UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Onkologisches Zentrum
II. Medizinische Klinik und Poliklinik
(Onkologie, Hämatologie und Knochenmarktransplantation
mit Sektion Pneumologie)
Direktor: Prof. Dr. C. Bokemeyer

Einfluss genetischer Veränderungen auf die Prognose nach allogener Stammzelltransplantation beim Multiplen Myelom

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Timon Hansen
aus Husum

Hamburg 2009

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 1.07.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. D. K. Hossfeld

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. C. Bokemeyer

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. R. Schneppenheim

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen **4**

1 Einleitung **8**

1.1 Multiples Myelom 8
1.1.1 Definition 8
1.1.2 Epidemiologie 9
1.1.3 Ätiologie 9
1.1.4 Pathogenese 9
1.1.5 Klinik und Komplikationen 11
1.1.6 Diagnostik 11
1.1.7 Stadieneinteilung 12
1.1.8 Prognosefaktoren 13
1.1.9 Therapie 13
1.1.9.1 Konventionelle Chemotherapie 14
1.1.9.2 Hochdosistherapie und autologe PBSZT 14
1.1.9.3 Allogene PBSZT 14
1.1.9.4 Neuere Wirkstoffe 15
1.2 Konventionelle Zytogenetik 16
1.2.1 Methodik 16
1.2.2 Inzidenz und prognostische Bedeutung von zytogenetisch detektierten Chromosomenaberrationen 17
1.3 Molekularzytogenetik 18
1.3.1 Methodik 18
1.3.1.1 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) 18
1.3.1.2 Vielfarben-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (M-FISH) 18
1.3.1.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und cIg-FISH 18
1.3.1.4 DNA- und RNA-Chips 21
1.3.2 Inzidenz und prognostische Bedeutung von molekularzytogenetisch detektierten Chromosomenaberrationen 21
1.3.2.1 Deletion 13q14 21
1.3.2.2 Deletion 17p13 22
1.3.2.3 *CMYC*-Überrepräsentation 23
1.3.2.4 *IGH*-Translokationen 24
1.3.2.4.1 t(4;14)(p16;q32) *25*
1.3.2.4.2 t(11;14)(q13;q32) *26*
1.3.2.4.3 t(14;16)(q32;q23) *27*
1.3.2.4.4 t(6;14)(p25;q32) *28*
1.4 Inhalte und Ziele dieser Studie 29

2 Material und Methoden 30

2.1 Patienten 30
2.1.1 Patientencharakteristika 30
2.1.2 Ethische Grundlagen und Datenschutz 32

2.2 Material 33
2.2.1 FISH-Materialien 33
2.2.2 PCR-Materialien 33
2.2.3 Zellkultur-Materialien 34
2.2.4 Primer 34
2.2.5 BACs, YACs und Cosmide 34
2.2.6 Chemikalien 35
2.2.7 Kits 36
2.2.8 Laborgeräte 36
2.2.9 Sonstige Labormaterialien 37

2.3 Methoden 38
2.3.1 Verarbeitung des Knochenmarkaspirats zu Cytospins 38
2.3.1.1 Ficoll-Separation/Cytospin-Herstellung 38
2.3.1.2 Einfrieren von überschüssigen Zellen aus dem Knochenmarkaspirat 39
2.3.2 Herstellung von Objektträgern mit Metaphasen aus PHA-Kulturen 40
2.3.2.1 Ansatz und Aufarbeitung von PHA-Kulturen 40
2.3.2.2 Vorbehandlung der OT und Ausstrichtechnik 41
2.3.3 Herstellung der DNA-Sonden 1077h22 (6p25), 865g1 (6p25), 416j7 (6p25), cos-α1 (14q32) und y6 (14q32) 42
2.3.3.1 Gewinnung von BACs und YACs aus *E.-coli-*//*S.-cerevisiae*-Dauerkulturen 42
2.3.3.1.1 Anzucht von BAC-transformierten Dauerkulturen auf Agarplatten 42
2.3.3.1.2 Anzucht von BAC-transformierten Einzelkolonien in Flüssigmedium 43
2.3.3.1.3 Anzucht von YAC-transformierten Dauerkulturen 44
2.3.3.1.4 Präparation von BAC-/YAC-DNA durch Säulenaffinitätschromatographie 45
2.3.3.1.5 Photometrische DNA-Konzentrationsmessung 45
2.3.3.1.6 YAC-DNA-Amplifikation durch die Alu-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 46
2.3.3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese 47
2.3.3.2 Markierung (Labeling) der DNA 48
2.3.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an PHA-Kulturen 49
2.3.4.1 Vorbehandlung der Ziel-DNA 49
2.3.4.2 Hybridisierung 50
2.3.4.3 Detektion und Amplifikation 52
2.3.5 cIg-FISH zur Detektion von *D13S25* (13q14), *P53* (17p13), *CMYC* (8q24), *IGH* (14q32), *FGFR3* (4p16.3), *CCND1* (11q13), *MAF* (16q23) und *IRF4* (6p25) 54
2.3.5.1 Vorbehandlung der Ziel-DNA 54
2.3.5.2 Hybridisierung 55
2.3.5.3 Detektion und Amplifikation 56
2.3.5.4 Cytoplasmatische Ig-Färbung 56
2.3.6 Auswertung der Objektträger mit hybridisierten Zellkernen oder Cytospins unter dem Fluoreszenzmikroskop 57

2.4 Statistische Auswertung 59

3 Ergebnisse **60**
3.1 cIg-FISH-Analyse 60
3.2 Ansprechen auf die Therapie und Toxizitäten 63
3.4 Therapiebedingte Mortalität 65
3.3 Rezidive 67
3.5 Ereignisfreies Überleben 70
3.6 Gesamtüberleben 72
3.7 Einfluss von Rezidiv/Progression nach vorangegangener HDT 79

4 Diskussion **80**
4.1 Ergebnisse der cIg-FISH-Analyse 80
4.2 Ergebnisse der uni- und multivariaten Analyse bezüglich Rezidive, EFS und OS 84

5 Zusammenfassung **91**

6 Literaturverzeichnis **93**

7 Patientendaten **105**

8 Danksagung **111**

9 Curriculum vitae **112**

10 Eidesstattliche Erklärung **114**

11 Veröffentlichungen **115**

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AHC-Medium	Acid-hydrolyzed-casein-Medium (Nährmedium)
AK	Antikörper
alloSZT	Allogene Stammzelltransplantation
AMCA	Amino-methylcoumarin-acetic acid
autoSZT	Autologe Stammzelltransplantation
BAC	Bacterial artificial chromosome (künstliches Bakterien-Chromosom)
BCL1/2/7A	*B-cell lymphoma 1/2/7A* (Gene auf den Chromosomen 11/18/12)
BJ	Bence Jones
BRCA2	*Breast cancer 2* (Gen auf Chromosom 13)
℃	Grad Celsius
CCND1	*Cyclin D1* (Gen auf Chromosom 11)
C-FOS	Gen auf Chromosom 14
CGH	Comparative genomic hybridization (vergleichende genomische Hybridisierung)
CI	Confidence interval
cIg-FISH	FISH mit zytoplasmatischer Immunglobulinfärbung
C-JUN	Gen auf Chromosom 1
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
C-MAF	Gen auf Chromosom 16
C-MYC	Gen auf Chromosom 8
CR	Complete remission (komplette Remission)
CRP	C-reaktives Protein
CS	Cytospin
D13S25	Region auf Chromosom 13
DAPI	Diamidino-phenylindole
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat
del	Deletion
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat

dH_2O	destilliertes Wasser
dl	Deziliter
DLI	Donorlymphozyteninfusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
D-PBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Phoshatpufferlösung)
DSMM	Deutsche Studiengruppe Multiples Myelom
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
EB	Elution buffer (Pufferlösung)
EBMT	European Group for Blood & Marrow Transplantation
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	Event-free survival (ereignisfreie Überlebenszeit)
et al.	et alii/aliae (und andere)
FGFR3	*Fibroblast growth factor receptor 3* (Gen auf Chromosom 4)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GvHD	Graft-versus-Host-Disease (Spender-gegen-Wirt-Erkrankung)
H_2O	Wasser
Hb	Hämoglobin
HCl	Hydrogen chloride (Salzsäure)
HDT	Hochdosistherapie
HLA	Human leucocyte antigen (humanes Leukozytenantigen)
HMCL	Human myeloma cell line (humane Myelom-Zelllinie)
HR	Hazard ratio
Ig	Immunglobulin
IGH	*Immunglobulin heavy chain* (Gen auf Chromosom 14)
IL	Interleukin
IRF4	*Interferon regulatory factor 4* (Gen auf Chromosom 6)
KCl	Kalium-Chlorid
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation

l	Liter
LB-Medium	Lysogeny-broth-Medium (Nährmedium)
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar
MAP	Mitogen-activated protein (Mitogen-aktiviertes Protein)
M-FISH	Multicolour-FISH (Vielfarben-FISH)
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
min	Minute/n
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MM	Multiples Myelom
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MMSET	*Multiple myeloma SET domain* (Gen auf Chromosom 14)
MR	Minor response (minimales Ansprechen)
MRD	Matched related donor (verwandter Spender)
MUD	Matched unrelated donor (unverwandter Spender)
MUM1/2	*Multiple myeloma oncogene 1/2* (Gene auf den Chromosomen 6/1)
MYEOV	*Myeloma overexpressed* (Gen auf Chromosom 11)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
OS	Overall survival (Gesamtüberlebenszeit)
OT	Objektträger
P	Irrtumswahrscheinlichkeit (Wert für die statistische Signifikanz)
PAX5	*Paired-box 5* (Gen auf Chromosom 9)
PBI	Pufferlösung
PBSZT	Periphere-Blutstammzell-Transplantation
PCL	Plasmazellleukämie
PCLI	Plasmazell-Labeling-Index
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Progressive disease (progrediente Erkrankung)
PE	Piperazin-EDTA (Pufferlösung)
pH	pondus/potentia Hydrogeni

PHA	Polyhydroxyalkanoate
pmol	Pikomol
PR	Partial remission (partielle Remission)
PZ	Plasmazellen
RB1	*Retinoblastoma 1* (Gen auf Chromosom 13)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S. cerevisiae	*Streptococcus cerevisiae*
SD	Stable disease (gleichbleibende Erkrankung)
SDS	Sodiumdedecylsulfat
SMM	Smouldering multiple myeloma
SSC	Sodium salt citrat (Natriumchlorid-Natriumcitrat)
SSCP	Single strand conformation polymorphism (Einzelstrang-Konformationspolymorphismus)
SZT	Stammzelltransplantation
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Pufferlösung)
TE	Tris-EDTA (Pufferlösung)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(Hydroxyl-)Aminomethan
TRM	Treatment-related mortality (Therapie-bedingte Mortalität)
TYB-Medium	Nährmedium
U	Unit
VDJ	Region des *IGH*-Lokus auf Chromosom 14
WHSC1	Gen auf Chromosom 14
WWOX	Gen auf Chromosom 16
YAC	Yeast artificial chromosome (künstliches Hefen-Chromosom)

1 Einleitung

1.1 Multiples Myelom

1.1.1 Definition

Das Multiple Myelom (auch 'diffuses Plasmozytom') gehört zu den niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe und ist durch die Folgen der Akkumulation eines Plasmazellklons gekennzeichnet, der sich in der Regel im Knochenmark (KM) ansiedelt und ein **monoklonales Immunglobulin** (Ig) produziert. Das monoklonale Ig kann den Klassen IgG (54%), IgA (25%), IgD (1%), IgE, IgM oder auch nur dessen Leichtketten (**Bence-Jones-Typ**, 20%) zugeordnet werden, das **asekretorische MM** ist selten.

Das solitäre ossäre oder medulläre Plasmazytom, das sich durch einen isolierten Plasmazellherd im Knochen ohne KM-Beteiligung und Osteolysen auszeichnet, ist mit einem Anteil kleiner 5% eine weitere seltene Erscheinungsform des MM. Ebenso ist das solitäre extraossäre oder extramedulläre Plasmozytom eine Rarität. Es ist in 75% der Fälle im Bereich der Schleimhäute des oberen Respirationstraktes lokalisiert und im Gegensatz zu den anderen MM-Formen durch eine lokale Strahlentherapie potentiell heilbar. Verlassen die malignen Plasmazellen den Plasmazellentumor oder das KM und sind in der lichtmikroskopischen Untersuchung des Blutausstrichs nachweisbar, verschlechtert sich die Prognose des MM. Werden mehr als 2000 Myelomzellen pro µl peripheres Blut nachgewiesen, sind die Kriterien einer **Plasmazellleukämie (PCL)** erfüllt.

Die genannten malignen MM-Formen unterscheiden sich auch durch die differenten Prognosen. So haben Patienten mit einem isolierten Plasmozytom eine mittlere Lebenserwartung von etwa 10 Jahren. Die mediane Lebenserwartung von Patienten mit MM konnte durch Chemotherapie inklusive Hochdosistherapie von 6-12 Monaten stadienabhängig auf 29-64 Monate im Median verlängert werden (s. u.). Patienten mit einer Plasmazellleukämie überleben trotz Chemotherapie im Median nur etwa 6 Monate.

1.1.2 Epidemiologie

Das MM gehört zu den 20 häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland und nimmt mit 13% der lymphoproliferativen Erkrankungen den größten Anteil der hämatologischen malignen Erkrankungen in Mitteleuropa ein. Die Inzidenz in der Bundesrepublik liegt bei etwa 4 pro 100.000, der Altersmedian bei Diagnosestellung beträgt 60 Jahre (< 3% sind jünger als 40 Jahre). Männer sind 1,5 mal häufiger betroffen als Frauen, schwarze Menschen doppelt so häufig wie weiße. Laut epidemiologischen Studien hat sich die Inzidenz zwischen 1950 und 1980 verdoppelt [1]. Möglicherweise liegt hier aber nur eine scheinbare Zunahme auf Grund einer verbesserten Diagnostik vor. Das MM ist für 1% der krebsbedingten Todesfälle in Deutschland verantwortlich.

1.1.3 Ätiologie

Die Entstehungsursachen des MM sind weitgehend unbekannt. Ionisierende Strahlen, Exposition gegenüber Schwermetallen, Pestiziden, Pflanzenschutzmitteln, organischen Lösungsmitteln oder Benzol sowie chronische Antigenexposition werden als auslösende Faktoren diskutiert [2, 3]. Ethnische und hereditäre Einflüsse spielen vermutlich auch eine Rolle [4].

1.1.4 Pathogenese

Beim MM kommt es zu einer Akkumulation terminal diffenrenzierter B-Zellen, den Plasmazellen, im KM. Die **Ursprungszelle** des MM ist höchstwahrscheinlich eine antigenselektionierte B-Zelle oder eine Gedächtniszelle vor der Umschaltung der Antikörperklasse. Unter dem Einfluss der wechselseitigen Interaktion mit den Stromazellen sezernieren die transformierten Plasmazellen osteoklastische Zytokine wie TNF-β, IL-6 und IL-1 [5]. Diese **erhöhte Osteoklastenaktivität** führt zu den für das MM typischen umschriebenen Osteolysen und Knochenschmerzen und wird ebenfalls für Hyperkalzämie und Hyperkalzurie verantwortlich gemacht. Unter dem Einfluss der Zytokine produzieren auch die Osteoklasten **IL-6**. Dieses ist identisch mit dem lymphokrinen B-Zell-Stimulationsfaktor 2 (BSF-2), der wiederum parakrin zu einer gesteigerten Proliferation des Plasmazellklons führt [6]. Bei nicht-transformierten Plasmazellen führt das Zytokin zu einer Differenzierung und beeinflusst nicht die Zellteilung, so dass von einer **veränderten Signalübertragung in den Myelomzellen**

ausgegangen wird, die über noch nicht geklärte intrazelluläre Mechanismen die Apoptose verhindert.

Die Proliferation der Myelomzellen verursacht neben der Destruktion des Knochenskeletts auch einen sekundären Antikörpermangel und die Verdrängung des blutbildenden Knochenmarks mit Bi- oder Panzytopenie. Weiterhin ist beim aktiven MM eine **erhöhte Blutgefäßdichte** im Knochenmark zu verzeichnen.

Die eigentlichen, ursächlichen pathogenetischen Vorgänge werden jedoch auf molekularer Ebene vermutet, wo das MM sich durch eine ausgeprägte genetische Instabilität auszeichnet. Chromosomenaberrationen werden als frühes Ereignis der Pathogenese angesehen. Am häufigsten sind **Translokationen** mit Beteiligung des *IGH*-Lokus 14q32 (etwa 75% aller Patienten), die Translokationspartner sind heterogen. Zudem sind zahlreiche weitere molekularzytogenetisch nachweisbare Veränderungen, darunter mit Abstand am häufigsten die **Deletion 13q14**, zu finden. In der Abbildung 1.1 ist ein genetisches Modell der Myelomgenese von Hideshima et al. (2004) dargestellt [7]. Da die chromosomalen Veränderungen bei Patienten mit MM in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle spielen, wird auf sie an anderer Stelle noch näher eingegangen (siehe 1.2 und 1.3).

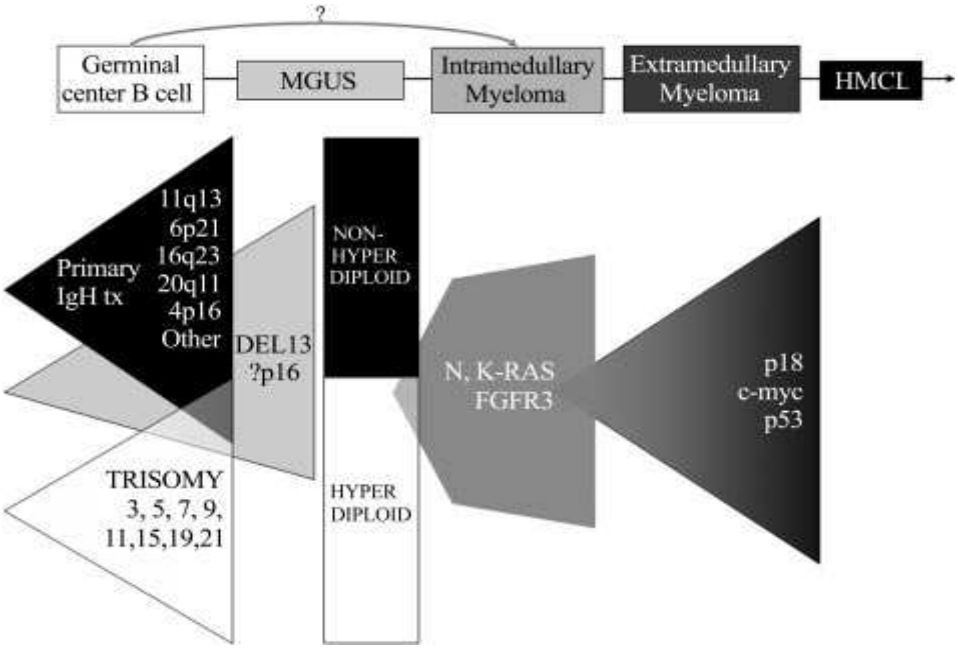


Abbildung 1.1 Genetisches Modell der Myelomgenese nach Hideshima et al. [7]

1.1.5 Klinik und Komplikationen

Die Initialsymptome beim MM sind uncharakteristisch. Bei einer Untersuchung von 500 Patienten an der Universität Heidelberg wiesen 80% bei Erstvorstellung **Knochenschädigungen** mit damit verbundenen Knochenschmerzen oder pathologischen Frakturen auf, 50% der Patienten gaben **Anämiesymptome** wie Müdigkeit, Kopfschmerzen oder Leistungsminderung an [8]. 83% der Patienten mit MM weisen Knochenläsionen am Schädel auf (sog. „Schrotschussschädel“). Inappetenz, Übelkeit, Erbrechen und Gewichtsverlust sind weitere Symptome. Aus dem sekundären Antikörpermangel und der Bi-/Panzytopenie resultiert eine **erhöhte Infektanfälligkeit**. Eine mögliche Thrombozytopenie kann zu Blutungen führen. Die durch die Immunglobulinopathie bedingten Leichtkettenablagerungen in Form von AL-Amyloid führen zu Schädigungen von Organen, insbesondere der Niere (Nephrotisches Syndrom mit Niereninsuffizienz, sog. **„Myelomniere“**). Weiterhin kann ein **Hyperviskositätssyndrom** mit Durchblutungsstörungen entstehen. Die Niere kann durch das erhöhte Serumkalzium und die damit verbundene Kalzurie geschädigt werden (**Nephrokalzinose**). Im Zusammenhang mit den beschriebenen Nierenschädigungen kann der Serumkreatininspiegel erhöht sein.

1.1.6 Diagnostik

Die Basisdiagnostik bei dem Verdacht auf MM lässt sich in Anamnese, klinische Untersuchung, Labor- und bildgebende Diagnostik sowie KM-Untersuchungen unterteilen. Im Blutbild sind Zeichen der KM-Insuffizienz und der Anämie zu erkennen. Weitere wichtige Laborparameter sind Kalzium, Kreatinin, Albumin, LDH, CRP, BSG und β2-Mikroglobulin. Zur Bildgebung beim MM gehört das konventionelle Röntgen („Pariser Schema“), welches zunehmend durch die Ganzkörper-MRT ersetzt wird. Neben der **KM-Punktion** und der **Serumelektrophorese** gehört die **Immunfixation** in Serum und Urin zu den Routinelaboruntersuchungen. Eine neue und sehr sensitive Spezialuntersuchung ist der **„Free-light-assay“**, durch den freie Leichtketten in Serum, Urin oder Liquor nachgewiesen werden können. Die zytologische Untersuchung gibt Auskunft über die Plasmazellinfiltration im KM. Durch die **molekularzytogenetische FISH-Analyse** können Chromosomenaberrationen detektiert werden, welche die Entscheidung für eine risikoadaptierte Therapie optimieren sollen. In Tabelle 1.1 sind die diagnostischen Kriterien der International Myeloma Foundation (IMF) aufgeführt.

Tabelle 1.1 Diagnosekriterien der IMF (Kyle et al., Br J Haematol, 2003)

Diagnosekriterien für das MM: alle 3 müssen erfüllt sein
1. Monoklonale Plasmazellen im Knochenmark > 10%
2. Monoklonales Protein im Serum und/oder Urin *
3. Myelom-assoziierte Dysfunktionen (1 oder mehr) - Kalzium i. S. ↑ - Serumkreatinin > 2 mg/dl - Anämie: Hb < 10 g/dl - Knochenläsionen
* Wenn kein monoklonales Protein vorhanden (asekretorisches MM): > 30% monoklonale PZ im KM erforderlich

1.1.7 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des MM nach **Salmon und Durie** [9], welche auch noch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, ist in Tabelle 1.3 dargestellt. Die Erweiterung dieses Systems durch die Einbeziehung bildgebender Verfahren wie MRT, Ganzkörper-FDG-PET und Ganzkörper-CT (**Salmon/Durie PLUS** [10]) konnte sich bislang nicht etablieren. In jüngerer Zeit setzt sich in Literatur und Klinik jedoch eine neue Stadieneinteilung, das **International Staging System (ISS)**, durch (siehe Tab. 1.2), basierend auf einer Studie von Greipp et al. (2005) [11]. Aktuell wird versucht, durch neue molekularzytogenetische Untersuchungsmethoden wie „global array-based gene expression profiling“ molekulare Subgruppen zu identifizieren [12, 13].

Tabelle 1.2 International Staging System (ISS) [11]

Stadium	**Klinik**	**Medianes Überleben**
I	β2-Mikroglobulin i. S. < 3,5 mg/l Albumin > 35 mg/dl	64 Monate
II	Weder Stadium I noch Stadium III	44 Monate
III	β2-Mikroglobulin i. S. > 5,5 mg/l	29 Monate

Tabelle 1.3 Stadieneinteilung des MM nach Salmon und Durie [9]

Stadium	Klinik	Medianes Überleben
I	≤ 1 Osteolyse IgG < 50 g/l oder IgA < 30 g/l Leichtketten im Urin < 4 g/24h Hb < 10 g/dl Kalzium i. S. < 2,6 mmol/l	I A: 69 Monate I B: 22 Monate
II	Weder Stadium I noch Stadium III	II A: 58 Monate II B: 34 Monate
III	Fortgeschrittene Osteolysen IgG > 70 g/l oder IgA > 50 g/l Leichtketten > 12 g/24h Hb < 8,5 g/dl Kalzium i. S. > 3 mmol/l	III A: 45 Monate III B: 24 Monate
	A: Serumkreatinin < 2 mg/dl; **B**: Serumkreatinin ≥ 2 mg/dl	

1.1.8 Prognosefaktoren

Zu den wichtigen Parametern für die Prognose beim MM zählen **β2-Mikroglobulin** und **IL-6** (als Indikatoren der Tumorzellmasse), Alter des Patienten, Krankheitsstadium, **Kreatininwert**, LDH- und CRP-Konzentration, Thrombozytenzahl, Hb-Wert und der **Plasmazell-Labeling-Index (PCLI)**. Eine hohe prognostische Relevanz haben daneben auch **chromosomale Veränderungen** (siehe 1.2 und 1.3). Ihre Untersuchung im Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf gewinnt zunehmend an Bedeutung für ein risikoadaptiertes therapeutisches Vorgehen, wie es bei der Behandlung von akuten Leukämien seit langem etabliert ist.

1.1.9 Therapie

Bei asymptomatischen Patienten im Stadium I nach Salmon und Durie gilt das Prinzip „watch and wait“, da sich in Studien ein Therapiebeginn zu diesem Zeitpunkt nicht als prognoseverbessernd erwiesen hat. Im Folgenden wird beschrieben, welche Therapiemöglichkeiten beim MM ab dem Stadium II zur Verfügung stehen.

1.1.9.1 Konventionelle Chemotherapie

Ende der sechziger Jahre wurde durch Alexanian et al. die Standardtherapie mit **Melphalan und Prednison** eingeführt. Der Anteil kompletter Remissionen (CR) lag bei unter 5 %, selten fand sich eine Gesamtüberlebenszeit (OS) von > 10 Jahren [14]. Vor einer Stammzellsammlung im Rahmen einer Hochdosistherapie (siehe 1.1.9.2) wird von diesem Schema abgeraten, da es im Gegensatz zum VAD-Schema (Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason) zur Reduktion hämatopoetischer Stammzellen führt. Diese Kombinationschemotherapie oder Modifikationen dieser Therapie erbrachten geringfügig höhere Remissionsraten, jedoch keine Prognoseverbesserung [15, 16]. Weitere Substanzen der konventionellen Chemotherapie sind **Cyclophosphamid**, **Bendamustin** oder **hochdosierte Glukokortikoide**. Sie werden vor allem in Kombinationstherapien mit neueren Wirkstoffen (siehe 1.1.9.4) eingesetzt.

1.1.9.2 Hochdosistherapie und Transplantation autologer peripherer Blutstammzellen

Durch die Hochdosistherapie (HDT) mit Melphalan gefolgt von einer autologen SZT konnte eine Erhöhung der CR auf bis zu 40% im Vergleich zu 5-10% nach konventioneller Chemotherapie sowie eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit von etwa 40 auf 60 Monate erreicht werden [17, 18]. Dadurch ist diese Therapieform aktuell die **Standardtherapie bei Patienten mit MM unter 60 Jahren**. Die Rezidivraten entsprechen jedoch denen nach konventioneller Chemotherapie.

1.1.9.3 Transplantation allogener peripherer Blutstammzellen

Die allogene Knochenmark- bzw. Blutstammzelltransplantation ist möglicherweise der einzige kurative Therapieansatz in der Behandlung des MM, jedoch ist der Stellenwert dieser Therapieform nicht gesichert. Nach einer allogenen SZT liegt die Wahrscheinlichkeit für ein krankheitsfreies 5-Jahres-Überleben bei 42% bei einem Altersmedian von 43 Jahren [19]. Diese verbesserte Prognose ist wahrscheinlich auf den „Graft-versus-Myeloma-Effekt“ zurückzuführen. In einer prospektiven Studie von 2006 mit 284 Patienten konnte allerdings kein Vorteil der HDT mit autologer SZT gefolgt von einer allogenen SZT gegenüber der „Tandem-HDT“ gezeigt werden [20]. Die Hauptprobleme der allogenen SZT sind die hohe therapiebedingte Mortalität (TRM) und Morbidität, welche durch die „Graft-versus-host-disease“ (GvHD), Organtoxizität und Infektionen bedingt sind. In den meisten retrospektiven Arbeiten lag die TRM bei 30-40%. In neueren Studien gelang jedoch durch **Verwendung von peripheren Blutstammzellen** statt Knochenmark eine bessere Kontrolle von GvHD und Infektionen und durch die Verabreichung von Donorlymphozyteninfusionen (DLI) eine

Reduktion der TRM auf etwa 20% [21, 22] (siehe auch Tab. 1.4). Auch in Studien, in denen eine weitaus **weniger aggressive Konditionierung** vor der Transplantation verwendet wurde (metakine/nicht-myloablative allogene SZT), konnte eine Reduktion der TRM erreicht werden (siehe Tab. 1.5).

Tabelle 1.4 Allogene SZT beim MM (myeloablative Konditionierung)

Studie	Patienten	CR	OS	EFS	TRM
Gahrton [23]	162	44%	32% (4 Jahre)	Keine Angabe	25%
Bensinger [24]	80	36%	24% (5 Jahre)	20% (5 Jahre)	56%
Alyea [25]	66	22%	39% (4 Jahre)	23% (4 Jahre)	24%
Reece [26]	26	50%	46% (3 Jahre)	40% (3 Jahre)	19%
Kröger [27]	18	53%	77% (6 Jahre)	31% (6 Jahre)	17%

Tabelle 1.5 Allogene SZT beim MM (dosisreduzierte Konditionierung)

Studie	Patienten	CR	OS	EFS	TRM
Badros [28]	31	61%	15 Mon. (median)		30%
Lee [29]	45	64%			
Peggs [30]	20	10%	71% (2 Jahre)	30% (2 Jahre)	15%
Einsele [31]	22	59%	62% (2 Jahre)	26% (2 Jahre)	23%
Perez-Simon [32]	29	k. A.	60% (2 Jahre)	33% (2 Jahre)	21%
Kröger [33]	17	73%	74% (2 Jahre)	56% (2 Jahre)	11%
Maloney [34]	54	57%	78% (1 Jahr)		

1.1.9.4 Neuere Wirkstoffe

Vor allem bei therapierefraktärem oder rezidiviertem MM, aber auch als Induktionstherapie bei älteren Patienten oder vor einer HDT mit autologer SZT wird **Thalidomid** verwendet. Dabei kommt es als Monotherapie oder in Kombinationstherapien mit z. B. Dexamethason oder Cyclophosphamid zum Einsatz. Ähnliche Indikationen bestehen für das ebenfalls zu den „immunomodulatory drugs“ (ImiDs) zählende **Lenalidomid**, auf das zudem auch Patienten mit Therapieversagen nach Thalidomid ansprechen. Seit dem Jahr 2004 ist der Proteaseinhibitor **Bortezomib** (Velcade®) zur Therapie des MM zugelassen und wird vor allem bei stark vorbehandelten Patienten in Mono- oder Kombinationstherapien eingesetzt. Weitere Medikamente wie z. B. Angiogeneseinhibitoren oder verschiedene Antikörper werden in Studien geprüft und lassen erwarten, dass bald weitere Substanzen in die Myelombehandlung integriert werden können.

1.2 Konventionelle Zytogenetik

1.2.1 Methodik

Die konventionelle zytogenetische Untersuchung ist eine Chromosomenanalyse, die auf der Gewinnung von **Metaphasen** durch Kultivierung von vitalen und teilungsfähigen Zellen beruht. Auf diese Weise kann man eine umfassende Darstellung der genetischen Aberrationen in den Plasmazellen von Patienten mit MM erhalten. Problematisch bei dieser Methode ist, dass die zur Analyse der Chromosomen benötigten Metaphasen häufig nur in ungenügender Anzahl vorhanden sind, da der PCLI in der Plateauphase der Erkrankung bei < 1% liegt [35]. Diese Beobachtung unterscheidet das MM als Erkrankung der terminal differenzierten B-Zelle von anderen Tumoren des hämatopoetischen Systems und hat zytogenetische Untersuchungen in der Vergangenheit stark eingeschränkt. In einigen Studien wurde durch eine Stimulation der Knochenmarkzellen mit Wachstumsfaktoren ein Anstieg der auswertbaren Metaphasen von 30% auf 50% erreicht. [36, 37]. Ein Nachteil gegenüber molekularzytogenetischen Methoden ist jedoch auch, dass kleine oder zu terminal gelegene Veränderungen an den Chromosomen in der konventionellen Zytogenetik nicht sichtbar werden. Eine geringe KM-Infiltration durch die Plasmazellen stellt ein weiteres Problem dar. Die zytogenetische Analyse ergibt dann häufig Normalbefunde, da Kerne von normalen KM-Zellen analysiert werden. Weh et al. zeigten mit speziellen Färbemethoden, dass die Metaphasen bei Patienten mit einem normalen Karyotyp überwiegend nicht von Plasmazellen stammen, sondern als Kontamination von anderen, nicht-malignen Zellen des hämatopoetischen Systems zu verstehen sind [38].

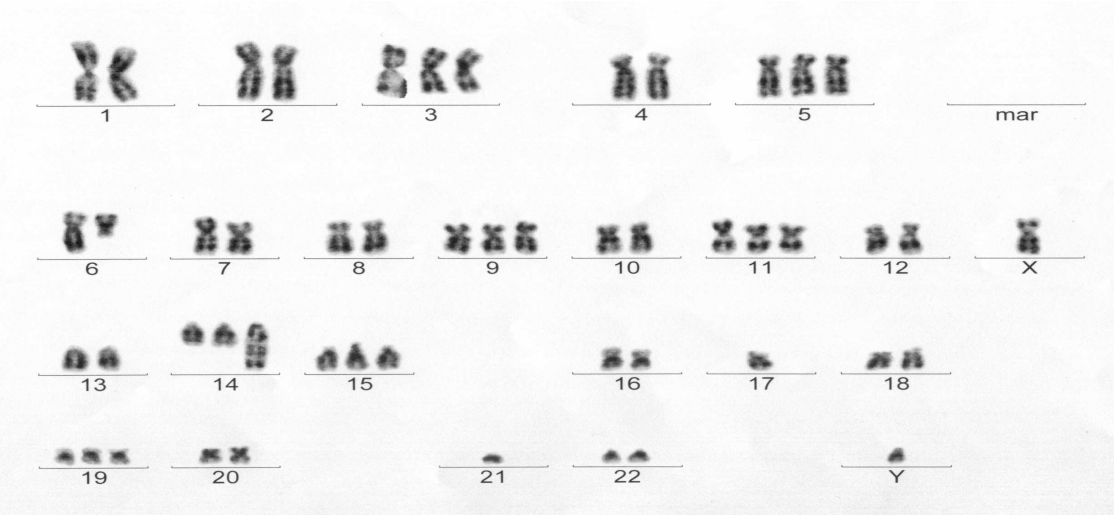


Abbildung 1.2 Konventionelle Zytogenetik; typischer komplexer hyperdiploider patholog. Karyotyp mit 9 numerischen (Chr. 3, 5, 9, 11, 14, 15, 17, 19, 21) und 2 strukturellen (6q, 14q) Aberrationen

1.2.2 Inzidenz und prognostische Bedeutung von zytogenetisch detektierten Chromosomenaberrationen

Mittels der konventionellen zytogenetischen Untersuchung sind bei 30-50% der Patienten mit Multiplem Myelom klonale Chromosomenveränderungen nachweisbar [39-41]. Zwischen klinischen Parametern und zytogenetischem Befund bestehen signifikante Zusammenhänge. So sind Chromosomenaberrationen häufiger im fortgeschrittenen Stadium mit erhöhtem β2-Mikroglobulin. Es bestehen Korrelationen zum Grad der KM-Infiltration, zum Auftreten von Osteolysen und zur Höhe des PCLI [42]. Bei Patienten mit klonalen Aberrationen sind zudem eine höhere Progressionsrate, ein kürzeres EFS und ein kürzeres OS zu beobachten [43-45]. Patienten mit MM sind anhand der Zytogenetik in zwei Gruppen einzuteilen: In der **hyerdiploiden Gruppe** findet man gehäuft Trisomien der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 sowie Verluste der Chromosomen 2, 8, 13, 14 und Y [45-48]. Sie zeichnet sich durch eine günstige Prognose aus. In der **hypodiploiden Gruppe** finden sich signifikant häufiger strukturelle Veränderungen wie *IGH*-Translokationen oder Aberrationen, die den Bereich des *BCL1*-Gens (11q13) oder den langen Arm von Chromosom 1 involvieren. Zudem treten gehäuft Deletionen des Chromosom 13 (Monosomien oder komplette/partielle Deletionen des q-Arms) auf [45-49]. Die hypodiploide Gruppe zeichnet sich durch eine ungünstige Prognose aus. Sie ist mit einer höheren Progressionsrate, einem kürzerem EFS und einem kürzeren OS assoziiert [50]. Strukturelle Veränderungen in 11q13 (*BCL1*-Lokus), 14q32 (*IGH*-Lokus) oder Deletionen in 13q14 sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Prognostisch günstiger dagegen werden Trisomien der Chromosomen 9 und 19 eingeschätzt [45-49, 51, 52]. In einer Studie mit 55 Patienten mit einem neu diagnostizierten MM wurde in 39 % ein abnormaler Karyotyp nachgewiesen, was mit einer signifikant niedrigeren Rate an CR (27 % vs. 48 %) assoziiert war. Die wichtigsten genetischen Veränderungen waren eine partielle oder komplette Deletion von Chromosom 13 oder strukturelle Veränderungen des langen Arms von Chromosom 11. Patienten mit beiden Abnormalitäten hatten die schlechteste Prognose mit einem OS von 12 Monaten [53]. Auch nach HDT einschließlich „Tandem-HDT“ hatten Patienten mit abnormem Karyotyp ein signifikant schlechteres EFS und OS [42, 54], insbesondere dann, wenn eine Deletion 13 oder Hypodiploidie vorlagen [55].

