

Aus dem Institut für Humangenetik
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Spielmann)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Klonale Evolution Multipler Myelome unter
Berücksichtigung ihrer zytogenetischen und
molekularzytogenetischen Veränderungen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Christiane Viktoria Pomplun
aus Mechernich

Kiel (2021)

1. Berichterstatterin: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Eva Maria Murga Penas

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Matthias Peipp

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 02.05.2022

Gez.: Frau Priv.-Doz. Dr. med. Almuth Caliebe
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen der Tumorentstehung	1
1.2 Klonale Evolution von Tumoren.....	2
1.3 Hämatologische Neoplasien.....	3
1.3.1 Entwicklung der B-Lymphozyten	4
1.3.2 Antikörpervariabilität	4
1.4 Das Multiple Myelom (MM).....	7
1.4.2 Epidemiologie und Ätiologie des MM	7
1.4.3 Klinik des MM	9
1.4.4 Diagnostik des MM	9
1.4.5 Zytogenetische und molekularzytogenetische Methoden zum Nachweis chromosomaler Aberrationen bei MM	10
1.4.6 Hyperdiploide und Non-hyperdiploide MM	11
1.4.7 14q32/IGH-Translokationen	12
1.4.8 Sekundäre genetische Veränderungen	12
1.4.9 Risikostratifizierung des MM.....	14
1.4.10 Therapie des MM.....	15
1.5 Fragestellung	17
2 Material	18
2.1 Tumormaterial.....	18
2.2 Chemikalien, Reagenzien.....	18
2.3 Laborgeräte	19
2.4 Puffer und Lösungen	20
2.5 Verwendete Sonden für die FISH-Analyse.....	22
3 Methoden.....	23
3.1 Klassische Zytogenetik: Chromosomen-Bänderungsanalyse	23
3.1.1 Materialvorbereitung für die Chromosomen-Bänderungsanalyse	23
3.1.2 Herstellung des konditionierten Mediums (CM) für die Zellkulturen.....	23
3.1.3 Kulturansatz des Patientenmaterials	24
3.1.4 Aufarbeitung der Zellkulturen	24
3.1.5 Chromosomen-Präparation, Färbung und Bänderung sowie deren digitale Aufnahme und Auswertung.....	25
3.2 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	26
3.2.1 Anreicherung der CD138-positiven Plasmazellen mittels der magnetischen Zellsortierung (<i>Magnetic Cell Sorting (MACS)</i>)	27
3.2.2 Aufarbeitung der CD138-positiven Plasmazellen.....	28
3.2.3 Herstellung lokusspezifischer FISH-Sonden	28
3.2.4 Präparation der BAC-DNA aus einer Bakterienkultur.....	29
3.2.5 Markierung der DNA mittels Random Priming	29
3.2.6 Aufreinigung der DNA.....	30
3.2.7 Sondenfällung mit Cot-1-DNA	30
3.2.8 Vorbereitung der Objektträger	31
3.2.9 FISH-Verdau	31
3.2.10 Hybridisierung des Materials	32

3.2.11	Waschen und Gegenfärbung der Präparate	32
3.2.12	FISH-Auswertung	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Demographische und klinische Daten des Patientenkollektivs	34
4.2	Genetische Aberrationen im untersuchten Patientenkollektiv	35
4.3	Einteilung des Patientenkollektivs hinsichtlich der nachgewiesenen genetischen Aberrationen 48	
4.3.1	Identifikation numerischer Aberrationen im untersuchten Patientenkollektiv	50
4.3.2	Identifikation struktureller Aberrationen im untersuchten Patientenkollektiv	52
4.4	Evolution der untersuchten genetischen Aberrationen im vorliegenden Patientenkollektiv .. 54	
4.4.1	Klonale Evolution von 14q32/IGH-Translokationen und des 8q24/MYC-Bruches	54
4.4.2	Klonale Evolution der 1q-Zugewinne	57
4.4.3	Amplifikationen von 1q23/IRTA1/2 (1q-Amplifikation)	58
4.4.4	Klonale Evolution der Tri- bzw. Tetrasomie 11 bzw. des 11q-Zugewinns	59
4.4.5	Klonale Evolution der 13q-Deletion	61
4.4.6	Klonale Evolution der 17p13/TP53-Deletion	62
4.4.7	Klonale Evolution der Tri- bzw. Tetrasomie 17 und des 17q-Zugewinns	63
4.4.8	Klonale Evolution der Tri- bzw. Tetrasomie 21	64
4.4.9	Inzidenz und klonale Evolution weiterer rekurrenter CA	65
4.5	Kombination simultan aufgetretener CA	67
4.6	Übersicht über die Ergebnisse bezüglich klonaler Evolution	70
4.7	Daten aus der Chromosomen-Bänderungsanalyse	71
5	Diskussion	74
5.1	Aspekte der FISH-Technik und der Chromosomen-Bänderungsanalyse bei MM	74
5.2	Einteilung der MM nach den genetischen Subgruppen HMM und NHMM	76
5.3	Klonale Evolution der strukturellen genetischen Aberrationen bei MM	77
5.3.1	Die strukturellen Aberrationen 14q32/IGH-Translokationen und 8q24/MYC-Brüche zeigen eine hohe genetische Stabilität	77
5.3.2	14q32/IGH-Translokationen mit den bekannten Translokationspartnern sind primäre Veränderungen und spezifische 14q32/IGH-Translokationen können zur genomischen Instabilität des MM beitragen	77
5.3.3	8q24/MYC-Brüche können sowohl primär als auch sekundär in beiden genetischen Subgruppen auftreten	79
5.3.4	Numerische 8q24/MYC-Veränderungen treten eher bei den NHMM und sekundär auf	80
5.4	Klonale Evolution der untersuchten numerischen Veränderungen bei MM	81
5.4.1	1q-Zugewinne sind häufige, genetisch stabile Aberrationen beider Gruppen, welche auch sekundär auftreten können	81
5.4.2	1q-Amplifikationen sind seltene, instabile CA beider Gruppen	82
5.4.3	Tri- bzw. Tetrasomien des Chromosoms 11 und der 11q-Zugewinn kommen häufiger bei den HMM vor, können sowohl primär als auch sekundär entstehen und eine genetische Instabilität aufweisen	83
5.4.4	13q-Deletionen zeigen eine hohe Inzidenz bei den HMM, treten eher primär auf und können eine genetische Instabilität aufweisen	84
5.4.5	17p13/TP53-Deletionen sind genetisch stabile CA der NHMM-Gruppe	86
5.4.6	Tri- bzw. Tetrasomien des Chromosoms 17 und der 17q-Zugewinn sind häufige CA der HMM-Gruppe, können primär oder sekundär entstehen und zeigen genetische Stabilität	88
5.4.7	Tri- bzw. Tetrasomien des Chromosoms 21 und der 21q-Zugewinn sind häufige CA der HMM-Gruppe, treten sowohl primär als auch sekundär auf und können eine genetische Instabilität aufweisen	89
5.5	Klonale Evolution weiterer numerischen Aberrationen	90
5.6	Klonale Evolution und kombiniert vorliegende CA: Sie liegen oft bereits primär vor und treten häufiger bei den NHMM auf	91

5.7	Stellenwert der Chromosomen-Bänderungsanalyse bei MM	93
5.8	Fazit und Ausblick	94
6	Zusammenfassung	98
7	Literaturverzeichnis	100
8	Danksagung	112
9	Eidesstattliche Erklärung	113
10	Publikationen	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kennzeichen von Tumoren nach Hanahan D, Weinberg RA. 2000 (Hanahan & Weinberg, 2000).....	1
Abbildung 2: V(D)J-Rekombination und somatische Hypermutation nach Thomas, R. K. und V. Diehl (2003).(Thomas & Diehl, 2003)	6
Abbildung 3: Fall 15, Zeitpunkt 05/11: Interphasezellkern mit einer Translokation t(11;14)/ <i>CCND1-IGH</i>	52
Abbildung 4: Repräsentatives Bild eines Interphasezellkerns mit einer Translokation t(8;14)/ <i>MYC-IGH</i>	56
Abbildung 5: Fall 15, Zeitpunkt 05/11: Interphasezellkern mit einem 8q24/ <i>MYC</i> -Bruch.....	56
Abbildung 6: Repräsentatives Bild eines Interphasezellkerns mit einem 1q-Zugewinn.....	58
Abbildung 7: Fall 1, Zeitpunkt 08/09: Interphasezellkern mit einer Trisomie 11	59
Abbildung 8: Repräsentatives Bild eines Interphasezellkerns mit 17p13/ <i>TP53</i> -Deletion	63
Abbildung 9: Fall 1, Zeitpunkt 08/09: Interphasezellkern mit einem 21q-Zugewinn.....	64
Abbildung 10: Fall 20, Zeitpunkt 09/2014: Karyogramm mit dem Karyotyp nach ISCN 2016	71
Abbildung 11: Fall 23 Zeitpunkt 06/07: Karyogramm mit Karyotyp nach ISCN 2016	72
Abbildung 12: Fall 14, Zeitpunkt 04/11: Karyogramm mit dem Karyotyp nach ISCN 2016	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der MM nach der Klassifikation von Salmon und Durie	15
Tabelle 2: Stadieneinteilung nach der IMWG: International Staging System.....	15
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	18
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Laborgeräte	19
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten FISH-Sonden	22
Tabelle 6: Demographische Patientendaten (als Mittelwerte und Spannbreite angegeben)	34
Tabelle 7: Molekularzytogenetische und zytogenetische Daten des gesamten Patientenkollektivs während des Krankheitsverlaufs	37
Tabelle 8: Verteilung der Fälle mit einem Karyotyp charakteristisch für HMM und Fälle mit IGH-Rearrangement, wie es für NHMM typisch ist	49
Tabelle 9: Häufigkeitsverteilung der numerischen Aberrationen im Gesamtkollektiv. Fälle der HMM und NHMM wurden entsprechend gruppiert	51
Tabelle 10: Fälle mit Bruchereignis im Bereich 14q32/IGH sowie 8q24/MYC und Inzidenz der unterschiedlichen Translokationen in den Gruppen HMM und NHMM	53
Tabelle 11: Fälle mit Bruchereignis im Bereich 14q32/IGH und 8q24/MYC, Zeitpunkt des Auftretens und Inzidenz der unterschiedlichen Translokationen.	55
Tabelle 12: Inzidenz der Fälle mit einem 1q-Zugewinn. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe, bei Erstdiagnose (ED) und unter Krankheitsprogress entstanden, hinblickend auf die genetische Stabilität.	57
Tabelle 13: Inzidenz der Fälle mit 1q-Amplifikation 1q23/IRTA1/2. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe HMM und NHMM, bei ED oder sekundär entstanden und genetischer Stabilität.	59
Tabelle 14: Inzidenz der Fälle mit Tri-/Tetrasomie 11 bzw. 11q-Zugewinn. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe, bei Erstdiagnose (ED) und unter Krankheitsprogress bzw. Persistenz entstanden, hinblickend auf die genetische Stabilität der untersuchten Aberration.	60
Tabelle 15: Inzidenz der Fälle mit 13q-Deletion. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe, CA bei Erstdiagnose (ED) und unter Krankheitsprogress bzw. Persistenz entstanden, hinblickend auf die genetische Stabilität der untersuchten Aberration.....	61
Tabelle 16: Inzidenz der Fälle mit 17p13/TP53-Deletion. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe (NHMM), bei Erstdiagnose (ED) und unter Krankheitsprogress bzw. Persistenz entstanden, hinblickend auf die genetische Stabilität der untersuchten Aberration.....	62
Tabelle 17: Inzidenz der Fälle mit Tri-/Tetrasomie 17 und 17q-Zugewinn. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe (HMM), bei Erstdiagnose (ED) und unter Krankheitsprogress bzw. Persistenz entstanden, hinblickend auf die genetische Stabilität der untersuchten Aberration.....	63
Tabelle 18: Inzidenz der Fälle mit Tri-/Tetrasomie 21. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe, bei Erstdiagnose (ED) und unter Krankheitsprogress bzw. Persistenz entstanden, hinblickend auf die genetische Stabilität der untersuchten Aberration.....	65
Tabelle 19: Nachgewiesene Zweifachkombinationen chromosomal Aberrationen in diesem Kollektiv	69
Tabelle 20: Nachgewiesene Dreifachkombinationen chromosomal Aberrationen in diesem Kollektiv	70
Tabelle 21: Klonale Evolution – Häufigkeitsverteilung der neu aufgetretenen CA. CA bezogen auf die 16 Fälle, welche eine klonale Evolution zeigten.	70

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AML	Akute Myeloische Leukämie
BAC	Künstliches Bakterienchromosom (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
BAP	Bruchpunkt-flankierende Sonden (<i>Break Apart Rearrangement Probe</i>)
BP	Bruchpunkt (<i>breakpoint</i>)
Bzgl.	Bezüglich
Bzw.	Beziehungsweise
CA	Chromosomale Aberration
clg-FISH	<i>Cytoplasmic Immunglobulin Fluorescence In Situ Hybridisation</i>
CEP	<i>Chromosome Enumeration Probe</i>
cen	centromerisch
CM	Konditioniertes Medium (<i>conditioned medium</i>)
CmCyR	Komplette molekularzytogenetische Remission (<i>complete molecularcytogenetic remission</i>)
CR	Komplette Remission (<i>complete remission</i>)
CSR	Klassenwechsel Rekombination (<i>class switch recombination</i>)
CT	Computertomographie
DAPI	Diamidinophenylindol
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
DEAC	Diethylaminomethyl coumari
del	Deletion
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
d ₂ Ho	Destilliertes Wasser
dist	distal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleinsäure-Nukleosid-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
Etc.	Et cetera
FDG-PET	Fluordeoxyglucose-Positronen-Emissionstomografie
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
HDT	Hochdosistherapie (<i>high dose therapy</i>)
HGP	Humanes Genom Projekt (<i>Human Genome Project</i>)
HMM	Hyperdiploides Multiples Myelom
IG	Immunglobulin (Gen)
Ig	Immunglobulin (Protein)
Ig κ	Immunglobulinleichtkette κ
Ig λ	Immunglobulinleichtkette λ
IGH	Immunglobulinschwerketten-Lokus (<i>immunoglobulin heavy chain gene</i>)
IGK	Immunglobulinleichtketten-Lokus Kappa (<i>immunoglobulin light chain gene κ</i>)
IGL	Immunglobulinleichtketten-Lokus Lambda (<i>immunoglobulin light chain gene λ</i>)
IL	Interleukin
IMiD	<i>Immune Modulatory Drug</i>
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
ISS	<i>International Staging System</i>
J _H	Joining-Region des IGH-Lokus
KM	Knochenmark
LB	Luria Broth (Bakterienmedium)

LDH	Laktatdehydrogenase
LSI	Lokus-spezifische Sonden (<i>Locus Specific Identifier</i>)
LK	Lymphknoten
m	männlich
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>Magnet Cell Sorting</i>)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MM	Multiples Myelom
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MRT	Magnetresonanztomographie
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
NHMM	Non-hyperdiploides Multiples Myelom
o. g.	oben genannt
OS	Gesamtüberleben (<i>overall survival</i>)
p	Kurzer Arm eines Chromosoms
PAC	Künstliches Chromosom aus P1-Bakteriophagen (<i>P1-derived artificial chromosome</i>)
PCLI	<i>Plasma cell labeling Index</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCyR	Partielle zytogenetische Remission (<i>partial cytogenetic remission</i>)
PFS	Progressionsfreies Überleben (<i>progression free survival</i>)
prox	proximal
q	Langer Arm eines Chromosoms
Q-Bänderung	Chromosomenbänderungsverfahren mit Quinacrin
R-Bänderung	Zur Giemsa-Färbung gegensätzliches Chromosomenbänderungsverfahren
REAL	<i>Revised European American Lymphoma</i>
R-ISS	<i>Revised International Staging System</i>
RT	Raumtemperatur
SCC	<i>Standard Saline Citrate</i>
SCT	Stammzelltransplantation (<i>stem cell transplantation</i>)
SG	<i>Spectrum green</i>
SO	<i>Spectrum orange</i>
SMM	<i>Smoldering Myeloma</i>
s. o.	siehe oben
sog.	so genannt
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
V(D)J	<i>Variable, (Diversity), Joining</i> -Genabschnitte
V _H	Variable-Region des <i>IGH</i> -Lokus
u. a.	unter anderem
UPM	Umdrehungen pro Minute
ÜN-Kultur	Über Nacht-Kultur
w	weiblich
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i>
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Tumorentstehung

Die Grundlage für die Entstehung von Tumoren sind genetische Veränderungen, durch die es zu fehlerhaften Prozessen während dynamischer Vorgänge, wie z. B. Zellteilung (Mitose), Zellregulation, Differenzierung und Proliferation kommt. Der Biologe David von Hansemann erkannte bereits 1890 auffällige Zellteilungsmuster bei unterschiedlichen Karzinomen und postulierte einen Zusammenhang zwischen der Entstehung von Tumoren und den entdeckten Veränderungen. Fünfundzwanzig Jahre später wurden diese Beobachtungen von Theodor Boveri aufgegriffen und weitergeführt. In seinem Buch „Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren“ aus dem Jahr 1914 formulierte er die These, Krebs sei eine genetische Erkrankung. Weiterhin postulierte er, dass Tumorzellen eine Evolution mit zunehmender Malignität durchlaufen und Eigenschaften einer normalen Zelle verlieren (Boveri, 1914).

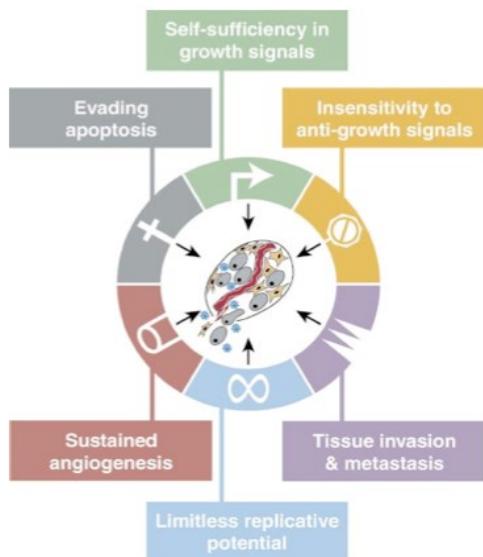


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kennzeichen von Tumoren nach Hanahan D, Weinberg RA. 2000 (Hanahan & Weinberg, 2000).

Hanahan und Weinberg definierten im Jahr 2000 6 charakteristische Alterationen, die im Zusammenhang mit der Entwicklung einer gesunden Zelle zur Tumorzelle stehen – bekannt als *Hallmarks of Cancer* (Hanahan & Weinberg, 2000). Tumorzellen haben demnach 6 Charakteristika gemeinsam: Sie zeigen eine unabhängige Versorgung mit wachstumsstimulierenden Signalen, Immunität gegenüber Wachstumsinhibitoren, Apoptoseresistenz, ein unlimitiertes Replikationspotential sowie die Fähigkeit zur Blutgefäßinvasion, Stromainvasion und Metastasierung (siehe Abbildung 1) (Hanahan & Weinberg, 2000).

Im Laufe der Jahre entwickelte sich das Verständnis bzgl. Krebsentstehung stetig weiter, sodass diese 6 Kennzeichen 11 Jahre später durch weitere Charakteristika ergänzt wurden: Genomische Instabilität und spezifische Mutationen sowie entzündliche Prozesse in der Umgebung des Tumors wurden als weitere Charakteristika angegeben, welche zur Tumorproliferation beitragen. Zwei grundlegend neue Merkmale waren, dass es maligne entarteten Zellen möglich ist, alternative Wege der Energiegewinnung zu nutzen und einer Elimination durch das Immunsystem zu entgehen (Hanahan & Weinberg, 2011).

Die Pathomechanismen, die den Tumorzellen diese Eigenschaften verleihen, basieren auf genetischen Mutationen. Man geht davon aus, dass die Tumorentwicklung im Sinne einer Mehrstufenkarzinogenese abläuft und die Krankheitsentstehung auf der genetischen Veränderung *einer* Zelle basiert. Im Verlauf akkumulieren die Tumorklone weitere Veränderungen, die zur Karzinogenese beitragen und auch Tumorsubklone können entstehen (Fearon & Vogelstein, 1990). Zu diesen Veränderungen zählen z. B. Mutationen in Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen (Croce, 2008). Protoonkogene kodieren für Proteine, welche im physiologischen Zustand die Zellproliferation kontrollieren. Kommt es zur Mutation in einem Protoonkogen, wird es als Onkogen bezeichnet. In der Regel ist ein unkontrolliertes Zellwachstum die Folge. Tumorsuppressorgene kodieren für Proteine, die eine unkontrollierte Teilung genetisch geschädigter Zellen verhindern. Somit sind Tumorsuppressorgene an Zellfunktionen wie Apoptose und DNA-Reparaturmechanismen beteiligt. Durch Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens kann es somit zur Tumorentstehung kommen (Croce, 2008). Der Grundstein für das Verständnis der Tumorigenese durch Tumorsuppressorgene wurde im Jahr 1971 durch Alfred G. Knudson gelegt: Nach der Datenanalyse von Patienten mit Retinoblastom stellte er fest, dass erst der Funktionsverlust beider *RB1*-Allele auf Chromosom 13q14.1-q14.2 zur Tumorentstehung führt (Knudson, 1971). Im Verlauf hat sich jedoch gezeigt, dass es durch grundlegende genetische Charakteristika wie z. B. Haploinsuffizienz eines Gens auch ohne Inaktivierung beider Allele zum Funktionsverlust kommen kann (Payne & Kemp, 2005).

1.2 Klonale Evolution von Tumoren

Das Modell der klonalen Evolution von Tumoren wurde 1976 von P.C. Nowell begründet und basiert auf der klassischen Evolutionstheorie nach Charles Darwin. Laut Darwins Theorie bedarf es zur Entstehung einer neuen Art 3 Konditionen: die zufällige Mutation, die gerichtete Selektion und eine (vorübergehende) räumliche Isolierung (Darwin, 1859). Bezogen auf die Entstehung von Tumoren postulierte Nowell, dass sie auf eine einzelne entartete Zelle zurückgehen. Durch ein initiales Ereignis kommt es zu einem Wachstumsvorteil einer

entarteten Zelle gegenüber den anderen Zellen, was zur Expansion des Zellklons führt (Nowell, 1976). Durch weitere Ereignisse bzw. Mutationen kommt es im Verlauf wiederum zum Wachstumsvorteil des Klons, bis sich schließlich ein Tumor entwickelt, der weitgehend unabhängig von Wachstums- und Restriktionsmechanismen proliferieren kann. Ob eine Mutation einen Selektionsvorteil für einen Zellklon bringt, ist abhängig von den vorliegenden Umweltbedingungen. Im Verlauf einer Tumorerkrankung kann es wiederum durch Therapien wie Bestrahlung oder Medikamente zu Veränderungen der Dynamik der vorherrschenden Klone kommen, was einer klonalen Evolution im Sinne einer artifiziellen Selektion entspricht. Dadurch kann es bei fortgeschrittener Erkrankung zur Dominanz besonders maligner Klone kommen, welche gegenüber gängigen Therapieregimen weitestgehend resistent sind (Greaves & Maley, 2012).

Die Einteilung der Tumoren erfolgt nach dem Ursprungsgewebe des Tumors. Es werden solide Tumoren (z. B. Karzinome, Sarkome) von hämatologischen Neoplasien unterschieden. Im Folgenden wird eine Übersicht über die hämatologischen Neoplasien und die physiologische und pathologische Entwicklung von B-Lymphozyten gegeben. Dabei wird auf die klinischen und genetischen Charakteristika sowie die therapeutischen Möglichkeiten, der in der vorliegenden Arbeit untersuchten hämatologischen Erkrankung, des Multiplen Myeloms (MM), eingegangen.

1.3 Hämatologische Neoplasien

Der Sammelbegriff hämatologische Neoplasien umfasst eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des blutbildenden Systems. Die Einteilung erfolgt in Neoplasien, die von der lymphatischen Reihe ausgehen und solche, die von der myeloischen Reihe ausgehen. Weiterhin werden die lymphatischen Neoplasien nach Differenzierungs- und Reifegrad der entarteten Blutzellen (Vorläuferzellen oder reife Zellen) und deren Linienzugehörigkeit (B- oder T-Zell-Leukämie/Lymphome) klassifiziert (Arber et al., 2016). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte hämatologische Neoplasie, das MM, ist eine vom lymphatischen System ausgehende Erkrankung der B-Zell-Reihe, gehört zu den reifen B-Zell-Neoplasien und wird zu den Lymphomen gezählt (Arber et al., 2016).

1.3.1 Entwicklung der B-Lymphozyten

B-Zellen sind für die spezifische humorale Immunabwehr zuständig. Nach ihrer Bildung im Knochenmark (KM) reifen die Vorläuferzellen (Prä-B-Zellen), dort antigenunabhängig, zu naiven B-Zellen heran. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie den B-Zell-Rezeptor. Dabei handelt es sich um membranständige Antikörper (IgM und IgD). Bei der nachfolgenden antigenabhängigen Reifung werden den naiven B-Zellen körpereigene Antigene im KM präsentiert. Sollten sie diese erkennen, kommt es zur Eliminierung der Zelle durch Apoptose (Selbsttoleranz) (Behrends et al., 2010).

Kommt es zur Bindung körperfremder Antigene auf ihrer Oberfläche, werden spezifische Antikörper durch die B-Zellen gegen das fremde Antigen sezerniert. Die Antikörperbildung kann einerseits durch eine T-Zell-unabhängige B-Zell-Aktivierung erfolgen oder durch die effizientere T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung. Das Antigen wird dabei zunächst phagozytiert und an MHCII (*Major Histocompatibility Complex*)-Moleküle auf der Oberfläche gebunden und einer T-Helfer-Zelle präsentiert. Durch diesen Prozess wird die klonale Expansion und Differenzierung zur Plasmazelle mit Antikörperproduktion eingeleitet (Behrends et al., 2010). Das MM ist eine Erkrankung mit Entstehung auf Ebene der Plasmazellen. Es kommt zur klonalen Expansion der Plasmazellen, jedoch handelt es sich hierbei um funktionslose, immuninkompetente Zellen.

1.3.2 Antikörpervariabilität

Antikörper bestehen aus 2 leichten L-Ketten (*light*) und 2 schweren H-Ketten (*heavy*). Die schweren Ketten (IgH) bestimmen die Immunglobulin-Klassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Die leichten Ketten gliedern sich in 2 funktionell nicht zu unterscheidende Klassen- Ig κ (*Kappa*) und Ig λ (*Lambda*). Die konstanten Teile der schweren Ketten werden als Fc-Fragment (kristallisierbares Fragment, *crystallizable*) bezeichnet. Das Fab-Fragment (Antigen-bindendes Fragment) der schweren Ketten setzt sich aus den hypervariablen V_H und V_L-Domänen und den C_{H1} und C₁-Domänen zusammen. Die Antigenbindungsstelle wird von den V_H und V_L-Domänen gebildet (siehe Abbildung 2, A) (Heinrich, 2007, Thomas & Diehl, 2003).

Damit möglichst viele Antigene erkannt werden und eine hohe Antikörpervielfalt erreicht wird, müssen Antikörper eine möglichst große Anzahl an unterschiedlichen Antigenbindungsseptopen besitzen. Es gibt verschiedene komplexe Mechanismen, die zu Variationen in den V_H und V_L-Domänen führen und vulnerable Ereignisse für die Entstehung genetischer Alterationen in der B-Zell-Entwicklung darstellen.

IGH (14q32.33), *IGK* (2p11.2), und *IGL* (22q11.2) sind Ig-kodierende Gene. Jeder dieser Genloki enthält die Gene V (*variable segment*), D (*diversity segment*, nur *IGH*), J (*joining segment*) und C (*constant segment*). Die variablen Bereiche der H-Ketten werden von den Gensegmenten V, D und J kodiert, die der L-Kette nur von den Segmenten V und J (I, Abbildung 2). Bei der nach dem Zufallsprinzip ablaufenden V(D)J-Rekombination, wird das Gen für die jeweilige variable Region des Rezeptors aus je einem V, D und J-Segment zusammengesetzt. Die dazwischenliegenden Genabschnitte werden deletiert. Bei den variablen Domänen der leichten Ketten wird direkt ein V-Segment mit einem J-Segment verknüpft. Die unreife B-Zelle ist nun in der Lage, IgM auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Dazu wird zur Bildung der konstanten Region auf DNA-Ebene das Segment $C\mu$ (*constant μ*) des *IGH*-Lokus an die VDJ-Einheit gespleißt. Bei reifen B-Zellen kann durch alternatives Spleißen des $C\delta$ -Segments IgD an die VDJ-Einheit synthetisiert werden (Rink et al., 2015, Watson & Breden, 2012).

Es folgt die Migration der reifen, naiven B-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe. Dort erfolgt die antigenabhängige B-Zell-Reifung, vor allem im Keimzentrum der Lymphknoten. Nach Aktivierung der B-Lymphozyten werden auch die anderen Antikörper-Isotypen exprimiert. Dies geschieht durch die Klassenwechsel Rekombination (*Class switch recombination (CSR)*). Beim Klassenwechsel können die $C\mu$ -und $C\delta$ -Gene durch eines der $C\gamma$, $C\alpha$ und $C\epsilon$ Gene ersetzt werden, wodurch IgG, IgA und IgE gebildet werden können. Dies findet an sogenannten Switch-Regionen statt, wobei stromauf- und stromabwärts gelegene Teile des Immunglobulin-Genclusters herausgeschnitten werden (III, Abbildung 2) (Heinrich, 2007).

Während des Reifungsprozesses der B-Zellen treten Punktmutationen im Bereich der variablen Region der schweren Kette auf. Dieser Prozess wird als „somatische Hypermutation“ bezeichnet und sorgt dafür, dass der variable Bereich so modifiziert wird, dass das Antigen mit einer bestmöglichen Affinität erkannt werden kann (II, Abbildung 2). Bei erfolgreicher Entwicklung differenzieren sich die B-Zellen schließlich zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen (Behrends et al., 2010, Rink et al., 2015).

Während dieser physiologischen Prozesse zur B-Zell-Reifung kann es zu DNA-Doppelstrangbrüchen kommen, welche einen Risikofaktor für chromosomal Translokationen darstellen. Bestimmte Translokationen, die charakteristisch für unterschiedliche lymphatische Neoplasien sind, entstehen typischerweise während der genannten Mechanismen: Beispiele sind die Translokationen im Bereich des *MYC*-Gens, welche typischerweise beim Burkitt-Lymphom auftreten, *BCL2*-Translokationen beim folliculären Lymphom, *CCND1*-Translokationen beim Mantelzell-Lymphom, oder *BCL6*-Translokationen beim diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (Thomas & Diehl, 2003).

Die Translokationen *IGH/BCL2* und *IGH/CCND1* resultieren von fehlerhafter V(D)J-Rekombination (B, Abbildung 2). *IGH/BCL6* oder *IGH/MYC*-Translokationen entstehen dagegen eher während der Klassenwechsel Rekombination oder der somatischen Hypermutation (C, D Abbildung 2).

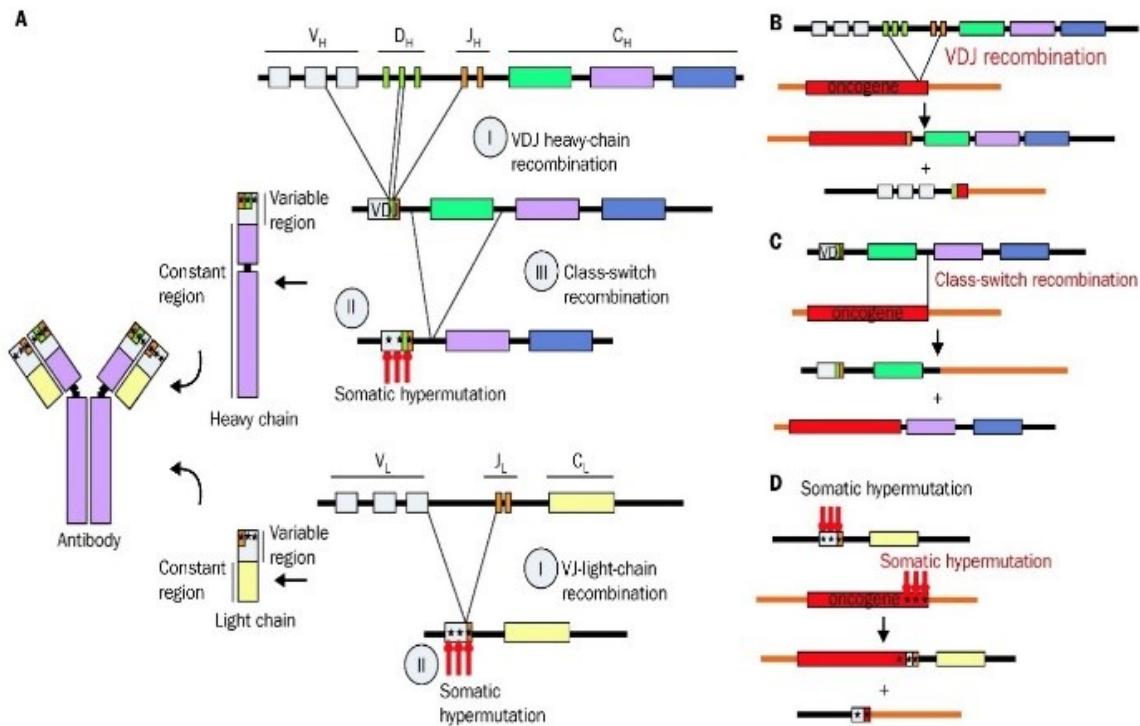


Abbildung 2: V(D)J-Rekombination und somatische Hypermutation nach Thomas, R. K. und V. Diehl (2003). (Thomas & Diehl, 2003).

A *Physiologischer Ablauf der Erzeugung von Antikörpervielfalt durch V(D)J-Rekombination, somatischer Hypermutation und Klassenwechsel im Rahmen der B-Zell-Reifung*. I: Zunächst erfolgt die Umlagerung der V-, D-, und J- Segmente auf DNA-Ebene für die Synthese der schweren Kette (heavy Chain) und der V- und J-Segmente für die leichte Kette (light chain). Die variablen Regionen der leichten und schweren Kette werden kombiniert. Anschließend erfolgt die somatische Hypermutation (II) zur Affinitätssteigerung und schließlich der Klassenwechsel (III, class switch recombination) durch Veränderung der konstanten Region des Ig. Rechts dargestellte Mechanismen, die zu den lymphomtypischen Translokationen führen: Entstehung der Translokation *IGH/BCL2* im Rahmen einer fehlerhaften V(D)J-Rekombination (B), Translokation *IGH/MYC* durch Fehler beim Prozess des Klassenwechsels (C) und Translokation *IGH/BCL6* durch inkorrekt ablaufende Hypermutation (D).

1.4 Das Multiple Myelom (MM)

1.4.1.1 Definition

Das MM wird nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) zu den niedrig malignen Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe gezählt (Arber et al., 2016). Die WHO-Klassifikation der myeloischen und lymphatischen Neoplasien stellt eine weltweite Konsensusklassifikation zur Diagnose hämatologischer Erkrankungen dar, und beruht auf der interdisziplinären Zusammenarbeit von Hämatopathologen, Hämatologen, Onkologen und Genetikern. Sie wurde 2001 etabliert und orientiert sich an der Revised-European-American-Lymphoma (REAL)-Klassifikation von 1994 (Harris et al., 1994). Die Kriterien wurden 2016 erneut überarbeitet, wobei neue wissenschaftliche Erkenntnisse bzgl. Morphologie, Immunphänotypisierung und Genetik sowie klinische und prognostische Erfahrungen berücksichtigt wurden (Arber et al., 2016, Campo et al., 2011).

Beim MM handelt es sich um eine Neoplasie des KM, ausgehend von Plasmazellen. Charakteristisch ist die diffuse, multilokuläre Infiltration des KM durch den transformierten Plasmazellklon, welcher in der Regel Immunglobuline (Ig) oder nur deren Leichtketten (Bence-Jones-Protein) produziert. Letzteres ist als Paraprotein im Urin und/oder Serum nachweisbar. Je nachdem welches Ig vornehmlich produziert wird, werden verschiedene Isotypen unterschieden: IgG (52 %), IgA (21 %), IgD (2 %) IgM (0,5 %), Bence-Jones-Protein (16 %) (Kyle et al., 2003). Selten liegt ein asekretorisches Myelom vor.

