Aus der Medizinischen Universitätsklinik Ulm
Klinik für Innere Medizin III
(Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie und Infektiologie)
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

MOLEKULARZYTOGENETISCHE ANALYSEN ZUR TRANSLOKATION t(14q32)-UNABHÄNGIGEN PATHOGENESE DES MULTIPLEN MYELOMS

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

vorgelegt von Daniel Scheck
aus Ulm
2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Donald Bunjes

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Möller

Tag der Promotion: 19.04.2007

ABBILDUNGEN UND TABELLEN III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IV

1 EINLEITUNG 1
1.1 Das Multiple Myelom 1
1.1.1 Definition 1
1.1.2 Klinik 1
1.1.3 Diagnosekriterien 2
1.1.4 Prognose und Therapie 3
1.2 Genetische Veränderungen beim Multiplen Myelom 4
1.2.1 Chromosomale Aberrationen – Hohe Inzidenz und Variabilität 4
1.2.2 Genetische Veränderungen und Prognose 5
1.2.3 Genetische Veränderungen und Pathogenese 6
1.3 Ziel der Arbeit 9

2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN 11
2.1 Patienten 11
2.2 Zellpräparation 11
2.3 BAC- und PAC-Präparation 13
2.4 DNA-Sonden für die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung 14
2.5 Nick-Translation 17
2.6 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung 18
2.6.1 Hybridisierung 18
2.6.2 Detektion 20
2.7 Auswertung und Dokumentation 21
2.8 Reagenzien und Chemikalien 22

3 ERGEBNISSE 25
3.1 Inzidenz chromosomaler Aberrationen 25
3.2 Definition genetischer Subgruppen 26
3.2.1 Korrelation genetischer Aberrationen 26
3.2.2 Definition dreier Subgruppen innerhalb des Gesamtkollektivs 27
3.3 Inzidenz von t(14q32), 13q- und +1q in den drei Subgruppen 28
3.3.1 Inzidenz der t(14q32) 28

3.3.2 Inzidenz von 13q-Verlusten 29
3.3.3 Inzidenz von 1q-Zugewinnen 30

4 DISKUSSION 31
4.1 Inzidenz chromosomaler Abberationen 31
4.2 Inzidenz der t(14q32) in den drei Subgruppen 33
4.3 Inzidenz der 13q-Deletion und von 1q-Zugewinnen in den Subgruppen 34

5 ZUSAMMENFASSUNG 35

6 LITERATURVERZEICHNIS 36

ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Tab. 1: Symptomatisches Multiples Myelom: Diagnosekriterien…… 2
Tab. 2: Asymptomatisches Multiples Myelom: Diagnosekriterien…….. 3
Abb. 1: Plasmazell-Ontogenese……...7
Abb. 2: Genetisches Modell der Myelompathogenese…… 8
Tab. 3: Primäre 14q32-Translokationen beim Multiplen Myelom……... 9
Abb. 3: Nachweis einer IgH-Translokation mittels FISH…….....15
Abb. 4: Kriterien zur Diagnose einer t(14q32) mittels FISH……...16
Abb. 5: Inzidenz chromosomaler Aberrationen im Gesamtkollektiv……25
Tab. 4: Korrelation der drei häufigsten Zugewinne mit der t(14q32)…….. 27
Tab. 5: Definition dreier Subgruppen anhand von 9q- und 11q-Zugewinnen….27
Abb. 6: Inzidenz der t(14q32) in den drei Subgruppen……...28
Abb. 7: Inzidenz der 13q-Verluste in den drei Subgruppen……...29
Abb. 8: Inzidenz der 1q-Zugewinne in den drei Subgruppen…… 30

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

-	Deletion
+	Trisomie
κ	Kappa
λ	Lambda
p	Kurzer Arm eines Chromosoms
q	Langer Arm eines Chromosoms
13q	Langer Arm von Chromosom 13
13q-	Deletion des langen Arms von Chromosom 13
BAC	*Bacterial Artificial Chromosome*
CGH	*Comparative Genomic Hybridization*
CRP	C-reaktives Protein
DNA	*desoxyribonucleid acid*
DNase	Desoxyribonuklease
E. coli	Escherichia coli
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
IgG, IgA IgD, IgM	Immunglobulin der Klasse G, A, D, M
IgH	Immunglobulin-Schwerkette *heavy*
IgL	Immunglobulin-Leichtkette *light*
IRS	*interspersed repetitive sequences*
LDH	Laktatdehydrogenase
MGUS	Monoklonale Gammopathie Unbestimmter Signifikanz
MM	Multiples Myelom
PAC	*P1-Artificial Chromosome*
PCL	Plasmazell-Leukämie
PCLI	*Plasma Cell Labeling Index*
t(11;14)	Translokation der Chromosomen 11 und 14
t(14q32)	Translokation der chromosomalen Bande 14q32
WHO	*World Health Organisation*

1 EINLEITUNG

1.1 Das Multiple Myelom

1.1.1 Definition

Das Multiple Myelom (MM) ist eine Tumorerkrankung, die nach der WHO-Klassifikation den malignen Lymphomen der B-Zell-Reihe zugeordnet wird. Bei der Erkrankung kommt es zur malignen Transformation einer Plasmazelle, die sich regulären Apoptose-Mechanismen entzieht und ungehemmt im Knochenmark proliferiert. Die klonale Zellpopulation produziert meist ein komplettes monoklonales Immunglobulin vom Typ IgG oder IgA, seltener IgM oder IgD („Paraprotein“) oder nur Immunglobulin-Leichtketten vom Typ κ oder λ („Bence Jonce-Protein“). In 2-3 % der Fälle liegt ein asekretorisches MM vor, das kein monoklonales Immunglobulin sezerniert. Die Inzidenz des MM steigt im Alter stark an und beträgt in Mitteleuropa altersadjustiert ca. 4/100.000. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt zwischen 60 und 70 Jahren.

1.1.2 Klinik

Die Initialsymptome der Erkrankung sind unspezifisch. Die häufigsten sind Knochenschmerzen, unter Umständen aufgrund pathologischer Frakturen, Anämiesymptome und eine erhöhte Infektanfälligkeit. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weisen etwa 80% der Patienten Knochenveränderungen auf. Die Ablagerung von Leichtketten-Amyloid („Amyloidose“) kann zu Organinsuffizienzen (Herz, Niere) führen. Seltener finden sich Symptome einer Hyperkalzämie, einer Neuropathie oder eines Hyperviskositätssyndroms.

1.1.3 Diagnosekriterien

Zur Diagnose eines MM werden heute die Kriterien der *International Myeloma Working Group* verwendet (Tabelle 1, 2; INTERNATIONAL MYELOMA WORKING GROUP, 2003). Das MM wird in ein symptomatisches, behandlungsbedürftiges MM und ein asymptomatisches („indolentes"), nicht behandlungsbedürftiges MM (früher: „*smoldering myeloma*") eingeteilt.

Tabelle 1: Symptomatisches Multiples Myelom: Diagnosekriterien

Alle drei Kriterien müssen erfüllt sein

1. Nachweis von ≥ 10% Plasmazellen im Knochenmark
   und/oder histologische Sicherung eines Plasmozytoms
2. Nachweis eines monoklonalen Proteins im Serum *und/oder* Urin [a]
3. Nachweis einer/von
   Hyperkalzämie (Ca^{2+} > obere Norm) *und/oder*
   Niereninsuffizienz (Kreatinin > 173 µmol/l) *und/oder*
   Anämie (Hb < 10 g/dl *oder* 2 g/dl < Norm) *und/oder*
   Knochenveränderungen (Osteolysen, diffuse Osteoporose) [b]

[a] Bei asekretorischem MM: Nachweis von ≥ 30% Plasmazellen im Knochenmark *und/oder* histologische Sicherung eines Plasmozytoms gefordert

[b] Bei solitärem Plasmozytom oder Osteoporose *ohne* Wirbelkörperfrakturen: > 30% Plasmazellen im Knochenmark gefordert

Tabelle 2: Asymptomatisches Multiples Myelom: Diagnosekriterien

Alle drei Kriterien müssen erfüllt sein

1. Nachweis monoklonaler Plasmazellen im Knochenmark
2. Nachweis eines monoklonalen Proteins im Serum *und/oder* Urin
3. Die Kriterien für MGUS, ossäres/extraossäres Plasmozytom *oder* symptomatisches MM sind nicht erfüllt

Bei einem monoklonalen Serumprotein von weniger als 3 g/dl, einer Plasmazellkonzentration im Knochenmark unter 10% und bei Fehlen typischer Symptome des MM liegt eine Monoklonale Gammopathie Unbestimmter Signifikanz (MGUS) vor. Die MGUS wird als Präkanzerose maligner Plasmazelltumoren verstanden. Pro Jahr entwickeln ca. 1% der Patienten mit MGUS eine maligne B-Zell-Erkrankung, meist ein MM.

1.1.4 Prognose und Therapie

Maligne Plasmazellerkrankungen zeigen einen sehr heterogenen klinischen Verlauf. Die Überlebenszeit von Patienten mit MM reicht von wenigen Monaten bis zu vielen Jahren. Das Repertoire therapeutischer Optionen hat sich vor allem in den letzten Jahren ständig erweitert. Über nahezu drei Jahrzehnte stellte die konventionell dosierte Chemotherapie mit zum Beispiel Melphalan und Prednison („Alexanian-Schema“) oder Vincristin, Adriamycin und Dexamethason (VAD) die einzige Behandlungsmöglichkeit des MM dar. Die Hochdosistherapie mit anschließender autologer oder allogener Stammzelltransplantation stellen neue, wichtige Therapieoptionen dar. Neue Substanzen wie Thalidomid und Thalidomidanaloga, Bortezomib oder Arsentrioxid befinden sich derzeit in klinischer Prüfung oder wurden bereits für die Behandlung des MM zugelassen.
Die genannten Therapiemodalitäten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Effektivität und Toxizität erheblich. Daher sind – neben Alter und Komorbidität des Patienten – prognostische Parameter für die Auswahl der Therapie von

Bedeutung. Neben dem klinischen Stadium nach SALMON und DURIE (Durie, Salmon; 1975), welches als orientierendes Maß der Tumormasse eine gewisse prognostische Bedeutung besitzt, spielen serologische Parameter eine Rolle. Eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CRP), der Laktatdehydrogenase (LDH) und vor allem des β_2-Mikroglobulins korrelieren mit einem ungünstigen Erkrankungsverlauf (FACON et al. 2001, DESIKAN et al. 2000). In Analogie zu den akuten und chronischen Leukämien, bei denen eine Reihe genetischer Veränderungen als wichtige prognostische Marker identifiziert werden konnten (DÖHNER et al. 2001, MROZEK et al. 2000), gelang in den letzten Jahren auch beim MM die Identifikation eines ersten unabhängigen genetischen Risikofaktors. So zeigt der Verlust eines Chromosoms 13 (Monosomie 13) oder eines Teils des langen Arms von Chromosom 13 (Deletion 13q-) einen äußerst ungünstigen Krankheitsverlauf an (BARLOGIE et al. 1999, FACON et al. 2001, FONSECA et al. 2002). Der Nachweis eines hypodiploiden Chromosomensatzes in der Bänderungsanalyse ist gleichfalls mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (SMADJA et al. 2001).