1.3 Molekularzytogenetik

1.3.1 Methodik

1.3.1.1 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

Die CGH erlaubt eine globale Analyse chromosomaler Imbalancen wie Trisomien, Amplifikationen oder Deletionen in Tumorgenomen [56]. Im Gegensatz zur konventionellen FISH-Technik werden keine definierten DNA-Sonden mit Metaphase- oder Interphase-Zellen des Tumors hybridisiert, sondern die gesamte Tumor-DNA und normale Kontroll-DNA mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert und auf normale Metaphase-Chromosomen hybridisiert. Unterschiede der Signalintensitäten der beiden genomischen Proben entlang der Chromosomen können mittels eines speziellen Computersystems identifiziert werden. Die Aussagekraft der CGH ist jedoch limitiert, da balancierte Aberrationen wie reziproke Translokationen sowie genetische Veränderungen < 5-10 Mbp nicht detektiert werden können [57-60]. Die Inzidenz von klonalen Aberrationen beträgt bei dieser Untersuchungstechnik etwa 70% [58, 61].

1.3.1.2 Vielfarben-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (M-FISH)

Die M-FISH-Technik (auch „multicolour spectral karyotyping“, SKY) ist eine neuartige Methode, die es ermöglicht, durch die Kombination verschiedener Fluorochrome jedes Chromosomenpaar der Metaphase individuell zu markieren [62, 63]. Wie bereits bei anderen Krankheitsentitäten gezeigt wurde, können durch die Farbkodierung der Chromosomen relevante Informationen gewonnen werden, die durch die klassische zytogenetische Analyse nicht zur Darstellung kommen. So können Markerchromosomen oder chromosomales Material unbekannter Herkunft spezifiziert werden. Zudem können sogenannte kryptische (zytogenetisch nicht erkennbare) chromosomale Veränderungen durch die Farbkodierung der Chromosomen sichtbar gemacht werden [64-68].

1.3.1.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und cIg-FISH

Die FISH ist eine molekulazytogenetische Methode, bei der durch die Applikation fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden komplementäre DNA-Sequenzen in Metaphase-Chromosomen und Interphase-Kernen des Tumorgenoms dargestellt und somit genomische Alterationen nachgewiesen werden können [69-71]. Auf Grund ihrer Größe und der daraus resultierenden Signalstärke sind für die Interphase-Diagnostik DNA-Sonden, die in künstlichen Bakterien- oder Hefechromosomen kloniert sind (bacterial artificial chromosome [BAC], yeast artificial chromosome [YAC]), gut

geeignet. FISH kann an KM-Ausstrichen, an sogenannten Tropfpräparaten fixierter KM-Zellen, an peripheren Blutausstrichen und an fixiertem und geschnittenem Gewebe durchgeführt werden. Die verwendeten DNA-Sonden werden meist durch enzymatische Inkorporation von biotin- oder digoxigeninmarkierten Nukleotiden oder direkt durch Fluorochrome markiert. Weitere Schritte bis zur mikroskopischen Analyse sind die Denaturierung der Ziel- und Sonden-DNA, die Hybridisierung und die Detektion. Eine schematische Darstellung der Arbeitsschritte zeigt die Abbildung 1.3. Konnten anhand der konventionellen Zytogenetik Deletionen von maximal einer chromosomalen Bande (ca. 4000 Kb) mikroskopisch nachgewiesen werden, ist es mit der FISH möglich, Veränderungen von nur wenigen Kb zu registrieren, was auf Grund der Tatsache, dass die Größe von Genen meist im Bereich von maximal einigen 100 Kb liegt, einen entscheidenden Fortschritt darstellt. Dementsprechend kam es durch Interphase-FISH-Studien zur Detektion von genetischen Aberrationen bei über 90% der Myelompatienten [72], da nun auch kleine interstitielle Deletionen und Insertionen oder subtelomere Aberrationen dargestellt werden konnten. Ein weiterer Vorteil ist, dass auch die Analyse von Interphasezellen möglich ist. Weil keine Mitosen mehr benötigt werden, vereinfacht dies die Untersuchung von Tumoren mit einer sehr niedrigen Proliferationsrate und verleiht der Methode eine hohe Sensitivität und Spezifität. Nachteilig hierbei ist, dass durch die gezielte Darstellung einzelner Aberrationen keine umfassende Genom- und Chromosomenanalyse möglich ist. Weiterhin kann man bei der mikroskopischen Auswertung eines Präparats die Kerne der Plasmazellen (PZ) nicht von denen der übrigen KM-Zellen unterscheiden, wodurch immer auch benigne Zellen mit ausgewertet werden. Besonders bei einer geringen Knochmarkinfiltration durch die PZ ist das Ergebnis also nicht aussagekräftig. Abhilfe für zuletzt genanntes Problem konnte durch die **Kombination der FISH mit einer zytoplasmatischen Immunglobulinfärbung (cIg-FISH)** geschaffen werden. Bei dieser auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methodik bleiben die Charakteristika der Zellen erhalten. Durch eine immunhistochemische Darstellung der intrazytoplasmatisch gelegenen κ- und λ-Leichtketten mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper ist es nun möglich, die PZ sicher von den restlichen KM-Zellen zu unterscheiden [73]. Dies führt zu einer weiteren Steigerung von Sensitivität und Spezifität der Methode. Eine Alternative im Falle eines sehr geringen PZ-Anteils im KM-Aspirat stellt die Anreicherung der PZ mittels „magnetic activated cell sorting“ (MACS) dar. Auf Grund der fehlenden umfassenden Chromosomenanalyse der cIg-FISH wird die Kombination mit der konventionellen Zytogenetik empfohlen [74, 75].

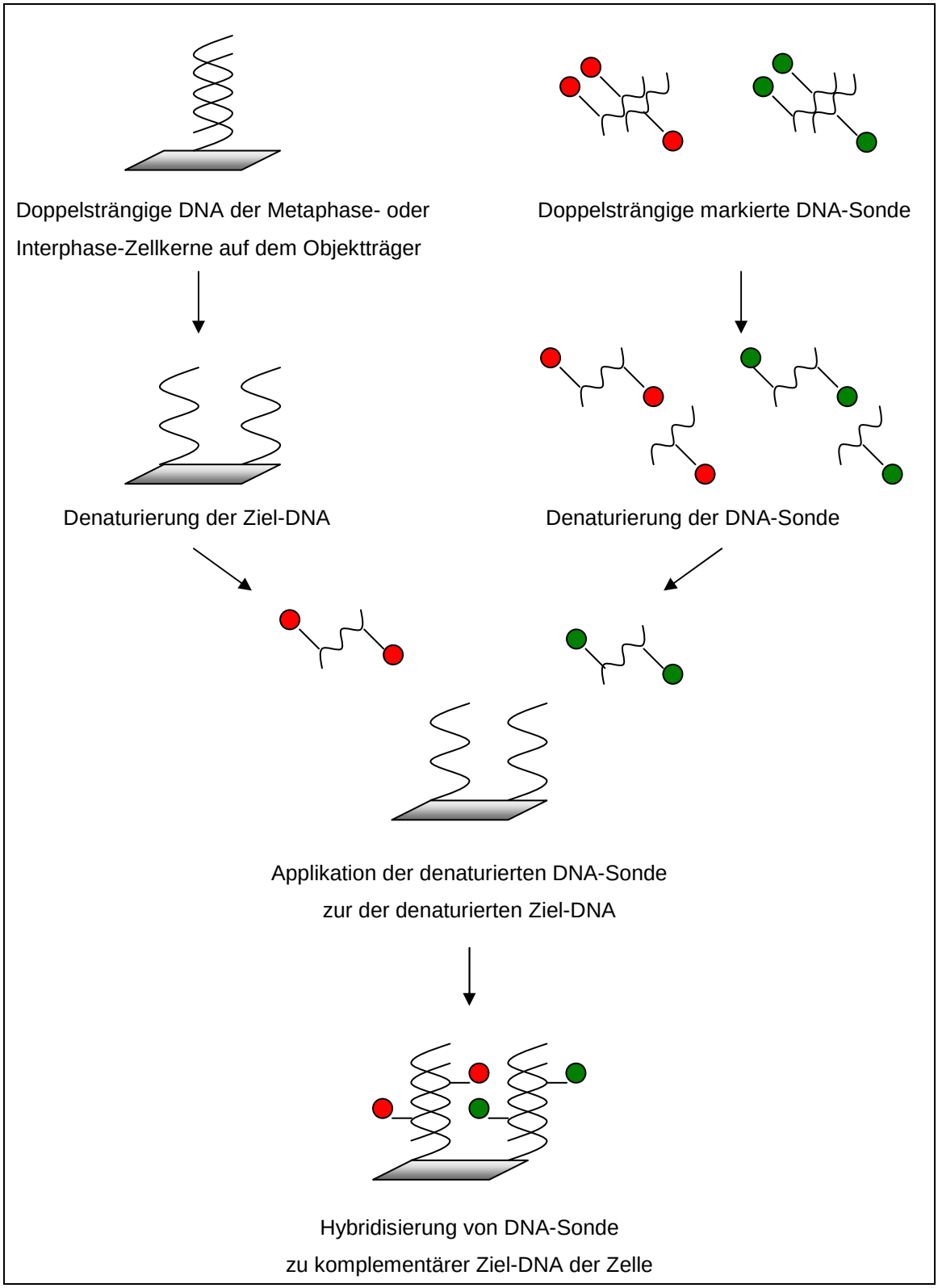


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der FISH-Technik

1.3.1.4 DNA- und RNA-Chips

Zu den neuesten und modernsten Untersuchungemethoden in der Analyse von Chromosomenveränderungen beim MM gehören DNA-/RNA-Chips oder -Microarrays. Sie bestehen aus einem festen Träger (z. B. Glasobjektträger), auf den in einem regelmäßigen Muster einzelsträngige DNA-/RNA-Moleküle bekannter Sequenz aufgebracht sind. Nach der Probenvorbereitung (Extraktion, PCR) folgt die Hybridisierung auf dem Microarray, anschließend, nach stringentem Waschen, die Detektion. Mittels Sequenzanalyse und Gen-Expressionsanalyse werden die Chips bioinformatisch ausgewertet. Bei höchstintegrierten Microarrays können so mehr als 10.000 verschiedene Gene gleichzeitig analysiert werden. Durch dieses sogenannte „global gene expression profiling“ mittels „microarray-based comparative genomic hybridization“ (M-CGH) verpricht man sich eine Screeningmethode, anhand der molekulare Subgruppen des MM klassifiziert werden können [76-80].

1.3.2 Inzidenz und prognostische Bedeutung von molekularzytogenetisch detektierten Chromosomenaberrationen

1.3.2.1 Deletion 13q14

Hierbei handelt es sich um den Verlust des ganzen oder des größten Teils des langen Arms von Chromosom 13, nur gelegentlich treten interstitielle Deletionen auf [81]. Besonders häufig betroffen sind die Regionen D13S72 und D13S31, dahinter die ebenfalls auf 13q lokalisierten Gene *BRCA2* und *RB1*, fast immer aber ist die Region 13q14 betroffen [82-85].

Die Inzidenz von Deletion 13q14 beträgt in konventionellen zytogenetischen Studien 14-36% [37, 39, 41, 42, 47, 50, 51, 53], in Interphase-FISH-Studien 28-54% [52, 86-95]. In einer Studie fanden sich Deletionen von D13S72 und D13S31 sogar in 70% und 64% der Fälle [83].

Auffällig bei Patienten mit del(13q) sind eine gesteigerte Neoangiogenese im KM [96] und Korrelationen zur Höhe des M-Gradienten, zum λ-Leichtketten-Typ, zu erhöhten LDH- und β2-Mikroglobulin-Spiegeln und zu einem niedrigen Hb-Wert [97]. Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von Deletion 13q hat in den vergangenen Jahren ein Umdenken stattgefunden. Untersuchungen aus den Jahren 1999 - 2004 zeigten ein signifikant kürzeres EFS und OS sowohl nach konventioneller Chemotherapie als auch nach Hochdosistherapie und allogener SZT [86, 90, 92-95, 98]. Neuere Studien aus den Jahren 2005 - 2007 wiesen jedoch nach, dass Deletion 13q als alleinige Aberration

bei Patienten mit MM in der uni- und multivariaten Analyse keinen ungünstigen prognostischen Faktor darstellt [52, 75, 87, 88, 99, 100]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Deletion 13q häufig mit anderen als prognostisch ungünstig eingestuften Aberrationen wie z. B. t(4;14) oder t(14;16) assoziiert ist [87, 88, 91, 101, 102]. Es wird vermutet, dass ein bislang der Deletion 13 zugeschriebener negativer Einfluss auf die Prognose möglicherweise auf diese mit ihr assoziierten *IGH*-Translokationen zurückzuführen ist (siehe auch 1.3.2.4).

1.3.2.2 Deletion 17p13

Auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 ist das Tumorsuppressorgen *P53* lokalisiert, welches in die Kontrolle der normalen Zellproliferation, -differenzierung und -apoptose involviert ist. Die Inaktivierung von *P53* (durch Mutation oder Verlust eines Allels) wurde in vielen soliden Tumoren gefunden und zeigte sich als prognostisch relevant. Bei hämatologischen Erkrankungen ist die Inzidenz weitaus geringer. Unklar ist momentan weiterhin, ob die *P53*-Funktion beim MM bereits durch den Verlust eines Allels inaktiviert ist oder noch zusätzliche Faktoren eine Rolle spielen.

In den meisten großen FISH- und PCR/SSCP-Studien lag die Inzidenz der *P53*-Deletion bei 2-13% [52, 87, 88, 90, 103-107], nur in einer Studie bei neu diagnostizierten Myelomen fand sie sich in 33% der Fälle [108]. Die geringere Inzidenz bei der MM-Vorstufe MGUS [109] und die Assoziation zu aggressiven Verläufen (z. B. Plasmazellleukämie) mit einer Inzidenz von bis zu 55 % bei fortgeschrittenen Myelomen und über 60 % in HMCLs lassen vermuten, dass die Deletion *P53* als ein Marker der Tumorprogression zu werten ist [86, 89, 108, 110-117]. Bei Patienten mit einer ZNS-Beteiligung des MM wurde sie sogar in 89% der Fälle gefunden [118]. Um ein Vielfaches geringer ist die Inzidenz bei konventionellen zytogenetischen Untersuchungen, was dadurch erklärbar ist, dass es sich meist um interstitielle Deletionen handelt, die auf den Chromosomen nicht erkannt werden können [108].

Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung fand sich bei Patienten mit *P53*-Deletion ein signifikant kürzeres OS nach konventioneller Chemotherapie [86, 90, 108, 115, 116]. Als Ursache für die kurze Überlebenszeit ist das schlechte Ansprechen auf die Chemotherapie anzusehen. Dies erinnert an Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie [119] und ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass viele zytotoxische Substanzen über eine Induktion der Apoptose wirken, wofür beide *P53*-Allele benötigt werden. Alternativ ist die Generierung komplexer genetischer Veränderungen nach Verlust der Wächterfunktion von *P53* zu diskutieren. Nach einer Hochdosistherapie

zeigte sich ein signifikant kürzeres EFS und OS [87, 88, 102, 106]. Über die prognostische Bedeutung nach allogener SZT liegen bisher keine Studien vor.

1.3.2.3 *CMYC*-Überrepräsentation

Das Onkogen *CMYC* ist in der Region 8q24 lokalisiert. Seine pathogenetische Rolle beim MM wurde zum ersten Mal 1988 beschrieben [120]. *CMYC* spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von Zellproliferation, -differenzierung und -apoptose. Es aktiviert Gene, deren Produkte das vollständige Durchlaufen der einzelnen Phasen des Zellzyklus ermöglichen und inhibiert gleichzeitig die Transkription der Gene, deren Proteine für Wachstumsstopp und Differenzierung verantwortlich sind.

Mittels Interphase-FISH-Studien wurden komplexe Strukturveränderungen des *CMYC*- oder des verwandten *LMYC*-Gens in 19 von 20 Myelomzell-Linien und bei etwa 50% der fortgeschrittenen Myelome gefunden, darunter komplexe Insertionen und Translokationen (Translokationspartner: IgH- oder IgL-Lokus) [121]. Eine weitere Interphase-FISH-Studie zeigte Rearrangements des *CMYC*-Gens in 15% der untersuchten MM und Plasmazellleukämien, wobei keine Korrelation zum Krankheitsstadium bestand [122]. Nur 25% der Rearrangments wurden hier durch Translokationen wie t(8;22) oder die t(8;14) repräsentiert. Diese Translokationen gehören zu den sekundären, komplexen Translokationen beim MM und treten wahrscheinlich als späte Ereignisse im Krankheitsprogress auf [123, 124]. Die reziproke t(8;14) hat beim MM mit einer Inzidenz von weniger als 5% im Gegensatz zum Burkitt-Lymphom eine geringere Bedeutung [125-127]. Häufiger ist dagegen eine verstärkte *CMYC*-Expression [128]. Hierfür sind entweder Genamplifikationen oder Mutationen im 5'-nicht-translatierten Bereich des *CMYC*-Gens verantwortlich, die zur Deregulation der Translokationskontrolle dieses Gens führen [129].

Eine gesteigerte *CMYC*-Expression erhöht die Proliferationsaktivität der Myelomzellen, was zu einem aggressiveren Krankheitsverlauf führt [130]. In einer kleineren FISH-Studie aus dem Jahr 2001 wiesen 32% der Patienten eine Überrepräsentation von *CMYC* auf. Bei diesen Patienten wurde ein signifikant kürzeres EFS nach konventioneller Chemotherapie gezeigt [116]. Über die prognostische Bedeutung nach Hochdosistherapie oder allogener SZT liegen bisher keine Studien vor.

Tabelle 1.6 del(13q14), del(17p13) und *CMYC*-Überrepräsentation beim MM

Genlokus	Inzidenz	Involvierte Gene	Genfunktion
13q14	28-54%	*RB1*	Zellzyklusregulation
17p13	2-13%	*P53*	Zellzyklusregulation
8q24	33%*	*CMYC*	Zellzyklusregulation

* Bisher nur 1 Studie an 31 Patienten

1.3.2.4 *IGH*-Translokationen

Der Immunglobulin-Schwerkettenlokus ist in der Region 14q32 lokalisiert. Alterationen in dieser Region sind bei Plasmazellerkrankungen und anderen B-Zell-Neoplasien häufig. Die Partnergene von Translokationen sind bei den malignen Lymphomen spezifisch (*CMYC* beim Burkitt-Lymphom, *Cyclin D1* beim Mantelzell-Lymphom, *BCL2* beim follikulären Lymphom), beim MM dagegen sind diese sehr variabel. Die Bedeutung der *IGH*-Translokationen wurde beim MM lange unterschätzt [127]. Erst durch FISH mit *IGH*-spezifischen Sonden konnte gezeigt werden, dass häufig kryptische (zytogenetisch nicht nachweisbare) Translokationen mit Bruchpunkt im *IGH*-Lokus stattfinden. Diese Bruchpunkte treten in der Regel in den 'switch'-Regionen des *IGH*-Lokus auf [131]. Im Gegensatz zu den meisten *IGH*-Translokationen bei nodalen Lymphomen, die zumeist im Rahmen eines illegitimen VDJ-Rearrangements auftreten, scheint somit bei Myelomen häufig eine illegitime 'switch'-Rekombination zur Translokation zu führen.

Durch Interphase-FISH und andere molekulare Techniken werden *IGH*-Veränderungen bei über 75% der Patienten mit MM und in nahezu 100% der HMCL gefunden [125, 132, 133]. Dabei scheint die Inzidenz in frühen Krankheitsstadien (I und II) genauso hoch wie im Stadium III, bei Plasmazellleukämien oder im Rezidiv zu sein [133]. Die häufigsten Tranlokationen sind t(4;14) und t(11;14), weniger häufig sind Translokationen mit *MUM-2* (1q21), *MYC* (8q24), *PAX5* (9p13), *BCL7A* (12q24), *BCL2* (18q21), *IRF4* (6p25) und *MAF* (16q23) [134]. Dysregulationen der Gene *PAX5* und *BCL7A* sind auch vei lymphoplasmozytoiden Lymphomen bzw. Burkitt-Lymphomen beschrieben. Tabelle 1.7 bietet eine Übersicht über die wichtigsten primären *IGH*-Translokationen. Diese Translokationen treten beim MM und bei der MGUS in ähnlicher Frequenz auf (40-60%), woraus sich schließen lässt, dass sie höchstwahrscheinlich frühe pathogenetische Ereignisse darstellen [7, 135-137], gefolgt von Chromosom-13-Veränderungen, deren Entstehen möglicherweise durch t(4;14) und t(14;16) getriggert werden [91].

Außer bei t(11;14) hat sich bei *IGH*-Translokationen in den meisten Studien ein negativer Einfluss auf die Prognose von Patienten mit MM gezeigt. Wie in 1.3.2.1 erwähnt, zeigte sich vor allem in aktuelleren Studien, dass auch die ungünstige Prognose bei Patienten mit Deletion 13q wahrscheinlich eher den *IGH*-Translokationen zuzuschreiben ist, welche häufig mit dem Auftreten der Deletion 13q vergesellschaftet sind [87, 88, 91, 101, 102]. Auf die prognostische Bedeutung der einzelnen Translokationen wird im Folgenden detailliert eingegangen.

Tabelle 1.7 Primäre *IGH*-Translokationen beim MM

Partnerlokus	Inzidenz	Involvierte Onkogene	Onkogenfunktion
11q13	8-21%	*Cyclin D1*	Zellzyklusregulation
4p16.3	10-27%	*FGFR3 + MMSET*	Rezeptortyrosinkinase
16q23	1-5%	*C- MAF*	bZIP-Transkriptionsfaktor
6p25	21%*	*MUM1/IRF4*	Transkriptionsfaktor

* Bisher nur 1 Studie mit 38 Patienten vorhanden

1.3.2.4.1 t(4;14)(p16;q32)

Die Translokation t(4;14) gehört neben t(11;14) zu den mit Abstand häufigsten *IGH*-Translokationen beim MM. Sie hat Auswirkung auf die Expression von 2 Genen in der Region 4p16: Das Fibroblast-Growth-Factor-Rezeptor-3-(***FGFR3***-)Gen, welches für eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase kodiert, die in Lymphozyten normalerweise nicht exprimiert wird, gelangt durch die Translokation auf das derivative Chromosom 14 unter den Einfluß des *IGH*-Enhancer-Elements und wird überexprimiert [138]. Dadurch werden ständig proliferations-stimulierende Signale vermittelt, was möglicherweise zu einer Immortalisierung der Myelomzelle beiträgt [127]. *FGFR3*-überexprimierende Myelomzellen proliferieren auch in Abwesenheit ihres Hauptwachstumsfaktors Interleukin IL-6: Mit IL-6 findet ein gesteigertes Wachstum statt, nach IL-6-Entzug wurde eine geringere Apoptoserate registriert [139]. Zudem wurde herausgefunden, dass *FGFR3* ein Onkogen ist, das über den MAP-Kinase-Pfad embryonale Fibroblasten von Mäusen transformiert. Diese Mäuse entwickelten hämatologische Erkrankungen vom prä-B-Zell-Phänotyp, womit die transformierende Qualität von *FGFR3* bewiesen wurde [140, 141]. Weiterhin waren bei einem Teil der MM Mutationen in dem translozierten Gen nachweisbar, welche über Autophosphorylierung zur konstituionellen Aktivierung des mutierten *FGFR3*-Proteins und somit zum pro-proliferativen Effekt führten. In einer neueren Studie wurde ein inhibitorischer Anti-*FGFR3*-Antikörper (PRO-001) vorgestellt, bei dem eine zytotoxische Wirkung auf

Myelomzellen mit t(4;14) nachgewiesen werden konnte [142]. Das zweite dysregulierte Gen ist ***MMSET/WHSC1***. Die Funktion des Gens und seine Bedeutung für die Pathogenese des MM ist bislang jedoch ungeklärt [143, 144]. Möglicherweise kodiert es für einen Transkriptionsfaktor, der vor allem in schnell wachsenden embryonalen Geweben, aber auch in verschiedenen adulten Geweben exprimiert wird. Auf niedrigem Niveau wird er in HMCLs exprimiert und ist im Falle der genannten Translokation überexprimiert [138]. t(4;14)(p16;q32) ist somit das erste gesicherte Beispiel für eine *IGH*-Translokation, bei der gleichzeitig zwei Gene mit onkogenem Potential fehlreguliert werden.

Anhand der konventionellen zytogenetischen Analyse ist t(4;14) in der Regel nicht erkennbar, da beide Translokationspartner am telomeren Ende der Chromosomen liegen. Die erstmalige Identifikation der Translokation gelang 1997 durch Southern-Blot-Analysen [145, 146]. Mittels RT-PCR-, Southern-Blot- und FISH-Analysen ist t(4;14) bei 10-27% der Patienten mit MM nachweisbar [52, 87, 88, 101, 134, 138, 146-149]. In einigen Studien fand sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von t(4;14) und Deletion 13q [87, 88, 91, 101].

Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung wurde gezeigt, dass Patienten mit t(4;14) ein schlechteres Ansprechen und ein signifikant kürzeres EFS und OS nach konventioneller Chemotherapie aufweisen [90, 150]. Als Ursache für das schlechtere Ansprechen auf die Chemotherapie wurde eine Drogenresistenz in Betracht gezogen. Nach einer Hochdosistherapie wurde ebenfalls ein signifikant kürzeres EFS und OS und auch eine geringere Rate an CR festgestellt [87, 88, 102, 149, 151, 152]. Über die prognostische Bedeutung nach allogener SZT liegen bisher keine Ergebnisse vor.

1.3.2.4.2 t(11;14)(q13;q32)

Neben der Amplifikation von 11q führt auch die balancierte t(11;14) zur Überexpression des ***BCL1/Cyclin D1***-Proto-Onkogens (Chromosomenregion 11q13) [153-156]. Das Cyclin-D1-Protein bindet an Cyclin-D1-abhängige Kinasen (CDK). Die entstehenden Komplexe wiederum binden an das *RB1*-Gen-Produkt (pRB) und führen zu dessen Hyperphosphorylierung und Inaktivierung. Dieser Vorgang hat die Progression durch die G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus zur Folge [157]. Zusätzlich scheint zudem das potentielle Proto-Onkogen *MYEOV* dysreguliert zu werden [158].

Die Translokation t(11;14)(q13;q32) tritt typischerweise beim Mantelzell-Lymphom auf. Beim MM wird sie durch die konventionelle Zytogenetik nur bei 5% der Patienten

erkannt [39, 41, 53], mittels FISH-Anlyse ist sie jedoch bei 8-21% der Patienten nachweisbar [52, 86-88, 91, 102, 134, 152, 159].

Während in zwei kleineren konventionellen zytogenetischen Studien und einer FISH-Studie Ende der neunziger Jahre von einer ungünstigen Prognose bei Patienten mit t(11;14) ausgegangen wurde [160-162], zeigten aktuellere, an größeren Patientenkollektiven erhobene Daten, dass die Translokation im Gegensatz zu anderen genetischen Aberrationen keinen oder sogar einen günstigen Einfluss auf die Prognose hat: Es bestand kein Unterschied beim EFS oder OS nach konventioneller Chemotherapie [159]. Im Gegensatz zu Patienten mit Deletion 13q, *P53*-Deletion oder t(4;14) zeigten jene mit t(11;14) ein ebenso langes oder signifikant längeres EFS und OS nach einer Hochdosistherapie [87, 88, 102, 152]. In zwei weiteren Studien wurde bei Patienten mit einer Cyclin-D1-Überexpression ein signifikant längeres EFS nach Hochdosistherapie oder „Tandem-HDT“ beschrieben [163, 164]. Über die prognostische Bedeutung nach allogener SZT liegen bisher keine Studien vor.

1.3.2.4.3 t(14;16)(q32;q23)

Durch die Translokation t(14;16) gelangt das humane Homolog des viralen *V-MAF*-Onkogens, das ***C-MAF***-Proto-Onkogen, unter den Einfluß regulatorischer Elemente im *IGH*-Lokus. *C-MAF* kodiert für einen Transkriptionsfaktor der 'basic zipper'-Familie, zu welcher auch andere Proto-Onkogene wie *C-JUN* oder *C-FOS* gehören. Mehrere Mitglieder der 'basic zipper'-Familie sind in die Kontrolle von Proliferation, Differenzierung oder das Antwortverhalten auf IL-6 eingeschaltet. Bei welchem dieser Mechanismen *C-MAF* bei der Myelompathogenese eine Rolle spielt, ist noch unklar. Neben der *C-MAF*-Hochregulation kommt es durch die genannte Translokation auch zu einem Bruch in dem kürzlich beschriebenen Gen *WWOX* [165]. Man schreibt diesem Gen, das mehrere 100 Kb in der Region 16q23 umfaßt und an der fragilen Stelle Fra16D liegt, eine mögliche Funktion als Tumorsuppressorgen zu.

Etwa 25% der HMCLs, aber nur 1-5% der primären Myelome weisen die Translokation t(14;16)(q32;q23) auf [88, 90, 91, 134, 152, 166].

Im Hinblick auf den prognostischen Einfluss von t(14;16) liegen nur wenige Studien vor. So zeigte sich nach konventioneller Chemotherapie ein signifikant kürzeres EFS und OS bei Patienten mit t(14;16) [90]. Den gleichen negativen Einfluss auf die Prognose hatte die Translokation nach einer Hochdosistherapie [88]. Über die prognostische Bedeutung nach allogener SZT liegen bisher keine Untersuchungen vor.

In einer Studie aus dem Jahr 2002 wiesen von 20 t(14;16)-positiven Patienten 92% ebenfalls eine Deletion 13q auf [91]. Diese Assoziation konnte in anderen Studien allerdings nicht bestätigt werden.

1.3.2.4.4 t(6;14)(p25;q32)

Im Gegensatz zum Genlokus 6p21, auf dem sich das Onkogen *Cyclin D3* befindet, ist 6p25 als Translokationspartner von 14q32 beim MM bislang wenig erforscht. Die Translokation t(6;14)(p25;q32) führt zur Dysregulation des Gens ***MUM1*** (multiple myeloma oncogene 1)***IIRF4*** (interferon regulatory factor 4) in der Region 6p25. Das *IRF4*-Gen kodiert für einen Transskriptionsfaktor, der sowohl die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen als auch deren Proliferation nach Mitogen-Stimulation reguliert [167]. In betroffenen Fibroblasten fördert die *IRF4*-Überexpression eine Transformation. Darüber hinaus wird in den Zellen mit *IRF4*-Expression neben drei anderen Genen das *MIG*-(monokine induced by interferon-gamma-)Gen überexprimiert. Auf diese Weise spielt *IRF4* vermutlich eine Rolle bei der Progression von malignen B-Zell-Erkrankungen/Leukämien [168]. Auch bei der B-CLL und dem Hodgkin-Lymphom wurde die Überexpression von *MUM1*/*IRF4* beschrieben [169-172]. Bei der B-CLL gibt es Hinweise für eine ungünstige Prognose bei Patienten mit (6;14) und einer Überexpression von *MUM1*/*IRF4* [169, 173].

Bezüglich der Inzidenz beim MM existieren für t(6;14)(p25;q32), zytogenetisch auf Grund des subtelomeren Bruchpunkts in 6p25 nicht zu erkennen, bisher nur die Daten zweier japanischer Studien. Bei Iida et al. war sie in 2 von 11 MM-Zelllinien nachweisbar [167], Yoshida et al. [174] konnten die Translokation mittels PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) in 3 von 17 MM-Zelllinien und durch Interphase-FISH bei 21% (8/38) der untersuchten Myelompatienten detektieren. Über die prognostische Bedeutung beim MM liegen bisher keine Studien vor.

1.4 Inhalte und Ziele dieser Studie

Aufgrund chromosomaler Veränderungen können bei den verschiedensten hämatologischen Erkrankungen unterschiedliche Entitäten und Subgruppen von Patienten definiert werden, die bei Diagnose zwar ein gleichartiges klinisches Erscheinungsbild aufweisen, aber unterschiedliche therapeutische Vorgehensweisen erforderlich machen. Auch beim Multiplen Myelom zählen diese, neben Parametern wie β2-Mikroglobulin, IL-6, PCLI, Serumalbumin, Serumkreatinin und anderen, zu den bedeutendsten Prognosefaktoren. Es liegen bereits Ergebnisse über die prognostische Bedeutung genetischer Aberrationen bei Patienten mit MM vor, die mit konventionellen Chemotherapieregimen oder Hochdosistherapien behandelt wurden. Welchen Einfluss diese Veränderungen auf die Prognose nach einer allogenen Stammzelltransplantation haben, die sich neben der chemotherapeutischen Wirkung auch auf den „Graft-versus-myeloma-Effekt“ stützt, wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch kaum untersucht.

Ziel dieser Studie ist es, genetische Veränderungen bei Patienten mit MM, die eine dosisreduzierte allogene Stammzelltransplantation durchlaufen, zu charakterisieren und mit klinischen, morphologischen und immunologischen Daten zu korrelieren. Dabei soll die Inzidenz der bereits bekannten Chromosomenaberrationen Deletion 13q, Deletion *P53*, Überrepräsentation von *C-MYC*, t(4;14), t(11;14), t(14;16) und t(6;14) überprüft und deren Einfluss auf Therapieansprechen, Therapie-bedingte Mortalität, Rezidivrate, ereignisfreies Überleben und Gesamtüberleben bei diesem Therapiekonzept untersucht werden. Die gewonnenen Daten sollen dazu beitragen, künftig in Verbindung mit anderen Prognosefaktoren die bestmögliche, risikoadaptierte und patientengerechte Therapie zu definieren. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, kombiniert mit der immunhistochemischen Darstellung der intrazytoplasmatisch gelegenen Leichtketten mittels Fluoreszenz-markierten AK (cIg-FISH), ist zurzeit die beste Methode zur Analyse der genannten Chromosomenaberrationen in den Plasmazellen bei Patienten mit MM. Durch die Anwendung dieser Untersuchungstechnik sind in der vorliegenden Studie der aktuellste labormethodische Standard und eine zweifelsfreie Identifikation der zu untersuchenden Zellen gewährleistet.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Patientencharakteristika

Es wurde das Knochenmark (KM) von 101 Patienten mit Multiplem Myelom (MM) untersucht, die in dem Zeitraum November 1999 bis Dezember 2006 eine allogene KMT (n=4) oder SZT (n=97) mit dosisreduzierter Melphalan/Fludarabin-basierter Konditionierung erhalten haben. Die Patienten wurden in folgenden Kliniken behandelt: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Universitätsklinikum Tübingen, Deutsche Klinik für Diagnostik in Wiesbaden, Universitätsklinikum Dresden, Universitätsklinikum Salamanca (Spanien), Chaim Sheba Medical Center in Tel Hashomer (Israel). Sie befanden sich in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium (Stadium II oder III nach Salmon und Durie) und wurden entweder im Rezidiv/Progress oder primär als „Hochrisiko-Patienten“ aufgrund einer nachgewiesenen Deletion 13q transplantiert. Bis auf wenige Ausnahmen erhielten die Patienten vor der Transplantation eine dosisreduzierte, Melphalan-/Fludarabin-basierte Konditionierung. 34 Patienten bekamen die Stammzellspende von einem Familienspender, 67 Patienten von einem Fremdspender (59 HLA-identisch, 8 HLA-haplo-identisch). Als Induktionstherapie erhielten fast alle Patienten Vincristin, Doxorubicin (Adriamycin®) und hochdosiertes Dexamethason (VAD-Schema) oder Modifikationen dieser Kombinationschemotherapie. In der Regel folgte dann mindestens eine Hochdosistherapie mit autologer SZT. Etwa ein Viertel der Patienten hatte vor der allogenen SZT eine Salvagetherapie mit Dexamethason oder neueren Myelom-Therapeutika wie Thalidomid, Bortezomib oder Lenalidomid erhalten. Die mediane Beobachtungszeit der überlebenden Patienten betrug zum Zeitpunkt der Auswertung 2,8 Jahre. Diese und weitere biologische und klinische Patientencharakteristika sind in Tabelle 2.1 auf der folgenden Seite zusammengefasst.

Tabelle 2.1 Biologische und klinische Patientencharakteristika

Charakteristika	Patienten (n=101)	Charakteristika	Patienten (n=101)
Geschlecht (w/m)		***Stadium (Salmon/Durie)***	
weiblich	42 (42%)	II (A/B)	26 (26/0)
männlich	59 (58%)	III (A/B)	75 (60/15)
Alter (Jahre)	52 (28-68)	***Vortherapien (Zyklen)***	6 (2-26)
Karnofsky Index (n=65)	100 (70-100)	***Anzahl der autoSZT***	
β_2-M (mmol/l) (n=79)	2,4 (1-12)	0	4 (4%)
Kreatinin (mg/dl) (n=86)	0,9 (0,5-7,6)	1	80 (79%)
Kalzium (mmol/l) (n=81)	2,3 (1,7-3,4)	2 oder mehr	17 (17%)
Albumin (g/l) (n=77)	42 (26-49)	***Therapieprotokoll***	
LDH (U/l) (n=84)	166 (78-390)	„auto-allo“[1]	51 (50%)
CRP (mg/l) (n=68)	< 5 (<5-22)	„Rezidiv nach auto“[2]	46 (46%)
Hämoglobin (g/dl) (n=77)	12,1 (6,6-16,8)	anderes	4 (4%)
Leukozyten (n/nl) (n=70)	5,2 (2,6-9,0)	***Remissionsstatus vor alloSZT[3]***	
Thrombozyten (n/nl) (n=68)	211 (63-399)	CR	3 (3%)
PZ-Anteil im KM (%) (n=61)	21 (1-98)	PR	69 (68%)
Osteolysen (n=89)		MR / SD	1 / 2 (1%/2%)
0	25 (28%)	PD	26 (26%)
1-3	29 (33%)	***Spender***	
> 3	35 (39%)	MRD	34 (34%)
Isotypen		MUD	67 (66%)
IgG	57 (56%)	***Spendergeschlecht***	
IgA	24 (24%)	weiblich	31 (32%)
IgD	1 (1%)	männlich	70 (68%)
BJ-Protein	16 (16%)	***ED bis alloSZT (Monate)***	16 (6-299)
Asekretorisch	3 (3%)	***Beobachtungszeit (Monate)***	33 (3-73)

Werte sind als Mediane angegeben (Bandbreite).

