 60 Jahre, die bei weitem die Mehrheit der Myelompatienten ausmacht, molekularzytogenetische Untersuchungen zur Inzidenz chromosomaler Aberrationen sowie deren prognostischer Wertigkeit. Vor diesem Hintergrund erfolgt derzeit die systematische Evaluation chromosomaler Veränderungen mittels FISH und einem umfassenden DNA-Sondensatz im Rahmen eines multizentrischen Studienprotokolls der *Deutschen Studiengruppe Multiples Myelom* zur Hochdosistherapie bei Patienten im Alter von 60-70 Jahren (*DSMM II-Protokoll*).

Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

1. Die Bestimmung der Inzidenz genomischer Veränderungen von sechs repräsentativen Genloci mittels FISH in einem Kollektiv homogen behandelte, älterer Patienten mit fortgeschrittenem Multiplen Myelom (n=110).
2. Die Evaluation einer möglichen Altersabhängigkeit des Auftretens einer Auswahl rekurrenter genetischer Veränderungen vor dem Hintergrund der exponentiellen Zunahme der Prävalenz des Multiplen Myeloms mit dem Lebensalter (Datenbankanalyse an 1800 Patienten).

2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

1.6 *Patienten*

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden Knochenmarkproben von 110 Patienten mit Multiplem Myelom im Stadium II/III, die in der Medizinischen Klinik, Abteilung Innere III der Universität Ulm in Behandlung waren, oder von denen Knochenmarkproben im Rahmen einer multizentrischen Phase III-Therapiestudie in das *Labor für Molekulare und Zytogenetischen Diagnostik* der Universitätsklinik eingesandt wurden, untersucht. Zielsetzung dieser Studie ist die Evaluation des Stellenwertes einer Induktionstherapie vor Stammzellmobilisierung und Tandem-Hochdosis-Melphalan bei Patienten im Alter von 60-70 Jahren mit Multiplem Myelom. Die molekularzytogenetischen Analysen erfolgten nach schriftlichem Einverständnis der Patienten.

Das mittlere Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt des Eingangs der Knochenmarkproben bei 64,7 Jahren (60 bis 68 Jahre). 51 (46%) der Patienten waren weiblich, 59 (54%) männlich. Der prozentuale Anteil der Plasmazellen in den Knochenmarkproben betrug zwischen 1% und 100%, im Mittel 46%.

2.1 *Zellpräparation*

Nach möglichst zeitnaher Aufarbeitung des Probenmaterials (Zellpräparation) wurde die Qualität der Proben zunächst durch mikroskopische Beurteilung panoptisch gefärbter Zytospinpräparate eingeschätzt. Verschiedene Kriterien, wie beispielsweise eine erhaltene Zellmorphologie und ein Plasmazellgehalt von mindestens 1% der mononukleären Zellfraktion, mussten erfüllt sein, damit das Material analysiert werden konnte. Die folgenden Arbeitsschritte werden unter dem Begriff der Zellpräparation zusammengefasst:

1. Isolierung der mononukleären Zellfraktion des Knochenmarks
2. Ggf. Lyse der Erythrozyten und/oder Plasmazellanreicherung
3. Zentrifugation der mononukleären Zellen auf Objektträger
mittels Zytospinzentrifuge

Zur Isolierung der mononukleären Zellfraktion wurde mit Natrium-Heparin im Verhältnis 1:10 versetztes Knochenmark mit RPMI 1640 Medium auf ein Gesamtvolumen von 20 ml verdünnt. Je 20 ml verdünntes Knochenmark wurden in einem 50 ml Plastikröhrchen (*Fa. Becton Dickinson Labware, New York, USA*) vorsichtig auf 20 ml Separationsmedium (Ficoll Separating Solution) überschichtet und anschliessend für 20 min bei 2.800 U/min ohne Bremse zentrifugiert (*Heraeus[®] Zentrifuge Model Minifuge T, Fa. Heraeus, Osterode, Deutschland*). Mit einer sterilen Pipette konnten danach die mononukleären Zellen in der Interphase, d.h. der Grenzschicht zwischen Separationsmedium und dem darüberliegenden Plasma, abgenommen und in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt werden. Die somit gewonnene Zellsuspension wurde zweimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen und 10 min bei 1.200 U/min zentrifugiert.

In einem zweiten Arbeitsschritt wurden je $0,5-1 \times 10^5$ Zellen (*Superfrost color, G. Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland*) mittels Zytospinzentrifuge (*Cytospin[®] 3 Zytozentrifuge, Shandon GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland*) auf einen Objektträger zentrifugiert (3 min bei 1000 U/min, langsame Beschleunigung). Unter einem Phasenkontrastmikroskop (*Axioskop, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland*) wurden Zellqualität und Zelldichte evaluiert mit dem Ziel, eine möglichst gleichmäßige Zellverteilung ohne Überlagerung von Zellen zu erreichen. Zudem wurde anhand der Morphologie eine orientierende Bestimmung des prozentualen Anteils der Plasmazellen vorgenommen. Waren in einem Zellpräparat Erythrozyten in so großer Anzahl vorhanden, dass erwartungsgemäß eine Beurteilung der kernhaltigen Zellen erschwert wurde, konnten diese durch Lyse entfernt werden. Hierfür wurde die Zellsuspension mit einem Lysepuffer¹ versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, daraufhin abzentrifugiert (1-2 min bei 5000 U/min, *Heraeus[®] Zentrifuge Modell Biofuge pico, Fa. Heraeus, Osterode, Deutschland*), der Überstand dekantiert und das Pellet in RPMI 1640 Medium bzw. 1x PBS resuspendiert.

Zudem wurde ein möglichst hoher Anteil an Plasmazellen angestrebt, was wie nachfolgend beschrieben durch eine Plasmazellanreicherung mittels sogenannter immunomagnetischer Separation erzielt wurde. Dazu wurde das Zellmaterial in ein 2 ml Eppendorf[®] Tube überführt, mit Waschpuffer² aufgefüllt, durchmischt und

¹ Lysepuffer: 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ und 0,1 mM Na₂EDTA (pH 7,4)

² Waschpuffer: 1xPBS und 2 mM EDTA

2 Minuten bei 5000 U/min abzentrifugiert. Pro 1×10^7 Gesamtzellzahl wurden 180 μl MiniMacs-Puffer³ sowie 20 μl sogenannter CD138-Microbeads (*Fa. Miltenyl Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland*) zugegeben. Bei letzteren handelt es sich um eisenbeladene Antikörper, die selektiv an Zellen binden, die das Oberflächenantigen CD138 exprimieren. Die auf diese Weise markierten Plasmazellen konnten wie folgt separiert werden: Hierzu wurde der Ansatz 15 min im Kühlschrank (bei 4°C) inkubiert. Danach wurde das Eppendorf® Tube mit sogenanntem MiniMacs-Puffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert (2 min bei 5000 U/min). Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 1 ml MiniMacs-Puffer aufgenommen. Die Zellseparation zur Gewinnung der eisenmarkierten Plasmazellfraktion an einer Magnetsäule wurde automatisiert mit dem AutoMacs-Gerät (*Fa. Miltenyl Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland*) durchgeführt. Nach Bestimmung der Zellzahl und Anfertigung einer Schnellfärbung zur Beurteilung von Materialqualität, Zelldichte sowie näherungsweise Bestimmung des Plasmazellanteils anhand morphologischer Kriterien erfolgte die Aufarbeitung der Zellen wie oben beschrieben.

Pro Patient wurden auf diese Weise bis zu 24 Zytospinpräparate erstellt, die über Nacht luftgetrocknet und in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration (70%-90%-100% Ethanol, je 3 min) dehydriert wurden. Danach wurden die Präparate mit einem Deckglas (100x100 mm) versehen, das mit Fixogum luftdicht verklebt wurde, und in Plastikboxen zu je 200 Stück bei -20°C gelagert.

2.2 BAC- und PAC-Präparation

Unter dem Begriff BAC-/PAC-Präparation versteht man die Klonierung und Amplifikation von genomischer DNA in *E. coli*-Plasmiden mit nachfolgender Isolierung der vervielfältigten DNA. Verwendet wurden *P1-Artificial Chromosome* (PAC)- und *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC)-Vektoren, die sich durch eine leichte Präparation und dauerhafte Stabilität auszeichnen. Aufgrund ihrer mit durchschnittlich ca. 120 kb im Vergleich zu YAC-Sonden (*yeast artificial chromosomes*) kleineren Insert-Größe ergeben sie außerdem sehr klar abgrenzbare Fluoreszenz-signale. BAC-Klone besitzen ein Resistenzgen gegen

³ MiniMacs-Puffer: 1xPBS, 2 mM EDTA und 0,5% BSA, steril filtriert

Chloramphenicol, PAC-Klone ein Resistenzgen gegen Kanamycin. Bei der Kultivierung der Klone kann nun durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums das Wachstum anderer Bakterienstämme und damit eine Kontamination von Kulturen rekombinanter E. coli-Stämme verhindert werden.

Zu Beginn der BAC-/PAC-Präparation wurden die rekombinanten E. coli-Stämme auf Bakterienagar-Platten (1,5 % Bakterienagar in autoklaviertem LB-Medium, Endkonzentration von Chloramphenicol bzw. Kanamycin je 25 µg/ml) ausgestrichen und für 24 h bei 37°C kultiviert. Für die sogenannten Vorkulturen wurden je 5 ml LB-Medium in sterile 15 ml-Plastikröhrchen gefüllt, mit einer einzelnen Kolonie beimpft und für ca. 8 h bei 37°C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurden je 500 ml autoklaviertes LB-Medium pro Kultur in sterile Erlenmeyerkolben gefüllt und entsprechend dem Vektortyp Kanamycin oder Chloramphenicol zugegeben. Nach Beimpfung mit einer Vorkultur erfolgte die Inkubation bei 37°C für weitere 12-16 h auf einem Schüttelinkubator.

Für die DNA-Extraktion wurde ein *Plasmid Purification Kit (QIAGEN Maxi Kit, Qiagen® GmbH, Hilden, Deutschland)* verwendet. Die E. coli-Kulturen wurden in Plastikgefäße (500 ml) mit Schraubverschluß umgefüllt und 20 min bei 6000 U/min in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge (*JA-10 Rotor, Fa. Beckmann, München, Deutschland*) zentrifugiert. Das aus den Bakterien bestehende Pellet wurde nach vorsichtigem Abkippen des Überstandes mit 10 ml eines sogenannten Resuspensionspuffers¹ vollständig resuspendiert. Zu der Bakteriensuspension wurden 10 ml Lysepuffer² zugegeben, das Ganze rotierend gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Neutralisationspuffer³ wurde erneut vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Zur Separation von Proteinen, Zelltrümmern und SDS (Sodiumdodecylsulfat) folgte daraufhin eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 8000 U/min (*Rotor 10.0, Fa. Beckman, München, Deutschland*). Der klare Überstand wurde anschließend über einen mit Aqua dest. angefeuchteten Filter gegeben, um gröbere Verunreinigungen zu beseitigen. Währenddessen wurden QIAGEN®-tip 500-Säulen mit je 10 ml einer Pufferlösung⁴ äquilibriert. Der gefilterte Überstand wurde nun auf die vorbereiteten Säulen

¹ 50 mM tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

² 200 mM NaOH, 1% SDS

³ 3.0 M Kaliumacetat, pH 5.5

⁴ 750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% Isopropanol; 0.15% Triton®

pipettiert. Anschließend wurden je 30 ml Waschpuffer⁵ über die Säulen gegeben, um die restlichen Verunreinigungen aus der Präparation zu entfernen. Durch Zugabe von je 25 ml eines im Wasserbad auf 50°C erwärmten Elutionspuffers⁶ wurde die DNA in neue 50 ml Plastikgefäße eluiert. Zur Fällung der DNA wurden daraufhin 17,5 ml Isopropanol in das Eluat pipettiert und dieses nach kurzem Mischen sofort 45 Minuten mit 4000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und das DNA-Pellet mit 5 ml 70% Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 4000 U/min. Zuletzt wurde der Überstand abgegossen, das DNA-Pellet luftgetrocknet und die DNA-Konzentration nach Resuspendierung mit Aqua destillata photometrisch gemessen.