Als solitäres Plasmozytom wird die singuläre medulläre oder extramedulläre Manifestation eines Plasmazelltumors ohne systemische Beteiligung bezeichnet und vom MM abgegrenzt (Dimopoulos et al., 1992). Kommt es zur Disseminierung der Plasmazellen ins periphere Blut, spricht man von einer Plasmazellleukämie. Es handelt sich dabei um eine sehr aggressive Variante mit entsprechend ungünstiger Prognose (Gonsalves et al., 2014).

1.4.2 Epidemiologie und Ätiologie des MM

Das MM ist ein häufiger Tumor von Knochen und KM. Es macht etwa 0,8 % aller Neoplasien aus und gehört damit zu den häufigsten hämatologischen Erkrankungen. Jährlich sterben etwa 63.000 Menschen weltweit an MM, was 0,9 % aller durch Krebs verursachten Todesfälle entspricht (Becker, 2011).

In Deutschland erkrankten im Jahr 2016 circa 3.900 Männer und 3000 Frauen an MM. Die Inzidenz steigt mit dem Lebensalter, so sind Erkrankungen vor dem 45. Lebensjahr selten

(Zentrum für Krebsregisterdaten, 2019). Das mediane Erkrankungsalter ist bei Männern 71 Jahre und bei Frauen 73 Jahre (Katalinic & Pritzkuleit, 2013).

Die Ätiologie des MM ist weitgehend unbekannt. Allgemeine Risikofaktoren, welche die Entstehung von Neoplasien begünstigen, werden auch in Zusammenhang mit der Krankheitsentstehung des MM gebracht. Als Risikofaktoren für MM werden Adipositas (Wallin & Larsson, 2011), chronische Infektionen sowie die Exposition gegenüber Benzol, ionisierenden Strahlen und Produkten der Gummiverarbeitung diskutiert (Landgren et al., 2006). Überproportional häufig erkrankten zudem Feuerwehrmänner, welche bei den Terroranschlägen auf das World Trade Center am 11. September 2001 im Einsatz waren (Landgren et al., 2018). Verwandte ersten Grades von Erkrankten zeigen ebenso ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines MM (Altieri et al., 2006).

Der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung eines MM ist neben dem Alter das Vorliegen einer präexistenten Plasmazellstörung, z. B. einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) oder eines *Smoldering Myeloma* (SMM). Studien konnten nachweisen, dass das MM bei mindestens einem Drittel der Patienten aus einer solchen präexistenten Plasmazelldyskrasie entsteht (Kyle et al., 2002, Weiss et al., 2009).

Die MGUS *per se* hat keinen Krankheitswert. Es handelt sich um eine asymptomatische Plasmazelldyskrasie, die durch das Vorliegen von monoklonalen Immunglobulinen (M-Protein) gekennzeichnet ist (siehe Abschnitt 1.4.4). Sie gilt als Vorstufe des MM, kann aber auch in andere lymphoproliferative Erkrankungen wie z. B. Morbus Waldenström oder Amyloidose übergehen (Kyle et al., 2002). Die Prävalenz der MGUS liegt in Deutschland bei 3,5 % bei den 47-75-Jährigen (Eisele et al., 2012). Das SMM stellt auch eine asymptomatische Plasmazellstörung dar, die zwar teilweise die Diagnosekriterien des MM erfüllt, jedoch charakteristischerweise ohne Endorganschäden bleibt (International Myeloma Working Group, 2003). Das Risiko der Entwicklung eines MM bei vorliegendem SMM liegt bei 10 % pro Jahr. Bei MGUS ist das Risiko mit circa 1 % pro Jahr etwas geringer (Kyle et al., 2007, Kyle et al., 2006). Faktoren, die die Entwicklung zu einem MM begünstigen, sind das Vorliegen einer Non-IgG-Gammopathie, einer auffälligen Freie Leichtketten-Ratio (free light-chain (sFLC) ratio), ein erhöhter Anteil aberranter Plasmazellen im KM, eine Verminderung polyklonaler Ig und eine vorliegende Aneuploidie (Dispenzieri et al., 2008, Perez-Persona et al., 2007, Rajkumar et al., 2005).

1.4.3 Klinik des MM

Die klinische Präsentation des MM ist unspezifisch und sehr variabel. Da das MM mit einer KM-Infiltration einhergeht, resultieren oftmals Symptome, die durch die Verdrängung der weiteren Zellreihen des KM entstehen. Eine Anämie, die zu Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Schwindel und Dyspnoe führen kann, tritt bei circa 75 % der Patienten auf (Kyle et al., 2003). Durch eine Thrombozytopenie kann es zu einer Blutungsneigung kommen. Zudem besteht häufig eine Infektanfälligkeit (10-20 %), die sich einerseits durch den sekundären polyklonalen Antikörpermangel und andererseits durch eine Granulozytopenie bei hochgradiger KM-Infiltration ergibt (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, 2018). Es können pathologische Frakturen aufgrund der angegriffenen Knochenstruktur auftreten. Bei circa 80 % der Patienten werden Knochenläsionen detektiert (Kyle et al., 2003). Diese entstehen durch Interaktion der entarteten Plasmazellen mit den Stromazellen. Durch Sezernierung osteoklastischer Zytokine (TNF- β , IL-1, IL-6) kommt es zur Aktivierung von Osteoklasten, was zu Osteolysen mit konsekutiver Hyperkalzämie führt (Klein & Bataille, 1992).

Weiterhin gehören Nierenfunktionsstörungen zu den Symptomen des MM. Die monoklonalen Leichtketten werden glomerulär filtriert und führen zur Destruktion des Nephrons, der Glomeruli und des Tubulussystems. Klinisch können schäumender Urin (als Korrelat der Bence-Jones-Proteinurie), Juckreiz, Kurzatmigkeit und Wassereinlagerungen auftreten. Durch Präzipitation des Proteins kann es zur Nierenschädigung bis hin zur Dialysepflichtigkeit kommen. Diese Form wird als Cast-Nephropathie oder Myelomniere bezeichnet (Dimopoulos et al., 2008).

Zusammengefasst werden die klinischen Manifestationen des MM, nämlich Hypercalcämie (*hypercalcemia*), Niereninsuffizienz (*renal insufficiency*), Anämie (*anemia*), und Knochenläsionen (*bone lesions*) als sog. CRAB-Kriterien (Kyle & Rajkumar, 2009).

1.4.4 Diagnostik des MM

Besteht der Verdacht auf ein MM, gehören eine Reihe laborchemischer und apparativer Untersuchungen zur Diagnosestellung. Differenzialblutbild, Elektrolyte, Albumin, Laktatdehydrogenase (LDH), Nierenretentionsparameter und β 2-Mikroglobulinspiegel müssen bestimmt werden. Die Analyse des M-Gradienten in der Serumelektrophorese, eine Immunfixationselektrophorese von Serum und Urin, sowie eine KM-Punktion gehören zum Standardprocedere. Die Gewinnung von KM ist einerseits für die Diagnosestellung von Bedeutung, andererseits wird das gewonnene Material zur Risikostratifizierung genetisch, z. B. mittels der klassischen Zytogenetik und der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH),

analysiert. Mit Hilfe des sensitiven FLC-Tests ist es möglich, freie Leichtketten im Serum zu quantifizieren und die Kappa/Lambda Ratio zu bestimmen (Kyle & Rajkumar, 2009).

Die Bildgebung bei MM bestand früher hauptsächlich aus Röntgenuntersuchungen des Skeletts („Pariser Schema“). Heute wird dagegen zunehmend die sensitivere Schnittbilddiagnostik (Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT), zuletzt auch Fluorodeoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET)) zum Nachweis von Osteolysen, Osteopenie und zur Stabilitätsbeurteilung eingesetzt (Dimopoulos et al., 2009).

Die Diagnosekriterien der *International Myeloma Working Group* (IMWG) richten sich nach der Menge des M-Proteins und der Infiltrationsrate des KM. MGUS ist definiert als eine Erhöhung des M-Proteins $< 30 \text{ g/l}$ bei einer KM-Infiltration durch monoklonale Plasmazellen $< 10 \%$ ohne nachweisbare Endorganschäden. Bei solitärem Plasmozytom liegt eine singuläre Osteolyse sowie eine biotisch gesicherte Plasmazellinfiltration im KM, anteilig $< 10 \%$ vor. Monoklonales Protein im Serum oder Urin ist nicht obligat nachweisbar und Endorganschäden fehlen bei solitärem Plasmozytom. Bei SMM liegt der klonale Plasmazellanteil im KM $> 10 \%$ und die Erhöhung des M-Proteins liegt bei $\geq 30 \text{ g/l}$ im Serum oder $\geq 500 \text{ mg/24 h}$, aber ohne nachweisbare CRAB-Kriterien (Rajkumar et al., 2014). Zur Diagnosestellung eines MM muss der Plasmazellanteil im KM $> 10 \%$ liegen, monoklonales Protein ist im Serum oder Urin nachweisbar und auch die CRAB-Kriterien sind im Sinne von nachweisbaren Endorganschäden erfüllt (International Myeloma Working Group, 2003).

1.4.5 Zytogenetische und molekularzytogenetische Methoden zum Nachweis chromosomal Aberrationen bei MM

Es stehen verschiedene genetische Techniken in der Diagnostik hämatologischer Neoplasien zur Verfügung. Je nach Proliferationsaktivität, Anteil der Tumorzellen im Untersuchungsmaterial, Tumorentität und Art der genetischen Aberrationen kommen unterschiedliche Verfahren zum Einsatz. Die klassische Zytogenetik mit der Chromosomen-Bänderungsanalyse zählt zu den Standardverfahren in der hämatologischen Diagnostik. Aufgrund der niedrigen Proliferationsaktivität und der niedrigen Tumorinfiltration bei MM ist die Aussagekraft der Methode bei MM eingeschränkt – so zeigen nur circa 30 % der Patienten mit neu diagnostiziertem MM chromosomale Veränderungen in der Chromosomen-Bänderungsanalyse (Sawyer et al., 1995, Weh et al., 1993). Im Vergleich dazu werden unter Verwendung anderer Techniken, welche unabhängig von der Generierung von Metaphasen sind, wie z. B. FISH, in fast 90 % der Fälle chromosomale Aberrationen (CA) detektiert (Drach et al., 1995). Die Detektion chromosomal Veränderungen in der klassischen Zytogenetik ist

demnach meist mit einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung assoziiert (Rajkumar et al., 1999a, Rajkumar et al., 1999b). Die Aussagen der Chromosomen-Bänderungsanalyse sind also aufgrund der niedrigen Proliferationsrate bei MM, v. a. im frühen Stadium eingeschränkt. Aus diesem Grund wird standardmäßig ergänzend die FISH zur Diagnostik des MM durchgeführt.

1.4.6 Hyperdiploide und Non-hyperdiploide MM

Das MM zeichnet sich durch eine ausgeprägte genetische Heterogenität aus. Es werden frühe, primäre genetische Läsionen von sekundären Veränderungen, die unter Progress der Erkrankung entstehen, unterschieden. Ein genomisches Initialereignis kann während der komplexen Prozesse zur Generierung der Antikörpervariabilität auftreten (siehe Abschnitt 1.3.2), wobei eine genetische Vulnerabilität vorliegt und es zur Entstehung einer entarteten Plasmazelle kommen kann (Bergsagel & Kuehl, 2001, Sawyer, 2011).

Schon auf Ebene der MGUS können genetische Veränderungen nachgewiesen werden (Lopez-Corral et al., 2011). Zytogenetisch lassen sich Patienten mit MM vereinfacht in 2 Gruppen einteilen: die hypodiploide oder non-hyperdiploide Gruppe (NHMM) und die Gruppe der hyperdiploiden MM (HMM). Die Gruppe der NHMM ist sehr heterogen bzgl. der genetischen Veränderungen. Es finden sich 14q32-Translokationen mit Beteiligung des *IGH*-Gens, Monosomien des Chromosoms 13, 1p- und 16q-Deletionen sowie 1q- und 8q-Zugewinne. Die hyperdiploide Gruppe ist durch Trisomien der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 charakterisiert (Sawyer, 2011).

Die Gruppe der NHMM wird im Gegensatz zu den HMM mit einer schlechteren Prognose und einer kürzeren Überlebenszeit in Verbindung gebracht (Smadja et al., 2001). Die *Intergroupe Francophone du Myélome* (IFM) postulierte diesbezüglich jedoch, dass die Hyperdiploidität kein unabhängiger prognostischer Faktor sei, sondern die bessere Prognose eher durch die niedrigeren Inzidenzen der 13q-Deletion, Translokation t(4;14) und der 17p-Deletion in der HMM-Gruppe zu erklären sei (Avet-Loiseau et al., 2007).

In der Praxis zeigt diese dichotome Klassifikation Überschneidungen und Ausnahmen. Sie hat sich bei der Betrachtung der Genetik des MM etabliert und wurde deshalb auch in der vorliegenden Arbeit zur orientierenden Einteilung des Kollektivs gewählt.

1.4.7 14q32/IGH-Translokationen

Zu den primären genetischen Veränderungen bei MM gehören *IGH*-Translokationen im Bereich 14q32. Bei den primären Translokationen handelt es sich um reziproke Translokationen, durch welche ein Onkogen neben einem Immunglobulin-Transkriptionsverstärker positioniert wird (Bergsagel & Kuehl, 2001).

Die häufigsten Translokationen sind die *t(11;14)/CCND1-IGH* und *t(4;14)(p16;q32)/MMSET/FGFR3-IGH*, mit einer Frequenz von ca. 15 %, gefolgt von der *t(14;16)(q32;q23)/IGH-MAF* (5 %), der *t(6;14)(p21;q32)/CCND3-IGH* (3 %), und der *t(14;20)(q32;q11)/IGH-MAFB* (2 %). Insgesamt treten alle genannten *IGH*-Translokationen mit einer Häufigkeit von etwa 40 % auf (Bergsagel & Kuehl, 2005).

Die häufigste Translokation *t(11;14)/CCND1-IGH*, führt zur Heraufregulation des *CCND1*-Gens auf Chromosom 11, resultierend in einem Zellzyklusprogress. Die zunächst vermutete schlechte Prognose dieser Translokation konnte jedoch auf einen neutralen Einfluss gemindert werden (Fonseca et al., 2002a).

Die Translokation *t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH* involviert 2 Gene: das *Wolf-Hirschhorn-Syndrome Candidate 1 Gene (WHSC1)*, auch bekannt als *Multiple Myeloma SET Domain (MMSET)* auf dem derivativen Chromosom 4 und das *Fibroblast Growth Receptor 3 (FGFR3)*-Gen auf dem derivativen Chromosom 14 (Kalf & Spencer, 2012). *MMSET* kodiert für eine Histon-Methyltransferase und *FGFR3* für einen Tyrosinkinaserezeptor. Durch die Translokation *t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH* kommt es zur Überexpression des *FGFR3*-Transkripts mit der Folge einer unkontrollierten Zellproliferation und Apoptoseinhibition. In 25 % der Fälle kommt es zum Verlust des derivativen Chromosoms 14, sodass keine Überexpression folgt (Sawyer, 2011). Es besteht zudem eine Assoziation zwischen der Translokation *t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH* und dem Vorliegen von Deletionen bzw. Monosomien des Chromosoms 13 (Avet-Loiseau et al., 2002, Fonseca et al., 2002a).

In etwa 3 % der Fälle kommt es sekundär zu einer Translokation *t(8;14)(q24;q32)/MYC-IGH* mit Beteiligung des *MYC*-Protoonkogens und des *IGH*-Lokus, oder zu einer Variante der Translokation mit Beteiligung von *MYC* und den *IGK*- und *IGL*-Lok. Bei den sekundär aufgetretenen Translokationen handelt es sich häufig um komplexe oder unbalancierte Translokationen, ggf. auch mit mehreren Translokationspartnern (Bergsagel & Kuehl, 2005).

1.4.8 Sekundäre genetische Veränderungen

Die Entwicklung der Tumorklone unterliegt der Akkumulation genetischer Läsionen. Sekundäre genetische Veränderungen bei MM sind z. B. 1q-Zugewinne, 1p-Deletionen, 8q24/MYC-Zugewinne bzw. Amplifikationen, Monosomien des Chromosoms 13 bzw. 13q-Deletionen sowie 17p-Deletionen (Sawyer, 2011). Welche Meilensteine es genau sind, die mit

dem genetischen Progress des MM einhergehen, ist noch zu klären. Genetische Läsionen, die nach aktueller wissenschaftlicher Meinung mit dem Fortschreiten der Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden, sind Veränderungen des Chromosoms 1, 8q24/MYC-Translokationen sowie 17p-Deletionen (Fonseca et al., 2009).

1.4.8.1 Veränderungen des Chromosoms 1

Veränderungen des Chromosoms 1 stellen eine der häufigsten genetischen Aberrationen bei MM dar. Dazu zählen vor allem Deletionen des kurzen Armes (1p-Deletion) und Zugewinne bzw. Amplifikationen des langen Armes von Chromosom 1 (1q-Zugewinn/1q-Amplifikation), welche beide mit einer schlechten Prognose und kürzerem Gesamtüberleben assoziiert sind (Fonseca et al., 2009).

Der 1q-Zugewinn gilt als genetisch instabile CA (Sawyer et al., 2014) und nimmt im Verlauf der Erkrankung an Häufigkeit zu: So wird der 1q-Zugewinn in 40 % der neu diagnostizierten MM und bei 70 % der Rezidive diagnostiziert (Hanamura et al., 2006). Zuletzt wurde der Einfluss des Ploidie-Status des 1q-Zugewinns als prognosebeeinflussend diskutiert: Walker et al. postulieren, dass die Amplifikation des Bereichs 1q die Prognose deutlich verschlechtert, v. a. bei simultan vorliegender, biallelischer 17p13/TP53-Deletion (Walker et al., 2019).

1.4.8.2 8q24/MYC-Veränderungen

Das Protoonkogen *MYC* ist in der Region 8q24 lokalisiert und ist beteiligt an der Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose. 8q24/MYC-Translokationen werden zu den typischen sekundären CA des MM mit steigender Prävalenz während des Krankheitsverlaufs gezählt: So werden 8q24/MYC-Brüche kaum im MGUS-Stadium nachgewiesen, jedoch bei ca. 15 % im frühen MM-Tumorstadium (Avet-Loiseau et al., 2001) und bei 45 % der Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium (Gabrea et al., 2008, Sawyer, 2011). Auch Translokationen, die *MYC* und einen *IG*-Lokus involvieren, stellen ein spätes Ereignis dar und zeigen eine ähnliche Verteilung in den Gruppen der HMM und NHMM. *MYC*-Aberrationen gehen mit einer hohen Proliferationsaktivität des Tumors einher (Sawyer, 2011).

1.4.8.3 Monosomie 13/13q-Deletion

In etwa der Hälfte der Fälle bei MM lassen sich Veränderungen des Chromosoms 13 mittels der FISH detektieren. In den meisten Fällen handelt es sich um eine Monosomie 13, seltener

um partielle Deletionen (Avet-Loiseau et al., 2000). Bezuglich ihrer prognostischen Aussagekraft bestehen kontroverse Ansichten. Zunächst wurde die Monosomie 13 bzw. die 13q-Deletion mit einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht (Perez-Simon et al., 1998, Tricot et al., 1995). Im Verlauf wurde dann ein Zusammenhang zwischen Veränderungen des Chromosoms 13 und einer schlechten Prognose postuliert, wenn die Detektion mittels Interphase-FISH bei normalem Karyotyp erfolgte (Avet-Loiseau, 2007). Andere Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein aggressiver Krankheitsverlauf nicht allein durch Veränderungen des Chromosoms 13 bedingt ist, sondern durch die Vergesellschaftung mit anderen genetischen Hochrisikoaberrationen, wie z. B. der Translokation t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH und 17p-Deletionen (Avet-Loiseau et al., 2007).

1.4.8.4 17p13/TP53-Deletion

Die 17p13/TP53-Deletion ist ein bedeutender prognostischer Faktor, welcher mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Drach et al., 1998). Durch die Deletion kommt es zum Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens *TP53*. Seine Funktion ist es, genetisch veränderte Zellen durch Einleitung der Apoptose zu eliminieren. Es wird aufgrund dieser Funktion als „Wächter des Genoms“ bezeichnet und ist in 50 % aller Malignome verändert (Gao et al., 2013). Die Inzidenz der 17p13/TP53-Deletion bei MM liegt bei ca. 10 % (Chang et al., 2005). Eine kürzere Überlebenszeit, ein sehr aggressiver Krankheitsverlauf und eine höhere Prävalenz extramedullärer MM korrelieren mit dem Vorliegen einer 17p13/TP53-Deletion (Avet-Loiseau, 2007, Fonseca et al., 2009, Sawyer, 2011).

1.4.9 Risikostratifizierung des MM

Die Überlebenszeit bei MM variiert zwischen einigen Monaten bis hin zu mehreren Jahren (Palumbo et al., 2015). Faktoren wie Tumorphologie, Tumorlast, Krankheitsstadium, Patientenfaktoren (z. B. Alter, sozioökonomischer Status, Eastern Co-operative Oncology Group (ECOG)-Performance-Status, Nierenfunktion) und Therapieansprechen beeinflussen die Überlebenszeit (Vu et al., 2015). Insbesondere CA, welche mit Hilfe der FISH an Myelomzellen detektiert werden, lassen Rückschlüsse auf die vorliegende Tumorphologie zu und helfen bei der prognostischen Einschätzung des Krankheitsverlaufs.

Lange war die Klassifikation nach Salmon und Durie gebräuchlich. Tabelle 1 bietet einen Überblick über die klinischen Parameter, anhand derer eine Einteilung in 3 Stadien erfolgte. So wurden Rückschlüsse auf die vorliegende Tumormasse gezogen und eine Prognose bzgl. der Überlebenszeit gegeben (Durie & Salmon, 1975, Kyle & Rajkumar, 2009).

Tabelle 1: Stadieneinteilung der MM nach der Klassifikation von Salmon und Durie

	Stadium I	Stadium II	Stadium III
Hämoglobin	>10 g/dl	Weder Stadium I noch III	< 8,5 g/dl
Serumcalcium	normal		erhöht
Monoklonale Ig (Urin)	Geringe Konzentration (< 4 g/24 h)		Hohe Konzentration (> 12 g/24 h)
Knochenläsion	Max. ein solitärer osteolytischer Herd		Zahlreiche fortgeschritten Osteolysen
Zusatzbezeichnung A: Kreatinin < 2 mg/dl B: Kreatinin > 2 mg/dl			

2005 wurde von der IMWG ein neues Klassifikationssystem etabliert: das *International Staging System* (ISS) (Greipp et al., 2005). Anhand der Albuminkonzentration und des β_2 -Mikroglobulinwertes erfolgt die Einteilung in 3 Stadien, siehe Tabelle 2.

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach der IMWG: *International Staging System*

	Parameter	Medianes Überleben
Stadium I	β_2 -Mikroglobulin < 3,5 mg/l und Albumin \geq 35 g/l	62 Monate
Stadium II	β_2 -Mikroglobulin < 3,5 mg/l und Albumin < 35 g/dl oder β_2 -Mikroglobulin 3,5 bis < 5,5 mg/l	44 Monate
Stadium III	β_2 -Mikroglobulin > 5,5 mg/l	29 Monate

Zur Verbesserung der Risikostratifizierung wurde 2015 von der IMWG das *Revised International Staging System* (R-ISS) etabliert, welches die Parameter Serum-Albumin und β_2 -Mikroglobulin mit prognostisch relevanten CA und der LDH-Konzentration im Serum kombiniert. Stadium I ist analog zum ISS Stadium I mit β_2 -Mikroglobulin < 3,5 mg/l und Albumin \geq 35 g/l, ohne genetische Hochrisikoveränderungen wie z. B. 17p13/TP53-Deletion, und/oder einer Translokation t(4;14)/MMSET/F β GFR3-IGH und/oder einer t(14;16)/IGH-MAF und normalem LDH-Level. Ab β_2 -Mikroglobulin \geq 5,5 mg/l, genetischen Hochrisikoaberrationen und erhöhter LDH-Konzentration erfolgt die Zuordnung zu Stadium III und alle anderen möglichen Kombinationen werden Stadium II zugerechnet (Palumbo et al., 2015).

1.4.10 Therapie des MM

Die Therapie des MM befindet sich aufgrund ständiger Neuerungen zur Verbesserung des Outcomes im Fluss. Neue Substanzen sorgen für neue Angriffspunkte und haben zu Änderungen der Therapieschemata beigetragen.

Bei asymptomatischem MM wird zunächst keine Therapie eingeleitet und die Betreuung der Patienten erfolgt nach dem „*Watch & Wait*“-Prinzip. Gemäß der IMWG liegt bei klinisch symptomatischem MM eine Indikation zur Therapie vor. Die Erfüllung eines der CRAB-Kriterien (siehe Abschnitt 1.4.3), das Vorliegen eines Hyperviskositätssyndroms, B-Symptomatik oder das Auftreten von MM-bedingten Komplikationen stellen Therapieindikationen dar.

Die Therapie bei neu diagnostiziertem MM besteht aus einer Hochdosistherapie mit Melphalan und anschließender autologer Stammzelltransplantation (SCT). Zusätzlich wurde die Therapie entscheidend durch die Integration neuer Substanzen wie Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib beeinflusst. Thalidomid und das Thalidomidanalagon Lenalidomid gehören zu den Immunmodulatoren (IMiD), wirken antiangiogenetisch und induzieren Apoptose. Pomalidomid stellt als Vertreter der neuen Generation der IMiD, vor allem bei Thalidomid- oder Lenalidomid-refraktären Patienten eine Behandlungsoption dar (Dimopoulos et al., 2016). Der Proteasominhibitor Bortezomib ist Bestandteil der Therapie bei neu diagnostiziertem, rezidiviertem und fortgeschrittenem MM (San Miguel et al., 2008).

Bei geeigneter Konstitution des Patienten wird eine HDT mit Melphalan und anschließender autologer SCT durchgeführt. Dies gilt aktuell als Standardtherapie und führt zu den höchsten Raten an kompletter Remission (CR) (Giralt et al., 2009). Im Rahmen der Induktionstherapie werden Kombinationen aus Bortezomib, Cyclophosphamid und Dexamethason, bzw. Lenalidomid, Bortezomib und Dexamethason verwendet (Cavo et al., 2010, Richardson et al., 2010). Ggf. kann nach durchgeführter SCT eine anschließende Tandemtransplantation nötig sein, welche die Wiederholung der HDT mit erneuter autologer SCT beinhaltet (Attal et al., 2003). Zuletzt durchgeführte Analysen deuten darauf hin, dass Patienten mit vorliegender zytogenetischer Hochrisikokonstellation von einer Tandemtransplantation profitieren (Testoni et al., 2017). Eine allogene SCT sollte laut IMWG bei Patienten mit Frührezidiv nach autologer SCT oder Progress nach Erstlinientherapie und Hochrisikokonstellation erwogen werden (Laubach et al., 2016).

Patienten, welche konstitutionell nicht transplantationsfähig sind, erhalten als Erstlinientherapie ebenfalls Kombinationen mit Bortezomib oder Lenalidomid (Durie et al., 2017). Neu zugelassen für die Erstlinientherapie dieser Patienten wurde der Anti-CD38-Antikörper Daratumumab in Kombination mit Bortezomib, Melphalan und Prednisolon (Mateos et al., 2018).

Die Rezidivrate bei MM ist sehr hoch. Oftmals kommt es im Verlauf zu einer verminderten Medikamentenempfindlichkeit, welche sich durch genetische Modifikationen der Tumorsubklone erklären lässt. Im Rahmen der klonalen Evolution entwickeln zunächst

einzelne Tumorsubklone z. B. durch Mutationen eine Resistenz gegenüber den eingesetzten Therapeutika (Morgan et al., 2012). Diese Heterogenität der Tumorsubklone erschwert deren Eliminierung. So wird gerade in der Rezidivsituation auf die Kombination verschiedener Medikamente mit unterschiedlichen Angriffspunkten gesetzt. Für die Behandlung in der Rezidivsituation werden aktuell proteasominhibitorbasierte Dreifachkombinationen mit Cyclophosphamid, Dexamethason, monoklonalen Antikörpern oder IMiDen, je nach primärem Therapienansprechen, Komorbiditäten und therapieassozierter Toxizität empfohlen (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, 2018).

1.5 Fragestellung

Das MM ist eine komplexe hämatologische Neoplasie mit multiplen CA. Einige Studien haben bereits gezeigt, dass es bei MM zur klonalen Evolution der vorliegenden genetischen Aberrationen mit subklonaler Tumorheterogenität kommt (Keats et al., 2012, Morgan et al., 2012, Walker et al., 2012). Dennoch bleiben viele Fragen zur genetischen Architektur des MM und der Entwicklung der CA während des Krankheitsverlaufs offen. Bisher wurde nur in wenigen Studien eine serielle Analyse der CA bei MM über die Zeit durchgeführt. In dieser Arbeit soll durch die stringente sequentielle Analyse über den gesamten Krankheitsverlauf der Patienten eine möglichst genaue Abbildung der Veränderungen, zu denen es im Rahmen der klonalen Evolution kommt, gegeben werden. Das Ziel war es, möglichst flächendeckend die Entwicklung der untersuchten genetischen Aberrationen darzustellen. Zur Beleuchtung dieser übergeordneten Thematik lagen die folgenden Fragen zu Grunde:

- Wie ist Inzidenz der einzelnen CA generell und in den beiden Subgruppen HMM und NHMM?
- Welche CA sind primär vorhanden, welche entstehen sekundär unter Berücksichtigung des gesamten Krankheitsverlaufs?
- Sind die Aberrationen genetisch stabil und lassen sie sich sequentiell nachweisen?
- Wie ist die Verteilung bzgl. klonaler Evolution in den Subgruppen HMM und NHMM?
- Inwiefern überschneiden sich die Ergebnisse der Chromosomen-Bänderungsanalyse und der FISH bzw. ergänzen sie sich?

2 Material

Die in dieser Doktorarbeit beschriebenen Analysen wurden von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki genehmigt (Ethik-Votum Aktenzeichen D484/14 im Anhang).

2.1 Tumormaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden 24 Patienten mit einem MM untersucht. Bei dem verwendeten Tumormaterial handelte es sich um KM-Aspirat aus genetischen Routineuntersuchungen, die im Institut für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel durchgeführt wurden. Die Einsendungen stammten aus dem Mildred-Scheel-Haus, II. Medizinische Klinik, Sektion für Hämatologie und Onkologie des UKSH, Campus Kiel.

Von den 24 Patienten des Kollektivs waren mindestens 3 Einsendungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs vorhanden. Alle Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Probenauswahl in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium oder Rezidiv der Erkrankung.

Das Patientenmaterial wurde bzgl. genetischer Veränderungen mittels der zytogenetischen Technik der Chromosomen-Bänderungsanalyse und der molekularzytogenetischen FISH für 7 ausgewählte Genloki untersucht (siehe Tabelle 5).

2.2 Chemikalien, Reagenzien

In diesem Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt. Allgemein gebräuchliche Utensilien wie z. B. Pinzetten, Zellkulturflaschen, Glaswaren etc. werden hier nicht explizit erwähnt.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Aqua ad inectabilia/Aqua destillata	Allemann Pharma (Rimbach, Deutschland)
Bioprime® DNA Labelling Kit	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Chlorwasserstoff (HCl) 2N	Merck (Darmstadt, Deutschland)
ChromaTide® Texas Red 12-dUTP	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Chromomycin A3	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Citronensäure	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
Colcemid	Boehringer (Ingelheim, Deutschland)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Desoxynucleoside Triphosphate Set	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

1,4-Diazabicyclo 2.2.2 octan (DABCO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DAPI counterstain	Merck (Darmstadt, Deutschland)
dUTP spectrum green (1mM)	Abbott/Vysis (Wiesbaden, Deutschland)
dUTP spectrum orange (1mM)	Abbott/Vysis (Wiesbaden, Deutschland)
Eisessig	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Exo-Klenow-Fragment	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Fixogum Kleber	Marabu (Tamm, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA (Cölbe, Deutschland)
Giemsa	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamin)	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
Glycerol	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
Human Cot-1 DNA	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Igepal CA 630 Detergenz	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Luria Broth (LB) Base	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
Methylgrün	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Microcon®-Filter YM-30	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin (PEST)	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Perfectprep® Plasmid Maxi Kit	Eppendorf
PhaseprepTM BAC DNA Kit	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Phosphate Buffered Saline (PBS)-Trockensubstanz	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Protease	Abbott/Vysis (Wiesbaden, Deutschland)
Protease-Puffer	Abbott/Vysis (Wiesbaden, Deutschland)
Pufferlösung mit pH 6,88	Merck (Darmstadt, Deutschland)
RPMI-1640 Medium	PAA (Cölbe, Deutschland)
20xSSC Puffer	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Steriflip® Filtereinheiten	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck (Darmstadt, Deutschland)

2.3 Laborgeräte

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Brutschrank	Function Line	Heraeus (Hanau, Deutschland)
FISH-Waschautomat	VP2000 Processor	Abbott/Vysis (Wiesbaden, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop	Axiokop	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop	Axiokop 2	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager A1	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Klimakammer	Thermotron	Thermotron (Sittingbourne, Großbritannien)
Lichtmikroskop	476012	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Spektrophotometer	NanodropU® ND-1000	peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Software	ISIS Software Version	Metasystems (Altusheim, Deutschland)
Software	Ikaros Software Version	Metasystems (Altusheim, Deutschland)
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Twist Top Vials		Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Vortexer	REAX2000	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Wasserbad		Labortechnik Köttermann jetzt ROWA (Heimsheim, Deutschland)
Wasserbad	WNE14	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Vakuumzentrifuge	Speedvac RC 1010	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Zentrifuge	Biofuge 22R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	Mikro 200	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge	Multifuge 1 L-R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zytogenetische Trocknungskammer	CDS-5	Thermotron Industries (Holland, USA)

2.4 Puffer und Lösungen

Antifade

230 mg DABCO

800 µl dH₂O

200 µl 1 M Tris-HCL pH 8,0

wurden in 9 ml Glycerol gelöst

ChromomycinA3–Gebrauchslösung

10 mg Chromomycin A3

30 ml Puffer, pH 6,88

DAPI-Lösung

6 µl DAPI-Konzentration (0,2 mg/ml DAPI in dH₂O)

60 ml 2x SSC

Fixativ

50 µl Eisessig

150 µl Methanol

Giemsa-Gebrauchslösung

6 ml Giemsa

80 ml Puffer mit pH 6,88

Glycerin (Glycerol) 50 %

50 ml 99,8 % Glycerin

50 ml dH₂O

LB-Medium

20 g LB BROTH BASE®

wurden in 1 l dH₂O gelöst und autoklaviert

Mastermix 50 %

2,5 ml Formamid

1,25 ml Dextransulfat 40 %

0,5 ml 20x SSC

0,25 ml dH₂O

PBS (phosphate buffer saline)

80 g NaCl

2 g KCL

6,1 g Na₂HPO₄

2 g KH₂HPO₄

wurden mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt und auf pH 7,3 eingestellt

SSC (standard saline citrat)

100 ml 20x SSC-Lösung

wurden mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt.

SSC-Lösung 1

2 ml 20x SSC

300 µl Igepal

wurden mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt.

SSC-Lösung 2

10 ml 20x SSC

100 µl Igepal
wurden mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt.