[1] „auto-allo“ = Patienten erhielten eine autoSZT gefolgt von der alloSZT innerhalb von 2-3 Monaten.

[2] „Rezidiv nach auto“ = Patienten erhielten die alloSZT auf Grund von Rezidiv/Progress nach autoSZT.

[3] nach EBMT-Kriterien, publiziert von Bladé et al. [175]

2.1.2 Ethische Grundlagen und Datenschutz

Alle Patienten wurden und werden in von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg und entsprechenden Kommissionen in Tübingen, Wiesbaden, Dresden, Salamanca und Tel Hashomer gebilligten Therapiestudien behandelt. Nach ausführlicher Aufklärung mussten alle Patienten ihr schriftliches Einverständnis zur Verarbeitung der Daten geben.

Gewebe für die beschriebenen Untersuchungen wurde ausschließlich im Rahmen der üblichen Diagnostik und nur mit Einverständnis des Patienten entnommen, so dass für den Patienten keinerlei zusätzliche Belastung entstand. Eine entsprechende Genehmigung wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg erteilt.

2.2 Material

2.2.1 FISH-Materialien

Name	Hersteller
AMCA Anti-Human Kappa Chain	Vector (Burlingame, USA)
AMCA Anti-Human Lamda Chain	Vector (Burlingame, USA)
Anti-Avidin = Biotinylated Anti-Avidin D	Vector (Burlingame, USA)
Anti-Digoxigenin-Rhodamin	Roche (Mannheim)
Avidin-FITC = Fluorescein Avidin D	Vector (Burlingame, USA)
Blocking reagent	Roche (Mannheim)
DAPI counterstain	Roche (Mannheim)
Desoxynukleosid-Triphosphat-Set	Roche (Mannheim)
Desoxyuridin-Triphosphate (dUTP): Biotin-16-dUTP, Digoxigenin-11-dUTP	 Roche (Mannheim)
Texas red conjugated donkey anti sheep Ig	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
DNA-Polymerase I, 500 U (9 U/µl)	Promega (Madison, USA)
DNA-Polymerase Buffer 10x	Promega (Madison, USA)
DNase I	Roche (Mannheim)
Human Cot-1 DNA®, 500 µg/1 mg	Invitrogen (Carlsbad, USA)
LSI® C-MYC Spectrum Orange™ DNA Probe	Vysis (Downersgrove, USA)
LSI® D13S25 Spectrum Orange™ DNA Probe	Vysis (Downersgrove, USA)
LSI® P53 Spectrum Orange™ DNA Probe	Vysis (Downersgrove, USA)
LSI® IGH SG/CCND1 SO [t(11;14)] DNA Probe	Vysis (Downersgrove, USA)
LSI® IGH/FGFR3 DC/DF [t(4;14)] DNA Probe	Vysis (Downersgrove, USA)
LSI® IGH/MAF [t(14;16)] DNA Probe	Vysis (Downersgrove, USA)
LSI/WCP® Hybridization Buffer	Vysis (Downersgrove, USA)
Pepsin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RNase	Roche (Mannheim)
Vectashield® Mounting Medium	Vector (Burlingame, USA)

2.2.2 PCR-Materialien

Material	Hersteller
Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs) 10 mM	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Taq-Polymerase	Peqlab (Erlangen)
Reaktionspuffer S und Y 10x	Peqlab (Erlangen)

2.2.3 Zellkultur-Materialien

Name	Hersteller
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bacto™ Casamino Acids (Säure-hydrolysiertes Casein)	Difco (Detroit, USA)
Bacto™ Tryptone (Pankreatischer Verdau von Casein)	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Bacto™ Yeast Extract (Abstrakt von autolysierten Zellen)	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Bacto™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (Hefe-Stickstoff [Basis] ohne Aminosäuren)	Difco (Detroit, USA)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
D(+)-Glucose	Merck (Darmstadt)
Fötales Kälberserum (FKS)	HyClone (Logan, USA)
KaryoMAX® Colcemid®	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Lyticase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Phytohämagglutinin (PHA)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
RPMI 1640 Medium mit Glutamax™	Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.2.4 Primer

Name	Sequenz	Hersteller
Alu 1	5'-GGATTACAGGYRTGAGCCA-3'	MWG Biotech
Alu 2	5'-RCCAYTGCACTCCAGCCTG-3'	

2.2.5 BACs, YACs und Cosmide

BACs	Referenz	Hersteller/Bereitstellung
RP5-1077h22 (6p25)	diese Arbeit	Bacpac Resources (Oakland, USA)
RP5-856g1 (6p25)	diese Arbeit	
RP3-416j7 (6p25)	diese Arbeit	
YACs	**Referenz**	**Hersteller/Bereitstellung**
Y6 (14q32)	Cuneo et al., 2001	Dr. Matsuda (Kyoto, Japan)
Cosmide	**Referenz**	**Hersteller/Bereitstellung**
cos-α1 (14q32)	Cuneo et al., 2001	Prof. Hagemeijer (Leuven, Belgien)

2.2.6 Chemikalien

Name	Hersteller
Adeninhemisulfat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Agarose 1,5%	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Agarose Ultra Pure	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Aqua ad iniectabila/Aqua destillata	Baxter S. A. (Lessines, Belgien)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dextran-Sulfat 50%	Amersham (Uppsala, Schweden)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) 1x	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Eisessig 100%	Riedel-de Haën (Seelze)
Essigsäure	J. T. Baker (Deventer, Holland)
Ethanol	J. T. Baker (Deventer, Holland)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ficoll	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Formaldehyd 37% Lsg. in Wasser	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Formamid	Merck (Darmstadt)
Formamid redestilliert	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Glycerol/Glycerin Approx. 99%	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid Pulver	Merck (Darmstadt)
Kaliumphosphat ($KH_2PO_4xH_2O$)	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid-hexahydrat ($MgCl_2x6H_2O$)	Serva (Heidelberg)
β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	J. T. Baker (Deventer, Holland)
Natriumchlorid	J. T. Baker (Deventer, Holland)
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumhydroxid/Natronlauge	Merck (Darmstadt)
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Salzsäure 0,1 M	Merck (Darmstadt)
Salzsäure 37%	Merck (Darmstadt)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad (Hercules, USA)
Sorbitol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Trizma®base, minimum 99,9% titration	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.2.7 Kits

Name	Hersteller
NucleoBond® PC 500 Plasmid DNA Purification Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Qiaquick® PCR Purification Kit (250)	Qiagen (Hilden)

2.2.8 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklaven	Typ T 12	Heraeus Sepatech (Osterode)
	Bioclav	Schütt (Göttingen)
Brutschrank	BBD 6220	Heraeus Sepatech (Osterode)
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 2	Zeiss (Jena)
Gelelektrophoresekammer	Horizon® 11.14	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Heizblock	Medax	Nagel (Kiel)
pH-Meter	CG811	Schott (Mainz)
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf-Nethler-Hintz (Hamburg)
Rührtisch	Ikamag® RH	Jahnke & Kunkel (Staufen)
Schüttler	Swip KM-2	Edmund Bühler (Hechingen)
Schüttelinkubator	G25	New Brunswick (Edison, USA)
Sicherheitswerkbank Klasse 2	Hera safe	Heraeus Sepatech (Osterode)
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Vortex	Typ Reax 1 D R	Heidolph (Kehlheim)
Wage	PB 300	Mettler (Giessen, Schweiz)
Wasserbäder	W 200	Memmert (Schwaben)
	MS/2	Lauda (Lauda-Königshofen)
Zählgerät	Counter® Assistent	Karl Knecht (Sondheim)
Zentrifugen	Biofuge 13	Heraeus Sepatech (Osterode)
	Multifuge 3 S	Heraeus Sepatech (Osterode)
	Centrifuge 5414	Eppendorf (Hamburg)
	J2-HS	Beckmann (Palo Alto, USA)
Cytozentrifuge	Cytospin 2	Shandon Southern (Sewickley, USA)
Kühlzentrifugen	Biofuge 13R	Heraeus Sepatech (Osterode)
	Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech (Osterode)
Vakuumzentrifuge	Hetovac VR-1	Heto (A/S Birkerod, Dänemark)

2.2.9 Sonstige Labormaterialien

Material	Modell	Hersteller
Deckgläser	Ø 13 mm	Karl Hecht (Sondheim)
	24 x 60 mm	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Kulturflaschen	40 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Küvetten aus Glas		Conrad (Hamburg)
Küvetten für Photometer	Uvette®	Eppendorf (Hamburg)
Montagekleber	Fixogum	Marabuwerke (Tamm)
Objektträger	ca. 76 x 26 mm	Carl Roth (Karlsruhe)
Parafilm® "M"		Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
Petrischalen		Nunc (Roskilde, Dänemark)
Pipetten	1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten für Pipettierhilfe	Falcon® 5ml, 10ml	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Pipettenspitzen	Eppendorf t.i.p.s.	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe (akkubetrieben)	Pipetus®	Hirschmann (Eberstadt)
Plastikröhrchen	Falcon® 15 ml	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
	50 ml, 250 ml	Beckmann (Palo Alto, USA)
Reinigungssäulen	MicroSpin™ G-50	Amersham Biosciences (Piscataway, USA)
Tubes	Eppendorf-Tubes 0,05 ml, 0,1 ml, 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg)
	Cryotubes™ Vials 1 ml	Nunc (Roskilde, Dänemark)

2.3 Methoden

Sämtliches von mir selbst ausgewertetes KM (Patienten aus Hamburg, Dresden, Wiesbaden und Tübingen) sowie das KM der spanischen Patienten wurden mittels der unten beschriebenen cIg-FISH analysiert (n=80). Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu verbessern, wurden bei der statistischen Gesamtauswertung auch israelische Patienten und einige Patienten aus Hamburg berücksichtigt, deren KM mittels Interphase-FISH ohne zytoplasmatischen Ig-Färbung analysiert wurden (n=21).

Soweit beschriebene Materialien nicht in der angewendeten Form vom Hersteller bestellt wurden, sind die jeweiligen Bestandteile mit angegeben. Selbst angefertigte Lösungen oder Medien wurden im Anschluss autoklaviert. Arbeitsschritte wie Waschen, Verdauen, Dehydrieren etc. wurden, wenn nicht anders angegeben, in den entsprechenden in Glasküvetten vorbereiteten Lösungen auf dem Schüttler (150 min^{-1}) vorgenommen. Arbeitsschritte, bei denen fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden oder Antikörper (AK) zur Anwendung kamen, wurden auf Grund der Lichtempfindlichkeit dieser Materialien mit einer Abdeckung durchgeführt. Das kurze Anzentrifugieren von Gemischen in Eppendorf-Röhrchen erfolgte stets mit der Tischzentrifuge Biofuge 13. Zur Hybridisierung oder Inkubation über Nacht wurden Objektträger (OT) mit Metaphasen oder Cytospins (CS) in eine feuchte Kammer (mit feuchten Tüchern ausgelegter verschließbarer Kasten) gelegt.

2.3.1 Verarbeitung des Knochenmarkaspirats zu Cytospins

2.3.1.1 Ficoll-Separation/Cytospin-Herstellung

Material	Aufbereitung/Herstellung
D-PBS	-
Ficoll	-
Ethanol-Reihe	70%/80%/100% Ethanol
DMSO	-
FKS	-
RPMI 1640 Medium +Glutamax™	-
Knochenmarkaspirat	-

Prinzip: An dem heparinisiertem Knochenmarkaspirat der Patienten wurde mittels der Ficollseparation eine Trennung der kernhaltigen Zellen von den Erythrozyten durchgeführt. Die Ficollreste wurden ausgewaschen und die intakten Zellen mit einer Cytozentrifuge auf den OT zentrifugiert. So erhielt man einen „Spot“ mit intakten Knochenmarkzellen.

Procedere: Das Knochenmarkaspirat wurde 1:1 mit D-PBS verdünnt. Dann wurden 3 ml Ficoll in ein 15ml-Falcon®-Röhrchen gegeben und das verdünnte Aspirat langsam mit einer Pasteurpipette auf das Ficoll pipettiert, so dass 2 Phasen entstanden (wenn mehr als 4 ml Aspirat vorhanden war, wurden 2 Röhrchen verwendet). Das Röhrchen wurde 30 min zentrifugiert (Multifuge 3 S, 1390 rpm) und der so entstandene Leukozytenring zwischen der roten und der transparenten Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt. Hierin wurde er mit D-PBS gewaschen und das Röhrchen 5 min zentrifugiert (Multifuge 3 S, 1000 rpm). Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit D-PBS (100-200 µl) aufgeschwemmt (falls ausreichend Zellen im Aspirat vorhanden waren, wurde nun die Hälfte bei –80°C eingefroren, siehe 2.3.1.2). Nun w urden mittels Zentrifuge probeweise 2 CS angefertigt (Cytospin 2, 5 min, 400 rpm) und die Zelldichte kontrolliert. Dann wurde mit 4 ml D-PBS aufgefüllt und 8 weitere CS angefertigt (pro CS wurden 200 µl der Zellsuspension verwendet). Anschließend wurden die CS bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe dehydriert. Dann wurden sie bei –20°C eingefroren.

Vor der Verwendung wurden die CS 30 min bei 4°C im Kühlschrank und 30 min bei RT aufgetaut.

2.3.1.2 Einfrieren von überschüssigen Zellen aus dem Knochenmarkaspirat

Material	Aufbereitung/Herstellung
DMSO	-
FKS	-
RPMI	-

Prinzip: Damit für eventuelle weitere molekularzytogenetische Analysen noch intakte Knochenmarkzellen des Patienten zur Verfügung standen, wurde ein Teil Zellen mit einem Gefrierschutz versetzt und eingefroren.

Procedere: Wie in 2.3.1.1 beschrieben wurde nach dem Aufschwemmen mit D-PBS die Hälfte des Materials eingefroren. Dazu wurde das Röhrchen erneut 5 min zentrifugiert (Multifuge 3 S, 1000 rpm) und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 500 µl RPMI resuspendiert und anschließend in ein Cryotube™ überführt. 500 µl FKS und 100 µl DMSO wurden hinzupipettiert, das Tube mehrere Male gewendet und dann bei –80℃ eingefroren.

2.3.2 Herstellung von Objektträgern mit Metaphasen aus PHA-Kulturen

2.3.2.1 Ansatz und Aufarbeitung von PHA-Kulturen

Material	Aufbereitung/Herstellung
Medium	125 ml RPMI 1640 Medium mit Glutamax™ 7 ml FKS 500 µl Penicillin/Streptomycin
Heparin-Blut	-
PHA	-
Karyomax® Colcemid®	-
KCl-Lösung 0,075 M	1,5 g KCl-Pulver, 1 l dH_2O → im Brutschrank bei 37℃ lagern
Fixativ	Methanol + Eisessig (100%), Verhältnis 3:1

Prinzip: Mittels PHA wurden die Leukozyten in von gesunden Probanden entnommenem, heparinisiertem Blut zur Teilung stimuliert. Danach wurden die Zellen mit dem Spindelgift Colcemid in der Metaphase der Mitose arretiert und anschließend fixiert. Die Metaphase-Chromosomen wurden später zur Probe-Hybridisierung mit den selbst hergestellten DNA-Sonden 1077h22, 856g1, 416j7, cos-α1 und y6 benötigt (siehe 2.3.4).

Procedere: Jeweils 10 ml Medium, 0,6-0,8 ml Heparin-Blut und 0,3-0,4 ml PHA wurde in Kulturflaschen pipettiert und 72 h im Brutschrank bei 37℃ inkubiert. Nach Überführung in 15ml-Falcon®-Röhrchen wurde 0,05 ml Karyomax® Colcemid® zugegeben und 30 min im Brutschrank bei 37℃ inkubiert. Danach wurden die Röhrchen 5 min zentrifugiert (Multifuge 3 S, 1000 rpm) und der Überstand mit der H_2O-Strahlpumpe abgesaugt. 6 ml KCl-Lösung (auf 37℃ vorgewärmt) wurden hinzuzugegeben und anschließend 20 min im Wasserbad bei 37℃ inkubiert. Nach 5 min Zentrifugieren (Multifuge 3 S, 1000 rpm) wurde der Überstand mit der H_2O-Strahlpumpe abgesaugt. Mit der Pasteur-Pipette wurde 0,5-1 ml frisches Fixativ und dann zusätzlich die Zellsuspension aufgezogen, so dass ein Fixativ-Zellsuspensionsgemisch entstand. Dieses wurde ausgespült, 1 mal gemischt und nach Zugabe von 6 ml Fixativ erneut gemischt. Anschließend wurde 5 min zentrifugiert (Multifuge 3 S, 1000 rpm) zentrifugiert, der Überstand mit der H_2O-Strahlpumpe abgesaugt, 6 ml frisches Fixativ hinzugegeben und wieder zentrifugiert und abgesaugt. Dieser Arbeitsschritt wurde mindestens 2 mal wiederholt, bis der Überstand klar und das Sediment sauber (weiß) war. Die gewonnenen Zellkerne wurden in Fixativ bei -20℃ geschlossen gelagert.

Um die in 2.3.2.2 benötigte Zellkernsuspension herzustellen, wurde das Material 5 min zentrifugiert (Multifuge 3 S, 1000 rpm) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und ca. 1 ml frisches Fixativ hinzugegeben.

2.3.2.2 Vorbehandlung der OT und Ausstrichtechnik

Material	Aufbereitung/Herstellung
dH_2O	-
Methanol	-
Zellkernsuspension	siehe 2.3.2.1

Prinzip: Um die spätere FISH-Analyse von Metaphasen zu ermöglichen, wurde die Zellkernsuspension auf OT aufgetropft und verteilt. Durch das Aufplatzen der Kernmembran konnten die einzelnen Metaphase-Chromosomen besser charakterisiert werden.

Procedere: Trockene OT wurden zum Entfetten in Methanol gespült und für den Gebrauch in dH_2O gewässert. Dann wurden sie trocken gewischt, 3 Tropfen Zellkernsuspension aufgetropft und durch Pusten oder Schwenken gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die OT an der Luft getrocknet.

2.3.3 Herstellung der DNA-Sonden 1077h22 (6p25), 865g1 (6p25), 416j7 (6p25), cos-α1 (14q32) und y6 (14q32)

2.3.3.1 Gewinnung von „bacterial artificial chromosomes" (BACs) und „yeast artificial chromosomes" (YACs) aus *E.-coli*- und *S.-cerevisiae*-Dauerkulturen

Prinzip: Zuerst wurden Bakterien- und Hefenkulturen angezüchtet, daraus Einzelkolonien entnommen und diese wiederum angezüchtet. So erhielt man BAC- und YAC-transformierte Bakterien- und Hefenkulturen, die jeweils von einem einzelnen Klon abstammten. Mittels Säulen-Affinitätschromatographie wurde die DNA extrahiert und gereinigt und anschließend photometrisch gemessen. Die YAC-DNA wurde danach mittels der Alu-PCR amplifiziert und das Ergebnis anhand einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Danach wurde erneut eine Reinigung der amplifizierten DNA durch Säulen-Affinitätschromatografie durchgeführt.

2.3.3.1.1 Anzucht von BAC-transformierten Dauerkulturen auf Agarplatten

Material	Aufbereitung/Herstellung
1 l LB-Medium	1 l dH_2O 10 g/l Bacto™ Tryptone 5 g/l Bacto™ Yeast Extract 1800 g/l NaCl
NaOH	-
Agarose 1,5%	-
Chloramphenicol 20 mg/ml	-
E.-coli-Dauerkulturen (Glycerolstocks)	-

Procedere: Der pH-Wert des LB-Mediums wurde mit NaOH auf 7-7,6 eingestellt, danach wurde es autoklaviert und anschließend 15 g 1,5% Agarose hinzugegeben. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle aufgekocht, auf 60℃ abgekühlt und 100 µl

Chloramphenicol wurden ergänzt. Dann wurde das Gemisch in Petrischalen gegossen und abgekühlt, bis es fest war. Die Glycerolstocks mit den Bakterien wurden ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Petrischalen im Kühlschrank bei 4℃ verwahrt.

2.3.3.1.2 Anzucht von BAC-transformierten Einzelkolonien in Flüssigmedium

Material	**Hersteller**
1 l TYB-Medium	1 l dH_2O 16 g/l Bacto™ Tryptone 16 g/l Bacto™ Yeast Extract 5 g/l NaCl 3,2 g/l $KH_2PO_4xH_2O$
1 l LB-Medium	siehe 2.3.3.1.1
Chloramphenicol 20 mg/ml	-
Glycerol	-

Procedere: Es folgte das Animpfen von Übernachtkulturen. Dafür wurde der pH-Wert des TYB-Mediums mit NaOH auf 7,2-7,6 eingestellt, dann wurde es autoklaviert. Zum Ansetzten einer Vorkultur wurde eine Chloramphenicol-resistente Bakterienkolonie der Petrischale (siehe 2.3.3.1.1) entnommen, in ein 50ml-Falcon®-Röhrchen mit 5 ml TYB-Medium und 5 µl Chloramphenicol überimpft und für 8 h bei 37℃ schüttelnd (260 rpm) inkubiert. Je 2,5 ml Vorkultur wurde anschließend mit 250 ml LB-Medium und 250 µl Chloramphenicol in einen 1l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen gegeben und über Nacht bei 37℃ schüttelnd (260 rpm) inkubiert (Zur Herstellung von neuen Dauerkulturen (Glycerolstocks) konnten 400 µl der Übernachtkulturen mit 600 µl Glycerol als Gefrierschutz versetzt und bei –20℃ eingefroren werden).

Nach abgeschlossener Inkubation wurde die Bakteriensuspension in 250ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt, auf Eis gestellt und danach 15 min zentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge, 8000 rpm, 4℃), der Überstand wurde abgegossen.

2.3.3.1.3 Anzucht von YAC-transformierten Dauerkulturen

Material	Aufbereitung/Herstellung
1 l AHC$^-$-Medium:	1,7 g Yeast Nitrogen Base 5 g Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$ 10 g Casamino Acids 20 g D(+) Glucose
Sorbitol 2 M	364,4 g, 1 l dH_2O oder 72,9 g, 200 ml dH_2O
EDTA 0,5 M	8,04 g EDTA, 40 ml dH_2O $\rightarrow$ auf pH 7,5 einstellen, dH2O ad 50 ml
Natriumcitrat 1 M	29,4 g, 100 ml dH_2O oder 58,8 g, 200 ml dH_2O
Tris HCl 1 M	121,1 g Trizma®base, 800ml dH_2O $\rightarrow$ auf pH 7,5 einstellen, dH_2O ad 1 l
NaCl 5 M	299,2 g + 1000 ml dH_2O
SDS 20%	20 g + 100 ml dH_2O
dH_2O	-
Adeninhemisulfat 20 mg/ml	20 mg, 1 ml dH2O
Ampicillin 100 mg/ml	100 mg, 1 ml dH2O
Lyticase	-
Beta-Mercaptoethanol	-
Nonidet P-40	-
S.-cerevisiae-Dauerkulturen (Glycerolstocks)	-

Procedere: Zu 20 ml AHC$^-$-Medium wurden im Erlenmeyerkolben 40 µl Adeninhemisulfat, 20 µl Ampicillin und ein wenig des Glycerolstocks hinzugegeben und für 3-4 Tage bei 30℃ schüttelnd (225 rpm) inkubier t.

Nach Abschluss der Inkubation wurde der Ansatz in 50ml-Falcon®-Röhrchen umgefüllt und 10 min zentrifugiert (Megafuge 1.0R, 2000 rpm, 4℃). Es folgte der Ansatz der „Spheroplastic Solution“ mit 35 ml 2 M Sorbitol, 7,5 ml 0,5 M EDTA, 7 ml 1 M Natrium-Citrat und 19,4 ml dH_2O. Kurz vor Gebrauch dieser Lösung wurden 700 µl Lyticase und 410 µl Beta-Mercaptoethanol dazugegeben.

Nun wurde der Überstand abgegossen, das Pellet in 3,5 ml Spheroplastic Solution resuspendiert, in 15ml-Falcon®-Röhrchen überführt und gevortext. Es folgte eine zweistündige Inkubation im Wasserbad bei 37℃ mit g elegentlichem Schütteln. Anschließend wurde die „Lysis Solution“ mit 2,8 ml 0,5 M Tris-HCl pH 7,4, 2,8 ml 5 M NaCl, 1,4 ml 20% SDS, 280 µl Nonidet P-40 und 19,31 ml dH_2O angesetzt. Kurz vor Gebrauch wurden 5,7 µl Beta-Mercaptoethanol dazugegeben.

Die Suspension wurde 10 min zentrifugiert (Megafuge 1.0R, 2000 rpm, 4℃), der Überstand abgegossen und das Pellet in 1,4 ml Lysis Solution resuspendiert. Danach folgte die Inkubation im Wasserbad bei 68℃ für 20- 30 min.

2.3.3.1.4 Präparation von BAC-/YAC-DNA durch Säulenaffinitätschromatographie

Material	Aufbereitung/Herstellung
70% Ethanol	-
Isopropanol	-
TE-Puffer (1/10)	10 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 (siehe 2.3.3.1.3), 2 ml 0,5 M EDTA (siehe 2.3.3.1.3), 988 ml dH_2O
NucleoBond® Plasmid DNA Purification Kit (PC 500)	
S1-Puffer	50 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A, pH 8,0
S2-Puffer	200 mN NaOH, 1% SDS
S3-Puffer	2,8 M Kac, pH 5,1
N2-Puffer	100 mM Tris, 15% Ethanol, 900 mM KCl, 0,15% Trition X-100 → mit H_3PO_4 auf pH 6,3 einstellen
N3-Puffer	100 mM Tris, 15% Ethanol, 1,15 M KCl → mit H_3PO_4 auf pH 6,3 einstellen
N5-Puffer	100 mM Tris, 15% Ethanol, 1 M KCl → mit H_3PO_4 auf pH 8,5 einstellen
NucleoBond® Faltenfilter	-
NucleoBond® AX 500 Säulen	-
Plastik-Waschanlage	-
RNase A	-

Procedere: Zur Präparation der BAC-/YAC-DNA wurde das „Plasmid-DNA-Purification-Kit“ NucleoBond® PC 500 verwendet. Die Durchführung orientierte sich an den Herstellerangaben. Nach dem Auffangen und Reinigen der DNA wurde die DNA-Konzentration photometrisch gemessen (siehe 2.3.3.1.5).

2.3.3.1.5 Photometrische DNA-Konzentrationsmessung

Procedere: Zur Bestimmung der Konzentration einer DNA-Probe wurde diese 1:50 mit dH_2O verdünnt und gegen einen Leerwert als Differenzabsorption gemessen. Dazu wurde das Gerät mit einer dH_2O-Probe geeicht und anschließend die Absorption der

DNA-Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) gemessen. Zur Kontrolle der Reinheit der DNA-Probe wurde zusätzlich eine Messung bei der charakteristischerweise von Proteinen absorbierten Wellenlänge von 280 nm (A_{280}) durchgeführt und der Quotient A_{260}/A_{280} bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass man bei Werten zwischen 1,8 und 2 von einer ausreichenden Reinheit der DNA-Probe ausgehen konnte. Werte kleiner 1,8 sprachen für eine Verunreinigung durch Proteine, Werte größer 2 für eine Verunreinigung durch RNA.

2.3.3.1.6 YAC-DNA-Amplifikation durch die Alu-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Material	**Aufbereitung/Herstellung**
dH_2O	-
dNTPs 10 mM	-
Taq-Polymerase	-
Reaktionspuffer S 10x	-
Reaktionspuffer Y 10x	-
YAC-DNA	siehe 2.3.3.1.4
Primer:	
Alu 1 (Sequenz: 5'-GGATTACAGGYRTGAGCCA-3')	
Alu 2 (Sequenz: 5'-RCCAYTGCACTCCAGCCTG-3')	
Qiaquick® PCR Purification Kit (250)	
PBI-Puffer	Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, Guanidin-Hydrochlorid, Isopropanol → auf pH 7,4 eingestellt
PE-Puffer (Konzentrat)	20 mM Piperazin (pH 6,0), 5 mM EDTA → vor Gebrauch Ethanol dazugeben
EB-Puffer	10 mM TrisCl, pH 8,5
Qiaquick Spin Columns	-
Collection Tubes (2 ml)	-

Procedere: Es wurde ein Ansatz mit folgenden Bestandteilen in einem Eppendorf-Röhrchen vorbereitet: 1 µl 10x Reaktionspuffer Y, 2 µl 10x Reaktionspuffer S, x µl YAC-DNA (≥0,5 µl), 2 µl 10 mM dNTPs, 10 µl Alu 1 (2,5 pmol/µl), 10 µl Alu 2 (2,5 pmol/µl), und 0,5 µl Taq-Polymerase. Die Menge der YAC-DNA folgte hierbei aus dem photometrisch gemessenen Wert (siehe 2.3.3.1.5). Mit dH_2O wurde der Ansatz auf 100 µl aufgefüllt (Die verwendeten Puffer wurden bei 37℃ aufgetaut, die Primer Alu 1 und Alu 2 sowie die dNTPs wurden auf Eis gelagert). Nach kurzem Rütteln und

Anzentrifugieren folgte die Amplifikation der YAC-DNA mittels Alu-PCR im Thermocycler:

Der PCR-Ansatz wurde 5 min bei 95℃ denaturiert. Es folgte die Hybridisierung der Oligonukleotide (Primer) für 3 min bei 59℃ und anschließend die Polymerisation für 3 min bei 72℃. Folgender Reaktionszyklus wurde darauf hin 30 mal wiederholt: 1 min 95℃, 1 min 59℃, 2 min 72℃. Bei jeder Alu-PCR wurde gleichzeitig eine Negativ-Kontrolle durchgeführt, um Kontaminationen ausschließen zu können.

Nach Beendigung der Amplifikation wurden die Proben anhand einer Agarose-Gelelektrophorese auf ihre korrekte Größe hin überprüft (siehe 2.3.3.1.7). Danach folgte die Aufreinigung der Alu-PCR-Produkte mit dem Qiaquick® PCR Purification Kit. Die Durchführung orientierte sich an den Herstellerangaben.

2.3.3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Material	Aufbereitung/Herstellung
Agarose Ultra Pure	-
1x TAE-Puffer	20 ml 50x TAE, 980 ml dH_2O (50xTAE: 121 g Trizma®base, 28,55 ml 100% Eisessig, 50 ml 0,5 M EDTA [siehe 2.3.3.1.3], dH_2O ad 500 ml)
Ethidiumbromid	-
DNA Ladder 100bp	-
Ladepuffer	40% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau
PCR-Produkte	siehe 2.3.3.1.6

Procedere: Für das Agarosegel zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein Ansatz mit 1 g Agarose und 100 ml 1x TAE-Puffer vorbereitet. Nach kurzem Aufkochen in der Mikrowelle wurde der auf 60℃ abgekühlten Agaroselösung 2 µl Ethidiumbromid zugegeben, welches in die DNA interkalierte und diese so unter UV-Licht sichtbar machete. Dann wurde die Lösung in den zuvor mit einem Kamm versehenen, abgeklebten Gelschlitten gegossen. Nachdem sie polymerisiert war, wurde der für die Ausformung der Taschen verwendete Kamm herausgezogen und der Gelschlitten in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Dabei sollten die Geltaschen mit Laufpuffer überschichtet sein und am positiven Pol zu liegen kommen. Eine H_2O-Kontrolle und die Proben (15-25 µl PCR-Produkte + 3-4 µl Ladepuffer)

wurden in die Taschen pipettiert und 7 µl 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) als Marker zum Anzeigen der Größe der einzelnen Banden hinzugegeben. Die elektrische Spannung wurde angelegt und die Elektrophorese bei 110 Volt so lange durchgeführt, bis das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau ⅔ der Laufstrecke zurückgelegt hatte. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

2.3.3.2 Markierung (Labeling) der DNA

Material	Aufbereitung/Herstellung
dH_2O	-
dNTPs	Desoxynukleosid-Triphosphat-Set → jeweils 20 µl von 100 mM dATP, dCTP, dGTP und 4 µl von 100 mM dTTP zu 959 µl dH_2O geben, in 100µl-Portionen aufteilen, bei –20℃ lagern
dUTPs (Biotin/Digoxigenin)	-
DNase I (1:1000)	1 µl DNase, 1 ml dH_2O
DNA-Polymerase I	-
DNA-Polymerase-Puffer 10x	-
BAC/YAC-DNA	siehe 2.3.3.1.4 und 2.3.3.1.6
MicroSpin™ G-50 Reinigungssäulen	-

Prinzip: Das Prinzip des DNA-Labelings ist die „Nick-Translation“. Durch das Enzym DNase I werden Einzelstrangbrüche (im angelsächsischen Raum „nicks“) in der Doppelstrang-DNA erzeugt. Von den „nicks“ ausgehend wurden mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase I die Original-Nukleotide durch mit Bitotin oder Digoxigenin markierte Nukleotide ersetzt.

Procedere: In Eppendorf-Röhrchen wurden Ansätze mit folgenden Bestandteilen vorbereitet: dH_2O, 10x DNA-Polymerase-Puffer, dNTPs (grün), Biotin-/Digoxigenin-dUTPs, BAC/YAC-DNA, DNase I (1:1000) und DNA-Polymerase I. Die Menge der BAC-DNA folgte aus den photometrisch gemessenen Werten (siehe 2.3.3.1.5), die Menge der YAC-DNA betrug stets 0,15 µl. Mit dH_2O wurde der Ansatz auf 50 µl aufgefüllt.

Die Reaktionslösungen wurden gerüttelt, kurz anzentrifugiert und danach 1 h im Wasserbad bei 16℃ inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Lösungen danach 7 min ins Wasserbad bei 75℃ und 1 min auf Eis gelegt, wodurch die Enzyme inaktiviert wurden. Es folgte die Reinigung der gelabelten DNA mittels MicroSpin™-G-50-Reinigunssäulen. Die Durchführung orientierte sich an den Herstellerangaben.

Vor der Analyse der Cytospins mit den DNA-Sonden wurden ihre Funktionalität und der korrekte Hybridisierungort an PHA-Kulturen getestet (siehe 2.3.4).

2.3.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an PHA-Kulturen

2.3.4.1 Vorbehandlung der Ziel-DNA

Material	Aufbereitung/Herstellung
dH_2O	-
D-PBS	-
2x SSC	100 ml 20x SSC, 900 ml dH_2O (20xSSC: 88,2 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 175,3 g NaCl, 800 ml dH_2O → pH 7,0 einstellen, dH_2O ad 1 l)
Pepsin	250 mg, 2,5 ml dH_2O (= 100 mg/ml) → in 100µl-Portionen aufteilen, bei –20℃ lagern
RNase	25 mg, 2,5 ml 2x SSC (= 10 mg/ml) → 10 min bei 100°C kochen, sofort auf Eis legen, in 10µl-Portionen aufteilen, bei –20℃ lagern
HCl 0,1 M	-
$MgCl_2$ 1 M	20,33 g $MgCl_2x6H_2O$, 100ml dH_2O
37% Formaldehyd	-
70% Formamid	70 ml Formamid, 10 ml 20x SSC, 20 ml dH_2O → mit 6 M HCl (100 ml 37% HCl, 100 ml dH_2O) auf pH 7,0 einstellen
Ethanol-Reihe	siehe 2.3.1.1
OT mit Metaphasen aus PHA-Kulturen	siehe 2.3.2

Prinzip: Zur Vorbereitung für die späteren Hybridisierung wurden störende Proteine mittels Pepsin-Verdau beseitigt und die doppelsträngige Ziel-DNA in Einzelstrang-DNA überführt.

Procedere: Die OT wurden in 2x SSC hydriert. Ein RNase-Gemisch wurde angefertigt (1000 µl 2x SSC + 10µl RNase) und davon 100 µl auf jeden OT pipettiert, danach wurden diese in einer feuchten Kammer 60 min im Brutschrank bei 37℃ inkubiert.

Anschließend wurden 90 ml dH_2O und 10 ml 1 M HCl im Wasserbad bei 37℃ sowie 70% Formamid im Wasserbad bei 70℃ vorgewärmt. Die OT wurden 5 min in 2x SSC, dann 5 min in D-PBS gewaschen. 150-300 µl Pepsin wurden ins HCl-Gemisch pipettiert, die OT zum Verdauen 10 min hineingestellt, danach wurde sie 5 min in D-PBS gewaschen. In 68 ml PBS, 3,7 ml 1 M $MgCl_2$ und 2 ml 37% Formaldehyd wurden die Metaphasen 10 min fixiert (nicht auf dem Schüttler!), danach wurden sie 5 min in D-PBS und 5 min in 2x SSC gewaschen. Um die doppelsträngige Ziel-DNA in eine Einzelstrang-DNA zu überführen, folgte 4 min Denaturierung in 70% Formamid (im Wasserbad), danach 3 min in eiskaltem 2x SSC, um eine Renaturierung zu verhindern. Mittels einer aufsteigenden Ethanol-Reihe wurden die Metaphasen dehydriert und anschließend an der Luft bei RT getrocknet.