1.2 Genetische Veränderungen beim Multiplen Myelom

1.2.1 Chromosomale Aberrationen – Hohe Inzidenz und Variabilität

Zum Nachweis chromosomaler Aberrationen beim MM können verschiedene Techniken angewendet werden. Bedingt durch die in der Regel niedrige Proliferationsrate klonaler Plasmazellen beim MM gelingt mit der Bänderungsanalyse der Nachweis genomischer Veränderungen in nur 30-40% der Fälle (SAWYER et al. 1995, CALASANZ et al. 1997, HALLEK et al. 1998). In der Bänderungsanalyse zeigen 50% der Patienten mit informativem Karyotyp zehn oder mehr numerische oder strukturelle Veränderungen (TRICOT et al. 1997). Moderne molekularzytogenetische Methoden, wie die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) und die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH), erlauben den Nachweis genetischer Veränderungen auch in Interphasezellen. Mit Hilfe dieser Techniken gelingt der Nachweis genomischer Aberrationen bei nahezu allen Patienten mit MM (LIEBISCH et al. 2003a, 2003b). Die CGH erlaubt die

Untersuchung des gesamten Tumorzellgenoms hinsichtlich genetischer Imbalancen in einem einzigen Hybridisierungsexperiment. Jedoch können kleinere strukturelle Veränderungen (< 10 Mpb) und balancierte Aberrationen, wie etwa reziproke Translokationen, nicht nachgewiesen werden (BENTZ et al. 1998). Im Gegensatz zur CGH erlaubt die FISH den Nachweis balancierter Veränderungen und – durch das hohe Auflösungsvermögen dieser Technik – sehr kleiner genomischer Verluste und Zugewinne. Pro Hybridisierungsexperiment können jedoch nur wenige, meist zwei chromosomale Loci untersucht werden.

1.2.2 Genetische Veränderungen und Prognose

In den letzten Jahren wurde eine Reihe genetischer Veränderungen als Prognosemarker beim MM diskutiert. Im Rahmen multivariabler Analysen konnte bislang jedoch nur für 13q-Verluste sowie den hypodiploiden Karyotyp eine unabhängige prognostische Wertigkeit belegt werden.

Monosomie 13/Deletion 13q (-13/13q-)

Retrospektive Analysen belegen, dass Patienten mit -13/13q- ein signifikant schlechteres Ansprechen auf konventionelle Chemotherapie oder Hochdosistherapie und ein kürzeres ereignisfreies Überleben und Gesamtüberleben aufweisen als Patienten ohne diesen genetischen Marker. Dies gilt unabhängig von der Methode, mit welcher die Chromosom 13-Verluste nachgewiesen werden (Karyotypisierung, FISH) (TRICOT et al. 1995 und 1997, FACON et al. 2001, FONSECA et al. 2002). Mittels Bänderungsanalyse kann bei rund 15-20% der Patienten mit abnormalem Karyotyp ein Chromosom 13-Verlust nachgewiesen werden (GOULD et al. 1998, SAWYER et al. 1995 und 2001, CALASANZ et al. 1997). Mittels FISH lassen sich 13q-Deletionen in 40-50% der Fälle nachweisen (AVET-LOISEAU et al. 2002, FONSECA et al. 2003a, LIEBISCH et al. 2003b).

Hypodiploider Karyotyp

An einer Kohorte von 208 neudiagnostizierten und unvorbehandelten Patienten mit MM konnten SMADJA et al. (2001) zeigen, dass ein hypodiploider Karyotyp (<46 Chromosomen in der Bänderungsanalyse) mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Patienten mit hypodiploidem Karyotyp wiesen im Vergleich zur Gruppe der Patienten mit hyperdiploidem Karyotyp ein signifikant kürzeres mittleres Gesamtüberleben auf (33,8 Monate vs. 12,6 Monate; p<0,001).

1.2.3 Genetische Veränderungen und Pathogenese

In den letzten Jahren wurde das Verständnis von der Pathogenese klonaler Plasmazellerkrankungen durch genetische Analysen erheblich verbessert.

B-Zell-Ontogenese

Ausgangspunkt der B-Zell-Entwicklung ist die pluripotente Stammzelle des Knochenmarkes. Nach funktioneller V(D)J-Rekombination von IgH- und IgL-Genen in Prä-B-Zellen verlassen naive B-Zellen das Knochenmark. Durch Antigenkontakt entstehen Lymphoblasten, welche sich zunächst zu kurzlebigen Plasmazellen und Gedächtniszellen differenzieren. Anschließend wandern Lymphoblasten in das Keimzentrum der Lymphfollikel bzw. Follikel der lymphatischen Gewebe. Dort kommt es nach somatischer Hypermutation der IgH- und IgL-Gene zur Selektion von Zellen mit hoher Antigenaffinität. Nach dem sogenannten Isotypenwechsel (Änderungen der Funktionalität, jedoch nicht der Spezifität des von der jeweiligen Zelle gebildeten Antikörpers) kehren Plasmoblasten in das Knochenmark zurück und wandeln sich in langlebige Plasmazellen um. Zellen, welche ihre Antikörperspezifität durch somatische Hypermutation nicht optimieren können, unterliegen der Apoptose (Abbildung 1). Durch DNA-Doppelstrangbrüche im Rahmen des Isotypenwechsels und der somatischen Hypermutation, durch die eine weitreichende Antikörperdiversität gewährleistet wird, kann es zum Auftreten reziproker Translokationen kommen (KUEHL, BERGSAGEL; 2002 und dortige Referenzen).

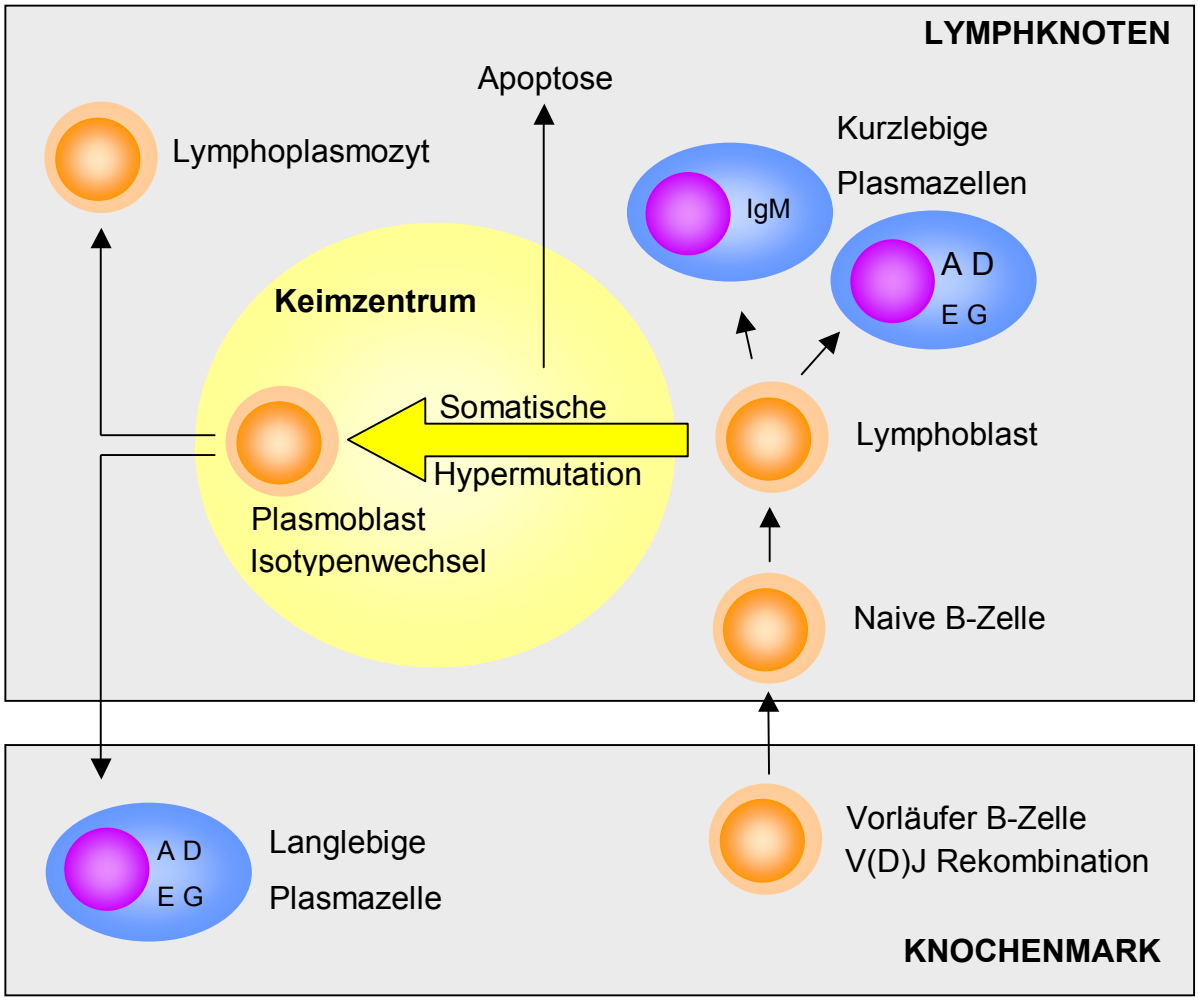

Abbildung 1: Plasmazell-Ontogenese (KUEHL, BERGSAGEL 2002; modifiziert)

Primäre und sekundäre 14q32 Translokationen

Nach einer aktuell weithin akzeptierten Modellvorstellung zur Pathogenese klonaler Plasmazellerkrankungen werden primäre und sekundäre IgH-Translokation unterschieden. Primäre Translokationen werden dabei aufgrund der hohen Inzidenz bei der MGUS als frühes und entscheidendes genetisches Ereignis im Hinblick auf die Entstehung klonaler Plasmazellerkrankungen angesehen. Mittels FISH konnte bei ca. 50-60% der Patienten mit MGUS eine primäre IgH-Translokation nachgewiesen werden. Bei Patienten mit MM lag die Inzidenz bei 55-70% (MOREAU et al. 2002, FONSECA et al. 2004). Primäre Translokationen entstehen im Rahmen der B-Zell-spezifischen DNA-Modifikation – vor allem beim Isotypenwechsel, seltener während der somatischen

Hypermutation – und haben die Dysregulation verschiedener Onkogene durch regulatorische Sequenzen des IgH-Locus („Enhancer“) zur Folge. Sekundäre Translokationen sind bei der MGUS selten nachzuweisen. Sie involvieren im Gegensatz zu primären Translokationen seltener den IgH-Locus, sind häufig unbalanciert und von komplexer Struktur. Weitere genetische Aberrationen und sekundäre Translokationen treten später im Verlauf der klonalen Expansion auf („genetische Instabilität") und tragen zur Progression der Erkrankung durch Dysregulation weiterer Onkogene oder Verluste von Tumorsuppressorgenen bei (Abbildung 2). Bei mindestens 30-45% der Patienten mit MM sind primäre IgH-Translokation nicht nachzuweisen. Dies wirft die Frage nach alternativen genetischen Veränderungen auf, welche die Immortalisierung der Plasmazelle in diesen Fällen bedingen könnten.

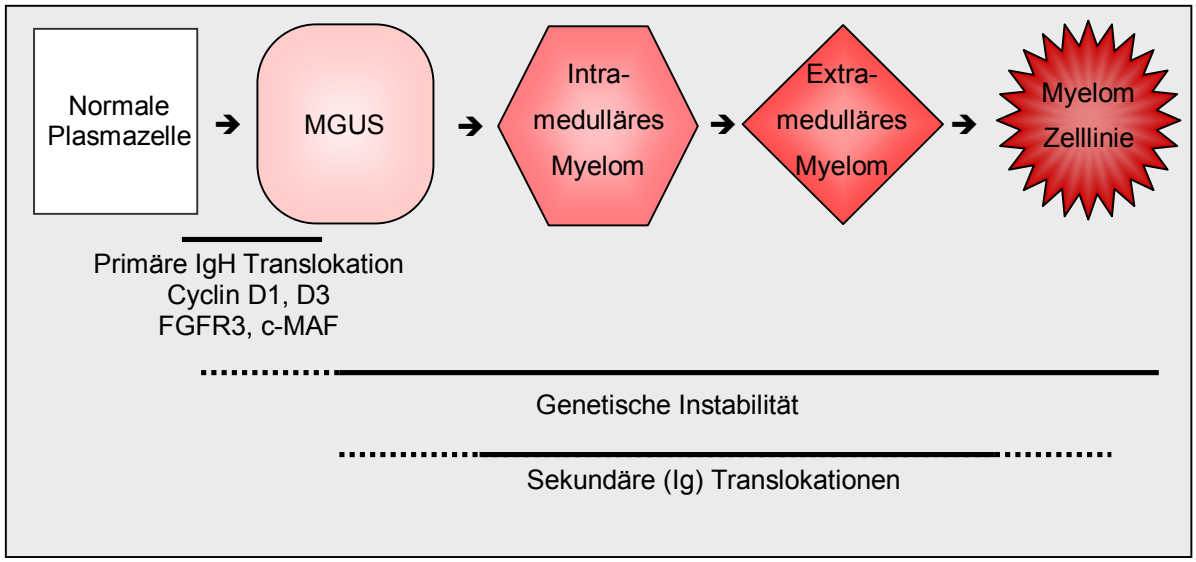

Abbildung 2: Genetisches Modell der Myelompathogenese
(KUEHL, BERGSAGEL 2002)

Im Gegensatz zu anderen B-Zell Neoplasien, die durch jeweils eine spezifische Translokation charakterisiert sind, wurden beim MM ca. 40 verschiedene Translokationspartner nachgewiesen (KUEHL, BERGSAGEL 2002 und dortige Referenzen). Die häufigen primären Translokationen beim MM sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Primäre 14q32-Translokationen beim Multiplen Myelom.