2.3 DNA-Sonden für die FISH

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten FISH-Untersuchungen wurde einer Auswahl von DNA-Sonden aus einem umfassenden, bereits etablierten DNA-Sondensatz zum Nachweis der häufigsten genetischen Veränderungen beim Multiplen Myelom verwendet. Aktuelle Untersuchungen weisen auf hohe Inzidenzen von Zugewinnen der Chromosomen 1q, 9q und 11q hin, die jeweils bei rund 35-50% der Patienten nachweisbar sind. Diese hohen Inzidenzen lassen Rückschlüsse auf eine mögliche biologische Bedeutung der genannten Aberrationen zu. Die Deletion 13q tritt in einer vergleichbaren Häufigkeit auf und ist als unabhängiger Prognosemarker in ihrer klinischen Relevanz unumstritten. Diskutiert wird auch eine prognostische Wertigkeit von Chromosom 17p- und 22q-Verlusten, deren Inzidenz etwa 5-10% bzw. 10-15% beträgt. Daher wurden die nachfolgenden Sonden ausgewählt: 1q43 (BAC 71L20/BAC 210F8), 9q34.2 (BAC 40A7), 11q22.3/11q25 (PAC 755b11/BAC 17M17), 13q14 (PAC 273/3), 17p13 (PAC p53) und 22q11 (PAC L11257Q13).

⁵ 1.0 M NaCl ; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% Isopropanol

⁶ 1.25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; 15% Isopropanol

2.4 Nick-Translation

Bei der Nick-Translation handelt es sich um ein Verfahren zur spezifischen Markierung von Sonden-DNA, bei dem durch den Einbau chemisch modifizierter Desoxyribonukleosid-Triphosphate die DNA im Anschluß an die Hybridisierung mit Hilfe von Fluoreszenz-Antikörpern im Interphasekern nachgewiesen werden kann. Setzt man DNA niedrigen Konzentrationen von DNase I aus, so entstehen Einzelstrangbrüche (engl.: „nicks“), die durch das aus E.coli gewonnene Enzym DNA-Polymerase I wieder geschlossen werden können. Dabei werden unter Abspaltung von Pyrophosphat den Basen des intakten DNA-Stranges komplementäre Desoxy-ribunukleosid-Triphosphate in das Molekül integriert. Werden der DNA-Polymerase neben dATP, dGTP und dCTP auch chemisch veränderte Nukleotide, wie beispielsweise digoxigeniertes oder biotinyliertes 16-dUTP angeboten, so werden diese Re-portermoleküle an den statistisch verteilten Stellen in die DNA eingebaut (LANGER et al. 1981, HEILES et al. 1988). Die Sonden-DNA wird darüber hinaus durch die DNase in kurze Fragmente geschnitten, deren Länge zwischen 200 und 500 Basenpaare betragen sollte, was ihr die Penetration durch die Kernmembran erleichtert.

Reaktionsansatz für die Nick-Translation von 3 µg DNA

3 µg Sonden-DNA
10 µl 10x konzentrierter Puffer⁷
10 µl Beta-Mercaptoethanol
10 µl Biotin-16-UTP + ACG-Mix⁸ bzw.
Digoxigenin-16-UTP + ACG-Mix
1,5 µl DNase-I-Stammlösung⁹ (1:500 verdünnt)
3 µl DNA-Polymerase I aus E. coli 10⁴ Units/ml
ad 100 µl Aqua distillata

⁷ 0.5 Tris-HCl/pH 8.0, 50 mM MgCl₂, 0.5 mg/ml Bovines Serum Albumin (BSA)

⁸ ACG-Mix = dATP, dCTP, dGTP je 0.5 mM

⁹ Dnase-Stammlösung: 3 mg Dnase I in 0.5 ml 0.3 M NaCl + 0.5 ml Glycerin, 1:1000 verdünnt

Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten in 1,5 ml-Plastikröhrchen (*Fa. Eppendorf Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland*) im Wasserbad bei 15°C inkubiert. Es folgte eine Überprüfung der DNA-Fragmentlänge. Dazu wurde ein Aliquot von 7 µl mit 1 µl Bromphenol-Xylencyanol-Gemisch versetzt. Dieses wurde neben einem 1 Kilobasen-Größenmarker (1 Kb DNA Ladder) auf ein Agarose-Gel (1,5%ig in 1x TAE-Puffer) aufgetragen und bei 120 Volt 25 Minuten im elektrischen Feld aufgetrennt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid zu dem Agarose-Gel konnten DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die durch unspezifisch gesetzte Strangbrüche durch die DNase entstanden sind, anschließend unter UV-Licht als Aufhellungszone auf dem Gel sichtbar gemacht werden. Lagen Teile dieser hellen Zone oberhalb der 500 Kb-Bande des Größenmarkers, so erfolgte ein Nachverdau mit frisch zugesetzten Enzymen. Hatten die DNA-Fragmente die gewünschte Länge erreicht, wurde der DNase-Verdau gestoppt, indem 2 µl 0,5 M EDTA sowie 1µl 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) zugegeben und die Probe danach für 10 Minuten bei 65°C auf dem Heizblock belassen wurde. Anschließend wurde der Reaktionsansatz durch Säulenelution in der Zentrifuge (5 Minuten bei 2500 U/min) von überschüssigen Nukleotiden gereinigt. Die hierfür verwendeten 1 ml Sephadex G 50-Säulen wurden zuvor mit Säulenpuffer (10 mM Tris-HCl/pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1% SDS) mehrfach durch Zentrifugation gewaschen und äquilibriert. Das Eluat wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.5 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)

2.5.1 Hybridisierung

Die Hybridisierungsexperimente wurden als Chromosomale-In-Situ-Suppressions (CISS)-Hybridisierungen durchgeführt (CREMER et al. 1988, LICHTER et al. 1988). Die bei dieser Form der in-situ Hybridisierung verwendete Sonden-DNA enthält hochrepetitive Sequenzen, sogenannte *interspersed repetitive sequences (IRS)*. Diese müssen durch Zugabe von humaner Cot-1 DNA aus Plazentagewebe, die ebenfalls hochrepetitive Sequenzen enthält, supprimiert werden, um unspezifische Bindungen der DNA-Sonden zu verhindern. In einem als *Preannealing* bezeichneten Teilschritt des Experiments kann die denaturierte

Cot-1 DNA an die hochrepetitiven Sequenzen der gleichfalls in Einzelsträngen vorliegenden Sonden-DNA binden. Aufgrund der geringen Komplexität und der Häufigkeit der hochrepetitiven Sequenzen geschieht diese Bindung innerhalb weniger Minuten. Erst nach Abschluß des *Preannealings* wird die Sonden-DNA auf den vorbereiteten Objektträger aufgetragen und für mehrere Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit können schließlich die komplexen Einzelsequenzen an ihre komplementären Zielsequenzen binden.

Ablauf eines Drei-Farben-Experimentes (Ansatz pro Objektträger)

Vorbereitung der Sonden-DNA

Der Sondenansatz, bestehend aus je 200 ng einer biotinylierten und einer digoxi-genierten DNA-Sonde sowie 10 µg Cot-1 DNA und 1 µg Lachssperma-DNA als Träger, wurden in einem 1,5 ml Plastikgefäß (Eppendorf) mit 3 M Natriumacetat/pH 5.2 (1/20 des DNA-Volumens) und bei -20°C aufbewahrtem 100 % Ethanol (2,5-faches des DNA-Volumens) gemischt und anschließend für 30 Minuten bei -80 °C gefällt. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 13 000 U/min (*Biofuge fresca, Fa. Heraeus Osterode, Deutschland*). Danach wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit 400 µl 70%igem Ethanol (4°C kalt) für 15 Minuten bei 13 000 U/min gewaschen. Nach vollständigem Abpipetieren des Überstandes wurde das Pellet in einer Vakuumzentrifuge (*Speed Vac Concentrator, Savant Instruments, Hicksvill, USA*) getrocknet. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 5 µl deionisiertem Formamid und 15-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur, des weiteren durch Hinzufügen von 5 µl Hybridisierungspuffer, bestehend aus 4x SSC (saline & sodium citrat) und 20 % Dextransulfat, und erneutem Schütteln (15 Minuten bei Raumtemperatur) die Resuspension des Pellets. Daraufhin wurde die DNA 6 Minuten lang bei 75°C auf dem Heizblock denaturiert und schließlich für weitere 8 Minuten zum *Preannealing* auf einem 37°C warmen Heizblock belassen.

Vorbereitung der Patienten-DNA

Parallel zur Bearbeitung des Sondenansatzes wurde das Zytospinpräparat für die Hybridisierung vorbereitet. Zunächst wurde der bei -20°C aufbewahrte Objektträger vorsichtig aufgetaut und schrittweise erwärmt (je 30 Minuten bei 4°C, Raumtemperatur, 37°C und 60°C). Um das Zytoplasma und den Zellkern der

Plasmazellen für die DNA-Sonden durchlässiger zu machen, wurde der Objektträger anschließend für 4 Minuten mit Pepsin behandelt. Hierfür wurden 2 ml Pepsin (1 mg/ml) in 98 ml 0,01 N HCl bei 37°C im Wasserbad gelöst. Danach folgte ein Waschschrift bei Raumtemperatur mit 1x PBS (Phosphate buffered saline) für 5 Minuten, anschließend eine 6-minütige Fixierung mit 1%iger Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur und ein erneuter Waschschrift mit 1x PBS (5 Minuten bei Raumtemperatur). Durch Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% - 90% - 100% Ethanol, je 5 Minuten bei Raumtemperatur) und darauf folgendes Erwärmen in einem Ofen (10 Minuten bei 60°C) wurden die Objektträger auf die Denaturierung in deionisiertem Formamid (70%ig in 2x SSC/pH 7.0) für exakt 4 Minuten bei 72°C vorbereitet. Sobald die Denaturierung abgeschlossen war, wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe auf Eis erneut dehydriert und für 1 Minute auf einem 37°C warmen Heizblock getrocknet.

Hybridisierung

Für die eigentliche Hybridisierung wurde die Sonden-DNA luftblasenfrei auf das Zytoplasmaareal des vorbereiteten Objektträgers (siehe oben) aufgetragen, mit einem 18x18 mm großen Deckglas bedeckt und die Ränder des Deckglases mit Klebstoff (*Fixogum Rubber Cement*) abgedichtet und somit gegen Austrocknung geschützt. Das Präparat wurde über Nacht (mindestens 12 h) bei 37°C in einer feuchten Hybridisierungskammer inkubiert.

2.5.2 Detektion

Der Hybridisierungsnachweis wurde automatisiert mit Hilfe eines FISH-Roboters (*Fa. Tecan, Crailsheim, Deutschland*) durchgeführt. Nach Entfernen des Klebstoffes sowie des Deckglases wurden die Objektträger in die Haltevorrichtungen des Gerätes eingespannt und die Reagenzien vorbereitet, die der Roboter nach einem im Folgenden beschriebenen computergesteuerten Programmablauf auf die Zytoplasmafelder der Objektträger pipettierte. Der Sondernachweis wurde mit Waschschriften in Formamid (50%ig in 2x SSC/pH 7,0 für 3 x 5 Minuten) und 0,5x SSC (3 x 5 Minuten) als Vorbereitung für das sogenannte *Blocking* eingeleitet. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen an Proteine wurden die Objektträger mit je

200 µl 3%igem Bovinen Serumalbumin (BSA) in 4x SSC überschichtet und für 30 Minuten inkubiert. Danach folgte die eigentliche Detektion mit an Antikörper gekoppelten Fluorochromen, die in einer Verdünnung von 6 µl Anti-Digoxigenin-Fluorescein bzw. 1 µl Streptavidin-Cy3 in jeweils 200 µl 1,5%igem BSA / 4x SSC analog der *Blocking*-lösung aufgetragen und ebenfalls 30 Minuten lang inkubiert wurden. Zur Signalverstärkung des Anti-Digoxigenin-Fluoresceins wurde ein zweiter antikörpergekoppelter Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt (*Fluorescein(FITC)-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Rabbit Anti-Sheep IgG(H+L)*), je 6 µl / 200 µl 1,5% BSA). Überschüssige Farbstoffe wurden durch Waschen in 4x SSC / 0,1% Tween 20 für 3 x 5 Minuten aus dem Präparat entfernt. Anschließend folgte ein letzter kurzer Waschschrift in 1x PBS, bevor die Objektträger nach Beendigung des Programms dem Pipettier-Roboter entnommen werden konnten. Um eine Identifizierung von Plasmazellen im Rahmen der fluoreszenzoptischen Auswertung der Hybridisierungsexperimente zu ermöglichen, wurde ein immunzytologischer Nachweis mit Hilfe von an den Fluoreszenzfarbstoff AMCA (7-Amino-4-Methylcoumarin-3-Essigsäure) gekoppelten Antikörpern gegen den tumorspezifischen Leichtkettentyp (Kappa- oder Lambda-Leichtkette) geführt. War zum Zeitpunkt des Materialeingangs der vom Tumorzellklon sezernierte Leichtkettentyp nicht bekannt, wurden sowohl Antikörper gegen Kappa- als auch gegen Lambda-Leichtketten verwendet. Die AMCA-Antikörper wurden hierfür mit 1x PBS im Verhältnis 1:5 auf ein Gesamtvolumen von 10 µl pro Zytospinareal verdünnt und auf die Objektträger pipettiert. Für die nachfolgende, mindestens 5-stündige Inkubation bei 37°C in der feuchten Kammer, die auch für die Hybridisierung verwendet wurde, wurde das Zytospinareal wiederum mit einem 18x18 mm großen Deckglas versehen, dessen Ränder mit Klebstoff (*Fixogum*) abgedichtet wurden. Zuletzt wurden die Objektträger im Anschluß an die AMCA-Färbung kurz in 1x PBS gewaschen, des weiteren zum Schutz vor dem raschen Verblässen der Fluorochrome mit je 15 µl *VectashieldTM mounting medium* bedeckt und mit einem 24x50 mm großen Deckglas versehen.