2.3.4.2 Hybridisierung

Material	Aufbereitung/Herstellung
Human Cot-1 DNA®	-
DNA-Sonden:	
1077h22, 856g1, 416j7 (6p25)	siehe 2.3.3
cos-α1, y6 (14q32)	siehe 2.3.3
Hybridisierungspuffer (10/10)	5 ml Formamid redestilliert, 1 ml 20x SSC, 1 g Dextran-Sulfat-Puder → 1-2 h bei 70℃ lösen, mit 1M HCl (9,1 ml 37% HCl, 100 ml dH_2O) auf pH 7,0 einstellen, 4 ml dH_2O dazugeben, in 1ml-Portionen aufteilen, bei –20℃ lagern

Prinzip: Da beide Hybridisierungspartner als Einzelstrang vorliegen müssen, wurde die doppelsträngige Sonden-DNA in Einzelstrang-DNA überführt. Vor dem Auftragen auf die OT wurde die Sonden-DNA zusätzlich mit sogenannter Konkurrenz-DNA vorhybridisiert. Ziel dieser Vorhybridisierung war es, mittels der Konkurrenz-DNA die unspezifischen repetetiven Sequenzen der DNA-Sonden abzusättigen, da diese sonst unspezifisch mit der Ziel-DNA hybridisiert hätten. Im Unterschied zu der weiter unten beschriebenen cIg-FISH wurde die FISH hier an Metaphase-Chromosomen

durchgeführt. Sie diente der Findung einer optimalen Konzentration von Sonden- und Konkurrenz-DNA für die spätere cIg-FISH (siehe 2.3.5).

Procedere: Zur Vorbereitung der DNA-Sonden-Gemische wurden jeweils eine bestimmte Menge Sonden-DNA und Konkurrenz-DNA (Human Cot-1 DNA®) in ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert, das dann kurz gerüttelt und anzentrifugiert wurde. Da die Funktionalität der Sonden je nach Erfolg des DNA-Labelns variieren kann, wurden dabei pro Sonde 3 verschiedene Testkonzentrationen gewählt (beispielhaft in Tab. 2.2 dargestellt). Beim späteren Auftragen auf die OT wurden dann entsprechend jeweils 3 Bereiche markiert und die Konzentration, bei der die Signale am besten auszuwerten waren, wurde für die cIg-FISH an CS (siehe 2.3.5) verwendet.

Tabelle 2.2 Testkonzentrationen von Sonden- und Konkurrenz-DNA

DNA-Sonde	Testkonzentrationen					
	Sonde	Cot-1	Sonde	Cot-1	Sonde	Cot-1
1077h22	5 µl	7 µl	5 µl	5 µl	3 µl	5 µl
856g1	5 µl	7 µl	5 µl	5 µl	3 µl	5 µl
416j7	5 µl	7 µl	5 µl	5 µl	3 µl	5 µl
cos-α1	3 µl	4 µl	3 µl	3 µl	2 µl	3 µl
y6	3 µl	4 µl	3 µl	3 µl	2 µl	3 µl

Anschließend wurden die Röhrchen 15-20 min in der Vakuumzentrifuge pelletiert und dann jeweils mit 5 µl Hybridisierungspuffer versehen. Nach kurzem Rütteln und Anzentrifugieren wurden die Gemische 30 min im Wasserbad bei 37℃ gelöst und danach 5 min im Wasserbad bei 75℃ denaturiert. Nachdem die Röhrchen 1 min auf Eis abgekühlt wurden, folgte eine 60-minütige Vorhybridisierung im Wasserbad bei 37℃. Auf jeden OT wurden pro markiertem Konzentrationsbereich 5 µl des entsprechenden Gemisches pipettiert, mit runden Deckgläschen (∅ 13 mm) bedeckt und mit Fixo-Gum luftdicht verschlossen. Um die noch verbliebene doppelsträngige DNA in Einzelstrang-DNA zu überführen, wurden die CS 7 min auf dem Heizblock bei 83℃ denaturiert. Anschließend folgte die Hybridisierung über Nacht im Brutschrank bei 37℃.

2.3.4.3 Detektion und Amplifikation

Material	Aufbereitung/Herstellung
D-PBS	-
2x SSC	siehe 2.3.4.1
0,1x SSC	50 ml 2x SSC, 950 ml dH_2O
4x SSC+Tween	200 ml 20x SSC, 500 µl Tween 20, 800 ml dH_2O
1x TNT	100 ml 10x TNT, 900 ml dH_2O (10x TNT: 121,4 g Trizma®base, 87,4 g NaCl, 800 ml dH_2O → mit 6 M HCl [siehe 2.3.4.1] auf pH 7,5 einstellen, dH_2O ad 1 l)
50% Formamid	500 ml 99% Formamid, 100 ml 20x SSC, 400 ml dH_2O → mit 6 M HCl (siehe 2.3.4.1) auf pH 7,0 einstellen
Ethanol-Reihe	siehe 2.3.1.1
Bio blocking reagent	0,5 g Blocking reagent, 100 ml 4x SSC (4x SSC: 200 ml 20x SSC, 800 ml dH_2O) → 1-2h bei 70°C lösen, gelegentlich schütteln, in 1 0ml-Portionen aufteilen, bei –20℃ lagern
Dig blocking reagent	0,5 g Blocking reagent, 100 ml 1x TNT → 1-2h bei 70°C lösen, gelegentlich schütteln, in 1 0ml-Portionen aufteilen, bei –20℃ lagern
Avidin-FITC	pur verwenden → in 10µl-Portionen aufteilen, bei –20℃ im Dunkeln lagern
Anti-Avidin (biotinyliert)	0,5 mg, 1 ml dH_2O (= 0,5 mg/ml) → in 10µl-Portionen aufteilen, bei –20℃ im Dunkeln lagern
Anti-Digoxigenin-Rhodamin	0,2 mg, 1 ml dH_2O (= 0,5 mg/ml) → in 10µl-Portionen aufteilen, bei –20℃ im Dunkeln lagern
Texas red conjugated donkey anti sheep Ig	0,5 mg, 0,4 ml dH_2O (1,25 mg/ml) → in 10µl-Portionen aufteilen, bei –20℃ im Dunkeln lagern
DAPI counterstain	10 mg DAPI-Pulver, 1 ml dH_2O = „stock 1“ → 2µl „stock 1“, 18 µl dH_2O = „stock 2“, bei –20℃ lagern Arbeitslösung: 0,5 µl „stock 2“, 1 ml Vectashield® Mounting Medium → gut mischen, bei 4℃ oder –20℃ im Dunkeln lagern

Prinzip: Die kombinierte Biotin- und Digoxigenin-Detektion („Double Colour Detection“) erfolgte in drei Schritten. Zuerst wurde eine Biotin-Detektion mit Avidin-FITC durchgeführt. Als nächstes wurden an die mit Fluorochrom gekoppelten Moleküle mit Biotin konjugierte Anti-Avidin-AK gebunden, um die Signale zu verstärken

(Amplifikation). Gleichzeitig wurde die Digoxigenin-Detektion mit Anti-Digoxigenin-AK durchgeführt. Zuletzt wurde durch die Bindung von Avidin-FITC an die Anti-Avidin-AK und die Bindung von mit Texas Red konjugierten AK an die Anti-Digoxigenin-AK erneut eine Amplifikation der Signale herbeigeführt. Anschließend folgte die Gegenfärbung mit DAPI.

Procedere: Für die Vorbehandlung der OT wurden zuerst 50% Formamid und 2x SSC bei 43℃ und 0,1x SSC bei 60℃ 30-45 min im Wasserbad vorgewärmt. Währenddessen wurden die verschiedenen AK-Layer, die später auf die OT pipettiert werden sollten, in Eppendorf-Röhrchen vorbereitet:

Layer 1: 1000 µl Bio blocking reagent + 1 µl Avidin-FITC

Layer 2: 1000 µl Dig blocking reagent + 10 µl Anti-Avidin + 10 µl Anti-Dig-Rhodamin

Layer 3: 1000 µl Bio blocking reagent + 1 µl Avidin-FITC + 10 µl Texas red

Nach Fertigstellung der Gemische wurden diese 30 min zentrifugiert (Biofuge 13R, 13000 rpm, 4℃) und anschließend bei 4℃ im Kühlschrank verwahrt.

Die OT wurden in folgender Reihenfolge gewaschen, um nicht gebundene bzw. unspezifische DNA-Sequenzen zu entfernen: 3 mal 5 min in 50% Formamid, 3 mal 5 min in 2x SSC, 3 mal 5 min in 0,1x SSC und 1 mal 5 min in 4x SSC+Tween (RT). Anschließend wurde 100 µl Bio blocking reagent auf jeden OT aufgetragen und im Brutschrank bei 37℃ 25 min inkubiert. Die AK-Layer wurden wie folgt auf die OT pipettiert, im Brutschrank bei 37℃ inkubiert und danach gewaschen:

- 100 µl Layer 1 auf jeden OT, 35 min Brutschrank, 2 mal 5 min in 4x SSC+Tween und 2 mal 5 min in 1xTNT
- 100 µl Layer 2 auf jeden OT, 35 min Brutschrank, 4 mal 5 min in 1x TNT
- 100 µl Layer 3 auf jeden OT, 35 min Brutschrank, 4x5 min in 1x TNT und 3 min in D-PBS

Anschließend wurden die Metaphasen auf den OT mittels einer aufsteigenden Ethanol-Reihe dehydriert und bei RT getrocknet. Zum Eindecken wurden jeweils 29 µl DAPI counterstain und ein Deckglas (24 x 60 mm) verwendet.

2.3.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und cytoplasmatische Immunglobulinfärbung (cIg-FISH) zur Detektion von *D13S25* (13q14), *P53* (17p13), *CMYC* (8q24), *IGH* (14q32), *FGFR3* (4p16.3), *CCND1* (11q13), *MAF* (16q23) und *IRF4* (6p25)

2.3.5.1 Vorbehandlung der Ziel-DNA

Material	Aufbereitung/Herstellung
dH_2O	-
D-PBS	-
Pepsin	siehe 2.3.4.1
HCl 0,1 M	-
$MgCl_2$ 1 M	siehe 2.3.4.1
37% Formaldehyd	-
Ethanol-Reihe	siehe 2.3.1.1
OT mit Cytospins	siehe 2.3.1.1

Prinzip: Zur Vorbereitung für die spätere Hybridisierung wurde ein Pepsin-Verdau durchgeführt, der die Zellmambran für das Eindringen der DNA-Sonden durchlässig machte.

Procedere: Zur Vorbehandlung der CS wurden 90 ml dH_2O und 10 ml 0,1 M HCl in einer Küvette 30 min im Wasserbad bei 37℃ erwärmt. Bei den aufgetauten CS wurde unter einem Lichtmikroskop die Zelldichte überprüft, dann wurden sie 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden 10 µl Pepsin und die CS in das erwärmte HCl-Gemisch gegeben und 2,5 min verdaut (je nach Zelldichte wurde die Verdauzeit in 30s-Schritten erhöht/erniedrigt oder bei unbefriedigendem Ergebnis die gesamte Prozedur mit veränderter Verdauzeit wiederholt). Danach wurden die CS 5 min in PBS gewaschen, 6 min in 66 ml D-PBS, 3,8 ml 1 M $MgCl_2$ und 4 ml 37% Formaldehyd fixiert und wieder 5 min in D-PBS gewaschen. Mittels einer aufsteigenden Ethanol-Reihe wurden die CS dehydriert und anschließend an der Luft bei RT getrocknet.

2.3.5.2 Hybridisierung

Material	Aufbereitung/Herstellung
DNA-Sonden:	
1077h22, 856g1, 416j7 (6p25)	siehe 2.3.3
cos-α1, y6 (14q32)	siehe 2.3.3
LSI® C-MYC Spectrum Orange DNA Probe	-
LSI® D13S25 Spectrum Orange DNA Probe	-
LSI® P53 Spectrum Orange DNA Probe	-
LSI® IGH/CCND1 [t(11;14)] DNA Probe	-
LSI® IGH/FGFR3 [t(4;14)] DNA Probe	-
LSI® IGH/MAF [t(14;16)] DNA Probe	-
Hybridsierungspuffer:	
Hybridisierungspuffer (10/10)	siehe 2.3.4.2
LSI/WCP® Hybridization Buffer	-
Human Cot-1 DNA®	-

Prinzip: Wie in 2.3.4.2 beschrieben, wurde die doppelsträngige Sonden-DNA vor der Hybridisierung in Einzelstrang-DNA überführt.

Procedere: Die selbsthergestellten DNASonden (1077h22, 856g1, 416j7, cos-α1 und y6) wurden zuerst mit Konkurrenz-DNA (Human Cot-1 DNA®) in einem vorher getesteten Verhältnis (siehe 2.3.4.2) in Eppendorf-Röhrchen pipettiert, die dann kurz gerüttelt und anzentrifugiert wurden. Anschließend wurden diese 15-20 min in der Vakuumzentrifuge pelletiert und dann jeweils mit 5 µl Hybridisierungspuffer (10/10) versehen. Nach kurzem Rütteln und Anzentrifugieren wurden die Gemische 15 min im Wasserbad bei 37℃ gelöst, danach in ein Röhrchen zusammenpipettiert (= 25 µl → Menge für 5 Cytospins) und erneut kurz gerüttelt und anzentrifugiert.

Bei den kommerziell erhältlichen Sonden wurden pro Cytospin 3,5 µl LSI/WCP® Hybridisierungspuffer, 1 µl dH_2O und 0,5 µl LSI®-DNA-Sonde in ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert, kurz gerüttelt und anzentrifugiert.

Auf jeden CS wurden 5 µl des Gemisches pipettiert, mit runden Deckgläschen (∅ 13 mm) bedeckt und mit Fixo-Gum luftdicht verschlossen. Um die doppelsträngige Sonden- und Ziel-DNA in Einzelstrang-DNA zu überführen, wurden die CS 7 min auf dem Heizblock bei 83℃ denaturiert. Anschließend folgte die Hybridisierung über Nacht im Brutschrank bei 37℃.

2.3.5.3 Detektion und Amplifikation

Wie bei der FISH an PHA-Kulturen beschrieben, war auch bei den CS mit den selbst hergestellten DNA-Sonden 1077h22, 856g1, 416j7, cos-α1 und y6 am zweiten Tag zuerst die kombinierte Biotin-/Digoxigenin-Detektion („Double Colour Detection“) mit anschließender Amplifikation notwendig (siehe 2.3.4.3). Die für die Dehydrierung notwendige aufsteigende Ethanol-Reihe wurde hier allerdings weggelassen, da noch das Auftragen der κ- und λ-Leichtketten-AK zur cytoplasmatische Ig-Färbung folgte (siehe 2.3.5.4). Bei den CS mit kommerziell erhältlichen DNA-Sonden war keine „Double Colour Detection“ notwendig, da diese bereits vom Hersteller durchgeführt worden war.

2.3.5.4 Cytoplasmatische Ig-Färbung

Material	Aufbereitung/Herstellung
D-PBS	-
0,4x SSC	200 ml 2x SSC (siehe 2.3.4.1), 800 ml dH_2O
κ-/λ-Antikörper:	-
AMCA Anti-Human Kappa Chain	-
AMCA Anti-Human Lamda Chain	-
Vectashield® Mounting Medium	-

Prinzip: Zur Anfärbung der Ig-Leichtketten in den Plasmazellen wurde eine inmmunhistochemische Darstellung der intrazytoplasmatisch gelegenen κ- und λ-Leichtketten durch fluoreszenzmarkierte AK durchgeführt.

Procedere: Die CS mit kommerziell erhältlichen DNA-Sonden wurden zuerst 2 min in 0,4x SSC (im Wasserbad bei 74℃ erwärmt) gewaschen und danach 5 min in D-PBS gewaschen. Dies war bei den CS mit selbst hergestellten DNA-Sonden nicht mehr notwendig.

Es folgte die Vorbereitung des Leichtketten-AK-Gemisches. Dafür wurden pro CS 5 µl D-PBS, 2,5 µl AMCA-markierte λ-AK und 2,5 AMCA-markierte µl κ-AK in ein Eppendorf-Tube pipettiert, kurz gevortext und anzentrifugiert. Die CS wurden der Küvette entnommen und die Feuchtigkeit um die Zellen herum abgewischt. Auf jeden CS wurden 10 µl des Leichtketten-AK-Gemisches pipettiert, mit runden Deckgläschen

(∅ 13 mm) eingedeckt und mit Fixo-Gum luftdicht verschlossen. Dann wurden sie über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Am Folgetag wurden die CS kurz in D-PBS gespült, dann wurde die Feuchtigkeit um die Zellen herum abgewischt. Zum Eindecken wurden jeweils 1-2 Tropfen Vectashield® Mounting Medium und Deckgläser (24 x 60 mm) verwendet.

2.3.6 Auswertung der Objektträger mit hybridisierten Zellkernen oder Cytospins unter dem Fluoreszenzmikroskop

Zur Auswertung wurde ein Objektträger mit Zellkernen und Metaphasen aus PHA-Kulturen oder einem CS mit KM-Zellen mit einem Tropfen Immersionsöl versehen und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einer 100-fachen Vergrößerung analysiert. Dabei waren ausschließlich die durch die DNA-Sonden erzeugten Signale in den Zellkernen der Plasmazellen von Interesse. Diese waren auf Grund der zuvor durchgeführten zytoplasmatischen Ig-Färbung mit den AMCA-markierten Leichtketten-AK durch einen bläulich leuchtenden Plasmasaum klar abgrenzbar von den übrigen Zellen. Es wurden jeweils 100 Plasmazellen ausgezählt. Bei den DNA-Sonden zur Detektion von *D13S25* (13q14), *P53* (17p13) und *CMYC* (8q24) entsprach das Vorliegen von 2 roten Signalen im Zellkern einem Normalbefund, von 1 roten Signal einer Deletion und von 3 oder mehr roten Signalen einer Überrepräsentation der untersuchten Chromosomenregion. Bei den DNA-Sonden zur Detektion der Translokationen *FGFR3*/*IGH* [t(4;14)(q16.3;q32)], *IRF4*/*IGH* [t(6;14)(p25;q32)], *CCND1*/*IGH* [t(11;14)(q13 ;q32) und *IGH*/*MAF* [t(14;16)(q32;q23)] entsprach das Vorliegen von 2 roten und 2 grünen Signalen im Zellkern einem Normalbefund, das Vorliegen von 2 gelben Signalen oder 2 gelben, 1 roten und 1 grünen Signal einer Translokation. Auch hierbei konnten Aberrationen wie Deletionen oder Überrepräsentionen anhand der entsprechenden Signalanzahl registriert werden.

Um einen Grenzwert für die Diagnosestellung zu erhalten, wurde für jede Aberration ein Cut-off-Wert ermittelt. Dazu wurden die für die jeweilige genetische Veränderung prozentual positiven Plasmazellen von 10 Nicht-Myelompatienten gezählt. Aus dem Mittelwert zuzüglich der dreifachen Standartabweichung wurde der Grenzwert (Cut-off-Wert) berechnet, bei dem das Ergebnis der FISH-Analyse bezüglich der gesuchten Chromosomenveränderung noch als ’negativ’ gewertet wurde (siehe Tab. 2.3).

Tabelle 2.3 Cut-off-Werte

Chromosomenaberration	Cut-off-Wert für 100 Plasmazellen
Deletion *D13S25* (13q14)	7
Deletion *P53* (17p13)	8
Überrepräsentation von *CMYC* (8q24)	8
t(4;14)(q16.3;q32)	6
t(6;14)(p25;q32)	4
t(11;14)(q13;q32)	10
t(14;16)(q32;q23)	4

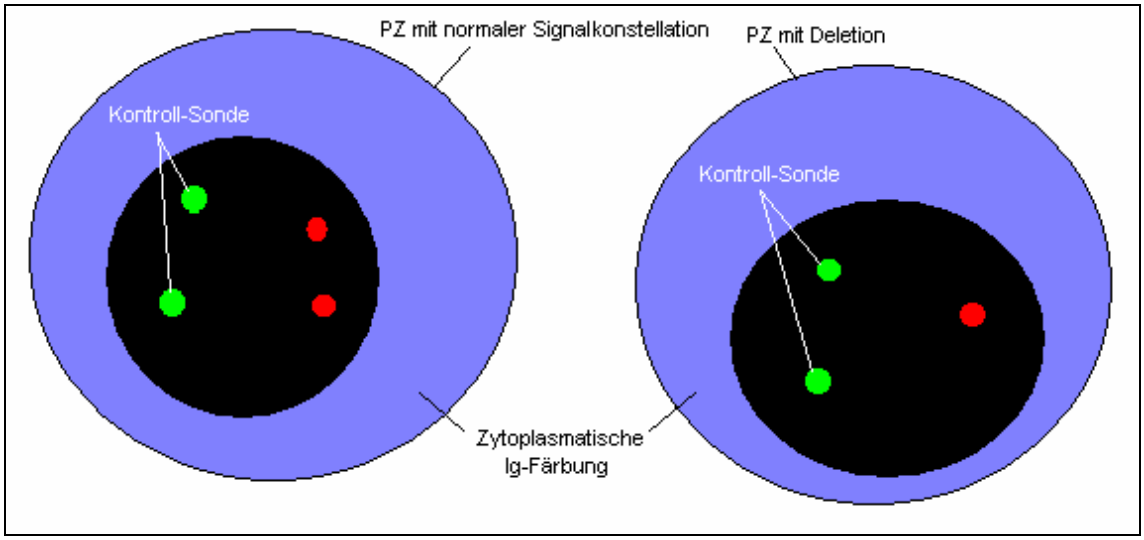


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung von Plasmazellen (PZ) mit normaler Signalgebung und Deletion

2.4 Statistische Auswertung

EFS und OS wurden vom Datum der allogenen PBSZT bis zum jeweiligen Ereignis berechnet. Tod jeglicher Ursache und Rezidiv/Progression wurde hinsichtlich des EFS als Ereignis gewertet. Alle „time-to-event“-Kurven sind gemäß der Kaplan-Meier-Methode geschätzt und innerhalb einer univariaten Analyse mittels „logrank test“ verglichen worden. Nicht Rezidiv-bedingte Mortalität und Rezidiv/Progression wurde mittels der kumulativen Inzidenz berechnet.

Basierend auf dem Regressionsmodell nach Cox wurde eine multivariate Analyse durchgeführt. Initial wurden sämtliche Variablen mit einem *P*-Wert kleiner 0.1 in der univariaten Analyse eingeschlossen und die schrittweise Regression abgebrochen, sobald sich der *P*-Wert bei Eingabe einer zusätzlichen Variable auf größer 0.1 erhöhte. Der Rezidiv-Vergleich wurde mittels x^2-test evaluiert. Alle Tests waren zweiseitig. Das Signifikanz-Niveau lag bei *P*=0.05. Für die statistische Analyse wurde das SPSS 15.0 Softwarepaket verwendet (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

3 Ergebnisse

3.1 cIg-FISH-Analyse

Nahezu 80% der untersuchten Patienten wiesen zumindest eine der sieben untersuchten Chromosomenaberrationen auf.

Die häufigste durch cIg-FISH detektierte chromosomale Veränderung war eine **del(13q14)**, welche bei 62/101 Patienten (61%) beobachtet werden konnte. Als alleinige Aberration trat sie unter den Patienten mit del(13q14), bei denen alle Aberrationen dieser Studie untersucht werden konnten, bei 27% (12/44) auf. Eine ***CMYC*-Überrepräsentation** war mit 21% (17/83) die zweithäufigste Veränderung, eine **del(17p13)** wurde bei 16% (16/100) detektiert. Mindestens eine der 4 untersuchten *IGH*-Translokationen wurde bei 38% der Patienten (31/81) nachgewiesen. Darunter wurde mit 19% am häufigsten **t(4;14)** beobachtet (16/86), **t(11;14)** wurde bei 14% (11/80) und **t(14;16)** bei 4% (4/79) gefunden. Bei keinem der untersuchten Patienten (0/73) konnte **t(6;14)** beobachtet werden, weshalb diese Aberration von weiteren Analysen ausgeschlossen wurde.

Folgende Korrelationen bestanden zwischen dem Auftreten einer del(13q) und den übrigen Chromosomenveränderungen: Unter den Patienten mit *CMYC*-Überrepräsentation und denen mit del(17p) wurden bei 82% und 94% zusätzlich del(13q) festgestellt. Bei den *IGH*-Translokationen wiesen 88% der Patienten mit t(4;14), 64% der Patienten mit t(11;14) und 75% der Patienten mit t(14;16) ebenfalls del(13q) auf. Signifikant war das gehäufte Auftreten einer del(13q) jedoch nur bei Patienten mit del(17p13) (P=0.004) und Patienten mit t(4;14) (P=0.04). Eine weitere signifikante Assoziation wurde zwischen t(4;14) und der *CMYC*-Überrepräsentation festgestellt: Bei 44% der Patienten mit t(4;14) wurde zugleich eine Überrepräsentation von *CMYC* nachgewiesen (P=0.03). Weitere Korrelationen zwischen dem Auftreten einzelner Aberrationen wurden nicht beobachtet.

In den Tabellen 3.1 und 3.2 ist eine Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse gegeben. Die übrigen klinischen und biologischen Patientencharakteristika sind der Tabelle 2.1 im Kapitel 'Material und Methoden' zu entnehmen. In den Abbildungen 3.1-6 sind Fotografien der cIg-FISH-Untersuchungsergebnisse zu sehen.

Tabelle 3.1 cIg-FISH-Untersuchungsergebnisse

Chromosomenaberrationen	Patienten (n)	%
del(13q14)	62/101	61%
davon del(13q14) allein	12/44	27%
CMYC-Überrepräsentation	17/83	21%
del(17p13)	16/100	16%
t(4;14)	16/86	19%
t(11;14)	11/80	14%
t(14;16)	4/79	4%
t(6;14)	0/73	0%
Irgendeine der Aberrationen	72/91	79%
Keine der Aberrationen	19/91	21%

Tabelle 3.2 Assoziationen von del(13q14) mit anderen Aberrationen

Chromosomenaberration	Davon del(13q14) pos.	*P*
del(17p13)	**94% (15/16)**	**0.004**
keine del(17p13)	55% (46/84)	
***CMYC*-Überrepräsentation**	82% (14/17)	0.15
keine *CMYC*-Überrepräsentation	61% (40/66)	
t(4;14)	**88% (14/16)**	**0.04**
keine t(4;14)	59% (41/70)	
t(11;14)	64% (07/11)	1.00
keine t(11;14)	62% (43/69)	
t(14;16)	75% (03/04)	1.00
keine t(14;16)	60% (45/75)	
Chromosomenaberration	**Davon *CMYC*-Überrepräs. pos.**	***P***
t(4;14)	**44% (07/16)**	**0.03**
keine t(4;14)	15% (10/65)	

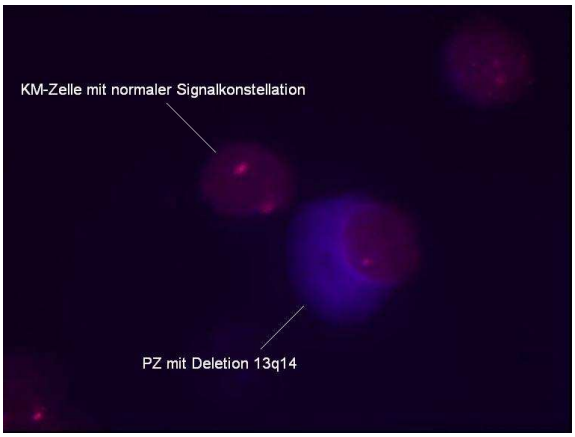


Abb. 3.1 Deletion 13q14

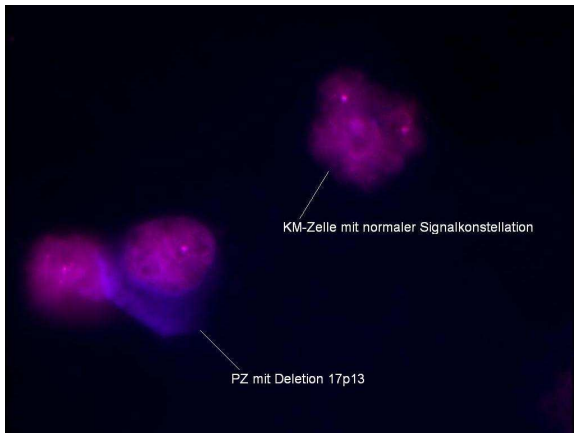


Abb. 3.2 Deletion 17p13

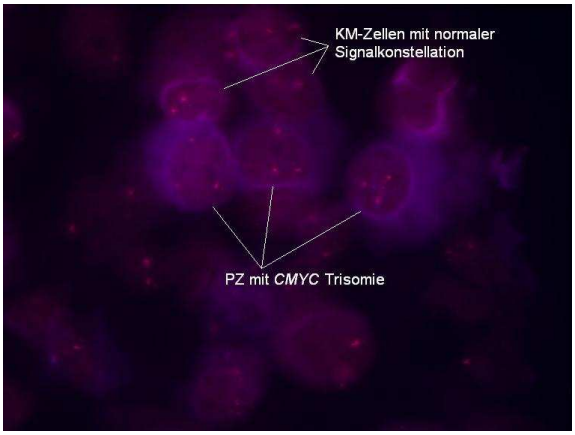


Abb. 3.3 *CMYC*-Trisomie

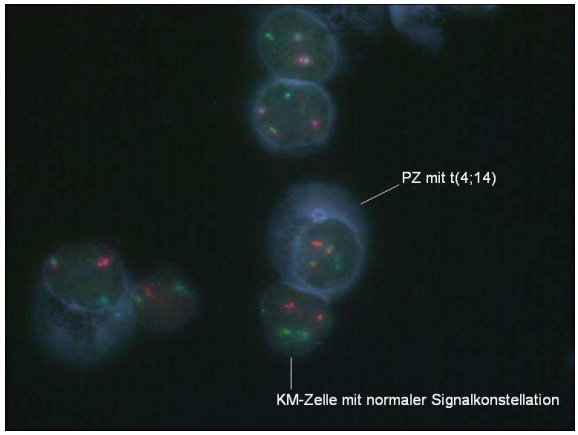


Abb. 3.4 t(4;14)

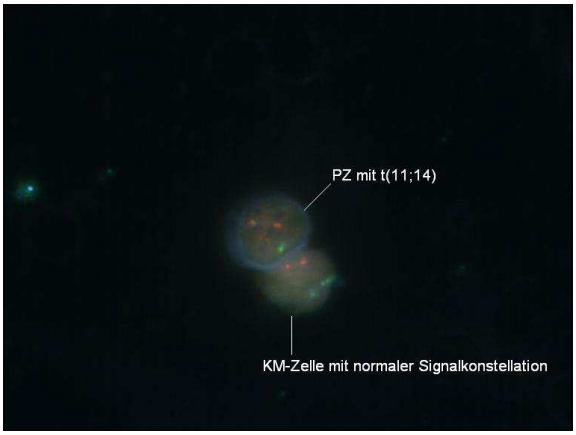


Abb. 3.5 t(11;14)

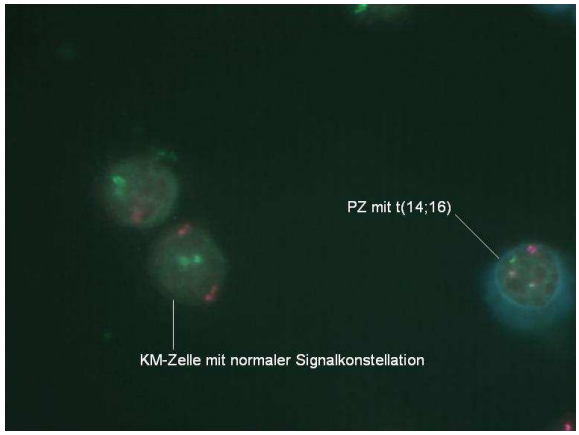


Abb. 3.6 t(14;16)

3.2 Ansprechen auf die Therapie und Toxizitäten

Das Ansprechen auf die allogene Stammzelltransplantation wurde nach den EBMT-Kriterien evaluiert, publiziert von Bladé et al. [175]. 89 von 101 Patienten konnten hinsichtlich des Ansprechens evaluiert werden. Die übrigen Patienten waren kurz nach der Transplantation therapiebedingt verstorben. Die Rate an kompletten Remissionen (CR) betrug 51% (45/89). Dabei konnte bei Patienten mit del(13q14), *CMYC*-Überrepräsentationen, t(4;14), t(11;14) und t(14;16) jeweils kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur gesamten Studienpopulation festgestellt werden. Patienten mit del(17p13) erreichten jedoch eine signifikant niedrigere Rate an kompletten Remissionen (7% vs 58%; *P*=0.001) (siehe Tab. 3.3). Wie in Tabelle 3.4 veranschaulicht, wurden 36 Patienten (40%) mit partieller Remission (PR), 2 Patienten (2%) mit minimalem Ansprechen (MR), ein Patient (1%) mit gleichbleibender Erkrankung (SD) und 5 Patienten (6%) mit progredienter Erkrankung (PD) nach allogener Transplantation registriert. Zudem sind in Tabelle 3.4 die Inzidenz einer GvHD (Standard-Kriterien für akute und chronische GvHD [176, 177]) und die Zeit bis zum Leukozyten- und Thrombozyten-„Engraftment“ aufgelistet. Als Leukozytenengraftment wurde die Bildung von mehr als 1/nl, als Thombozytenengraftment die Bildung von mehr als 20/nl über mehrere Tage nach der Transplantation bezeichnet.

Tabelle 3.3 Komplette Remissionen, bezogen auf die FISH-Ergebnisse

Patienten	CR	*P*
Alle Patienten	51%	
del(13q14) vs non-del(13q14)	53% vs 47%	0.66
del(13q) allein vs keine Aberration	67% vs 47%	0.44
del(17p13) vs andere	7% vs 58%	**0.001**
CMYC-Überrepräsentation vs andere	69% vs 43%	0.13
t(4;14) vs andere	60% vs 49%	0.57
t(11;14) vs andere	30% vs 53%	0.31
t(14;16) vs andere	75% vs 48%	0.36
del(13q14) + del(17p13) vs andere	8% vs 57%	**0.002**
del(13q14) + *CMYC*-Überrepräsentation vs andere	75% vs 43%	0.06
del(13q14) + *IGH*-Translokation vs andere	52% vs 52%	1.00
del(13q14) + t(4;14) vs andere	57% vs 50%	0.77
del(13q14) + t(11;14) vs andere	33% vs 52%	0.67
CMYC-Überr. + t(4;14) vs andere	67% vs 48%	0.43
Irgendeine vs keine Aberration	51% vs 50%	1.00

Abbildung 3.7 Therapieansprechen bei Patienten mit oder ohne del(17p13)

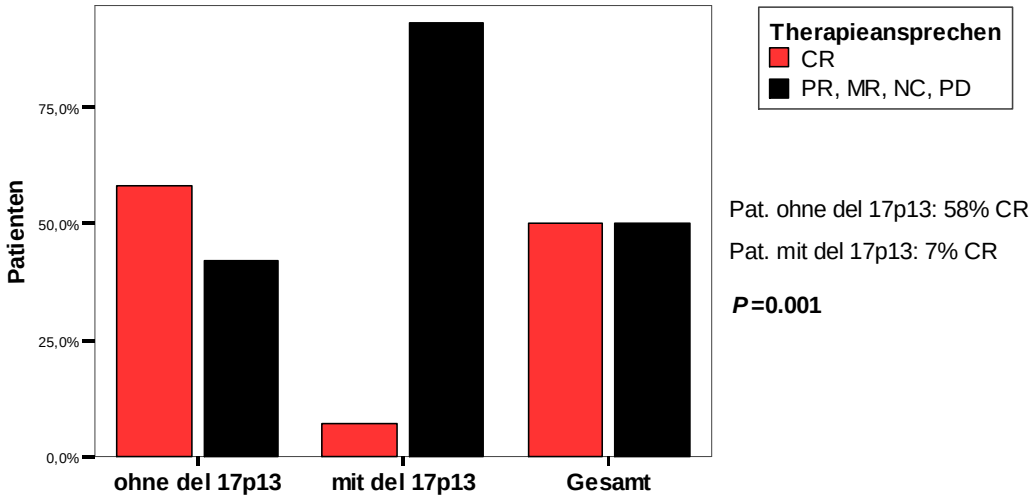


Tabelle 3.4 Engraftment, GvHD und Krankheitsstatus nach allogener SZT

Engraftment	**Zeit (median)**
Leukozyten > $1x10^9$/l	15 Tage (range, 5-33)
Thrombozyten > $20x10^9$/l	17 Tage (range, 5-45)
Akute GvHD	**Patienten (n=100)**
Grad 0	61
Grad I	13
Grad II	21
Grad III	1
Grad IV	4
Chronische GvHD	**Patienten (n=90)**
Overall	22
Remissionsstatus nach allogener SZT	**Patienten (evaluierbar: n=89)**
CR	45
PR	36
MR	2
SD	1
PD	5

3.4 Therapiebedingte Mortalität

Die therapiebedingte Mortalität (TRM) der gesamten Studienpopulation betrug 21% nach einem Jahr. Neben den Chromosomenveränderungen wurden folgende klinische Parameter hinsichtlich eines Einflusses auf die TRM analysiert: Alter, Anzahl der Vortherapien, Rezidiv nach autologer SZT, Remissionsstatus vor allogener SZT, verwandter/unverwandter Spender, HLA-Übereinstimmung, Spendergeschlecht, Transplantatquelle (KMT/PBSZT), β2-Mikroglobulin-Wert, LDH-Wert, Albumin-Wert, Hb-Wert, Anzahl osteolytischer Läsionen. Der einzige signifikante Faktor für eine höhere therapiebedingte Mortalität war ein Alter über 50 Jahre (33% vs 13%; *P*=0.03) (siehe Tab. 3.5-6, Abb. 3.8).