1M Tris HCl pH 8,0
60,55 g C₄H₁₁NO₃
in 400 ml dH₂O gelöst
wurden mit HCl auf pH 8 eingestellt
500 ml dH₂O

Waschpuffer 1
20 ml 20x SSC
3 ml Igepal ad 1000 ml dH₂O

Waschpuffer 2
100 ml 20x SSC
3 ml Igepal ad 1000 ml dH₂O

Kulturansätze

2-Tages-Medium (2d)
350 ml RPMI 1640
100 ml FKS
50 ml CM
5 ml Glutamin
5 ml PEST

CM-Ansatzmedium
500 ml RPMI 1640
125 ml FKS
6,25 ml Glutamin
6,25 ml PEST
6,25 ml PHA-15

2.5 Verwendete Sonden für die FISH-Analyse

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten FISH-Sonden

Klonbezeichnung	Lokalisation	Lokus	Sondenart
Lokus Sonden:			
RP11-110J1 SG	1q23.1	<i>IRTA1/2</i>	Eigene Sonde
RP11-85G21 SG			
RP11-217A12 SG			
RP11-367J7 SO			
RP11-120D12 SO			
RP11-444M10 SO			
RP11-420H22 SG	11q22~23	<i>FDX</i>	Eigene Sonde
Vysis® LSI® ATM SO	11q22~23	<i>ATM</i>	Firma Abbott/Vysis
CEP11® (D11Z1) Spectrum Aqua Probe	11p11.11~q11.1	Zentromer 11	Firma Abbott/Vysis
Kreatech® PN13(13q13)/21 (21q22)	13q13 21q22	<i>RB1</i> <i>RCAN1</i>	Firma Kreatech, Amsterdam, Niederlande
Kreatech® ON P53(17p13)/MPO(17q22)	17p13 17q22	<i>P53</i> <i>MPO</i>	Firma Kreatech
Break Apart Sonden:			
RP11-1132M4 SG	4p16	<i>MMSET/FGFR3</i>	Eigene Sonde
CTD-3056L2 SG			
RP11-572o17 SO			
Vysis® LSI® MYC Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	8q24	<i>MYC</i>	Firma Abbott/Vysis
RP11-683L4 SO	14q32	<i>IGH</i>	Eigene Sonde
CTD-2011A5 SO			
RP11-141i7 SO			
RP11-150i16 SG			
RP11-817G24 SG			
RP11-937M13 SG			
Vysis® LSI® <i>IGH</i> Dual Color Break Apart Rearrangement Probe	14q32	<i>IGH</i>	Firma Abbott/Vysis
RP11-571o6 SG	16q23	<i>MAF</i>	Eigene Sonde
RP11-264M12 SG			
RP11-281J9 SG			
RP11-70D24 SO			
RP11-342M22 SO			
RP4-710H13 SG	20q11	<i>MAFB</i>	Eigene Sonde
RP5-1185N5 SG			
RP11-290F20 SO			
RP5-894K16 SO			
Fusionssonden:			
Vysis® LSI® <i>IGH//FGFR3</i> Dual Color, Dual Fusion Translocation Probes	4p16 14q32	<i>MMSET/FGFR3-IGH</i>	Firma Abbott/Vysis
Vysis® LSI <i>IGH/MYC/CEP 8</i> Tri-color Dual Fusion Probe	14q32 8q24	<i>IGH-MYC</i>	Firma Abbott/Vysis
Vysis® LSI® <i>IGH/CCND1</i> Dual Color, Dual Fusion Translocation Probes	4p16 14q32	<i>IGH-CCND1</i>	Firma Abbott/Vysis

3 Methoden

Zytogenetische und molekularzytogenetische Techniken

3.1 Klassische Zytogenetik: Chromosomen-Bänderungsanalyse

Bei der klassischen Zytogenetik handelt es sich um eine Technik zur Chromosomenanalyse. Es werden Metaphase-Chromosomen nach differentieller Färbung anhand von Bänderungstechniken analysiert, sodass numerische und strukturelle Aberrationen (z. B. Translokationen sowie größere Deletionen und Zugewinne) detektiert werden können. Um Metaphasen zu erhalten, muss das Tumormaterial kultiviert und durch mitogene Substanzen zur Teilung angeregt werden. Zu den verwendeten Färbemethoden zählen die G-Bänderung (Färbung mit Giemsa), die Q-Bänderung (Färbung mit Quinacrin) und die reverse Bänderung (R-Bänderung), welche eine der G-Bänderung gegensätzliche Färbung darstellt. Anhand der Größe, der Lage des Zentromers und der Bänderung erfolgt die Erstellung eines Karyogramms. Die international gültige Nomenklatur *International System of Cytogenetic Nomenclature* [ISCN 2016] (Sawyer, 2011) dient der Beschreibung des Karyotyps.

3.1.1 Materialvorbereitung für die Chromosomen-Bänderungsanalyse

Durch die Kultivierung des Patientenmaterials (z. B. Blut, KM oder Lymphknoten (LK)) wurde die Vermehrung der Tumorzellen mit Erhöhung der Mitoserate angestrebt. Bei der anschließenden Aufarbeitung der Zellkulturen wurde durch Zugabe von Colcemid ein Zellteilungsarrest durch Hemmung des Aufbaus des Spindelapparates induziert. Die Zugabe von hypotoner KCl-Lösung bewirkte eine Zunahme des Zellvolumens mit konsekutiver Ausbreitung der Chromosomen innerhalb der Zelle, was zur besseren Darstellung bei der anschließenden Auswertung genutzt wurde.

Das Auftröpfen der Zellsuspension auf gewaschene, kalte Objektträger (OT) führte zum Aufplatzen der Zellmembran, sodass sich die Chromosomen auf dem OT verteilten und bestmögliche Verhältnisse zur Analyse der Chromosomen geschaffen wurden.

3.1.2 Herstellung des konditionierten Mediums (CM) für die Zellkulturen

Zur Herstellung des konditionierten Mediums (CM) wurde Blut von freiwilligen Spendern in Heparinmonovetten entnommen. Zur Sedimentierung wurde das Blut 2-4 h in den Brutschrank

gestellt, bis sich ein Leukozytenring gebildet hatte. Der Leukozytenring wurde abgenommen, gemischt und je 1 ml in eine Zellkulturflasche mit Belüftungskappe, die zuvor mit 9 ml des CM-Ansatzmediums bestückt wurde, gegeben. Die Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂. Danach wurden die im Medium kultivierten Lymphozyten abgenommen und 10 min bei 1300 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in einem großen Erlenmeyerkolben gesammelt. Das Sediment wurde entsprechend entsorgt.

Die Lösung aus dem Erlenmeyerkolben wurde daraufhin in 50 ml-Röhrchen zu je 40 ml abgefüllt. Es wurden Steriflip-Filter auf die Röhrchen aufgeschraubt und die Lösung wurde durch eine Vakuumpumpe gesaugt. In der Klimakammer (Thermotron) wurde der Filter schließlich abgeschraubt und das Röhrchen mit einem sterilen Deckel verschlossen. Die Kulturen wurden bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

3.1.3 Kulturansatz des Patientenmaterials

Bei dem eingesendeten Material handelte es sich bei der Fragestellung bzgl. MM in der Regel um KM-Aspirat. Zum Ansetzen einer Kultur wurde das KM in ein 15 ml-Röhrchen gegeben und auf 14 ml mit RPMI-1640 Zellkulturmedium aufgefüllt. Es wurden 50 µl Zellsuspension für die Zellzählung abgenommen. Je nach Zellzahl wurden daraufhin die für die Diagnose relevanten Kulturen angesetzt: Bei MM handelte es sich hierbei um eine unstimulierte 2-Tages-Kultur (2d-Kultur). Nun wurde die Suspension 10 min bei 1300 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Für die A-Kultur wurden 10×10^6 Zellen mit CM auf 5 ml Gesamtvolumen angesetzt und 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

3.1.4 Aufarbeitung der Zellkulturen

Zur Aufarbeitung der Zellkulturen wurden nach entsprechender Kultivierungsdauer 75 µl Colcemid auf die 5 ml-Kultur gegeben. Die Zellsuspension wurde daraufhin in ein 15 ml-Röhrchen umgefüllt und 10 min bei 1300 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde bis ca. 2 ml über dem Sediment abgesaugt und das Sediment daraufhin resuspendiert. Nun wurde mit 37 °C warmer, 0,075 mol KCl-Lösung bis auf ca. 13 ml aufgefüllt. Die Suspension wurde anschließend für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Zur Präfixierung wurden einige Tropfen eiskaltes Fixativ auf die Zellsuspension gegeben und wieder bei 1300 UpM 10 min zentrifugiert. Dann wurde der Überstand bis auf ca. 2 ml abgesaugt, das Sediment abermals aufgemischt und mit eiskaltem Fixativ auf 14 ml aufgefüllt. Diese beiden Schritte wurden so oft wiederholt, bis das Sediment mit den isolierten Zellkernen

weiß war, mindestens jedoch dreimal, maximal siebenmal. Das Sediment wurde anschließend in 2 ml resuspendiert, in ein Twist Top Vial gefüllt und beschriftet. Die Lagerung der fixierten Zellkerne erfolgte im Kühlschrank.

3.1.5 Chromosomen-Präparation, Färbung und Bänderung sowie deren digitale Aufnahme und Auswertung

Die OT wurden über Nacht in einer Küvette mit Spülmittel gelagert, am nächsten Morgen mit deionisiertem Wasser abgespült und in den Kühlschrank gestellt.

Das Auftröpfen der Zellsuspension erfolgte unter dem Abzug. Die kalten OT wurden zunächst beschriftet. Nach Aufwirbeln der Suspension wurden mit einer Pasteurpipette aus ca. 30 cm Entfernung 5-6 Tropfen auf den OT aufgetropft. Nach dem vollständigen Trocknen der OT erfolgte die Färbung in der Giemsa-Gebrauchslösung für 10 min. Anschließend wurden die OT mit Leitungswasser abgewaschen und in das Metaphasensuchgerät zur Auswertung gelegt. Das Gerät detektiert Metaphase-Chromosomen und fotografiert diese. Jedoch muss zusätzlich eine manuelle Auswertung erfolgen, da zum Teil auch Artefakte fälschlicherweise als Metaphasen gewertet werden. Es sollten circa 40 geeignete Metaphasen vorliegen. Durch Speicherung der Koordinaten und Lokalisation der Metaphasen ist es so möglich, nach Bänderung der Chromosomen die ausgewählten Metaphasen wiederzufinden.

Zur Giemsa-Entfärbung wurden die OT im Anschluss durch eine absteigende Alkoholreihe gezogen (100 %, 95 %, 70 %, 50 %) und mindestens 45 min in Fixativ gelegt. Für die R-Bänderung der Chromosomen erfolgte nun die ChromomycinA3- und Methylgrün-Gegenfärbung. Es wurden 2 Tropfen ChromomycinA3-Lösung auf die OT aufgebracht und eingedeckelt. Luftblasen und überschüssiges Medium wurden vorsichtig entfernt. Die OT wurden eine Stunde unter Lichtausschluss in einer Metallbox gelagert. Im Anschluss wurden die OT weitere 5 min in der Methylgrün-Gebrauchslösung gefärbt. Überschüssige Farbe wurde mit Glycerin abgespült und die OT eingedeckelt.

Die OT wurden daraufhin wieder in das Metaphasensuchgerät eingelegt und die zuvor ausgewählten Metaphasen fotografiert. Die ChromomycinA3-gefärbten Chromosomen werden durch das Fluoreszenzlicht des Gerätes zum Leuchten gebracht.

Mit Hilfe des Computerprogramms Ikaros erfolgte schließlich die Auswertung der Chromosomen und die Erstellung des Karyotyps. Mittels der international gültigen Nomenklatur ISCN 2016 wurde der Karyotyp beschrieben. Bei Verlusten ganzer Chromosomen mussten diese in mindestens 3 Metaphasen nachzuweisen sein, um als klonal beschrieben zu werden. Bei Zugewinnen oder strukturellen chromosomal Aberrationen

sollten diese in 2 Metaphasen detektiert werden können. Ein komplex aberranter Karyotyp wurde bei Nachweis von ≥ 3 numerischen und/oder strukturellen Veränderungen definiert.

3.2 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Bei der FISH handelt es sich um eine molekularzytogenetische Methode zur Sichtbarmachung definierter Chromosomenabschnitte. Ein fluoreszenzmarkiertes DNA-Segment (Sonde) lagert sich an das komplementäre Segment eines DNA-Strangs an, sodass dieses DNA-Zielsegment durch die Fluoreszenz-Markierung sichtbar gemacht wird. Die Analyse erfolgt unter dem Fluoreszenz-Mikroskop, wobei die Auswertung unter Verwendung unterschiedlicher Filter durchgeführt wird.

Die FISH-Analytik kann sowohl in der Metaphase als auch in der Interphase des Zellzyklus durchgeführt werden. Es sind unterschiedliche Sonden für verschiedene Fragestellungen verfügbar. Mit Hilfe von lokusspezifischen Sonden (*Locus Specific Identifiers*, LSI) lassen sich numerische und strukturelle chromosomal Aberrationen identifizieren. *Centromer Enumeration Probes* (CEP) markieren chromosomenspezifische α -Satelliten-DNA, in der Regel im Zentromerbereich, und ermöglichen die Detektion von Aneuploidien oder werden als interner Standard verwendet. Zur Identifizierung von Marker-Chromosomen werden *Whole-Genome-Painting*-Sonden verwendet. Diese markieren das gesamte Euchromatin eines Chromosoms. Zusätzlich wird die gesamte DNA des Zellkerns mit dem interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) zur Beurteilung der Zellkernmorphologie sichtbar gemacht.

Besteht der Verdacht auf numerische Aberrationen, kann dies mit Hilfe eines Zweifarbf-FISH-Assays überprüft werden. Dabei bindet eine Sonde an den zu untersuchenden Genabschnitt und eine Kontrollsonde bindet an einen anderen Abschnitt auf dem gleichen Chromosom. So können Aneuploidien von Deletionen oder Zugewinnen innerhalb des Chromosoms unterschieden werden.

Chromosomale Brüche können durch eine *Break-Apart-Probe* (BAP) ermittelt werden. Dabei handelt es sich um eine Sonde, deren Genregionen im Bruchpunktbereich zweifarbig markiert sind. Die Sonden hybridisieren telomer- und zentromerwärts um den Bruchpunkt. Im physiologischen Zustand werden 2 kolokalisierte Fusionssignale unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar. Besteht allerdings ein Bruch in diesem Bereich, kommt es zum „*Signalsplit*“, sodass die Farbsignale entfernt voneinander liegen.

Soll eine spezifische Translokation nachgewiesen werden, eignen sich *Dual Color/Dual Fusion*-Sonden. Diese überspannen die jeweilige Bruchpunktregion, sodass bei einer

Translokation 2 Fusionssignale und 2 einzelne Signale der jeweiligen Chromosomen zur Darstellung kommen.

Für die FISH können verschiedene Materialien verwendet werden. Dazu zählen Blut, KM, Tumorgewebe, Paraffin-Schnitte, Fruchtwasserzellen, Zytospinpräparate und in Methanol-Eisessig fixierte Zellen. Es wurden in diesem Projekt ausschließlich in Methanol-Eisessig fixierte Zellen verwendet. Es wurden einerseits die nach einer magnetischen Sortierung selektierten CD138-positiven Plasmazellen untersucht und in einigen Fällen auch die unsortierten Leukozyten des KM.

3.2.1 Anreicherung der CD138-positiven Plasmazellen mittels der magnetischen Zellsortierung (*Magnetic Cell Sorting (MACS)*)

Um eine hohe Sensitivität der FISH bei MM zu erreichen, wird die molekularzytogenetische Analyse in der Regel an speziell magnetisch separierten Plasmazellen durchgeführt. Da die Infiltrationsrate der Plasmazellen bei MM sehr gering sein kann, hat die FISH bei unsortiertem Probenmaterial aus dem nativen KM eine eingeschränkte Aussagekraft, da in die Auswertung alle kernhaltigen Zellen miteinbezogen werden. Als Alternative kann die FISH-Analyse mit einer Immunfluoreszenz-Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern für die intrazytoplasmatisch gelegenen Leichtketten κ oder λ (cIG-FISH) kombiniert werden. Beide Methoden bieten die Möglichkeit, speziell die vorliegenden Plasmazellen zu analysieren und sind in der Diagnostik des MM standardmäßig verwendete Methoden. Im vorliegenden Projekt wurde nur die Selektion der Plasmazellen mittels magnetischer Zelltrennung durchgeführt.

Zur Untersuchung des KM wurde das Material einer magnetaktivierten Zellsortierung (MACS) unterzogen. Dabei bindet der mit magnetischen Mikrokugeln markierte Antikörper (AK) CD138 an das entsprechende Antigen auf der Oberfläche der Plasmazellen. Die Zellsuspension wurde durch eine Magnetsäule gegeben, wobei die markierten Plasmazellen an der Magnetsäule hängenblieben und die restlichen Zellen durch Waschgänge entfernt wurden.

Das Probenmaterial wurde in ein 15 ml-Röhrchen gegeben und bis 14 ml mit RPMI-1640 Zellkulturmedium aufgefüllt. Ab einer Zellzahl von 30×10^6 Zellen wurde auch für die klassische Zytogenetik eine 2d-Kultur angelegt. Bei weniger als 30×10^6 Zellen wurde die Negativfraktion als 2d-Kultur angesetzt.

Die Zellsuspension wurde vorsichtig über die gleiche Menge Ficoll (Biocoll separation solution) geschichtet und anschließend 20 min bei 2000 UpM zentrifugiert. Der Zellring wurde abgenommen und in einem neuen Röhrchen mit 14 ml MACS-Puffer gemischt. Abermals wurden die Zellen gezählt. Daraufhin wurde erneut bei 1300 UpM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Je nach Zellzahl wurde die entsprechende Antikörpermenge

(10 µl Ak für je 10×10^6 Zellen) hinzugefügt und anschließend für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden 2 ml Puffer dazugegeben und abermals 10 min bei 1300 UpM zentrifugiert. Zwischenzeitlich wurde die Separationssäule mit 500 µl MACS-Puffer vorgespült. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellsuspension resuspendiert. Danach wurden bei einer Zellzahl bis 100×10^6 Zellen je 500 µl MACS-Puffer hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde nun auf die Säule gegeben und jeweils dreimal mit 500 µl MACS-Puffer gespült. Dann wurde die Säule auf das Eppendorfröhrchen gesetzt und 1 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben. Der Stempel wurde nun auf die Säule aufgesetzt und vorsichtig durchgedrückt. Das Eppendorfröhrchen und die Negativfraktion wurden dann bei 1300 UpM für 10 min zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand bis auf ca. 200 µl abgenommen und unter der Sicherheitswerkbank 1 ml ÜN+CM Medium dazugegeben. Die Aufarbeitung erfolgte am nächsten Tag. Der Überstand der Negativfraktion wurde bis auf ca. 1 ml abgenommen und 1 ml DMSO-Gebrauchslösung hinzugefügt, dann bei -80 °C eingefroren.

3.2.2 Aufarbeitung der CD138-positiven Plasmazellen

Das Eppendorfröhrchen mit der Positivfraktion wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit Kryoröhrchen gestellt und 10 min bei 1300 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen und das Eppendorfröhrchen mit warmer KCl-Lösung aufgefüllt. Anschließend erfolgte für 30 min die Inkubation im Brutschrank. Für die Präfixierung wurden einige Tropfen eiskaltes Fixativ auf die Zellsuspension gegeben. Anschließend wurde die Suspension wieder 10 min bei 1300 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Glaspipette entfernt und mit kaltem Fixativ aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt.

3.2.3 Herstellung lokusspezifischer FISH-Sonden

Für die Herstellung lokusspezifischer FISH-Sonden sind die Ergebnisse des Humanen Genom Projektes (HGP) von zentraler Bedeutung. Im Rahmen dessen wurde die menschliche DNA fragmentiert und in Klonierungsvektoren, sogenannten BACs (*bacterial artificial chromosome*), PACs (*phage artificial chromosome*), YACs (*yeast artificial chromosome*), Fosmide oder Cosmide kloniert. In dieser Arbeit wurden BACs verwendet. Die Klone können in verschiedenen Datenbanken (<http://genome.usc.edu>, <http://ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://sangerac.uk>) eingesehen werden und wurden bei den Anbietern <http://clones.invitrogen.com>, <http://sanger.ac.uk> oder <http://bacpac.chori.org/orderchlones.php> erworben.

Für die Anzüchtung der Klone wurden 50 µl Bakteriensuspension in ca. 3 ml LB-Medium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (z. B. Chloramphenicol) gegeben und 16-24 h bei 37 °C im Schüttelinkubator offen inkubiert. Zur Herstellung der Glycerinstocks wurden 500 µl Bakterienkultur und 500 µl Glycerin verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.4 Präparation der BAC-DNA aus einer Bakterienkultur

10 µl des Bakterienglycerinstocks wurden in 100 ml LB-Medium unter Zugabe von 50 µl Chloramphenicol gegeben. Im Schüttelinkubator wurde die Suspension 16-24 h bei 37 °C inkubiert.

Die DNA-Isolation erfolgte mit dem PhasePrep™ BAC DNA Kit von SIGMA nach Anleitung des Herstellers. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe des Nano Drop® ND-1000 Spektrophotometers (NanoDrop Technologies) bestimmt. Zur Messung bestimmt das Gerät die optische Dichte gegen destilliertes Wasser als Referenz bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Berechnung basiert darauf, dass die optische Dichte doppelsträngiger DNA bei einer Konzentration von 50 µg/l 1 beträgt. Zudem wird das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

3.2.5 Markierung der DNA mittels Random Priming

Die Fluoreszenz-Markierung der DNA erfolgte mit dem Bioprime® DNA Labeling Kit von Invitrogen. Nach der Denaturierung der DNA wurde mittels Random Priming Methode mit Klenow-Fragment (DNA-Polymerase ohne 5'->3'-Exonukleaseaktivität), der markierte Gegenstrang synthetisiert. Dabei kam es nach Zugabe von Oligonukleotiden mit zufälliger Sequenz (Random Primer) zur Anlagerung an das denaturierte DNA-Template. Das Klenow-Fragment synthetisierte nun entlang dieser Primer den komplementären Gegenstrang.

Das im Set zur Biotinylierung vorhandene dNTP-Reagenz wurde durch einen dNTP-Mix mit direkt markierten Nukleotiden ersetzt. Für die Gebrauchslösung wurden die unmarkierten Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) des Desoxynucleoside Triphosphate Set von Roche Life Science mit den Fluoreszenz-markierten dUTP-Nukleotiden gemischt. Die verwendeten Farbstoffe zur Markierung waren Spectrum Green (SG), Spectrum Orange (SO) (Abbott/Vysis) und Diethylaminomethylcoumarin (DEAC) (NEN).

Herstellung der dUTP-Mixtur

Komponente	Konzentration (in mM)	Menge (in µl)
dATP (Roche)	10	2,5
dCTP (Roche)	10	2,5
dGTP (Roche)	10	2,5
dTTP (Roche)	10	1,25
dUTP (Vysis/Abbott) (SO, SG, SA)	1	12,5
Aqua dest.		3,75
Total		25

Es wurde 1 µl DNA mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 24 µl verdünnt. Nun wurden 20 µl 2,5 x Random Primer hinzugefügt und dann für 5 min im siedenden Wasserbad denaturiert. Im Anschluss wurde der Mix sofort für 5 min auf Eis abgekühlt. Daraufhin wurden 5 µl der fluoreszenzmarkierten 10 x-dNTP-Mixtur und 1 µl Klenow-Fragment dazugegeben. Nach vorsichtigem Anzentrifugieren erfolgte die Inkubation im Brutschrank bei 37 °C (Function Line, Heraeus) über Nacht. Die Reaktion wurde am folgenden Tag durch Zugabe von 5 µl Stopp-Puffer beendet.

3.2.6 Aufreinigung der DNA

Für die Aufreinigung wurden Filtersysteme vom Typ Microcon® YM-30 (Milipore) verwendet. Die Säule wurde auf ein 1,5 ml-Tube gesetzt und die am Vortag hergestellte DNA-Mixtur mittig auf den Filter pipettiert, zusätzlich wurden 300 µl H₂O zugegeben. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 14.000 UpM. Der Durchfluss wurde verworfen. Abermals wurden 300 µl H₂O auf die Säule gegeben und wie im vorherigen Schritt zentrifugiert. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 50 µl H₂O auf die Säule, wobei diese umgedreht in ein neues 1,5 ml-Tube gestellt wurde und anschließend bei 5000 UpM für 5 min zentrifugiert wurde. Der Durchlauf mit den fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.7 Sondenfällung mit Cot-1-DNA

Zur Vermeidung unspezifischer FISH-Sonden-Bindung im Bereich repetitiver DNA-Segmente wird zur Blockade dieser Bereiche hochrepetitive humane DNA, genannt Cot-1-DNA verwendet. Dazu wurden zu je 10 µl der farblich markierten Sonden 5 µl Cot-1-DNA pipettiert. 1/10 des Volumens von 3 M Natriumacetat (NaAC) -Lösung, pH 5,3 und das 2,5-fache des Volumens von Ethanol 100 % wurden hinzugefügt und bei 17.000 UpM 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nun erfolgte die Trocknung bei 40 °C für ca. 15 min, abgedunkelt in der Speedvac™ (Thermo Scientific).

Das Pellet wurde anschließend in 10 µl Mastermix aufgenommen und bei Raumtemperatur (RT) im Schüttler (Thermomixer Comfort, Eppendorf) 2 h bei 800 UpM gelöst.

3.2.8 Vorbereitung der Objektträger

Für die FISH-Analyse wurden fixierte Zellen aus der zytogenetischen Routinediagnostik auf die OT aufgetropft. Dazu wurden trockene, ungewaschene OT verwendet. In einer Klimakammer (Thermotron Industries) wurde nach der Beschriftung eine kleine Menge der Suspension mit einer Pasteurpipette entnommen und aus einer Höhe von 2-3 cm in gleichmäßigen Abständen auf den OT aufgebracht. Unter dem Lichtmikroskop erfolgte nun die Auswahl eines geeigneten Hybridisierungsfeldes mit ausreichend Zellen. Der ausgewählte Bereich wurde auf der Rückseite des OT mit einem Diamantschreiber markiert.

Bei durch MACS isolierten CD138-positiven Zellen wurden diese auf ein zuvor mit dem Diamantschreiber markiertes Areal auf den beschrifteten OT pipettiert. Im Falle einer zu geringen Zelldichte nach der Kontrolle im Lichtmikroskop, wurde eine Konzentrierung der Suspensionen durchgeführt. Dafür erfolgte zunächst die Zentrifugation der Suspension bei 2000 UpM für 2 min mit anschließendem Abnehmen des Überstandes. Die übrige Suspension wurde vorsichtig resuspendiert und auf den OT gegeben.

3.2.9 FISH-Verdau

Um einen möglichen, störenden Fluoreszenzhintergrund zu reduzieren und eine bessere Permeabilität der Zellen für die FISH-Sonden zu erzeugen, erfolgte vor der Hybridisierung eine enzymatische Vorbehandlung mit einer Protease. Dieser Schritt erfolgte im VP 2000 Processor von Abbott Molecular. Das Gerät führt die OT selbstständig entsprechend dem ausgewählten Programm durch die verschiedenen Lösungen. Das verwendete Programm enthält folgende Schritte.

FISH Routine Protease

Zeit	Station	Temperatur	Basin
5 min	Protease	37 °C	Basin 2
1 min	H ₂ O	Raumtemperatur (RT)	Basin 14
2 min	1 % Paraformaldehyd	RT	Basin 13
1 min	H ₂ O	RT	Basin 14
2 min	70 % Ethanol	RT	Basin 12
2 min	80 % Ethanol	RT	Basin 11
2 min	100 % Ethanol	RT	Basin 10
5 min	Trocknen	RT	Drying Station

3.2.10 Hybridisierung des Materials

Im Anschluss an den Verdau wurden 1,3 µl Sondenmix auf das markierte Hybridisierungsfeld pipettiert. Es wurde ein Deckgläschen mit Hilfe einer Pinzette auf das Feld gelegt und eventuelle Luftblasen entfernt. Danach wurde das Deckgläschen durch Fixogum Klebstoff luftdicht auf dem OT fixiert.

Zur Denaturierung der DNA-Stränge wurde der OT in einer verschlossenen Metallbox mit einem feuchten Tuch im Wasserbad bei 75 °C 7 min lang erhitzt. Die Hybridisierung erfolgte für 12-72 h bei 37 °C im Brutschrank.

3.2.11 Waschen und Gegenfärbung der Präparate

Nach der Hybridisierung erfolgte eine stringente Abfolge von Waschschritten, um unspezifisch oder nicht gebundene Sonden zu entfernen. Außerdem wurden die Zellkerne und Metaphasen durch eine Gegenfärbung mit dem DNA-bindenden Fluoreszenz-Farbstoff DAPI markiert. Das anschließende Benetzen der OT mit Antifade-Lösung verzögerte das Ausbleichen des Fluoreszenz-Farbstoffes am Mikroskop.

Die Waschung der OT erfolgte nach dem standardisierten Programm des VP 2000 Processors. Die Waschschritte wurden in folgender Reihenfolge durchgeführt:

Zeit	Station	Temperatur	Basin
2 min	Waschpuffer 1	72°C	Basin 1
1 min	Waschpuffer 2	RT	Basin 8
1 min	2 x SSC	RT	Basin 7
5 min	DAPI	RT	Basin 6
ca. 4 min	2xSSC	RT	Basin 7

Um ein Austrocknen der OT zu verhindern, wurden sie bis zum Eindecken in 2 x SSC Puffer gelagert. Folgend wurden 2 Tropfen Antifade Lösung auf ein Deckglas (24 x 60 mm) gegeben und der OT mit der Hybridisierungsseite nach unten auf das Deckglas gelegt. Durch vorsichtiges Drücken wurden Luftblasen und überschüssiges Medium mit einem Zellstofftuch entfernt. Durch die Applikation der Antifade-Lösung wurde eine Verstärkung der Fluoreszenzkraft erreicht. Die Auswertung konnte direkt im Anschluss vorgenommen werden.

3.2.12 FISH-Auswertung

Die Auswertung der OT erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop vom Typ Zeiss Axioskop, Axioskop 2 und Axio Imager A1. Zunächst wurde das Präparat für einen Überblick über die Zellzahl in geringer Vergrößerung mit dem 20 x Objektiv durchgemustert. Die eigentliche Auswertung erfolgte in stärkerer Vergrößerung mit dem 63 x Objektiv oder dem 100 x Objektiv mit Immersionsöl.

Zur Befunderhebung wurden im Fall von sortierten Plasmazellen in der Regel 100 Zellkerne ausgewertet. In einigen Fällen wurden aufgrund der Zellarmut des Materials weniger Zellen ausgezählt, die dann allen auf dem OT vorhandenen Plasmazellen entsprachen. Im Fall der unselektierten KM-Zellen wurden 400 Zellen ausgewertet. Zur Dokumentation wurden mit dem ISIS Programm, Softwareversion 5.1.9 und Version 5.2.11 (Metasystems) 1-3 Bilder aufgenommen.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der klassischen Zytogenetik (Chromosomen-Bänderungsanalyse) und der FISH-Technik die klonale Evolution des MM genauer zu beleuchten. Einige wissenschaftliche Arbeiten thematisierten bereits die Genetik des MM. Vor allem im Hinblick auf eine Risikostratifizierung der Erkrankung wurden bereits prognostisch relevante CA untersucht. Zur möglichst präzisen Abbildung der genetischen Aberrationen, im Kontext des Krankheitsverlaufs über mehrere Jahre, wurden sequentielle Proben von Patienten mit MM analysiert.

4.1 Demographische und klinische Daten des Patientenkollektivs

Es wurde der Krankheitsverlauf von 24 Patienten mit der Diagnose eines MM untersucht, wobei der Fokus auf der klonalen Evolution der malignen Zellen lag. Es wurden solche Fälle in diese Arbeit einbezogen, von denen mindestens Probenmaterial von 3 oder mehr unterschiedlichen Zeitpunkten während des Krankheitsverlaufs zu Verfügung stand. In diesem Kollektiv waren es zwischen 3 und 7 sequentiellen Biopsaten pro Fall, die in die Analyse miteinbezogen werden konnten. Das durchschnittliche Alter der Patienten war 60,8 Jahre (50-74 Jahre). 11 Patienten waren weiblich (45,8 %), 13 waren männlich (54,1 %) (Tabelle 6). In 2 Fällen konnten zudem Zweitneoplasien detektiert werden: In Fall 11 handelte es sich um eine Myeloproliferative Neoplasie (MPN) und in Fall 20 um ein Myelodysplastisches Syndrom (MDS).

Tabelle 6: Demographische Patientendaten (als Mittelwerte und Spannweite angegeben)

Charakteristika	Patienten (n=24)
Geschlecht (w/m)	
• Weiblich: • Männlich	11 (45,8 %) 13 (54,1 %)
Alter (Jahre)	60,8 (50-74)

Von 14 der 24 Patienten konnten einzelne klinische Daten generiert werden. Am häufigsten lag das ISS-Stadium I (5 Patienten) vor, gefolgt von Stadium III (4 Patienten). Bei weiteren 4 Patienten änderte sich im Krankheitsverlauf das ISS-Stadium: einmal von Stadium II auf I, zweimal von II auf III und einmal von I auf III. Ein Patient konnte keinem ISS-Stadium zugerechnet werden. Der häufigste Ig-Isotyp war IgG κ (6 Patienten), gefolgt von IgG λ (3 Patienten), IgA κ (2 Patienten) und bei einer Patientin lag eine Kombination von IgG und IgA

vor. Bei 2 Patienten waren es Leichtkettenmyelome, bei denen nur inkomplette Immunglobuline produziert wurden.

Als therapeutischen Ansatz erhielten 13 von 14 Patienten eine autologe oder allogene SCT. 10 Patienten sind während des Beobachtungszeitraumes verstorben, 2 lebten bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes und bei 2 Patienten konnte der bis dato aktuelle Status nicht erhoben werden. Die mittlere Überlebenszeit betrug 43,6 Monate (17-88 Monate).

4.2 Genetische Aberrationen im untersuchten Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurde die klonale Evolution jener Chromosomenaberrationen untersucht, die eine wichtige Rolle beim Progress und der Prognose des MM spielen. Das Patientenkollektiv wurde dementsprechend hinsichtlich Veränderungen der Chromosomen 1, 8, 11, 13, 14, 17 und 21 mit Hilfe der FISH-Analyse untersucht, speziell auf Zugewinne im Bereich 1q23.1 (*IRTA1/2*-Genort), Zugewinne/Bruchereignisse in den Bereichen 8q24 (*MYC*-Genort) und 14q32 (*IGH*-Genort), Trisomien der Chromosomen 11 (Zentromerregion des Chromosoms 11 und 11q22~23) und 21 (21q22, *RCAN1*-Genort) sowie Deletionen in den Chromosomenregionen 13q14 (*RB1*-Genort) und 17p13 (*TP53*-Genort). Sofern Material vorhanden war und die Untersuchung für die Fragestellung dieser Arbeit relevant war, wurden zusätzliche Versuche zum Nachweis der Translokationen *t(4;14)/MMSET/FGRF3-IGH*, *t(14;16)/IGH-MAF* und *t(14;20)/IGH-MAFB* mit spezifischen Sonden durchgeführt.

Bezüglich der numerischen Aberrationen der Region 13q ist zu erwähnen, dass es sich bei MM in 85 % der Fälle um Monosomien des Chromosoms 13 und nur in etwa 15 % um 13q-Deletionen handelt (Sawyer, 2011). Durch die Nutzung einer FISH-Sonde, welche im Bereich 13q14/RB1 hybridisiert, ist die Differenzierung bzgl. Monosomie 13 oder 13q-Deletion in diesem Kollektiv nicht möglich, jedoch hat dieser Unterschied auch keine prognostische Relevanz (Fonseca et al., 2009). Dementsprechend werden beide Aberrationen in der vorliegenden Arbeit als 13q-Deletion subsumiert.

Außerdem ist zu beachten, dass die hier genutzte Sonde zur Analyse des Chromosoms 21 aufgrund ihrer Hybridisierungslokalisierung in der Region 21q22 streng genommen nur Zugewinne bzw. Aneuploidien des langen Armes von Chromosom 21 detektiert, sodass *per definitionem* ein Zugewinn in diesem Bereich als „partielle“ Trisomie/Tetrasomie bezeichnet werden muss. Da es sich bei dem Chromosom 21 jedoch um ein akrozentrisches Chromosom handelt, werden Zugewinne im Bereich 21q als Äquivalent einer Trisomie 21 anerkannt, sodass in dieser Arbeit die Benennung auch als solche erfolgt.