Bande	Onkogen	Inzidenz
11q13	*Cyclin D1*	~15-20%
4p16	*FGFR3/MMSET*	~15-20%
16q23	*c-MAF*	~6%
6p21	*Cyclin D3*	~4%
1q21	*MUM2/MUM3*	<5%

1.3 Ziel der Arbeit

Mit dem Ziel der Identifikation rekurrenter genomischer Imbalancen und deren kritische Regionen wurden im Labor für Zytogenetische und Molekulare Diagnostik der Medizinischen Klinik III der Universitätsklinik Ulm 46 Patienten mit MM mittels CGH analysiert (LIEBISCH et al. 2003a). Diese Methode ermöglicht die Erfassung genomweiter Zugewinne und Verluste in einem einzigen Hybridisierungsexperiment. Die häufigsten genomischen Aberrationen waren Zugewinne des Chromosoms 1q (26% der Fälle), 9q und 11q (jeweils 15%), sowie Verluste der Chromosomen 13q (37%), 6q, Xp und Xq (jeweils 15%) Auf der Grundlage dieser Ergebnisse und basierend auf publizierten Daten wurde ein myelomspezifischer DNA-Sondensatz zum Nachweis rekurrenter Zugewinne und Verluste mittels FISH generiert. Dieser umfassende DNA-Sondensatz wurde durch Sonden zum Nachweis der wichtigsten primären und sekundären 14q32-Translokationen ergänzt. Die Untersuchung einer Serie von 357 Tumoren zeigte – in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten – eine hohe Inzidenz von 13q-Verlusten (43%). Darüber hinaus fand sich jedoch auch eine hohe Inzidenz von 9q-Zugewinnen (47,2%), 11q-Zugewinnen (37,4%) und 1q-Zugewinnen (31,7%) (LIEBISCH et al. 2003b). Die hohe Inzidenz dieser drei Veränderungen lies vermuten, dass den drei chromosomalen Zugewinnen eine wichtige Rolle in der Myelompathogenese zukommen könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die biologische Relevanz dieser drei häufigen myelomassoziierten chromosomalen Zugewinne näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck sollte ein größeres Kollektiv von Patienten mit fortgeschrittenen MM mittels FISH auf Aberrationen in den chromosomalen Banden 1q21, 9q34, 11q25, 13q14 und 14q32 untersucht werden. Anschließend sollte durch Korrelation der zu erwartenden rekurrenten Aberrationen untereinander geprüft werden, ob deren Auftreten bestimmten Muster folgt oder zufällig verteilt ist.

2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten

Im Rahmen der vorgelegten Untersuchung wurden Knochenmarkproben von 108 Patienten mit Multiplem Myelom untersucht, die in der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Ulm in Behandlung waren, oder von denen Knochenmarkproben im Rahmen nationaler multizentrischer Phase-III-Therapiestudien in das Labor für Zytogenetische und Molekulare Diagnostik der Klinik eingesandt wurden. Zielsetzung der Studien ist die Evaluation neuer Hochdosis-Chemotherapieprotokolle bei Patienten im Alter bis zu 70 Jahren und Multiplem Myelom im Stadium II/III nach Salmon und Durie. Alle Patienten wurden über die geplanten molekularzytogenetischen Analysen aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Das mittlere Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt des Eingangs der Knochenmarkproben bei 55 Jahren (28 bis 68 Jahre). 40 Patienten waren weiblich (37%), 68 männlich (63%).

2.2 Zellpräparation

Unter dem Begriff der Zellpräparation werden folgende Arbeitsschritte zusammengefasst:

1. Isolierung der mononukleären Zellfraktion des Knochenmarkes
2. Anreicherung der Plasmazellen
3. Zentrifugation der mononukleären Zellfraktion auf Objektträger mittels Zytospinzentrifuge

Zur Isolierung der mononukleären Zellfraktion wurde Knochenmark (versetzt mit Natrium-Heparin im Verhältnis 1:10) mit RPMI 1640 Medium auf ein Gesamtvolumen von 20 ml verdünnt. Je 20 ml verdünntes Knochenmark wurden in einem 50 ml Plastikröhrchen (Fa. Becton Dickinson Labware, New York, USA) vorsichtig auf 20 ml Separationsmedium (Ficoll Separating Solution) überschichtet.

Danach wurde für 20 Minuten bei 2.800 U/min. ohne Bremse zentrifugiert (*Heraeus® Zentrifuge Model Minifuge T, Fa. Heraeus, Osterode, Deutschland*).
In der sogenannten Interphase, der Grenzschicht zwischen Separationsmedium und dem darüberliegenden Plasma, konnten danach die mononukleären Zellen mit einer sterilen Pipette abgenommen und in ein 50ml Plastikröhrchen überführt werden. Anschließend wurde die Zellsuspension zweimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen und zentrifugiert (10 Minuten bei 1.200 U/min.).
Mittels Zytospinzentrifuge (*Cytospin® 3 Zytozentrifuge, Shandon GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland)* wurden zwei Objektträger (Superfrost color, G. Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH&Co.KG, Braunschweig, Deutschland) mit je 0.5-$1 \cdot 10^5$ Zellen aufzentrifugiert (5 Minuten bei 400 U/min, langsame Beschleunigung). Die Zellqualität und Zelldichte der Präparate wurde unter einem Phasenkontrastmikroskop (*Axioskop, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland*) evaluiert. Angestrebt wurde eine gleichmäßige Zellverteilung ohne Überlagerungen von Zellen. Außerdem wurde morphologisch eine orientierende Bestimmung des prozentualen Anteils von Plasmazellen vorgenommen.
Bei 7 Patienten mit einer Tumorzellkonzentration von unter 10% erfolgte eine Anreicherung durch positive Selektion der Plasmazellen. Dazu wurde für je $4 \cdot 10^7$ Zellen 20 µl CD138-spezifische Microbeads (MACS® CD138 Microbeads, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) und 180 µl eines sogenannten Running Buffer (MiniMacs-Puffer, 1xPBS + 2 mM EDTA + 0.5% BSA, pH 7,2) angesetzt und bei 4°C für 15 Minuten inkubiert. Danach wurde die Probe in 1-2 ml eines Waschpuffers (sogenannter Rinsing Solution, 1xPBS + 2 mM EDTA) gewaschen und zentrifugiert (2 Minuten bei 5000 U/min). Nach Aufnahme des Pellets in 1 ml Running Buffer erfolgte die automatisierte Zellseparation (*AutoMACS®*, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) durch positive Zellselektion.
Mit der Zytospinzentrifuge wurden je 0.5-$1 \cdot 10^5$ Zellen der angereicherten Probe pro Objektträger aufzentrifugiert. Pro Patient wurden 24 bis 36 Zellpräparate erstellt. Die Zytospinpräparate wurden über Nacht luftgetrocknet und in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration (70%, 90%, 100% Ethanol, je 3 Minuten) dehydriert, luftdicht in Plastikfolie verschweißt und bei -20°C gelagert.

2.3 BAC- und PAC-Präparation

Unter dem Begriff BAC/PAC-Präparation versteht man die Klonierung von in E. coli inkorporierter Plasmid-DNA und die nachfolgende Isolierung der amplifizierten DNA. In *P1-Artificial Chromosome* (PAC)- und *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC)-Vektoren kann genomische DNA vervielfältigt werden. PAC-/BAC-Sonden zeichnen sich durch leichte Präparation und dauerhafte Stabilität aus. Außerdem ergeben sie aufgrund ihrer – im Vergleich zu YAC-Sonden *(Yeast Artificial Chromosome*) – kleineren Insert-Größe (durchschnittlich ca. 120 kb) sehr klar abgrenzbare Fluoreszenzsignale. BAC-Klone enthalten ein Resistenzgen gegen Chloramphenicol und PAC-Klone ein Resistenzgen gegen Kanamycin. Bei der Kultivierung der Klone kann nun mittels Zugabe von Chloramphenicol bzw. Kanamycin das Wachstum anderer Bakterienstämme und damit eine Kontamination von Kulturen rekombinanter E. coli-Stämme verhindert werden.

Zu Beginn der BAC/PAC-Präparation wurden die rekombinanten E. coli-Stämme auf Bakterienagar-Platten (1,5% Bakterienagar in autoklaviertem LB-Medium, Endkonzentration des Antibiotikums für BAC-Klone: Chloramphenicol 12.5 µg/ml LB-Medium; PAC-Klone: Kanamycin 25 µg/ml LB-Medium) ausgestrichen und für 24 h bei 37°C kultiviert. Für eine sogenannte Vorkultur wurden 2-5 ml LB-Medium in ein steriles 15 ml-Plastikröhrchen gefüllt. Nach dem Beimpfen mit einer einzelnen Kolonie wurde die Vorkultur für ca. 8 h bei 37°C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurden je 500 ml LB-Medium pro Kultur in sterile Erlenmeyerkolben gegeben und entsprechend des Vektortyps Kanamycin oder Chloramphenicol, sowie 6 ml des Zuckers IPTG (Isopropyl-beta-D-Thiogalactosid) zugegeben und mit einer Vorkultur beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 12-16 h auf einem Schüttelinkubator.

Zur DNA-Extraktion wurde ein sogenanntes *Plasmid Purification Kit* (*QIAGEN Maxi Kit, Qiagen® GmbH, Hilden, Deutschland)* verwendet. Die E. coli Kulturen wurden dazu in 500 ml fassende Plastikgefäße mit Schraubverschluß gefüllt und 20 Minuten bei 6.000 U/min. in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge (*JA-10 Rotor, Fa. Beckmann, München, Deutschland*) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das aus den Bakterien bestehende Pellet mit 10 ml eines

sogenannten Resuspensionspuffers[1] vollständig resuspendiert und anschließend in 30 ml Plastikgefäße pipettiert. Nach Zugabe von 10 ml Lysepuffer[2] und anschließendem vorsichtigen Mischen wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10 ml eines Neutralisationspuffers[3] zugegeben, erneut vorsichtig gemischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 12.000 U/min. und 4°C (*JS 13.1 Rotor, Fa. Beckmann, München, Deutschland*), zur Separation von Proteinen, Zelltrümmern und SDS (Sodiumdodecylsulfat). Der Überstand mit der genomischen DNA wurde abgenommen und erneut für 15 Minuten bei 12.000 U/min. und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend auf eine QIAGEN®-tip 500-Säule gegeben, die zuvor mit einem Puffer[4] äquilibriert wurde. Anschließend wurden zweimal je 30 ml Waschpuffer[5] über die Säule gegeben, um alle Verunreinigungen aus der Präparation zu entfernen. Die DNA wurde nach Zugabe des Elutionspuffers[6] in ein neues 50 ml-Plastikröhrchen eluiert. Zur DNA-Fällung wurden 10.5 ml Isopropanol in das Eluat pipettiert und dieses nach kurzem Mischen sofort 30 Minuten mit 9.500 U/min. bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 5 ml 70% Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen und erneut für 10 Minuten mit 9.500 U/min. zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und das DNA-Pellet luftgetrocknet. Nach Resuspendierung der DNA mit Aqua destillata erfolgte eine photometrische Konzentrationsmessung.