Abbildung 3.8 TRM nach allogener SZT bei Patienten älter oder jünger als 50 Jahre

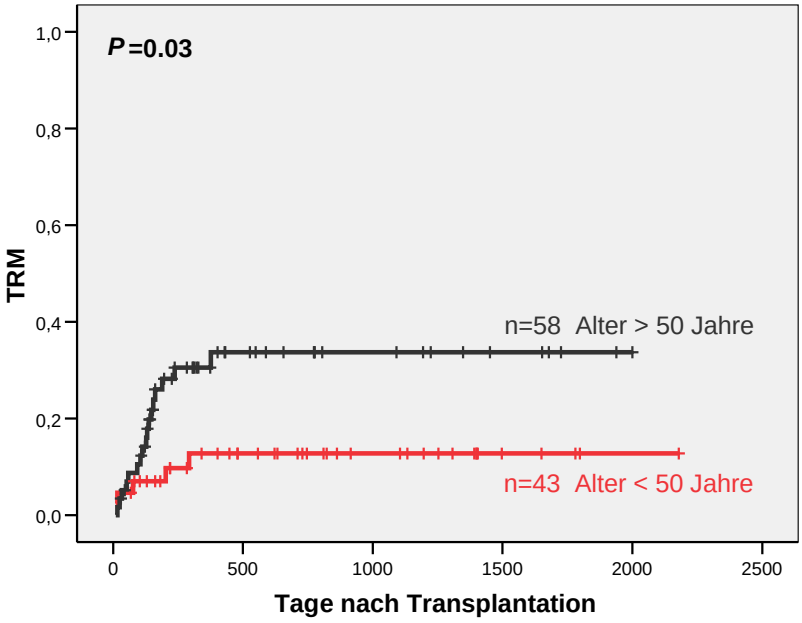


Tabelle 3.5 TRM nach 1 Jahr, bezogen auf die FISH-Ergebnisse

Patienten	TRM	*P*
Alle Patienten	21%	
del(13q14) vs non-del(13q14)	22% vs 29%	0.35
del(13q) allein vs keine Aberration	40% vs 27%	0.76
del(17p13) vs andere	25% vs 24%	0.77
CMYC-Überrepräsentation vs andere	24% vs 25%	0.70
t(4;14) vs andere	20% vs 26%	0.66
t(11;14) vs andere	31% vs 26%	0.70
t(14;16) vs andere	25% vs 24%	0.82
del(13q14) + del(17p13) vs andere	26% vs 24%	0.69
del(13q14) + *CMYC*-Überrepräsentation vs andere	14% vs 27%	0.59
del(13q14) + *IGH*-Translokation vs andere	29% vs 25%	0.62
del(13q14) + t(4;14) vs andere	8% vs 28%	0.14
del(13q14) + t(11;14) vs andere	31% vs 26%	0.48
del(13q14) + t(14;16) vs andere	33% vs 24%	0.50
CMYC-Überr. + t(4;14) vs andere	17% vs 27%	0.59
Irgendeine vs keine Aberration	24% vs 27%	0.55

Tabelle 3.6 TRM nach 1 Jahr, bezogen auf klinische Parameter

Patienten	TRM	*P*
Alle Patienten	21%	
Alter > 50 Jahre vs < 50 Jahre	34% vs 13%	**0.03**
Alter > 45 Jahre vs < 45 Jahre	29% vs 9%	0.10
Anzahl Vortherapien > 6 vs ≤ 6	28% vs 21%	0.42
Anzahl Vortherapien > 10 vs ≤ 10	42% vs 21%	0.11
Rezidiv nach auto SZT vs kein Rezidiv nach auto SZT	22% vs 25%	0.93
Rem.status vor allo SZT MR + SD + PD vs CR + PR	18% vs 26%	0.67
Spender MRD vs MUD	26% vs 23%	0.84
HLA mismatch vs match	27% vs 24%	0.73
Spendergeschlecht männlich vs weiblich	20% vs 34%	0.12
Transplantation PBSZT vs KMT	24% vs 25%	0.93
β2-Mikroglobulin ≥ 3,5 mmol/l vs < 3,5 mmol/l	35% vs 23%	0.21
LDH > 250 U/l vs ≤ 250 U/l	33% vs 25%	0.90
Albumin < 35 g/l vs ≥ 35 g/l	0% vs 27%	0.12
Hb < 10,0 g/dl vs ≥ 10,0 g/dl	33% vs 24%	0.70
Anzahl Osteolysen > 2 vs 0-2	33% vs 20%	0.20
Anzahl Osteolysen > 3 vs 0-3	32% vs 20%	0.30

3.3 Rezidive

Innerhalb der Nachsorgeperiode wurden insgesamt 38 Rezidive/Progressionen (40%) beobachtet. 94 Patienten konnten diesbezüglich evaluiert werden, die übrigen waren kurz nach der Fremdspendertransplantation therapiebedingt verstorben. In einer univariaten Analyse wurde eine statistisch höhere Rezidivrate nach 4 Jahren für die folgenden Faktoren beobachtet: Alter > 50 Jahre (65% vs 45%; *P*=0.02), del(13q14) (70% vs 36%; *P*=0.006), del(17p13) (73% vs 54%; *P*=0.003), LDH > 250 U/l (67% vs 48%; *P*=0.001) und Hb < 10 g/dl (73% vs 50%; *P*=0.02). Auch Patienten mit „irgendeiner der Aberrationen“ (67% vs 30%; *P*=0.01) sowie Patienten, die zugleich del(13q14) und del(17p13) (70% vs 54%; *P*=0.01) oder del(13q14) und t(11;14) (100% vs 44%; *P*=0.01) trugen, wiesen signifikant häufiger Rezidive auf. Bei Patienten mit t(4;14), t(11;14), t(14;16), *CMYC*-Überrepräsentation oder del(13q) als alleinige Aberration wurde kein Unterschied gesehen (siehe Tab. 3.8). Auch klinische Parameter wie der Remissionsstatus vor Transplantation, das Spendergeschlecht, der β2-Mikroglobulin-Wert und die Anzahl osteolytischer Läsionen hatten keinen Einfluss auf die Inzidenz von Rezidiven (siehe Tab. 3.9). Aus der multivariaten Analyse gingen nur del(13q14) (HR: 2.34; 95% CI: 1.06-5.15; *P*=0.03) und del(17p13) (HR: 2.24; 95% CI: 1.02-4.92; *P*=0.04) als unabhängige Faktoren für eine höhere Rezidivrate hervor (siehe Tab. 3.7, Abb. 3.9-10). Da der LDH-Wert und der Hb-Wert zum Transplantationszeitpunkt nur bei 84 bzw. 77 Patienten evaluierbar waren, wurden diese Parameter nicht in die multivariate Analyse mit eingeschlossen.

Tabelle 3.7 Multivariate Analyse der Rezidive

Patienten	Rezidive	*P*
Alter > 50 Jahre	-	-
del(17p13)	2.24 (1.02-4.92)	**0.04**
del(13q14)	2.34 (1.06-5.15)	**0.03**

Tabelle 3.8 Rezidivraten, bezogen auf die FISH-Ergebnisse

Patienten	Rezidive	*P*
Alle Patienten	40%	
del(13q14) vs non-del(13q14)	70% vs 35%	**0.006**
del(13q) allein vs keine Aberration	42% vs 36%	0.35
del(17p13) vs andere	73% vs 53%	**0.003**
CMYC-Überrepräsentation vs andere	53% vs 52%	0.40
t(4;14) vs andere	50% vs 52%	0.60
t(11;14) vs andere	74% vs 45%	0.26
t(14;16) vs andere	33% vs 47%	0.66
del(13q14) + del(17p13) vs andere	70% vs 54%	**0.01**
del(13q14) + *CMYC*-Überrepräsentation vs andere	59% vs 51%	0.20
del(13q14) + *IGH*-Translokation vs andere	75% vs 43%	0.13
del(13q14) + t(4;14) vs andere	51% vs 52%	0.55
del(13q14) + t(11;14) vs andere	100% vs 44%	**0.01**
del(13q14) + t(14;16) vs andere	50% vs 55%	0.87
CMYC-Überr. + t(4;14) vs andere	49% vs 53%	0.55
Irgendeine vs keine Aberration	67% vs 30%	**0.01**

Tabelle 3.9 Rezidivraten, bezogen auf klinische Parameter

Patienten	Rezidive	*P*
Alle Patienten	40%	
Alter > 50 Jahre vs < 50 Jahre	64% vs 45%	**0.02**
Alter > 45 Jahre vs < 45 Jahre	52% vs 69%	0.96
Anzahl Vortherapien > 6 vs ≤ 6	55% vs 56%	0.59
Anzahl Vortherapien > 10 vs ≤ 10	34% vs 56%	0.60
Rezidiv nach auto SZT vs kein Rezidiv nach auto SZT	59% vs 48%	0.08
Rem.status vor allo SZT MR + SD + PD vs CR + PR	49% vs 53%	0.19
Spender MRD vs MUD	36% vs 67%	0.10
HLA mismatch vs match	100% vs 52%	0.96
Spendergeschlecht männlich vs weiblich	55% vs 58%	0.68
Transplantation PBSZT vs KMT	57% vs 33%	0.51
β2-Mikroglobulin ≥ 3,5 mmol/l vs < 3,5 mmol/l	50% vs 54%	0.65
LDH > 250 U/l vs ≤ 250 U/l	67% vs 48%	**0.001**
Albumin < 35 g/l vs ≥ 35 g/l	27% vs 57%	0.33
Hb < 10,0 g/dl vs ≥ 10,0 g/dl	73% vs 50%	**0.02**
Anzahl Osteolysen > 2 vs 0-2	53% vs 50%	0.42
Anzahl Osteolysen > 3 vs 0-3	55% vs 46%	0.21

Abbildung 3.9 Rezidivraten nach allogener SZT für Patienten mit oder ohne del(17p13)

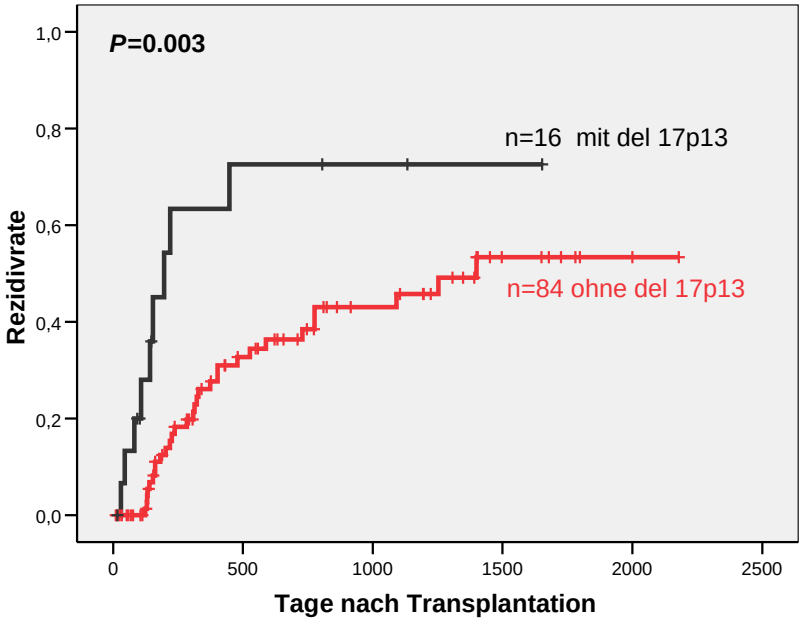
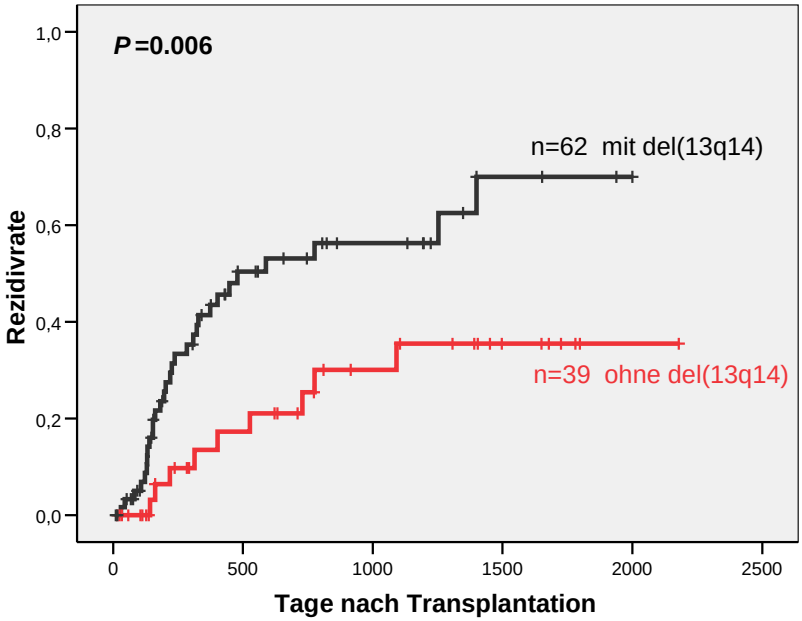


Abbildung 3.10 Rezidivraten nach allogener SZT für Patienten mit oder ohne del(13q14)



3.5 Ereignisfreies Überleben

Neben den genetischen Veränderungen und verschiedenen Kombinationen der Aberrationen wurden die klinischen Parameter Alter, Auto-allo-Protokoll ja/nein, Anzahl der Vortherapien, Rezidiv nach autologer SZT, Remissionsstatus vor allogener SZT, verwandter/unverwandter Spender, HLA-Übereinstimmung, Spendergeschlecht, Transplantatquelle, β2-Mikroglobulin-Wert, LDH-Wert, Albumin-Wert, Hb-Wert und Anzahl osteolytischer Läsionen nach einem prognostischen Einfluss untersucht. Die folgenden Parameter hatten bei den jeweiligen Patienten dabei keinen signifikanten Einfluss auf das ereignisfreie Überleben (EFS) nach 4 Jahren: del(13q14), t(4;14), t(11;14), t(14;16), *CMYC*-Überrepräsentation, höheres β2-Mikroglobulin (> 3,5 mmol/l), MUD und irgendeine Chromosomenaberration. Bei Patienten, die nach der vorangegangenen autologen SZT rezidivierten, wurde ein Trend zu einem geringeren EFS beobachtet (33% vs 52%; *P*=0.09). Ein signifikanter Einfluss auf das EFS innerhalb der univariaten Analyse wurde bei Patienten mit del(17p13) (28% vs 43%; *P*=0.02) und Patienten höheren Alters (> 50 Jahre) (25% vs 63%; *P*=0.001) gesehen (siehe Tab. 3.10-11, Abb. 3.11+14). In der multivariaten Analyse behielten die Faktoren Alter über 50 Jahre (HR: 2.81; *P*=0.01) und del(17p13) (HR: 2.06; *P*=0.03) einen signifikanten negativen Einfluss auf das EFS (siehe Tab. 3.12).

Tabelle 3.10 EFS, bezogen auf die FISH-Ergebnisse

Patienten	EFS	*P*
del(13q14) vs non-del(13q14)	39% vs 46%	0.36
del(13q) allein vs keine Aberration	47% vs 47%	0.81
del(17p13) vs andere	28% vs 43%	**0.02**
CMYC-Überrepräsentation vs andere	36% vs 48%	0.21
t(4;14) vs andere	50% vs 45%	0.84
t(11;14) vs andere	36% vs 45%	0.48
t(14;16) vs andere	25% vs 46% (nach 3 Jahren)	0.51
del(13q14) + del(17p13) vs andere	30% vs 43%	**0.04**
del(13q14) + *CMYC*-Überrepräsentation vs andere	35% vs 47%	0.35
del(13q14) + *IGH*-Translokation vs andere	41% vs 46%	0.39
del(13q14) + t(4;14) vs andere	57% vs 43%	0.41
del(13q14) + t(11;14) vs andere	29% vs 45%	0.13
del(13q14) + t(14;16) vs andere	33% vs 44%	0.50
CMYC-Überr. + t(4;14) vs andere	43% vs 45%	0.72
Irgendeine vs keine Aberration	45% vs 63%	0.12

Tabelle 3.11 EFS, bezogen auf klinische Parameter

Patienten	EFS	*P*
Alter > 50 Jahre vs < 50 Jahre	25% vs 65%	**0.001**
Alter > 45 Jahre vs < 45 Jahre	36% vs 60%	0.14
Auto-allo-Protokoll vs nicht Auto-allo-Protokoll	54% vs 46%	0.42
Anzahl Vortherapien > 6 vs ≤ 6	32% vs 49%	0.11
Anzahl Vortherapien > 10 vs ≤ 10	39% vs 42%	0.41
Rezidiv nach auto SZT vs kein Rezidiv nach auto SZT	33% vs 52%	0.09
Rem.status vor allo SZT MR + SD + PD vs CR + PR	35% vs 45%	0.33
Spender MRD vs MUD	49% vs 36%	0.40
HLA mismatch vs match	44% vs 41%	0.99
Spendergeschlecht männlich vs weiblich	43% vs 39%	0.59
Transplantation PBSZT vs KMT	41% vs 50%	0.80
β2-Mikroglobulin ≥ 3,5 mmol/l vs < 3,5 mmol/l	32% vs 47%	0.12
LDH > 250 U/l vs ≤ 250 U/l	33% vs 49%	0.06
Albumin < 35 g/l vs ≥ 35 g/l	73% vs 44%	0.18
Hb < 10,0 g/dl vs ≥ 10,0 g/dl	22% vs 49%	0.09
Anzahl Osteolysen > 2 vs 0-2	35% vs 56%	0.14
Anzahl Osteolysen > 3 vs 0-3	35% vs 56%	0.14

Tabelle 3.12 EFS, multivariate Analyse

Patienten	EFS	*P*
Alter > 50 Jahre	2.81 (1.52-5.18)	**0.01**
del(17p13)	2.06 (1.05-4.01)	**0.04**
del(13q14)	-	-

3.6 Gesamtüberleben

Es wurden dieselben Variablen wie in 3.5 untersucht. Die folgenden Parameter hatten bei den jeweiligen Patienten keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben (OS) nach 4 Jahren: del(13q14), t(4;14), t(11;14), t(14;16) und MUD und irgendeine Chromosomenaberration. Der Trend zu einem kürzeren OS wurde bei Patienten mit del(17p13) (30% vs 49%; *P*=0.07) oder *CMYC*-Überrepräsentation (15% vs 52%; *P*=0.08) beobachtet (siehe Tab. 14). Ein signifikant kürzeres OS wurde bei Patienten mit einem höheren β2-Mikroglobulin (> 3,5 mmol/l) (24% vs 55%; *P*=0.04) und bei Patienten mit einem Alter über 50 Jahren (34% vs 65%; *P*=0.001) gesehen (siehe Tab. 3.15, Abb. 3.14-15). Da die Anzahl der Patienten mit bekanntem β2-Mikroglobulin-Wert nur 79 betrug, wurde dieser Parameter nicht in die multivariate Analyse mit eingeschlossen. Nur der Faktor Alter über 50 Jahre behielt in dieser Analyse einen unabhängigen signifikanten Einfluss auf das OS (HR: 2.9; *P*=0.002) (siehe Tab. 3.13).

Tabelle 3.13 OS, multivariate Analyse

Patienten	OS	*P*
Alter > 50 Jahre	2.9 (1.5-5.61)	**0.002**
del(17p13)	-	-
del(13q14)	-	-

Tabelle 3.14 OS, bezogen auf die FISH-Ergebnisse

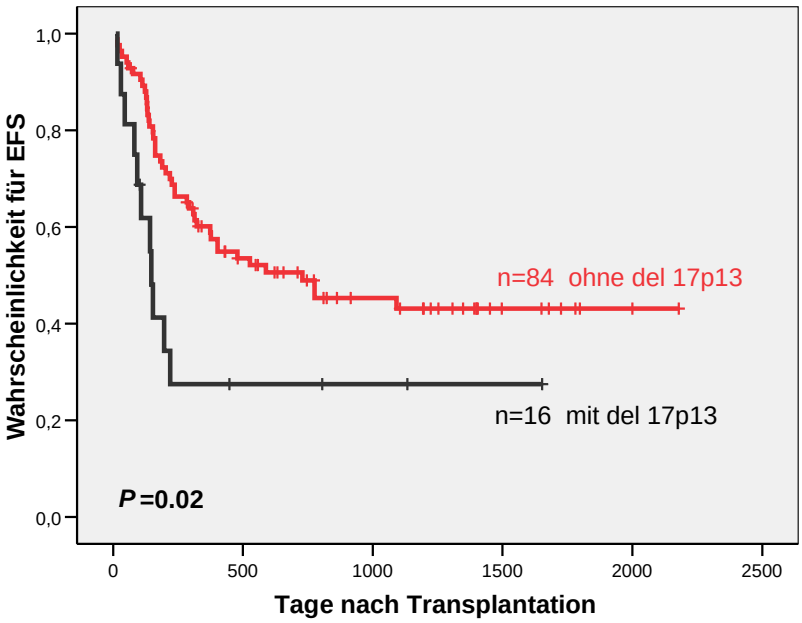
Patienten	OS	*P*
del(13q14) vs non-del(13q14)	38% vs 56%	0.31
del(13q) allein vs keine Aberration	42% vs 61%	0.36
del(17p13) vs andere	30% vs 49%	0.07
CMYC-Überrepräsentation vs andere	15% vs 52%	0.09
t(4;14) vs andere	39% vs 49%	0.77
t(11;14) vs andere	36% vs 44%	0.48
t(14;16) vs andere	38% vs 47%	0.85
del(13q14) + del(17p13) vs andere	33% vs 48%	0.12
del(13q14) + *CMYC*-Überrepräsentation vs andere	16% vs 51%	0.21
del(13q14) + *IGH*-Translokation vs andere	33% vs 50%	0.23
del(13q14) + t(4;14) vs andere	45% vs 48%	0.68
del(13q14) + t(11;14) vs andere	29% vs 45%	0.16
del(13q14) + t(14;16) vs andere	0% vs 48%	0.69
CMYC-Überr. + t(4;14) vs andere	24% vs 48%	0.57
Irgendeine vs keine Aberration	39% vs 61%	0.22

Tabelle 3.15 OS, bezogen auf klinische Parameter

Patienten	OS	*P*
Alter > 50 Jahre vs < 50 Jahre	34% vs 63%	**0.001**
Alter > 45 Jahre vs < 45 Jahre	44% vs 51%	0.17
Auto-allo-Protokoll vs nicht Auto-allo-Protokoll	50% vs 43%	0.46
Anzahl Vortherapien > 6 vs ≤ 6	47% vs 46%	0.63
Anzahl Vortherapien > 10 vs ≤ 10	40% vs 48%	0.33
Rezidiv nach auto SZT vs kein Rezidiv nach auto SZT	40% vs 54%	0.27
Rem.status vor allo SZT MR + SD + PD vs CR + PR	41% vs 49%	0.61
Spender MRD vs MUD	54% vs 41%	0.48
HLA mismatch vs match	58% vs 46%	0.88
Spendergeschlecht männlich vs weiblich	49% vs 41%	0.25
Transplantation PBSZT vs KMT	46% vs 50%	0.91
β2-Mikroglobulin ≥ 3,5 mmol/l vs < 3,5 mmol/l	24% vs 55%	**0.04**
LDH > 250 U/l vs ≤ 250 U/l	33% vs 54%	0.09
Albumin < 35 g/l vs ≥ 35 g/l	67% vs 53%	0.22
Hb < 10,0 g/dl vs ≥ 10,0 g/dl	42% vs 53%	0.16
Anzahl Osteolysen > 2 vs 0-2	46% vs 53%	0.39
Anzahl Osteolysen > 3 vs 0-3	51% vs 55%	0.58

Abbildung 3.11 EFS und OS nach allogener SZT für Patienten mit oder ohne del(17p13)

A)



B)

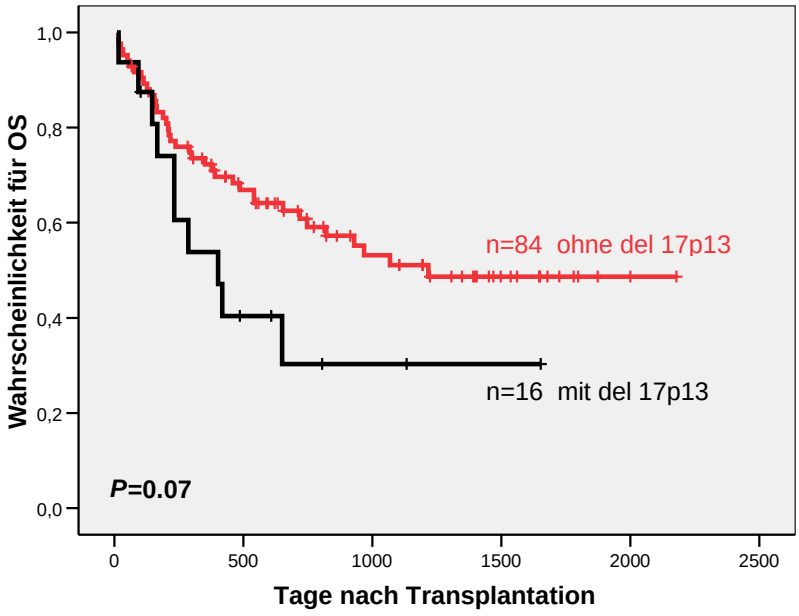
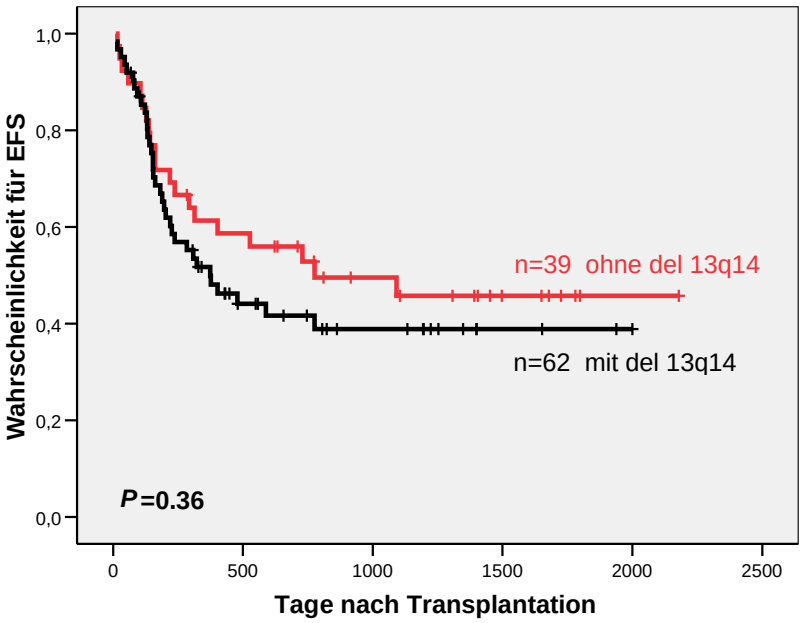


Abbildung 3.12 EFS und OS nach allogener SZT für Patienten mit oder ohne del(13q14)

A)



B)

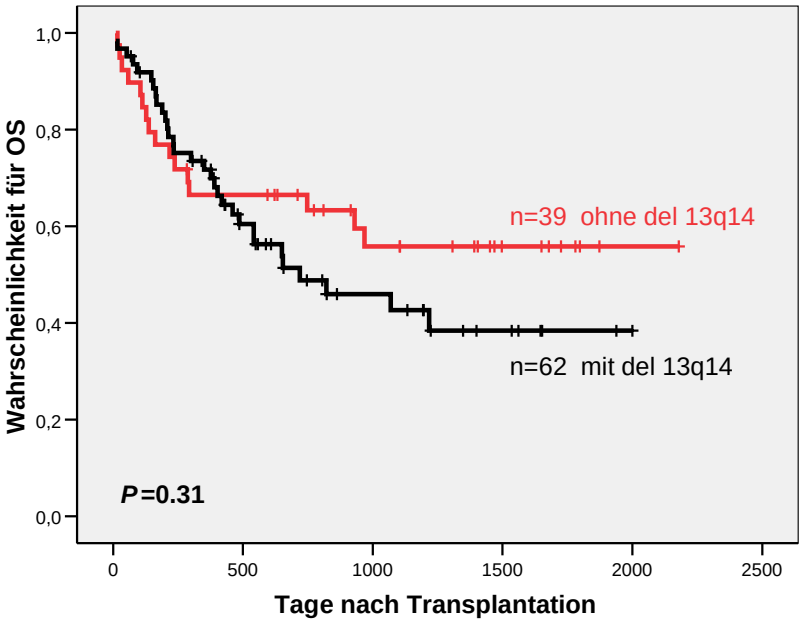
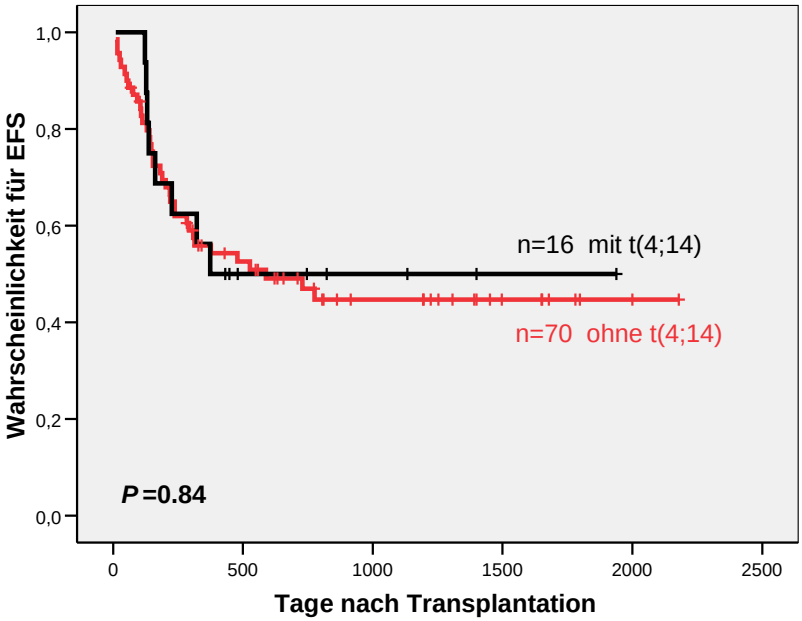


Abbildung 3.13 EFS und OS nach allogener SZT für Patienten mit oder ohne t(4;14)

A)



B)

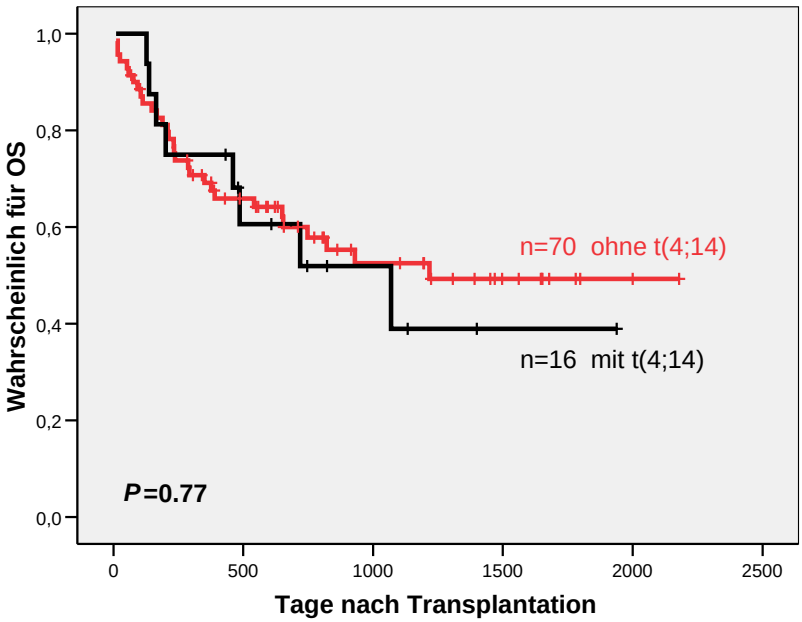
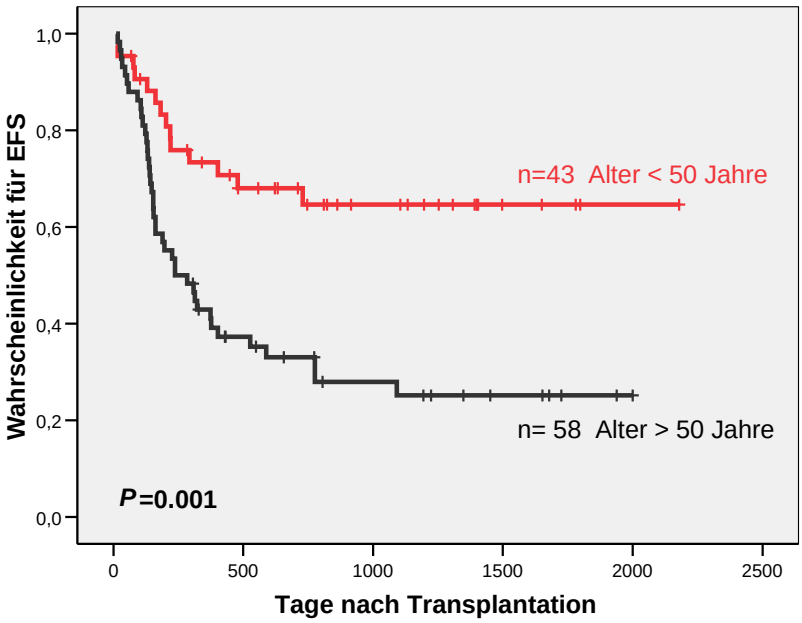


Abbildung 3.14 EFS und OS nach allogener SZT für Patienten älter oder jünger als 50 Jahre

A)



B)

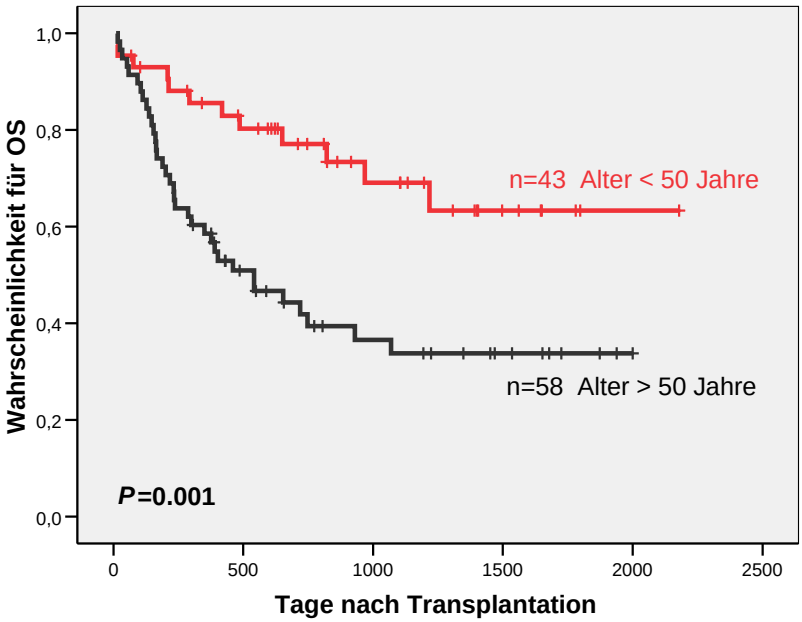
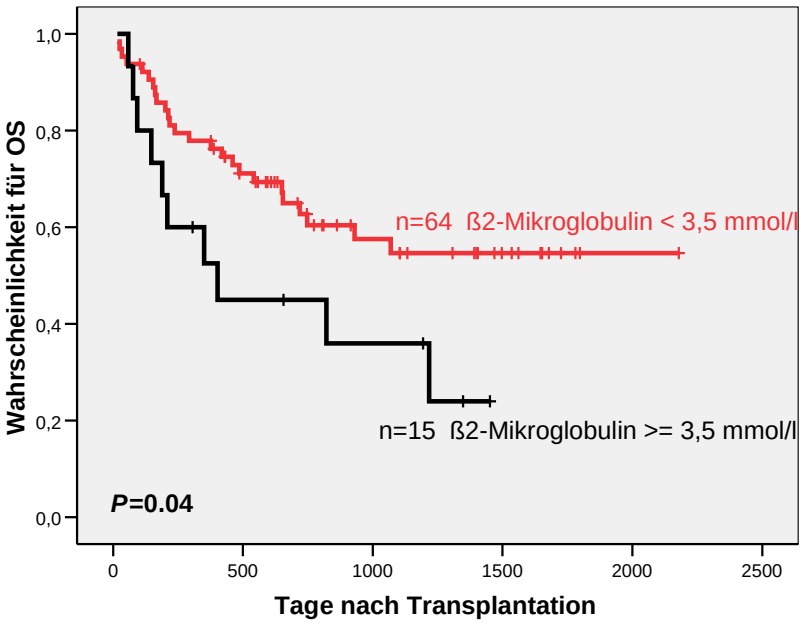


Abbildung 3.15 OS nach allogener SZT für Patienten mit β2-M ≥ 3,5 mmol/l oder < 3,5 mmol/l



3.7 Einfluss von Rezidiv/Progression nach vorangegangener Hochdosistherapie

Im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen [178] zeigten Patienten, die nach vorangegangener Hochdosistherapie (HDT) mit autologer Stammzellreinfusion rezidivierten, lediglich einen Trend zu einem schlechteren EFS (33% vs 52%, *P*=0.09). Patienten mit del(13q) (n=61) und/oder del(17p) (n=16) wiesen nur einen Trend zu einem besseren OS auf (*P*=0.09 und *P*=0.05), wenn sie die allogene SZT ohne vorangegangenes Rezidiv nach der HDT erhielten. Patienten mit t(4;14) (n=16) hatten zudem ein signifikant besseres EFS ohne vorheriges Rezidiv nach der Hochdosistherapie (*P*=0.02).

Zusätzlich wurde eine zytogenetische Subanalyse der Patienten mit und ohne Rezidiv nach der HDT durchgeführt. Hinsichtlich der gesamten Patientengruppe mit Rezidiv nach der Hochdosistherapie (n=51) haben weder del(13q) (*P*=0.6) noch t(4;14) (*P*=0.2), dafür aber del(17p13) (*P*=0.05) einen Einfluss auf das EFS dieser Subgruppe gehabt. Bei den Patienten ohne Rezidiv nach der HDT (n=51) haben weder del(13q) (P=0.6) noch del(17p13) (P=0.3) noch t(4;14) (P=0.1) das EFS beeinflusst. Bemerkenswert ist, dass Patienten mit t(4;14) einen Trend zu einem besseren EFS zeigten (85% vs 50%), jedoch ist die Anzahl dieser Patienten zu gering (n=7), um Schlüsse daraus zu ziehen.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisse der cIg-FISH-Analyse

Im Rahmen unserer umfassenden cIg-FISH-Analyse von chromosomalen Veränderungen bei Patienten mit Multiplem Myelom konnte bei nahezu 80% der untersuchten Patienten mindestens eine der sieben analysierten Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden. Dies zeigt einmal mehr die höhere Detektionsrate chromosomaler Aberrationen der FISH gegenüber der konventionellen Zytogenetik, der auf Grund eines zu geringen Plasmazell-Anteils, zu wenigen auswertbaren Metaphasen oder zu kleinen bzw. telomernahen Aberrationen viele auffälligen Befunde entgehen.