2.6 Auswertung und Dokumentation

Für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Präparate stand ein Mikroskop vom Typ *Axioskop* (Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) zur Verfügung. Es wurden DAPI-, FITC- und Rhodamin-Filter verwendet. Die Fotodokumentation erfolgte mittels einer Digitalkamera (CCD; *Charge Coupled Device*) vom Typ *Xylix*. Die Bildbearbeitung wurde mit Hilfe von ISIS Metasystem (Fa. Metasystem, Altlußheim, Deutschland) und *Adobe PhotoshopTM*, Version 6.0 (Fa. Adobe) durchgeführt.

Pro Patient wurden mindestens 100 AMCA-positive Plasmazellen ausgewertet, wobei die Identifikation der Tumorzellen zum einen immunzytologisch, zum anderen unter Berücksichtigung charakteristischer morphologischer Merkmale von Plasmazellen erfolgte. Zur Sicherung der Hybridisierungseffizienz wurde in jedem Hybridisierungsexperiment eine Kombination aus zwei DNA-Sonden mit bekanntem Schwellenwert verwendet, von denen höchstens eine eine Deletion, d.h. nur ein Signal pro Zelle, aufweisen durfte. Desweiteren wurden nicht nur Plasmazellen, sondern auch mononukleäre Zellen der myeloischen Zellreihe sowie erythropoetische Vorläuferzellen hinsichtlich der Qualität der Hybridisierungseffizienz beurteilt. Die FISH-Analyse erfolgte bei 64 Patienten ohne vorherige Plasmazellanreicherung. In den übrigen 46 Fällen wurden die Befunde an mittels immunomagnetischer Separation angereicherten Zytospin-Präparaten erhoben, um für die Auswertung einen möglichst hohen Plasmazellanteil zu erhalten. Als Schwellenwert für eine Aberration wurde der mittlere Anteil abnormer Plasmazellen im Knochenmark gesunder Probanden + 3 SD (20%) zugrundegelegt.

2.7 Reagenzien und Chemikalien

Die im Folgenden aufgeführten Reagenzien und Chemikalien wurden von den nebenstehend genannten Firmen bezogen:

Agarose	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Alpha satellite DNA probe	Fa. Oncor, Heidelberg, Deutschland
AMCA-Antikörper	Fa. Vector, Burlingame, USA

Anti-Digoxigenin-Fluorescein	Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland
Avidin-FITC-DCS-Antikörper	Fa. Vector, Burlingame, USA
Aqua dest. 1000 ml	Fa. Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland
Aqua dest. 10 ml	Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
Bakterienagarose	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fa. Sigma, St. Louis, USA
10 x Blue Juice™	
Gel Loading Buffer	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
CD138 Microbeads	Fa. Miltenyl Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Chloramphenicol	Fa. Sigma, St. Louis, USA
4,6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Fa. Sigma, St. Louis, USA
1 kb DNA Größenmarker (1 kb DNA ladder)	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
DNA-Polymerase I (E.coli)	Fa. New-England-Biolabs, Beverly, USA
DNAse I	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Fa. Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland
Ethidiumbromid	Fa. Eurobio, Les Uilles, Frankreich
Ficoll Separating Solution (Density 1,077)	Fa. Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Fixogum Rubber Cement	Fa. Marabu, Tamm, Deutschland
Fluorescein(FITC)-conjugated Affini-Penn-	Fa. ImmunoResearch, West Grove, sylvania, USA
Pure F(ab') ₂ -Fragment Rabbit Anti-Sheep IgG(H+L)	
Formamid	Fa. T. J. Baker, Deventer, Niederlande
Glycerol	Fa. Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Hefeextrakt (Yeast Extract)	Fa. Difco, Detroit, USA

Humane COT-1 DNA	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
Isopropanol	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Lachs-DNA	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Methanol	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Fa. J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumhydroxid (NaOH)	Fa. J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumcitrat-2-hydrat	Fa. J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Natrium-Heparin	Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
Nukleotide:	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,
1. dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Deutschland
2. Biotin-16-dUTP	
3. Digoxigenin-11-dUTP	
Paraformaldehyd (PFA)	Fa. Merck Darmstadt, Deutschland
10 x PBS Puffer	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
Pepsin	Fa. Böhlinger, Mannheim, Deutschland
Peptone	Fa. Gibco.BRL, New York, USA
RPMI 1640 Waschmedium	Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Fa. J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Sephadex G 50	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Streptavidin-Cy 3	Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl (Tris Puffer)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Türk´sche Färbelösung	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Fa. Fluka Chemie GmbH, Buchs,
Schweiz	
Vectashield™ mounting medium	Fa. Vector, Burlingame, USA

2.8 Statistik

Zur Evaluation möglicher Korrelationen genetischer und biologischer Variablen wurde der exakte Test nach Fisher angewandt. Die Analyse einer möglichen altersassoziierten Varianz im Auftreten molekularzytogenetischer Aberrationen wurde im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Zentrale Einheit Biostatistik, Heidelberg mittels binärem logistischen Regressionsmodell sowie *Proportional Odds Modells* (ordinaler logistischer Regression) an einem 1800 Patienten umfassenden Datensatz geprüft, welcher durch sequenzielle Abfragen aus einer Access-Datenbank des Labors für Zytogenetische und Molekulare Diagnostik der Klinik für Innere Medizin III gewonnen wurde.

2. ERGEBNISSE

2.1 Inzidenz chromosomaler Aberrationen im untersuchten Kollektiv

Im untersuchten Kollektiv war bei 96 von 110 Patienten (87%) mindestens einer von sechs genomischen Loci aberrant. Die häufigsten Aberrationen (in absteigender Häufigkeit) waren: Zugewinne von Chromosom 9q (n=54/110; 49,1%), Zugewinne von Chromosom 11q (n=47/110; 42,7%), Verluste von Chromosom 13q (n=42/110; 38,2%) sowie Zugewinne von Chromosom 1q (n=40/110; 36,4%). Veränderungen mit einer geringen Inzidenz waren Verluste von Chromosom 22q (n=15/110; 13,6%) und Chromosom 17p (n=11/110; 10,0%), Zugewinne von Chromosom 17p (n=6/110; 5,5%) und Chromosom 22q (n=4/110; 3,6%) sowie Verluste von Chromosom 9q (n=3/110; 2,7%). Ein Zugewinn von Chromosom 13q ließ sich in lediglich einem Fall mit tetraploidem Tumorzellklon nachweisen. Verluste von Chromosom 11q und Chromosom 1q waren nicht nachweisbar (Abbildung 3).

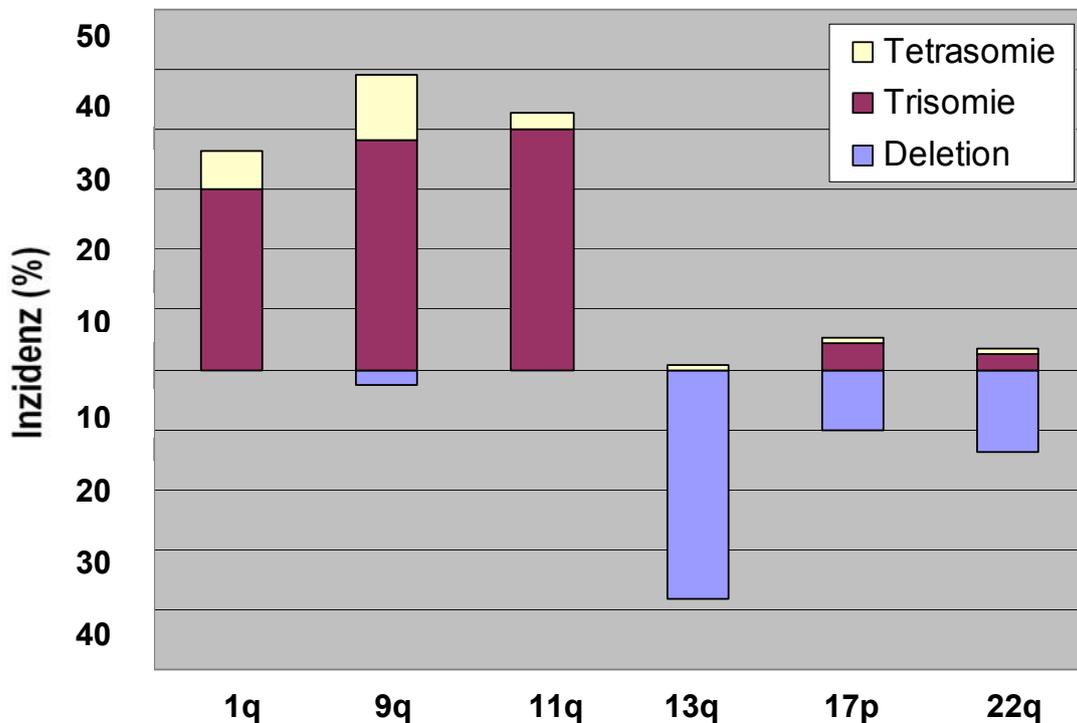


Abbildung 3: Inzidenz (%) chromosomaler Aberrationen im Gesamtkollektiv

Bei 14 Patienten (12,7%) war keine der untersuchten chromosomalen Regionen verändert. In 23/110 Fällen (20,9%) ließ sich eine der oben angeführten Aberrationen nachweisen. 34/110 Patienten (30,9%) wiesen zwei, weitere 28/110 Patienten (25,5%) drei, 9/110 Patienten (8,1%) vier und je 1/110 Patienten (0,9%) fünf bzw. sechs genetische Veränderungen auf (Abbildung 4).

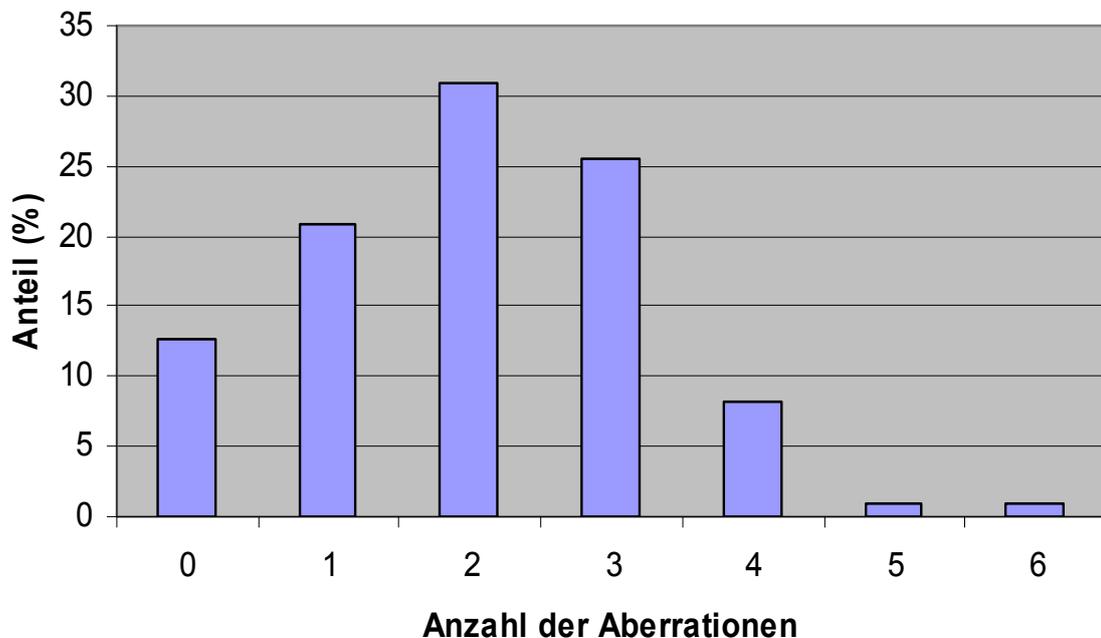


Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung genetischer Veränderungen im Gesamtkollektiv

Der Plasmazellgehalt der untersuchten Zytospin-Präparate lag sowohl vor als auch nach Anreicherung zwischen < 1% und nahezu 100%. Der mittlere Plasmazellanteil betrug 32,0% ohne Anreicherung und 66,6% mit Anreicherung. Aberrationen ließen sich in 57/64 (89,1%) der Fälle ohne Anreicherung sowie in 39/46 (84,7%) der Fälle nach Anreicherung nachweisen. Insgesamt waren genetische Veränderungen bei den angereicherten Zytospin-Präparaten jedoch nicht signifikant häufiger nachweisbar als bei Fällen ohne vorherige Anreicherung ($p=0,56$).