Insgesamt wurden 115 sequentielle Knochenmarkproben von 24 Patienten mittels der o. g. FISH-Sonden hybridisiert (siehe Tabelle 5). Von 21 Patienten konnten zudem 66 Proben mit Karyotypen aus der Chromosomen-Bänderungsanalyse der Routineuntersuchungen in diese Analyse miteinbezogen werden. Die Konsensus-Karyotypen der FISH-Untersuchungen und Chromosomen-Bänderungsanalysen aller Fälle sind in Tabelle 7 nachzulesen. Dort folgt eine zentrale Übersicht über alle 24 Fälle mit den Untersuchungsergebnissen aus der FISH und der Chromosomen-Bänderungsanalyse pro analysierten Zeitpunkt. Den sequentiellen Untersuchungszeitpunkten sind die vorliegenden Ergebnisse gegenübergestellt. Im Verlauf neu aufgetretene CA sind in der rechten Spalte gesondert dargestellt. Die FISH-Analysen wurden an sortierten CD138-positiven Zellen sowie an Zellen des nativen KM durchgeführt, wenn keine CD138-positiven Zellen zur Verfügung standen. Die aberranten Ergebnisse sind fett markiert. Wenn die Testung an nativen KM-Zellen erfolgte, sind die Ergebnisse blau koloriert.

Tabelle 7: Molekularzytogenetische und zytogenetische Daten des gesamten Patientenkollektivs während des Krankheitsverlaufs

Fall	Datum der Einsendung	Karyotyp	Neu aufgetretene chromosomale Veränderungen
1	10/06	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q22 (RCAN1 x 3) Natives KM: 46,XX[17]	
	12/07	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 1), 21q22 (RCAN1 x 3~4) Natives KM: 46,XX[10]	
	07/09	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 1), 21q22 (RCAN1 x 3) Natives KM: keine Metaphasen	11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3). Trisomie 11.
	08/09	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q22 (RCAN1 x 3) Natives KM: keine Metaphasen	
	10/09	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 3) Natives KM: keine Metaphasen	
2	09/09	CD138+ Zellen: nuc ish 13q14 (RB1 x 1), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)	
	02/10	CD183+ Zellen: nuc ish 13q14 (RB1 x 1), 21q22 (RCAN x 2) Natives KM: 46,XY[7]	
	05/10	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1) Natives KM: 46,XY[10]	
	09/10	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MMSET/FGFR3 con IGH x 1)(IGH prox sep IGH dist x 1) Natives KM: 46,XY[2]	1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3). 1q-Zugewinn.
3	10/04	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 12p11.1~q11 (CEP12 x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17p13 (P53 x 2) Natives KM: 46,XY[20]	

Ergebnisse

	06/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2)	
	11/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2~3, IRTA1/2 dist x 2~3), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, CCND1 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 16q22~23 (MAF prox x 2, MAF dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) (IGH prox sep IGH dist x 1) Natives KM: 46,XY[20]	14q32 (IGH prox sep IGH dist x 1). Bruchereignis im <i>IGH</i> -Gen.
	06/06	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 16q22~23 (MAF prox x 2, MAF dist x 2, CBFA2T3 prox x 2, CBFA2T3 dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) (IGH prox sep IGH dist x 1) Natives KM: 45~46,XY,+1,del(1)(p12),add(1)(p11),add(2)(p21),+5,der(5)t(5;16)(q12;p13),-6,add(6)(p22),dic(9;13)(p24;p13),-13,der(14)t(14;16)(q32;q22~23),-15,der(16)t(5;16)(q12;p13)t(14;16)(q32;q22~23),del(20)(q11q13),+mar[cp2].ish der(14)(IGH prox+, IGH dist-), der(16)(IGH prox-, IGH dist +)	13q14 (RB1 x 1). 13q-Deletion.
	07/08	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 1, IGH dist x 1), 21q22 (RCAN1 x 2) (IGH prox sep IGH dist x 1)	
4	11/04	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 1), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 12p11.1~q11 (CEP12 x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 1, IGH dist x 1), 17p13 (P53 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XY[15]	
	06/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 4p16 (MMSET/FGFR3 prox x 2, MMSET/FGFR3 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2, IGH x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2) Natives KM: 46,XY[14]	
	09/05	CD138+ Zellen: nuc ish 4p16 (MMSET/FGFR3 x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XY[18]	
	04/06	CD138+ Zellen: nuc ish 4p16 (MMSET/FGFR3 x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XY[11]	
	10/08	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 4p16 (MMSET/FGFR3 prox x 1, MMSET/FGFR3 dist x 1), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 1), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XY[20]	
	01/09	CD138+ Zellen: nuc ish 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 1, IGH dist x 1), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XY[6]	

Ergebnisse

	06/09	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 1), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 1, IGH dist x 1), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 45,XY,-8,i(8)(q10),del(13)(q14q21),inc[5]	
5	01/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, FDX x 2, ATM x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 3, IGH dist x 3), 17p13 (P53 x 2), 21q22 (RCAN1 x 3) Natives KM: 46,XY[8]	
	01/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3~4, FDX x 3~4, ATM x 3~4), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 3, IGH dist x 3), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 3) Natives KM: 46,XY[10]	11 (CEP11 x 3~4, FDX x 3~4, ATM x 3~4). Tri. bzw. Tetrasomie 11.
	06/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XY[20]	
	11/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 3, IGH dist x 3), 21q22 (RCAN1 x 3) Natives KM: 46,XY[15]	
	08/13	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 3, IGH dist x 3), 17 (P53 x 2, MPO x 3), 21q22 (RCAN1 x 3)	17 (P53 x 2, MPO x 3). 17q-Zugewinn.
6	06/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: Keine Metaphasen	
	02/06	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 2), 8q24 (MYC x 2), 11 (CEP11 x 2, CCND1 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 3, IGH prox x 2, IGH dist x 2), 16q22~23 (MAF x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1) Natives KM: 46,XX[18]	Klon bei der ersten Untersuchung nicht erfasst.
	09/06	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 2), 8q24 (MYC x 2), 11 (CEP11 x 2, CCND1 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 3, IGH prox x 2, IGH dist x 2), 16q22~23 (MAF x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 20q12 (MAFB prox x 2, MAFB dist x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1)(MAFB prox sep MAFB dist x 1) Natives KM: 46,XX[20]	
	02/07	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 20q12 (MAFB prox x 2, MAFB dist x 2)	

Ergebnisse

	11/08	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 20q12 (MAFB prox x 2, MAFB dist x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1)(MAFB prox sep MAFB dist x 1) Natives KM: 46,XX[16]	
7	07/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 8q24 (MYC x 2), 11 (CEP11 x 2, CCND1 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH x 3, IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17p13 (P53 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1) Natives KM: 46,XY[3]	
	12/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2) Natives KM: 46,XY[20]	
	08/06	CD138+ Zellen: nuc ish 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 14q32 (IGH x 3, IGH prox x 2, IGH dist x 2)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1)	
	01/07	CD138+ Zellen: nuc ish 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 14q32 (IGH x 3)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2)	
8	11/07	CD138+ Zellen: nuc ish 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP 17 x 2, RARA x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: Keine Metaphasen	
	08/08	CD138+ Zellen: nuc ish 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 3, MPO x 3), 21q22 (RCAN1 x 3~4)	Klon bei der ersten Untersuchung nicht erfasst.
	01/09	CD138+ Zellen: Keine Zellen	
	08/09	CD138+ Zellen: nuc ish 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 2), 21q22 (RCAN1 x 3~4)	
9	11/08	CD138+ Zellen: Keine Zellen	
	08/10	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11q13 (CCND1 x 3), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH x 3, IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(CCND1 con IGH x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1) Natives KM: 46,XY[8]	
	04/12	CD138+ Zellen: nuc ish 11q13 (CCND1 x 3), 14q32 (IGH x 3, IGH prox x 2, IGH dist x 2)(CCND1 con IGH x 2) Natives KM: Keine Metaphasen	
	01/13	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, CCND1 prox x 2, CCND1 dist x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XY[14]	

Ergebnisse

10	09/04	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17p13 (P53 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 7 Metaphasen mit unterschiedlichen Einzelzellveränderungen.	Klon bei der ersten Untersuchung nicht erfasst.
	09/05	CD138+ Zellen: nuc ish 11 (CEP11 x 3~4, ATM x 3~4, FDX x 3~4), 13q14 (RB1 x 4), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 4~5, CEP17 x 4~5), 21q22 (RCAN1 x 4~6) Natives KM: 46,XY[16]	
	05/06	CD138+ Zellen: nuc ish 11 (CEP11 x 3~4, ATM x 3~4, FDX x 3~4), 13q14 (RB1 x 4), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 4, CEP17 x 4), 21q22 (RCAN1 x 4)	
	09/07	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3), 13q14 (RB1 x ?4), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 4, CEP17 x 4), 21q22 (RCAN1 x 4) Natives KM: Keine Metaphasen	
11	01/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, FDX x 2, ATM x 2), 13q (RB1 x 1, D13S319 x 1, D13S25 x 1 , D13S327 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17p13 (P53 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XY,del(13)(q14q21)[2]	11 (CEP11 x 3, FDX x 3, ATM x 3). Trisomie 11
	02/05	CD138+ Zellen: nuc ish 11 (CEP11 x 2, FDX x 2, ATM x 2), 13q (RB1 x 1, D13S319 x 1, D13S25 x 1 , D13S327 x 2) Natives KM: 45,X,-Y[3]/46,XY[6]	
	08/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3, FDX x 3, ATM x 3), 13q (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17p13 (P53 x 2) Natives KM: 46,XY,del(13)(q14q21)/46,XY[11]	
	10/07	CD138+ Zellen: nuc ish 11 (CEP11 x 3, FDX x 3, ATM x 3), 13q14 (RB1 x 1), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2)	
	07.06/11	CD138+ Zellen: nuc ish 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XY,del(13)(q12q21) [1]	
	28.06/11	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 1, D13S319 x 1, D13S25 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2) Natives KM: 46,XY,del(13)(q12q21)[6]/46,XY[11]	
	05/14	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XY,del(13)(q12q21)[11]/46,XY[9]	1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3). 1q-Zugewinn.

Ergebnisse

12	04/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XY[18]	8q24 (MYC prox sep MYC dist x 1). Bruchereignis im MYC-Gen.
	10/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XY[20]	
	07/08	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 17 (P53 x 2, MPO x 2)	
	09/08	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 17 (P53 x 2, MPO x 2) Natives KM: 46,XY[10]	
	10/08	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) (MYC prox sep MYC dist x 1) Natives KM: 46,XY[16]	
	06/09	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 8q24 (MYC prox x 2, dist x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3), 17 (P53 x 2, MPO x 3~4) (MYC prox sep MYC dist x 1)	17 (P53 x 2, MPO x 3~4). 17q-Zugewinn.
13	06/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XY[20]	21q (RCAN1 x 3). Trisomie 21.
	06/09	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 3) Natives KM: 46,XY[5]	
	06/11	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 13q14 (RB1 x 2), 21q22 (RCAN1 x 3)	
	06/11	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 3) Natives KM: 46,XY[7]	
14	12/06	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 3, CEP17 x 3), 21q22 (RCAN1 x 2)	21q22 (RCAN1 x 3~4). Tri. bzw.
	05/07	CD138+ Zellen: nuc ish 13q14 (RB1 x 1), 17 (P53 x 3~4, CEP17 x 3~4), 21q22 (RCAN1 x 3~4)	

Ergebnisse

	08/07	CD138+ Zellen: nuc ish 13q14 (RB1 x 1), 21q22 (RCAN1 x 3~4)	Tetrasomie 21.
	02/10	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 4, IRTA1/2 dist x 4), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 1), 17 (P53 x 3, MPO x 3), 21q22 (RCAN1 x 3~4)(MYC prox sep MYC dist x 1) Natives KM: 46,XX[1]	8q24 (MYC prox sep MYC dist x 1). Bruchereignis im MYC-Gen.
	04/11	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 3, MPO x 3), 21q22 (RCAN1 x 3~4)(MYC prox sep MYC dist x 1) Natives KM: 54~56,X,~X,+1,+1,t(1;8)(p12;q24),dic(1;14)(p11;p11),dic(1;15)(p11;p11),der(2)add(p?)add(q?),+3,+i(3)(p10),~4,del(4)(q1?4),+6,add(6)(p2?),del(6)(q?16),+7,+9,del(9)(q13q22),+11,~13,+15,+17,+17,+18,add(18)(p11),add(18)(q22),+21,+21,inc[cp4]//46,XY[2]	11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3). Trisomie 11. 13q14 (RB1 x 2). 13q-Zugewinn.
15	03/07	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3~4), 8q24 (MYC prox x 3~4, dist x 3~4), 11 (CEP11 x 3~4, CCND1 x 3~5, ATM x 3~4, FDX x 3~4), 13q14 (RB1 x 3~4), 14q32 (IGH x 3~5, IGH prox x 3~4, IGH dist x 3~4), 17 (P53 x 2, CEP17 x 3~4), 21q22 (RCAN1 x 3~4)(CCND1 con IGH x 2~3). <i>Tetraploid aberranter Klon.</i>	
	08/07	CD138+ Zellen: nuc ish 11q13 (CCND1 x 3~5), 14q32 (IGH x 3~5)(CCND1 con IGH x 2~3)	
	10/09	CD138+ Zellen: nuc ish 11q13 (CCND1 x 3~5), 14q32 (IGH x 3~5)(CCND1 con IGH x 2~3)	
	12/10	CD138+ Zellen: nuc ish 11q13 (CCND1 x 3), 14q32 (IGH x 3 , IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 1, MPO x 2)(CCND1 con IGH x 2).	
	05/11	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, CCND1 x 5, ATM x 3~4, FDX x 3~4), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH x 4), 17 (P53 x 1, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MYC prox sep MYC dist x 1)(CCND1 con IGH x 3)	1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4). 1q-Zugewinn. 8q24 (MYC prox sep MYC dist x 1). Bruchereignis im MYC-Gen. 13q14 (RB1 x 1). 13q-Deletion.
16	11/07	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 8q24 (MYC prox x 3, MYC dist x 3), 11 (CEP11 x 2, CCND1 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 3, IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 1, CEP 17 x 2, RARA x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1) Natives KM: 46,XX[4]	
	09/08	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 8q24 (MYC prox x 3, MYC dist x 3), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 3), 17 (P53 x 1, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2) Natives KM: 46,XX[3]	
	04/09	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3~10), 8q24	13q14 (RB1 x 1). 13q-Deletion.

Ergebnisse

		(MYC prox x 3, MYC dist x 3), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 1, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2) Natives KM: 44,X,-X,+1,del(1)(p21p31),dic(1;7)(p13~21;p11),del(3)(p12p14),t(4;14)(p16;q32),del(8)(p21),del(11)(q14q24),del(12)(p12),del(13)(q12q33)[3]/80~88<4n>,idemx2[9]	
17	12/07	CD138+ Zellen: nuc ish 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, CCND1 x 2, ATM x 1, FDX x 1), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH x 3 , IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2, RARA x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1)	
	09/08	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 14q32 (IGH x 3)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2)	11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2). 11q-Zugewinn.
	09/09	CD138+ Zellen: nuc ish 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH x 3), 21q22 (RCAN1 x 2)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2)	
	10/09	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 14q32 (IGH x 3)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2)	
	03/10	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 8q24 (MYC prox x 3, MYC dist x 3), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH x 3), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2)	8q24 (MYC prox x 3, MYC dist x 3). MYC-Zugewinn.
18	06/08	CD138+ Zellen: Keine Zellen nach der magnetischen Zellsortierung	
	01/09	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, CCND1 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XX[12]	
	07/11	CD138+ Zellen: nuc ish nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2 CCND1 x 3 , ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 3 , IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MYC prox sep MYC dist x 1)(CCND1 con IGH x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1)(IGH dist dim x 1) Natives KM: 46,XX[7]	Klon bei den Voruntersuchungen nicht erfasst.
	12/11	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11q13 (CCND1 x 3), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 3 , IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MYC prox sep dist x 1)(CCND1 con IGH x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1) Natives KM: 46,XX [10]	
	06/05	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 4p16 (MMSET/FGFR3 prox x 2, MMSET/FGFR3 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2 MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XX[4]	

Ergebnisse

	01/07	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 8q24 (MYC x 3), 11 (CEP11 x 3, CCND1 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH x 3, IGH prox x 2, IGH dist x 2), 16q22~23 (MAF x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q22 (RCAN1 x 3)(MYC con IGH x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1)	Klon bei der ersten Untersuchung nicht erfasst.
	05/08	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 11 (CEP11 x 3, CCND1 prox x 3, CCND1 dist x 3, ATM x 3, FDX x 3), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1)	
	01/09	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH x 3), 21q22 (RCAN1 x 3)(MYC con IGH x 1)	8q24 (MYC x 2) und (MYC con IGH x 1). Verlust einer Kopie des MYC-Gens.
20	05/07	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 4~5), 8q24 (MYC prox x 3~4, MYC dist x 3~4), 11 (CEP11 x 3~4, CCND1 x 3~4, ATM x 3~4, FDX x 3~4), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH x 3~6, IGH prox x 3~4, IGH dist x 3~4), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2~4)(IGH prox sep IGH dist x 1~2). <i>Tetraploid aberranter Klon.</i> Natives KM: 46,XX[5]	
	01/08	CD138+ Zellen: nuc ish 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH x 3, IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1) Natives KM: 46,XX[5]	11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2). Verlust der Tri. bzw. Tetrasomie 11
	05/12	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 2~3), 8q24 (MYC x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 2~3), 17 (P53 x 1, MPO x 2)(MMSET/FGFR3 con IGH x 1~2) Natives KM: 46,XX[1]	13q14 (RB1 x 2). 13q-Zugewinn somit Verlust der 13q-Deletion. 17 (P53 x 1, MPO x 2). Verlust einer Kopie des TP53-Gens.
	09/13	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 8q24 (MYC prox x 3, MYC dist x 3), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 3), 17 (P53 x 1, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) (MMSET/FGFR3 con IGH x 2) Natives KM: 46,XX[20].nuc ish 5 (D5S71/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7q (WBS x 2, D7S486/D7S522 x 2), 8q22 (ETO x 2), 11q24 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17(P53 x 2, MPO x 2), 20q12 (MAFB prox x 2, MAFB dist x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, AML1 x 2)	8q24 (MYC prox x 3, MYC dist x 3). MYC-Zugewinn.
	12/13	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 8q24 (MYC prox x 3, MYC dist x 3), 11 (CEP11 x 3, CCND1 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 14q32 (IGH x 3), 17 (P53 x 1, MPO x 2)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2) Natives KM: 46,XX[20]	11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3). Erneut Trisomie 11
	09/14	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 4p16 (MMSET/FGFR3 x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 13q14 (RB1 x 3~4), 14q32 (IGH x 3), 17 (P53 x 1, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 3~4)(MMSET/FGFR3 con IGH x 2)	8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2). Verlust des MYC-Zugewinns. 13q14 (RB1 x 3~4). Erneut 13q-

Ergebnisse

		<p>Natives KM: 45,XX,-7[23]/46,XX .nuc ish 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7q (WBS x 1, D7S486/D7S522 x 1), 8q22 (ETO x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 20q12 (MAFB prox x 2, MAFB dist x 2), 21q22 (RCAN1 x 2, AML1 x 2)</p>	Zugewinn. 21q22 (RCAN1 x 3~4). Partielle Tri. bzw. Tetrasomie 21.
21	12/07	<p>CD138+ Zellen: nuc ish 4p16 (MMSET/FGFR3 x 2), 8q24 (MYC x 2), 11 (CEP11 x 3, CCND1 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 2, IGH prox x 2, IGH dist x 2), 16q22~23 (MAF x 3), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2, RARA x 2), 21q22 (RCAN1 x 3)</p>	
	03/08	<p>CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)</p> <p>Natives KM: 46,XX[6]</p>	
	06/10	<p>CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 16q23 (MAF prox x 3, MAF dist x 3), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)</p> <p>Natives KM: 46,XX[4]</p>	11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2). Verlust der Trisomie 11. 21q22 (RCAN1 x 2). Verlust der partiellen Trisomie 21.
	07/10	<p>CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 3, IGH prox x 2, IGH dist x 2), 16q22~23 (MAF x 3), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2, MPO x 3), 21q22 (RCAN1 x 4)</p>	17 (P53 x 2, CEP17 x 2, MPO x 3). 17q-Zugewinn. 21q22 (RCAN1 x 4). Erneut auftreten des Zugewinnes von Chromosom 21.
	10/10	<p>CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 16q23 (MAF prox x 3, MAF dist x 3), 17 (P53 x 2, MPO x 3), 21q22 (RCAN1 x 3~4)</p> <p>Natives KM: 46,XX[2]</p>	
22	02/10	<p>CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 11 (CEP11 x 2, CCND1 x 3~4, ATM x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 3~4, IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(CCND1 con IGH x 2~3)</p> <p>Natives KM: 46,XY[10]</p>	
	01/12	<p>CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC x 2), 11q13 (CCND1 x 3~4), 13q14 (RB1 x 2), 14q31 (IGH x 3~4), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 3)(CCND1 con IGH x 2~3)</p>	21q22 (RCAN1 x 3). Partielle Trisomie 21.
	05/13	<p>CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC x 2), 11q13 (CCND1 x 3~4), 13q14 (RB1 x 2), 14q31 (IGH x 3~4), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 3)(CCND1 con IGH x 2~3)</p> <p>Natives KM: nuc ish X (CEPX x 1), Y (CEPY x 1), 5 (D5S721/D5S23 x 2, EGR1 x 2, PDGFRB prox x 2, PDGFRB dist x 2), 7q (WBS x 2, D7S486/D7S522 x 2), 8q22 (ETO x 2), 11q23 (MLL prox x 2, MLL dist x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 20q12 (MAFB prox x 2, MAFB dist x 2), 21q (LSI 21 x 2, AML1 x 2)</p>	
	03/14	<p>CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, CCND1 x 3, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 3), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 3)(CCND1 con IGH x 2)</p> <p>Natives KM: 46,XY[20]</p>	

Ergebnisse

	09/16	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11q13 (CCND1 x 3), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH x 3~4), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 3)(CCND1 con IGH x 2)	
23	01/06	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MYC prox sep MYC dist x 1) Natives KM: 46,XY[20]	
	06/07	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 2p12 (IGK prox x 2, IGK dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(IGK prox sep IGK dist x 1)(MYC prox sep MYC dist x 1) Natives KM: 48~50,X,-Y,t(2;8)(p12;q24),+5,+6,+9,+10,del(13)(q14q21),+19,+22[cp2]/46,XY[5]	
	11/10	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)(MYC prox sep MYC dist x 1)	
	01/12	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 2p11 (IGK prox x 2, IGK dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 13q14 (RB1 x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2) Natives KM: 46,XY[4]	
24	12/06	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 8q24 (MYC prox x 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17p13 (P53 x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)	
	08/08	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 2, IRTA1/2 dist x 2), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 2), 17p13 (P53 x 2, MPO x 2) Natives KM: 46,XX [10]	
	01/09	CD138+ Zellen: nuc ish 11p11.11~q11 (CEP11 x 3)	
	04/09	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3, IRTA1/2 dist x 3), 8q24 (MYC prox x 3, MYC dist x 3), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17p13 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2) Natives KM: 46,XX[10]	1q23.1 (IRTA 1/2 prox x 3, IRTA 1/2 dist x 3). 1q-Zugewinn. 8q24 (MYC prox x 3, MYC dist x 3). MYC-Zugewinn. 13q14 (RB1 x 1)
	09/09	CD138+ Zellen: nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3~4, IRTA1/2 dist x 3~4), 8q24 (MYC prox x 3, MYC dist x 3), 11 (CEP11 x 3, ATM x 3, FDX x 3), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17p13 (P53 x 2, MPO x 2), 21q22 (RCAN1 x 2)	

Aberrante Ergebnisse sind fett markiert. Blau dargestellt sind solche Ergebnisse, welche an Zellen des nativen KM und nicht ausschließlich an CD138 positiven Zellen erhoben wurden.

4.3 Einteilung des Patientenkollektivs hinsichtlich der nachgewiesenen genetischen Aberrationen

Primäre und sekundäre genetische Läsionen bei MM unterscheiden sich im Zeitpunkt der Entstehung. Primäre genetische Veränderungen treten früh auf und spielen eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung, während sich sekundäre Veränderungen unter dem Progress der Erkrankung entwickeln (Kuehl & Bergsagel, 2002). Primäre genetische Läsionen können darüber hinaus jedoch auch im Verlauf der Erkrankung auftreten, dann sollen sie als sekundäre Aberrationen bewertet werden. In Abschnitt 1.4.6 wurde die Einteilung der Patienten aufgrund der primären CA in die zwei Gruppen HMM und NHMM dargestellt. Diese orientierende Einteilung erfolgt aufgrund der vorliegenden zytogenetischen Veränderungen: In die Gruppe der HMM, die durch multiple Zugewinne, v. a. der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 gekennzeichnet ist und in die Gruppe der NHMM, meistens einhergehend mit *IGH*-Translokationen (Sawyer, 2011). Die HMM zeigen meist einen milderer Krankheitsverlauf mit besserer Prognose und längerer Überlebenszeit als die NHMM (Smadja et al., 2001).

Die FISH-Experimente der vorliegenden MM-Fälle wurden in der Routine-Diagnostik des Instituts für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel durchgeführt und durch zusätzliche FISH-Analysen ergänzt. Die Auswahl der eingesetzten FISH-Sonden erfolgte nach der Empfehlung der IMWG: In der Routine-Diagnostik sollte demnach eine Testung auf die prognostisch wichtigen Aberrationen 1q-Zugewinn, 17p13/*TP53*-Deletion und Translokation t(4;14)/*MMSET/FGFR3-IGH* erfolgen (Chng et al., 2014). Im erweiterten FISH-Panel, wie es beispielsweise für Studien durchgeführt wird, sollten die Translokationen t(11;14)/*CCND1-IGH* und t(14;20)/*IGH-MAFB*, 1p-Deletion, 13q-Deletion und der Ploidie-Status analysiert werden (Sonneveld et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Einteilung in die NHMM-Gruppe bei nachgewiesenem Bruchereignis im Bereich 14q32/*IGH* oder 2p12/*IGK* (Fall 23), welcher mit einer BAP-Sonde für den entsprechenden Genlokus untersucht wurde. Des Weiteren wurden für die Translokationen t(4;14)/*MMSET/FGFR3-IGH*, t(8;14)/*MYC-IGH*, und t(11;14)/*CCND1-IGH* spezifische Fusions- oder BAP-Sonden für sonstige *IGH*-Translokationspartner wie 16q32/*MAF* und 20q12/*MAFB* angewendet (siehe Kapitel 2.5). Der Einschluss in die HMM-Gruppe erfolgte bei Nachweis mehrerer Kopien der Chromosomenpaare 11 und 21. FISH-Analysen zur Detektion von Zugewinnen des Chromosoms 11 wurden mit einer Sonde für die Zentromerregion des Chromosoms 11 sowie das *ATM*- und das *FDX*-Gen (je 11q22~23) durchgeführt. Die Analyse bzgl. Aneuploidien des Chromosoms 21 erfolgte mit einer Sonde, welche die Region *RCAN1* im Bereich 21q22 abbildet.

Es ist zudem zu erwähnen, dass in manchen Fällen aufgrund des individuellen Karyotyps mit spezifischen Aberrationen, zusätzliche FISH-Sonden eingesetzt wurden, welche dann in Tabelle 7 vermerkt sind.

Insgesamt konnten 11 Patienten dieses Kollektivs in die HMM-Gruppe eingeschlossen werden (45,8 %, 11/24). Bei den anderen 13 Patienten (54,2 %, 13/24) fand sich in 12 Fällen ein *IGH*-Rearrangement und in Fall 23 ein Bruchereignis im Bereich 2p12/*IGK*. In Fall 4 konnten weder Zugewinne der Chromosomen 11 oder 21, noch eine *IGH*-Translokation detektiert werden. Da die Präsenz von Zugewinnen anderer Genloki, die nicht mittels FISH untersucht wurden, nicht auszuschließen ist, erfolgte die Zuteilung des Falles in die HMM-Gruppe (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Verteilung der Fälle mit einem Karyotyp charakteristisch für HMM und Fälle mit *IGH*-Rearrangement, wie es für NHMM typisch ist

Hyperdiploide MM (HMM)	Non-Hyperdiploide MM (NHMM) (<i>IGH</i> -Rearrangement)
Fall 1	Fall 2 t(4;14)/MMSET/FGFR3- <i>IGH</i>
Fall 4	Fall 3 t(14;16)*
Fall 5	Fall 6 t(14;20)/ <i>IGH</i> -MAFB
Fall 8	Fall 7 t(4;14)/MMSET/FGFR3- <i>IGH</i>
Fall 10	Fall 9 t(11;14)/CCND1- <i>IGH</i>
Fall 11	Fall 15 t(11;14)/CCND1- <i>IGH</i>
Fall 12	Fall 16 t(4;14)/MMSET/FGFR3- <i>IGH</i>
Fall 13	Fall 17 t(4;14)/MMSET/FGFR3- <i>IGH</i>
Fall 14	Fall 18 t(11;14)/CCND1- <i>IGH</i>
Fall 21	Fall 19 t(8;14)/MYC- <i>IGH</i>
Fall 24	Fall 20 t(4;14)/MMSET/FGFR3- <i>IGH</i> Fall 22 t(11;14)/CCND1- <i>IGH</i> Fall 23 t(2;8)/ <i>IGK</i> -MYC

*Fall 3 t(14;16), Eine Beteiligung von MAF oder CBFA2T3 wurde mittels FISH ausgeschlossen. Der Translokationspartner konnte nicht ermittelt werden.

4.3.1 Identifikation numerischer Aberrationen im untersuchten Patientenkollektiv

Numerische chromosomale Aberrationen bzw. chromosomale Zugewinne und/oder Verluste fanden sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (ED) bei 21 von 24 Patienten (87,5 %) und unabhängig vom Zeitpunkt des Auftretens bei 22 von 24 Patienten (91,7 %). Eine detaillierte Darstellung der numerischen Veränderungen im untersuchten Patientenkollektiv befindet sich in Tabelle 9.

Die folgenden prozentualen Anteile beziehen sich alle auf das Gesamtkollektiv von 24 Patienten. In absteigender Frequenz fanden sich folgende numerische Alterationen:

Mit gleicher Häufigkeit waren die Chromosomen 1 und 13 von numerischen Aberrationen betroffen: So wurden 1q-Zugewinne bei 16 Patienten (66,7 %) detektiert und abermals in 16 Fällen (66,7 %) lagen numerische Aberrationen des Chromosoms 13 vor. Es zeigten sich davon in 15 Fällen 13q-Deletionen (62,5 %). In Fall 10 lag ein 13q-Zugewinn im Rahmen eines tetraploiden Klons vor. Zudem konnten in den Fällen 14 und 20 sowohl 13q-Deletionen als auch 13q-Zugewinne nachgewiesen werden, sodass in insgesamt 3 Fällen 13q-Zugewinne (12,5 %) detektiert werden konnten (siehe Tabelle 9).

Tri-/Tetrasomien des Chromosoms 11 lagen bei 13 Patienten vor (54,2 %). Eine Tri-/Tetrasomie 21 wurde bei 10 Patienten (41,7 %) identifiziert. Numerische Veränderungen des Chromosoms 17 fanden sich bei insgesamt 9 Patienten (37,5 %), davon wiesen 3 Fälle eine 17p13/TP53-Deletion (12,5 %) und 6 Fälle einen 17q-Zugewinn bzw. eine Tri-/Tetrasomie 17 auf (25,0 %). Numerische Veränderungen in den Regionen 8q und 16q wurden mit Sonden nachgewiesen, welche in den Bereichen 8q24/MYC bzw. 16q22~23/MAF hybridisieren. Vier Fälle zeigten einen 8q24/MYC-Zugewinn (16,7 %) und in 2 Fällen (8,3 %) konnte ein 8q24/MYC-Verlust detektiert werden. In einem Fall wurde ein 16q-Zugewinn (4,2 %) detektiert. Weitere numerische Veränderungen, die bei einzelnen Patienten mittels FISH nachgewiesen wurden, betrafen die Chromosomenabschnitte 4p und 14q. Numerische Aberrationen im Bereich 4p wurden mit einer FISH-Sonde nachgewiesen, welche spezifisch in der Region 4p16/MMSET/FGFR3 hybridisiert und zeigte je einen Fall mit einem 4p-Zugewinn und einer 4p-Deletion (je 4,2 %). Eine 14q-Deletion und ein 14q-Zugewinn konnten ebenfalls in je einem Fall (4,2 %), ermittelt mit einer Sonde spezifisch für das *IGH*-Gen, identifiziert werden.

Tabelle 9: Häufigkeitsverteilung der numerischen Aberrationen im Gesamtkollektiv. Fälle der HMM und NHMM wurden entsprechend gruppiert

Gruppe	Fall	1q-Zugewinn	+11	13q-Deletion	17p13/TP53-Deletion	+21	Andere
HMM	1	+	+	+	-	+	-
	4	-	-	+	-	-	4p-Deletion, 14q-Deletion
	5	-	+	-	-	+	14q-Zugewinn, 17q-Zugewinn
	8	-	+	-	-	+	Trisomie 17
	10	-	+	-	-	+	13q-Zugewinn, Tetrasomie 17
	11	+	+	+	-	-	-
	12	+	+	-	-	-	17q-Zugewinn
	13	+	-	-	-	+	-
	14	+	+	+	-	+	Tri-/Tetrasomie 17, 13q-Zugewinn
	21	+	+	-	-	+	16q-Zugewinn, 17q-Zugewinn, Verlust der Trisomien 11 und 21
	24	+	+	+	-	-	8q24/MYC-Zugewinn
NHMM	2	+	-	+	-	-	-
	3	+	-	+	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	+	-	-	-
	9	-	-	+	-	-	-
	15	+	-	+	+	-	-
	16	+	-	+	+	-	8q24/MYC-Zugewinn
	17	+	+	+	-	-	8q24/MYC-Zugewinn, 11q-Verlust/11q-Zugewinn
	18	-	-	-	-	-	-
	19	+	+	+	-	+	4p-Zugewinn, 8q24/MYC-Verlust
	20	+	+	+	+	+	8q24/MYC-Zugewinn, 13q-Zugewinn 2x), 11q-Verlust, 8q24/MYC-Verlust
	22	+	-	-	-	+	-
	23	+	+	+	-	-	-

Die jeweilige Veränderung war bei + nachweisbar, bei - nicht nachweisbar.

Außerdem wurde die Verteilung der numerischen Aberrationen auf die zwei Gruppen HMM und NHMM ermittelt. Da die Anzahl der Patienten in den beiden Gruppen ungleich war (11 HMM versus 13 NHMM), wurde der prozentuale Anteil entsprechend den Fällen der einzelnen Gruppe und nicht zur Gesamtanzahl der Fälle berechnet. Sie stellte sich wie folgt dar:

Die Fälle mit einem 1q-Zugewinn waren nahezu dichotom auf beide Gruppen verteilt. Sieben Fälle mit 1q-Zugewinn gehörten zu den HMM (63,6 %, 7/11) und 9 Fälle zu den NHMM (69,2 %, 9/13).

Eine 13q-Deletion war deutlich häufiger in der NHMM-Gruppe zu identifizieren – somit zeigten 10 Fälle bei den NHMM eine 13q-Deletion (76,9 %, 10/13) versus 5 Fälle bei den HMM (45,5 %, 5/11). Die 3 Fälle mit 13q-Zugewinn fanden sich zweimal in der HMM-Gruppe und einmal in der NHMM-Gruppe, was einem Anteil von 18,2 % (2/11) bei den HMM und 7,7 % (1/13) bei den NHMM entspricht.

Im untersuchten Kollektiv wiesen 9 der 11 Patienten der HMM-Gruppe Tri-/Tetrasomien des Chromosoms 11 bzw. einen 11q-Zugewinn auf (81,8 %), in der NHMM-Gruppe waren es 4 Fälle (30,8 %, 4/13).

Tri-/Tetrasomien des Chromosoms 21 wurden in 7 der 11 HMM-Fälle identifiziert (63,6 %), in der NHMM-Gruppe waren es 3 von 13 Fällen (23,1 %).

Erwartungsgemäß gehörten alle 6 Fälle mit einer Tri-/Tetrasomie 17 oder einem 17q-Zugewinn zu den HMM (54,5 %, 6/11), wobei es sich in 3 Fällen um einen partiellen 17q-Zugewinn und abermals in 3 Fällen um eine Tri-/Tetrasomie des Chromosoms 17 handelte (je 27,3 %, 3/11). Demgegenüber lagen alle 3 Fälle mit einer 17p13/TP53-Deletion bei den NHMM vor (23,1 %, 3/13). Eine Übersicht über die Gruppenzugehörigkeit der genannten numerischen Aberrationen bietet Tabelle 9.