Als häufigste chromosomale Veränderung konnten wir **Deletion 13q14** nachweisen, sie zeigte sich bei 62/101 Patienten (61%). Im Unterschied dazu sind die Inzidenzen von del(13q) in anderen Studien mit 28-54% niedriger angegeben [52, 86-95]. Als Gründe hierfür sind z. B. die hohen Anteile an Patienten mit Rezidiv nach autologer SZT (50%) und an Patienten, die refraktär vor allogener SZT waren (28%), zu sehen. Auf Grund des von unserer Abteilung für Stammzelltransplantation durchgeführten „Auto-allo-Therapieprotokolls“ (siehe 2.1.1), innerhalb dessen die Hälfte der untersuchten Patienten therapiert wurde, hat sich zudem eine Art Spezialisierung auf die „Hochrisiko-Patienten“ mit del(13q14) entwickelt. Auf diese Weise hat eine gewisse Vorselektion stattgefunden.

Als zweithäufigste Aberration detektierten wir mit 21% (17/83) die ***CMYC*-Überrepräsentation**. Der Vergleich mit Daten früherer Studien ist schwierig, da meist komplexe Strukturveränderungen und Rearrangements des *CMYC*-Gens wie Insertionen und Translokationen untersucht wurden [121-127]. Lediglich eine kleinere FISH-Analyse bei 31 Patienten mit MM aus dem Jahr 2001 [116] untersuchte nur die Überrepräsentation von *CMYC* und konnte sie in 32% der Fälle nachweisen. Die höhere Inzidenz in dieser Studie im Vergleich zu unserer Untersuchung ist nicht eindeutig zu begründen. Es wird davon ausgegangen, dass die Überrepräsentation von *CMYC*, ähnlich wie die Translokation t(8;14), zu einer Überexpression des Gens führt, wodurch sie ebenso als Marker der Tumorprogression angesehen werden kann. Da der Anteil an Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien jedoch in beiden Studien

ähnlich ist, kann dies nicht als Erklärung dienen. Letztlich muss man die geringe Patientenzahl der Studie aus dem Jahr 2001 berücksichtigen. Weitere Untersuchungen zur Evaluation der Inzidenz der *CMYC*-Überrepräsentation beim MM wären wünschenswert.

Bei 16/100 Patienten (16%) konnten wir **Deletion 17p13** nachweisen. Damit liegen wir etwas über den Ergebnissen der meisten anderen Studien, in denen Inzidenzen von 2-13% angegeben sind [52, 87, 88, 90, 102-106]. Ein Grund dafür könnte der hohe Anteil an Patienten in fortgeschrittenen Stadien und/oder mit Rezidiv in unserer Studie (74%) sein, da del(17p) als Marker der Tumorprogression gilt [86, 89, 108, 110-117]. In der Mehrzahl der Studien mit niedrigerer del(17p)-Inzidenz, vor allem in den größten und aussagekräftigsten [87, 88], wurden ausschließlich neu diagnostizierte Myelom-Patienten untersucht. Nur in einer Studie von Drach et al. (1998) wurde del(17p13) bei 33% und 55% der Patienten mit neu diagnostiziertem und rezidiviertem MM nachgewiesen [108]. Die hohen Werte wurden allerdings von Avet-Loiseau et al. (1999) angezweifelt, nachdem diese Arbeitsgruppe in ihrer Studie deutlich weniger Deletionen nachwiesen [104]. Die Ergebnisse von Drach et al. seien durch eine hohe falsch-positiv-Rate auf Grund einer schlechten Hybridisierungseffizienz zustande gekommen. Drach et al. dagegen sahen die Ursache für die unterschiedlichen del(17p)-Häufigkeiten in den unterschiedlichen Patientenpopulationen [180]. Trotzdem forderten Avet-Loiseau et al. in Anbetracht dieser Diskrepanzen Kontrollen von Interphase-FISH-Untersuchungen, da diese mittlerweile weit verbreitet zur Untersuchung von chromosomalen Aberrationen angewendet werden.

***IGH*-Translokationen** wurden in unserer Patientenpopulation in 38% der Fälle festgestellt. Dass die Inzidenz dieser Translokationen im Unterschied hierzu in anderen Studien bis zu 75% beträgt [125, 132, 133], hängt damit zusammen, dass in unserer Studie lediglich nach den 4 *IGH*-Translokationen t(4;14), t(11;14), t(14;16) und t(6;14) gesucht wurde. In den Untersuchungen mit höheren Inzidenzen wurden darüber hinaus durch Verwendung anderer DNA-Sonden auch andere bekannte Translokationspartner von 14q32 wie 8q24, 12q24 oder 18q21 erfasst. Zudem werden sogenannte „break apart assays“ eingesetzt, durch die mittels spezifischer DNA-Sonden Bruchpunkte in Genloki wie 14q32 detektiert werden können, ohne dass die dazugehörigen Translokationspartner mit dargestellt werden. Daher wird häufig ein nicht unerheblicher Anteil unbekannter Translokationspartner mit angegeben.

Als häufigste *IGH*-Translokation war in unserer Studie mit 19% **t(4;14)(p16;q32)** zu finden. Dieser Wert liegt ungefähr im Mittelfeld der Inzidenzen früherer Untersuchungen, in denen Angaben von 10-27% [52, 87, 88, 101, 134, 138, 146-149] gemacht werden. Wenn man darunter einmal nur die Studien betrachtet, in denen FISH als Untersuchungstechnik verwendet wurde, so findet man bemerkenswerterweise bisher keine Inzidenz größer 15%.

Bei 14% der Patienten fanden wir **t(11;14)(q13;q32)**. Auch dieser Wert liegt etwa im Mittelfeld bisheriger Studien, in denen die Translokation in 8-21% der Fälle detektiert werden konnte [52, 86-88, 91, 102, 134, 152, 159].

t(14;16)(q32;q23) wurde bei den Patienten unserer Studie nur in 4% der Fälle nachgewiesen. Dies entspricht aber ebenfalls den Ergebnissen anderer Untersuchungen, in denen 16q23 als Translokationspartner von 14q32 mittels FISH auch nur in maximal 5% der Fälle gefunden werden konnte [88, 90, 91, 134, 152, 166].

Bei keinem der Patienten konnten wir **t(6;14)(p25;q32)** beobachten. Ein Vergleich zu den Ergebnissen anderer Studien ist hier nur eingeschränkt möglich, da die Inzidenz von 6p25 als Translokationspartner von 14q32 bei Myelompatienten bisher nur in einer anderen Studie untersucht wurde. Hier fand sich bei 21% der Patienten (8/38) ein positiver Befund für t(6;14)(p25;q32). Die Ergebnisse sind jedoch nicht direkt vergleichbar, da unterschiedliche DNA-Sonden eingesetzt wurden (siehe Yoshida et al.,1999 [174]).

Bezüglich **Korrelationen** zwischen dem Auftreten der verschiedenen analysierten Aberrationen haben sich in unserer Studie eindrückliche Ergebnisse ergeben. Zum einen zeigte sich eine gehäufte Inzidenz von *CMYC*-Überrepräsentationen bei Patienten mit der *IGH*-Translokation t(4;14): 7 von 16 Patienten mit t(4;14) (44%; *P*=0.03) wiesen gleichzeitig eine *CMYC*-Überrepräsentation auf. Dieses Ergebnis erinnert an eine Studie von Avet-Loiseau et al. aus dem Jahr 2001, in der zumindest ein Trend zur Assoziation mit t(4;14) gesehen wurde, da 14 von 60 Patienten mit t(4;14) (23%) ebenfalls ein *CMYC*-Rearrangement aufwiesen [122]. Allerdings wurden in dieser Analyse neben DNA-Sonden zur quantitativen Detektion von 8q24 auch Sonden zur Detektion von t(8;14) und t(8;22) verwendet.

Zum anderen war sowohl bei den Patienten mit del(17p13) und denen mit *CMYC*-Überrepräsentation als auch bei Patienten mit t(4;14), mit t(11;14) und denen mit t(14;16) bei der Mehrheit zugleich del(13q) nachzuweisen. Mit Ausnahme von t(11;14) machte dieser Anteil jeweils über 75% aus, von den Patienten mit del(17p) besaßen

sogar 94% ebenfalls del(13q), bei denen mit t(11;14) waren es immerhin noch 64%. Signifikant war diese Häufung von del(13q) auf Grund von zum Teil nur geringen Patientenzahlen allerdings nur in den Gruppen del(17p13)-positiver und t(4;14)-positiver Patienten. In früheren Studien konnten ähnliche Korrelationen zwischen den Chromosomenaberrationen gezeigt werden: t(4;14) war dort in 79-94% der Fälle mit del(13q) assoziert, del(17p) war zu 68-78%, t(11;14) zu 40% und t(14;16) in einer Studie in 92% der Fälle mit del(13q) assoziiert [87, 88, 91, 101]. Daten zur Korrelation der Inzidenz von *CMYC*-Überrepräsentation und del(13q14) existierten bislang nicht.

Da also Aberrationen verschiedenen Ursprungs stark mit dem Auftreten der Deletion 13q14 zu korrelieren scheinen, macht es Sinn, das vorliegende Phänomen aus dem umgekehrten Blickwinkel zu betrachten, wie es schon Fonseca et al. hinsichtlich t(4;14) getan haben [101]: Deletion 13q14 fungiert vermutlich als Wegbereiter für andere genetische Veränderungen, darunter vor allem del(17p13), aber auch *IGH*-Translokationen (ausführlichere Erläuterungen hierzu in Kapitel 4.2). Diese Ergebnisse leisten einen Beitrag zur Erklärung, warum del(13q14) in früheren Studien als negativer prognostischer Faktor gewertet wurde, in neueren Studien jedoch als alleinige Aberration keinen ungünstigen Faktor für die Prognose mehr darstellt.

Zusammenfassend lassen sich auf Grund der Ergebnisse unserer cIg-FISH-Untersuchungen folgende Aussagen treffen: Wir konnten bestätigen, dass Deletion 13q die häufigste Chromosomenaberration beim MM ist. Deletion *P53* ist nicht, wie ursprünglich angenommen, ein seltenes Ereignis beim MM, sondern gehört als Marker der Tumorprogression im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf zu den häufigsten genetischen Veränderungen. Wahrscheinlich noch häufiger, innerhalb unserer Studie bei mehr als einem Fünftel der Patienten nachweisbar, tritt die Überrepräsentation von *CMYC* beim MM auf. Unter den *IGH*-Translokationen konnten wir t(4;14) am häufigsten nachweisen, womit bisherige Studienergebnisse bestätigt wurden. Auch die eher niedrige Inzidenz von t(14;16) konnte durch unsere Ergebnisse bekräftigt werden. t(6;14)(p25;q32) spielt in unseren Untersuchungen keine Rolle beim MM. Da dieses Ergebnis aber im Kontrast zu einer früheren Studie aus dem Jahr 1999 (s. o.) steht, sollte die Inzidenz dieser Translokation beim MM noch weiter evaluiert werden. Schließlich zeigten unsere Analysen starke Korrelationen zwischen dem Auftreten von Deletion 13q und den übrigen untersuchten Aberrationen. Sie lassen darauf schließen, dass del(13q) eine wichtige Rolle in der Pathogenese des MM spielt, in dem es unter anderem als Wegbereiter für andere Aberrationen wie Deletion 17p13, t(4;14) und *CMYC*-Überrepräsentation fungiert.

4.2 Ergebnisse der uni- und multivariaten Analyse bezüglich Rezidive, EFS und OS

Die Evaluation der cIg-FISH-Ergebnisse und deren Einfluss auf die Prognose nach allogener SZT bei Patienten mit Multiplem Myelom hat gezeigt, dass **Deletion 17p13** ein signifikanter prognostischer Faktor nach allogener SZT ist. Die ereignisfreie Überlebenszeit war bei diesen Patienten signifikant verkürzt, zudem zeigte sich der Trend zu einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit. Dies hängt vor allem mit der signifikant höheren Rate an Rezidiven/Progressionen innerhalb dieser Patientengruppe zusammen. Darüber hinaus ist del(17p13) die einzige der untersuchten molekularzytogenetischen Veränderungen, aus der eine signifikant niedrigere Rate an kompletten Remissionen im Vergleich zu den anderen Aberrationen resultierte (7% vs 58%; *P*=0.001). Diese Ergebnisse spiegeln die ungünstige Prognose dieser Patientenpopulation selbst nach einer allogenen SZT wieder. Auch in Studien, welche die prognostische Bedeutung der Deletion *P53* nach einer Hochdosistherapie evaluierten, zeigte sich stets ein negativer prognostischer Einfluss auf die Überlebenszeit [87, 88, 102, 106].

Trotz der schlechten Prognose von Patienten mit del(17p13) war das in unserer Studie beobachtete EFS von 28% nach 4 Jahren günstiger im Vergleich zu dem berichteten EFS von 10% bei Patienten, die eine Hochdosistherapie erhalten hatten [87]. Diese Beobachtung deutet auf eine dringende Notwendigkeit hin, die Therapie dieser „Hochrisiko-Patienten“ weiter zu verbessern.

Im Gegensatz zu unserer vorangegangenen Studie [10] blieb **Deletion 13q14** lediglich im Hinblick auf Rezidive ein signifikanter prognostischer Faktor, EFS und OS wurden nicht beeinflusst. Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von del(13q14) hat sich erst seit Kurzem ein Wandel ergeben. Ältere Studien berichteten von einem ungünstigen Einfluss auf das EFS und OS nach konventioneller Chemotherapie und nach Hochdosistherapie [86, 90, 93-95, 98]. Laut neueren Studien (siehe unten) haben Patienten, bei denen neben del(13q) keine weiteren chromosomalen Aberrationen nachgewiesen werden können, auch kein verkürztes EFS und OS zu erwarten. Diese unterschiedlichen Ergebnisse kommen vermutlich durch zwei Versäumnisse in den älteren Studien zustande: Zum einen wurden die Inzidenz und prognostische Bedeutung von del(17p13) und *IGH*-Translokationen lange Zeit unterschätzt. So hat man sich in der Mehrzahl der früheren Studien auf die Analyse von del(13q14) beschränkt, andere Chromosomenaberrationen sind nicht untersucht worden [93-95,

98]. Zum anderen ist bei diesen Studien in der statistischen Analyse noch nicht die Variable „del(13q14) als alleinige Aberration“ zu finden. Dadurch ist zu erklären, dass auch in Untersuchungen, in denen zusätzlich del(17p13) und *IGH*-Translokationen mit ausgewertet wurden, ein prognostischer Einfluss von del(13q14) in der multivariaten Analyse festgestellt wurde [86, 90]. Um nämlich den reinen prognostischen Einfluss der Deletion 13q zu erhalten, muss man innerhalb der Analyse Patienten mit del(13q) als alleinige Abnormalität von denen mit del(13q) plus andere Aberrationen trennen.

Im Hinblick auf die Diskrepanz zwischen unserer aktuellen Studie und der vorangegangenen aus dem Jahr 2004 ist nun von Relevanz, dass in der letzten Studie noch mehr Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (50% waren therapierefraktär) eingeschlossen worden waren, wohingegen in der aktuellen Untersuchung nur 28% der Patienten refraktär vor der allogenen SZT waren. Zudem ist, wie zuvor beschrieben, sicherlich von Bedeutung, dass in der vorherigen Studie nur del(13q14) untersucht wurde. Wie unsere aktuelle Studie jedoch zeigt, besteht eine starke Assoziation dieser Deletion zu anderen Aberrationen (siehe 4.1). Beispielsweise konnten wir allein bei 15 Patienten neben del(13q) auch Deletion *P53* nachweisen, welche sowohl nach HDT mit autologer als auch nach allogener SZT mit einer signifikant schlechteren Prognose verbunden ist. Vor diesem Hintergrund ist es nicht überraschend, dass del(13q14) als alleinige Abnormalität, im Gegensatz zu del(13q14) plus andere Aberrationen, den negativen Einfluss auf EFS und OS verloren hat. Diese Feststellung passt analog zu den Analysen bei Patienten mit CLL, bei denen del(13q) ebenfalls gehäuft nachgewiesen wurde, aber kein Einfluss auf die Prognose gefunden werden konnte [181, 182]. Weiterhin stehen unsere Ergebnisse im Einklang mit anderen aktuellen Studien, die zeigten, dass nicht del(13q14), sondern die häufig damit assoziierten Aberrationen t(4;14) und del(17p13) als einzige unabhängige Faktoren für eine kürzere Überlebenszeit nach einer Hochdosistherapie aus einer multivariaten Analyse hervorgingen. Deletion 13q als alleinige Aberration hingegen war auch in diesen Studien kein ungünstiger prognostischer Faktor mehr [87, 88].

Das bedeutsamste Ergebnis unserer Studie ist, dass die *IGH*-Translokation **t(4;14)** keinen negativen Einfluss (nicht einmal einen Trend dazu) auf CR-Rate, EFS und OS besaß. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass der negative Einfluss von t(4;14) durch die allogene SZT überwunden werden könnte. Die Translokation t(4;14) kann bei etwa 10-27% der Myelompatienten nachgewiesen werden und ist beim MM somit die häufigste Translokation unter denen, die den *IGH*-Lokus 14q32 involvieren. Sie hat die Dysregulation zweier Gene zur Folge, die auf dem Bruchpunkt 4p16 lokalisiert sind,

FGFR3 und *MMSET* (siehe 1.3.2.4.1). Neuerdings lassen sich die t(4;14)-positiven Patienten mittels „gene expression profiling“ (siehe 1.3.1.4) in zwei Gruppen mit unterschiedlicher Prognose unterteilen [183]. Nahezu alle klinischen Untersuchungen, die FISH zur Detektion von t(4;14) verwendeten, haben den negativen prognostischen Einfluss von t(4;14) sowohl nach konventioneller Chemotherapie als auch nach einer Hochdosistherapie bestätigt [87, 88, 90, 102,149-152].

Sucht man nach einer Erklärung für die verbesserte Prognose für Patienten mit t(4;14) nach einer allogenen SZT, so besitzt der sogenannte **„Graft-versus-myeloma-Effekt“** (Transplantat-gegen-Myelom-Effekt) wahrscheinlich die größte Relevanz. Dieser bei der Leukämie schon länger bekannte immunologische Effekt von Spenderlymphozyten auf die Tumorzellen des Empfängers konnte seit den neunziger Jahren auch bei Myelompatienten gezeigt werden [184-187]. Vor allem nach allogener SZT mit anschließenden Donorlymphozyteninfusionen wurde von lang anhaltenden kompletten Remissionen bei Patienten berichtet, die zuvor refraktär nach konventioneller Chemotherapie und Hochdosistherapie waren. Eine Arbeitsgruppe meinte zudem, den ungünstigen prognostischen Einfluss von del(13q14) bei den beiden untersuchten Patienten durch die allogene SZT überwunden zu haben [188]. Mittlerweile wissen wir, dass wahrscheinlich nicht die del(13q14), sondern andere, bei diesen Patienten nicht untersuchte, Aberrationen die ungünstige Prognose bedingt haben müssen. Schließt man unsere aktuellen Ergebnisse in diese Überlegungen mit ein und bedenkt den prognostischen Benefit, den die beschriebenen Patienten in der zuletzt genannten Untersuchung durch die allogene SZT erfahren haben, so könnte man vermuten, dass zusätzlich zur del(13q14) am ehesten t(4;14) vorgelegen hat. Aber dies sind natürlich nur Spekulationen, die auf einer sehr geringen Anzahl von Patienten basieren. Unsere aktuellen Resultate hingegen zeigen zum ersten Mal an einer größeren Patientenpopulation eine Prognoseverbesserung mittels Graft-versus-myeloma-Effekt, welche anhand molekularzytogenetischer Daten nachzuvollziehen ist. Laut einer Studie aus dem Jahr 2006, in der sich bei Patienten mit konventionell zytogenetisch detektierten Aberrationen nach dosisreduzierter allogener SZT keine Prognoseverbesserung zeigte, bilden Myelompatienten mit chromosomalen Veränderungen eine Entität, die sich dem Graft-versus-myeloma-Effekt entzieht [189]. Der Grund dafür sei möglicherweise eine Resistenz gegenüber immunologischen Manipulationen. Diese Untersuchung vergleicht jedoch lediglich Patienten mit und Patienten ohne zytogenetische Veränderungen. Die Beobachtungen stehen folglich nicht im Widerspruch zu unserer Hypothese, da es, wie auch in unserer Studie

beobachtet, durchaus Aberrationenen gibt, deren Träger nicht von einer allogenen SZT profitieren.

Bezüglich der pathogenetischen Bedeutung von Translokation t(4;14) innerhalb der Myelomgenese hat es in der Vergangenheit verschiedene Überlegungen gegeben. Fonseca et al. (2001) beobachteten ähnliche Häufigkeiten der t(4;14) bei MGUS/SMM und MM (10%) und stellten fest, dass bei fast allen Patienten mit t(4;14) zugleich del(13q14) vorlag, umgekehrt jedoch nicht bei allen Patienten mit del(13q14) zugleich auch t(4;14) [101]. Aus diesen Beobachtungen folgerte die Arbeitsgruppe, dass sich Deletion 13q in der Regel vor der Translokation manifestiert. Avet-Loiseau et al. (2002) detektierten zwar ebenfalls bei den meisten Patienten mit t(4;14) zugleich auch del(13q14), konnten jedoch unter den Patienten mit MGUS/SMM fast keine t(4;14) finden [91, 190]. Ähnliche Ergebnisse erhielten sie für die Translokation t(14;16). Auf diesen unterschiedlichen Befunden basierend entwickelten sie ein Modell der Myelomgenese, in dem bestimmte 14q32-Translokationen wie t(4;14) und t(14;16) mit zu den frühesten onkogenetischen Ereignissen gehören und del(13q14) ein sekundäres frühes Ereignis darstellt, dessen Entstehen von den Translokationen induziert wird. Die Ergebnisse unserer vorliegenden Studie unterstützen in dieser Hinsicht am ehesten die Hypothese von Fonseca et al. (2001). Denn, wie schon in 4.1 beschrieben, waren nicht nur die *IGH*-Translokationen, sondern auch Deletion *P53* und die *CMYC*-Überrepräsentation mit dem Auftreten von del(13q14) assoziiert, was darauf hindeutet, dass del(13q14) bei der Genese der anderen Aberrationen eine entscheidende (Vorläufer-)Rolle spielt.

Die Translokation **t(14;16)**, welche bei etwa 1-5% der Myelompatienten nachweisbar und mit einer ungünstigen Prognose nach einer Hochdosistherapie verbunden ist [88], war weder mit einer geringeren Rate an CR noch einem kürzeren EFS oder OS nach allogener SZT assoziiert. Auf Grund der geringen Anzahl von Patienten mit dieser Translokation (n=4) innerhalb unserer Studie, können aus diesen Ergebnissen jedoch keine endgültigen Schlüsse gezogen werden. Würde sich aber in weiteren Studien ein fehlender prognostischer Einfluss von t(14;16) nach allogener SZT bestätigen, so könnte man, zusammengenommen mit unseren Ergebnissen für t(4;14), daraus schließen, dass der negative prognostische Einlfuss aller *IGH*-Translokationen, sofern er vorhanden ist, durch eine allogene SZT überwunden werden kann.

Die zweithäufigste *IGH*-Translokation **t(11;14)**, die wir, ähnlich dem Durchschnitt anderer Studien, bei 14% der Patienten nachweisen konnten, hatte weder auf die

Rezidivrate noch auf das ereignisfreie oder das Gesamtüberleben nach allogener SZT einen signifikanten Einfluss. Diese Resultate stimmen mit früheren Studien überein, die in der Regel keinen Einfluss auf die Prognose nach einer Hochdosistherapie feststellen konnten [87, 88, 102]. Teilweise wurde bei Patienten mit t(11;14) und/oder Cyclin-D1-Überexpression sogar von einem signifikant längeres EFS und OS nach einer Hochdosistherapie oder „Tandem-HDT“ berichtet [152, 163, 164].

Auch die pathogenetische Bedeutung der t(11;14) innerhalb der Myelomgenese ist im Gegensatz zu der von t(4;14) und t(14;16) nach bisherigen Analysen eher geringer. Sie wurde bei allen Plasmazell-Erkrankungen von der MGUS bis zur Plasmazellleukämie mit der gleichen Häufigkeit detektiert [91], und es wurde im Vergleich zu anderen *IGH*-Translokationen die niedrigste Korrelation zum Auftreten von del(13q14) beobachtet (etwa 40%) [87, 91].

Bei Patienten mit einer **Überrepräsentation von *CMYC*** (Gen-Lokus 8q24), wie wir sie in 21% der Fälle detektieren konnten, wurde lediglich der Trend zu einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit beobachtet (15% vs 52%; *P*=0.08). Ein signifikanter Einfluss auf Rezidivrate, EFS oder OS wurde nicht festgestellt. Die Studienlage bezüglich der prognostischen Bedeutung der *CMYC*-Überrepräsentation ist sehr beschränkt. Nur in einer kleineren Studie aus dem Jahr 2001 wurde sie mittels Interphase-FISH bei 31 Patienten untersucht und in 32% der Fälle nachgewiesen. In diesen Fällen ergab sich eine signifikant kürzere ereignisfreie Überlebenszeit nach konventioneller Chemotherapie [116]. Der fehlende signifikante Einfluss in unseren Untersuchungen könnte somit darauf hinweisen, dass ein möglicher negativer prognostischer Einfluss der *CMYC*-Überrepräsentation, analog zu den Resultaten hinsichtlich t(4;14), durch die allogene SZT überwunden werden kann. Angesichts der Tatsache, dass einschließlich unserer aktuellen Studie nunmehr erst zwei Analysen zur prognostischen Bedeutung der *CMYC*-Überrepräsentation existieren (eine darunter mit nur 31 Patienten), wäre es noch zu früh, aus diesen Daten endgültige Schlüsse zu ziehen. Aus diesem Grund ist die Erhebung weiterer Daten, z. B. zur prognostischen Bedeutung der *CMYC*-Überrepräsentation nach einer Hochdosistherapie, indiziert.

Unter den **klinischen Parametern**, die im Hinblick auf eine prognostische Bedeutung nach allogener SZT analysiert wurden, kristallisierte sich das **Alter** als wichtigster Faktor heraus. Bei Patienten über 50 Jahren wurde in der univariaten Analyse eine signifikant höhere Rate an Rezidiven/Progressionen beobachtet (65% vs 45%; *P*=0.02). In einer multivariaten Analyse blieb dieser Faktor jedoch nicht als unabhängig

bestehen. Anders verhielt es sich bei der Überlebenszeit: Hier war der Faktor Alter unter 50 Jahre auch in der multivariaten Analyse mit einem signifikant besseren EFS und OS assoziiert. Dies hängt vor allem mit einer niedrigeren therapiebedingten Mortalität zusammen, welche schon in unserer letzten Studie aus dem Jahr 2004 gezeigt werden konnte [92]. Andere Untersuchungen von chromosomalen Veränderungen, in denen das Alter als prognostischer Faktor in die statistische Analyse mit einbezogen wurde, haben unterschiedliche Ergebnisse ergeben: In zwei Studien sowie in unserer vorangegangenen Untersuchung konnte weder uni- noch multivariat eine prognostische Relevanz festgestellt werden [92, 100, 152]. In zwei anderen Studien zeigte sich ein höheres Alter in der multivariaten Analyse als unabhängiger prognostischer Faktor für ein kürzeres OS nach konventioneller Chemotherapie oder Hochdosistherapie [86, 88]. Zwei weitere Studien aus den Jahren 2007 und 2008 untersuchten, inwiefern sich die Überlebensraten von Myelompatienten im Laufe der vergangenen Jahre durch die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten verändert haben. In beiden Studien kam man zu dem Ergebnis, dass sich die 5- und 10-Jahres-Überlebensraten am stärksten bei Patienten unter 50 bzw. 60 Jahren verbessert haben. Bei älteren Patienten hingegen kam es zu geringeren, bei Patienten über 70 Jahren sogar zu gar keiner Verbesserung der Überlebenszeit [191, 192]. Die TRM von 13% und ein EFS von über 60% nach 4 Jahren in unserer Studie zeigt die Notwendigkeit der weiteren Evaluation einer allogenen SZT insbesondere in der Gruppe von Patienten jünger als 50 Jahre an.

Einen signifikanten ungünstigen Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit hatte auch ein **β2-Mikroglobulin-Wert** von über 3,5 mmol/l (24% vs 55%; *P*=0.04). Da jedoch die Anzahl der Patienten mit bekanntem β2-Mikroglobulin-Wert nur 79 betrug, wurde dieser Parameter nicht in die multivariate Analyse mit eingeschlossen. Unser Ergebnis der univariaten Analyse entspricht den Resultaten vergangener Studien, welche die prognostische Bedeutung nach konventioneller Chemotherapie oder nach Hochdosistherapie evaluierten [86-88, 100, 102, 152]. In der Mehrzahl dieser Auswertungen verblieb ein erhöhter β2-Mikroglobulin-Wert auch in der multivariaten Analyse als unabhängiger prognostischer Faktor für eine kürzere Gesamtüberlebenszeit [86, 87, 100, 152]. Zudem bekräftigen unsere Ergebnisse die zentrale Rolle des β2-Mikroglobulin-Werts im International Staging System (ISS). Darin führt ein Wert von > 3,5 mmol/l zur Zuordnung zum Stadium II und somit zu einer deutlich ungünstigeren Prognose.

Zusammenfassend kommen wir zu dem Ergebnis, dass Deletion 17p13 ein signifikanter Faktor für eine geringere Rate an kompletten Remissionen, eine höhere Rezidivrate und ein kürzeres EFS bei Patienten mit Multiplem Myelom nach allogener Stammzelltransplantation ist. Der negative Einfluss von t(4;14) hingegen, welcher nach Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation beobachtet wurde, kann durch eine allogene Stammzelltransplantation überwunden werden. Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich der „Graft-versus-myeloma-Effekt“. Anhand der Ergebnisse unserer Analyse können wir zwei verschiedene prognostische Gruppen identifizieren: Patienten, die von einer allogenen SZT profitieren (Deletion 17p13 neg., t(4;14) pos., Alter < 50 Jahre, niedriger β2-Mikroglobulin-Wert) und Patienten, die von dieser Behandlungsmethode keine Verbesserung ihrer Prognose erwarten können (Deletion 17p13 pos., Alter > 50 Jahre, hoher β2-Mikroglobulin-Wert). Diese Untersuchungen können Auswirkungen auf die risikoadaptierte Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelom haben.

5 Zusammenfassung

Genetische Veränderungen gehören beim Multiplen Myelom (MM) neben β2-Mikroglobulin, Albumin und anderen zu den bedeutendsten Prognosefaktoren. Welchen Einfluss Chromosomenaberrationen nach konventionellen Therapieregimen oder nach einer Hochdosistherapie besitzen, wurde bereits vielfach untersucht. So wurde gezeigt, dass die häufigste Aberration beim MM, Deletion 13q14, als solitär auftretende Veränderung keinen Einfluss auf die Prognose hat. Sie scheint jedoch als Wegbereiter für andere Chromosomenaberrationen wie Deletion 17p13 oder *IGH*-Translokationen zu fungieren. Del(17p13) und die am häufigsten auftretende *IGH*-Translokation t(4;14) hatten in allen Untersuchungen einen ungünstigen Einfluss auf die Prognose nach einer Hochdosistherapie.

Welche prognostische Bedeutung die genetischen Veränderungen für Patienten nach einer allogenen SZT haben, die sich neben dem chemotherapeutischen auch auf den „Graft-versus-myeloma-Effekt“ stützt, wurde bisher kaum untersucht. Aus diesem Anlass analysierten wir innerhalb einer multizentrischen Studie die aus dem Knochenmark stammenden Plasmazellen von 101 Patienten mit Multiplem Myelom, um die Chromosomenaberrationen del(13q14), del(17p13), *CMYC*-Überrepräsentation, t(4;14), t(11;14), t(14;16) und t(6;14) zu detektieren. Alle Patienten hatten eine dosisreduzierte Melphalan/Fludarabin-basierte allogene KMT oder SZT erhalten. Als Untersuchungsmethode wurde die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, in der Regel kombiert mit einer cytoplasmatischen Immunglobulinfärbung zur Identifikation der Plasmazellen (cIg-FISH), verwendet.

Bei 61% der Patienten wurde del(13q14) nachgewiesen, eine *CMYC*-Überrepräsentation lag in 21% und del(17p13) in 16% der Fälle vor. Unter den *IGH*-Translokationen konnten wir t(4;14) bei 19%, t(11;14) bei 14% und t(14;16) bei 4% der Patienten detektieren. t(6;14) wurde bei keinem Patienten beobachtet, weshalb diese Aberration von weiteren Analysen ausgeschlossen wurde. Hinsichtlich Korrelationen zwischen dem Auftreten der Chromosomenveränderungen wurde eine starke Assoziation von del(13q14) zu den anderen detektierten Aberrationen gefunden, was die Vorreiterrolle von del(13q14) gegenüber weiteren genetischen Veränderungen bestätigt.

Wir analysierten alle nachgewiesenen Chromosomenaberrationen sowie klinische Parameter und Laborwerte hinsichtlich eines Einflusses auf Therapieansprechen, Therapie-bedingte Mortalität (TRM), Rezidivrate, ereignisfreies Überleben (EFS) und Gesamtüberleben (OS). Der einzige Faktor, welcher die Rate an kompletten Remissionen signifikant beeinflusste, war del(17p13) (7% vs 58%; *P*=0.001). Die TRM war nur bei Patienten mit einem Alter über 50 Jahren signifikant häufiger zu finden (33% vs 13%; *P*=0.03). Aus einer multivariaten Analyse der Rezidivraten gingen die Aberrationen del(13q14) (HR: 2.34; 95% CI: 1.06-5.15; *P*=0.03) und del(17p13) (HR: 2.24; 95% CI: 1.02-4.92; *P*=0.04) als unabhängige Faktoren für eine höhere Rezidivrate hervor. Das EFS war bei Patienten älter 50 Jahre (HR: 2.81; *P*=0.01) und bei Patienten mit del(17p13) (HR: 2.06; *P*=0.03) signifikant kürzer. Einen ungünstigen Einfluss auf das OS hatte innerhalb einer multivariaten Analyse nur der Faktor Alter über 50 Jahre (HR: 2.9; *P*=0.002). Translokation t(4;14) übte in keiner der genannten Analysen einen Einfluss auf die Prognose aus

Unseren Untersuchungen zufolge ist also Deletion 17p13 ein signifikanter Faktor für eine geringere CR-Rate, eine höhere Rezidivrate und ein kürzeres EFS bei Patienten mit Multiplem Myelom nach einer allogenen Stammzelltransplantation. Der negative Einfluss von t(4;14) hingegen, welcher nach einer Hochdosistherapie beobachtet wurde, kann durch die allogene Stammzelltransplantation überwunden werden. Diese Ergebnisse können Auswirkungen auf die risikoadaptierte Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelom haben.

6 Literaturverzeichnis

1. Kyle, R.A., *Newer approaches to the management of multiple myeloma.* Cancer, 1993. **72**(11 Suppl): p. 3489-94.
2. Riedel, D.A. and L.M. Pottern, *The epidemiology of multiple myeloma.* Hematol Oncol Clin North Am, 1992. **6**(2): p. 225-47.
3. Zahm, S.H. and A. Blair, *Cancer among migrant and seasonal farmworkers: an epidemiologic review and research agenda.* Am J Ind Med, 1993. **24**(6): p. 753-66.
4. Altieri, A., et al., *Familial risks and temporal incidence trends of multiple myeloma.* Eur J Cancer, 2006. **42**(11): p. 1661-70.
5. Klein, B. and R. Bataille, *Cytokine network in human multiple myeloma.* Hematol Oncol Clin North Am, 1992. **6**(2): p. 273-84.
6. Bataille, R., D. Chappard, and B. Klein, *Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma.* Hematol Oncol Clin North Am, 1992. **6**(2): p. 285-95.
7. Hideshima, T., et al., *Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications.* Blood, 2004. **104**(3): p. 607-18.
8. Goldschmidt, H., et al., *[Multiple myeloma. Diagnosis and therapy].* Internist (Berl), 2003. **44**(5): p. 599-600, 603-16; quiz 617-8.
9. Durie, B.G. and S.E. Salmon, *A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival.* Cancer, 1975. **36**(3): p. 842-54.
10. Durie, B.G., *The role of anatomic and functional staging in myeloma: description of Durie/Salmon plus staging system.* Eur J Cancer, 2006. **42**(11): p. 1539-43.
11. Greipp, P.R., et al., *International staging system for multiple myeloma.* J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3412-20.
12. Carrasco, D.R., et al., *High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients.* Cancer Cell, 2006. **9**(4): p. 313-25.
13. Zhan, F., et al., *The molecular classification of multiple myeloma.* Blood, 2006. **108**(6): p. 2020-8.
14. Alexanian, R. and M. Dimopoulos, *The treatment of multiple myeloma.* N Engl J Med, 1994. **330**(7): p. 484-9.
15. Barlogie, B., L. Smith, and R. Alexanian, *Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents.* N Engl J Med, 1984. **310**(21): p. 1353-6.
16. Anderson, H., et al., *VAD chemotherapy as remission induction for multiple myeloma.* Br J Cancer, 1995. **71**(2): p. 326-30.
17. Barlogie, B., et al., *Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma.* Blood, 1999. **93**(1): p. 55-65.