Zugewinne von 9q:

Die häufigsten genetischen Veränderungen in der vorliegenden Arbeit waren Zugewinne des langen Armes von Chromosom 9q. Hierbei handelte es sich zumeist um eine Trisomie 9q (n=42/100; 38,2%), seltener um eine Tetrasomie 9q (n=12/110; 10,9%). Ein Fall wies eine Hexasomie 9q mit 80% auf. Der mediane Anteil klonal veränderter Plasmazellen mit 9q-Zugewinn lag bei 82% (50-95%).

Zugewinne von 11q:

Zugewinne von Chromosom 11q waren mit insgesamt 42,7% die zweithäufigste genetische Veränderung im untersuchten Kollektiv. Eine Trisomie 11q lag bei 42 von 110 (40%) Patienten vor, eine Tetrasomie 11q in 3/110 (2,7%) Fällen. Der mediane Anteil klonal aberranter Plasmazellen betrug 86% (37-98%).

Verluste von 13q:

Die Inzidenz von 13q- lag in der vorliegenden Untersuchung bei 38,1%. Der mediane Anteil deletierter Plasmazellen betrug 86% (40-99%). Bei einem Patienten lag eine Tetrasomie 13q14 vor. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um einen Patienten mit tetraploidem Tumorzellklon, da alle sechs untersuchten Genloci in vierfacher Kopienzahl vorlagen.

Zugewinne von 1q:

Unter den Zugewinnen von Chromosom 1q waren Trisomien mit insgesamt 33/110 (30%) Fällen weitaus häufiger vertreten als Tetrasomien, die 7/110 (6,4%) ausmachten. Der mediane Plasmazellanteil mit 1q-Amplifikationen lag bei 81% (34-95%).

Verluste von 22q:

Mit einer Inzidenz von 13,6% waren Verluste von 22q in der vorliegenden Analyse die zweithäufigste Deletion nach der Deletion 13q14. Der mediane Anteil klonal veränderter Plasmazellen lag bei 94% (71-100%).

Verluste von 17p:

Genetische Veränderungen, die die Region 17p13 (p53-Locus) betreffen, waren im untersuchten Kollektiv vergleichsweise selten (n=16/110; 15,4%). Davon entfielen 11/110 (10%) auf eine Deletion 17p mit einem medianen Plasmazellanteil von 83% (60-98%).

Zugewinne von 17p:

Zugewinne von Chromosom 17p waren bei 6/110 (5,5%) Patienten nachweisbar. Es handelte sich hierbei fast ausschließlich um eine Trisomie 17p (n=5/110; 4,5%) mit einem medianen Anteil aberranter Plasmazellen von 82% (75-94%). Eine Ausnahme stellte der o. g. Patient mit einer Tetrasomie (76% aberrante Plasmazellen) bei tetraploidem Chromosomensatz dar.

Zugewinne von 22q:

22q-Zugewinne waren insgesamt sehr selten (n=4/110; 3,6%). Darunter waren 3 Patienten, die eine Trisomie 22q in 40-75% der Plasmazellen aufwiesen, sowie der oben angeführte Patient mit einer Tetrasomie (88%) bei Tetraploidie.

Verluste von 9q:

Eine Deletion 9q war bei 3/110 Patienten (2,7%) nachweisbar. Der mediane Anteil klonal veränderter Plasmazellen mit dieser Aberration betrug 94% (94-97%).

Tabelle 4: Übersicht der Größe aberranter Plasmazell-Klone (in %)

Aberration	Minimum	Maximum	Median
13q-	40%	99%	86%
17p-	60%	98%	83%
22q-	71%	100%	94%
9q-	94%	97%	94%
+1q	34%	95%	81%
+9q	50%	95%	84%
+11q	37%	98%	86%
+17p	75%	94%	82%

3.2 Korrelation genetischer Veränderungen

3.2.1 Leichtkettentyp und Häufigkeit bestimmter Aberrationen

In 94/110 (85%) der Fälle war der Leichtkettentyp zum Zeitpunkt der Analyse bekannt. Plasmazellklone, die Immunglobulin-Leichtketten vom Typ Kappa sezernieren, waren im untersuchten Kollektiv häufiger als solche vom Typ Lambda (65% vs. 35%). Vergleicht man die unterschiedlichen Verteilungsmuster des Leichtkettentyps bei den vier häufigsten genetischen Aberrationen mit ihrer Verteilung im Gesamtkollektiv, so lassen sich daraus folgende Beobachtungen ableiten:

1. Sowohl Verluste von Chromosom 13q als auch Zugewinne von Chromosom 1q waren signifikant häufiger mit dem Leichtkettentyp Lambda assoziiert ($p = 0,008$).

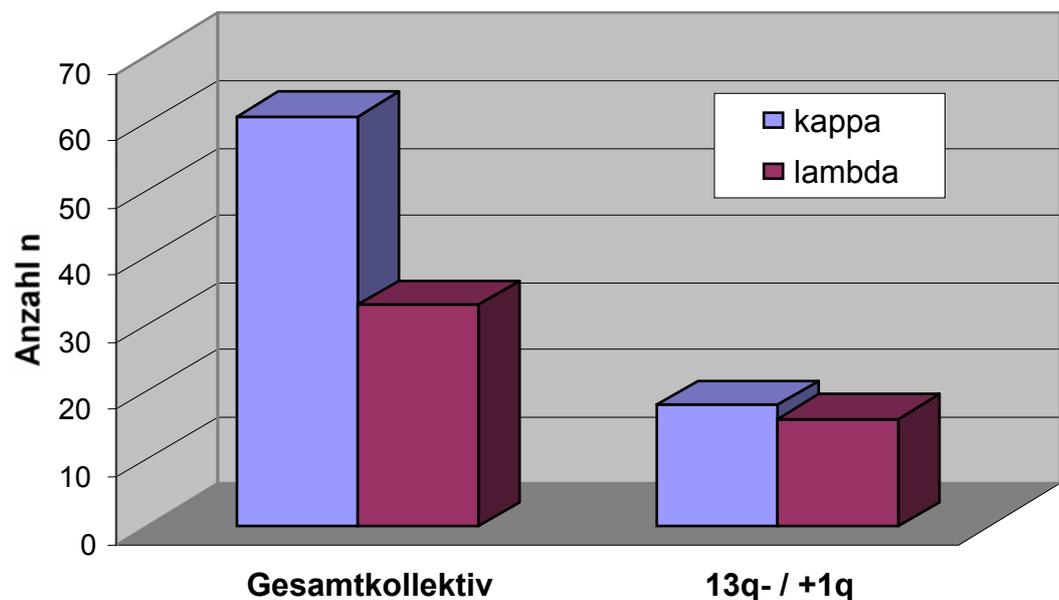


Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung des κ - und λ -Leichtkettentyps bei der Deletion 13q und Zugewinnen von 1q

2. Zugewinne von Chromosom 9q korrelierten weder besonders häufig mit dem Leichtkettentyp Kappa, noch mit dem Leichtkettentyp Lambda ($p = 0,6$).

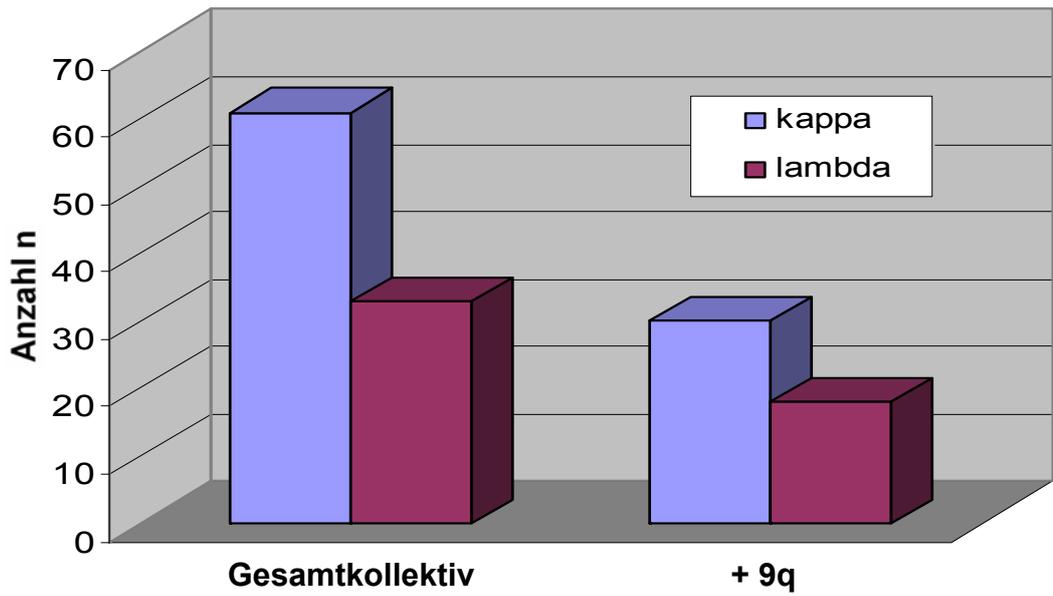


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung des κ - und λ -Leichtkettentyps bei Zugewinnen von Chromosom 9q

3. Zugewinne von Chromosom 11q waren signifikant mit dem Leichtkettentyp Kappa korreliert ($p = 0,03$).

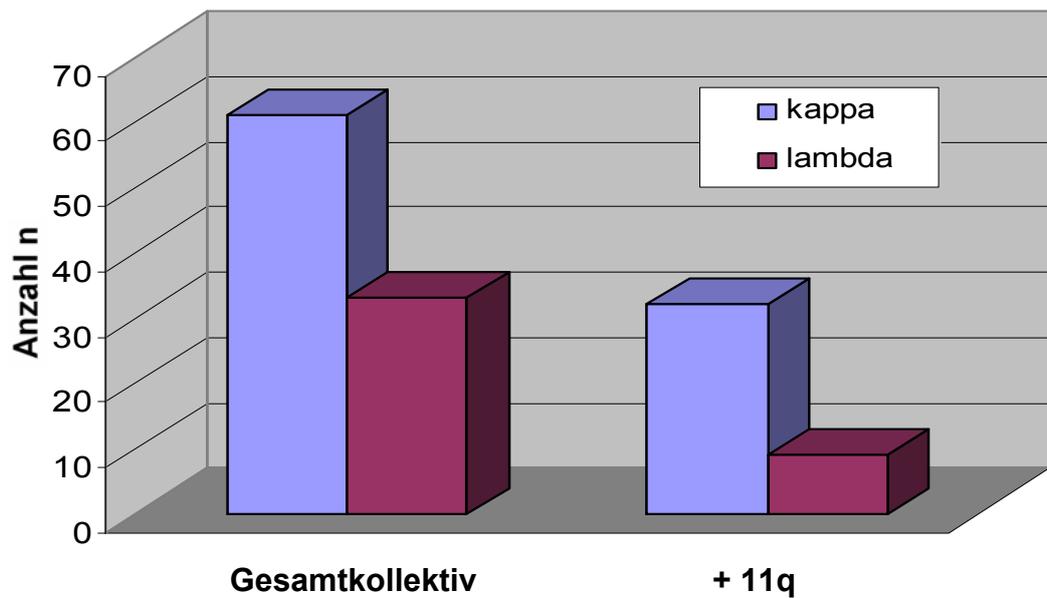


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung des κ - und λ -Leichtkettentyps bei Zugewinnen von Chromosom 11q

Tabelle 5: *Korrelation zwischen dem Leichtkettentyp und den vier häufigsten chromosomalen Imbalancen*

Aberration	Kappa	Lambda	p-Wert
13q-	16/34 (47,1%)	18/34 (52,9%)	0,008
+1q/tetra 1q	16/34 (47,1%)	18/34 (52,9%)	0,008
+9q/tetra 9q	30/48 (62,5%)	18/48 (37,5%)	0,6
+11q/tetra 11q	32/41 (78,0%)	9/41 (22,0%)	0,03

3.2.2 Korrelation genetischer Veränderungen

Mittels exaktem Test nach Fisher wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der einzelnen Aberrationen besteht (s. Tabelle 6). Hierbei ließ sich eine signifikante positive Korrelation der Trisomien 9q und 11q ($p=0,0001$) sowie ein Trend hinsichtlich des gemeinsamen Auftretens von Zugewinnen von Chromosom 1q und Chromosom 11q ($p=0,06$) feststellen. Die Deletion 13q korrelierte hoch signifikant mit Zugewinnen von Chromosom 1q ($p=0,001$). Zudem konnte eine signifikante Korrelation zwischen Verlusten von Chromosom 22q und der Deletion 13q ($p=0,02$) und 9q-Zugewinnen ($p=0,004$) festgestellt werden. Die 17p-Deletion wurde hierbei nicht berücksichtigt, da in diesem Fall die Inzidenz von Zugewinnen bzw. Verlusten zu niedrig für eine statistische Auswertung war.