2.4 DNA-Sonden für die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung

Für den Nachweis von Imbalancen von 1q, 9q, 11q und 13q wurden die folgenden DNA-Klone eingesetzt: BAC 71-L-20 (1q21), BAC 40-A-07 (9q34), BAC 17-M-17 (11q25) und PAC 272/3 (13q14). Zum Nachweis der t(14q32) wurden zwei die Bruchpunktregion flankierenden DNA-Klone verwendet: PAC V_H (kartiert in die

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

[2] 200 mM NaOH, 1% SDS

[3] 3.0 M Kaliumacetat, pH 5.5

[4] 750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% Isopropanol; 0.15% Triton® X-100

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

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

variable Region des IgH-Locus), BAC C_H (kartiert in der konstante Region des IgH-Locus).

Für die Chromosomenarme 1q, 9q, und 11q wurde ein Zugewinn oder Verlust diagnostiziert, wenn der Anteil der untersuchten Plasmazellen mit abnormer Signalzahl (mehr oder weniger als zwei Fluoreszenzsignale) > 20% betrug. Die C_H- und V_H-Sonden flankieren die Bruchpunktregion im IgH-Locus in der Weise, dass C_H zentromernah, V_H telomernah zu liegen kommt. Die Detektion einer 14q32-Translokation erfolgt durch den Nachweis einer eindeutigen Separation eines Sondensignalpaares C_H/V_H in mindestens 20% der untersuchten Zellen (Abbildung 3).

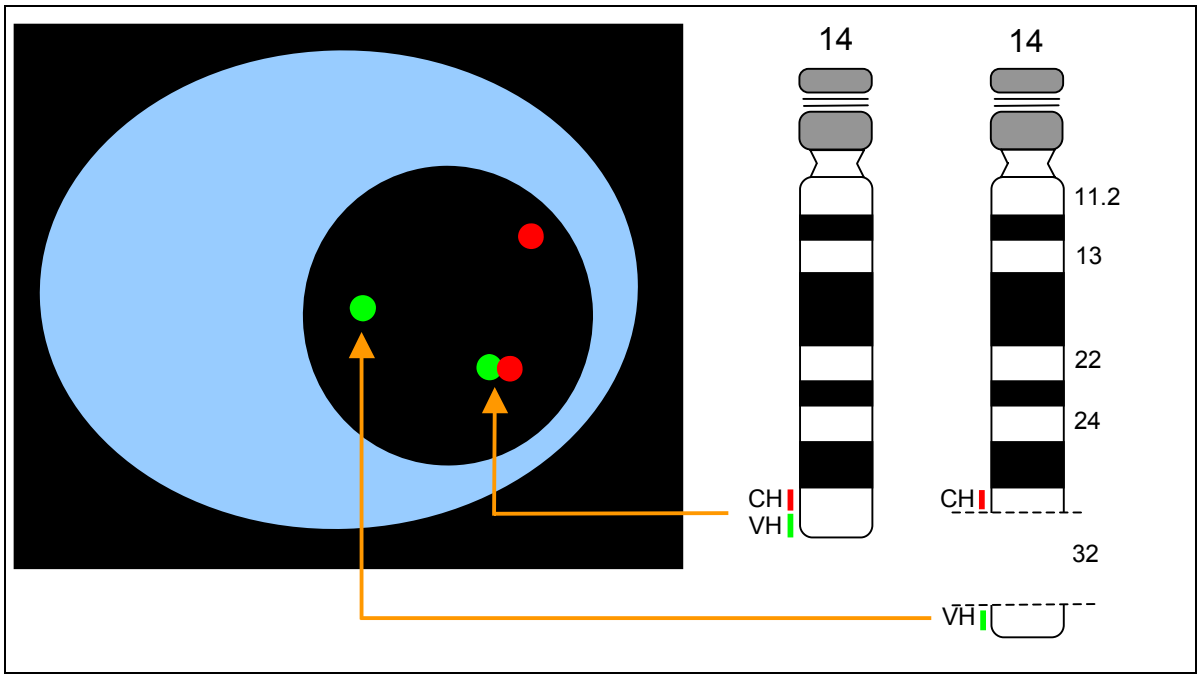

Abbildung 3: Nachweis einer IgH-Translokation mittels FISH (Schema). Die Bruchpunktregion in der Bande 14q32 wird von zwei Sonden flankiert, die durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar gemacht werden können. Beim Auftreten einer Translokation mit Bruchpunkt zwischen C_H und V_H kommt es zu einer Separation der Signale eines 14q32-Allels. Auf dem unbeeinträchtigten Chromosom 14 kolokalisieren die Signale.

Die Identifikation von Plasmazellen erfolgte mittels Immunzytologie unter Verwendung eines an den Fluoreszenzfarbstoff AMCA (7-Amino-4-Methylcoumarin-3-Essigsäure) gekoppelten Antikörpers gegen den tumorspezifischen Leichtkettentyp (Kappa- oder Lambda-Leichtkette). Zur Einschätzung der Hybridisierungseffizienz wurden neben Plasmazellen auch mononukleäre Zellen der myeloischen Zellreihe sowie erythropoetischen Vorläuferzellen bewertet.

Hybridisierungsexperimente an Zellen gesunder Probanden zeigten, dass die Fluoreszenzsignale der C_H- und V_H-Sonden im Kern unterschiedliche Distanz aufweisen können. Um eine gewisse Standardisierung der Auswertung zu erreichen, wurde der Signalabstand eines Sondenpaares einer von vier arbiträren Kategorien zugeteilt (Abbildung 4). Eine Translokation wurde angenommen, wenn mindestens 20% der Plasmazellen einen Signalabstand der Kategorie 4 aufwiesen.

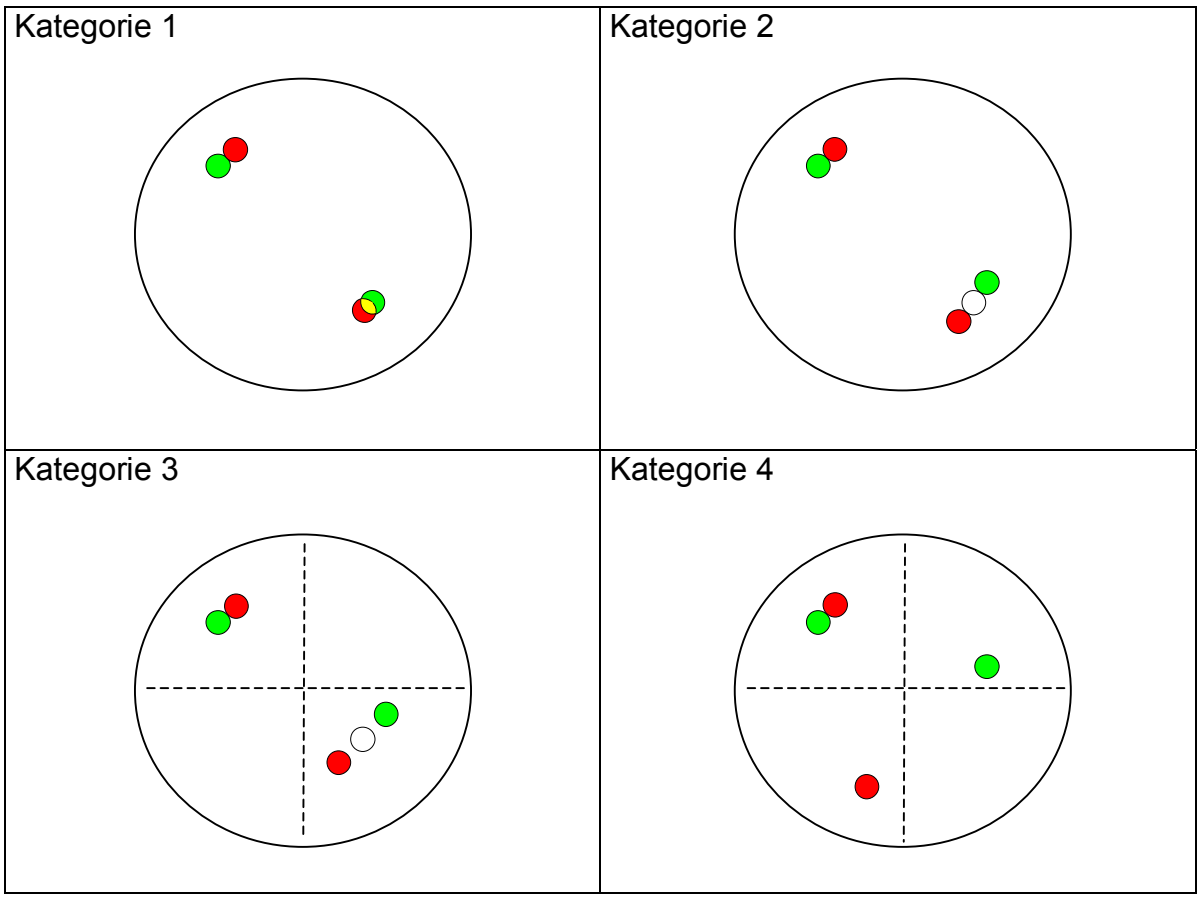

Abbildung 4: Kriterien zur Diagnose einer t(14q32) mittels FISH

2.5 Nick-Translation

Die Nick-Translation ist ein Verfahren zur spezifischen Markierung von Sonden-DNA. Durch den Einbau chemisch modifizierter Desoxyribonukleosid-Triphosphate in die DNA wird diese im Anschluss an die Hybridisierung durch Fluoreszenz-Antikörper im Interphasekern nachweisbar.

Wird DNA niedrigen Konzentrationen von DNase I ausgesetzt, so entstehen Einzelstrangbrüche (engl.: *nicks*), die durch das Enzym DNA-Polymerase I (aus E. coli) wieder geschlossen werden können. Dabei werden – den Basen des intakten DNA-Stranges komplementäre – Desoxyribonukleosid-Triphosphate unter der Abspaltung von Pyrophosphat in das Molekül integriert. Werden der DNA-Polymerase neben dATP, dGTP und dCTP auch chemisch veränderte Nukleotide wie etwa biotinyliertes oder digoxigeniertes 16-dUTP angeboten, so werden diese Reportermoleküle an den statistisch verteilten Stellen in der DNA eingebaut (LANGER et al. 1981, HEILES et al. 1988). Darüber hinaus wird die Sonden-DNA durch die DNase in kurze Fragmente geschnitten, deren Länge zwischen 200 und 500 Basenpaare betragen sollte. Durch diesen Teilverdau wird der DNA die Penetration der Kernmembran erleichtert.

Reaktionsansatz für die Nick-Translation von 3 µg DNA

3 µg	Sonden-DNA
10 µl	10x konzentrierter Puffer[7]
10 µl	β-Mercaptoethanol
10 µl	Biotin-16-UTP + ACG-Mix *oder*
	Digoxigenin-16-UTP + ACG-Mix[8]
1.5 µl	DNase-I-Stammlösung (1:500 Verdünnt)[9]
3 µl	DNA-Polymerase I aus E. coli 10^4 Units/ml

ad 100 µl Aqua distillata

[7] 0.5 Tris-HCl/ pH 8.0, 50 mM $MgCl_2$, 0.5 mg/ml Bovines Serum Albumin (BSA).