4.3.2 Identifikation struktureller Aberrationen im untersuchten Patientenkollektiv

Den *IGH*- bzw. *IGK*-Lokus betreffende Bruchereignisse konnten bei insgesamt 13 der 24 Patienten (54,2 %) nachgewiesen werden. Die *IGH*-Translokation *t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH* lag bei 5 Patienten (20,8 %, 5/24) vor und die *t(11;14)/CCND1-IGH* in 4 Fällen (16,7 %, 4/24), siehe Abbildung 3. Bei je einem Patienten zeigte sich eine Translokation *t(8;14)/MYC-IGH* und eine *t(14;20)/IGH-MAFB*, je (4,2 %, 1/24), siehe Tabelle 10. In Fall 23 war zwar der Genort 14q32/*IGH* unauffällig, aber sowohl in der FISH-Analyse als auch in der Chromosomen-Bänderungsanalyse offenbarte sich eine Translokation *t(2;8)/IGK-MYC* als Variante der Translokation *t(8;14)/MYC-IGH*, weshalb der Fall zu den NHMM gezählt wurde.

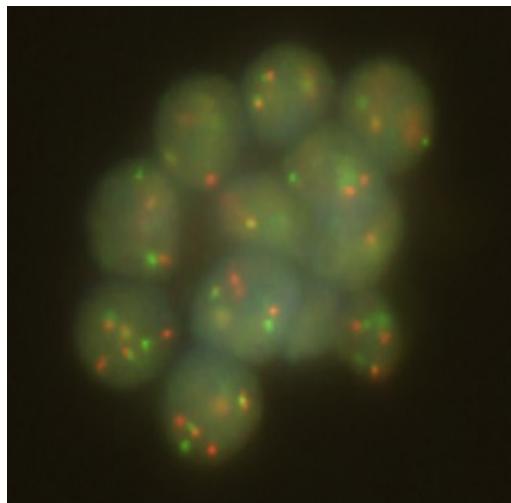


Abbildung 3: Fall 15, Zeitpunkt 05/11: Interphasezellkern mit einer Translokation *t(11;14)/CCND1-IGH*. FISH an per MACS sortierten CD138+ Zellen mit der Sonde LSI *IGH* (14q32)(SG)/*CCND1* XT (11q13)(SO) DCDF (Abbott-Vysis). zu erkennen sind 3 gelbe Fusionssignale der Sonden für die *IGH*- (grün markiert) und *CCND1*-Genorte (rot markiert) aufgrund der Translokation *t(11;14)/CCND1-IGH*. Außerdem sind 2 rote Signale für 2 normale *CCND1*-Genorte und ein grünes Signal für einen normalen *IGH*-Genort zu sehen. Sowohl die überzähligen *IGH-CCND1*-Fusionssignale, als auch die isolierten *CCND1*-Signale sind aufgrund eines tetraploiden Chromosomensatzes entstanden.

Tabelle 10: Fälle mit Bruchereignis im Bereich 14q32/IGH sowie 8q24/MYC und Inzidenz der unterschiedlichen Translokationen in den Gruppen HMM und NHMM

Gruppe	Fall	t(4;14)	t(11;14)	t(14;20)	t(14;16)*	8q24/MYC-Bruch
HMM	1	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	+
	13	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	+ t(1;8)
	21	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
NHMM	3	-	-	-	*	-
	6	-	-	+	-	-
	7	+	-	-	-	-
	9	-	+	-	-	-
	15	-	+	-	-	+
	16	+	-	-	-	-
	17	+	-	-	-	-
	18	-	+	-	-	+
	19	-	-	-	-	+ t(8;14)
	20	+	-	-	-	-
	22	-	+	-	-	-
	23	-	-	-	-	+ t(2;8)

Die Veränderung war bei + nachweisbar, bei - nicht nachweisbar. Fall 3 t(14;16)*: Eine Beteiligung von MAF oder CBFA2T3 wurde mittels FISH ausgeschlossen. Der Translokationspartner konnte nicht ermittelt werden.

In Fall 3 konnte bei bestehendem Bruchereignis im Bereich 14q32/IGH keine der folgenden Translokationen nachgewiesen werden: t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH, t(8;14)/MYC-IGH, t(11;14)/CCND1-IGH und t(14;16)/IGH-MAF. Die Chromosomen-Bänderungsanalyse, kombiniert mit der FISH, zeigte eine Translokation zwischen den langen Armen je eines Chromosoms 14 und 16 mit Beteiligung von 14q32/IGH. Weitere FISH-Analysen mit einer spezifischen Sonde für den CBFA2T3-Genort in 16q24.3 ergaben aber einen unauffälligen Befund, sodass der Translokationspartner des IGH-Genortes in diesem Fall unbestimmt blieb.

Weitere, hier analysierte strukturelle CA waren 8q24/MYC-Bruchereignisse. Das Vorliegen eines Bruches, welcher im Bereich 8q24 das MYC-Gen involviert, ist ein wichtiger prognostischer Faktor bzgl. des Krankheitsverlaufs. Ein 8q24/MYC-Bruch konnte bei insgesamt 6 der 24 Patienten (25,0 %) nachgewiesen werden. Davon gab es 2 Fälle in der HMM-Gruppe (18,2 %, 2/11), einmal mit einer Translokation t(1;8), welche durch die Chromosomen-Bänderungsanalyse offenbart wurde (Fall 14). Vier Fälle mit 8q24/MYC-Bruch zählten zur NHMM-Gruppe (30,8 %, 4/13), darunter die 2 o. g. Fälle mit einer Translokation t(8;14)/MYC-IGH (Fall 19) und einer t(2;8)/IGK-MYC (Fall 23). In den verbleibenden 2 Fällen konnte kein Translokationspartner von 8q24/MYC identifiziert werden.

In den folgenden Abschnitten werden die nachgewiesenen strukturellen und numerischen Aberrationen, hinblickend auf ihren Nachweiszeitpunkt (bei ED oder sekundär entstanden), ausgewertet. Die Analyse der Ergebnisse beachtet zudem die genetische Stabilität der Aberrationen, *ergo* ob sie ab dem Nachweiszeitpunkt sequentiell detektiert werden konnten, oder ggf. während einer der *Follow-Up*-Untersuchungen verschwanden.

4.4 Evolution der untersuchten genetischen Aberrationen im vorliegenden Patientenkollektiv

Im vorliegenden Kollektiv mit 24 Patienten und mindestens 3 zur Verfügung stehenden Einsendungen mit Probenmaterial, konnte bei insgesamt 16 Patienten (66,7 % 16/24) eine Entwicklung im Sinne einer klonalen Evolution nachgewiesen werden. Es kam also im Krankheitsverlauf und unter Therapie zur Entwicklung neuer Aberrationen, welche im Vergleich zum vorherigen Analysezeitpunkt sekundär auftraten. Es wurde eine genetische Stabilität angenommen, wenn die Aberration in aufeinanderfolgenden Knochenmarkbiopsien nachgewiesen wurde, auch wenn in einer zwischenzeitlich durchgeföhrten Analyse keine Testung des Genortes aufgrund der Begrenztheit des Materials durchgeföhrert werden konnte.

In manchen Fällen konnte der aberrante Plasmazellklon bei der ersten FISH-Analyse nicht nachgewiesen werden. Wenn jedoch unter Betrachtung des gesamten Krankheitsverlaufs davon auszugehen ist, dass dieser bereits zum Zeitpunkt der ED vorlag und lediglich nicht erfasst werden konnte, wurde dies auch so in der vorliegenden Analyse gewertet. Diese Fälle sind in den Tabellen der kommenden Unterkapitel markiert, welche die einzelnen CA bzgl. einer klonalen Evolution beleuchten.

Die Häufigkeitsverteilung der Fälle, welche eine Entwicklung im Sinne einer klonalen Evolution zeigten, war mit jeweils 8 Fällen in jeder Gruppe ausgeglichen: Anteilig sind dies in der HMM-Gruppe 72,7 % (8/11) und in der NHMM-Gruppe 61,5 % (8/13). Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 7 (rechte Spalte) nachzuvollziehen.

4.4.1 Klonale Evolution von 14q32/IGH-Translokationen und des 8q24/MYC-Bruches

Bruchereignisse im Bereich des *IGH*-Lokus (einschließlich des Falles mit einem Bruch im *IGK*-Lokus), im Sinne einer Translokation *t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH*, *t(11;14)/CCND1-IGH*, *t(8;14)/MYC-IGH* oder *t(14;20)/IGH-MAFB*, lagen in 12 von 24 Fällen (50,0 %) bei ED vor. Als

sekundäre Veränderung trat ein *IGH*-Bruch nur in Fall 3 der NHMM auf. Der *IGH*-Translokationspartner konnte in diesem Fall nicht ermittelt werden (siehe Abschnitt 4.3.2).

Das Bruchereignis im Bereich 14q32/*IGH* stellte sich in den meisten Fällen als genetisch stabile CA heraus. So war die Veränderung in allen Fällen ab Diagnosestellung sequentiell nachweisbar. In Fall 9 kam es bei der letzten Verlaufskontrolle zur kompletten molekularzytogenetischen Remission (CmCyR), sodass die genetische Stabilität in diesem Fall nicht abschließend beurteilt werden kann. In 3 weiteren Fällen kam es unter Therapie ebenfalls zur CmCyR, wobei es in 2 Fällen zum Rezidiv kam und die vorliegende Translokation t(4;14)/*MMSET/FGFR3-IGH* erneut sequentiell nachweisbar war. Tabelle 11 bietet eine Übersicht über die Inzidenzen und Nachweiszeitpunkte der analysierten strukturellen Aberrationen 14q32/*IGH*-Translokationen und 8q24/MYC-Bruch.

Tabelle 11: Fälle mit Bruchereignis in den Bereichen 14q32/*IGH* und 8q24/MYC, Zeitpunkt des Auftretens und Inzidenz der unterschiedlichen Translokationen.

Gruppe	Fall	t(4;14)	t(11;14)	t(14;20)	t(14;16)*	8q24/MYC-Bruch bei ED	Sekundäre strukturelle Aberration	Aberrationen sequentiell nachweisbar
HMM	12	-	-	-	-	-	8q24/MYC-Bruch	Ja
	14	-	-	-	-	-	8q24/MYC-Bruch t(1;8)(p12q24)	Ja
NHMM	2	(+)	-	-	-	-	-	Ja
	3	-	-	-	+	-	t(14;16)*	Ja
	6	-	-	+	-	-	-	Ja.CmCyR
	7	+	-	-	-	-	-	Ja.CmCyR
	9	-	+	-	-	-	-	Ja.CmCyR*
	15	-	+	-	-	-	8q24/MYC-Bruch	Ja (t(11;14))**
	16	+	-	-	-	-	-	Ja
	17	+	-	-	-	-	-	Ja
	18	-	+	-	-	+	-	Ja (beide)
	19	-	-	-	-	(+) t(8;14)	-	Ja
	20	+	-	-	-	-	-	Ja
	22	-	+	-	-	-	-	Ja
	23	-	-	-	-	+	-	Ja.CmCyR

Die Veränderung war bei + nachweisbar, bei - nicht nachweisbar, (+) Aberration in der ersten Analyse nicht nachweisbar, da der aberrante Klon nicht erfasst wurde oder nicht untersucht werden konnte, aufgrund mangelnder CD138+ Zellen. t(14;16)*, eine Beteiligung von *MAF* oder *CBFA2T3* wurde mittels FISH ausgeschlossen. Der Translokationspartner konnte nicht ermittelt werden. **Bei Fall 15 war die Translokation t(11;14) sequentiell nachweisbar, der 8q24/MYC-Bruch konnte erst zum letzten Beobachtungszeitpunkt nachgewiesen werden. "CmCyR": komplett molekularzytogenetische Remission.

Zusätzlich zu Fall 19 mit der Translokation t(8;14)/MYC-*IGH*, wurden 2 weitere NHMM Fälle mit einem 8q24/MYC-Bruch bei ED nachgewiesen: In Fall 23 lag die Ig-variante Translokation t(2;8)/*IGK-MYC* vor und in Fall 18 ein 8q24/MYC-Bruch, der Translokationspartner konnte jedoch nicht identifiziert werden. Ein 8q24/MYC-Bruch als sekundäre Veränderung kam in 2 HMM und einem NHMM vor (Abbildung 4 und Abbildung 5).

Ein homogenes Bild zeigte sich bei der Frage nach der Stabilität des 8q24/MYC-Bruches über den Beobachtungszeitraum: In allen Fällen war das Bruchereignis kontinuierlich nach Aberrationsnachweis detektierbar. Ergänzend zu erwähnen sind Fall 15, in welchem der 8q24/MYC-Bruch erst zum letzten Untersuchungszeitpunkt auftrat (Abbildung 5) und Fall 23, bei welchem es zur CmCyR bei der letzten Verlaufskontrolle kam. Außerdem kam es in Fall 19 im Verlauf zum Verlust einer Kopie des MYC-Gens.

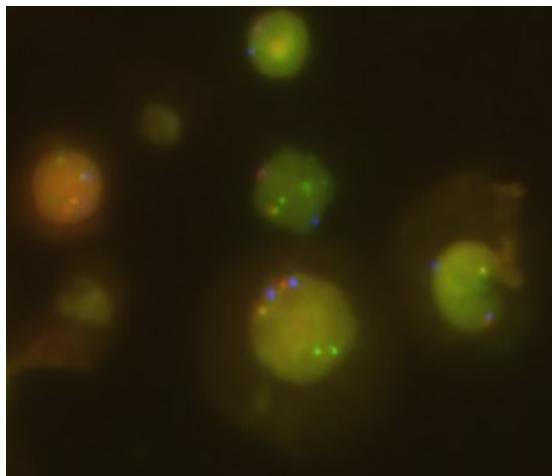


Abbildung 4: Repräsentatives Bild eines Interphasezellkerns mit einer Translokation $t(8;14)/\text{MYC-IGH}$. FISH mit der $t(8;14)$ -Probe an unselektierten, fixierten Zellen. LSI IGH (14q32) (SG), MYC (8q24) (SO), CEP8 (SB) DCFD (Abbott-Vysis). Zu sehen sind gelbe Fusionssignale der Zellen mit der Translokation $t(8;14)$, sowie isolierte rote und grüne Signale der unbeteiligten Chromosomen. Die blauen Signale entsprechen der Zentromerregion des Chromosoms 8.

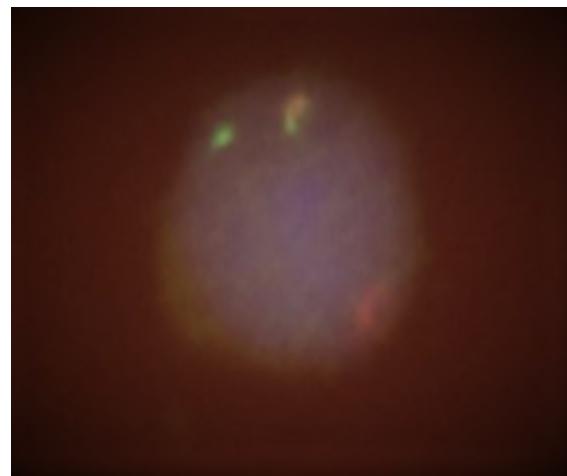


Abbildung 5: Fall 15, Zeitpunkt 05/11: Interphasezellkern mit einem 8q24/MYC-Bruch. FISH an unsortierten Zellen aus dem nativen KM mit der Sonde MYC Dual Color BAP (Abbott-Vysis). Zu erkennen ist ein Fusionssignal entsprechend einem normalen Chromosom 8 und ein Bruch im Bereich 8q24/MYC, belegt durch die Präsenz jeweils eines isolierten roten und eines grünen Signals.

Zusammenfassend waren 14q32/IGH-Translokationen ausschließlich in der NHMM-Gruppe, (als die NHMM definierende CA), zu detektieren. Die üblichen 14q32/IGH-Translokationen lagen alle bereits bei ED vor und waren genetisch stabil.

8q24/MYC-Brüche lagen unter Exklusion der beiden Fälle, die aufgrund der Translokationen $t(8;14)/\text{MYC-IGH}$ und $t(2;8)/\text{IGK-MYC}$ zu den NHMM gerechnet wurden, dichotom in beiden Gruppen vor. 8q24/MYC-Brüche waren sowohl primär als auch sekundär nachzuweisen. Vor allem im Rahmen von nachgewiesenen Translokationen lagen sie auch bei der ED vor. Sie offenbarten sich zudem als hauptsächlich genetisch stabile CA. Demnach sind sowohl die üblichen 14q32/IGH-Translokationen, als auch der 8q24/MYC-Bruch zuverlässige genetische Marker zur Risikostratifizierung des MM.

4.4.2 Klonale Evolution der 1q-Zugewinne

Unter allen 24 Fällen zeigten 16 Fälle einen 1q-Zugewinn (66,7 %, 16/24) und in 11 Fällen (45,8 %, 11/24) lag die Veränderung bereits zum Zeitpunkt der ED vor. Anteilig fand sich ein 1q-Zugewinn bei ED in der HMM-Gruppe in 36,4 % (4/11) und in 53,8 % in der NHMM-Gruppe (7/13). In einzelnen Fällen war der aberrante Klon bei der FISH-Analyse nicht zu erfassen und in Fall 17 konnte keine ergänzende Testung bzgl. 1q-Zugewinn zum ED-Zeitpunkt durchgeführt werden, da das Probenmaterial nicht ausreichte (siehe Tabelle 12).

Als sekundäre Veränderung wurde der 1q-Zugewinn in 5 Fällen nachgewiesen (20,8 %, 5/24 Fälle). Anteilig lag die Detektionsfrequenz des sekundären 1q-Zugewinnes in der HMM-Gruppe bei 27,3 % (3/11) und in der NHMM-Gruppe bei 15,4 % (2/13). In 2 Fällen wurde der 1q-Zugewinn in der FISH-Untersuchung der zweiten Knochenmarkbiopsie nachgewiesen, und in je einem Fall wurde ein neu aufgetretener 1q-Zugewinn in je der dritten, fünften und siebten FISH-Untersuchung detektiert (siehe Tabelle 7). Somit kann ein 1q-Zugewinn als sekundäre Veränderung prinzipiell zu jedem Zeitpunkt der Tumorevolution auftreten.

Tabelle 12: Inzidenz der Fälle mit einem 1q-Zugewinn. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe, bei Erstdiagnose (ED) und unter Krankheitsprogress entstanden, hinblickend auf die genetische Stabilität.

Gruppe	Fall	1q-Zugewinn bei ED	1q-Zugewinn als sekundäre Aberration	Aberration sequentiell nachweisbar
HMM	1	+	-	Ja
	11	-	+	X
	12	+	-	Ja. CmCyR
	13	+	-	Ja
	14	+	-	Ja
	21		+	Ja
	24	-	+	Ja
NHMM	2	-	+	X
	3	+	-	Ja. CmCyR
	15	-	+	X
	16	+	-	Ja
	17	(+)	-	Ja
	19	(+)	-	Ja
	20	+	-	Ja
	22	+	-	Ja
	23	+	-	Ja. CmCyR

Die Veränderung war bei + nachweisbar, bei - nicht nachweisbar, (+) Aberration in der ersten Analyse nicht nachweisbar, da der aberrante Klon nicht erfasst wurde oder nicht untersucht werden konnte, aufgrund mangelnder CD138+ Zellen. CmCyR: komplett molekularzytogenetische Remission. X: Keine Aussage möglich, da der Nachweis des 1q-Zugewinns zum letzten Beobachtungszeitpunkt geschah.

Betrachtet man den 1q-Zugewinn bzgl. genetischer Stabilität, so konnte festgestellt werden, dass er in 13 von 16 Fällen mit 1q-Zugewinn (81,3 %) kontinuierlich über den Beobachtungszeitraum nachgewiesen werden konnte. In 3 Fällen kam es zur CmCyR unter Therapie, jedoch war der 1q-Zugewinn im Anschluss wieder kontinuierlich nachweisbar. In Fall 23 kam es zur CmCyR zum letzten Beobachtungszeitpunkt und wiederum in 3 Fällen trat der

1q-Zugewinn erst zum letzten Zeitpunkt des Beobachtungsintervalls auf, sodass hier die genetische Stabilität nicht abschließend beurteilt werden kann (siehe Tabelle 12).

Die erhobenen Daten zeigen, dass ein 1q-Zugewinn in der Mehrheit der MM zum Zeitpunkt der Initialdiagnose bereits vorhanden ist, jedoch auch als sekundäre Veränderung zu jedem Zeitpunkt auftreten kann. Hinsichtlich der Stabilität der 1q-Zugewinne im Verlauf der Erkrankung wurde beobachtet, dass sie unabhängig vom Zeitpunkt des Nachweises vorlag und der 1q-Zugewinn kontinuierlich über den Beobachtungszeitraum nachgewiesen werden wurde. Somit repräsentiert er eine zuverlässige Tumoraberration zur Verlaufskontrolle des MM.

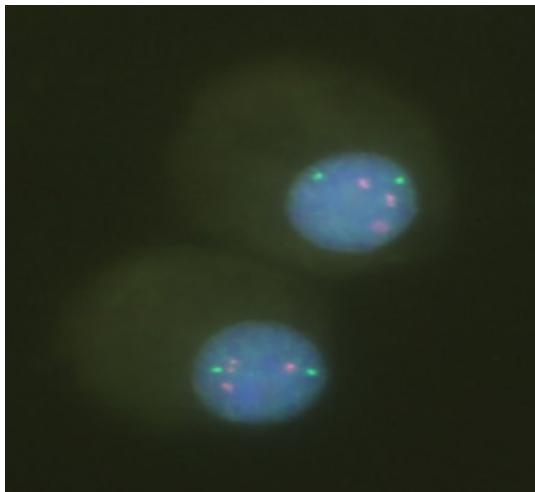


Abbildung 6: Repräsentatives Bild eines Interphasezellkerns mit einem 1q-Zugewinn. FISH an unselektierten, fixierten Zellen mit einer Sonde für das IRTA1/2-Gen auf 1q23.1 (SO) und einer Kontrollsonde auf 1p32 (SG). Die roten Signale repräsentieren die Sonde, die mit dem IRTA1/2-Genort hybridisiert. Bei gleichzeitiger Präsenz von 2 grünen Hybridisierungssignalen für die Kontrollsonde auf 1p32 beweist dies das Vorliegen eines 1q-Zugewinns.

4.4.3 Amplifikationen von 1q23/IRTA1/2 (1q-Amplifikation)

Kürzlich wurde die Amplifikation des Bereichs 1q, definiert als 4 oder mehr (≥ 4) vorliegende Kopien des Bereichs 1q, in einer Hochrisikogruppe von MM Patienten identifiziert (Walker et al., 2019). Diese Patienten wiesen gleichzeitig eine 17p13/TP53-Deletion/Mutation auf und der Krankheitsverlauf war mit einer extrem schlechten Prognose assoziiert. Darüber hinaus zeigte die 1q-Amplifikation eine Aggravation der bereits bestehenden schlechten Prognose, welche die 1q-Zugewinne ohnehin besitzen (Walker et al., 2019).

Analog dazu wurden in diesem Kollektiv die Fälle mit einem 1q-Zugewinn und mit ≥ 4 Kopien des Genlokus 1q23/IRTA1/2 als 1q-Amplifikation gewertet. Es wurden 10 Fälle identifiziert, von denen lediglich 2 Fälle eine anhaltende 1q-Amplifikation mit 1q23/IRTA1/2 x 3~4 in der FISH-Analyse zeigten und welche bereits zum Zeitpunkt der ED bestand. In 8 weiteren Fällen konnten zwischenzeitlich 3 bis 4 Kopien von IRTA1/2 detektiert werden, aber eine kontinuierlich bestehende 1q-Amplifikation konnte nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich

mit jeweils 5 Fällen eine gleichmäßige Verteilung der 1q-Amplifikation auf die Gruppen HMM und NHMM.

Tabelle 13: Inzidenz der Fälle mit 1q-Amplifikation 1q23/RTA1/2. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe HMM und NHMM, bei ED oder sekundär entstanden und genetischer Stabilität

Gruppe	Fall	1q-Amplifikation bei ED	1q-Amplifikation als sekundäre Aberration	Anhaltende 1q-Amplifikation
HMM	1	+	-	Ja
	12	-	+	Nein
	13	-	+	X
	14	-	1q23/RTA1/2 x 4	Nein*
	24	-	+	X
NHMM	3	+	-	Nein
	15	-	+	X
	16	-	+	Nein
	17	(+)	-	Ja
	19	-	+	Nein

Die Veränderung war bei + nachweisbar, bei - nicht nachweisbar, (+) Aberration in der ersten Analyse nicht nachweisbar, da der aberrante Klon nicht untersucht werden konnte, aufgrund mangelnder CD138+ Zellen. Fall 14 Nein*: Amplifikation 1q23/RTA1/2 x 4 zum Zeitpunkt 4/5, zum Zeitpunkt 5/5 1q23/RTA1/2 x 3~4. X: Keine Aussage möglich, da der Nachweis des 1q-Zugewinns zum letzten Beobachtungszeitpunkt geschah.

4.4.4 Klonale Evolution der Tri- bzw. Tetrasomie 11 bzw. des 11q-Zugewinns

Eine Tri-/Tetrasomie 11 bzw. ein 11q-Zugewinn wurde in insgesamt 13 Fällen (54,2 %, 13/24) des Kollektivs nachgewiesen und in 8 Fällen (33,3 %, 8/24) lag die Veränderung bereits zum Zeitpunkt der ED vor (Abbildung 7). Anteilig fand sie sich zum Zeitpunkt der ED in der HMM-Gruppe in 45,5 % (5/11) und in der NHMM-Gruppe mit 23,1 % (3/13), siehe Tabelle 14.

In 5 Fällen (20,8 %, 5/24) kam es erst während des Krankheitsverlaufs zur Entstehung der Tri-/Tetrasomie 11 bzw. des 11q-Zugewinns. Davon gehörten 4 Fälle zu den HMM (36,4 %, 4/11) und lediglich Fall 17 mit einem 11q-Zugewinn (7,7 %, 1/13), zählte zu den NHMM.

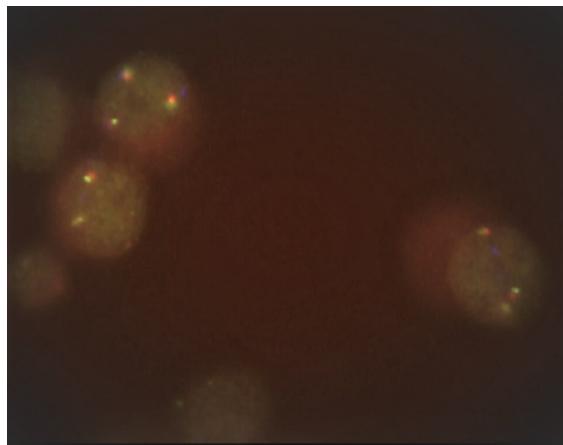


Abbildung 7: Fall 1, Zeitpunkt 08/09: Interphasezellkern mit einer Trisomie 11. FISH an per MACS sortierten CD138+ Zellen mit der 11q/11cen-Sonde: ATM SO (Abbott-Vysis), CEP11 SA Vysis, FDX 420H22 SG. Zu sehen ist eine Trisomie des Chromosoms 11 mit 3 roten und 3 grünen Signalen. Die blauen Signale der Zentromersonde von Chromosom 11 sind nicht in der Abbildung dargestellt.

Tabelle 14: Inzidenz der Fälle mit Tri-/Tetrasomie 11 bzw. 11q-Zugewinn. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe, bei Erstdiagnose (ED) und unter Krankheitsprogress bzw. Persistenz entstanden, hinblickend auf die genetische Stabilität der untersuchten Aberration

Gruppe	Fall	+11 bei ED	+11 als sekundäre Aberration	Aberration sequentiell nachweisbar
HMM	1	-	+	Ja
	5	-	+	Ja. CmCyR
	8	(+)	-	(Ja)
	10	(+)	-	Ja
	11	-	+	Ja. CmCyR
	12	+	-	Ja. CmCyR
	14	-	+	X
	21	+	-	Nein
NHMM	24	+	-	Ja
	17	-	+11q	Ja
	19	(+)	-	Ja
	20	+	-	Nein
	23	+	-	Ja. CmCyR

Die Veränderung war bei + nachweisbar, bei - nicht nachweisbar, (+) Aberration in der ersten Analyse nicht nachweisbar, da der aberrante Klon nicht erfasst wurde oder nicht untersucht werden konnte aufgrund mangelnder CD138+ Zellen. Fall 5: (ja): Tris. 11 in 2 Proben nachweisbar, aber keine lückenlose Testung vorliegend. Fall 14: X: Nachweis der +11 zum letzten Beobachtungszeitpunkt. CmCyR: komplett molekularzytogenetische Remission.

Die Tri-/Tetrasomie 11 bzw. der 11q-Zugewinn zeigte in 10 von 13 Fällen (76,9 %) ein stabiles genetisches Muster, siehe Tabelle 14.

In Fall 17 entwickelte sich der 11q-Zugewinn aus einer 11q-Deletion, welche bereits bei der initialen Diagnosestellung nachgewiesen wurde. Der 11q-Zugewinn war wiederum stabil in den Folgeuntersuchungen nachweisbar.

In 4 Fällen kam es im Verlauf zur Remission der Erkrankung, davon in Fall 23 zum letzten Beobachtungszeitpunkt. In 3 dieser Fälle war die Tri-/Tetrasomie 11 unter Progress wieder stabil nachweisbar.

Einzelne Fälle offenbarten jedoch eine genetische Instabilität der Tri-/Tetrasomie 11: So zeigte die Tri-/Tetrasomie 11 in Fall 20 eine genetische Instabilität: Sie bestand bei ED, jedoch kam es während des 2. Beobachtungszeitpunktes zum Verlust der Tri-/Tetrasomie 11 und zum 5. Beobachtungszeitpunkt konnte erneut eine Trisomie 11 nachgewiesen werden.

Ein ebenso instabiler Verlauf der Trisomie 11 zeigte sich in Fall 21: Hier lag bei der ED zunächst eine Trisomie 11 vor, zum Zeitpunkt der 2. Untersuchung kam es zur CmCyR. In der Rezidivsituation bei der 3. Beobachtung zeigte sich schließlich ein Verlust der Trisomie 11.

Zusammenfassend lag die Tri-/Tetrasomie 11 erwartungsgemäß vorwiegend in der HMM-Gruppe vor. Insgesamt bestand sie zwar in der Mehrheit der Fälle bereits bei der ED, jedoch kam es auch zur sekundären Entstehung, was ebenso häufiger in der HMM-Gruppe der Fall war. In einzelnen Fällen konnte eine genetische Instabilität der Tri-/Tetrasomie 11 offenbart werden, was im Rahmen einer Risikostratifizierung anhand einer vorliegenden Trisomie 11 bedacht werden sollte.

4.4.5 Klonale Evolution der 13q-Deletion

In Abschnitt 4.3.1 wurde bereits erwähnt, dass numerische Aberrationen des Bereichs 13q in 16 Fällen des Kollektivs identifiziert werden konnten. Davon hatten 15 Fälle eine 13q-Deletion (62,5 %, 15/24), welche in 11 Fällen (45,8 %, 11/24) bereits bei der ED vorlag. Die Verteilung auf die beiden Gruppen HMM und NHMM bei der ED war mit 53,8 % (7/13) auf die Seite der NHMM gewichtet, im Vergleich zu 36,4 % (4/11) bei den HMM, siehe Tabelle 15. In 4 Fällen (16,7 %, 4/24) kam es erst unter Progress zur Entwicklung der 13q-Deletion, wovon 3 Fälle zu den NHMM gehörten (23,1%, 3/13) und nur ein Fall zu den HMM (9,1 %, 1/11).

In 8 der 15 Fälle (53,3 %) war die 13q-Deletion stabil und sequentiell ab Aberrationsnachweis detektierbar. Die Fälle teilten sich dichotom auf die Kategorien HMM und NHMM auf. Davon kam es in 2 Fällen zur CmCyR mit anschließendem sequentiellem Nachweis in der Rezidivsituation (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Inzidenz der Fälle mit 13q-Deletion. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe, CA bei Erstdiagnose (ED) und unter Krankheitsprogress bzw. Persistenz entstanden, hinblickend auf die genetische Stabilität der untersuchten Aberration

Gruppe	Fall	13q-Deletion bei ED	13q-Deletion als sekundäre Aberration	Aberration sequentiell nachweisbar
HMM	1	+	-	Ja
	4	+	-	Ja CmCyR
	11	+	-	Ja CmCyR
	14	+	-	Nein
	24	-	+	Ja
NHMM	2	+	-	Ja
	3	-	+	Ja
	7	+	-	CmCyR*
	9	(+)	-	CmCyR
	15	-	+	X
	16	-	+	X
	17	+	-	Ja
	19	(+)	-	Ja
	20	+	-	Nein
	23	+	-	CmCyR

Die Veränderung war bei + nachweisbar, bei - nicht nachweisbar, (+) Aberration bei der ersten Analyse nicht nachweisbar, da der aberrante Klon nicht erfasst wurde oder nicht untersucht werden konnte, aufgrund mangelnder CD138+ Zellen.; X: Nachweis der -13q zum letzten Beobachtungszeitpunkt. Fall 7: CmCyR* Nach CmCyR in der Rezidivsituation aufgrund mangelnder CD138+ Zellen keine Testung bzgl. -13q möglich. CmCyR: komplett molekularzytogenetische Remission.

In 2 Fällen zeigte sich eine genetische Instabilität: In Fall 20 bestand bei ED eine 13q-Deletion. Unter Progress kam es zum Zeitpunkt der 3. Untersuchung zum 13q-Zugewinn. Daraufhin kam es im Rahmen der nächsten Evolution zum erneuten 13q-Zugewinn.

Ebenso verhielt es sich in Fall 14, wo im Verlauf der klonalen Evolution aus einer 13q-Deletion, welche bereits bei ED bestand, ein 13q-Zugewinn entstand. Die Karyotypen beider Fälle sind in Tabelle 7 nachzulesen.

In den weiteren Fällen kam es entweder beim letzten Beobachtungszeitpunkt zur CmCyR oder es konnte aufgrund des spärlichen Materials keine weitere FISH-Analyse bzgl. einer 13q-Deletion erfolgen. In 2 Fällen trat die 13q-Deletion erst zum letzten Beobachtungszeitpunkt auf. In diesen Fällen konnte keine Aussage zur genetischen Stabilität erfolgen (siehe Tabelle 15).

Zusammenfassend zeigte die 13q-Deletion tendenziell eine höhere Inzidenz in der NHMM-Gruppe. Sie konnte überwiegend bereits zum ED-Zeitpunkt detektiert werden und zeigte mehrheitlich ein stabiles genetisches Muster. Dennoch konnte in 2 Fällen eine genetische Instabilität mit Entwicklung eines 13q-Zugewinnes detektiert werden. Da die 13q-Deletion als prognostischer Marker bei MM gilt, ist hier eine mögliche genetische Instabilität zu beachten.

4.4.6 Klonale Evolution der 17p13/TP53-Deletion

Alle 3 Fälle mit 17p13/TP53-Deletion (12,5 %, 3/24) gehörten zur Gruppe der NHMM (Abbildung 8). In 2 der 3 Fällen mit 17p13/TP53-Deletion war diese bereits zum Zeitpunkt der ED nachweisbar. In Fall 20 trat die 17p13/TP53-Deletion erst im Verlauf der Erkrankung auf. In allen 3 Fällen konnte die 17p13/TP53-Deletion stabil und sequentiell nachgewiesen werden. Eine Übersicht über den Zeitpunkt des Nachweises und die genetische Stabilität pro Fall gibt Tabelle 16.

Tabelle 16: Inzidenz der Fälle mit 17p13/TP53-Deletion. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe (NHMM), bei Erstdiagnose (ED) und unter Krankheitsprogress bzw. Persistenz entstanden, hinblickend auf die genetische Stabilität der untersuchten Aberration

Gruppe	Fall	17p13/TP53-Deletion bei ED	17p13/TP53-Deletion als sekundäre Aberration	Aberration sequentiell nachweisbar
NHMM	15	+	-	Ja
	16	+	-	Ja
	20	-	+	Ja

Die Veränderung war bei + nachweisbar, bei - nicht nachweisbar.