Tabelle 6: *Positive Korrelation genetischer Veränderungen*

	13q-	+1q	+9q	+11q
13q-	—————	—————	—————	—————
+1q	0,001	—————	—————	—————
+9q	1,00	0,21	—————	—————
+11q	0,11	0,06	0,0001	—————
22q-	0,02	1,00	0,004	1,00

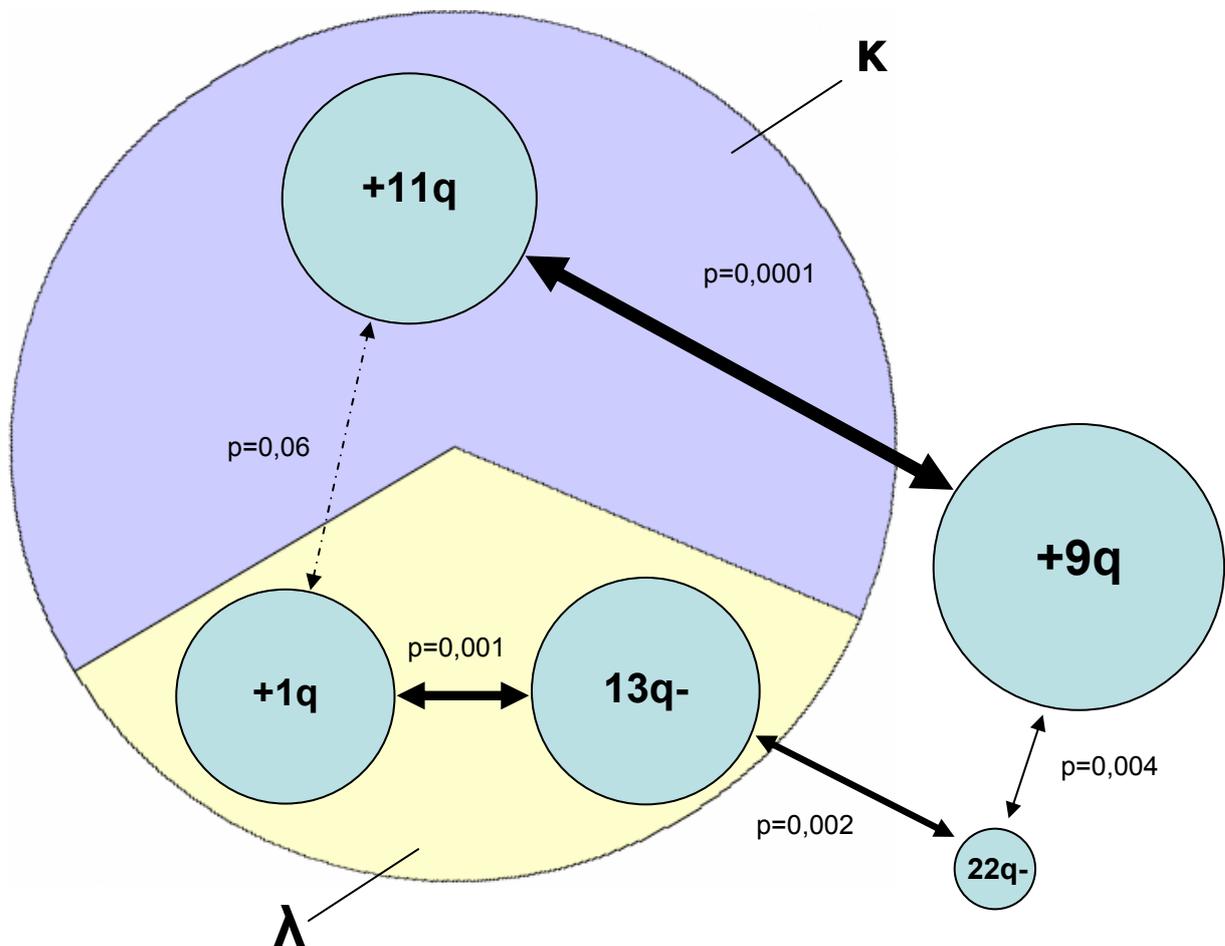


Abbildung 8: *Interaktion genetischer Veränderungen*

3.3 Altersabhängigkeit genetischer Veränderungen – Datenbankanalyse

In einem Kollektiv von insgesamt 1800 in der Datenbank der Medizinischen Klinik der Universität Ulm registrierten Myelompatienten wurde zunächst die Häufigkeitsverteilung der sechs in der vorliegenden Arbeit betrachteten Genloci überprüft. Die prozentualen Zugewinne und Verluste der einzelnen Chromosomen-Regionen entsprachen dabei im Wesentlichen denjenigen im eigenen Kollektiv. Mit Hilfe der binären bzw. ordinalen logistischen Regression wurde der Einfluss des Alters auf die zytogenetische Verteilung der Genloci untersucht. Die Analyse erfolgte an einer Subgruppe von 224 Patienten, von denen zum Zeitpunkt der Untersuchung FISH-Daten zu allen sechs interessierenden Loci vorlagen. Hierbei ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Lebensalter und dem Auftreten bestimmter genetischer Veränderungen.

4 DISKUSSION

4.1 Inzidenz chromosomaler Aberrationen beim Multiplen Myelom

4.1.1 Zugewinne der Chromosomenarme 9q, 11q und 1q

In einer umfangreichen FISH-Studie unseres Labors an insgesamt 357 Patienten mit Multiplem Myelom waren Zugewinne von 9q, 11q und 1q die bei weitem häufigsten Aberrationen (+9q 47,6%, +11q 42,2% und +1q 40,5%, LIEBISCH et al. 2003b). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung an 60-70-jährigen Patienten bestätigen im Wesentlichen die Resultate dieser Analyse.

9q-Zugewinne:

Zugewinne des langen Armes von Chromosom 9q waren im untersuchten Kollektiv bei 49% der Patienten nachweisbar. Somit war die Inzidenz dieser Veränderung in der vorliegenden Untersuchung mit der in der oben angeführten FISH-Studie, welche an einem im Mittel etwa neun Jahre jüngeren Kollektiv (Altersmedian 56 vs. 65 Jahre) erfolgte, vergleichbar. In einer FISH-Analyse an 55 Patienten mit MM, bei der eine Chromosom 9-Zentromerprobe zum Nachweis einer Trisomie 9 eingesetzt wurde, lag die Inzidenz dieser Veränderung bei über 80% und damit deutlich über der, die an in unserem Labor analysierten Kollektiven bestimmt wurde (DESCALESCU et al., 1999). Diese Diskrepanz lässt sich am ehesten durch die geringe Patientenanzahl der letztgenannten Studie und eine möglicherweise unterschiedliche Zusammensetzung der Kollektive, nicht aber durch die unterschiedlichen DNA-Sonden zum Nachweis von Chromosom 9-Zugewinnen erklären (kritische Region dieser Aberration: 9q31-q34).

Die hohe Inzidenz der +9q beim MM lässt eine biologische Relevanz dieser Veränderungen annehmen. Zum anderen stellt sich die Frage nach der prognostischen Bedeutung dieser genetischen Veränderung. Im Rahmen einer multivaten Risikofaktoranalyse unter Einschluss klinischer und genetischer Variablen an einer Serie von 111 Patienten, die eine Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation erhielten, stellten 13q- und +9q die einzigen unabhängigen prognostischen Marker hinsichtlich der beiden Überlebensparameter EFS und OS dar (LIEBISCH 2005).

11q-Zugewinne:

Eine Trisomie 11q lag bei 42 von 110 (40%) der untersuchten Patienten vor, eine Tetrasomie 11q in 3/110 (2,7%) Fällen. Die Inzidenz lag somit im Bereich der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit für 11q-Zugewinne (LIEBISCH et al. 2003b). Zugewinne, die den langen Arm von Chromosom 11 betreffen, sind im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Pathogenese und Prognose der Erkrankung von Interesse. Eine aktuelle Analyse an insgesamt 100 neu diagnostizierten Patienten mittels Metaphase- und Interphase-Fluoreszenz in situ Hybridisierung zeigte zudem eine hohe Variabilität im Hinblick auf die Anzahl der Extrakopien von Chromosom 11q. Die Koexistenz von Subklonen mit partiellen Trisomien oder Tetrasomien könnte demzufolge ein Indikator für anhaltende strukturelle Veränderungen im Krankheitsverlauf sowie für eine klonale Evolution beim Multiplen Myelom sein (CREMER et al., 2005). Für eine prognostische Bedeutung der Trisomie 11q hinsichtlich EFS und OS gibt es derzeit keinen Anhalt (LIEBISCH et al., 2005).

1q-Zugewinne:

Die Inzidenz von Chromosom 1q-Zugewinnen lag in der vorliegenden Arbeit bei 36,4% und war damit vergleichbar mit der in der o.g. Serie ermittelten Inzidenz bei jüngeren Patienten (LIEBISCH et al. 2003b). Sie ist zudem vergleichbar mit der im Rahmen großer FISH-Analysen anderer Arbeitsgruppen bestimmten Inzidenz von 1q-Zugewinnen, welche mit 30-43% angegeben wird (AVET-LOISEAU et al. 2005, FONSECA et al. 2006, HANAMURA et al. 2006). Darüber hinaus war das Verhältnis von Tumoren mit drei (30%) und mehr als drei (6,4%) 1q-Kopien in der vorliegenden Untersuchung mit dem an einem Kollektiv von 476 Patienten nachgewiesenen Ratio vergleichbar (31% und 11%; SHAUGHNESSY et al. 2005). In zytogenetischen Studien sind 1q-Aberrationen mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium, Tumorprogression und kürzerer Überlebenszeit assoziiert (SAWYER et al., 1995). Daten aus aktuellen Studien deuten darauf hin, dass eine Amplifikation und Überexpression des Zellzyklusregulatorgens *CKS1B*, welches in die chromosomale Bande 1q21 kartiert, mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist (SHAUGHNESSY et al., 2005, CHANG et al., 2006). Eine multivariate Risikoanalyse an insgesamt 216 Patienten bestätigte diese Beobachtungen, konnte jedoch weder für Zugewinne im Bereich 1q21 noch für die Überexpression von

CKS1B eine Bedeutung als unabhängige negativ-prognostische Marker vergleichbar der Deletion 13q herausstellen (FONSECA et al., 2006).

4.1.2 *Deletion 13q14:*

In der vorliegenden Arbeit betrug die Inzidenz der 13q-Deletion 38,1%. Sie entsprach somit der in anderen großen FISH-Analysen (38%, FACON et al. 2001; 43%, AVET-LOISEAU et al. 2001). In einer Untersuchung an 325 Myelompatienten betrug die Inzidenz der 13q-Deletion 54% (FONSECA et al., 2001). Zum Nachweis dieser Aberration werden in der Regel DNA-Sonden, die in die chromosomale Bande 13q14 kartieren, eingesetzt, obwohl eine kritische Region bislang nur unzureichend definiert wurde. Eine einzelne Untersuchung an einem kleineren Patientenkollektiv mittels Sonden für die Chromosomenbanden 13q14-q21 lokalisiert eine 350 kb große kritische Region distal des Rb1-Genlocus (ELNENAEI et al., 2003). Der Nachweis einer 13q- ist in den meisten Fällen der Detektion einer Monosomie 13 gleichzusetzen. Lediglich in 10% der Fälle liegt eine interstitielle Deletion des Chromosomenarms vor (FONSECA et al., 2001). Der mediane prozentuale Anteil von Zellen mit 13q- liegt bei 75-90% (ZOJER et al., 2000; SHAUGHNESSY et al. 2000, LIEBISCH et al. 2005).