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

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

Der Reaktionsansatz wurde in 1.5 ml-Plastikröhrchen (Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten bei 15°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Überprüfung der DNA-Fragmentlänge. Ein Aliquot von 7 µl wurde mit 1 µl Bromphenol-Xylencyanol-Gemisch versetzt. Das Aliquot wurde neben einem 1 Kilobasen-Größenmarker (1 Kb DNA Ladder) auf ein Agarose-Gel (1.5%ig in 1xTAE-Puffer) aufgetragen und bei 160 Volt 45 Minuten im elektrischen Feld aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 15 Minuten mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA-Fragmente durch UV-Licht sichtbar gemacht. Durch die von der DNase unspezifisch gesetzten Strangbrüche entstanden Fragmente unterschiedlicher Länge, die auf dem Gel als Schmier sichtbar werden. Lagen Teile des Schmiers oberhalb der 500 kb-Bande des Größenmarkers, wurde ein Nachverdau mit frisch zugesetzten Enzymen durchgeführt. Hatten die DNA-Fragmente die gewünschte Länge erreicht, wurde der DNase-Verdau durch Zugabe von 2 µl 0.5M EDTA und 1 µl 10% SDS (Natriumdodecylsulfat) gestoppt und die Probe für 10 Minuten bei 65°C auf einem Heizblock belassen.
Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz durch Zentrifugation (5 Minuten bei 2.500 U/min.) über 1 ml Sephadex G 50-Säulen, die zuvor mit Säulenpuffer (10 mM Tris-HCl/pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1% SDS) äquilibriert worden waren, von überschüssigen Nukleotiden gereinigt und das Eluat bei -20°C aufbewahrt.

2.6 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung

2.6.1 Hybridisierung

Die Hybridisierungsexperimente wurden als Chromosomale-In-Situ-Suppressions (CISS)-Hybridisierungen durchgeführt (CREMER et al. 1988, LICHTER et al. 1988). Diese Form der in-situ Hybridisierung erlaubte den Gebrauch von Sonden-DNA, die hochrepetitive Sequenzen – wie beispielsweise die der Alu-Familie – enthält. Diese Sequenzen – *interspersed repetitive sequenzes (IRS)* genannt – müssen durch Zugabe von humaner Cot-1 DNA aus Plazentagewebe, die gleichfalls hochrepetitive Sequenzen enthält, supprimiert werden, um unspezifische Bindungen der DNA-Sonden zu verhindern. Während des als *Preannealing* bezeichneten Teilschrittes des Experimentes wird der denaturierten Cot-1 DNA

erlaubt, sich an die hochrepetitiven Sequenzen der gleichfalls einzelsträngig vorliegenden Sonden-DNA zu binden. Dies geschieht aufgrund der geringen Komplexität und der Häufigkeit der hochrepetitiven Sequenzen rasch. Erst nach Abschluss des *Preannealing* nach wenigen Minuten wird die Sonden-DNA auf den Objektträger aufgetragen und diese bei 37°C für mehrere Stunden inkubiert. Während dieser Zeit können dann die komplexen Einzelsequenzen an ihre komplementären Zielsequenzen binden.

Vorbereitung der Sonden-DNA

Je 200 µg einer biotinylierten und einer digoxigenierten DNA-Sonde wurden in einem 1.5 ml Plastikgefäß (Eppendorf) mit 10 µg Cot-1 DNA und 1 µg Lachssperma-DNA als Träger gemischt. Des weiteren wurden 3 M Natriumacetat/pH 5.2 (1/20 des DNA-Volumens) und bei -20°C aufbewahrtes 100%iges Ethanol (2.5faches des DNA-Volumens) zugegeben und der Ansatz anschließend für 30 Minuten bei -80°C gefällt. Danach wurde 15 Minuten bei 13.000 U/min. und 4°C zentrifugiert (*Biofuge fresca, Fa. Heraeus, Osterode, Deutschland)* der Überstand dekantiert und das Pellet mit 400 µl 70%igem, 4°C kaltem Ethanol für 15 Minuten bei 13.000 U/min. gewaschen. Anschließend wurde der Überstand komplett abpipettiert und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge (*Speed Vac Concentrator, Savant Instruments, Hicksvill, USA)* getrocknet. Durch Zugabe von 5 µl deionisiertem Formamid und 15 minütigem Schütteln bei Raumtemperatur und Zugabe von 5 µl Hybridisierungspuffer [4xSSC (saline & sodium citrat), 20% Dextransulfat] und erneutem Schütteln für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Pellet resuspendiert. Im Anschluss wurde die DNA auf einem Heizblock denaturiert (6 Minuten bei 75°C) und danach 8 Minuten zum *Preannealing* auf einem 37°C warmen Heizblock belassen.

Vorbereitung der Patienten-DNA

Parallel zur Bearbeitung der Sonden-DNA wurde das Zytospinpräparat für die Hybridisierung vorbereitet: der bei -20°C aufbewahrte Objektträger wurde vorsichtig aufgetaut und erwärmt (je 30 Minuten bei 4°C, Raumtemperatur, 37°C und 60°C). Anschließend wurde der Objektträger für 3 Minuten mit Pepsin

behandelt (2ml Pepsin [1 mg/ml] in 98 ml 0.01N HCl bei 37°C), um das Zytoplasma und den Zellkern der Plasmazellen für die DNA-Sonden durchlässiger zu machen. Es folgte ein Waschschritt mit 1xPBS (*phosphate buffered saline*) bei Raumtemperatur für 5 Minuten, bevor mit 1%iger Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert wurde. Nach einem weiteren Waschschritt (1xPBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur), wurde der Objektträger durch Dehydrieren in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%, je 5 Minuten bei Raumtemperatur) und anschließendem Erwärmen in einem Ofen (10 Minuten bei 60°C) für die Denaturierung vorbereitet. Die Denaturierung selbst fand in deionisiertem Formamid (70%ig in 2xSSC/pH 7.0) für exakt 4 Minuten bei 72°C statt. Im Anschluss wurde der Objektträger in einer Alkoholreihe auf Eis erneut dehydriert und danach 1 Minute auf einem 37°C warmen Heizblock getrocknet.

Hybridisierung

Schließlich wurde die Sonden-DNA luftblasenfrei auf das Hybridisierungsareal des Objektträgers aufgetragen, mit einem 18x18 mm großen Deckglas bedeckt und die Ränder des Deckglases mit Klebstoff (*Fixogum Rubber Cement*) abgedichtet. Zur Inkubation bei 37°C wurde das Präparat über Nacht (mind. 12 h) in einer feuchten Hybridisierungskammer belassen.

2.6.2 Detektion

Der Hybridiserungsnachweis erfolgt mittels eines Pipettier-Roboters (Tecan RSP Genesis mit Gemini Pipettier-Software, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland). Dazu wurde nach Entfernen des Klebstoffes und des Deckglases der Objektträger mit Abstandshalter und Deckglas in das Gerät eingespannt.
Zuerst erfolgten Waschschritte mit Formamid (50%ig in 2xSSC/pH 7.0; 200 µl 3x5 Minuten bei Raumtemperatur) und in 0.5xSSC (200 µl 3x5 Minuten bei Raumtemperatur). Es folgte dann das sogenannte *Blocking:* Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der DNA-Sonden an Proteine wurde der Objektträger mit 200 µl 3%igem Bovinen Serumalbumin (BSA) in 4xSSC für 30 Minuten bei Raumtemperatur überschichtet. Die eigentliche Detektion erfolgte anschließend

mit antikörpergekoppelten Fluorochromen, die verdünnt (6 µl Anti-Digoxigenin-Fluorescein bzw. 1 µl Streptavidin-Cy3 in 200 µl 1.5%iges BSA / 4xSSC) wie die Blocking-Lösung ebenfalls für 30 Minuten bei Raumtemperatur überschichtet wurde. Durch Waschen mit 200 µl 4xSSC/0.1% Tween 20 (3x5 Minuten bei Raumtemperatur wurden überschüssige Fluoreszenzfarbstoffe vom Präparat abgewaschen. Anschließend wurde der Objektträger kurz mit 200 µl 1xPBS gewaschen.

Der immunzytologischen Nachweis von Plasmazellen im Rahmen der fluoreszenzoptischen Auswertung der Hybridisierungsexperimente erfolgte ohne Pipettier-Roboter. Es wurde ein an den Fluoreszenzfarbstoff AMCA (7-Amino-4-Methylcoumarin-3-Essigsäure) gekoppelter Antikörper gegen den tumorspezifischen Leichtkettentyp (Kappa- oder Lambda-Leichtkette) eingesetzt. Dazu wurden die AMCA-Antikörper mit 1xPBS im Verhältnis 1:5 auf ein Gesamtvolumen von 10 µl verdünnt und auf das Hybridisierungsareal pipettiert. Das Areal wurde mit einem 18x18 mm Deckglas bedeckt und mit Klebstoff abgedichtet. Die nachfolgende Inkubation erfolgte für mindestens 5 Stunden.

Schließlich wurde der Objektträger kurz in 1xPBS gewaschen und zum Schutz vor raschem Ausbleichen der Fluorochrome mit 15 µl *Vectashield™ mounting medium* bedeckt und mit einem 24x50 mm großen Deckglas versehen.

2.7 Auswertung und Dokumentation

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte an einem Mikroskop vom Typ *Axioskop* (Fa. Zeiss, Jena, Deutschland). Zum Einsatz kamen Filter für DAPI, FITC und Rhodamin. Die Photodokumentation erfolgte mittels einer CCD *(Charge Coupled Device)*-Kamera (Typ *Xillix*). Die Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe von ISIS Metasystem (Fa. Metasystem, Altlußheim, Deutschland) und *Adobe Photoshop™*, Version 6.0 (Fa. Adobe).

Pro Patient wurden mindestens 100 AMCA-positive Plasmazellen ausgewertet. Die Identifikation der Plasmazellen erfolgte einerseits immunzytologisch, andererseits unter Beachtung charakteristischer morphologischer Merkmale von Plasmazellen, wie zum Beispiel der exzentrischen Lage des Zellkerns. Zur Sicherung der Hybridisierungseffizienz wurden nicht nur Plasmazellen, sondern

auch mononukleäre Zellen der myeloischen Zellreihe sowie erythropoetische Vorläuferzellen bewertet. Darüber hinaus wurden im Hybridisierungsexperiment immer zwei DNA-Sonden kombiniert verwendet, von denen höchstens eine Sonde eine Deletion, d.h. nur ein Hybridisierungssignal pro Zelle, zeigen durfte, um die Hybridisierungseffizienz in den Tumorzellen prüfen zu können.

2.8 Statistik

Um herauszufinden, ob Zugewinne von 1q, 9q und 11q verwendet werden können um eine Translokation 14q32 vorherzusagen, wurde ein logistisches Regressionsmodel angewandt. Mit der „Tenfold cross-validation“ wurde das Vorhersagefähigkeit von 9q und 11q Zugewinnen ermittlet. Mit dem Cochran-Armitage Tend Test wurde nun ermittelt, ob die Inzidenz von 13q-Verlusten und 1q-Zugewinne in den drei Sugruppen, welche durch die 9q und 11q Zugewinne definiert wurden

2.9 Reagenzien und Chemikalien

Die nachfolgend aufgeführten Reagenzien und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Agarose	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Alpha satellite DNA probe	Fa. Oncor, Heidelberg, Deutschland
AMCA-Antikörper	Fa. Vector, Burlingname, USA
Anti-Digoxigenin-Fluorescein	Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland
Avidin-FITC-DCS-Antikörper	Fa. Vector, Burlingname, USA
Aqua dest.	Fa. Delta-Pharma GmbH, Pfullingen Deutschland
Aqua dest.	Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
Bakterienagarose	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fa. Sigma, St. Louis, USA
10 x Blue JuiceTM Gel Loading Buffer	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
Chloramphenicol	Fa. Sigma, St. Louis, USA

4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Fa. Sigma, St. Louis, USA
1 kb DNA Größenmarker (1kb DNA Ladder)	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
DNA-Polymerase I (E.coli)	Fa. New-England-Biolabs, Beverly, USA
DNAse I	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Fa. Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
Ethidiumbromid	Fa. Eurobio, Les Uilles, Frankreich
Ficoll Separating Solution (Density 1,077)	Fa. Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Fixogum Rubber Cement	Fa. Marabu, Tamm, Deutschland
Formamid	Fa. T.J.Baker, Deventer, Holland
Glycerol	Fa. Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Hefeextrakt (Yeast Extract)	Fa. Difco, Detroit, USA
Humane COT-1 DNA	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
Isopropanol	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Lachs-DNA	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Microbeads CD 138	Fa. Miltenyi Biotec GmbH, Crailsheim, Deutschland
Methanol	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumhydroxid (NaOH)	Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumcitrat-2-hydrat	Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland
Natrium-Heparin	Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
Nukleotide:	
1. dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
2. Biotin-16-dUTP	Fa. Roche Diagnostics GmbH,

	Mannheim, Deutschland
3. Digoxigenin-11-dUTP	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
PFA (Paraformaldehyd)	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
10 x PBS Puffer	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
Pepsin	Fa. Böhringer, Mannheim, Deutschland
Peptone	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
RPMI 1640 Waschmedium	Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Sephadex G 50	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Streptavidin-Cy3	Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland
ß-Mercaptoethanol	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl (Tris-Puffer)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Türk´s Färbelösung	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Fa. Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
VectashieldTM mounting medium	Fa. Vector, Burlingname, USA

3 ERGEBNISSE

3.1 Inzidenz chromosomaler Aberrationen

Die häufigsten genetischen Veränderungen im untersuchten Kollektiv waren (in absteigender Häufigkeit): 9q-Zugewinne (n=60, 56%), t(14q) (n=58, 54%), 11q-Zugewinne (n=57, 53%), 13q-Verluste (n=47, 44%) und 1q-Zugewinne (n=37, 34%). Verluste genomischen Materials der Chromosomenarme 1q und 9q und 13q-Zugewinne waren in jeweils weniger als 1% der Fälle nachweisbar. 11q-Verluste waren nicht nachweisbar (Abbildung 5).