18. Attal, M., et al., *A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome.* N Engl J Med, 1996. **335**(2): p. 91-7.
19. Gahrton, G., et al., *Progress in allogenic 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, 2001. **113**(1): p. 209-16.
20. Garban, F., et al., *Prospective comparison of autologous stem cell transplantation followed by dose-reduced allograft (IFM99-03 trial) with tandem autologous stem cell transplantation (IFM99-04 trial) in high-risk de novo multiple myeloma.* Blood, 2006. **107**(9): p. 3474-80.
21. Bandini, A., R. Lemoli, and M. Benni, *Allogeneic transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells for multiple myeloma. A multivariable analysis of risk factors on outcome.* Bone Marrow Transplant, 1998. **21**(Suppl 1): p. 746.
22. Gahrton, G., et al., *Progress in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma.* Bone Marrow Transplant, 2000. **25**(Suppl 1): p. 140.
23. Gahrton, G., et al., *Prognostic factors in allogeneic bone marrow transplantation for multiple myeloma.* J Clin Oncol, 1995. **13**(6): p. 1312-22.
24. Bensinger, W.I., et al., *Allogeneic marrow transplantation for multiple myeloma: an analysis of risk factors on outcome.* Blood, 1996. **88**(7): p. 2787-93.
25. Alyea, E., et al., *Outcome after autologous and allogeneic stem cell transplantation for patients with multiple myeloma: Impact of graft versus myeloma effect. .* Blood, 2001. **98**(4): p. 943-939.
26. Reece, D.E., et al., *Treatment of myeloma using intensive therapy and allogeneic bone marrow transplantation.* Bone Marrow Transplant, 1993. **15**: p. 117-123.
27. Kroger, N., et al., *Myeloablative intensified conditioning regimen with in vivo 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, 2003. **31**(11): p. 973-9.
28. Badros, A., et al., *Improved outcome of allogeneic transplantation in high-risk multiple myeloma patients after nonmyeloablative conditioning.* J Clin Oncol, 2002. **20**(5): p. 1295-303.
29. Lee, C.K., et al., *Prognostic factors in allogeneic transplantation for patients with high-risk multiple myeloma after reduced intensity conditioning.* Exp Hematol, 2003. **31**(1): p. 73-80.
30. Peggs, K.S., et al., *Reduced-intensity transplantation with in vivo T-cell depletion and adjuvant dose-escalating donor lymphocyte infusions for chemotherapy-sensitive myeloma: limited efficacy of graft-versus-tumor activity.* Biol Blood Marrow Transplant, 2003. **9**(4): p. 257-65.
31. Einsele, H., et al., *Follow-up of patients with progressive multiple myeloma undergoing allografts after reduced-intensity conditioning.* Br J Haematol, 2003. **121**(3): p. 411-8.
32. Perez-Simon, J.A., et al., *Chronic but not acute graft-versus-host disease improves outcome in multiple myeloma patients after non-myeloablative allogeneic transplantation.* Br J Haematol, 2003. **121**(1): p. 104-8.

33. Kroger, N., et al., *Autologous stem cell transplantation followed by a dose-reduced allograft induces high complete remission rate in multiple myeloma.* Blood, 2002. **100**(3): p. 755-60.
34. Maloney, D.G., et al., *Allografting with nonmyeloablative conditioning following cytoreductive autografts for the treatment of patients with multiple myeloma.* Blood, 2003. **102**(9): p. 3447-54.
35. Greipp, P.R. and R.A. Kyle, *Clinical, morphological, and cell kinetic differences among multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and smoldering multiple myeloma.* Blood, 1983. **62**(1): p. 166-71.
36. Facon, T., et al., *Improved cytogenetic analysis of bone marrow plasma cells after cytokine stimulation in multiple myeloma: a report on 46 patients.* Br J Haematol, 1993. **84**(4): p. 743-5.
37. Lai, J.L., et al., *Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis.* Blood, 1995. **85**(9): p. 2490-7.
38. Weh, H.J., W. Fiedler, and D.K. Hossfeld, *Cytogenetics in multiple myeloma: are we studying the 'right' cells?* Eur J Haematol, 1990. **45**(4): p. 236-7.
39. Dewald, G.W., et al., *The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis.* Blood, 1985. **66**(2): p. 380-90.
40. Gould, J., et al., *Plasma cell karyotype in multiple myeloma.* Blood, 1988. **71**(2): p. 453-6.
41. Sawyer, J.R., et al., *Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma.* Cancer Genet Cytogenet, 1995. **82**(1): p. 41-9.
42. Rajkumar, S., et al., *Abnormal cytogenetics predict poor survival after high-dose therapy and autologous blood cell transplantation in multiple myeloma.* Bone Marrow Transplant, 1999. **24**(5): p. 497-503.
43. Weh, H.J., et al., *Karyotype in multiple myeloma and plasma cell leukaemia.* Eur J Cancer, 1993. **29A**(9): p. 1269-73.
44. Weh, H.J., et al., *Correlations between karyotype and cytologic findings in multiple myeloma.* Leukemia, 1995. **9**(12): p. 2119-22.
45. Calasanz, M.J., et al., *Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations.* Genes Chromosomes Cancer, 1997. **18**(2): p. 84-93.
46. Cigudosa, J.C., et al., *Cytogenetic data in 41 patients with multiple myeloma. Karyotype and other clinical parameters.* Cancer Genet Cytogenet, 1994. **78**(2): p. 210-3.
47. Seong, C., et al., *Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma.* Br J Haematol, 1998. **101**(1): p. 189-94.
48. Smadja, N.V., et al., *Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases.* Leukemia, 1998. **12**(6): p. 960-9.
49. Calasanz, M.J., et al., *Hypodiploidy and 22q11 rearrangements at diagnosis are associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma.* Br J Haematol, 1997. **98**(2): p. 418-25.
50. Smadja, N.V., et al., *Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma.* Blood, 2001. **98**(7): p. 2229-38.
51. Desikan, R., et al., *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, 2000. **95**(12): p. 4008-10.

52. Chiecchio, L., et al., *Deletion of chromosome 13 detected by conventional cytogenetics is a critical prognostic factor in myeloma.* Leukemia, 2006. **20**(9): p. 1610-7.
53. Tricot, G., et al., *Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities.* Blood, 1995. **86**(11): p. 4250-6.
54. Tricot, G., et al., *Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplants.* J Clin Oncol, 1997. **15**(7): p. 2659-66.
55. Fassas, A.B., et al., *Both hypodiploidy and deletion of chromosome 13 independently confer poor prognosis in multiple myeloma.* Br J Haematol, 2002. **118**(4): p. 1041-7.
56. Kallioniemi, A., et al., *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.* Science, 1992. **258**(5083): p. 818-21.
57. Cigudosa, J.C., et al., *Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization.* Blood, 1998. **91**(8): p. 3007-10.
58. Avet-Loiseau, H. and R. Bataille, *Detection of nonrandom chromosomal changes in multiple myeloma by comparative genomic hybridization.* Blood, 1998. **92**(8): p. 2997-8.
59. Liebisch, P., et al., *Value of comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization for molecular diagnostics in multiple myeloma.* Br J Haematol, 2003. **122**(2): p. 193-201.
60. Aalto, Y., et al., *Among numerous DNA copy number changes, losses of chromosome 13 are highly recurrent in plasmacytoma.* Genes Chromosomes Cancer, 1999. **25**(2): p. 104-7.
61. Gutierrez, N.C., et al., *Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma.* Blood, 2004. **104**(9): p. 2661-6.
62. Speicher, M.R., S. Gwyn Ballard, and D.C. Ward, *Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH.* Nat Genet, 1996. **12**(4): p. 368-75.
63. Schrock, E., et al., *Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes.* Science, 1996. **273**(5274): p. 494-7.
64. Sawyer, J.R., et al., *Identification of new nonrandom translocations in multiple myeloma with multicolor spectral karyotyping.* Blood, 1998. **92**(11): p. 4269-78.
65. Rao, P.H., et al., *Multicolor spectral karyotyping identifies new recurring breakpoints and translocations in multiple myeloma.* Blood, 1998. **92**(5): p. 1743-8.
66. Veldman, T., et al., *Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping.* Nat Genet, 1997. **15**(4): p. 406-10.
67. Sawyer, J.R., et al., *Multicolour spectral karyotyping identifies new translocations and a recurring pathway for chromosome loss in multiple myeloma.* Br J Haematol, 2001. **112**(1): p. 167-74.
68. Sawyer, J.R., *Multicolor spectral karyotyping in multiple myeloma.* Methods Mol Med, 2005. **113**: p. 49-58.
69. Cremer, T., et al., *Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and*

non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. Hum Genet, 1986. **74**(4): p. 346-52.

70. Le Beau, M.M., *Detecting genetic changes in human tumor cells: have scientists "gone fishing?"* Blood, 1993. **81**(8): p. 1979-83.
71. Trask, B.J., *Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping.* Trends Genet, 1991. **7**(5): p. 149-54.
72. Drach, J., et al., *Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization.* Cancer Res, 1995. **55**(17): p. 3854-9.
73. Ahmann, G.J., et al., *A novel three-color, clone-specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies.* Cancer Genet Cytogenet, 1998. **101**(1): p. 7-11.
74. Chang, H., et al., *Detection of chromosome 13q deletions and IgH translocations in patients with multiple myeloma by FISH: comparison with karyotype analysis.* Leuk Lymphoma, 2004. **45**(5): p. 965-9.
75. Dewald, G.W., et al., *Relationship of patient survival and chromosome anomalies detected in metaphase and/or interphase cells at diagnosis of myeloma.* Blood, 2005. **106**(10): p. 3553-8.
76. Solinas-Toldo, S., et al., *Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances.* Genes Chromosomes Cancer, 1997. **20**(4): p. 399-407.
77. Wendl, C., et al., *Automated screening for genomic imbalances in multiple myeloma using microarray-based comparative genomic hybridization (M-CGH).* Haematologica, 2005. **90**(Suppl 2): p. 150.
78. Shaughnessy Jr, J.D., et al., *A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1.* Blood, 2006.
79. Tassone, P., et al., *Genetics and molecular profiling of multiple myeloma: novel tools for clinical management?* Eur J Cancer, 2006. **42**(11): p. 1530-8.
80. Zhan, F., et al., *Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells.* Blood, 2002. **99**(5): p. 1745-57.
81. Fonseca, R., et al., *Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy.* Leukemia, 2001. **15**(6): p. 981-6.
82. Shaughnessy, J. and B. Barlogie, *Chromosome 13 deletion in myeloma.* Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **246**: p. 199-203.
83. Shaughnessy, J., et al., *High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH.* Blood, 2000. **96**(4): p. 1505-11.
84. Dao, D.D., et al., *Deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma.* Leukemia, 1994. **8**(8): p. 1280-4.
85. Juge-Morineau, N., et al., *High incidence of deletions but infrequent inactivation of the retinoblastoma gene in human myeloma cells.* Br J Haematol, 1995. **91**(3): p. 664-7.
86. Konigsberg, R., et al., *Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma.* J Clin Oncol, 2000. **18**(4): p. 804-12.

87. Avet-Loiseau, H., et al., *Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome.* Blood, 2007.

88. Gutierrez, N.C., et al., *Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis.* Leukemia, 2007. **21**(1): p. 143-50.

89. Schmidt-Wolf, I.G., et al., *Chromosomal aberrations in 130 patients with multiple myeloma studied by interphase FISH: diagnostic and prognostic relevance.* Cancer Genet Cytogenet, 2006. **167**(1): p. 20-5.

90. Fonseca, R., et al., *Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma.* Blood, 2003. **101**(11): p. 4569-75.

91. Avet-Loiseau, H., et al., *Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation.* Blood, 2002. **99**(6): p. 2185-91.

92. Kroger, N., et al., *Deletion of chromosome band 13q14 as detected by fluorescence in situ hybridization is a prognostic factor in patients with multiple myeloma who are receiving allogeneic dose-reduced stem cell transplantation.* Blood, 2004. **103**(11): p. 4056-61.

93. Worel, N., et al., *Deletion of chromosome 13q14 detected by fluorescence in situ hybridization has prognostic impact on survival after high-dose therapy in patients with multiple myeloma.* Ann Hematol, 2001. **80**(6): p. 345-8.

94. Facon, T., et al., *Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy.* Blood, 2001. **97**(6): p. 1566-71.

95. Zojer, N., et al., *Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization.* Blood, 2000. **95**(6): p. 1925-30.

96. Schreiber, S., et al., *Multiple myeloma with deletion of chromosome 13q is characterized by increased bone marrow neovascularization.* Br J Haematol, 2000. **110**(3): p. 605-9.

97. Fonseca, R., et al., *Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (delta13) in multiple myeloma: an eastern cooperative oncology group study.* Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 715-20.

98. Perez-Simon, J.A., et al., *Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes.* Blood, 1998. **91**(9): p. 3366-71.

99. Zhan, F., J. Sawyer, and G. Tricot, *The role of cytogenetics in myeloma.* Leukemia, 2006. **20**(9): p. 1484-6.

100. Chng, W.J., et al., *Prognostic factors for hyperdiploid-myeloma: effects of chromosome 13 deletions and IgH translocations.* Leukemia, 2006. **20**(5): p. 807-13.

101. Fonseca, R., M.M. Oken, and P.R. Greipp, *The t(4;14)(p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance.* Blood, 2001. **98**(4): p. 1271-2.

102. Gertz, M.A., et al., *Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy.* Blood, 2005. **106**(8): p. 2837-40.
103. Schultheis, B., et al., *Analysis of p73 and p53 gene deletions in multiple myeloma.* Leukemia, 1999. **13**(12): p. 2099-103.
104. Avet-Loiseau, H., et al., *P53 deletion is not a frequent event in multiple myeloma.* Br J Haematol, 1999. **106**(3): p. 717-9.
105. Liebisch, P., et al., *High incidence of trisomies 1q, 9q, and 11q in multiple myeloma: results from a comprehensive molecular cytogenetic analysis.* Leukemia, 2003. **17**(12): p. 2535-7.
106. Chang, H., et al., *p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation.* Blood, 2005. **105**(1): p. 358-60.
107. Willems, P.M., et al., *Sporadic mutations of the p53 gene in multiple myeloma and no evidence for germline mutations in three familial multiple myeloma pedigrees.* Leukemia, 1993. **7**(7): p. 986-91.
108. Drach, J., et al., *Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy.* Blood, 1998. **92**(3): p. 802-9.
109. Ackermann, J., et al., *Absence of p53 deletions in bone marrow plasma cells of patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance.* Br J Haematol, 1998. **103**(4): p. 1161-3.
110. Mazars, G.R., et al., *Mutations of the p53 gene in human myeloma cell lines.* Oncogene, 1992. **7**(5): p. 1015-8.
111. Preudhomme, C., et al., *Rare occurrence of P53 gene mutations in multiple myeloma.* Br J Haematol, 1992. **81**(3): p. 440-3.
112. Portier, M., et al., *p53 and RAS gene mutations in multiple myeloma.* Oncogene, 1992. **7**(12): p. 2539-43.
113. Neri, A., et al., *p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy.* Blood, 1993. **81**(1): p. 128-35.
114. Corradini, P., et al., *Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and Rb1, in plasma cell dyscrasias.* Leukemia, 1994. **8**(5): p. 758-67.
115. Ortega, M.M., et al., *A possible role of the P53 gene deletion as a prognostic factor in multiple myeloma.* Ann Hematol, 2003. **82**(7): p. 405-9.
116. Dierlamm, J., et al., *Incidence and prognostic significance of deletions of tumor suppressor genes and aneuploidies in multiple myeloma: an interphase FISH study.* Europ J Cancer, 2001. **37**(Suppl 6): p. 96, A346.
117. Yasuga, Y., et al., *N-ras and p53 gene mutations are very rare events in multiple myeloma.* Int J Hematol, 1995. **62**(2): p. 91-7.
118. Chang, H., et al., *Multiple myeloma involving central nervous system: high frequency of chromosome 17p13.1 (p53) deletions.* Br J Haematol, 2004. **127**(3): p. 280-4.
119. Dohner, H., et al., *p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias.* Blood, 1995. **85**(6): p. 1580-9.
120. Selvanayagam, P., et al., *Alteration and abnormal expression of the c-myc oncogene in human multiple myeloma.* Blood, 1988. **71**(1): p. 30-5.

121. Shou, Y., et al., *Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 228-33.
122. Avet-Loiseau, H., et al., *Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors.* Blood, 2001. **98**(10): p. 3082-6.
123. Bergsagel, P.L. and W.M. Kuehl, *Chromosome translocations in multiple myeloma.* Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5611-22.
124. Gabrea, A., P. Leif Bergsagel, and W. Michael Kuehl, *Distinguishing primary and secondary translocations in multiple myeloma.* DNA Repair (Amst), 2006. **5**(9-10): p. 1225-33.
125. Bergsagel, P.L., et al., *Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13931-6.
126. Bergsagel, P.L., et al., *IgH translocations in multiple myeloma: a nearly universal event that rarely involves c-myc.* Curr Top Microbiol Immunol, 1997. **224**: p. 283-7.
127. Hallek, M., P.L. Bergsagel, and K.C. Anderson, *Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process.* Blood, 1998. **91**(1): p. 3-21.
128. Greil, R., et al., *Expression of the c-myc proto-oncogene in multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia: an in situ analysis.* Blood, 1991. **78**(1): p. 180-91.
129. Paulin, F.E., et al., *Aberrant translational control of the c-myc gene in multiple myeloma.* Oncogene, 1996. **13**(3): p. 505-13.
130. Nobuyoshi, M., et al., *Increased expression of the c-myc gene may be related to the aggressive transformation of human myeloma cells.* Br J Haematol, 1991. **77**(4): p. 523-8.
131. Kuipers, J., et al., *Fluorescence in situ hybridization analysis shows the frequent occurrence of 14q32.3 rearrangements with involvement of immunoglobulin switch regions in myeloma cell lines.* Cancer Genet Cytogenet, 1999. **109**(2): p. 99-107.
132. Nishida, K., et al., *The Ig heavy chain gene is frequently involved in chromosomal translocations in multiple myeloma and plasma cell leukemia as detected by in situ hybridization.* Blood, 1997. **90**(2): p. 526-34.
133. Avet-Loiseau, H., et al., *High incidence of cryptic translocations involving the Ig heavy chain gene in multiple myeloma, as shown by fluorescence in situ hybridization.* Genes Chromosomes Cancer, 1999. **24**(1): p. 9-15.
134. Avet-Loiseau, H., et al., *High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies.* Cancer Res, 1998. **58**(24): p. 5640-5.
135. Fonseca, R., et al., *Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance.* Blood, 2002. **100**(4): p. 1417-24.
136. Chng, W.J., et al., *A validated FISH trisomy index demonstrates the hyperdiploid and nonhyperdiploid dichotomy in MGUS.* Blood, 2005. **106**(6): p. 2156-61.
137. Kaufmann, H., et al., *Both IGH translocations and chromosome 13q deletions are early events in monoclonal gammopathy of undetermined significance and do not evolve during transition to multiple myeloma.* Leukemia, 2004. **18**(11): p. 1879-82.

138. Finelli, P., et al., *Detection of t(4;14)(p16.3;q32) chromosomal translocation in multiple myeloma by double-color fluorescent in situ hybridization.* Blood, 1999. **94**(2): p. 724-32.
139. Plowright, E.E., et al., *Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis.* Blood, 2000. **95**(3): p. 992-8.
140. Li, Z., et al., *The myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 is transforming in hematopoietic cells.* Blood, 2001. **97**(8): p. 2413-9.
141. Chesi, M., et al., *Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma.* Blood, 2001. **97**(3): p. 729-36.
142. Trudel, S., et al., *The inhibitory anti-FGFR3 antibody, PRO-001, is cytotoxic to t(4;14) multiple myeloma cells.* Blood, 2006. **107**(10): p. 4039-46.
143. Chesi, M., et al., *The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts.* Blood, 1998. **92**(9): p. 3025-34.
144. Stec, I., et al., *WHSCI, a 90 kb SET domain-containing gene , expressed in early development and homologous to a Drosophila dysmorphy gene maps in the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region and is fused to IgH in t(4;14) multiple myeloma.* Hum Mol Genet, 1998. **7**: p. 1071-1082.
145. Richelda, R., et al., *A novel chromosomal translocation t(4; 14)(p16.3; q32) in multiple myeloma involves the fibroblast growth-factor receptor 3 gene.* Blood, 1997. **90**(10): p. 4062-70.
146. Chesi, M., et al., *Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3.* Nat Genet, 1997. **16**(3): p. 260-4.
147. Nakazawa, N., et al., *Interphase detection of t(4;14)(p16.3;q32.3) by in situ hybridization and FGFR3 overexpression in plasma cell malignancies.* Cancer Genet Cytogenet, 2000. **117**(2): p. 89-96.
148. Malgeri, U., et al., *Detection of t(4;14)(p16.3;q32) chromosomal translocation in multiple myeloma by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of IGH-MMSET fusion transcripts.* Cancer Res, 2000. **60**(15): p. 4058-61.
149. Cavo, M., et al., *Poor outcome with front-line autologous transplantation in t(4;14) multiple myeloma: low complete remission rate and short duration of remission.* J Clin Oncol, 2006. **24**(3): p. e4-5.
150. Keats, J.J., et al., *In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression.* Blood, 2003. **101**(4): p. 1520-9.
151. Chang, H., et al., *The t(4;14) is associated with poor prognosis in myeloma patients undergoing autologous stem cell transplant.* Br J Haematol, 2004. **125**(1): p. 64-8.
152. Moreau, P., et al., *Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy.* Blood, 2002. **100**(5): p. 1579-83.
153. Kobayashi, H., et al., *Overexpression of the PRAD1 oncogene in a patient with multiple myeloma and t(11;14)(q13;q32).* Acta Haematol, 1995. **94**(4): p. 199-203.
154. Chesi, M., et al., *Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines.* Blood, 1996. **88**(2): p. 674-81.

155. Pruneri, G., et al., *Immunohistochemical analysis of cyclin D1 shows deregulated expression in multiple myeloma with the t(11;14).* Am J Pathol, 2000. **156**(5): p. 1505-13.
156. Hoyer, J.D., et al., *The (11;14)(q13;q32) translocation in multiple myeloma. A morphologic and immunohistochemical study.* Am J Clin Pathol, 2000. **113**(6): p. 831-7.
157. Motokura, T. and A. Arnold, *Cyclin D and oncogenesis.* Curr Opin Genet Dev, 1993. **3**(1): p. 5-10.
158. Janssen, J.W., et al., *Concurrent activation of a novel putative transforming gene, myeov, and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32).* Blood, 2000. **95**(8): p. 2691-8.
159. Fonseca, R., et al., *Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients.* Blood, 2002. **99**(10): p. 3735-41.
160. Lai, J.L., et al., *Cytogenetics in multiple myeloma: a multicenter study of 24 patients with t(11;14)(q13;q32) or its variant.* Cancer Genet Cytogenet, 1998. **104**(2): p. 133-8.
161. Fonseca, R., et al., *Multiple myeloma and the translocation t(11;14)(q13;q32): a report on 13 cases.* Br J Haematol, 1998. **101**(2): p. 296-301.
162. Hoechtlen-Vollmar, W., et al., *Amplification of cyclin D1 gene in multiple myeloma: clinical and prognostic relevance.* Br J Haematol, 2000. **109**(1): p. 30-8.
163. Soverini, S., et al., *Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation.* Blood, 2003. **102**(5): p. 1588-94.
164. Cook, J.R., et al., *Immunohistochemical analysis identifies two cyclin D1+ subsets of plasma cell myeloma, each associated with favorable survival.* Am J Clin Pathol, 2006. **125**(4): p. 615-24.
165. Krummel, K.A., et al., *The common fragile site FRA16D and its associated gene WWOX are highly conserved in the mouse at Fra8E1.* Genes Chromosomes Cancer, 2002. **34**(2): p. 154-67.
166. Chesi, M., et al., *Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma.* Blood, 1998. **91**(12): p. 4457-63.
167. Iida, S., et al., *Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma.* Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 226-30.
168. Uranishi, M., et al., *Multiple myeloma oncogene 1 (MUM1)/interferon regulatory factor 4 (IRF4) upregulates monokine induced by interferon-gamma (MIG) gene expression in B-cell malignancy.* Leukemia, 2005. **19**(8): p. 1471-8.
169. Chang, C.C., et al., *Expression of MUM1/IRF4 correlates with clinical outcome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2002. **100**(13): p. 4671-5.
170. Carbone, A., et al., *Expression pattern of MUM1/IRF4 in the spectrum of pathology of Hodgkin's disease.* Br J Haematol, 2002. **117**(2): p. 366-72.
171. Yamada, M., et al., *Quantitation of multiple myeloma oncogene 1/interferon-regulatory factor 4 gene expression in malignant B-cell proliferations and normal leukocytes.* Anticancer Res, 2001. **21**(1B): p. 633-8.
172. Tsuboi, K., et al., *MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies.* Leukemia, 2000. **14**(3): p. 449-56.

173. Ito, M., et al., *MUM1/IRF4 expression is an unfavorable prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)/small lymphocytic lymphoma (SLL).* Jpn J Cancer Res, 2002. **93**(6): p. 685-94.
174. Yoshida, S., et al., *Detection of MUM1/IRF4-IgH fusion in multiple myeloma.* Leukemia, 1999. **13**(11): p. 1812-6.
175. Blade, J., et al., *Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant.* Br J Haematol, 1998. **102**(5): p. 1115-23.
176. Przepiorka, D., et al., *1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading.* Bone Marrow Transplant, 1995. **15**(6): p. 825-8.
177. Shulman, H.M., et al., *Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients.* Am J Med, 1980. **69**(2): p. 204-17.
178. Kroger, N., et al., *Relapse to prior autograft and chronic graft-versus-host disease are the strongest prognostic factors for outcome of melphalan/fludarabine-based dose-reduced allogeneic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma.* Biol Blood Marrow Transplant, 2004. **10**(10): p. 698-708.
179. Flactif, M., et al., *Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) as a powerful tool for the detection of aneuploidy in multiple myeloma.* Leukemia, 1995. **9**(12): p. 2109-14.
180. Drach, J., et al., *Deletions of the p53 gene in multiple myeloma.* Br J Haematol, 2000. **108**(4): p. 886.
181. Juliusson, G., et al., *Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities.* N Engl J Med, 1990. **323**(11): p. 720-4.
182. Dohner, H., et al., *Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of B cell chronic lymphocytic leukemia: specific chromosome aberrations identify prognostic subgroups of patients and point to loci of candidate genes.* Leukemia, 1997. **11 Suppl 2**: p. S19-24.
183. Shaughnessy, J.D., Jr., et al., *A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1.* Blood, 2007. **109**(6): p. 2276-84.
184. Verdonck, L.F., et al., *Graft-versus-myeloma effect in two cases.* Lancet, 1996. **347**(9004): p. 800-1.
185. Tricot, G., et al., *Graft-versus-myeloma effect: proof of principle.* Blood, 1996. **87**(3): p. 1196-8.
186. Mehta, J. and S. Singhal, *Graft-versus-myeloma.* Bone Marrow Transplant, 1998. **22**(9): p. 835-43.
187. Mohty, M., et al., *Graft-versus-myeloma effect following antithymocyte globulin-based reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2004. **34**(1): p. 77-84.
188. Laterveer, L., et al., *Graft versus myeloma may overcome the unfavorable effect of deletion of chromosome 13 in multiple myeloma.* Blood, 2003. **101**(3): p. 1201-2.

189. Lee, C.K., et al., *Clonal cytogenetic changes and myeloma relapse after reduced intensity conditioning allogeneic transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2006. **37**(5): p. 511-5.

190. Avet-Loiseau, H., et al., *Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome.* Blood, 1999. **94**(8): p. 2583-9.

191. Kristinsson, S.Y., et al., *Patterns of survival in multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003.* J Clin Oncol, 2007. **25**(15): p. 1993-9.

192. Brenner, H., A. Gondos, and D. Pulte, *Recent major improvement in long-term survival of younger patients with multiple myeloma.* Blood, 2008. **111**(5): p. 2521-6.

7 Patientendaten

initials	age	patsex	diagnosis	stage	isotype	del 13q14	del 17p13	CMYC	t(4:14)	t(11:14)	t(14:16)	t(6:14)
AI	54	0	01.02.2002	III A	BJ lambda	1	0					
BU	60	0	01.11.2002	II A	BJ lambda	1	0	1	0	0	1	0
BW	64	1	01.02.2001	II A	IgG kappa	0	0	0	0	0	0	0
BI	57	0	01.02.2005	III A	IgG kappa	1	0	0	0	0	0	0
BRM	47	0	01.04.2005	III A	IgG kappa	1	0	1	0	0	0	0
BE	57	0	01.08.2004	III B	IgG lambda	1	0	0	0	0	0	0
BM	36	0	01.12.2002	III B	BJ lambda	1	0	0	0		1	0
CD	49	1	01.04.2001	II A	IgG kappa	0	0	0	0	0	0	0
CK	62	1	01.07.2002	III A	IgG lambda	0	0	0	0	0	0	0
EH	57	1	01.05.2003	III A	IgA kappa	1	0	0	1			
EW	55	1	01.01.2001	III B	IgG lambda	1	1	0	0	0	0	0
FK	45	0	01.02.2003	III A	IgA lambda	1	0	1	1	0		
GJ	35	1	01.02.2004	III B	IgA lambda	1	0	0	1	0	0	0
HaB	53	0	01.10.1993	III A	BJ kappa	0	0	0	0	0	0	0
HI	54	0	01.06.1987	II A	IgG kappa	1	0	0	0	0	0	
HW	60	1	01.03.1999	III B	IgG kappa	0	0	1	0	0		0
HMG	53	0	01.07.1998	II A	IgG kappa	0	0	1	1	0		0
HL	59	1	01.12.2002	III A	IgA kappa	1	0	0	0			
HLA	68	1	01.03.2004	III A	IgG kappa	1	0	0	0			
HJ	60	1	01.05.1999	II A	IgA kappa	0	0	0	1	0	0	0
HeB	46	0	01.07.2002	II A	IgA lambda	1	0	0	1	0	0	0
HM	45	0	01.10.2003	II A	IgA lambda	1	0	0	0	0	0	0
JR	47	1	01.04.2006	II A	IgA lambda	1	0	0	0	0	0	0
KR	53	0	01.12.2003	II A	IgG lambda	0	0	0	0	0	0	0
KLB	48	0	01.09.2004	III A	IgA lambda	1	0	0	0	0	0	
KU	46	0	01.05.1999	III A	IgG kappa	0	0	0	0	0	0	0
KraA	60	0	01.01.2002	III A	IgG kappa	1	0	0	0	0		0
KroA	60	1	01.02.1998	III B	IgG kappa	0	0					
KT	41	1	01.05.2002	II A	IgA lambda	1	0	1	1	0		0
LM	60	0	01.02.2000	II A	IgG lambda	1	0	0	0	0	0	0
MH	49	1	01.10.2003	III A	BJ kappa	0	0	0	0	1	0	0
MI	53	0	01.07.2002	III A	BJ kappa	1	0					
MB	60	0	01.07.1989	III A	IgG kappa	0	0					
MD	59	1	01.07.2001	III A	IgG kappa	0	0	0	0	0	0	0
MR	38	1	01.08.2000	III A	IgA kappa	0	0	0	0	0	0	0
MT	49	1	01.05.2001	III A	IgG kappa	0	0	0	0	0	0	0
NM	60	0	01.06.2000	III A	IgA kappa	1	0	1	1	0	0	0
RJ	39	1	01.01.2002	III B	BJ lambda	1	0	0	0	1	0	0
RW	53	1	01.05.2002	III B	IgA lambda	1	0	1	0	0	0	
RC	35	1	01.06.2004	II A	IgA kappa	1	1	0	1	0	0	0
RB	55	1	01.06.2004	III A	IgG kappa	1	0	1	0	0	0	0
SC	64	1	01.11.2002	III A	IgA lambda	1	0		0			
SK	49	1	01.03.2003	III A	IgG kappa	1	1	0	1	0	0	
SD	54	1	01.12.2001	III A	IgG kappa	0	0	0	0	0	0	0
SchM	48	1	01.09.2000	III A	IgA kappa	0	0	0	0	0	0	0
SB	41	0	01.03.2002	III A	IgG lambda	1	0	1	0	0	0	0
SV	48	1	01.02.2004	III A	IgG kappa	0	0	1	0	0	0	0
SpM	28	1	01.09.2005	II A	BJ kappa	0	0		0	0	0	0
SH	62	0	01.12.1997	III B	IgG kappa	0	0			1		
SU	50	0	01.12.2004	III A	IgG lambda	1	1	1	0	0	0	0
UT	50	0	01.02.1999	III A	BJ kappa	0	0					
VW	62	1	01.12.2003	III A	IgG kappa	1	0	0	0	0	0	0
WI	51	1	01.02.1999	III B	IgA kappa	0	0	0	0	0	0	0
WT	34	1	01.03.2004	II A	IgG lambda	0	0		0	0	0	0
WieJ	57	1	01.11.2004	III A	IgG lambda	1	0	0	0	0	0	0
WitJ	50	1	01.05.2001	III A	IgA kappa	0	0	0	0	0	0	0
WV	37	1	01.11.2001	III A	IgG lambda	1	0	0	0	1	0	
HO	34	1	01.04.2002	II A	non secreting	1	1	0			0	
KG	41	0	01.09.2003	III A	IgA kappa	0	0	0	0		0	0
RB	45	1	01.03.2001	III A	IgG kappa	0	0	0			0	
AC	64	0	01.05.1981	I A	IgG lambda	1	0	1	1	0	0	0
BC	49	0	01.07.1998	II A	IgG lambda	0	0	0	0		0	
DJ	50	1	01.11.2000	III A	IgG kappa	0	0	0	0	0	0	0
FL	42	1	01.10.2001	III A	IgG kappa	1	0	0	0	0		0
MG	67	1	01.09.2003	II A	IgA kappa	1	1	0	0	0	0	0
SG	43	1	01.01.2003	III A	IgG kappa	0	0	0	0		0	0
VU	54	1	01.06.2002	III A	IgG kappa	0	0	0	0	0	0	0
WK	55	1	01.03.2001	III A	IgG kappa	1	1	0	0	0	0	0
BL	54	0	01.09.2001	III B	IgD lambda	1	1	0	0	1	0	0
BJ	60	1	01.12.2001	III A	IgG kappa	1	1	0	0	0	0	0
GJ	43	1	01.09.2000	II A	IgG lambda	1	0	1	0	1	0	
GE	53	0	20.10.2001	III A	IgG lambda	1	0	0	0	0	0	0
HR	55	1	01.12.2001	III A	IgG lambda	1	0					
HG	53	1	01.01.1997	II A	BJ kappa	1	1					
MR	44	1	01.01.2000	III A	IgG kappa	1	1	0	0	0	0	0
MH	52	1	01.12.1999	III A	IgG kappa	1	0					
NG	50	0	01.07.1997	II A	IgG kappa	0	0	0	0	0	0	0
RE	52	1	01.12.1998	II A	IgG lambda	1	0	0	1	0	0	0
SJ	57	1	01.08.1998	III A	BJ lambda	0	0	0	0	0	0	0
SB	52	0	01.03.1998	II A	IgG lambda	0	0					
AO	50	0	01.03.2001	III A	nonsecreting	1	0	1	0	0	0	
AA	53	0	01.03.2001	III A	BJ lambda	1		0	1	0	0	0
CE	63	1	01.04.2003	III B	BJ lambda	1	1	0	0	1	0	0
EL	40	1	14.04.2002	III B	BJ lambda	1	1	0	0	1	0	0
ID	59	1	27.09.2003	III B	IgG	1	0	0	1	0	0	0
KS	63	0	20.11.1997	III B	IgG kappa	1	1	0	0	0	0	0
KG	49	0	09.01.2003	III A	nonsecreting	1	0	0	0	0	0	0
MZ	56	1	01.05.2002	III A	IgG Lambda	0	0	0	0	1	0	0
MI	51	1	01.04.2002	II A	IgA	1	0	0	0	0	0	0
OV	56	1	12.11.1997	III A	BJ lambda	1	0	0	0	1	0	0
PG	62	0	12.02.2000	II A	IgG Lambda	0	0	0	0	0	0	0
PA	38	0	15.01.2004	III A	IgA Lambda	1	0	1	1	0	0	0
RN	45	0	20.12.2002	III A	BJ kappa	0	0	0	0	0	0	0
SY	52	0	01.10.2001	III A	IgA lambda	1	0	1	1	0	0	0
SP	54	0	01.02.2002	III A	IgG Lambda	1	1	0	0	0	0	0
VG	36	1	30.12.2002	III A	IgG kappa	1	0	0	0	0	1	0
BGJ	56	1	29.09.2000	III	IgG	0	0				1	
MBA	54	1	26.01.2000	III A	IgA	1	0		0	0	0	0
RIMG	51	0	15.07.2000	III	IgG	1	0					
RUZ	51	1	15.10.1999	III	IgG	0	1		0	0	0	0
TVJ	49	0	10.07.1998	III	IgG	0	0			1		