4.1.3 *Chromosom 17p -Veränderungen*

Eine Deletion 17p13 konnte im untersuchten Kollektiv in 11/110 (10%) Fällen nachgewiesen werden. Im Mittel wies 83% aller Plasmazellen diese Veränderung auf. Eine Konsensusregion für Verluste von Chromosom 17p wurde bislang nicht bestimmt. Die meisten Arbeitsgruppen verwenden jedoch eine DNA-Sonde, welche das p53-Tumorsuppressorgen enthält, welches für die Pathogenese solider Tumoren, aber auch hämatologischer Neoplasien eine wichtige Rolle spielt. In den meisten FISH-Studien beträgt die Inzidenz von p53-Deletionen zwischen 5-10%. Ein funktioneller Verlust des p53-Gens besteht jedoch bei bis zu 40% der Patienten mit fortgeschrittenem Multiplen Myelom und bis zu 60% der HCML, was darauf hindeutet, dass diese Aberration ein Marker für Tumorprogression darstellt (NERI et al. 1993, MAZARS et al., 1993).

Zugewinne von Chromosom 17p machten lediglich 6/110 (5,5%) der genetischen Veränderungen im untersuchten Kollektiv aus. Die Inzidenz von 17p-Trisomien bzw. 17p-Tetrasomien lag aus unklaren Gründen niedriger als in anderen FISH-Studien, bei der diese Zugewinne in 10-22% der Fälle nachweisbar waren (PEREZ-SIMON et al. 1998, KÖNIGSBERG et al. 2000, Liebisch 2005).

4.1.4 Deletion 22q11

Mit einer Inzidenz von 13,6% war die Deletion 22q in der vorliegenden Analyse der zweithäufigste chromosomale Verlust nach der Deletion 13q. Zu dieser Aberration liegen zum jetzigen Zeitpunkt weder umfassende Untersuchungen zur Häufigkeit noch zur klinischen Relevanz beim Multiplen Myelom vor.

4.2 Korrelation genetischer Veränderungen

Unter dem Begriff „multiples Myelom“ wird – heute noch – eine Vielfalt ganz unterschiedlicher maligner Plasmazellerkrankungen subsumiert. Beispielhaft kann diese Heterogenität an der ganz unterschiedlichen Morphologie klonaler Plasmazellen abgelesen werden. So weisen Tumore mit vorherrschend lymphoplasmazytären Zellen meist einen gutartigen Verlauf auf, während plasmoblastische Myelome mit einer sehr ungünstigen Prognose und einem Befall des ZNS vergesellschaftet sind (FASSAS et al., 2002). Zytogenetische, molekularzytogenetische und molekularbiologische Untersuchungen haben in den letzten Jahren entscheidend dazu beigetragen, die Heterogenität dieser Entität besser zu verstehen. So konnte etwa im Rahmen einer Genexpressionsanalyse gezeigt werden, dass Erkrankungen mit und ohne Nachweis von Osteolysen mit distinkten Mustern über- und unterexprimierter Genen assoziiert sind. Interessanterweise war z.B. der osteolytische Verlauf der Erkrankung mit der Überexpression des *Dickkopf 1*-Gens (DKK1), welches an der Steuerung der Funktion von Osteoblasten beteiligt ist, korreliert (TIAN et al., 2004).

Die Korrelation neuerer molekularzytogenetischer Marker mit klassischen biologischen Charakteristika führte in den letzten Jahren zu einigen interessanten Befunden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das asekretorische

Myelom mit einer lymphoplasmozytären Plasmazellmorphologie und der primären Translokation $t(11;14)(q13;32)$ assoziiert ist (FONSECA et al., 2003; AVET-LOISEAU et al., 2003).

Neben Hinweisen auf die Pathogenese maligner Plasmazellerkrankungen erhofft man sich von der molekularzytogenetischen Analyse des Multiplen Myeloms die Identifikation innovativer Prognosemarker. Bis dato wurden nur sehr wenige Aberrationen von unabhängiger prognostischer Relevanz identifiziert. Neben der Translokation $t(4;14)(p16;q32)$ zeigen auch chromosomale Verluste der chromosomalen Banden 13q14 und 17p13 eine ungünstige Prognose an (MOREAU et al., 2002, FONSECA et al., 2003, GERTZ et al. 2005, CHANG et al., 2005). Es liegt auf der Hand, dass diese drei Veränderungen die ausgeprägte prognostische Heterogenität der Erkrankung nur im Ansatz widerspiegeln. Eine aktuelle Untersuchung unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass der Nachweis einer Trisomie 9q mittels FISH ein unabhängiger negativ-prognostischer Marker ist. Interessanterweise war in der vorliegenden Untersuchung die Deletion 22q11 sehr eng mit dem Auftreten der Deletion 13q sowie der Trisomie 9q korreliert, was darauf hindeuten könnte, dass dieser chromosomale Verlust gleichfalls ein Marker für eine ungünstige Prognose beim Multiplen Myelom darstellen könnte. Diese Hypothese wird derzeit im Rahmen zweier grosser multizentrischer Therapiestudien evaluiert. Weder aus zytogenetischen, noch aus molekularzytogenetischen Studien liegen bislang umfangreiche Daten zur Bedeutung der 22q-Deletion vor.

Korrelation genetischer Aberrationen mit dem Leichtkettentyp

Bei der Evaluation klinischer und laborchemischer Parameter im Hinblick auf einen möglichen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten konnte bislang kein Unterschied zwischen dem Leichtkettentyp festgestellt werden. Obwohl dem Leichtkettentyp beim Multiplen Myelom per se somit keine prognostische Bedeutung zuzukommen scheint, sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob die untersuchten genetischen Aberrationen mit möglicher prognostischer Signifikanz überproportional häufig mit einem bestimmten Leichtkettentyp assoziiert sind. Während Zugewinne von Chromosom 9q keinerlei Präferenz bezüglich des Leichtkettentyps aufwiesen, traten sowohl Zugewinne von Chromosom 1q als auch Verluste von Chromosom 13q vermehrt bei Patienten mit dem Leicht-

kettentyp Lambda auf. Das Gegenteil war der Fall bei Zugewinnen von Chromosom 11q: hier zeigte sich ein Trend zugunsten des Leichtkettentyps Kappa.

Aus einer Genexpressionsanalyse ergeben sich Hinweise auf einen Unterschied im Vorhandensein von Genprodukten, die den Knochenumbau stimulieren. Eines dieser Gene, das sogenannte *Mip-1alpha*, war in der Kappa-Subgruppe überrepräsentiert. Es zeigte sich zudem eine starke Korrelation zwischen dem Leichtkettentyp kappa und dem Auftreten von aktiven osteolytischen Herden beim Multiplen Myelom (MANGRANGEAS et al., 2003).

4.3 Altersabhängigkeit genetischer Veränderungen

Zur Frage der Altersabhängigkeit des Auftretens genomischer Veränderungen beim Multiplen Myelom liegen bis dato nur sehr wenige publizierte Daten vor. Die Analyse der Inzidenz von Aberrationen sechs genomischer Loci im Rahmen der vorliegenden Arbeit erbrachten keine Hinweise auf eine Korrelation dieser chromosomalen Aberrationen mit dem Patientenalter. Einschränkend muss bemerkt werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine Rückschlüsse auf eine mögliche Altersabhängigkeit anderer rekurrenter struktureller oder numerischer Veränderungen beim Multiplen Myelom zulassen.

Eine unlängst publizierte Multicenter Studie an 228 Patienten mit Multiplem Myelom, die ebenfalls mittels Interphase-Zytogenetik analysiert wurden, kommt zu dem Ergebnis, dass das Patientenalter eine bedeutende Variable im Hinblick auf die Inzidenz und die Bedeutung chromosomaler Aberrationen beim Multiplen Myelom sein könnte. Während in der Gruppe der jüngeren Patienten im Gegensatz zu den über 70-Jährigen neben den bekannten unabhängigen prognostischen Markern 13q- und t(14;16) zwei weitere genetische Faktoren, t(4;14) und Deletion p53, einen negativen Einfluß auf die Prognose hatten, spielten letztere in der Gruppe der alten Patienten keine Rolle, da diese im Vergleich zu den jüngeren Patienten unabhängig von genetischen Veränderungen generell kürzere Überlebensraten zeigten (ROSS et al. 2005). Allerdings handelt es sich bei der genannten Studie um ein sehr gemischtes Kollektiv bestehend aus Patienten unterschiedlichster Krankheitsstadien und ohne einheitliche Therapie. Eine direkte Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Untersuchung ist auch deshalb nicht gegeben, da der beschriebene Effekt erst in der Altersklasse der über 70-

Jährigen deutlich wurde. In vielen multivariablen Risikofaktoranalysen konnte gezeigt werden, dass das Patientenalter kein negativ-prognostischer Marker im Hinblick auf die bekannten Überlebensparameter nach konventioneller Therapie und Hochdosistherapie gefolgt von autologer Stammzelltransplantation ist (SIEGEL et al. 1999, TERPOS et al. 2003).

4. ZUSAMMENFASSUNG

Chromosomalen Aberrationen kommt in der Pathogenese des Multiplen Myeloms eine entscheidende Bedeutung zu. Darüber hinaus spielen sie als Prognosemarker bei der Planung der Behandlung dieser klinisch äußerst heterogenen Entität eine zunehmend wichtigere Rolle. Bisherige Untersuchungen zur Häufigkeit genomischer Veränderungen wurden überwiegend bei jüngeren Patienten im Alter bis 60 Jahre durchgeführt. Vor dem Hintergrund einer klaren Altersabhängigkeit des Auftretens maligner Plasmazellerkrankungen wurde in der vorliegenden Arbeit die Inzidenz einer Reihe rekurrenter Aberrationen an einem großen Kollektiv (n=110) älterer Patienten bestimmt. Mit dem Ziel, eine mögliche Korrelation zwischen dem Alter und der Häufigkeit genomischer Veränderungen zu evaluieren, wurde darüber hinaus eine ergänzende Datenbankanalyse an einer Kohorte von 1800 Patienten durchgeführt.

Die häufigsten genetischer Veränderungen sechs repräsentativer chromosomaler Loci im Kollektiv älterer Patienten waren (in absteigender Häufigkeit): +9q (49,1%), +11q (42,7%), 13q- (38,2%), +1q (36,4%), 22q-(13,6%) und 17p- (10,0%). Die genannten Veränderungen waren somit ähnlich häufig wie bei jüngeren Patienten. Mittels Datenbankanalyse konnte in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen gleichfalls keine signifikante Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der Inzidenz chromosomaler Aberrationen belegt werden. In der vorliegenden Arbeit konnten klare Muster im Auftreten bestimmter genomischer Veränderungen gezeigt werden. So fand sich eine signifikante Häufung der 13q-Deletion und von 1q-Zugewinnen bei Tumoren mit Expression des Lambda-Leichtkettentyps sowie von 11q-Zugewinnen bei Tumoren mit Expression des Kappa-Leichtkettentyps. Neben einer bereits bekannten Korrelation von Chromosom 9q- und 11q-Zugewinnen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals eine signifikante Korrelation der Deletion 22q11 mit der 13q-Deletion sowie der Trisomie 9q gezeigt werden. Die beiden letztgenannten Aberrationen stellen unabhängige negativ-prognostische Prädiktoren beim Multiplen Myelom dar. Auf der Basis dieser Beobachtung kann hypothetisiert werden, dass die 22q-Deletion ein neuer genetischer Marker für eine ungünstige Prognose der Myelomerkrankung darstellt. Diese Hypothese wird derzeit in mehreren multizentrischen Therapiestudien der Deutschen Studiengruppe Multiples Myelom evaluiert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Agnastopoulos A, Gika D, Symeonidids A, Zervas K, Pouli A, Repoussis P, Grigoraki V, Agnastopoulos N, Economopoulos T, Maniatis A, Dimopoulos MA
Multiple myeloma in elderly patients: prognostic factors and outcome.
Eur J Heamatol 75: 370-375 (2005)
2. Alexanian R, Haut A, Khan A, Lane M, McKelvey EM, Migliore PJ, Stuckey WJ Jr., Wilson HE
Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens
J Am Med Ass 208: 1680-1685 (1969)
3. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Cassas-sus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R
A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome
N Engl J Med 335: 91-97 (1996)
4. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, Minvielle S, Bataille R
Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation.
Blood 99:2185-2191 (2002)
5. Avet-Loiseau H, Garand R, Lodé L, Harousseau JL, Bataille R
Translocation t(11 ;14)(q13 ;q32) is the hallmark of IgM, IgE, and non-secretory multiple myeloma variants
Blood 101:1570-1571 (2003)
6. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Harousseau JL, Facon T, Mathiot C
A comprehensive analysis of cytogenetic abnormalities in myeloma: results of the FISH analysis of 1000 patients enrolled in the IFM trials.
(unveröffentlichte Befunde) (2005)
7. Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH, Naucke S, Cheson B, Mattox S, Bracy D, Salmon S, Jacobson J, Crowley J, Tricot G
Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma
Blood 89: 789-793 (1997)
8. Berenson JR, Yang HH, Sadler K, Jarutirasarn SG, Vesico RA, Mapes R, Lee S, Wilson J, Morrison B, Adams J, Schenkein D, Swift R
Phase I/II trial assessing Bortezomib and Melphalan combination therapy for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma.
J Clin Oncol 24: 937-944 (2006)