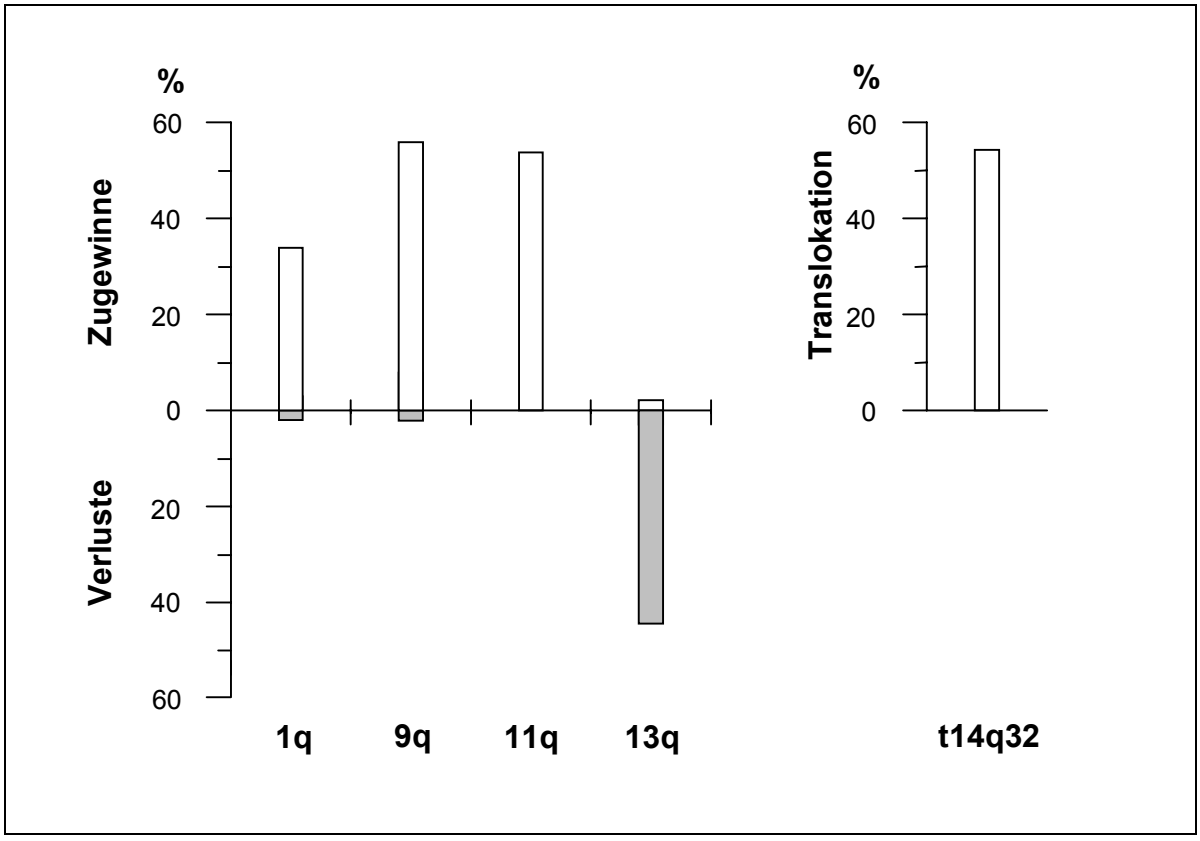

Abbildung 5: Inzidenz chromosomaler Aberrationen im Gesamtkollektiv

11 der 108 Patienten wiesen keine der genannten genetischen Aberrationen auf. 23 Patienten wiesen eine, 52 der Patienten zwei, 13 der Patienten drei und 9 der Patienten wiesen vier genetische Veränderungen auf.

3.2 Definition genetischer Subgruppen

3.2.1 Korrelation genetischer Aberrationen

Die Analyse des Auftretens rekurrenter Aberrationen im untersuchten Kollektiv ergab eine klare, nicht-zufällige Verteilung genetischer Veränderungen:

a) Korrelation rekurrenter chromosomaler Imbalancen

- Signifikant *positive* Korrelation von 9q-Zugewinnen und 11q-Zugewinnen. Zugewinne von 9q waren statistisch signifikant häufiger bei Patienten mit 11q-Zugewinnen nachweisbar als bei Patienten ohne 11q-Zugewinn. (47/57 [82%] vs. 13/51 [25%], $p<0,0001$, Cramer's V Koeffizient = 0,57, 95% Konfidenzintervall 0,42 bis 0,73).
- Signifikant *positive* Korrelation von 1q-Zugewinnen und 13q-Verlusten. Zugewinne von 1q waren statistisch signifikant häufiger bei 13q-deletierten Patienten nachweisbar als bei Patienten ohne 13q-Verlust.
  (24/47 [51,1%] vs. 13/61 [21,3%], $p=0,002$).
- Signifikant *negative* Korrelation von 9q-/11q-Zugewinnen und 13q-Verlusten. 9q-/11q-Zugewinne waren statistisch signifikant seltener bei 13q-deletierten Patienten nachweisbar als bei Patienten ohne 13q-Verlust (24/48 [50%] vs. 46/50 [92%], $p<0,0001$).

b) Korrelation chromosomaler Zugewinne mit der Translokation t(14q32)

- Signifikant *negative* Korrelation der Zugewinne von Chromosom 9q und Chromosom 11q und der Translokation t(14q32) (Tabelle 4).
- Signifikant *positive* Korrelation der 1q-Zugewinne und der Translokation t(14q32) (Tabelle 4).

Tabelle 4: Korrelation rekurrenter chromosomaler Zugewinne mit der Translokation t(14q32)

Zugewinn	odds ratio	Unteres 95% KI	Oberes 95% KI	P-Wert
1q	6,21	2,18	19,9	<0,001
9q	0,13	0,04	0,40	<0,001
11q	0,25	0,08	0,74	0,01

3.2.2 Definition dreier Subgruppen innerhalb des Gesamtkollektivs

Aufgrund des additiven Effektes von 9q- und 11q-Zugewinnen in Hinsicht auf die Vorhersage einer 14q32-Translokation wurde die Detektion dieser beiden Aberrationen zur Definition dreier Subgruppen innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs verwendet: 1. Tumore mit Zugewinnen von 9q *und* 11q, 2. Tumore mit 9q- *oder* 11q-Zugewinn, 3. Tumore *ohne* Zugewinne von 9q und 11q (Tabelle 5).

Tabelle 5: Definition dreier Subgruppen anhand von 9q- und 11q-Zugewinnen

Zugewinn von 9q *und* 11q	n=47 (43,5%)
Zugewinn von 9q *oder* 11q	n=23 (21,3%)
weder Zugewinn von 9q *noch* von 11q	n=38 (35,2%)

3.3 Inzidenz von t(14q32), 13q- und +1q in den drei Subgruppen

3.3.1 Inzidenz der t(14q32)

Die Inzidenz der t(14q32) im Gesamtkollektiv betrug 54%. Die Inzidenz der t(14q32) war in den drei Subgruppen hochsignifikant unterschiedlich (p<0,001) und betrug in der Gruppe ohne 9q-/11q-Zugewinne 89%. In der Gruppe der Patienten mit gleichzeitigem Auftreten beider Zugewinne betrug die Inzidenz der 14q-Translokation nur 23%. In der Gruppe der Patienten mit 9q- *oder* 11q-Zugewinn betrug die Inzidenz der 14q-Translokation 56% (Abbildung 6).

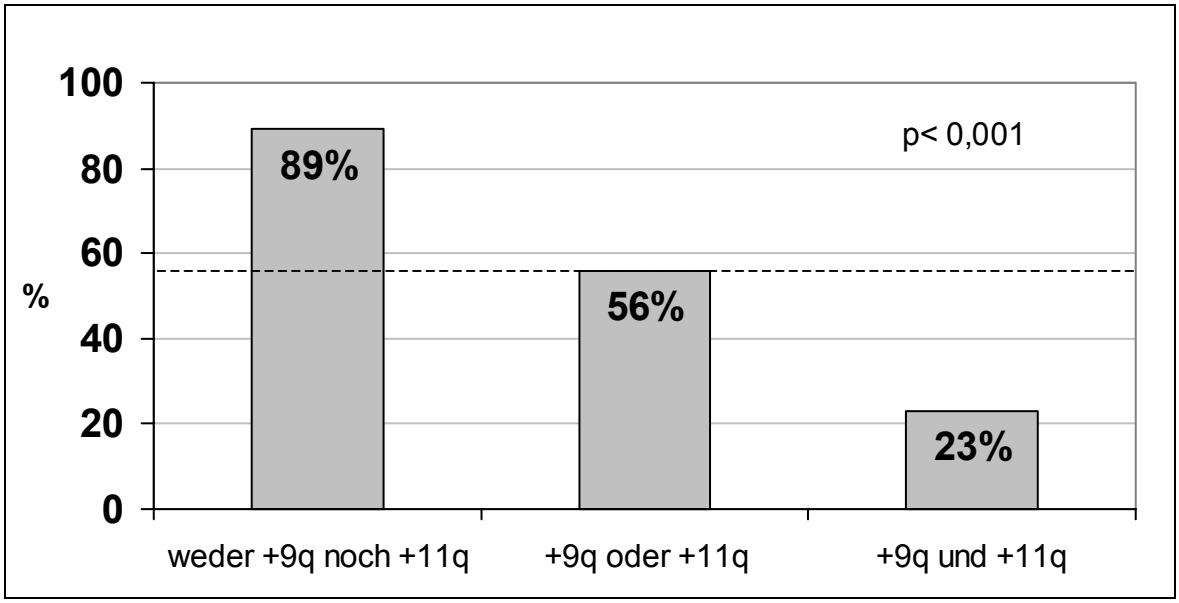

Abbildung 6: Inzidenz der t(14q32) in den drei Subgruppen

3.3.2 Inzidenz von 13q-Verlusten

Die Inzidenz der 13q-Verluste im untersuchten Kollektiv betrug 44%. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Häufigkeit von 13q-Verlusten in den drei Subgruppen (p<0,001). Analog zur 14q32-Translokation war die Inzidenz in der Gruppe ohne Zugewinne von 9q und 11q mit 63% am höchsten. Im Gegensatz dazu lag die Inzidenz der 13q-Verluste in der Gruppe der Patienten mit gleichzeitigem Auftreten beider Zugewinne bei 23%. In der Gruppe der Patienten mit 9q- *oder* 11q-Zugewinn betrug die Inzidenz der 14q-Translokation 36% (Abbildung 7).