Insgesamt stellte die 17p13/TP53-Deletion eine CA dar, welche ausschließlich bei den NHMM vorlag, eher bereits bei ED bestand und ausnahmslos genetisch stabil war. Somit stellt sie einen verlässlichen genetischen Marker zur Verlaufskontrolle bei MM dar.

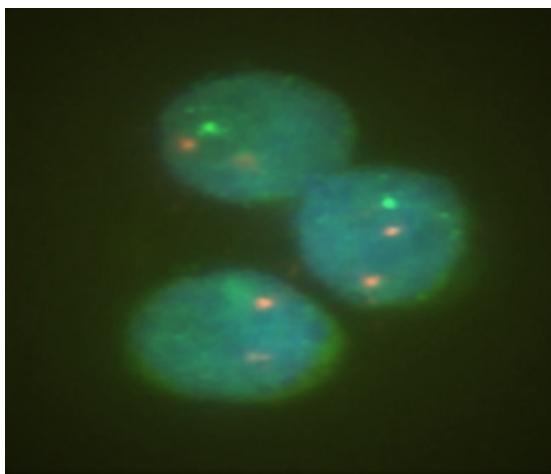


Abbildung 8: Repräsentatives Bild eines Interphasezellkerns mit 17p13/TP53-Deletion. FISH an per MACS sortierten CD138+ Zellen mit der TP53/MPO Probe. Zu erkennen sind ein grünes Signal für den TP53-Lokus im Bereich 17p13 und 2 rote Signale für das MPO-Gen in 17q23 (Kontrollsonde).

4.4.7 Klonale Evolution der Tri- bzw. Tetrasomie 17 und des 17q-Zugewinns

In 6 Fällen (25,0 %, 6/24) zeigten sich 17q-Zugewinne sowie Tri-/Tetrasomien des Chromosoms 17, welche alle zu den HMM zählten (54,5 %, 6/11). Alle 3 Fälle mit 17q-Zugewinn (12,5%, 3/24) traten sekundär im Verlauf der Erkrankung auf. Im Gegensatz dazu lag in allen 3 Fällen mit Tri-/Tetrasomie 17 (12,5 %, 3/24) diese bereits zum Zeitpunkt der ED vor, siehe Tabelle 17.

Tabelle 17: Inzidenz der Fälle mit Tri-/Tetrasomie 17 und 17q-Zugewinn. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe (HMM), bei Erstdiagnose (ED) und unter Krankheitsprogress bzw. Persistenz entstanden, hinblickend auf die genetische Stabilität der untersuchten Aberration

Gruppe	Fall	Zugewinn 17q/+17 bei ED	Zugewinn 17q/+17 als sekundäre Aberration	Aberration sequentiell nachweisbar
HMM	5	-	+	X
	8	(+)	-	X*
	10	(+)	-	Ja
	12	-	+	X
	14	+	-	Ja
	21	-	+	Ja

Die Veränderung war bei + nachweisbar, bei - nicht nachweisbar, (+) Aberration bei der ersten Analyse nicht nachweisbar, da der aberrante Klon nicht erfasst wurde oder nicht untersucht werden konnte aufgrund mangelnder CD138+ Zellen. X: Nachweis des Zugewinns 17q/ Tri-/Tetrasomie 17 zum letzten Beobachtungszeitpunkt. Fall 8 X*: Keine Folgetestung aufgrund mangelnder CD138+ Zellen möglich.

Der 17q-Zugewinn und die Tri-/Tetrasomie 17 konnten in 3 Fällen stabil und sequentiell nachgewiesen werden. In den 3 übrigen Fällen entstand der 17q-Zugewinn erst zum letzten Beobachtungszeitpunkt oder es konnte keine weitere FISH-Analyse bzgl. Aberrationen des Chromosoms 17 aufgrund der geringen Materialmengen durchgeführt werden. Somit kann in diesen Fällen keine Aussage bzgl. der genetischen Stabilität gemacht werden kann (siehe Tabelle 17).

Insgesamt zeigte sich der 17q-Zugewinn bzw. die Tri-/Tetrasomie 17 in dieser Analyse als CA der HMM mit gleichmäßiger Verteilung bzgl. des Entstehungszeitpunktes. In den Fällen, in denen die genetische Stabilität beurteilt werden konnte, war sie vorhanden.

4.4.8 Klonale Evolution der Tri- bzw. Tetrasomie 21

Wie bereits in Kapitel 4.2 erwähnt, erfolgte der Nachweis der Aneuploidien des Chromosoms 21 mit einer Sonde, welche im Bereich 21q22 hybridisiert und dadurch nur Zugewinne bzw. Aneuploidien des langen Armes von Chromosom 21 detektiert (Abbildung 9). Da es sich bei Chromosom 21 jedoch um ein akrozentrisches Chromosom handelt, wird auf den Zusatz „partielle“ Trisomie 21 verzichtet.

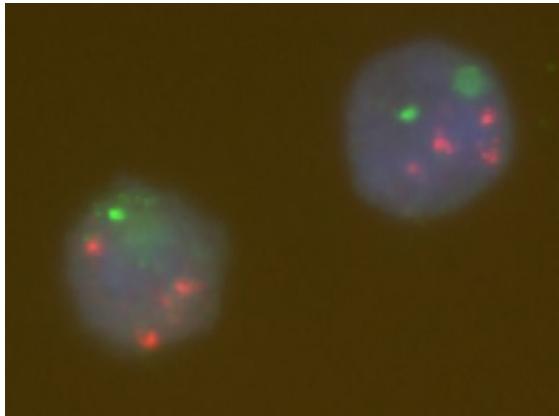


Abbildung 9: Fall 1, Zeitpunkt 08/09: Interphasezellkern mit einem 21q-Zugewinn. FISH an per MACS selektierten CD138+ Zellen mit der Sonde PN13(13q13)/21 (21q22). Zu sehen ist eine Tetrasomie des Chromosoms 21 mit 4 roten Signalen. Für das Chromosom 13 ergab sich eine unauffällige Signalkonstellation mit 2 grünen Signalen.

Insgesamt wurde eine Tri-/Tetrasomie 21 in 10 Fällen (41,7 %, 10/24) detektiert. In 6 Fällen (25 %, 6/24) konnte die Tri-/Tetrasomie 21 bereits bei der ED nachgewiesen werden, davon mit 45,5 % (5/11) hauptsächlich bei den HMM, im Vergleich zu 7,7 % (1/13) bei den NHMM. In 4 Fällen (16,7 %, 4/24) kam es erst im Verlauf der Erkrankung zur Entstehung der Tri-/Tetrasomie 21, die sich mit jeweils 2 Fällen dichotom auf beide Gruppen aufteilte, siehe Tabelle 18.

Tabelle 18: Inzidenz der Fälle mit Tri-/Tetrasomie 21. Fälle unterteilt nach genetischer Gruppe, bei Erstdiagnose (ED) und unter Krankheitsprogress bzw. Persistenz entstanden, hinsichtlich auf die genetische Stabilität der untersuchten Aberration

Gruppe	Fall	+21 bei ED	+21 als sekundäre Aberration	Aberration sequentiell nachweisbar
HMM	1	+	-	Ja
	5	+	-	Ja CmCyR
	8	(+)	-	Ja
	10	(+)	-	Ja
	13	-	+	Ja
	14	-	+	Ja
	21	+	-	Nein
NHMM	19	(+)	-	Ja
	20	-	+	X
	22	-	+	Ja

Die Veränderung war bei + nachweisbar, bei - nicht nachweisbar, (+) Aberration bei der ersten Analyse nicht nachweisbar, da der aberrante Klon nicht erfasst wurde; X: Nachweis der Tri-/Tetrasomie 21 zum letzten Beobachtungszeitpunkt.: CmCyR: komplett molekularzytogenetische Remission.

Genetische Stabilität lag in 8 Fällen vor (80,0 %, 8/10). In Fall 20 entstand die Tri-/Tetrasomie 21 erst zum letzten Zeitpunkt des Beobachtungsintervalls, sodass eine Aussage bzgl. der genetischen Stabilität in diesem Fall nicht zu treffen ist (siehe Tabelle 18).

Fall 21 stellt insofern eine Besonderheit dar, als dass ein instabiler Verlauf der Tri-/Tetrasomie 21 offenbart wurde. Bei ED lag zunächst eine Tri-/Tetrasomie 21 vor, im Rahmen des Krankheitsprogress kam es dann jedoch zum Verlust. In der darauffolgenden Analyse trat jedoch wieder eine Tetrasomie 21 auf (siehe Tabelle 7).

Insgesamt lässt sich die Tri-/Tetrasomie 21 als CA subsumieren, welche erwartungsgemäß vorwiegend in der HMM-Gruppe vorlag. Sie zeigte bzgl. ihres Entstehungszeitpunktes ein heterogenes Muster, mit nahezu gleichmäßiger Verteilung bzgl. primär vorliegend versus sekundär entstanden. Die Tri-/Tetrasomie 21 war vorwiegend genetisch stabil, jedoch sollte eine mögliche Instabilität durch größere Studien beleuchtet werden und bei der Risikostratifizierung des MM beachtet werden.

4.4.9 Inzidenz und klonale Evolution weiterer rekurrenter CA

In diesem Abschnitt werden weitere numerische Aberrationen besprochen, welche in dieser Arbeit detektiert wurden. Alle Fälle mit den genannten Aberrationen sind in Tabelle 7 und Tabelle 9 detailliert aufgeführt und können dort nachvollzogen werden.

Es zeigten sich folgende weitere numerische Aberrationen in dieser Kohorte: **8q24/MYC-Zugewinne** lagen in 4 Fällen vor (16,7 %, 4/24), wovon 3 Fälle zu den NHMM gehörten (23,1 %, 3/13) und ein Fall zu den HMM (9,1 %, 1/11), siehe Tabelle 9. In Fall 16 (NHMM) lag der 8q24/MYC-Zugewinn bereits bei ED vor (4,2 %, 1/24), bei den anderen 3 Fällen trat er als

sekundäre Aberration auf (12,5 %, 3/24), wovon 2 Fälle zu den NHMM zählten (15,4 %, 2/13) und ein Fall zu den HMM (9,1 %, 1/11). Bezuglich genetischer Stabilität zeigte der 8q24/MYC-Zugewinn ein heterogenes Bild: So war er in den Fällen 16 und 24 stabil und sequentiell nachweisbar, in Fall 17 wurde er erst in der letzten FISH-Testung nachgewiesen, sodass keine Aussage zur genetischen Stabilität gemacht werden kann. In Fall 20 kam es im Rahmen der evolutionären Entwicklung zum 8q-Zugewinn, jedoch folgte in der weiteren Progression der Verlust des 8q24/MYC-Zugewinns.

Eine **8q24/MYC-Deletion** lag in den Fällen 19 und 20 des Kollektivs vor (8,3 %, 2/24). Beide Fälle gehörten zu den NHMM (15,4 %, 2/13) und die 8q24/MYC-Deletion entstand jeweils sekundär. In beiden Fällen kam es zum letzten Beobachtungszeitpunkt zur 8q24/MYC-Deletion, wobei sie in Fall 20 aus einem zuvor vorliegenden 8q24/MYC-Zugewinn entstand und in Fall 19 aus einer bestehenden Translokation t(8;14)/MYC-IGH.

In 3 Fällen konnte ein **13q-Zugewinn** detektiert werden (12,5 %, 3/24). Zwei Fälle gehörten zu den HMM (18,2 %, 2/11) und ein Fall zu den NHMM (7,7 %, 1/13). In Fall 10 lag dieser bereits zum ED-Zeitpunkt vor, in den anderen 2 Fällen entstand er sekundär im Rahmen der klonalen Evolution. In Fall 20 entwickelte sich der 13q-Zugewinn sekundär bei primär bestehender 13q-Deletion. So kam es in diesem Fall sogar zu 2 Zeitpunkten zum 13q-Zugewinn bei der klonalen Evolution unter Erkrankungsprogression. Auch in Fall 14 entwickelte sich der 13q-Zugewinn sekundär bei zunächst primär bestehender 13q-Deletion, siehe Abschnitt 4.4.5. In Fall 10 konnte die Entwicklung der Aberration aufgrund mangelnden Materials leider nicht weiterverfolgt werden.

Zu den weiteren detektierten CA zählten numerische Aberrationen des Bereichs 4p: So gab es je einen Fall mit einem **4p-Zugewinn** und einen Fall mit einer **4p-Deletion** (je 4,2 %, 1/24). Fall 4 mit der 4p-Deletion zählte zu den HMM (9,1 %, 1/11) und Fall 19, welcher einen 4p-Zugewinn aufwies, gehörte zu den NHMM (7,7 %, 1/13). In beiden Fällen wurde die Aberration zum ED-Zeitpunkt detektiert, jedoch konnten keine Daten zur weiteren Verfolgung des genetischen Verlaufs ermittelt werden.

4.5 Kombination simultan aufgetretener CA

Aufgrund der Vielzahl der analysierten Proben unter Verwendung der o. g. Sonden, konnten mehrere kombiniert auftretende CA detektiert werden. Bei wiederkehrender Kombination CA in mindestens 3 Fällen, wurde diese in die Zählung aufgenommen. So waren es in der vorliegenden Arbeit 15 Zweifachkombination und 5 Dreifachkombinationen, die in mindestens 3 Fällen vorlagen. Manche konnten als zeitgleich primär vorliegende oder simultan sekundär entstandene Kombinationen offenbart werden. Andere, zeitweise simultan nachgewiesenen Kombinationen, entstanden wiederum im Rahmen einer evolutionären Entwicklung einzelner CA – diese Fälle sind in Tabelle 19 und Tabelle 20 in Klammern dargestellt. Es gab zudem CA, die pro Fall, jedoch nicht zeitgleich vorlagen. Diese wurden nicht in die Auswertung eingeschlossen. Eine Übersicht über die detektierten Kombinationen in den verschiedenen Fällen, unter Beachtung der genetischen Gruppenzugehörigkeit HMM oder NHMM, bieten Tabelle 19 und Tabelle 20.

Am häufigsten mit 12 Fällen (50 %, 12/24) trat die Kombination aus 1q-Zugewinn und 13q-Deletion auf. In 6 Fällen (25 %, 6/24) waren die beiden genannten CA simultan nachweisbar und davon in Fall 24 simultan sekundär im Rahmen der klonalen Evolution. In den weiteren 6 Fällen entstand die Kombination erst durch die sekundäre Entstehung einer der beiden Aberrationen (siehe Tabelle 19).

Aufgrund der Assoziation von Trisomien der Chromosomen ungerader Zahlen zur hyperdiploiden Gruppe bei MM (Sawyer, 2011), war die hohe Frequenz der Kombinationen aus 1q-Zugewinn und Tri-/Tetrasomie 11 mit 8 Fällen (33,3 %, 8/24), der Tri-/Tetrasomien 11 und 21 mit 7 Fällen (29,2%, 7/24) und aus 1q-Zugewinn und Tri-/Tetrasomie 21 mit ebenfalls 7 Fällen (29,2 %, 7/24), erwartungsgemäß häufig vertreten. Im Allgemeinen waren die genannten Kombinationen eher in der HMM-Gruppe zu detektieren, aber die Kombinationen des 1q-Zugewinns mit den Tri-/Tetrasomien 11 bzw. 21 waren in je 3 Fällen (23,1 %, 3/13) auch in der NHMM-Gruppe vertreten. Die genauen Verteilungen der einzelnen Fälle auf die Gruppen HMM und NHMM können in Tabelle 19 nachvollzogen werden.

Weiterhin konnte die Kombination aus Tri-/Tetrasomie 11 und einer 13q-Deletion frequent nachgewiesen werden. So trat sie in 7 Fällen auf, was einem Anteil von 29,2 % (7/24) entspricht. Es zeigte sich eine ähnliche Verteilung auf die Gruppen NHMM (23,1 %, 3/13) und HMM (36,4 %, 4/11).

Die als prognostisch relevant erachtete Kombination aus der Translokation t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH und 13q-Deletion konnte in 5 Fällen identifiziert werden (20,8 %, 5/24). Mit einer Häufigkeit von 16,7 % (4/24) konnte die Kombination aus einer Translokation t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH und einem 1q-Zugewinn nachgewiesen werden. In 3 Fällen

(12,5 %, 3/24) kam es zu kombiniert auftretender Translokation $t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH$ und einem 8q-Zugewinn. Alle zuvor genannten Kombinationen zählten aufgrund der nachgewiesenen 14q32/IGH-Translokation ausschließlich zu den NHMM.

Es konnten zudem 5 Dreifachkombinationen, die in mindestens 3 Fällen auftraten, detektiert werden. So wurden die Kombinationen aus 1q-Zugewinn, Tri-/Tetrasomie 11 und 21, 1q-Zugewinn, 13q-Deletion und Tri-/Tetrasomie 21 und aus den Tri-/Tetrasomien 11, 17 und 21 in je 3 Fällen nachgewiesen (je 12,5 %, 3/24). Doppelt so häufig, nämlich in 6 Fällen (25 %, 6/24), konnten ein 1q-Zugewinn, eine Tri-/Tetrasomie 11 und eine 13q-Deletion kombiniert nachgewiesen werden. Die Kombination aus einer Translokation $t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH$, einem 1q-Zugewinn und einer 13q-Deletion, wurde in 4 Fällen (16,7 %, 4/24) detektiert. Einen Überblick über die einzelnen Fälle und die Gruppenzugehörigkeit bietet Tabelle 20.

Tabelle 19: Nachgewiesene Zweifachkombinationen chromosomaler Aberrationen in diesem Kollektiv

Gruppe	+1q & +8q	+1q & 8q24/M YC-Bruch	+1q & +11	+1q & -13q	+1q & -17p	+1q & +21	+11 & -13q	+11 & +17	+11 & +21	-13q & +8q	-13q & +21	+17 & +21	t(4;14) & +1q	t(4;14) & +8q	t(4;14) & -13q
HMM		(Fall 12) (Fall 14)	(Fall 1)	Fall 1 (Fall 11)		Fall 1 (Fall 13) (Fall 14) (Fall 21)	(Fall 1)	Fall 10 (Fall 14)	(Fall 1)	Fall 24	Fall 1 (Fall 14)	Fall 8			
NHMM	Fall 16 (Fall 17) Fall 20 Fall 24*	(Fall 15)	Fall 19	(Fall 2) (Fall 3) (Fall 15) (Fall 16)	Fall 15 (Fall 20) (Fall 22)	Fall 19	Fall 19	Fall 8	Fall 5	(Fall 16) (Fall 17)	Fall 19		(Fall 2) Fall 16 Fall 20	Fall 16 (Fall 17) Fall 20	Fall 2
				Fall 20 (Fall 17)			Fall 20		Fall 19			Fall 17	Fall 17 Fall 20	Fall 7 (Fall 16) Fall 17 Fall 20	
				Fall 23			Fall 23								

In Klammern dargestellt sind die Fälle, bei denen die Kombination erst durch die evolutionäre Entwicklung einer CA entstand. Fall 24*: die Kombinationen aus +1q und -13q und +1q und +8q entstanden simultan sekundär im Rahmen der klonalen Evolution.

Tabelle 20: Nachgewiesene Dreifachkombinationen chromosomaler Aberrationen in diesem Kollektiv

Gruppe	+1q & +11 & -13q	+1q & +11 & +21	+1q & -13q & +21	+11 & +17 & +21	t(4;14) & +1q & -13q
HMM	(Fall 1) (Fall 11) (Fall 24)	(Fall 1) (Fall 14)	Fall 1 (Fall 14)	Fall 8 Fall 10 (Fall 14)	
NHMM	Fall 19 Fall 20 Fall 23	Fall 19	Fall 19		(Fall 2) (Fall 16) (Fall 17) Fall 20

In Klammern dargestellt sind die Fälle, bei denen die Kombination erst durch die evolutionäre Entwicklung einer CA entstand.

4.6 Übersicht über die Ergebnisse bezüglich klonaler Evolution

In der vorliegenden Arbeit wurden sequentielle Proben von 24 MM-Patienten analysiert, um die klonale Evolution der CA zu untersuchen. Eine klonale Evolution konnte in 16 Fällen (66,7 %, 16/24) nachgewiesen werden, wobei die HMM mit 72,7 % (8/11) anteilig häufiger als die NHMM sekundäre CA entwickelten (61,5 %, 8/13).

Die häufigsten sekundären Veränderungen im Rahmen der klonalen Evolution stellten mit einer Frequenz von 31,3 % (5/16) der 1q-Zugewinn und die Tri-/Tetrasomie 11 (einschließlich des Falles mit dem 11q-Zugewinn), dar. Nachfolgend mit einer Frequenz von je 25,0 % (4/16) traten 13q-Deletionen und die Tri-/Tetrasomie 21 auf, gefolgt von je 3 Fällen mit 8q24/MYC-Bruch, 8q24/MYC-Zugewinn und 17q-Zugewinn (je 18,8 %, 3/16). Weitere sekundäre CA waren der 13q-Zugewinn und die 8q24/MYC-Deletion mit jeweils 12,5 % (2/16). Nur in je einem Fall (6,3 %, 1/16) kam es sekundär zur Entstehung eines 14q32/IGH-Bruches und einer 17p13/TP53-Deletion während des Krankheitsverlaufs. Eine Übersicht über die Inzidenzen der sekundär entstandenen CA bietet Tabelle 21.

Tabelle 21: Klonale Evolution – Häufigkeitsverteilung der neu aufgetretenen CA. CA bezogen auf die 16 Fälle, welche eine klonale Evolution zeigten

Chromosom	CA	Häufigkeit
Chromosom 1	1q-Zugewinn	n=5/16 (31,3 %)
Chromosom 8	8q24/MYC-Bruch 8q24/MYC Zugewinn 8q24/MYC Deletion	n=3/16 (18,8 %) n=3/16 (18,8 %) n=2/16 (12,5 %)
Chromosom 11	Tri-/Tetrasomie 11/11q-Zugewinn	n=5/16 (31,3 %)
Chromosom 13	13q-Deletion 13q-Zugewinn	n=4/16 (25,0 %) n=2/16 (12,5 %)
Chromosom 14	14q32/IGH-Bruch	n=1/16 (6,2 %)
Chromosom 17	17-Deletion 17q-Zugewinn	n=1/16 (6,2 %) n=3/16 (18,8 %)
Chromosom 21	Tri-/Tetrasomie 21	n=4/16 (25,0 %)

4.7 Daten aus der Chromosomen-Bänderungsanalyse

Eine Chromosomen-Bänderungsanalyse bei MM stellt oft, aufgrund der Schwierigkeiten, Plasmazellen zur Teilung zu stimulieren, eine Herausforderung dar. Jedoch liefert die zytogenetische Analyse wichtige Informationen über alle erfassbaren CA der Plasmazellen, und nicht nur über gezielte Veränderungen, wie es bei der FISH der Fall ist. Wenn die Erfassung eines chromosomal aberranten Klons gelingt, zeigt sich die Komplexität der CA bei MM in ihrer gesamten Dimension. Außerdem kann die Chromosomen-Bänderungsanalyse zur Erkennung von Zweitneoplasien hilfreich sein.

Bei Patienten mit MM, die mit immunmodulatorischen Arzneimitteln behandelt wurden, wurde ein erhöhtes Risiko für sekundäre maligne Erkrankungen, insbesondere das myelodysplastische Syndrom (MDS), beobachtet. In zwei der hier analysierten Fälle wurde mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse ein chromosomal aberranter Klon, der im Einklang mit einer Zweitneoplasie stand, detektiert. In **Fall 11** handelte es sich um eine myeloproliferative Neoplasie (MPN) mit einer Deletion del(13)(q12q21), welche klinisch bestätigt wurde. Dieser Fall zeigte in den CD138-positiven Zellen eine 13q-Deletion, welche mit Hilfe der Chromosomen-Bänderungsanalyse auf die Bruchpunkte 13q14 und 13q21 spezifiziert wurde. Der myeloische Klon mit der Deletion del(13)(q12q21) wurde 6 Jahre nach der ED nachgewiesen.

In **Fall 20** deutete ein chromosomal aberranter Karyotyp mit einer Monosomie 7 in einer Verlaufskontrolle, 7 Jahre nach der ED, auf die Präsenz einer Zweitneoplasie hin (Abbildung 10). Klinisch wurde dieser Verdacht bestätigt und ein MDS diagnostiziert.

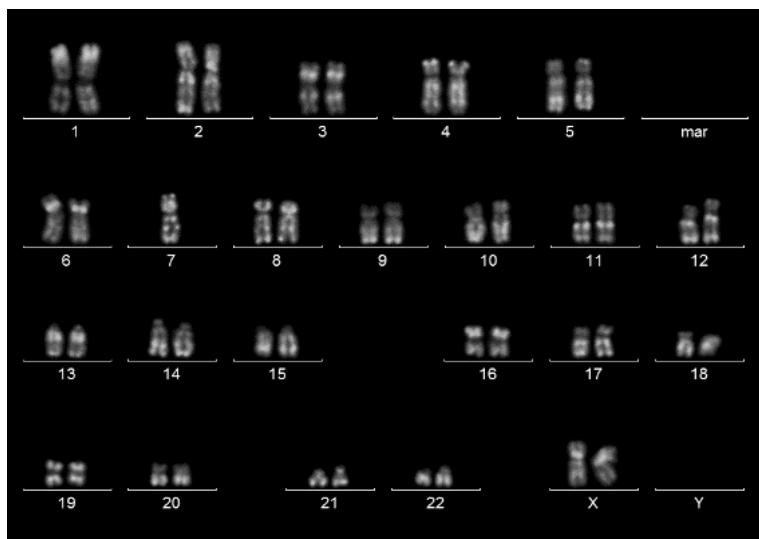


Abbildung 10: Fall 20, Zeitpunkt 09/2014: Karyogramm mit dem Karyotyp nach ISCN 2016: 45,XX,-7[23]/46,XX

In 22 der 24 analysierten Fälle konnten Kulturen für eine Chromosomen-Bänderungsanalyse angesetzt werden. In 21 dieser Fälle konnte neben den Daten aus der FISH-Analyse mindestens ein Karyotyp aus einem Knochenmarkbiopsat erhoben werden. Es wurden insgesamt 73 von 115 untersuchten sequentiellen Knochenmarkbiopsaten (63,5 %) karyotypisiert, davon zeigten 7 Biopsate keine Metaphasen und 52 Biopsate einen regelrechten weiblichen oder männlichen Chromosomensatz. Erwartungsgemäß stellte sich eine deutlich höhere Rate detekter CA mittels FISH im Vergleich zur klassischen Zytogenetik heraus. In 52 der 66 gelungenen Chromosomen-Bänderungsanalysen (81,8 %) war der Karyotyp unauffällig, davon zeigten jedoch 41 Biopsien CA in der FISH-Analyse.

In 12 Knochenmarkbiopsaten aus 7 Fällen, einschließlich der 2 Fälle mit einer Zweitneoplasie, konnte ein chromosomal aberranter Klon in einer oder mehreren der analysierten sequentiellen Proben mit zu den FISH-Daten kongruentem Ergebnis, erfasst werden.

Im folgenden Abschnitt werden nur die zytogenetischen Ergebnisse aus 5 Fällen ohne Zweitneoplasie erwähnt, da nur diese Fälle die genetischen Befunde der Plasmazellen darstellen. In 4 der 5 Fälle zeigten sich in den frühen Biopsien unauffällige zytogenetische Ergebnisse – erst in der letzten Chromosomen-Bänderungsanalyse wurde ein komplex aberranter Karyotyp erfasst. Die Chromosomen-Bänderungsanalyse konnte fast alle CA, die mittels FISH detektiert wurden, nachweisen.

In **Fall 4** wurde durch beide Untersuchungsmethoden eine 13q-Deletion nachgewiesen, die mittels FISH detektierten, 4p- und 14q-Deletionen blieben der Chromosomen-Bänderungsanalyse jedoch verborgen. Eine 17p13/TP53-Deletion in **Fall 16** konnte ebenfalls mittels der Zytogenetik nicht detektiert werden und in **Fall 23** war das Chromosom 1 in der Chromosomen-Bänderungsanalyse unauffällig, während jedoch in der FISH ein 1q-Zugewinn nachgewiesen wurde (Abbildung 11).

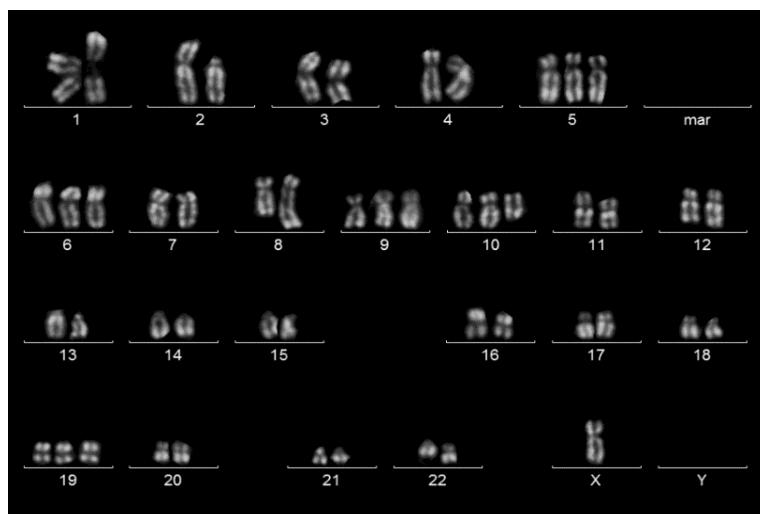


Abbildung 11: Fall 23 Zeitpunkt 06/07: Karyogramm mit Karyotyp nach ISCN 2016:
Natives KM:
48~50,X,-Y,t(2;8)(p12;q24),+5,+6,+9,+10,del(13)(q14q21),+19+22[cp2]/46,XY[5]

In **Fall 3** wurde ein Bruchereignis im Bereich 14q32/IGH detektiert. Die Zytogenetik konnte eine Translokation t(14;16)(q32;q22~23) ermitteln. Aufgrund des zytogenetischen Ergebnisses wurde die FISH zur Detektion von Brüchen in den MAF- und CBFA2T3-Genorten in 16q22~23 durchgeführt, jedoch zeigten diese Analysen unauffällige Ergebnisse.

Durch die FISH-Analyse wurden in **Fall 14** mehrere numerische Aberrationen, wie die 1q-Amplifikation, eine Trisomie 17 und eine Tri-/Tetrasomie 21 detektiert. Außerdem konnte molekularzytogenetisch ein Bruchereignis im Bereich 8q24/MYC ermittelt werden. Alle diese Veränderungen wurden auch mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse identifiziert sowie diverse andere Aberrationen, die durch die FISH-Analyse nicht abgedeckt wurden. Insbesondere konnte das Chromosom 1 als Translokationspartner des Chromosoms 8 im MYC-Bruch identifiziert werden (Abbildung 12).

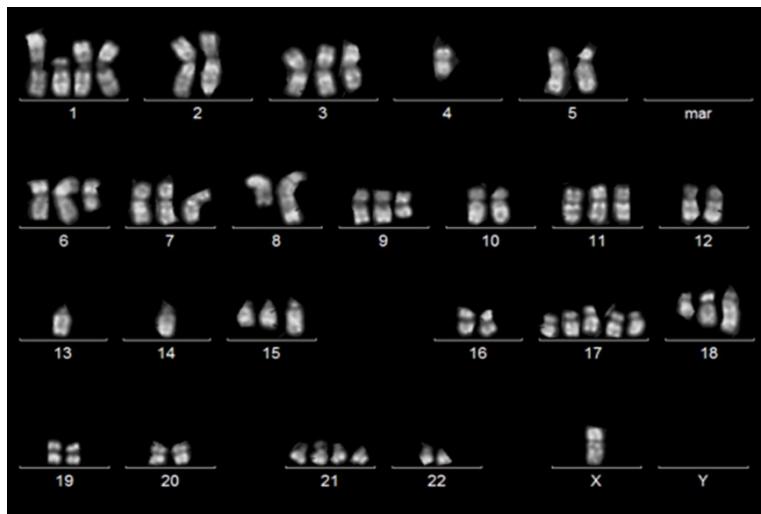


Abbildung 12: Fall 14, Zeitpunkt 04/11: Karyogramm mit dem Karyotyp nach ISCN 2016:

Natives KM:
54~56,X,-X,+1,+1,t(1;8)(p12;
q24),dic(1;14)(p11;p11),
dic(1;15)(p11;p11),der(2)
add(p?)add(q?),+3,+i(3)(p10),
-4,del(4)(q1?4),+6,add(6)
(p2?),del(6)(q?16),+7,+9,
del(9)(q13q22),+11,-13,+15,
+17,+17,+18add(18)(p11),add
(18)(q22),+21,+21,inc
[cp4]//46,XY[2]

5 Diskussion

Die Frage nach klonaler Evolution von Tumoren war in den letzten Jahren Thema vieler Studien. Aufgrund des zumeist mäßigen Ansprechens auf die vorhandenen Therapieregime besteht die Hoffnung, durch neue Erkenntnisse bzgl. klonaler Veränderungen eines Tumors, Strategien für neue, gezielte Therapien zu gewinnen. Das Ziel dieser Arbeit war es, die klonale Evolution der chromosomalen Aberrationen, hier als CA abgekürzt, bei sequentiellen Proben von MM-Patienten zu untersuchen. Dieser Thematik zu Grunde liegende Fragen waren: Welche CA liegen primär vor, welche entstehen sekundär im Rahmen einer möglichen Tumorevolution? Sind die Aberrationen genetisch stabil über den Beobachtungszeitraum? Gibt es bei den genannten Aspekten Unterschiede in der HMM- und NHMM-Gruppe, wie die aktuell übliche orientierende genetische Einteilung vermuten ließe? Und schließlich, inwiefern überschneiden bzw. ergänzen sich die Ergebnisse aus der FISH und der Chromosomen-Bänderungsanalyse bei MM?

Eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten befasst sich bereits mit dem Thema der klonalen Evolution bei unterschiedlichen Neoplasien. Auch bei MM sind bereits mehrere Untersuchungen zum Thema klonale Evolution durchgeführt worden. Jedoch sind zur Gewinnung neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse in diese Studie die CA sequentieller Knochenmarkbiopsien mittels FISH und Chromosomen-Bänderungsanalyse untersucht worden, um den Verlauf der CA über die Zeit und unter Therapie zu beleuchten. Diese Analyse des zyto- und molekularzytogenetischen Profils an sequentiellen Biopsien von MM-Patienten über einen längeren Zeitraum, ist nach vorliegenden Informationen in diesem Ausmaß bisher nicht erfolgt. Insgesamt sind in dieser Arbeit 115 sequentielle Knochenmarkproben von 24 MM-Patienten mittels FISH analysiert worden. Zudem wurden von 21 der 24 Patienten Ergebnisse aus der Chromosomen-Bänderungsanalyse in die Recherche miteinbezogen.

5.1 Aspekte der FISH-Technik und der Chromosomen-Bänderungsanalyse bei MM

Zu den genetischen Standardverfahren in der Diagnostik des MM zählen die FISH-Technik und die Chromosomen-Bänderungsanalyse.

Bei der Chromosomen-Bänderungsanalyse handelt es sich um eine ungerichtete Methode zur Untersuchung genetischer Veränderungen. In den präparierten Metaphasen können komplette Chromosomensätze einer Zelle analysiert werden, sodass es prinzipiell möglich ist,

eine Vielzahl von numerischen und strukturellen CA zu erfassen. Bei MM besteht die Herausforderung der Chromosomen-Bänderungsanalyse einerseits darin, trotz der oft niedrigen Tumorinfiltration und geringer Proliferationsaktivität der Tumorzellen, v. a. in frühen Krankheitsstadien, überhaupt CA nachzuweisen. Andererseits ist die Auflösung der Bandenqualität von zentraler Bedeutung, sodass bei niedrigem Bandenniveau die Auswertung erschwert ist. Dafür sind zudem eine hohe Expertise und langjährige Erfahrung nötig. Mit Hilfe der Chromosomen-Bänderungsanalyse kann durch die komplette Karyotypisierung eine ggf. vorhandene Zweitneoplasie detektiert werden. Sie kann zur Ergänzung der genetischen Abbildung des MM durchgeführt werden. Außerdem deutet die Präsenz eines aberranten Karyotyps auf eine fortgeschrittene Erkrankung hin, die meist mit einer ungünstigen Prognose einher geht (Rajkumar et al., 1999a, Sawyer, 2011). Die Chromosomen-Bänderungsanalyse führt jedoch häufig aufgrund der niedrigen Teilungsrate der Plasmazellen zu keinem verwertbaren Ergebnis. Daher besitzt die FISH an sortierten CD138-positiven Zellen aus dem KM einen zentralen Stellenwert in der Diagnostik des MM.