9. Chang H, Qi C, Yi QL, Reece D, Stewart AK
P53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an ad-verse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation.
Blood 105: 358-360 (2005)

10. Chang H, Qi X, Trieu Y, Xu W, Reader JC, Ning Y, Reece D
Multiple myeloma patients with CKS1B gene amplification have a shorter progression-free survival post-autologous stem cell transplantation
Br J Haematol 135: 486-491

11. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party
High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma
N Engl J Med 348: 1875-1883 (2003)

12. Corso A, Klersy C, Lazzarino M, Bernasconi C
Multiple myeloma in younger patients: the role of age as prognostic factor
Ann Hematol 76: 67-72 (1998)

13. Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis
Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridisation using chromosome-specific library probes
Hum Genet 80: 235-246 (1988)

14. Cremer FW, Kartal M, Hose D, Bila J, Buck I, Bellos F, Raab MS, Brough M, Moebus A, Hager HD, Goldschmidt H, Moos M, Bartram CR, Jauch A
High incidence and intraclonal heterogeneity of chromosome 11 aberrations in patients with newly diagnosed multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH.
Cancer Genet Cytogenet 161: 116-124 (2005)

15. Descalescu CM, Callanan M, Chauvet M, Le Baccon P, Pegourie-Bandelier B, Garban F, Sotto JJ, Leroux D
Interphase FISH: a rapid method for detecting malignant plasma cells in multiple myeloma patients submitted to autologous transplantation.
Bone Marrow Transplant 23: 687-94 (1999)

16. Desikan R, Barlogie B, Sawyer J, Ayers D, Tricot G, Badros A, Zangari M, Munshi N, Anaissie E, Spoon D, Siegel D, Jagannath S, Vesole D, Epstein J, Shaughnessy J, Fassas A, Lim S, Robertson P, Crowley J
Results of high-dose therapy for 1000 patients with multiple myeloma: durable complete remissions and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities
Blood 95: 4008-4010 (2000)

17. Dewald GW, Therneau T, Larson D, Lee YK, Fink S, Smoley S, Paternoster S, Adeyinka A, Ketterlin R, Van Dyke DL, Fonseca R, Kyle R
Relationship of patient survival and chromosome anomalies detected in metaphase and/or interphase cells at diagnosis of myeloma.
Blood 106: 3553-3558 (2005)
18. Drach J, Ackermann J, Fritz E, Krömer E, Schuster R, Gisslinger H, DeSantis M, Zojer N, Fiegl M, Roka S, Schuster J, Heinz R, Ludwig H, Huber H
Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy
Blood 92: 802-809 (1998)
19. Drach J, Schuster, Nowotny H, Angerler J, Rosenthal F, Fiegl M, Rothermund C, Gsur A, Jager U, Heinz R, Lechner K, Ludwig H, Huber H
Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence *in situ* hybridisation.
Cancer Res 55: 3854-3859 (1995)
20. Durie BGM
The epidemiology of multiple myeloma
Semin Hematol 38: 1-5 (2001)
21. Durie BGM, Kyle RA, Belch A, Bensinger W, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Comenzo R, Djulbegovic B, Fantl D, Gahrton G, Harousseau JL, Hungria V, Joshua D, Ludwig H, Mehta J, Rodriguez-Morales A, Morgan G, Nouel A, Oken M, Powles R, Roodman D, San Miguel J, Shimizu K, Singhal S, Sirohi B, Sonneveld P, Tricot G, Van Ness B
Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation
Hematol J 4: 379-39 (2003)
22. Durie BG, Salmon SE
A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival
Cancer 36: 842-845 (1975)
23. Elnenaï MO, Hamoudi RA, Swansbury J, Gruszka-Westwood AM, Brito-Babapulle V, Matutes E, Catovsky D
Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma.
Genes Chromosomes Cancer 36: 99-106 (2003)
24. Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, Moreau P, Geneviève F, Zandecki M, Lai J, Leleu X, Jouet J, Bauters F, Harousseau J, Bataille R, Mary JY, Inter-groupe Francophone du Myelome
Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum β -2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy.
Blood 97: 1566-1571 (2001)

25. Fassas ABT, Muwalla F, Berryman T, Benramdane R, Joseph L, Ainaissie B, Sethi R, Siegel D, Badros A, Toor A, Zangari M, Morris C, Angtuaco E, Mathew S, Wilson C, Hough A, Hari S, Barlogie B, Tricot G
Myeloma of the central nervous system: association with high-risk chromosomal abnormalities, plasmablastic morphology and extramedullary manifestations
Br J Haematol 117: 103-108 (2002)
26. Fernand JP, Katsahian S, Divine M, Leblond V, Dreyfus F, Macro M, Arnulf B, Royer B, Mariette X, Pertuiset, Belanger C, Janvier M, Chevret S, Brouet JC, Ravaud P
High-dose therapy and autologous blood stem-cell transplantation compared with conventional treatment in myeloma patients aged 55 to 65 years: long-term results of a randomized control trial from the Group Mylome-Autogreffe.
J Clin Oncol 23: 9227-9233 (2005)
27. Fonseca R, Oken M, Harrington D
Deletions of chromosomes 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q-arm or monosomy.
Leukemia 15: 981-986 (2001)
28. Fonseca R, Blood EA, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Bailey JR, Van Wier SA, Henderson KJ, Hoyer JD, Harrington D, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR
Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients
Blood 99: 3735-3741 (2002)
29. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, Bailey RJ, Greipp PR
Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma
Blood 101: 4569-4575 (2003)
30. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD, Jr., Steward AK, Avet-Loiseau H
Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report
Cancer Research 64: 1546-1558 (2004)
31. Fonseca R, Van Wier S, Chng WJ, Ketterling R, Lacy M, Dispenzieri A, Bergsagel PL, Rajkumar SV, Greipp P, Litzow M, Kumar S, Gonzalez-Paz N, Henderson K, Ahmann G, Gertz M
Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma
Leukemia 20: 2034-2040 (2006)

32. Gahrton G, Svensson H, Cavo M, Apperly J, Bacigalupo A, Bjorkstrand B, Blade J, Cornelissen J, de Laurenzi A, Facon T, Ljungman P, Michallet M, Niederwieser D, Powles R, Reiffers J, Russell NH, Samson D, Schaefer UW, Schattenberg A, Tura S, Verdonck LF, Vernant JP, Willemze R, Volin L; The European Group for Blood and Marrow Transplantation
Progress in allogeneic bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a comparison between transplants performed 1983—93 and 1994—8 at European Group for Blood and Marrow Transplantation centres.
Br J Haematol 113: 209-216 (2001)
33. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Litzow MR, Henderson KJ, Van Wier SA, Ahmann GJ, Fonseca R
Clinical implications of t(11;14)(q13;32), t(4;14)(p16;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy
Blood 106:2837-2840 (2005)
34. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, Bocca-doro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Tureson I, Westin J
International staging system for multiple myeloma.
J Clin Oncol 23: 3412-4320 (2005)
35. Goranov S
Kappa and lambda light chain proteins - clinical and prognostic significance in patients with multiple myeloma
Folia Med (Plovdiv) 39: 52-57 (1997)
36. Gutierrez NC, Hernandez JM, Garcia JL, Canizo MC, Gonzalez M, Hernandez J, Gonzalez MB, Garcia-Marcos MA, San Miguel JF
Differences in genetic changes between multiple myeloma and plasma cell leukaemia demonstrated by comparative genomic hybridisation.
Leukemia 15: 840-845 (2001)
37. Hanamura I, Steward JP, Huang Y, Santra M, Sawyer JR, Hollmig K, Zangari M, Pineda-Roman M, van Rhee F, Cavallo F, Burington B, Crowley J, Tricot G, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr.
Frequent gains of chromosome 1q21 in plasma cell dyscrasia detected by fluorescence *in situ* hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation
Blood 108: 1724-1732 (2005)
38. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC
Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process.
Blood 91: 3-21 (1998)

39. Huff CA, Jones RJ
Bone marrow transplantation for multiple myeloma: where we are today.
Curr Opin Oncol 14: 147-151 (2002)
40. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F
Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia.
Acta Haematol 107: 76-94 (2002)
41. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, Taylor BJ, Larratt LM, Mant MJ, Belch AR, Pilarski LM
In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression
Blood 101: 1520-1529 (2003)
42. Königsberg R, Zojer N, Ackermann J, Kromer E, Kittler H, Fritz E, Kaufmann H, Nosslinger T, Riedl L, Gisslinger H, Jager U, Simonitsch I, Heinz R, Ludwig H, Drach
Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma
Clin Oncol 18: 804-812 (2000)
43. Kröger N, Einsele H, Wolff D, Casper J, Freund M, Derigs G, Wandt H, Schäfer-Eckart K, Wittkowsky G, Schmitz N, Krüger W, Zabelina T, Renges H, Ayuk F, Krüll A, Zander A
Myeloablative intensified conditioning regimen with *in vitro* T-cell depletion (ATG) followed by allografting in patients with advanced multiple myeloma. A phase I/II study of the German Study-group Multiple Myeloma (DSMM)
Bone Marrow Transplant 31: 973-979 (2003)
44. Kröger N, Sayer HG, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Nagler A, Renges H, Zabelina T, Fehse B, Ayuk F, Wittkowsky G, Schmitz N, Zander AR
Unrelated stem cell transplantation in multiple myeloma after a reduced-intensity conditioning with pretransplantation antithymocyte globulin is highly effective with low transplantation-related mortality
Blood 100: 3919-3924 (2002)
45. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ
A long term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance
N Engl J Med 346: 546-569 (2002)
46. Liebisch P, Viardot A, Bassermann A, Wendl C, Roth K, Goldschmidt H, Einsele H, Straka C, Stilgenbauer S, Döhner H, Bentz M
Value of comparative genomic hybridisation and fluorescence *in situ* hybridisation for molecular diagnostics in multiple myeloma
Br J Haematol 122: 193-201 (2003a)

47. Liebisch P, Wendl C, Wellmann A, Kröber A, Schilling G, Goldschmidt H, Einsele H, Straka C, Bentz M, Stilgenbauer S, Döhner H
High incidence of trisomies 1q, 9q, and 11q in multiple myeloma: results from a comprehensive molecular cytogenetic analysis
Leukaemia 17: 2535-2537 (2003b)
48. Liebisch P, Benner A, Tschajka K, Wendl C, Goldschmidt H, Döhner H
Gains on chromosome arm 9q represent a novel and independent marker of adverse prognosis in multiple myeloma patients receiving up-front high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation.
Haematologica 90: 88 (abstr., suppl. 2) (2005)
49. Liebisch P, Döhner H
Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma
Eur J Cancer 42: 1520-1529 (2006)
50. Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA
BCL2-translocation frequency rises with age in humans
Proc Natl Acad Sci USA 91: 8910-8914 (1994)
51. Lynch HT, Sanger WG, Pirucello S, Quinn-Laquer B, Weissenburger DD
Familial multiple myeloma: a family study and review of literature
J Natl Cancer Inst. 93: 1479-1483 (2001)
52. Malpas JS, Bergsagel DE, Kyle R, Anderson K
Multiple Myeloma: Biology and management
Oxford Univ. Press, Oxford (1998)
53. Mangrangeas F, Nasser V, Avet-Loiseau H, Loricod B, Decaux O, Granjeaud S, Bertucci F, Birnbaum D, Nguyen C, Harrousseau JL, Bataille R, Houlgatte R, Minvielle S
Gene expression profiling of multiple myeloma reveals molecular portraits in relation to the pathogenesis of the disease.
Blood 101: 4998-5006 (2003)
54. Mazars GR, Portier M, Zhang XG, Jourdan M, Bataille R, Theillet C, Klein B
Mutations of the p53 gene in human myeloma cell lines.
Oncogene 7: 1015-1018 (1992)
55. Moreau P, Facon T, Leleu X, Morineau N, Huyghe P, Harrousseau JL, Bataille F, Avet-Loiseau H
Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy
Blood 100: 1579-1583 (2002)
56. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, Hows JM, Navarrete C, Greaves M
Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development
Proc Natl Acad Sci USA 99: 8242-8247 (2002)