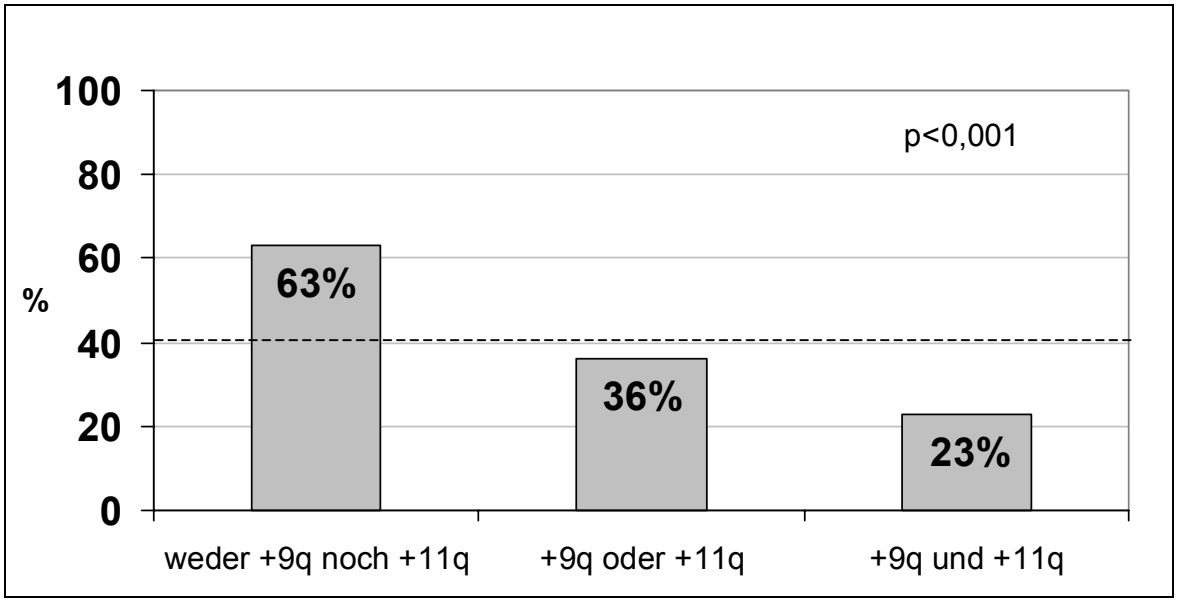

Abbildung 7: Inzidenz der 13q-Verluste in den drei Subgruppen

3.3.3 Inzidenz von 1q-Zugewinnen

Die Inzidenz der 1q-Zugewinne zeigte keinen signifikanten Unterschied in den drei Subgruppen (Cochran-Armitage trend test, p=0,5) (Abbildung 8).

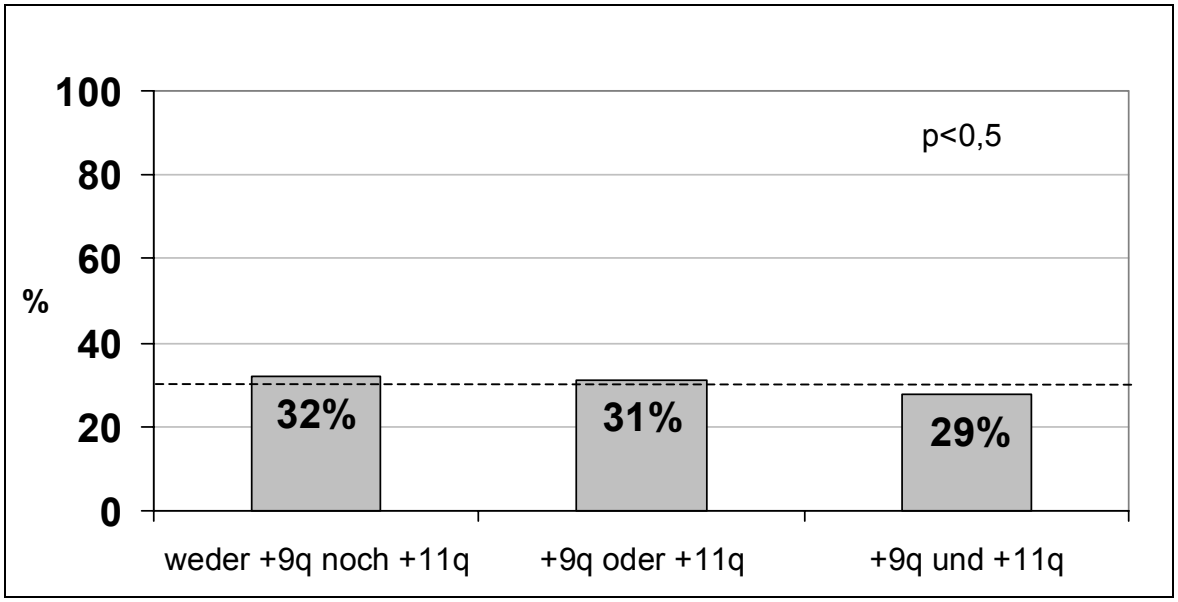

Abbildung 8: Inzidenz der 1q-Zugewinne in den drei Subgruppen

4 DISKUSSION

4.1 Inzidenz chromosomaler Abberationen

Deletion 13q

Die Inzidenz der 13q-Deletion im analysierten Kollektiv von 108 Patienten betrug 44%. Dies entspricht der Inzidenz einer in unserem Labor durchgeführten FISH-Untersuchung an einem größeren Kollektiv von 344 Patienten mit MM (43%) (LIEBISCH et al. 2003b). In weiteren großen FISH-Studien lag die Inzidenz der Deletion 13q14 zwischen 38% und 55% (FACON et al. 2001, AVET-LOISEAU et al. 2002, FONSECA et al. 2003).

9q-Zugewinne

Zugewinne des langen Arms von Chromosom 9 waren in unserem Kollektiv bei 56% der Patienten nachweisbar. Sie lag damit etwas höher als in einer Serie von 235 untersuchten Patienten mittels FISH (47,5%) (LIEBISCH et al. 2003b). In konventionellen Bänderungsanalysen und CGH-Analysen reicht die Inzidenz von Chromosom 9q-Zugewinnen zwischen 6% und 30% bzw. 12% und 58% (LIEBISCH et al. 2003b). Bei Verwendung einer Zentromersonde wiesen DASCALESCU und Mitarbeiter (1999) eine hohe Inzidenz der Trisomie 9 (82%) bei einer Serie von 55 Patienten nach.

11q-Zugewinne

Die Inzidenz der Zugewinne des langen Arms des Chromosoms 11 im analysierten Kollektiv von 108 Patienten betrug 53%. Im Rahmen der in unserem Labor an einem größeren Kollektiv durchgeführten FISH-Untersuchung war eine solche Veränderung bei 109 von 291 Patienten mit Multiplen Myelom (37,4%) nachweisbar und stellte somit nach 9q-Zugewinnen die zweithäufigste Aberration

im Rahmen dieser Studie dar (LIEBISCH et al. 2003b). Darüber hinaus liegen bisher nur wenige Daten zu 11q-Zugewinnen beim MM vor. Zwei FISH-Studien zeigen einen Zugewinn von Chromosom 11 in 33% bzw. 38% der Fälle auf. Jedoch ist die Aussagekraft dieser Analysen begrenzt, einerseits aufgrund der limitierten Anzahl untersuchter Fälle (n=63 bzw. n=89; PEREZ-SIMON et al. 1998, KÖNIGSBERG et al. 2000), andererseits aufgrund der Verwendung einer Zentromersonde, die außerhalb der mutmaßlichen kritischen Region kartiert, in eine der beiden Studien. In einer großen zytogenetischen Studie waren 11q-Zugewinne in nur 2 von 345 Fällen (0,5%) nachweisbar (TRICOT et al. 1997).
Mittels CGH waren Zugewinne des Chromosoms 11 in 23% bis 62% der Fälle nachweisbar. Darüber hinaus konnte in diesen Untersuchungen kritische Regionen auf dem langen Arm des Chromosoms identifiziert werden (LIEBISCH et al. 2003a und dortige Refenenzen). In der vorliegenden Arbeit wurde eine DNA-Sonde verwendet, die in die kritische Region kartiert und eine große Anzahl von Tumoren untersucht. Damit bietet diese Analyse verlässliche Daten bezüglich der Inzidenz dieser Abberation.

1q-Zugewinne

Ein 1q-Zugewinn war im untersuchten Kollektiv bei 34% der Patienten nachweisbar. Im Rahmen einer umfangreichen Untersuchung unserer Arbeitsgruppe war eine Trisomie des langen Arms von Chromosom 1 bei 65 von 205 Patienten mit Multiplen Myelom (31,7%) nachweisbar (LIEBISCH et al. 2003b). Weitere publizierte FISH-Daten zur Häufigkeit von 1q-Zugewinnen liegen bisher nicht vor.

14q32-Translokation

Die Inzidenz der 14q23-Translokationen im analysierten Kollektiv betrug 54%. Eine vergleichbar hohe Inzidenz fanden FONSECA et al. (2003) bei einer Serie von 80 Patienten (55%). Im Rahmen einer FISH-Analyse von AVET-LOISEAU et al.

(2002) an 669 Patienten konnte eine t(14q32) in 73% der Fälle beobachtet werden.

4.2 Inzidenz der t(14q32) in den drei Subgruppen

Die Inzidenz der 14q32-Translokation war in den von uns definierten Subgruppen signifikant unterschiedlich und reichte von 23% bei Tumoren mit 9q- und 11q-Zugewinne bis 89% bei Tumoren *ohne* diese beiden Zugewinne. Diese Daten bestätigen eine Analyse von FONSECA et al. (2003), bei der mittels FISH 80 Patienten mit abnormalem Karyotyp auf 14q32-Translokationen untersucht wurden. In dieser Analyse wurden zwei Subgruppen definiert: Eine Gruppe „hyperdiploider" Tumore (48 bis 74 Chromosomen) und eine Gruppe „nicht-hyperdiploider" Tumore (<48 oder >74 Chromosomen). IgH-Translokationen wurden in der Subgruppe der hyperdiploider Tumore signifikant seltener nachgewiesen als in der Gruppe nicht-hyperdiploider Tumore (83% vs. 18,5%; p<0,0001). SMADJA et al. (2003) wiesen an einer Serie von 55 Patienten mit abnormalem Karyotyp eine t(14q32) in 73% der hypodiploiden Tumore und 14% der hyperdiploiden Tumore nach. In einer Arbeit von FONSECA et al. (2002b) war die t(11;14)(q13;q32) signifikant seltener in der hyperdiploiden Gruppe nachweisbar als in der nicht-hyperdiploiden Gruppe (14% vs. 62%; p<0,0001). Im Vergleich zu den genannten Studien erfolgte jedoch in der vorgelegten Arbeit keine Bänderungsanalyse zur Ervaluation des Ploidiestatus. Es ist jedoch naheliegend, dass Tumore mit Nachweis von 9q- und 11q-Zugewinnen einen hyperdiploiden Karyotyp aufweisen.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass das gleichzeitige Auftreten chromosomaler Zugewinne – möglicherweise durch eine gesteigerte Transkription eines oder mehrere Gene („gain-of-function") der kritischen Regionen – einen translokations-unabhängigen Weg hin zur Plasmazellimmortalisierung eröffnen. In einer Arbeit von SPECHT et al. (2004) konnte mittels real-time RT-PCR eine Überexpression des Onkogens *Cyclin D1* bei Patienten ohne t(11;14), jedoch mit Nachweis einer 11q-Trisomie gezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte eine Genexpressionsanalyse von SHAUGHNESSY et al. (2003) einen Funktionsverlust

(„haplo-insufficiency“) des *RB1* Gens und weiterer in der Bande 13q14 gelegener Gene Patienten mit 13q-Deletion.