Die FISH ist eine molekularzytogenetische Methode, die durch die Hybridisierung fluoreszenzmarkierter Sonden an definierten Chromosomenabschnitten genetische Veränderungen sichtbar macht. Demnach ist lediglich die Analyse ausgewählter Genorte pro Zelle möglich und die Antizipation möglicherweise veränderter Genorte nötig. In dieser Arbeit lag der methodische Schwerpunkt auf der FISH-Untersuchung an sortierten CD138-positiven Zellen aus dem KM bzw. an nativen KM-Zellen, falls nicht ausreichend selektierte Zellen generiert werden konnten. Da die Infiltrations- und Proliferationsrate bei MM oft niedrig ist, war die FISH-Auswertung gelegentlich dahingehend herausfordernd, als dass nur wenige Zellen nach der MACS-Sortierung übrig waren und teilweise, je nach Qualität des Präparates, die mikroskopische Auswertung erschwert war. Wenn möglich, erfolgte in solchen Fällen die Auswertung von 100~400 unsortierten Zellen aus dem nativen KM. Theoretisch ist in diesen Fällen eine exakte Aussage, ob es sich definitiv um genetisch veränderte Plasmazellen handelt, nicht mit absoluter Sicherheit möglich. So könnten bei vorliegenden weiteren Neoplasien deren aberrante Zellen fälschlicherweise dem MM zugerechnet werden. In solchen Fällen kann wiederum die Chromosomen-Bänderungsanalyse Aufschlüsse geben.

Die Analyse subtiler spezifischer Aberrationen ist einer der Vorteile, die FISH im Vergleich zur Chromosomen-Bänderungsanalyse bietet. In dieser Arbeit wurden die Genorte 1q23.1/IRTA1/2, 8q24/MYC, 11q22~23 und die Zentromerregion des Chromosoms 11, 13q14/RB1, 14q32/IGH, 17p13/TP53 und 21q22/RCAN1 untersucht, welche sich an den Empfehlungen der IMWG orientieren (Palumbo et al., 2015). Mittlerweile sind jedoch weitere Genorte, wie z. B. die 1p32-Deletion bekannt, denen ein prognostischer Einfluss auf den Krankheitsverlauf bei MM zugerechnet wird (Fonseca et al., 2009). Hier offenbart sich ein

Nachteil der spezifischen Genort-Analyse: FISH hat pro Hybridisierung einen bis höchstens 3 Genorte im Fokus, sodass die Komplexität der genetischen Aberrationen bei MM nur schwer abgebildet werden kann. Zur möglichst vollständigen Analyse der Genetik der MM-Fälle dieses Kollektivs wurden deshalb sowohl die FISH-Technik als auch die Chromosomen-Bänderungsanalyse durchgeführt. Es gab erwartungsgemäß eine Diskrepanz bei den Ergebnissen beider Methoden. Insgesamt wurde durch die FISH-Technik eine deutlich höhere Anzahl CA detektiert, obwohl die Methode viel selektiver als die Chromosomen-Bänderungsanalyse ist. Diese Diskrepanz kann daran liegen, dass manche Aberrationen mit Hilfe des erreichten Bandenniveaus nicht erfassbar waren. Außerdem ist es möglich, dass aufgrund der schlechten Morphologie der Chromosomen teilweise kein vollständiger Karyotyp (inc: *incomplete*) erhoben werden konnte, sodass nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass Veränderungen hätten identifiziert werden können. Wenn sich in der Chromosomen-Bänderungsanalyse ein aberranter Karyotyp zeigte, war jedoch die Anzahl detekтирter CA häufig um ein Vielfaches höher als in der FISH. Somit wird deutlich, dass nur durch die Zusammenschau der Befunde aus beiden Methoden eine möglichst vollständige Abbildung der genetischen Architektur eines MM möglich ist.

5.2 Einteilung der MM nach den genetischen Subgruppen HMM und NHMM

Es wurden 24 Fälle mit mindestens 3 zur Verfügung stehenden sequentiellen Knochenmarkbiopsien von Patienten mit MM analysiert. Anhand ihrer genetischen Merkmale konnten die Fälle in die orientierenden genetischen Gruppen HMM und NHMM eingeteilt werden.

Bekanntermaßen besteht eine hochgradige Assoziation der NHMM-Gruppe zu 14q32/IGH-Translokationen (Fonseca et al., 2003b), weshalb die Gruppierung des vorliegenden Kollektivs vornehmlich anhand der Präsenz einer 14q32/IGH-Translokation erfolgte. Bei Vorliegen eines *IGH*- bzw. *IGK*- oder *IGL*-Rearrangements wurde der Fall in die NHMM-Gruppe eingeschlossen und bei Nachweis einer Trisomie 11 oder 21 in die HMM-Gruppe. Mit einer Inzidenz von 11 HMM (45,8 %, 11/24) und 13 NHMM (54,2 %, 13/24) war die Verteilung nahezu ausgeglichen. Dies entspricht den Häufigkeiten der publizierten Daten (Sawyer, 2011). Somit stellt dieses Kollektiv trotz der kleinen Fallzahl eine repräsentative Kohorte zur Analyse der klonalen Evolution bei MM dar.

Im Allgemeinen blieben 38,5 % (5/13) der Tumoren bei den NHMM genetisch stabil, im Vergleich zu 27,3 % (3/11) bei den HMM. Somit ließ sich im untersuchten Kollektiv eine etwas

höhere genetische Stabilität für die Tumoren mit *IGH*-Translokationen (NHMM-Gruppe) im Vergleich zur HMM-Gruppe ermitteln.

5.3 Klonale Evolution der strukturellen genetischen Aberrationen bei MM

5.3.1 Die strukturellen Aberrationen 14q32/*IGH*-Translokationen und 8q24/*MYC*-Brüche zeigen eine hohe genetische Stabilität

Strukturelle Aberrationen der Bereiche 14q32/*IGH* bzw. 2p12/*IGK* wurden in 13 der 24 Fälle nachgewiesen und alle diese Fälle wurden der NHMM-Gruppe zugewiesen (54,2 %, 13/24). Die untersuchten strukturellen Aberrationen 14q32/*IGH*-Translokationen und 8q24/*MYC*-Brüche offenbarten eine hohe genetische Stabilität in diesem Kollektiv. So zeigten einzelne Fälle mit 14q32/*IGH*-Translokation zwar eine komplette molekularzytogenetische Remission (CmCyR) unter erfolgreicher Therapie, sodass die *IGH*-Translokation intermittierend nicht nachweisbar war, jedoch konnte sie unter Progress bzw. Rezidiv der Erkrankung wieder stabil nachgewiesen werden. Ebenso verhielt es sich bei den Fällen mit 8q24/*MYC*-Bruch, bei denen es lediglich in einem Fall zur CmCyR kam. In allen weiteren Fällen zeigte sich der 8q24/*MYC*-Bruch ausschließlich genetisch stabil.

Die in dieser Arbeit dargestellte hohe genetische Stabilität der beiden strukturellen CA 14q32/*IGH*-Translokationen und 8q24/*MYC*-Bruch offenbart beide Läsionen als stabile Marker-Aberrationen zur Risikostratifizierung bei MM.

5.3.2 14q32/*IGH*-Translokationen mit den bekannten Translokationspartnern sind primäre Veränderungen und spezifische 14q32/*IGH*-Translokationen können zur genomischen Instabilität des MM beitragen

Die Analyse der Fälle mit Translokationen des Bereichs 14q32/*IGH* in der vorliegenden Arbeit bestätigt die etablierte wissenschaftliche Kenntnis, dass die üblichen 14q32/*IGH*-Brüche zu den primären Ereignissen bei MM zählen (Sawyer, 2011). Nur in einem der 12 Fälle mit einem 14q32/*IGH*-Bruch, wurde dieser sekundär nachgewiesen (Fall 3). In diesem Fall konnte trotz FISH der üblicherweise beteiligten Genorte kein Translokationspartner bestimmt werden. Man könnte spekulieren, dass die häufigsten *IGH*-Translokationen wie t(4;14), t(8;14), t(11;14), t(14;16) und t(14;20) primär auftreten, aber weitere 14q32/*IGH*-Brüche mit anderen, möglicherweise bisher unbekannten Translokationspartnern im Rahmen einer klonalen

Evolution bei MM auftreten könnten. Es ist bekannt, dass neben der Entstehung der *IGH*-Translokationen während des Immunglobulin-Klassenwechsels der reifen B-Zellen auch andere Mechanismen in der Genese der *IGH*-Translokationen eine Rolle spielen. So hatten Walker et al. bereits 2013 insgesamt 5 unterschiedliche Mechanismen postuliert, im Rahmen derer es zur Entstehung von *IGH*-Translokationen kommen kann und die zudem zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Krankheitsverlaufs auftreten (Walker et al., 2013). In einer Studie von Barwick et al. aus dem Jahr 2019 konnte wiederum gezeigt werden, dass die gängigen *IGH*-Translokationen in der Regel klonal mit den üblichen Bruchpunkten im Bereich der Switch-Region vorliegen. Weitere *IGH*-Translokationen, wie z. B. die t(8;14)/MYC-*IGH*, wiesen jedoch andere Bruchpunkte auf und traten vornehmlich subklonal auf, was auf eine sekundäre Entstehung hindeutet (Barwick et al., 2019), und somit die oben genannte Hypothese unterstützt.

Tatsache ist, dass bereits eine Vielzahl von *IGH*-Translokationspartnern identifiziert wurde, wahrscheinlich jedoch noch einige *IGH*-Translokationspartner unbekannt sind. Mit den neuen, hoch spezialisierten Verfahren der *Next Generation Sequencing* (NGS)-Technologie konnten neben der genaueren Beleuchtung der spezifischen Bruchpunkte bereits weitere, bisher unbekannte Translokationspartner identifiziert werden (Barwick et al., 2019, Jimenez et al., 2017), wie *NDUFS4* bei der t(5;14)(q11;q32)/*NDUFS4-IGH* oder *SCARB1* bei der t(12;14)(q24;q32)/*SCARB1-IGH*, welche durch die FISH-Analyse bisher unentdeckt blieben (Jimenez et al., 2017). Durch neue Erkenntnisse bzgl. der Translokationsmechanismen und weiterer Translokationspartner könnten in Zukunft neue Angriffspunkt für Therapieregime entwickelt werden.

Genetische Stabilität der 14q32/*IGH*-Translokationen *per se* war ausnahmslos vorhanden in diesem Kollektiv. Der Einfluss der unterschiedlichen *IGH*-Translokationen auf die genomische Stabilität des Myeloms wurde bereits in mehreren Arbeiten analysiert. So sind bekannte, den *IGH*-Lokus betreffende Hochrisikoläsionen die Translokationen t(4;14)/*MMSET/FGFR3-IGH*, t(14;16)/*IGH-MAF* und t(14;20)/*IGH-MAFB* (Sawyer, 2011). Sie sind mit einem prognostisch schlechteren Verlauf assoziiert, da diese Tumoren mit einer höheren genetischen Instabilität in Zusammenhang gebracht werden, wie Keats et al. postulieren (Keats et al., 2012). In einer Kohorte von 28 Patienten mit MM beobachteten sie unterschiedliche genetische Verläufe: Ein Drittel der Patienten mit hyperdiploidem Karyotyp der Niedigrisikogruppe entsprechend, zeigte genetische Stabilität. Ein weiteres Drittel zeigte klonale Heterogenität, welche laut Autoren bereits zum Diagnosezeitpunkt vorlag und ein weiteres Drittel offenbarte eine lineare klonale Evolution des Tumors. Diese Tumoren waren eben solche, welche die o. g. Hochrisikoaberrationen zeigten (Keats et al., 2012). Auch im vorliegenden untersuchten Kollektiv zeigten 4 von 5 Fällen mit einer Translokation t(4;14)/*MMSET/FGFR3-IGH* eine

klonale Evolution, was mit der Beobachtung von Keats und Kollaboratoren im Einklang steht. Der einzige Fall dieser Kohorte mit einer $t(14;20)/IGH-MAFB$ blieb jedoch ohne Entwicklung im Sinne einer klonalen Evolution. Stattdessen zeigten 2 von 4 Fällen mit einer Translokation $t(11;14)/CCND1-IGH$ eine klonale Evolution.

Insgesamt unterstreicht dies die Relevanz der Detektion einer so bedeutenden CA wie der $14q32/IGH$ -Translokation und damit einhergehender Pathomechanismen bei MM, damit eine valide Risikostratifizierung möglich ist und gezielte Therapieregime zum Einsatz kommen können.

5.3.3 8q24/MYC-Brüche können sowohl primär als auch sekundär in beiden genetischen Subgruppen auftreten

Zusätzlich zu den $14q32/IGH$ -Translokationen wurden auch strukturelle Veränderungen des Protoonkogens *MYC* auf dem Genlokus 8q24 untersucht. Die Inzidenz des 8q24/MYC-Bruchs lag bei insgesamt 25,0 % (6/24) in dieser Kohorte. Die angegebene Inzidenz für 8q24/MYC-Brüche variiert in der Literatur zwischen 15~23 % (Avet-Loiseau et al., 2001, Barwick et al., 2019). Demnach steht die hier ermittelte Inzidenz mit den Ergebnissen aktueller Studien im Einklang.

In der Literatur wird eine gleichmäßige Verteilung des 8q24/MYC-Rearrangements bzgl. der Kategorien HMM und NHMM angegeben (Gabrea et al., 2008). Im vorliegenden Kollektiv lagen 2 Fälle mit 8q24/MYC-Translokationen vor, welche den *IGH*- bzw. *IGK*-Lokus involvierten und darüber die Zugehörigkeit zur NHMM-Gruppe definiert worden war. Unter Exklusion dieser beiden Fälle konnte die dichotome Verteilung auf die Gruppen HMM und NHMM auch in diesem Kollektiv bestätigt werden.

Aufgrund der wenigen Studien, welche das MM im Rahmen des gesamten Erkrankungsverlaufs abbilden, gibt es in der Literatur kaum Angaben zur genetischen Stabilität des 8q24/MYC-Bruchs. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei dem 8q24/MYC-Buch um eine überwiegend genetisch stabile CA handelt, da er in dieser Kohorte in allen Fällen ab dem Aberrationsnachweis seriell detektierbar war.

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen, dass der 8q24/MYC-Bruch sowohl primär als auch sekundär mit gleicher Inzidenz auftreten kann (jeweils 3 Fälle). Bezüglich des Entstehungszeitpunktes wird das 8q24/MYC-Rearrangement von den meisten Autoren als sekundär auftretende CA gewertet (Avet-Loiseau et al., 2001, Gabrea et al., 2008). Jedoch wurde ebenso bereits demonstriert, dass 8q24/MYC-Rearrangements, welche die Genorte $14q32/IGH$, einen *IG*-Leichtkettenlokus oder andere Translokationspartner involvieren, bereits bei MGUS oder frühen MM vorliegen können (Barwick et al., 2019, Fonseca et al., 2002b).

Im Gegensatz dazu steht, dass von der Translokation $t(8;14)/MYC-IGH$ von Barwick und Kollaboratoren als vornehmlich subklonal vorliegende Aberration berichtet wurde (Barwick et al., 2019). Im hier untersuchten Kollektiv waren 2 der 3 bei ED bereits vorhandenen 8q24/MYC-Rearrangements in einer Translokation nachzuweisen ($t(2;8)/IGK-MYC$ und $t(8;14)/MYC-IGH$). In einem Fall blieb der *MYC*-Translokationspartner unbekannt. Von den in dieser Untersuchung sekundär entstandenen 8q24/MYC-Rearrangements blieb der *MYC*-Translokationspartner ebenso unbestimmt, jedoch wurde in einem Fall eine Translokation $t(1;8)(p12q24)$ mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse nachgewiesen.

Es gilt die allgemeine Annahme, dass das 8q24/MYC-Rearrangement mit einer fortgeschrittenen Erkrankung und hoher Proliferationsaktivität einhergeht (Bergsagel & Kuehl, 2001, Gabrea et al., 2008). 8q24/MYC-Translokationen werden als genetisch komplexe z. T. nicht reziproke Translokationen mit Insertionen, Duplikationen, Amplifikationen oder Deletionen beschrieben (Bergsagel & Kuehl, 2005). Diese Komplexität lässt dementsprechend eine genetische Vulnerabilität möglich erscheinen. Barwick und Kollaboratoren hatten zuletzt bei Präsenz einer Translokation $t(8;22)/MYC-IGL$ eine deutliche Prognoseverschlechterung detektiert, und besonders ist zu betonen, dass sie in 78 % mit der HMM-Gruppe assoziiert war, welche im Allgemeinen mit einer besseren Prognose in Verbindung gebracht wird (Barwick et al., 2019). Dies unterstreicht wiederum die Multidimensionalität einer einzelnen CA und wie essentiell deren fundierte Kenntnis ist, um Rückschlüsse auf die prognostische Relevanz ziehen zu können. Da es sich bei dem 8q24/MYC-Bruch um einen genetischen Risikomarker bei MM handelt, welcher mit einer Verschlechterung der Prognose in Verbindung gebracht wird (Walker et al., 2014), könnte eine genauere Beleuchtung, v. a. der genetischen Stabilität zum besseren Verständnis des Einflusses des 8q24/MYC-Bruchs beitragen.

5.3.4 Numerische 8q24/MYC-Veränderungen treten eher bei den NHMM und sekundär auf

Weitere, in dieser Arbeit detektierte CA, sind numerische Veränderungen von 8q24/MYC. Davon waren es in 4 Fällen 8q24/MYC-Zugewinne (16,6 %, 4/24) und in 2 Fällen handelte es sich um 8q24/MYC-Verluste (8,3 %, 2/24). Insgesamt zeigten sich beide numerische Aberrationen meist in der NHMM-Gruppe und traten eher sekundär auf.

Die beiden Fälle mit 8q24/MYC-Deletionen entstanden sekundär aus je einem 8q24/MYC-Zugewinn und einer Translokation $t(8;14)/MYC-IGH$, sodass hier die Vermutung ihrer Genese aus einer ggf. vorliegenden 8q24/MYC-Instabilität möglich erscheint (Merz et al., 2018).

5.4 Klonale Evolution der untersuchten numerischen Veränderungen bei MM

Numerische Aberrationen konnten in 91,7 % (22/24) der Fälle des vorliegenden Kollektivs nachgewiesen werden. Sie zählten sowohl primär als auch sekundär zu den häufigsten Aberrationen. In allen 16 Fällen, die eine evolutionäre Tumorentwicklung zeigten, waren es numerische Aberrationen, welche im Rahmen der klonalen Evolution entstanden (siehe Kapitel 4.6). In 4 Fällen traten neben den numerischen Aberrationen zusätzlich strukturelle Aberrationen, wie 14q32//IGH- bzw. 8q24/MYC-Translokationen auf (in Abschnitt 5.3.2 und 5.3.3 zuvor diskutiert). Am häufigsten traten 1q-Zugewinne, Tri-/Tetasomien des Chromosoms 11, sowie numerische Aberrationen von 8q24/MYC (siehe Abschnitt 5.3.4) jeweils mit gleicher Frequenz sekundär auf, gefolgt von 13q-Deletionen, Tri-/Tetasomien des Chromosoms 21 und numerischen Aberrationen des Chromosoms 17. Im Folgenden werden die untersuchten CA einzeln besprochen.

5.4.1 1q-Zugewinne sind häufige, genetisch stabile Aberrationen beider Gruppen, welche auch sekundär auftreten können

Der 1q-Zugewinn gehört zu den häufig vorkommenden CA bei MM. Er besitzt einen negativen prognostischen Stellenwert, weshalb laut IMWG die Testung auf 1q-Zugewinne in der Routine-Diagnostik empfohlen wird (Chng et al., 2014).

In der untersuchten Kohorte stellte der 1q-Zugewinn mit einer Gesamthäufigkeit von 66,7 % (16/24) die Aberration mit der höchsten Inzidenz unter den analysierten CA dar. Ein 1q-Zugewinn kam mit hoher Inzidenz in den beiden Gruppen, HMM (63,6 %, 7/11) und NHMM (69,2 %, 9/13) vor, was im Einklang mit veröffentlichten Studien steht (Aktas Samur et al., 2019). Bei ED lag die Inzidenz der 1q-Zugewinne mit 45,8 % (11/24) unter der Gesamtinzidenz der 1q-Zugewinne. Dies passt ebenso zu den Ergebnissen anderer Studien, welche Inzidenzen des 1q-Zugewinns zwischen 20~50 % beobachteten (Aktas Samur et al., 2019, Liebisch et al., 2003, Sawyer et al., 1995).

Die lange etablierte wissenschaftliche Auffassung war, dass 1q-Zugewinne sekundäre Veränderungen sind, die während des Krankheitsverlaufs des MM auftreten (Hanamura et al., 2006). Neueste Studien mit größeren Kohorten und umfassenden Untersuchungen haben gezeigt, dass 1q-Zugewinne sowohl zum Zeitpunkt der ED, als auch als sekundäre Veränderungen auftreten können (Aktas Samur et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde ein 1q-Zugewinn in 11 initialen MM (68,9 %, 11/16) und in 5 Fällen (31,3 %, 5/16) als sekundäre Veränderung detektiert. So wurde der 1q-Zugewinn, in dem hier untersuchten

Kollektiv als vor allem bei den NHMM primär vorliegende Aberration nachgewiesen (53,8 % der NHMM (7/13) bei ED und bei 36,4 % der HMM (4/11)). Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen der Studie von Aktas Samur und Kollaboratoren, wonach 1q-Zugewinne bei den NHMM zu den früh auftretenden, numerischen Aberrationen gehören, während sie bei den HMM später auftreten (in dieser Studie als sekundäre Aberration bei 27,3 % der HMM (3/11) und 15,4 % der NHMM (2/13)) (Aktas Samur et al., 2019).

Der 1q-Zugewinn wird im Allgemeinen als eine im Rahmen der Tumorprogression genetisch instabil werdende CA erachtet (Sawyer, 2011). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden, da sich der 1q-Zugewinn vorrangig genetisch stabil präsentierte. So war der 1q-Zugewinn in 81,3 % (13/16) der Fälle sequentiell nachweisbar. Dieses Ergebnis entspricht den bereits zitierten Daten von Aktas Samur insofern, als dass der 1q-Zugewinn dort ebenso als frühe, vorwiegend klonal vorliegende CA detektiert werden konnte (Aktas Samur et al., 2019). Darüber hinaus kann ein 1q-Zugewinn zu jedem Zeitpunkt der Evolution der Erkrankung auftreten. Er zeigte unabhängig vom Nachweiszeitpunkt genetische Stabilität. Somit zeigen die hier erhobenen Daten, dass der 1q-Zugewinn einen stabilen genetischen Marker zur Verlaufskontrolle bei MM darstellt und dass aufgrund des wichtigen prognostischen Werts seine Testung bei jeder Routineanalyse empfehlenswert wäre.

5.4.2 1q-Amplifikationen sind seltene, instabile CA beider Gruppen

Die 1q-Amplifikation, welche sich nach den Kriterien von Walker durch die Präsenz von ≥ 4 Kopien des Bereichs 1q21 definiert (Walker et al., 2019), und hier analog dazu bei Vorliegen einer Amplifikation des Genlokus 1q23/IRTA1/2 gewertet wurde, offenbarte sich als seltene, instabile CA mit gleichmäßiger Verteilung in der HMM und NHMM-Gruppe. Von 10 Fällen mit nachgewiesener 1q-Amplifikation, zeigten nur 2 Fälle eine anhaltende 1q-Amplifikation. In den übrigen 8 Fällen war sie nur transient nachweisbar.

Die Studie von Walker und Kollaboratoren veranschaulicht die Bedeutung der Unterscheidung zwischen einer 1q-Amplifikation und einem 1q-Zugewinn, da die Prognose von Patienten mit einer 1q-Amplifikation signifikant schlechter ist und sowohl mit einer Verkürzung des Gesamtüberlebens (*overall survival*, OS) als auch des progressionsfreien Überlebens (*progression free survival*, PFS) einhergeht (Walker et al., 2019). Besonders in der „Double-Hit“-Gruppe mit simultan vorliegender biallelischer 17p13/TP53-Deletion war in der genannten Studie bei betroffenen Patienten eine infauste Prognose zu verzeichnen (Walker et al., 2019). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine mögliche Integration der 1q-Amplifikation in die Risikostratifizierung bei MM zur Diskussion gestellt. Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

jedoch eine Instabilität der 1q-Amplifikation zeigen, wirft dies die Frage auf, ob eine instabile CA zur validen Prognoseeinstufung das richtige Kriterium darstellt. Zudem müssten spezifischere genetische Diagnoseverfahren bei MM etabliert werden, um eine sichere Unterscheidung zwischen 1q-Zugewinn und 1q-Amplifikation, sowie mono- bzw. biallelischer *TP53*-Deletion zu ermöglichen. Ergänzend erscheint der Unterschied in der genetischen Stabilität des 1q-Zugewinns im Vergleich zur Instabilität der 1q-Amplifikation eine nähere Betrachtung zu verdienen, um genauer zu differenzieren, ob es sich bei transient vorliegender 1q-Amplifikation um eine genetische Instabilität der 1q-Amplifikation oder womöglich doch des 1q-Zugewinns handelt.

5.4.3 Tri- bzw. Tetrasomien des Chromosoms 11 und der 11q-Zugewinn kommen häufiger bei den HMM vor, können sowohl primär als auch sekundär entstehen und eine genetische Instabilität aufweisen

In dem untersuchten Kollektiv wurde insgesamt bei über der Hälfte der Patienten eine Tri-/Tetrasomie 11 oder ein 11q-Zugewinn nachgewiesen (54,2 %, 13/24). Erwartungsgemäß war die Inzidenz in der HMM-Gruppe mit 81,8 % (9/11) deutlich größer als bei den NHMM mit 30,8 % (4/13), was mit bereits publizierten Daten übereinstimmt (Aktas Samur et al., 2019). Die Inzidenz der Tri-/Tetrasomie 11 und des 11q-Zugewinns bei ED lag bei 33,3 % (8/24) und passt somit zu den ermittelten Inzidenzen von ca. 36~37,5 % aus anderen Studien (Fonseca et al., 2002a, Kumar et al., 2012, Liebisch et al., 2003). Sie entstand jedoch in der hier analysierten Kohorte ebenso sekundär in 20,8 % (5/24). Somit zeigen die Ergebnisse dieser Analyse, dass es sich bei der Tri-/Tetrasomie 11 bzw. dem 11q-Zugewinn um eine heterogene CA handelt, was ihren Entstehungszeitpunkt betrifft. Vor allem in der HMM-Gruppe verdeutlicht sich diese Heterogenität bzgl. des Entstehungszeitpunktes, da die genannte Veränderung in 5 Fällen bei ED im Vergleich zu 3 Fällen als sekundäre CA detektiert wurde. Bei den NHMM zeigte sich bzgl. des Entstehungszeitpunktes dagegen tendenziell eine Gewichtung in Richtung der ED (3 Fälle), verglichen mit nur einem Fall, wo der 11q-Zugewinn sekundär entstand.

Bisher galt eine Tri-/Tetrasomie 11 bzw. der 11q-Zugewinn als eine der CA, welche die HMM-Gruppe definiert und frühzeitig bei MM entsteht (Kumar et al., 2012). Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass 11q-Zugewinne bei den NHMM zu den früh auftretenden klonalen CA zählen und es sich bei dem 11q-Zugewinn der HMM um eine später entstehende CA handelt (Aktas Samur et al., 2019). Unsere oben gezeigten Daten unterstützen somit diese Erkenntnisse und tragen dazu bei, diese Hypothese durch die Erfassung weiterer Patientendaten genauer zu beleuchten.

Die Tri-/Tetrasomie 11 bzw. der 11q-Zugewinn erwies sich in den meisten Fällen als genetisch stabile CA. Dennoch gab es 2 Fälle, die eine genetische Instabilität offenbarten. In diesen beiden Fällen kam es zum Verlust der Tri-/Tetrasomie 11. Damit demonstrieren diese Ergebnisse ein mögliches instabiles genetisches Muster der Tri-/Tetrasomie 11 unter klonaler Evolution, was bereits 2015 unsererseits in einem Poster publiziert wurde (Pomplun et al., 2017). Die mögliche genetische Instabilität der Tri-/Tetrasomie 11 bzw. des 11q-Zugewinns ist mit den Ergebnissen von Walker und Kollaboratoren kongruent, welche Mutationsanalysen an einer großen Kohorte mit Patienten bei ED des MM untersucht hatten. In dieser Studie wurde eine Assoziation zwischen Mutationen des *FAM46C*-Gens und der Tri-/Tetrasomie 11 bzw. des 11q-Zugewinns gezeigt und daraufhin eine mögliche genetische Instabilität, hervorgerufen durch Mutationen in bestimmten Treibergen, postuliert (Walker et al., 2018).

Die Erkenntnis einer möglichen genetischen Instabilität der Trisomie 11 wurde durch die hier durchgeführte, konsequente, sequentielle Analyse der CA im Rahmen einer klonalen Evolution über den gesamten Krankheitsverlauf gewonnen. Da es verschiedene Untersuchungen gibt, die das simultane Vorliegen von Trisomien bei MM und Hochrisikoläsionen wie den Translokationen t(4;14), t(14;16), t(14;20) und 17p13/TP53-Deletion analysiert haben und eine Verbesserung der Prognose bei simultan vorliegenden Trisomien postulierten (Kumar et al., 2012), ist es relevant zu beachten, dass möglicherweise eine Instabilität der Tri-/Tetrasomie 11 bzw. des 11q-Zugewinns oder ggf. auch anderer Trisomien vorliegen könnte, und dieser vermeintlich positive Effekt kritisch betrachtet werden sollte.

5.4.4 13q-Deletionen zeigen eine hohe Inzidenz bei den HMM, treten eher primär auf und können eine genetische Instabilität aufweisen

Die zweithäufigste CA, mit einer Frequenz von insgesamt 62,5 % (15/24), war die 13q-Deletion. In 45,8 % (11/24) lag die 13q-Deletion bereits bei der ED vor und in 16,7 % (4/24) entstand sie als sekundäre CA. Somit steht die ermittelte Inzidenz im Einklang mit den Inzidenzen von 43~47 % aus anderen Studien mit größeren Kohorten (Avet-Loiseau et al., 2013, Fonseca et al., 2001, Liebisch et al., 2003).

Die 13q-Deletion wird in der Literatur als vornehmlich in der NHMM-Gruppe auftretende genetische Läsion angegeben (Fonseca et al., 2009). In einer Studie von Fonseca und Kollaboratoren wurden Häufigkeiten für eine 13q-Deletion von 71 % bei den NHMM und von 37 % bei den HMM ermittelt (Fonseca et al., 2003b). In der vorliegenden Arbeit lag die Gewichtung der 13q-Deletionen ebenfalls auf der Seite der NHMM mit 76,9 % (10/13) im Vergleich zu 45,5 % (5/11) bei den HMM. Allerdings zeigen die HMM dieser Arbeit eine etwas höhere Inzidenz von 13q-Deletionen, als in der Arbeit von Fonseca und Kollaboratoren.

Weitere etablierte Studien berichten von höheren Inzidenzen vor allem bei den NHMM, zeigen aber in Relation ähnliche Ergebnisse (Aktas Samur et al., 2019, Kumar et al., 2012, Saxe et al., 2019). Beispielsweise wurde in einer Studie von Kumar und Kollaboratoren dargestellt, dass 57 % der Patienten der NHMM-Gruppe eine Monosomie 13, bzw. eine 13q-Deletion aufwiesen sowie 36 % der Patienten der HMM-Gruppe (Kumar et al., 2012).

Wenn man den Zeitpunkt des Auftretens einer 13q-Deletion und die Verteilung in der HMM- und NHMM-Gruppe betrachtet, verändert sich die Gewichtung der 13q-Deletionen im hier untersuchten Kollektiv. In der analysierten Kohorte war, aufgrund der sequentiellen Analyse der Proben, der ED-Zeitpunkt deutlich genauer als in vielen anderen Studien zu definieren. Zum Zeitpunkt der ED betrug die Inzidenz bei den NHMM 53,8 % (7/13) und 36,4 % (4/11) bei den HMM. Als sekundäre CA trat eine 13q-Deletion jedoch in 23,1 % der NHMM (3/13) und in nur 9,1 % der HMM (1/11) auf. Dieser neue Aspekt, welcher sich durch die hier erfolgten sequentiellen Testungen und Analysen bzgl. der klonalen Evolution ergibt, erlaubt spezifischere Aussagen bzgl. des Entstehungszeitpunktes der CA. Dadurch lässt sich die Diskrepanz der vorliegenden Daten zu der häufigen Annahme, die 13q-Deletionen sei mit einem sekundären Auftreten assoziiert (Sawyer, 2011), erklären. Dass die Frage nach dem Entstehungszeitpunkt der 13q-Deletion noch nicht endgültig geklärt ist, wird auch daran deutlich, dass es Studien gibt, welche die 13q-Deletionen bereits im MGUS-Stadium (Avet-Loiseau et al., 1999, Binder et al., 2017, Fonseca et al., 2002b) bzw. bei neu diagnostizierten MM detektiert haben (Fonseca et al., 2001, Kaufmann et al., 2004). Durch serielle Analysen der 13q-Deletion sind demnach genauere Aussagen bzgl. des Entstehungszeitpunktes möglich.

Bezüglich der genetischen Stabilität der 13q-Deletion gibt es kaum Studien. Die 13q-Deletion offenbarte sich in dieser Arbeit als numerische CA mit einem möglichen instabilen genetischen Verlauf. So kam es in 2 Fällen unter evolutionärer Entwicklung zum 13q-Zugewinn, *ergo* Verlust der 13q-Deletion. Da jeweils ein Fall zur Gruppe der HMM und ein Fall zur Gruppe der NHMM gehörte, könnte bzgl. der Instabilität innerhalb der Gruppen eine gleichmäßige Verteilung vermutet werden.

Die prognostische Relevanz der 13q-Deletion wird kontrovers diskutiert: Einige Autoren zählen sie zu den CA, welche die Prognose des MM verschlechtern (Perez-Simon et al., 1998), wobei andere nicht von einer Verschlechterung der Prognose durch die 13q-Deletion *per se* ausgehen, sondern jene Prognoseverschlechterung eher durch die frequente Vergesellschaftung der 13q-Deletion mit Hochrisikoläsionen wie 17p13/TP53-Deletion oder der Translokation t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH bedingt sei (Avet-Loiseau et al., 2007). Unsere Daten bestätigen diese These, denn hier lagen in 4 Fällen die 13q-Deletion und die Translokation t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH bei ED simultan vor und in einem Fall als

sekundäre CA. Interessant ist die Beobachtung, dass die restlichen 3 Fälle mit sekundärer 13q-Deletion nicht simultan mit einer Translokation $t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH$ vorlagen, sondern die 13q-Deletion mit je einer Translokation $t(11;14)/CCND1-IGH$ und einer $t(14;16)$ vergesellschaftet war und in Fall 24 bei den HMM auftrat. Eine Häufung gemeinsam auftretender 13q-Deletionen und 17p13/TP53-Deletionen konnte hier jedoch nicht festgestellt werden, allerdings muss die geringe Anzahl der 17p13/TP53-positiven Fälle bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Bezüglich einer möglichen Risikostratifizierung anhand des Nachweises einer 13q-Deletion sollte eine potentielle Instabilität berücksichtigt werden. Hier ist eine größere Kohorte mit sequentieller genetischer Testung nötig, um eine mögliche Instabilität und den Entstehungszeitpunkt der 13q-Deletion genauer zu definieren. Zudem sollte die Rolle der begleitenden CA einer 13q-Deletion näher betrachtet werden, um einen möglichen prognostischen Einfluss auf die 13q-Deletion an sich und möglicherweise auch auf die Tumorevolution des MM genauer zu beleuchten.