57. Neri A, Baldini L, Trecca D, Cro L, Polli E, Maiolo AT
P53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy
Blood 81: 128-135 (1993)
58. Nilsson T, Lenhoff S, Turesson I, Rylander L, Mitelman F, Westin J, Høglund M, Johansson B
Cytogenetic features of multiple myeloma: impact of gender, age, disease phase, culture time, and cytogenetic stimulation
Eur J Haematol 68: 345-353 (2002)
59. Palumbo A, Bringhen S, Petrucci MT, Musto P, Rossini F, Nunzi M, Lauta VM, Bergonzi C, Barbui A, Caravita T, Capaldi A, Pregno P, Guglielmelli T, Grasso M, Callea V, Bertola A, Cavallo F, Falco P, Rus C, Massaia M, Mandelli F, Carella AM, Pogliani E, Liberati AM, Dammacco F, Ciccone G, Boccadoro M
Intermediate-dose melphalan improves survival of myeloma patients aged 50-70: results of a randomized controlled trial
Blood 104: 3052-3057 (2004)
60. Palumbo A, Triolo S, Argentino C, Bringhen S, Dominiotto A, Rus C, Omedè P, Tarella C, Pileri A, Boccadoro M
Dose-intensive melphalan with stem cell support (MEL 100) is superior to standard treatment in elderly myeloma patients
Blood 94: 1248-1253 (1999)
61. Pérez-Simon JA, Garcia-Sanz R, Tabernero MD, Almeida J, Gonzalez M, Fernandez-Calvo J, Moro MJ, Hernandez JM, San Miguel JF, Orfao A
Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: a FISH analysis of 15 different chromosomes
Blood 91: 3366-3371 (1998)
62. Phekoo KJ, Schey SA, Richards MA, Bevan DH, Bell S, Gillet D, Moller H
A population study to define the incidence and survival of multiple myeloma in a National Health Service Region in UK
Br J Haematol 127: 299-304 (2004)
63. Rajkumar SV, Fonseca R, Dewald GW, Therneau TM, Lacy MQ, Kyle RA, Greipp PR, Gertz MA
Cytogenetic abnormalities correlate with the plasma cell labelling index and extent of bone marrow involvement in multiple myeloma.
Cancer Genet Cytogenet 113: 73-77 (1999)
64. Rajkumar SV, Fonseca R, Lacy MQ, Witzig T, Lust J, Greipp P, Therneau T, Kyle R, Litzow M, Gertz M
Abnormal cytogenetics predict poor survival in patients undergoing high dose chemotherapy with peripheral blood stem cell transplantations in multiple myeloma
Bone Marrow Transplant 24: 497-503 (1999)

65. Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC
Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers.
Cancer Control 10: 36 (2003)
66. Riedel DA, Pottern LM
The epidemiology of multiple myeloma
Haematol Oncol Clin North Am 6: 224-247 (1992)
67. Ries LAG, Hankey BF, Miller BA
Cancer statistics review 1973-1988.
Washington DC US govt printing office (1991)
68. Ross FM, Ibrahim AH, Vilain-Holmes A, Winfield MO, Chiecchio I, Protheroe RKM, Strike P, Gunasekera JL, Jones A, Harrison CJ, Morgan GJ, Cross NCP
Age has a profound effect on the incidence and significance of chromo-some abnormalities in myeloma
Leukemia 19: 1634-1642 (2005)
69. Sawyer J, Waldron JA, Jagannath S, Barlogie B
Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma.
Cancer Genet Cytogenet 82: 41-49 (1995)
70. Sharpless NE, DePinho RA
Telomeres, stem cells, senescence, and cancer
J Clin Invest 113: 160-168 (2004)
71. Shaughnessy J, Tian E, Sawyer J, Bumm K, Landes R, Badros A, Morris C, Tricot G, Epstein J, Barlogie B
High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH
Blood 96: 1505-1511 (2000)
72. Shaughnessy J
Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p23(Kip1) and an aggressive clinical course in multiple myeloma.
Hematology 10 Suppl 1: 117-126 (2005)
73. Seong C, Dalasalle K, Hayes K, Weber D, Dimopoulos M, Swantkowski J, Huh Y, Glassman A, Champlin R, Alexania R
Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma
Br J Haematol 101: 189-194 (1998)
74. Siegel DS, Desikan KR, Mehta J, Singhal S, Fassas A, Munshi N, Anaissie E, Naucke S, Ayers D, Spoon D, Vesole D, Tricot G, Barlogie B
Age is not a prognostic variable with autotransplantation in patients with multiple myeloma
Blood 93: 51-54 (1999)

75. Singhal S, Mehta J
Novel therapies in multiple myeloma
Int J Hematol 77: 226-231 (2003)
76. Sirohi B, Powles R, Treleaven J, Mainwaring P, Kulkarni S, Pandha H, Bhagwati N, Horton C, Singhal S, Mehta J
The role of autologous transplantation in patients with multiple myeloma aged 65 years and over
Bone Marrow Transplant 25: 533-539 (2000)
77. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C
Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma
Blood 98: 2229-2238 (2001)
78. Smadja NV, Fruchart C, Isnard F, Louvet C, Dutel JL, Cheron N, Grange MJ, Monconduit M, Bastard C
Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases
Leukemia 12: 960-96 (1998)
79. Taberno D, San Miguel JF, Garcia-Sanz, Najera L, Garcia-Isidoro M, Perez-Simon JA, Gonzalez M, Wiegant J, Raap AK, Orfao A
Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluo-rescence *in situ* hybridisation analysis using 15 chromosome-specific probes
Am J Pathol 149: 153-161 (1996)
80. Terpos E, Apperley JF, Samson D, Giles C, Crawley C, Kanfer E, Olavarria E, Goldman JM, Rahemtulla A
Autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: improved survival in nonsecretory multiple myeloma but lack of influence of age, status at transplant, previous treatment and conditioning regimen. A single-centre experience in 127 patients
Bone Marrow Transplant 31: 163-170 (2003)
81. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy J
The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma
N Engl J Med 349: 2483-2494 (2003)
82. Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, Bracy D, Mattox S, Vesole DH, Naucke S, Sawyer JR
Poor prognosis in multiple myeloma is only associated with partial or complete deletion of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities
Blood 86: 4250-4256 (1995)

83. Tricot G, Sawyer JR, Jagannath S, Desikan KR, Siegel D, Naucke S, Mattox S, Bracy D, Munshi N, Barlogie B
Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplants
J Clin Oncol 15: 2659-2666 (1997)
84. Van der Molen LA, Duffey PL, Cossman J, Jaffe ES, Longo DL
Surface light chain phenotype in indolent lymphomas: lack of prognostic significance
Am J Hematol 34: 15-20 (1990)
85. Westin EH, Longo DL
Lymphoma and Myeloma in Older Patients
Semin Oncol 31: 198-205 (2004)
86. Zandecki M, Lai JL, Facon T
Multiple myeloma : almost all patients are cytogenetically abnormal.
Br J Haematol 94: 217-227 (1996)
87. Zojer N, Königsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Kromer E, Kaufmann H, Riedl L, Gisslinger H, Schreiber S, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J
Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization
Blood 95: 1925-1930 (2000)

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

<u>Abbildung 1:</u>	Inzidenz hämatologischer Tumorerkrankungen	Seite 1
<u>Abbildung 2:</u>	Altersverteilung hämatologischer Neoplasien	Seite 2
<u>Tabelle 1:</u>	Diagnosekriterien der <i>International Myeloma Working Group</i> (2003)	Seite 6
<u>Tabelle 2:</u>	Stadieneinteilung nach Durie und Salmon (1975)	Seite 7
<u>Tabelle 3:</u>	Inzidenz primärer IgH-Translokationen bei Patienten mit Multiplem Myelom und dysregulierte Onkogene	Seite 11
<u>Abbildung 3:</u>	Inzidenz chromosomaler Aberrationen im Gesamtkollektiv	Seite 28
<u>Abbildung 4:</u>	Häufigkeitsverteilung genetischer Veränderungen im Gesamtkollektiv	Seite 29
<u>Tabelle 4:</u>	Übersicht der Größe aberranter Plasmazell-Klone (in%)	Seite 30
<u>Abbildung 5:</u>	Häufigkeitsverteilung des κ - und λ -Leichtkettentyps Bei der Deletion 13q und 1q-Zugewinnen	Seite 32
<u>Abbildung 6:</u>	Häufigkeitsverteilung des κ - und λ -Leichtkettentyp Bei 9q-Zugewinnen	Seite 33
<u>Abbildung 7:</u>	Häufigkeitsverteilung des κ - und λ -Leichtkettentyps Bei 11q-Zugewinnen	Seite 33
<u>Tabelle 5:</u>	Korrelation des Leichtkettentyps mit den vier häufigsten genetischen Veränderungen	Seite 34
<u>Tabelle 6:</u>	Positive Korrelation genetischer Veränderungen	Seite 34
<u>Abbildung 8:</u>	Interaktion genetischer Aberrationen	Seite 35

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich auf vielfältige Art und Weise während meiner Zeit als Doktorandin unterstützt haben:

- Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Döhner für die Möglichkeit, in seinem Labor wissenschaftlich tätig zu sein.
- Herrn Dr. med. Peter Liebisch für die Zeit, die er in die optimale Betreuung meiner Promotionsarbeit investiert hat. Sein großes persönliches Engagement verbunden mit vielen wertvollen Anregungen, Ideen und Hilfestellungen haben einen wesentlichen Anteil zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.
- Herrn Dr. med. Daniel Scheck und Frau Dr. med. Christiane Wendl, die mir vor allem während der Einarbeitungsphase im Labor jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen
- Der Arbeitsgruppe Multiples Myelom, insbesondere Frau Katrin Roth und Frau Sibylle Janczik, für die hilfreiche Unterstützung, die vielen praktischen Tipps zu Arbeitstechniken und Experimenten sowie die gute Zusammenarbeit im Rahmen der verschiedenen Projekte.
- Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zytogenetischen Labors sowie allen Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden für den freundlichen Umgang miteinander und das dadurch bestehende gute und konstruktive Arbeitsklima.
- Ein großes Dankeschön gilt nicht zuletzt auch meiner Familie, die mir das alles ermöglicht und mir stets den Rücken gestärkt hat, sowie meinen Freunden, die mich während meiner Doktorarbeit immer wieder motiviert und unterstützt haben.
- Tobi, der mir mehr als alles andere bedeutet, für alles, ganz besonders jedoch für seine unendliche Geduld. **Danke!**

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Astrid Wille, geb. Wimmer
Geburtsdatum: 05.11.1978
Geburtsort: Crailsheim
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch
Vater: Peter Werner Wimmer
Mutter: Edith Anna Wimmer, geb. Hanschke

Schulischer Werdegang:

09.1984 - 07.1988 Leonhard-Sachs-Schule Crailsheim (Grundschule)
09.1988 - 07.1996 Albert-Schweitzer-Gymnasium Crailsheim
08.1996 - 07.1997 Worthington Senior High School, Worthington, MN USA
Abschluss: High School Diploma
09.1997 - 07.1999 Albert-Schweitzer-Gymnasium Crailsheim
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Universitärer Werdegang:

09.1999 - 04.2006 Medizinstudium an der Universität Ulm

- 11.09.2001 Ärztliche Vorprüfung
- 19.09.2002 Erstes Staatsexamen
- 08.04.2005 Zweites Staatsexamen
- 25.04.2006 Ärztliche Prüfung

Berufstätigkeit - Weiterbildung

05.2005 – heute Klinikum Memmingen, Abteilung für Anästhesiologie,
operative Intensivmedizin und Schmerztherapie