4.3 Inzidenz der 13q-Deletion und von 1q-Zugewinnen in den Subgruppen

Eine 13q-Deletion war in der vorliegenden Arbeit signifikant seltener bei Patienten mit 9q- und 11q-Zugewinn nachweisbar als bei Patienten ohne diese beiden Zugewinne. Diese Ergebnisse unterstützen Resultate einer Analyse von Fonseca et al. (2003), in der mittels Flowzytometrie zur Bestimmung des Ploidiestatus und FISH zur Detektion von 13q-Verlusten nachgewiesen werden konnte, dass die Inzidenz der 13q-Deletion in der Gruppe der hyperdiploiden MM signifikant geringer war, als in der nicht-hyperdiploiden Patientengruppe (34% vs. 66%). Die Inzidenz von 1q-Zugewinnen war dagegen in den drei verschiedenen Subgruppen nicht signifikant unterschiedlich.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Genetische Veränderungen spielen in der Pathogenese und für die Prognose des Multiplen Myeloms (MM) eine entscheidende Rolle. Die Monosomie 13 bzw. der Verlust des langen Arms des Chromosoms 13 ist, ebenso wie ein hypodiploider Karyotyp, mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Nach heutiger Vorstellung können primäre IgH-Translokationen durch Dysregulation verschiedener Onkogene die Tumorentstehung („Immortalisierung“) initiieren. Solche Translokationen im Immunglobulin-Schwerketten-Locus (t[14q32]) treten bei rund 50-70% der Plasmazellneoplasien auf und werden als entscheidendes pathogenetisches Ereignis angesehen. In 30-50% der Fälle ist keine primäre Translokation nachweisbar. Dies wirft die Frage nach alternativen genetischen Aberrationen auf, welche zur Immortalisierung der Plasmazelle führen können. Unlängst wurden genomische Zugewinne der Chromosomen 1q, 9q und 11q als sehr häufige Aberrationen bei MM identifiziert. Um die biologische Bedeutung dieser häufigen Zugewinne näher zu untersuchen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Kollektiv von 108 Patienten mit MM mittels FISH und einem aus fünf DNA-Sonden bestehenden Sondensatz untersucht. Hierbei zeigte sich ein klares Muster der Verteilung rekurrenter genetischer Veränderungen. Die Inzidenz der t(14q32) wurde in der Gruppe der Patienten mit 9q- und 11q-Zugewinnen signifikant seltener nachgewiesen als bei Fällen ohne diese chromosomalen Imbalancen. Daneben zeigte sich analog dazu eine hohe Inzidenz der t(14q32) in der Gruppe mit 1q-Zugewinnen und 13q-Verlusten im Vergleich mit dem Kollektiv von Patienten ohne diese genetischen Veränderungen. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass bei Tumoren, deren Genom Zugewinne der Chromosomen 9q und 11q aufweisen, ein t(14q32)-unabhängiger Pfad in der Pathogenese maligner Plasmazellerkrankungen existieren könnte, im Rahmen dessen eine erhöhte Transkription eines oder mehrerer Gene in den kritischen Regionen der zugewonnenen Chromosomen zur Immortalisierung der Plasmazelle führen könnte.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, Minvielle S, Bataille R. 2002. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. **Blood J**; 99:2185-2191

Barlogie B, Jagannath S, Desikan KR, Mattox S, Vesole D, Siegel D, Tricot G, Munshi N, Fassas A, Singhal S, Mehta J, Anaissie E, Dhodapkar D, Naucke S, Cromer J, Sawyer J, Epstein J, Spoon D, Ayers D, Cheson B, Crowley J. 1999. Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. **Blood J**; 93:55-65

Bergsagel PL, Kuehl WN. 2002. Chromosome translocations in multiple myeloma. **Oncogene**; 20:5611-5622

Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P. 1998. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. **Genes Chromosomes Cancer**; 21:172-175

Calasanz MJ, Cigudosa JC, Odero MD, Ferreira C, Ardanaz MT, Fraile A, Carrasco JL, Sole F, Cuesta B, Gullon A. 1997. Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations. **Genes Chromosomes Cancer**; 18:84-93

Dascalescu CM, Callanan M, Chauvet M, Le Baccon P, Pegourie-Bandeiler B, Garban F et al. 1999. Interphase FISH: a rapid method for detecting malignant plasma cells in multiple myeloma patients submitted to autologous transplantation. **Bone Marrow Transplant**; 23:687-694

Desikan R, Barlogie B, Sawyer J, Ayers, D, Tricot G, Badros A, Zangari M, Munshi NC, Anaissie E, Spoon D, Siegel D, Jagannath S, Vesole D, Epstein J, Shaughnessy J, Fassas A, Lim S, Robertson P, Crowley J. 2000. Results of high-dose therapy for 100 patients with multiple myeloma: durable complete remission and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities. **Blood J**; 95:4008-4010

Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. 2001. Genomic aberration and survival in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**; 343:1910-1916

Durie BG, Salmon SE. 1975. A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. **Cancer**; 36:842-845

Fonseca R, Harrington D, Oken MM, Dewald GW, Bailey RJ, van Wier SA, Henderson KJ, Blood EA, Rajkumar SV, Kay NE, van Ness B, Greipp PR. 2002. Biological and prognostic significance interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (Δ 13) in multiple myeloma: an eastern cooperative oncology group study. **Cancer Res**; 62:715-720

Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, Bailey RJ, Greipp PR. 2003a. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. **Blood J**; 101:4569-4575

Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, Dewald GW, Byrant SC, Winkler JM, Blood E, Oken MM, Santana-Dávila R, Gounzáles-Paz N, Kyle R, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Greipp PR. 2003b. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. **Blood J**; 102:2562-2567

Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl M, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD, Stewart AK, Avet-Loiseau H. 2004. Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report. **Cancer Res**; 64:1546-1558

Facon T, Avet-Loiseau H, Guillerm G, Moreau P, Genevieve F, Zandecki M, Lai JL, Leleu X, Jouet JP, Bauters F, Harousseau JL, Batallie R, Mary JY; Intergroupe Francophone du Myelome. 2001. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum β2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. **Blood J**; 97:1566-1571

Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. 1998. Multiple Myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process. **Blood J**; 91:3-21

International Myeloma Working Group. 2003. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. **Br J Haematol**; 121:749-757

Konigsberg R, Zojer N, Ackermann J, Kromer E, Kittler H, Fritz E, Kaufmann H, Nosslinger T, Riedl L, Gisslinger H, Jager U, Simonitsch I, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J. 2000. Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. **J Clin Oncol**; 18:804-812

Kuehl WM, Bergsagel PL. 2002. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. **Nat Rev Cancer**; 2:175-187

Liebisch P, Viardot A, Bassermann N, Wendl C, Roth K, Goldschmidt H, Einsele H, Straka C, Stilgenbauer S, Döhner H, Bentz M. 2003a. Value of comparative genomic hybridization and fluorescence *in situ* hybridization for molecular diagnostics in multiple myeloma. **Br J Haematol**; 122:193-201

Liebisch P, Wendl C, Wellmann A, Kröber A, Schilling C, Goldschmidt H, Einsele H, Straka C, Bentz M, Stilgenbauer S, Döhner H. 2003b. High incidence of trisomies 1q, 9q, and 11q in multiple myeloma: results from a comprehensive molecular cytogenetic analysis. **Leukemia**; 17:2535-2537

Moreau P, Facon T, Leleu X, Morineau N, Huyghe P, Harousseau JL, Bataille R, Avet-Loiseau H; Intergroupe Francophone du Myelome. 2002. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. **Blood J**; 100:1579-1583.

Mrozek K, Hinomen K, Bloomfield CD. 2000. Prognostic value of cytogenetic findings in adults with acute myeloid leukemia. **Int J Hematol**; 72:261-271

Pérez-Simón JA, García-Sanz R, Tabernero MD, Almeida J, González M, Fernandez-Calvo J, Moro MJ, Hernandez JM, San Miguel JF, Orfão A. 1998. Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: a FISH analysis of 15 different chromosomes. **Blood J**; 91:3366-3371

Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath S, Barlogie B. 1995. Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. **Cancer Genet Cytogenet**; 82:41-49

Shaughnessy J, Tian E, Sawyer J, Bumm K, Landes R, Badros A, Morris C, Tricot G, Epstein J, Barlogie B. 2000. High incidence of chromosome 13 deletions in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH. **Blood J**; 96:1505-1511

Shaughnessy J, Jacobson J, Sawyer J, McCoy J, Fassas A, Zhan F, Bumm K, Epstein J, Anaissie E, Jagannath S, Vesole D, Siegel D, Desikan R, Munshi N, Badros A, Tian E, Zangari M, Tricot G, Crowley J, Barlogie B. 2003. Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities, especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy I: interpretation in the context of global gene expression. **Blood J;** 101:3849-3856

Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fuchart C. 2001. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. **Blood J**; 98:2229-2238

Smadja NV, Leroux D, Soulier J, Arnould C, Taviaux S, Taillemite JL, Bastard C. 2003. Further cytogenetic characterization of multiple myeloma confirms that 14q32 translocations are a very rare event in hyperdiploid cases. **Genes Chromosomes Cancer**; 38:234-239

Specht K, Haralambieva E, Bink M, Mandl-Weber S, Koch I, Tomer R, Hofler H, Schuring E, Kluin PM, Fend F, Quintanilla-Martinez L. 2004. Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealead by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels. **Blood J**; 104:1120-1126

Tricot G, Barlogi B, Jagannath S, Bracy D, Mattox S, Vesole DH, Naucke S, Sawyer JR. 1995. 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 J**; 86:4250-4256

Tricot G, Sawyer JR, Jagannath S, Desikan KR, Siegel D, Naucke S, Mattox S, Bracy D, Munshi n, Barlogie B. 1997. Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplants. **J Clin Oncol**; 15:2659-2666

Wuilleme S, Robillard N, Lode L, Magrangeas F, Beris H, Harousseau JL, Proffitt J, Minvielle S, Avet-Loiseau H; Intergroupe Francophone de Myelome. 2005. Ploidy, as detected by fluorescence in situ hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma. **Leukemia**; 19:275-278

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich auf vielfältige Art und Weise während meiner Zeit als Doktorand unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Döhner für die Möglichkeit, in seinem Labor wissenschaftlich arbeiten zu können, danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Peter Liebisch für seine Betreuung und sein persönliches Engagement. Durch seine wertvollen Vorschläge und optimale Hilfestellung hat er maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen.

Darüber hinaus gilt mein Dank Frau Dr. Christiane Wendl, die mir bei der Einarbeitung in die verschiedenen Arbeitstechniken zur Seite stand und durch praktische Hinweise zum Gelingen der Experimente beigetragen hat.

Frau Katrin Roth und Sibylle Janczik möchte ich für die stets freundliche Zusammenarbeit und hilfreiche Unterstützung im Rahmen der Projekte der Arbeitsgruppe Multiples Myelom danken.

Nicht zu letzt auch ein großes Dankeschön an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Zytogenetischen Labors, sowie allen Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden für das freundliche und kooperative Arbeitsklima.

Lebenslauf

Name	Scheck
Vornamen	Daniel Thomas
Geburtstag	19.08.1976
Geburtsort	Ulm
Familienstand	ledig
Vater	Dr. med. Rainer Scheck
Mutter	Margaret Scheck, geb. Hansen

Schulischer Werdegang

1983 – 1987	Grundschule Gerhausen
1987 – 1996	Gymnasium Blaubeuren
06/1996	Abitur

Zivildienst

1996 – 1997	Medizinische Universitätsklinik Ulm

Universitärer Werdegang

10/1997 – 06/2004	Studium der Humanmedizin Universität Ulm
08/1999	Ärztliche Vorprüfung
09/2000	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2004	Ärztliche Prüfung

Berufstätigkeit – Weiterbildung

07/2004-12/2004	Internistische Gemeinschaftspraxis, Dr. med. Küter / Dr. med. Scheck, Ulm
01/2005-heute	Medizinische Klinik III, Hämatologie und Onkologie, Klinikum Heidenheim