initials	any abnormality	only del 13q14	del 13q14 + del17p1	del 13q1 +CMYC tris	del 13q14+IGH transloc	del 13q14+t(4;14)	del 13q14+t(11;14)	del 13q14+t(14;16)	CMYC tris+t(4;14)
AL	1		0						
BU	1		0	1	1	0	0	1	0
BW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BI	1	1	0	0	0	0	0	0	0
BRM	1		0	1	0	0	0	0	0
BE	1	1	0	0	0	0	0	0	0
BM	1		0	0	1	0		1	0
CD	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CK	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EH	1		0	0	1	1			0
EW	1		1	0	0	0	0	0	0
FK	1		0	1	1	1	0		1
GJ	1		0	0	1	1	0	0	0
HaB	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HI	1	1	0	0	0	0	0	0	0
HW	1		0	0		0	0		0
HMG	1		0	0	1	0	0		1
HL	1		0	0		0			0
HLA	1		0	0		0			0
HJ	1		0	0	1	0	0	0	0
HeB	1		0	0	1	1	0	0	0
HM	1	1	0	0	0	0	0	0	0
JR	1	1	0	0	0	0	0	0	0
KR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KLB	1	1	0	0	0	0	0	0	0
KU	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KraA	1		0	0	0	0	0		0
KroA			0						
KT	1		0	1	1	1	0		1
LM	1	1	0	0	0	0	0	0	0
MH	1		0	0	1	0	0	0	0
MI	1		0						
MB			0						
MD	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MT	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NM	1		0	1	1	1	0	0	1
RJ	1		0	0	1	0	1	0	0
RW	1		0	1	0	0	0	0	0
RC	1		1	0	1	1	0	0	0
RB	1		0	1	0	0	0	0	0
SC	1		0			0			
SK	1		1	0	1	1	0	0	0
SD	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SchM	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SB	1		0	1	0	0	0	0	0
SV	1		0	0	0	0	0	0	0
SpM			0		0	0	0	0	
SH	1		0				0		
SU	1		1	1	0	0	0	0	0
UT			0						
VW	1	1	0	0	0	0	0	0	0
WI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WT			0		0	0	0	0	
WieJ	1	1	0	0	0	0	0	0	0
WitJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WV	1		0	0	1	0	1	0	0
HO	1		1	0				0	
KG			0	0		0		0	0
RB			0	0				0	
AC	1		0	1	1	1	0	0	1
BC			0	0		0		0	0
DJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FL	1		0	0		0	0		0
MG	1		1	0	0	0	0	0	0
SG			0	0		0		0	0
VU	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WK	1		1	0	0	0	0	0	0
BL	1		1	0	1	0	1	0	0
BJ	1		1	0	0	0	0	0	0
GJ	1		0	1	1	0	1	0	0
GE	1	1	0	0	0	0	0	0	0
HR	1		0						
HG	1		1						
MR	1		1	0	0	0	0	0	0
MH	1		0						
NG	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RE	1		0	0	1	1	0	0	0
SJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SB			0						
AO	1		0	1	0	0	0	0	0
AA	1			0	1	1	0	0	0
CE	1		1	0	1	0	1	0	0
EL	1		1	0	1	0	1	0	0
ID	1		0	0	1	1	0	0	0
KS	1		1	0	0	0	0	0	0
KG	1	1	0	0	0	0	0	0	0
MZ	1		0	0	0	0	0	0	0
MI	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OV	1		0	0	1	0	1	0	0
PG	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PA	1		0	1	1	1	0	0	1
RN	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SY	1		0	1	1	1	0	0	1
SP	1		1	0	0	0	0	0	0
VG	1		0	0	1	0	0	1	0
BGJ	1		0					0	
MBA	1		0		0	0	0	0	
RIMG	1		0						
RUZ	1		0		0	0	0	0	
TVJ	1		0				0		

initials	ß2-M (mmol/l)	CRP (mg/l)	LDH (U/l)	Calcium (mmol/l)	Creatinine (mg/dl)	Albumin (g/l)	Hb (g/dl)	LC	TC	lytic lesions	karnofsky (%)
AL	1,38	7	206	2,34	0,5	42	11,8	5,5	198	> 3	100
BU	1,7	< 5	142	2,46	0,8	45	11,8	4,6	138	0	
BW	2,3	< 5	199	2,18	0,8	42	10,3	4,9	231	1	100
BI	4,11	< 5	152	2,28	1	33	9,6	3,7	104	2	100
BRM		< 5	217	3,37	0,7	43	12,2	7,1	399	> 3	90
BE	5,48	8	181	2,55	1,5	43	10,5	7,6	303	> 3	100
BM		< 5	161	2,34	4	45	12,8	3,1	175	0	90
CD	1,5	< 5	157	2,44	1,2	42	13,6	4,9	185	1	100
CK	1,28	9	166	2,32	1	43	14	5,6	193	> 3	100
EH	3,1	13	179	2,3	0,9	44	12,6	3,9	227	3	100
EW	1,9	< 5	333	2,07	1,8	38	8,9	8,4	68	0	100
FK		< 5	315	2,37	0,9	49	12,2	5,8	218	0	90
GJ		< 5	191	2,43	0,8	43	11,9	5	175	1	100
HaB	3	18	187	2,36	0,7	37	14,1	7,8	246	> 3	100
HI	1,59	< 5	133	2,26	0,6	38	12,3	2,6	284	1	100
HW	4,31	< 5	157	2,37	1,7	44	11,9	4,9	280	2	90
HMG		8	173	2,34	1,3	36	10,6	5,3	368	0	100
HL	4	< 5	135	2,38	1,1	46	13,6	7,3	218	> 3	80
HLA	2,47	< 5	146	2,51	1	41	8,8	3	168	> 3	100
HJ	2,44	< 5	199	2,35	0,9	43	11,9	2,8	258	3	70
HeB	1,02	< 5	180	2,42	0,8	46	11,7	7,2	398	0	100
HM	6,1	6	178	1,72	1	40	13,3	8	291	0	90
JR		<5	186	2,26	0,9	44	12,4	4,3	214	0	90
KR	1,32	< 5	192	2,33	0,8	44	9,8	5,3	204	> 3	100
KLB	1,77	< 5	158	2,71	0,7	47	12,4	6,1	206	0	100
KU	3,25	10	145	2,47	0,7	44	12	4,6	257	1	90
KraA	2,58	< 5	144	2,32	0,8	44	11,4	3	191	0	100
KroA	2,43	< 5	134	2,4	0,9	36	10,7	6	254	> 3	100
KT	3,3	< 5	185	2,45	0,9	38	11,5	6,9	260	0	100
LM	2,14	< 5	209	2,3	0,8	44	11,6	7,4	224	3	100
MH	1,8	9	211	2,37	0,9	44	12,4	8,6	242	> 3	100
MI	5	< 5	190	2,29	0,5	42	12,4	2,7	181	> 3	90
MB	2,91	< 5	202	2,4	0,9	38	11,3	4,1	257	3	100
MD	2,36	18	185	2,48	0,7	35	13,5	4,7	156	3	
MR	2,31	< 5	124	2,26	0,7	42	12,7	6	218	3	100
MT	1,32	<5	143	2,1	0,7	37	12,3	5,7	213	> 3	100
NM	2,9	< 5	115	2,38	0,6	34	12,5	5,2	242	3	100
RJ	2,72	< 5	127	2,48	1,4	44	13,5	8	173	2	100
RW	3	< 5	206	2,45	1	43	13	7,1	340	1	90
RC	2,76	< 5	158	2,39	0,9	46	13,1	4,3	152	0	100
RB	5,36	7	159	2,35	1	45	10,8	3,8	82	> 3	90
SC	2,37	22	164	2,24	0,8	41	13,9	7	340	> 3	90
SK	2,17	< 5	188	2,48	0,8	42	16,8	7,1	180	0	100
SD	1,84	< 5	137	2,41	0,8	43	13,1	5,8	216	2	100
SchM	1,48	< 5	157	2,26	0,9	42	14,5	4,3	133	1	100
SB	4,4	< 5	144	2,38	0,6	46	12,8	4,8	241	0	100
SV	1,58	11	129	2,07	0,9	36	11,6	2,6	226	2	100
SpM		<5	115	2,27	1,4	48	13,7	5,2	286	0	100
SH	1,85	<5	151	2,48	0,8	34	12,7	5,3	208	> 3	100
SU	1,09	<5	182	2,4	0,7	47	11,3	9	218	> 3	90
UT	2,78	6	157	2,29	0,6	33	10,6	6,4	196	0	100
VW	2,11	< 5	189	2,33	1,1	47	11,3	4,6	109	> 3	90
WI	3,4	20	153	2,3	1,1	42	11,1	4,8	116	> 3	
WT	1,38	16	129	2,55	1	46	12,6	5,2	197	1	100
WieJ	2,13	< 5	156	2,47	0,9	41	10,7	4,4	182	> 3	80
WitJ	3,2	< 5	144	2,23	1	43	12,1	6,5	178	1	100
WV	1,57	10	157	2,27	0,9	44	12,2	2,8	218	1	100
HO	2,68	16,7	330	2,11	1,2	35	9	2,7	106	2	90
KG	2,02	<5	norm.	2,32	0,7	44				> 3	80
RB	1,32	6	norm.	2,38	1,3	46				0	90
AC	2,2	11,8	196	1,79	0,8	34	9	2,9	150	0	90
BC	2,5	6,3	247	1,88	norm.	30	9	5,8	229	1	90
DJ	1,8	1,1	norm.	norm.	norm.	norm.	12,4	6,3	132	> 3	90
FL	norm.	norm.	norm.	norm.	norm.	norm.	12,2	7,8	280	> 3	90
MG	1,5		147		1,1		13,6	3,6	163	> 3	100
SG	norm.	norm.	284	2,68	norm.	norm.	15,2	8,6	286	> 3	90
VU	1,5	< 5	199	2,4	1	45,2	12,9	3,4	63	> 3	100
WK	2,7	<5	185	2,49	1,1	41	12,2	5,8	197	> 3	90
BL	12		157	2	0,9			3,6		> 3	
BJ	2,7		178	2,1	0,6					1	
GJ	12				0,9					2	
GE	12		148	2,3	0,5	41	11,6	3,1	195	> 3	
HR	1,6		165	2,2	0,7			4,9		2	
HG	3,8		170	2	1					1	
MR	1,6		140		0,9					> 3	
MH											
NG	2,4		198		1					3	
RE	2,1										
SJ	2,4	<5	norm.	norm	norm.	norm.	11,2	7,2	182	0	
SB	2,6										
AO										> 3	
AA											
CE			390	2,47	7,6	45	11,1			0	
EL											
ID	3,1		297	2,99	3	42	8,5			> 3	
KS					2,9		6,6			0	
KG	1,9		176	2,25	0,8	42	12,4			> 3	
MZ	4,5		78	2,02	0,9	26	10			> 3	
MI										0	
OV											
PG										0	
PA	3,1		114	2,5	0,9	39	10,7			> 3	
RN	2,6		133	2,3	0,8	40	12,1			> 3	
SY											
SP	3,8		180	2,27	0,9	37	10,8			0	
VG	4,4		198	1,82	1	28	10,4			0	
BGJ											
MBA											
RIMG											
RUZ											
TVJ											

initials	number prior therap	number autoSCT	auto-allo-prtcl y/n	relapse post auto	remstat prior alloSCT	alloSCT	diagn-alloSCT days	mud/rel	HLAmatch id y/n
AL	5	1	0	1	PD	17.10.2002	261	0	1
BU	7	1	1	0	PR	13.07.2004	620	1	1
BW	11	1	0	1	PD	18.11.2004	1386	0	1
BI	7	1	0	1	PD	28.02.2006	393	0	1
BRM	5	1	1	0	PR	25.01.2006	300	0	1
BE	5	1	1	0	PR	27.04.2005	270	0	1
BM	5	1	1	0	PR	22.09.2003	295	0	1
CD	4	1	1	0	PR	15.02.2002	321	1	1
CK	3	1	0	1	PR	18.08.2004	779	0	1
EH	5	2	1	0	PR	19.12.2003	233	0	0
EW	10	1	1	1	PD	16.05.2002	501	0	1
FK	14	2	0	1	PR	07.09.2005	949	0	1
GJ	5	1	1	0	PR	30.09.2004	241	0	1
HaB	10	1	0	1	PD	27.05.2002	3159	0	1
HI	11	1	1	0	PR	08.06.2005	6578	1	1
HW	12	3	0	1	PR	05.10.2005	2409	0	1
HMG	12	1	0	1	PR	28.02.2005	2433	0	1
HL	5	1	1	0	PR	24.09.2003	298	1	1
HLA	9	1	0	1	PD	31.05.2005	457	0	0
HJ	16	1	0	1	PR	02.12.2003	1676	1	1
HeB	3	1	1	0	PR	15.12.2004	898	0	0
HM	6	1	1	0	PD	11.11.2004	407	0	1
JR	4	1	1	0	PR	06.12.2006	249	0	0
KR	5	1	1	0	PR	11.01.2005	407	0	0
KLB	5	1	1	0	PR	21.06.2005	294	1	1
KU	14	2	0	1	PR	03.06.2003	1494	0	0
KraA	6	1	1	0	PR	30.06.2005	1276	0	1
KroA	10	1	0	1	PR	24.01.2001	1088	1	1
KT	5	1	1	0	PR	03.03.2003	307	0	1
LM	9	3	0	1	PR	27.10.2005	2094	0	1
MH	5	1	1	0	PR	23.11.2004	419	0	1
MI	5	1	1	0	PR	23.04.2003	297	1	1
MB	18	1	0	1	PD	16.01.2003	4945	0	0
MD	5	1	1	0	PR	09.07.2002	374	0	1
MR	10	2	0	1	PR	05.12.2002	857	0	1
MT	5	1	1	0	PR	12.02.2002	286	1	1
NM	4	1	0	1	PD	13.06.2002	743	1	1
RJ	5	1	1	0	PR	25.09.2002	268	0	1
RW	5	1	1	0	PR	15.04.2003	350	0	1
RC	5	1	1	0	CR	10.05.2005	344	0	1
RB	5	1	1	0	PR	15.03.2005	288	0	1
SC	7	2	0	1	PR	30.12.2005	1154	0	1
SK	5	1	1	0	PR	27.11.2003	272	0	1
SD	7	1	1	0	PR	23.12.2002	388	0	1
SchM	7	1	0	1	PD	29.06.2004	1397	1	1
SB	3	1	1	0	PR	10.10.2002	224	0	1
SV	4	1	1	0	MR	12.10.2004	254	1	1
SpM	3	1	1	0	PR	06.04.2006	217	0	1
SH	7	1	0	1	PR	11.04.2002	1591	1	1
SU	5	1	1	0	PR	02.11.2006	701	0	1
UT	6	1	1	0	PR	01.08.2001	912	1	1
VW	5	1	1	0	PR	21.10.2004	325	0	1
WI	9	2	0	1	PR	04.06.2002	1219	0	1
WT	5	1	1	0	PR	07.04.2005	403	0	1
WieJ	6	1	1	0	PR	08.12.2005	403	0	1
WitJ	4	1	1	0	PR	25.06.2002	421	0	1
WV	5	1	1	0	PR	02.07.2002	244	0	0
HO	20	1	0	1	PD	12.03.2004	711	0	1
KG	6	1	0	1	PR	08.12.2004	464	1	1
RB	5	1	0	1	PD	23.04.2003	784	1	1
AC	26	2	0	1	PD	25.10.2005	8968	0	1
BC	9	2	0	1	PD	11.03.2003	1714	1	1
DJ	8	2	0	1	PR	23.12.2003	1148	0	1
FL	13	2	0	1	PR	15.09.2004	1080	0	1
MG	8	1	0	1	PR	28.10.2004	423	1	1
SG	9	1	0	0	PR	19.01.2005	749	0	1
VU	7	1	0	1	PR	01.03.2005	1004	0	1
WK	11	2	0	1	PD	01.09.2005	1645	0	1
BL	5	1	1	0	PR	26.08.2002	359	0	1
BJ	3	1	1	1	PD	17.07.2002	228	0	1
GJ	6	2	0	1	PD	22.10.2002	781	0	1
GE	3	1	1	0	PR	16.05.2002	208	0	1
HR	3	1	1	0	PR	14.10.2002	317	0	1
HG	4	1	0	1	PD	19.06.2000	1265	0	1
MR	7	2	1	1	PR	26.06.2001	542	0	1
MH	13	1	1	0	PR	25.10.2001	694	0	1
NG	8	2	1	1	PR	06.02.2001	1316	0	1
RE	6	0	1	ne	PR	20.02.2001	812	0	1
SJ	4	1	0	1	PD	26.11.1999	482	0	1
SB	10	2	0	1	PD	23.08.2001	1271	0	1
AO	7	1	0	1	PD	11.05.2005	1532	1	1
AA	2	0	0	ne	PR	23.08.2001	176	1	1
CE	5	0	0	ne	PD	12.12.2003	255	1	1
EL	3	1	0	1	PR	25.06.2003	437	0	1
ID	5	1	0	1	PD	04.11.2004	403	1	1
KS	7	1	0	1	PR	29.04.2004	2350	1	1
KG	6	1	0	1	CR	14.10.2004	643	0	1
MZ	6	0	0	ne	NC	30.01.2003	274	1	1
MI	5	1	0	1	PD	25.09.2003	542	1	1
OV	3	1	0	1	PR	03.12.2002	1846	1	1
PG	7	1	1	0	NC	18.08.2003	1282	1	1
PA	7	1	0	1	CR	20.12.2004	339	0	1
RN	7	1	0	1	PR	05.06.2005	897	1	1
SY	3	1	0	1	PR	28.02.2003	515	0	1
SP	6	1	1	0	PR	20.04.2003	443	1	1
VG	5	1	1	0	PR	02.10.2003	276	0	1
BGJ	7	1	1	0	PR	14.11.2001	411	1	1
MBA	8	1	1	0	PR	09.04.2001	439	1	1
RIMG	7	1	1	0	PR	10.04.2001	270	1	1
RUZ	9	1	0	1	PD	17.12.2001	793	1	1
TVJ	7	1	0	1	PD	27.05.2000	687	1	1

initials	donorsex	source	engrLC>1/nl day	engrTC>20/nl day	aGvHDov	cGvHD y/n	remstat post alloSCT	relapse y/n	relapse date
AL	1	PBSCT	15	22	2	0	CR	1	01.12.2004
BU	1	PBSCT	18		0	0	CR	0	
BW	1	PBSCT	15	19	1	0	PR	0	
BI	1	PBSCT	20		0	0	PR	0	
BRM	0	PBSCT	15	15	2	0	CR	0	
BE	0	PBSCT	23	45	2	0	CR	0	
BM	0	PBSCT	15		0	1	CR	0	
CD	1	PBSCT	15	15	0	0	CR	0	
CK	1	PBSCT	20	24	0	0	CR	1	27.01.2006
EH	0	PBSCT	23		1	1	CR	1	01.08.2004
EW	1	PBSCT	19	11	0	0	PR	1	01.09.2002
FK	0	PBSCT	15	18	2	0	PR	0	
GJ	1	PBSCT	18		0	1	PR	0	
HaB	0	BMT	18	26	0	0	CR	0	
HI	1	PBSCT	18		1	1	CR	0	
HW	1	PBSCT	15		0	ne	ne	ne	
HMG	0	BMT	14	21	2	ne	ne	0	
HL	1	PBSCT	16	19	2	0	CR	0	
HLA	0	PBSCT	15	14	1	0	PR	1	01.12.2006
HJ	0	PBSCT	15	16	2	1	CR	0	
HeB	1	PBSCT	17	19	2	0	CR	0	
HM	1	PBSCT	19		0	0	PR	0	
JR	0	PBSCT	28		0	ne	ne	0	
KR	1	PBSCT	17	23	0	ne	ne	0	
KLB	1	PBSCT	14	9	0	1	CR	0	
KU	1	PBSCT	15		2	0	PR	0	
KraA	0	PBSCT	22	29	0	0	CR	0	
KroA	0	PBSCT	16	33	0	0	PR	0	
KT	1	PBSCT	13	12	0	0	CR	0	
LM	1	PBSCT	17		1	0	CR	0	
MH	0	PBSCT	16	15	0	0	PR	0	
MI	1	PBSCT	14	17	0	0	CR	0	
MB	1	PBSCT	20		0	ne	ne	ne	
MD	1	PBSCT			0	ne	ne	ne	
MR	1	BMT	18		0	0	CR	0	
MT	0	PBSCT	12		0	0	CR	0	
NM	1	PBSCT	23		0	0	CR	1	01.05.2003
RJ	0	PBSCT	22		0	0	PR	1	01.03.2006
RW	1	PBSCT	15	14	0	0	CR	1	01.09.2003
RC	1	PBSCT	13	13	0	0	PR	1	01.08.2006
RB	1	PBSCT	22		0	0	CR	0	
SC	1	PBSCT	12	14	0	0	CR	1	01.06.2006
SK	1	PBSCT	12	13	2	1	CR	0	
SD	1	PBSCT	11	15	0	0	PR	1	01.11.2003
SchM	0	PBSCT	14	15	1	1	PR	0	
SB	0	PBSCT	23	24	0	0	CR	1	01.02.2004
SV	0	PBSCT	14	13	2	0	PR	0	
SpM	1	PBSCT	19		2	1	CR	0	
SH	1	PBSCT	16	20	0	0	CR	0	
SU	1	PBSCT	12	22	2	ne	ne	0	
UT	1	PBSCT	17	20	0	0	CR	0	
VW	1	PBSCT	16	17	2	0	PR	1	01.08.2005
WI	0	PBSCT			0	ne	ne	ne	
WT	1	PBSCT	14	15	0	0	CR	0	
WieJ	1	PBSCT	15	18	1	0	CR	1	01.11.2006
WitJ	1	PBSCT	15	24	0	0	PR	0	
WV	1	PBSCT	15	21	0	0	CR	1	01.05.2006
HO	1	PBSCT	28	27	0	0	PD	1	01.06.2004
KG	1	PBSCT	20	19	0	0	CR	0	
RB	1	PBSCT	21	18	0	0	PR	0	
AC	1	PBSCT	25	26	0	0	PR	0	
BC	1	PBSCT	33	18	1	1	PR	0	
DJ	1	PBSCT	29	24	0	1	CR	1	21.12.2005
FL	1	PBSCT	30	19	0	1	PR	0	
MG	0	PBSCT	30	19	0	0	PR	0	
SG	0	PBSCT	16	18	0	0	PR	0	
VU	1	PBSCT	31		4	ne	ne	0	
WK	1	PBSCT	27	25	0	0	PR	1	01.02.2006
BL	0	PBSCT	8	11	2	0	PD	0	
BJ	1	PBSCT	10	12	0	0	PR	0	
GJ	1	PBSCT	12	5	0	0	MR	1	01.03.2003
GE	0	PBSCT	5	7	0	0	CR	1	08.01.2003
HR	1	PBSCT	13	7	4	1	ne	0	
HG	1	PBSCT	13	13	0	0	PR	1	01.01.2001
MR	1	BMT	12	29	0	0	PD	1	01.02.2002
MH	0	PBSCT	13	17	2	0	PR	1	01.12.2002
NG	0	PBSCT	8	21	0	0	PR	0	
RE	0	PBSCT	15	12	1	1	PR	1	01.03.2002
SJ	1	PBSCT	6		0	1	PR	ne	
SB	0	PBSCT	17	23	1	0	CR	1	01.02.2002
AO	0	PBSCT			ne	ne	ne	ne	
AA	1	PBSCT	11	11	2	1	CR	0	
CE	1	PBSCT	16	30	0	0	NC	1	11.01.2004
EL	0	PBSCT			ne	ne	ne	ne	
ID	0	PBSCT	12	12	3	0	PR	1	15.03.2005
KS	1	PBSCT	14	13	0	0	PR	1	13.06.2004
KG	1	PBSCT	10	10	0	0	CR	1	04.05.2005
MZ	1	PBSCT	25	19		0	PR	0	
MI	1	PBSCT	13	14	2	1	CR	0	
OV	1	PBSCT	13	21	0	1	CR	1	08.10.2003
PG	1	PBSCT	27	34	4	ne	MR	0	
PA	1	PBSCT	15	16	1	0	CR	1	31.05.2005
RN	0	PBSCT	9	17	1	0	CR	1	10.01.2006
SY	1	PBSCT	10	9	1	0	CR	1	30.06.2003
SP	1	PBSCT	11	10	4	1	PR	0	
VG	1	PBSCT	12	11	0	0	PR	1	01.04.2004
BGJ	1	PBSCT	17	11	0	0	CR	1	09.11.2004
MBA	1	PBSCT	13	14	2	1	CR	0	
RIMG	1	PBSCT	16	9	2	1	PD	1	20.08.2001
RUZ	1	PBSCT	21	10	2	1	PD	1	08.05.2002
TVJ	1	PBSCT	15	8	0	0	PR	1	03.07.2001

initials	death y/n	death date	cause of death	TRM	event y/n	EFS days	OS days	follow-up days	last follow-up
AL	0			0	1	776	1551	1551	31.12.2006
BU	1	03.09.2004	multiple organ failure	1	1	52	52	932	31.01.2007
BW	0			0	0	775	775	775	31.12.2006
BI	0			0	0	305	305	305	31.12.2006
BRM	0			0	0	342	342	342	31.12.2006
BE	1	02.11.2005	fungal ecephalitis	1	1	189	189	644	31.01.2007
BM	0			0	0	832	832	832	31.12.2006
CD	0			0	0	1781	1781	1781	31.12.2006
CK	1	04.09.2006	relapse	0	1	527	716	896	31.01.2007
EH	1	23.03.2005	relapse	0	1	227	461	1138	31.01.2007
EW	1	30.10.2002	relapse	0	1	108	168	1720	31.01.2007
FK	0			0	0	480	480	480	31.12.2006
GJ	0			0	0	822	822	822	31.12.2006
HaB	0			0	0	1674	1674	1674	31.12.2006
HI	1	20.06.2006	respiratory insufficiency	1	1	377	377	602	31.01.2007
HW	1	03.12.2005	enzephalitis	1	1	59	59	482	31.01.2007
HMG	1	05.07.2005	multiple organ failure	1	1	129	129	702	31.01.2007
HL	0			0	0	1019	1193	1193	31.12.2006
HLA	0			0	1	549	589	589	10.01.2007
HJ	1	17.04.2004	pneumonia	1	1	138	138	1155	31.01.2007
HeB	0			0	0	555	748	748	31.12.2006
HM	1	27.01.2005	respiratory insufficiency	1	1	59	59	812	31.01.2007
JR	0			0	0	74	74	74	12.02.2007
KR	1	04.05.2005	GvHD	1	1	115	115	750	31.01.2007
KLB	0			0	0	558	558	558	31.12.2006
KU	0			0	0	1306	1306	1306	31.12.2006
KraA	0			0	0	549	549	549	31.12.2006
KroA	1	05.07.2001	aspergillus pneumonia	1	1	162	162	2197	31.01.2007
KT	0			0	0	1398	1398	1398	31.12.2006
LM	0			0	0	432	432	432	31.12.2006
MH	1	11.09.2005	cerebral toxoplasmosis	1	1	273	273	799	31.01.2007
MI	0			0	0	1347	1347	1347	31.12.2006
MB	1	19.02.2003	multiple organ failure	1	1	34	34	1475	31.01.2007
MD	1	25.07.2002	hypoxic brainfailure	1	1	16	16	1666	31.01.2007
MR	0			0	0	1498	1498	1498	10.01.2007
MT	0			0	0	1797	1797	1797	15.01.2007
NM	1	17.05.2005	relapse	0	1	322	1068	1692	31.01.2007
RJ	0			0	0	1560	1560	1560	03.01.2007
RW	1	28.01.2005	relapse	0	1	139	651	1386	31.01.2007
RC	0			0	0	608	608	608	08.01.2007
RB	0			0	0	656	656	656	31.12.2006
SC	0			0	1	153	376	376	10.01.2007
SK	0			0	0	1132	1132	1132	03.01.2007
SD	0			0	1	313	1470	1470	31.12.2006
SchM	0			0	0	915	915	915	31.12.2006
SB	1	08.01.2005	relapse	0	1	479	820	1573	31.01.2007
SV	0			0	0	812	812	812	31.12.2006
SpM	0			0	0	284	284	284	15.01.2007
SH	0			0	0	1724	1724	1724	31.12.2006
SU	0			0	0	102	102	102	12.02.2007
UT	0			0	0	1405	1405	1405	06.06.2005
VW	1	15.04.2006	relapse	0	1	286	543	832	31.01.2007
WI	1	29.06.2002	sepsis	1	1	25	25	1701	31.01.2007
WT	0			0	0	633	633	633	31.12.2006
WieJ	0			0	0	390	390	390	31.12.2006
WitJ	0			0	0	1649	1649	1649	31.12.2006
WV	0			0	0	1645	1645	1645	03.01.2007
HO	1	04.05.2005	relapse	0	1	81	419	1055	31.01.2007
KG	0			0	0	622	622	622	22.08.2006
RB	0			0	0	1104	1104	1104	02.05.2006
AC	0			0	0	454	454	454	31.12.2006
BC	0			0	0	1390	1390	1390	31.12.2006
DJ	0			0	1	728	1105	1105	31.12.2006
FL	0			0	0	862	862	862	25.01.2007
MG	0			0	0	805	805	805	11.01.2007
SG	0			0	0	713	713	713	31.12.2006
VU	1	24.10.2005	GvHD, sepsis	1	1	237	237	701	31.01.2007
WK	0			0	1	153	488	488	31.12.2006
BL	1	27.11.2002	multiple organ failure	1	1	93	93	1618	31.01.2007
BJ	0			0	0	1652	1652	1652	25.01.2007
GJ	1	19.05.2003	relapse	0	1	130	209	1561	31.01.2007
GE	1	02.05.2003	relapse	0	1	237	351	1720	31.01.2007
HR	1	18.03.2003	multiple organ failure	1	1	155	155	1567	31.01.2007
HG	1	26.07.2001	upper GI-bleeding	0	1	196	402	2416	31.01.2007
MR	1	07.04.2003	relapse	0	1	220	650	2044	31.01.2007
MH	1	19.04.2003	relapse	0	1	402	541	1923	31.01.2007
NG	0			0	0	2178	2178	2178	25.01.2007
RE	1	09.02.2003	relapse	0	1	375	720	2170	31.01.2007
SJ	1	13.06.2002	ne	0	1	929	929	2621	31.01.2007
SB	1	28.03.2002	relapse	0	1	162	217	1986	31.01.2007
AO	1	21.05.2005	multiple organ failure	1	1	10	10	630	31.01.2007
AA	0			0	0	1937	1937	1937	13.12.2006
CE	1	31.07.2004	progress	0	1	30	231	1145	31.01.2007
EL	1	12.07.2003	sepsis/acute renal failure	1	1	17	17	1315	31.01.2007
ID	1	24.05.2005	GvHD, sepsis	1	1	132	201	818	31.01.2007
KS	1	18.12.2004	relapse	0	1	45	233	1007	31.01.2007
KG	1	14.05.2005	sepsis	1	1	202	212	839	31.01.2007
MZ	0			0	0	1451	1451	1451	21.01.2007
MI	0			0	0	1222	1222	1222	30.01.2007
OV	1	28.12.2003	progress	0	1	309	390	1519	31.01.2007
PG	1	01.12.2003	GVHD	1	1	105	105	1261	31.01.2007
PA	1	20.04.2006	relapse	0	1	162	486	772	31.01.2007
RN	0			0	1	220	595	595	21.01.2007
SY	1	11.08.2003	progress	0	1	122	164	1432	31.01.2007
SP	1	14.09.2003	GvHD, sepsis	1	1	147	147	1381	31.01.2007
VG	1	31.01.2007	relapse	0	1	181	1216	1216	31.01.2007
BGJ	0			0	1	1090	1874	1874	31.12.2006
MBA	0			0	0	2000	2000	2000	30.09.2006
RIMG	1	04.02.2002	progress	0	1	135	298	2121	31.01.2007
RUZ	1	30.09.2002	relapse/progress	0	1	144	289	1870	31.01.2007
TVJ	1	20.01.2003	relapse/progress	0	1	402	966	2439	31.01.2007

8 Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt **Frau Dr. Georgia Schilling**. Durch ihre umfangreiche klinische und labormedizinische Erfahrung hat sie die Bereitstellung des faszinierenden Themas ermöglicht und konnte mich mit den theoretischen und praktischen Grundlagen zur Durchführung der Arbeit versorgen. Mit ihrer liebenswerten und kompetenten Betreuung, der ehrgeizigen Zielsetzung und ihrer kontinuierlichen Verfügbarkeit hat sie wesentlich zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit beigetragen.

Außerordentlich danken möchte ich auch meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Dieter Kurt Hossfeld** für seine Ratschläge insbesondere in der Anfangs- und Schlussphase der Arbeit sowie für die Bereitstellung aller zur Durchführung der Studie benötigten Mittel. Hinsichtlich der Finanzierung der Laboranalysen sei an dieser Stelle auch der Eppendorfer Krebs- und Leukämiehilfe e.V. ein besonderer Dank ausgesprochen.

Ich möchte mich darüber hinaus bei **Herrn Prof. Dr. Nicolaus Kröger** bedanken, dessen Patienten aus der Abteilung für Stammzelltransplantation im UKE den Kern meiner Arbeit bilden. Seine Erfahrung in der Durchführung von Studien und die weit verzweigten Beziehungen zu anderen Universitätskliniken waren für diese multizentrische Studie und deren Veröffentlichung von entscheidender Bedeutung.

Bei allen Mitarbeitern des ehemaligen Pavillons 29 im UKE möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und die nette Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken. Vor allem die MTAs des zytogenetischen Labors, Svenja Otterstetter, Doris Seeger und Michaela Eggers standen mir bei Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite.

Den beteiligten Mitarbeitern der Universitätskliniken von Hamburg, Dresden, Wiesbaden, Tübingen, Salamanca und Tel Hashomer möchte ich für die Kooperation beim Zusammentragen der Patientendaten danken.

Meiner Liebsten Selda danke ich sehr für ihre Zuneigung und die Mut machenden und motivierenden Worte insbesondere in der Schlussphase meiner Arbeit.

Der größte Dank gilt an dieser Stelle meinen lieben Eltern in Husum. Mit ihrer verständnisvollen und bedingungslosen Unterstützung in allen Lebenslagen haben sie es mir ermöglicht, Medizin zu studieren und diese Doktorarbeit erfolgreich abzuschließen.

9 Curriculum vitae

Timon Hansen

Persönliche Angaben

*08.12.1980 in Husum

deutsch, verheiratet

Berufliche Tätigkeit

Seit 08/2008	Assistenzarzt in der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik (Onkologie, Hämatologie und Knochenmarktransplantation mit Sektion Pneumologie), Direktor: Prof. Dr. C. Bokemeyer Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Praktisches Jahr

10/2007 - 01/2008	II. Med. Klinik, Onkologie und Hämatologie, Dr. D. Braumann Asklepios Klinik Altona
06/2007 -10/2007	Chirurgische Klinik, Dr. B. Lerf Zuger Kantonsspital, Zug (Schweiz)
02/2007- 06/2007	Klinik und Poliklinik für Neurologie, Prof. Dr. C. Gerloff Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Famulaturen

11/2006	Medizinisch-geriatrische Klinik, Prof. Dr. W. von Renteln-Kruse Zentrum für Geriatrie und Gerontologie, Albertinenhaus
09/2006	Abt. für Diagnostische Radiologie, Dr. R. Michalik-Himmelmann Klinikum Eilbek, Schönkliniken
06/2005	Abt. für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Dr. G. Melichar Asklepios Klinik Wandsbek
02/2004	II. Med. Klinik, Onkologie u. Hämatologie, Prof. Dr. D. K. Hossfeld Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Schul- und Hochschulausbildung

05/2008	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Gesamtnote: sehr gut
09/2004	Prüfung im Modellstudiengang Medizin (äquivalent Physikum) Gesamtnote: gut
10/2001 - 03/2008	Studium der Medizin, Universität Hamburg
1991 - 2000	Theodor-Storm-Gymnasium Husum, Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst/Nebentätigkeiten

03/2008 - 06/2008	Studentische Hilfskraft in der Tumorkonferenz (Protokollierung) II. Med. Klinik, Onkologie u. Hämatologie, Asklepios Klinik Altona
12/2001 - 02/2008	Studentische Hilfskraft in der Pflege und in der Zentralsterilisation Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
08/2000 - 06/2001	Zivildienst in der mobilen Altenpflege, Diakoniestation Drelsdorf

Ort, Datum, Unterschrift

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Dissertation „Einfluss genetischer Veränderungen auf die Prognose nach allogener Stammzelltransplantation beim Multiplen Myelom“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die aus den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des verwendeten Werkes kenntlich gemacht.

Außerdem versichere ich, dass ich die Dissertation bisher keinem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ort, Datum, Unterschrift

11 Veröffentlichungen

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sind bisher folgende Veröffentlichungen erschienen:

- Schilling, G., Hansen, T., Shimoni, A., Zabelina, T., Gutierrez, N. C., Bethge, W., Liebisch, P., Schwerdtfeger, R., Otterstetter, S., Penas, E. M. M., Dierlamm, J., Ayuk, F., Atanackovic, D., Bacher, U., Bokemeyer, C., Zander, A. R., San-Miguel, J., Nagler, A. and Kroger, N., *Impact of genetic abnormalities on survival after allogeneic hematopoetic stem cell transplantation in multiple myeloma.* Leukemia. 2008 Jun;22(6):1250-5.

- Hansen, T., Schilling, G., Shimoni, A., Simon-Perez, J. A., Bethge, W., Liebisch, P., Schwerdtfeger, R., Bornhaeuser, M., Otterstetter, S., Ayuk, F., Bokemeyer, C., Zander, A. R., San-Miguel, J., Nagler A., and Kroeger, N., *Translocation t(4;14) is not an adverse prognostic factor in patients with multiple myeloma undergoing allogeneic stem cell transplantation.* Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). 2007 Nov;110:4743.

- Hansen, T., Schilling, G., Liebisch, P., Schwerdtfeger, R., Perez-Simon, J. A., Bornhaeuser, M., Otterstetter, S., Dierlamm, J., Nagler, A., Hossfeld, D. K., Bokemeyer, C., Zander, A. R. and Kroger, N., *No Adverse Impact of 13q14 and P53 deletion, t(4;14)(p16;q32) or overrepresentation of CMYC (8q24) as detected by fluorescence in situ hybridization on outcome in patients with multiple myeloma following dose-reduced allogeneic stem cell transplantation.* Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). 2006 Nov;108:5038.

- Schilling, G., Hansen, T., Perez-Simon, J. A., Schwerdtfeger, R., Bornhaeuser, M., Otterstetter, S., Seeger, D., Dierlamm, J., Ayuk, F., Hossfeld, D. K., Bokemeyer, C., Zander, A. R. and Kroger, N., *Deletion of P53 as detected by fluorescence in situ hybridization is associated with significant shorter event-free survival in patients with multiple myeloma who are receiving allogeneic blood stem cell transplantation.* Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). 2005 Nov;106:4338.