5.4.5 17p13/TP53-Deletionen sind genetisch stabile CA der NHMM-Gruppe

Eine Hochrisikoaberration bei MM ist die 17p13/TP53-Deletion, welche mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht wird (Avet-Loiseau et al., 2007, Fonseca et al., 2009). In das R-ISS zur Risikostratifizierung des MM wird sie gemeinsam mit der Translokation $t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH$ als chromosomal Risikoläsion eingerechnet (Palumbo et al., 2015). Die Inzidenz der 17p13/TP53-Deletion bei initialer Diagnose wird in der Literatur mit 9~13 % angegeben (Avet-Loiseau et al., 2007, Fonseca et al., 2003a, Kumar et al., 2012, Walker et al., 2019), mit Zunahme während des Krankheitsverlaufs (Avet-Loiseau et al., 2007, Schultheis et al., 1999). Insgesamt konnte die 17p13/TP53-Deletion mit einer Frequenz von 12,5 % (3/24) detektiert werden. Mit einer Inzidenz von 8,3 % (2/24) bei ED und 4,2 % (1/24) sekundär aufgetretener 17p13/TP53-Deletionen, sind die vorliegenden Ergebnisse zu den etablierten Studienergebnissen insofern diskrepanz, als dass die 17p13/TP53-Deletion generell mit einer sekundären Entstehung in Verbindung gebracht wird (Aktas Samur et al., 2019, Sawyer, 2011). Zusätzlich war die Nachweisfrequenz der 17p13/TP53-Deletion insgesamt geringer als im Allgemeinen beschrieben. Es ist bemerkenswert, dass trotz der Analyse von 115 seriellen Proben die 17p13/TP53-Deletion nicht annähernd als sekundär auftretende CA offenbart werden konnte. Man könnte spekulieren, dass die hier vorliegende Testdichte kaum mit großen, etablierten Studien und deren Nachweiszeitpunkten bzgl. einer sekundären Entstehung vergleichbar ist. Die kleine Fallzahl von 24 Patienten könnte ebenso

einen Einfluss haben. Allerdings wurden hier über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 9 Jahren sequentielle Proben untersucht, was im Vergleich zu anderen Studien sehr lang ist.

Die 17p13/TP53-Deletion wird allgemein als CA mit ähnlicher Nachweisfrequenz in beiden Kategorien HMM und NHMM angegeben (Aktas Samur et al., 2019, Chng et al., 2006). In den hier analysierten Daten zeigte sich jedoch eine klare Dominanz der 17p13/TP53-Deletion bei den NHMM, da sie ausschließlich in dieser Gruppe nachzuweisen war. Somit widersprechen die erhobenen Daten zur Verteilung auf die HMM bzw. NHMM-Gruppe erneut der gängigen wissenschaftlichen Kenntnis.

In der hier vorliegenden Kohorte zeigte sich in allen Fällen mit 17p13/TP53-Deletion genetische Stabilität. Aufgrund der wenigen Studien mit sequentieller Analyse der genetischen Architektur des MM gibt es kaum Angaben zur genetischen Stabilität der 17p13/TP53-Deletion in der Literatur. Sawyer et al. hatten 2014 über die Möglichkeit springender Translokationen der chromosomal Bereiche 1q12 und 17p als mögliche Ursache für die Entstehung einer 17p13/TP53-Deletion berichtet. Dies lässt die Möglichkeit einer genetischen Instabilität der 17p13/TP53-Deletion vermuten (Sawyer et al., 2014). Chng et al. hatten ebenso eine genetische Instabilität der TP53-Deletion postuliert, da sie in der Analyse von MM mit TP53-Mutationen in 56 % eine Korrelation mit einer hemizygoten 17p13/TP53-Deletion nachweisen konnten (Chng et al., 2007).

Die bereits erwähnte Studie von Walker und Kollaboratoren, welche eine besonders schlechte Prognose in der „Double-hit“-Gruppe von Patienten mit simultan vorliegender 1q-Amplifikation und biallelischer 17p13/TP53-Deletion gezeigt hatte, hatte ebenso die prognostische Signifikanz der TP53-Mutationen bei MM dargestellt: In einem großen Kollektiv von fast 1300 Patienten mit ED eines MM, wurden mittels NGS TP53-Mutationen mit einer Inzidenz von 5,5 % detektiert (Walker et al., 2019). In der Korrelation mit klinischen Daten konnte sogar dargestellt werden, dass unter Einbeziehung der TP53-Mutationen, die 17p13/TP53-Deletion, welche als eine der relevantesten Risikoläsionen gilt, keinen prognostischen Einfluss hat (Walker et al., 2019). Dies zeigt mit aller Deutlichkeit, wie wichtig fundierte Kenntnisse bzgl. einer so relevanten CA wie der TP53-Mutation sind.

Da die 17p13/TP53-Deletion in dem hier untersuchten Kollektiv ausnahmslos genetisch stabil nach dem Primärnachweis war, stellt sie nach dieser Analyse einen stabilen genetischen Marker zur Verlaufskontrolle dar. Trotz der geringen Fallzahl zeigen die Ergebnisse Kontroversen bzgl. des Verständnisses der 17p13/TP53-Deletion auf und könnten somit einen Anstoß für weitere Studien geben. Zur weiteren Beleuchtung der genetischen Eigenschaften der 17p13/TP53-Deletion und TP53-Mutation, inklusive Reevaluation ihres Entstehungszeitpunktes und ihrer genetischen Stabilität, sollten Studien mit größerer Fallzahl

und sequentiellen genetischen Untersuchungen durchgeführt werden. Da die 17p13/TP53-Deletion als Hochrisikoaberration zählt, erscheint die Kenntnis ihrer genetischen Merkmale als essenziell um ihre Bedeutung bzgl. einer Risikostratifizierung definieren zu können.

5.4.6 Tri- bzw. Tetrasomien des Chromosoms 17 und der 17q-Zugewinn sind häufige CA der HMM-Gruppe, können primär oder sekundär entstehen und zeigen genetische Stabilität

Häufiger als die 17p13/TP53-Deletion, lag ein 17q-Zugewinn bzw. eine Tri-/Tetrasomie des Chromosoms 17 vor. Die Gesamtinzidenz lag bei 25,0 % (6/24), wovon jeweils 3 Fälle einen 17q-Zugewinn und 3 Fälle eine Tri-/Tetrasomie 17 aufwiesen (je 12,5 %). Die Inzidenz bei ED wird in der Studie von Chretien und Kollaboratoren mit ca. 5 % für die Trisomie 17 angegeben (Chretien et al., 2015), unter Verwendung der SNP-Array Diagnostik. Da in dieser Arbeit alle Fälle mit Tri-/Tetrasomie 17 bereits bei der Initialdiagnose vorlagen, ist hier die Inzidenz mit 12,5 % (3/24) deutlich höher. Im Gegensatz dazu traten alle 17q-Zugewinne in diesem Kollektiv ausnahmslos sekundär auf. Dies steht im Kontrast zu der hohen Inzidenz der Trisomie 17 bzw. des 17q-Zugewinns von 28 % im MGUS-Stadium, welche von der Arbeitsgruppe um Aktas Samur ermittelt wurde (Aktas Samur et al., 2019). Kongruenz zeigte sich aber insofern zur genannten Studie, als dass die Tri-/Tetrasomie 17 bzw. der 17q-Zugewinn ausschließlich in der HMM-Gruppe nachgewiesen wurden. Zudem deuten die hier erhobenen Daten auf eine genetische Stabilität beider Läsionen hin.

Einerseits sind die nachgewiesenen Inzidenzen aufgrund der generell spärlichen Angaben zur Inzidenz der Trisomie 17 bzw. des 17q-Zugewinns schwierig zu vergleichen. Andererseits ist die Patientenanzahl dieses Kollektivs klein, sodass eine Überrepräsentation aufgrund der geringen Fallzahl möglich ist. Jedoch gibt es kaum Studien, die so viele sequentielle Proben bzgl. CA bei MM analysiert haben. Dies erschwert es, valide Schlüsse auf die wahrhaftige Inzidenz der Tri-/Tetrasomie 17 zu ziehen.

Der alleinige Nachweis in der HMM-Gruppe legt die Vermutung nahe, dass, obwohl die Trisomie 17 nicht zu den die HMM-Gruppe definierenden CA zählt, auch das Chromosom 17, wie die anderen Chromosomen ungerader Zahlen, bei MM polyploid vorliegen könnte. Die Beobachtung, dass die Fälle mit Tri-/Tetrasomie 17 alle bei ED bestanden und die Fälle mit 17q-Zugewinn alle sekundär auftraten, könnte einen Hinweis auf ihre unterschiedlichen Entitäten geben. Zur genaueren Beleuchtung dieser Beobachtungen wäre die gezielte Analyse bzgl. einer Tri-/Tetrasomie 17 bzw. eines 17q-Zugewinns in den beiden Gruppen HMM und NHMM sowie ihres Entstehungszeitpunktes nötig.

5.4.7 Tri- bzw. Tetrasomien des Chromosoms 21 und der 21q-Zugewinn sind häufige CA der HMM-Gruppe, treten sowohl primär als auch sekundär auf und können eine genetische Instabilität aufweisen

Als eine die HMM-Gruppe definierende numerische CA (Sawyer, 2011), zeigten sich die Tri-/Tetrasomie 21 und der 21q-Zugewinn auch in diesem Kollektiv erwartungsgemäß deutlich häufiger in der Gruppe der HMM (63,6 %, 7/11), als bei den NHMM (23,1 %, 3/13). Die Gesamtinzidenz der Tri-/Tetrasomie 21 und des 21q-Zugewinns lag bei 41,7 % (10/24). Die Trisomie 21 wird selten in der Literatur als eigenständige CA betrachtet und eher in die Inzidenz der Trisomien bei MM miteingerechnet. So findet sie beispielsweise in der Studie von Kumar und Kollaboratoren zum Einfluss vorliegender Trisomien auf das Überleben bei simultan vorliegenden Hochrisikoaberrationen keine Erwähnung (Kumar et al., 2012). In der Studie von Chretien und Kollaboratoren wird die Inzidenz der Trisomie 21 zum Zeitpunkt der initialen Diagnosestellung mit 23 % angegeben (Chretien et al., 2015). Somit sind die Ergebnisse dieser Arbeit mit einer Inzidenz von 25 % (6/24) zum Zeitpunkt der ED kongruent.

Die erwartungsgemäß hohe Inzidenz der Tri-/Tetrasomie 21 bzw. des 21q-Zugewinns in der HMM-Gruppe von 63,6 % ist etwas höher als die beobachtete Inzidenz von 44 % bei den HMM in großen, aktuellen Studien, wie der von Aktas Samur und Kollegen. Die Inzidenz der Trisomie 21 bei den NHMM ist fraglich zu gering, als dass sie dort Erwähnung finden würde (Aktas Samur et al., 2019).

Die Trisomie 21 bei MM wird nach allgemeiner wissenschaftlicher Kenntnis als frühzeitig auftretende CA erachtet (Saxe et al., 2019). Die Analyse des vorliegenden Kollektivs zeigte jedoch, dass die Tri-/Tetrasomie 21 zwar eher primär vorliegt (25 %, 6/24), jedoch nicht deutlich seltener auch sekundär entsteht (16,7 % 4/24).

Die FISH-Analyse bzgl. einer Trisomie 21 ist nicht in der Standarddiagnostik nach IMWG-Kriterien etabliert (Chng et al., 2014), was einen Grund für die seltene Durchführung einer Analyse bzgl. ihrer Präsenz bei MM darstellen könnte. Besonders bei bereits vorliegenden, die NHMM-Gruppe definierenden CA, werden durch die Testung auf numerische Aberrationen möglicherweise keine neuen Erkenntnisse erwartet. Jedoch wurde bereits 2015 in der Studie von Chretien und Kollaboratoren die mögliche prognostische Relevanz der Trisomie 21 bei bestehenden Hochrisikoaberrationen wie der 17p13/TP53-Deletion und der Translokation t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH diskutiert. Bislang galt die Annahme, dass Trisomien einen günstigen prognostischen Effekt bei Patienten mit Hochrisikoaberrationen wie z. B. Translokationen t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH, t(14;16)/IGH-MAF oder t(14;20)/IGH-MAFB, bzw. 17p13/TP53-Deletionen haben (Kumar et al., 2012). Chretien und Kollegen differenzierten zwischen den vorliegenden Trisomien und zeigten sogar gegensätzliche

Effekte: So wurde die Neutralisierung der schlechten Prognose bei Patienten mit einer Translokation $t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH$ durch das Vorliegen einer Trisomie 3 und/oder Trisomie 5 postuliert sowie eine Verlängerung des OS bei Patienten mit 17p13/TP53-Deletion und simultan vorliegenden, genannten Trisomien. Bezuglich der Kombination einer Trisomie 21 und vorliegenden Risikoaberrationen wurde jedoch sogar eine zusätzliche Verschlechterung der Prognose durch die Präsenz der Trisomie 21 beobachtet (Chretien et al., 2015).

Neben der neuen Erkenntnis der vorliegenden Arbeit, dass die Trisomie 21 auch mit einer sekundären Entstehung assoziiert sein kann, offenbarte sich durch die seriellen Testungen in einem Fall eine genetische Instabilität der Trisomie 21. Zwar wies die Mehrzahl der Tri-/Tetrasomien 21 und auch der 21q-Zugewinn eine genetische Stabilität auf, jedoch kam es in einem Fall zum Verlust der Trisomie 21 und im Verlauf sogar zum Nachweis einer Tetrasomie 21. Insgesamt sind größere Studien mit sequentieller Analyse des Verlaufs und der genetischen Stabilität der Trisomie 21 nötig, um diese Beobachtung näher zu beleuchten. Jedoch sollte die Möglichkeit einer genetischen Instabilität der Tri-/Tetrasomie 21, wie sie sich in dieser Arbeit offenbarte, bei einer potentiellen Risikostratifizierung von Patienten anhand der Präsenz einer Trisomie 21 und simultan vorliegenden Hochrisikoaberrationen bedacht werden. Die Möglichkeit einer Prognoseverschlechterung aufgrund einer genetischen Instabilität könnte womöglich erklärend sein.

5.5 Klonale Evolution weiterer numerischen Aberrationen

In diesem Kapitel werden weitere numerische Aberrationen, welche in diesem Kollektiv detektiert wurden, diskutiert. Es handelt sich jeweils um seltene, z. T. einmalig detektierte, numerische CA. Da es sich bei den meisten der nun folgenden CA nicht um typische, mit dem MM assoziierte Aberrationen handelt, finden sie in den meisten wissenschaftlichen Arbeiten nur selten Erwähnung. Zudem soll der Fokus dieser Arbeit auf den bereits in den einzelnen Kapiteln zuvor diskutierten CA liegen, weshalb hier nur ein Überblick geboten werden soll.

Aus den Untersuchungen dieser Arbeit konnte der 13q-Zugewinn als seltene und eher sekundär auftretende CA identifiziert werden. Dieser lag in 3 Fällen vor (12,5 %), von denen 2 Fälle zu den NHMM und ein Fall zu den HMM gehörten. In 2 Fällen entstand der 13q-Zugewinn aus einer zuvor präsenten 13q-Deletion (siehe Abschnitt 4.4.5). Deshalb erscheint es möglich, dass der 13q-Zugewinn aufgrund einer genetischen Instabilität der 13q-Deletion entsteht. Der singuläre Fall mit 13q-Zugewinn, welcher zu den HMM gehörte und bereits bei ED vorlag, scheint hingegen innerhalb eines polyploiden Klons entstanden zu sein.

Weitere einzelne numerische CA, die im Rahmen dieser Analyse detektiert wurden, waren eine 4p-Deletion, ein 4p-Zugewinn, eine 14q-Deletion, ein 14q-Zugewinn sowie ein 16q-Zugewinn, welche jeweils in einem Fall auftraten (je 4,2 %, 1/24). Alle genannten CA waren bereits bei der ED vorhanden und fast ausschließlich in der Gruppe der HMM zu detektieren. Lediglich Fall 19 mit einem 4p-Zugewinn zählte zu den NHMM. Dies lässt eine höhere genetische Variabilität der HMM gegenüber den NHMM vermuten, welche bereits in frühen Krankheitsstadien vorliegt.

5.6 Klonale Evolution und kombiniert vorliegende CA: Sie liegen oft bereits primär vor und treten häufiger bei den NHMM auf

Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten, die Kombinationen von CA und deren möglichen Einfluss auf die Prognose der Erkrankung untersuchen. Offensichtlich sind die kombiniert auftretenden Trisomien der Chromosomen ungerader Zahlen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21, welche die Gruppe der HMM definieren (Sawyer, 2011). Dazu passend wurden auch in diesem Kollektiv einige Fälle mit kombiniert auftretenden CA, die für die HMM-Gruppe pathognomonisch sind, detektiert. So waren es 8 Fälle mit kombiniert vorliegendem 1q-Zugewinn und Tri-/Tetrasomie 11, 7 Fälle mit 1q-Zugewinn und Tri-/Tetrasomie 21 und ebenfalls 7 Fälle mit Tri-/Tetrasomie 11 und Tri-/Tetrasomie 21. Diese traten zumeist in der HMM-Gruppe auf, jedoch gab es auch einige Fälle genannter Kombinationen, welche zu den NHMM gehörten (siehe Kapitel 4.5).

Kumar und Kollaboratoren hatten in einer Arbeit zur Entschlüsselung des Einflusses von Hochrisikoläsionen auf das Überleben bei MM, die Überlappung verschiedener CA untersucht (Kumar et al., 2012). Allerdings wurden hier alle Fälle mit 14q32/IGH-Translokationen sowie alle Fälle mit jeglichen Trisomien zusammengefasst und deren kombiniertes Auftreten mit einer 13q-Deletion untersucht. Es zeigte sich in 57 % der Fälle eine Kombination aus 14q32/IGH-Abnormalität und 13q-Deletion und 36 % der Fälle boten eine Kombination aus einer der untersuchten Trisomien in Kombination mit einer 13q-Deletion (Kumar et al., 2012). In der vorliegenden Untersuchung entsprechen dieser Einteilung die Kategorien NHMM und HMM und somit analog dazu die Inzidenzen der 13q-Deletion in den Gruppen NHMM (41,7 % 10/24) und HMM (20,8 %, 5/24). Somit waren die Inzidenzen der 13q-Deletion in diesem Kollektiv insgesamt niedriger, jedoch ist die Verhältnismäßigkeit der Inzidenzen in beiden Gruppen passend.

Eine weitere bekannte Kombination simultan vorliegender CA ist die Kombination aus Translokation t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH und 13q-Deletion (Fonseca et al., 2009). Aufgrund

der Assoziation der 13q-Deletion mit der Translokation *t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH* als bekannte Hochrisikoläsion, wird, ihr als prognostisch ungünstig geltender Effekt, kontrovers diskutiert (Avet-Loiseau et al., 2007). Die vorliegenden Daten können diese Überlappung einer Translokation *t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH* und einer 13q-Deletion bestätigen, da sie auch in diesem Kollektiv in allen 5 Fällen, welche positiv für die Translokation *t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH* waren, kombiniert vorlagen. Bezüglich der Evaluation des prognostischen Einflusses in diesem Kollektiv, wäre eine Korrelation mit klinischen Daten notwendig.

Mehrere wissenschaftliche Arbeiten thematisieren die Rolle eines 1q-Zugewinns als wichtige Markeraberration bei MM, aufgrund seines schlechten prognostischen Einflusses (Walker et al., 2010). Zuletzt hatten Walker und Kollaboratoren die infauste Prognose bei kombiniert vorliegender 1q-Amplifikation und 17p13/*TP53*-Deletion/Mutation beschrieben (Walker et al., 2019). Diese Kombination konnte in der vorliegenden Arbeit lediglich in 2 Fällen gefunden werden. Da es sich jedoch bei dem 1q-Zugewinn um die in dieser Arbeit am häufigsten detektierte CA handelt, wurden hier eine Reihe an Kombinationen mit anderen CA beobachtet, welche in Kapitel 4.5 genauer aufgeschlüsselt sind. Am häufigsten, mit 12 Fällen, trat eine Kombination aus 1q-Zugewinn und 13q-Deletion auf, davon einmal im Rahmen der Tumorevolution. Da es sich bei beiden CA um mehrheitlich als Risikoläsionen erachtete CA handelt (Avet-Loiseau, 2007, Tricot et al., 1995, Walker et al., 2010), wären weitere Studien, die diese Kombination hinsichtlich eines prognostischen Einflusses beleuchten, interessant. Mit gleicher Begründung könnte zudem die nähere Untersuchung der überlappend vorkommenden Aberrationen 1q-Zugewinn und Translokation *t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH* sinnvoll sein, die in dieser Arbeit in 4 Fällen auftraten.

Zusammenfassend konnte mit 43 NHMM-Proben im Vergleich zu 32 HMM-Proben, eine höhere Zahl simultan vorliegender CA bei den NHMM detektiert werden: Hier fallen v. a. die 14q32/*IGH*-Translokationen und 13q-Deletionen ins Gewicht, was die allgemeine wissenschaftliche Auffassung zu häufig auftretenden Kombinationen von 14q32/*IGH*-Translokationen und 13q-Deletionen mit anderen CA, bestätigt. Außerdem offenbarte die Analyse der kombinierten CA, dass diese häufig bereits bei der ED vorliegen. Somit sind die erhobenen Daten kongruent mit dem allgemeinen Verständnis der genetischen Evolution des MM. Zum Ausbruch der Erkrankung sind primäre genetische Ereignisse erforderlich, welche zur Entartung der Plasmazelle, entweder in Richtung HMM oder NHMM führen. Im Verlauf der Erkrankung, bedingt durch Therapie und eine Vielzahl weiterer Einflüsse, können jedoch einzelne sekundäre Läsionen entstehen, wie es in dieser Arbeit dargestellt werden konnte.

5.7 Stellenwert der Chromosomen-Bänderungsanalyse bei MM

In der hier durchgeführten Analyse von 115 sequentiellen Knochenmarkproben von 24 MM-Patienten wurde neben der FISH-Technik auch die Chromosomen-Bänderungsanalyse zur Beleuchtung der Genetik des MM miteinbezogen. Von 21 der 24 Patienten lagen Daten aus der Chromosomen-Bänderungsanalyse vor. Wie bereits erwähnt wurde, stellt die Chromosomen-Bänderungsanalyse eine Methode zum nahezu globalen Nachweis vorliegender CA bei Tumorerkrankungen dar, jedoch ist die Generierung auswertbarer Chromosomensätze bei MM durch die oft niedrige Infiltrationsrate und die niedrige Teilungsaktivität der Plasmazellen erschwert. Subtile CA, wie z. B. die Translokation t(4;14)/*MMSET/FGFR3-IGH* können durch die Analyse der Metaphasen nicht erkannt werden (Sawyer, 2011), was einen Nachteil der Chromosomen-Bänderungsanalyse darstellt. Für kleine Veränderungen, auch solche auf Nukleotid-Ebene, stellen die FISH und die NGS geeignete Nachweismethoden dar.

Somit hat die Detektion CA durch die Chromosomen-Bänderungsanalyse prognostische Relevanz bei MM. Vor allem im frühen Krankheitsstadium sind aberrante Karyotypen bei MM eher selten (Sawyer et al., 1995). Der Nachweis CA in der klassischen Zytogenetik deutet demnach auf eine fortgeschrittene Erkrankung hin (Bergsagel & Kuehl, 2001). In dieser Arbeit konnten v. a. bei den genetischen Analysen der fortgeschrittenen Krankheitsstadien komplexe aberrante Karyotypen identifiziert werden.

Bei geglückter Plasmazellstimulation können aufgrund der umfassenden Darstellung der CA durch eine Chromosomen-Bänderungsanalyse deutlich mehr Aberrationen als durch die FISH erfasst werden, allerdings auf einer niedrigen Auflösungsebene. In der vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse, welche durch die FISH-Analyse erhoben wurden, durch die Resultate der Chromosomen-Bänderungsanalyse bestätigt, bzw. in einigen Fällen sogar ergänzt werden. Durch die Möglichkeit der umfassenden Detektion vorliegender CA durch die Chromosomen-Bänderungsanalyse, konnte so in dieser Arbeit in Fall 3 der Translokationspartner von 14q32/*IGH* offenbart werden, welcher trotz weitreichender FISH-Testungen bzgl. eines Translokationspartners nicht identifiziert werden konnte: In der Chromosomen-Bänderungsanalyse wurde schließlich die Translokation t(14;16)(q32;q22~23) nachgewiesen.

Zudem ist bekannt, dass es bei MM zur Entstehung sekundärer Neoplasien kommen kann, hier sind v. a. die akute myeloische Leukämie (AML) und das MDS zu erwähnen (Landgren et al., 2011). Im Speziellen konnten auch in dieser Arbeit durch die Chromosomen-Bänderungsanalyse Zweitneoplasien entdeckt werden, welche durch die alleinige FISH-Analyse verborgen geblieben wären: Bei zwei Patienten konnte so jeweils eine MPN und ein

MDS detektiert werden. Es konnte in dieser Analyse gezeigt werden, dass die Monosomie 7 und die Monosomie 5 bzw. die 5q-Deletion rekurrente zytogenetisch nachweisbare Veränderungen bei sekundär entstandenem MDS sind (Paul et al., 2015). Durch die zusätzliche Analyse mittels NGS konnten zudem weitere genetische Aberrationen wie *RUNX1*- und *TP53*-Mutationen bei Patienten mit sekundär entstandenem MDS bei MM als rekurrente Aberrationen identifiziert werden (Murga Penas et al., 2015). Da die Diagnostizierung einer Zweitneoplasie durchaus therapeutische Konsequenzen für die Patienten haben kann und ein relevanter Einfluss auf den Krankheitsverlauf möglich ist, ist die Chromosomen-Bänderungsanalyse bei MM eine sinnvolle Methode zur diagnostischen Ergänzung.

5.8 Fazit und Ausblick

Der ursprüngliche Gedanke zum Thema klonale Evolution bei Tumoren basiert auf der These Peter Nowells. Dieser postulierte 1976, ein Tumor entstünde aus einer einzelnen entarteten Zelle, welche im Krankheitsverlauf durch sukzessiv entstandene Mutationen im Sinne der Darwinschen Theorie „*survival of the fittest*“, selektiert würde und im Verlauf dominiert (Nowell, 1976). Die grundlegende Hypothese war also, dass es sich bei der Entstehung von Tumoren um einen evolutionären Verlauf handelt, der mit der Akkumulation genetischer Aberrationen einhergeht, schließlich zur tumorösen Entartung und im Verlauf zur Therapieresistenz führt. Viele wissenschaftliche Arbeiten mit der Fragestellung nach klonaler Evolution bei MM legen Daten zu einer möglichen evolutionären Tumorentwicklung dar (Furukawa & Kikuchi, 2020, Keats et al., 2012, Merz et al., 2017). Eine longitudinale Studie mit Ergebnissen zum Verlauf der genetischen Aberrationen über mehrere Zeitpunkte bei MM, lag bisher jedoch noch nicht in dieser Form vor.

Zur genaueren Beleuchtung der klonalen Evolution bei MM wurden 115 serielle Proben aus einem Kollektiv von 24 Patienten mit einem klinisch diagnostizierten MM analysiert. Dafür wurde primär die FISH-Technik verwendet sowie ergänzend die Chromosomen-Bänderungsanalyse. An den Empfehlungen der IMWG orientiert, wurden FISH-Testungen bzgl. vorliegender Aberrationen der Genorte 1q23.1/IRTA1/2, 8q24/MYC, 11q22~23 und der Zentromerregion des Chromosoms 11, 13q14/RB1, 14q32/IGH, 17p13/TP53 und 21q22/RCAN1 durchgeführt. Anhand vorliegender CA wie z.B. 14q32/IGH-Translokationen und Trisomien der Chromosomen 11 und 21 erfolgte die Einteilung in die orientierenden Subgruppen HMM und NHMM, auf welche die Fälle nahezu gleichmäßig verteilt werden konnten. Die Analyse der CA erfolgte hinblickend auf die Gruppenzugehörigkeit HMM bzw. NHMM, den Entstehungszeitpunkt (primär *versus* sekundär) und genetische Stabilität der CA, um das Thema der klonalen Evolution bei MM näher zu betrachten.

Insgesamt konnte bei 16 der 24 Patienten eine Entwicklung im Sinne einer klonalen Evolution nachgewiesen werden. Numerische Aberrationen traten deutlich häufiger als strukturelle CA im Rahmen der klonalen Evolution auf: So zeigten 12 der 16 Fälle ausschließlich numerische Aberrationen. Chromosomale Aberrationen, welche eindeutig den HMM zugeordnet werden konnten, waren die Tri-/Tetrasomie 11 bzw. der 11q-Zugewinn, die Tri-/Tetrasomie 17 bzw. der 17q-Zugewinn und die Tri-/Tetrasomie 21 bzw. der 21q-Zugewinn. 14q32/IGH-Translokationen und 17p13/TP53-Deletionen waren eindeutig mit der NHMM-Gruppe assoziiert. Eine nahezu ausgeglichene Verteilung auf beide genetische Subgruppen konnte für den 1q-Zugewinn, die 1q-Amplifikation, die 8q24/MYC-Translokation und die 13q-Deletion ermittelt werden.

Die analysierten strukturellen Aberrationen 14q32/IGH- und 8q24/MYC-Bruch waren äußerst stabil nachweisbar. Es konnte aber gezeigt werden, dass es spezifische 14q32/IGH-Translokationen wie z. B. die t(4;14)/MMSET/FGFR3-IGH gibt, welche mit einer genomischen Instabilität des Tumorklons assoziiert sein können. Als genetisch stabile numerische Aberrationen konnten der 1q-Zugewinn und numerische Aberrationen des Chromosoms 17 identifiziert werden. Eine genetische Instabilität konnte bei der 1q-Amplifikation, der Tri-/Tetrasomie 11, der 13q-Deletion und der Tri-Tetrassomie 21 offenbart werden. Die durchgeführte Analyse zeigt, dass die meisten hier untersuchten CA zu jedem Zeitpunkt während des Krankheitsverlaufs auftreten können: Sowohl die 8q24/MYC-Translokation, als auch die numerischen Veränderungen 1q-Zugewinn, Tri-/Tetrasomie 11 bzw. 11q-Zugewinn, die numerischen Veränderungen von Chromosom 17 und die Tri-/Tetrasomie 21 waren bzgl. ihres Entstehungszeitpunktes heterogen. Lediglich 14q32/IGH-Translokationen und 13q-Deletionen zeigten eine eindeutige Tendenz bereits primär vorzuliegen. Numerische Veränderungen von 8q24/MYC und die 1q-Amplifikation traten dagegen deutlich häufiger sekundär auf.

Die Analyse von 115 seriellen Proben von 24 MM Patienten hat gezeigt, dass die Mehrzahl der Fälle eine Entwicklung sekundärer Aberrationen im Sinne einer klonalen Evolution bot. Der Anteil der Fälle mit klonaler Evolution war in der Gruppe der HMM etwas höher als in der Gruppe der NHMM, bei gleicher absoluter Anzahl. Die Gruppe der NHMM zeigte demnach tendenziell eine höhere genetische Stabilität als die HMM-Gruppe, sodass die orientierende Einteilung in die beiden Gruppen eine unterschiedliche Tumorphogenese und verschiedene Tumoreigenschaften vermuten lässt.

Durch diese serielle Analyse konnten somit weitere Erkenntnisse zur klonalen Evolution bei MM generiert werden, welche den Entstehungszeitpunkt, die Gruppenzugehörigkeit und die genetische Stabilität betreffen. Allerdings offenbart sich eine Problematik der hier durchgeführten Recherche in der Wahl der Methodik: Die Generierung ausreichenden

Materials zur Auswertung mittels FISH bzw. Chromosomen-Bänderungsanalyse stellt bei MM oft aufgrund der niedrigen Infiltrationsrate der Plasmazellen eine Herausforderung dar. Zudem kann die Materialqualität die Auswertung, für welche *per se* eine hohe Expertise nötig ist, erschweren. Da es sich bei der FISH-Technik um eine spezifische, auf antizipierte CA fokussierte Untersuchungsmethode handelt, kann es aufgrund der Vulnerabilität bzw. der Subtilität mancher chromosomal Veränderungen wie z. B. (Punkt-)Mutationen, zur unvollständigen Abbildung der vorliegenden genetischen Veränderungen kommen.

In Zukunft könnten durch Untersuchungen mit neueren Methoden aus dem NGS-Spektrum manche dieser Probleme umgangen werden. So wäre eine Möglichkeit subtile, genetisch instabile CA durch die Verwendung der *Whole Genome Sequencing* (WGS)- Technologie zu analysieren.

Insgesamt wurden durch die hier durchgeführte, umfassende sequentielle genetische Analyse zur Beantwortung der Frage nach klonaler Evolution bei MM insofern neue Erkenntnisse gewonnen, als dass die Instabilität einiger CA und auch die Heterogenität des Entstehungszeitpunktes zur kritischen Betrachtung der aktuell gültigen Klassifikation und Risikostratifizierung veranlassen könnte. Die Komplexität der genetischen Architektur des MM wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlicht und zeigt, dass es durchaus zur klonalen Evolution bei MM kommt, der Weg jedoch einem komplexen Verlauf entspricht.

Generell sind größere Kohorten, aber vor allem longitudinale Studien nötig, um das Thema der klonalen Evolution bei MM umfassender zu beleuchten. Im Speziellen könnten Untersuchungen mit dem Fokus auf den Entstehungszeitpunkt und die genetische Stabilität interessante Erkenntnisse zur Pathogenese des MM und schließlich zur Entwicklung neuer Therapieregime bringen. Dabei werden neben den etablierten Methoden wie der FISH-Technik und der Chromosomen-Bänderungsanalyse neue Methoden aus dem NGS-Spektrum eine große Rolle spielen, wie bereits in neueren Studien gezeigt wurde. Aktuell ist die gezielte Untersuchung einzelner, bekannter Aberrationen mittels FISH aufgrund der Kosteneffizienz und begrenzter Materialmengen bei Verlaufskontrollen des MM die Methode der Wahl. Neue Methoden könnten die Problematik der genetischen Analyse der Plasmazellen vereinfachen. NGS erlaubt die komplette Sequenzierung des menschlichen Genoms innerhalb kurzer Zeit. Jedoch ist auch diese Methodik nicht allumfassend. Numerische und strukturelle Veränderungen bei MM können ab einer gewissen Größe durch die Karyotypisierung und bei gezielter Suche durch die FISH-Technik detektiert werden. Punktmutationen dagegen können weder mittels Chromosomen-Bänderungsanalyse noch FISH erfasst werden, hier greifen aber die WES (*Whole Exome-Sequencing*)- oder die WGS-Techniken. Umgekehrt ist aber der Nachweis numerischer Aberrationen beim WES/WGS nur durch die Wahl eines sehr großen Panels möglich, was derzeit nicht zum Standardprocedere in der Diagnostik zählt. Außerdem

ist der Nachweis struktureller CA mittels NGS eingeschränkt, da sie sehr kurze DNA-Fragmente zwischen 150 und 300 Basenpaare sequenziert und insbesondere *IGH*-Translokationen aufgrund der Streuung der Bruchpunkte und der hoch repetitiven Sequenzbereiche nicht adäquat abgebildet werden können. Durch die Weiterentwicklung der Methoden aus dem NGS-Spektrum können mittlerweile durch die innovative Nanopore-Sequenzierung oder *Third Generation Sequencing* bis zu zwei Millionen Basen abgebildet werden. Dadurch wird es möglich, auch strukturell veränderte Bereiche des Genoms zu erfassen (Kraft & Kurth, 2020), und im Kontext der hier vorliegenden Analyse könnte somit auch die Streuung z. B. der *MYC*- und *IGH*-Bruchpunkte umgangen werden.

Die Korrelation von Daten der NGS-Technik und den etablierten Methoden wie FISH und der Chromosomen-Bänderungsanalyse könnte Aufschlüsse über das komplexe genetische Gerüst des MM geben. Auf der Basis der Ergebnisse dieser Arbeit können weitere, gezielte Studien mit neuen Methoden durchgeführt werden, um Fortschritte in der Diagnostik und der Therapie des MM zu erreichen.

6 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM), welches durch eine abnorme Proliferation von Plasmazellen definiert ist, zeichnet sich sowohl durch klinische als auch genetische Heterogenität aus. Es ist ein häufiger Tumor von Knochen und Knochenmark (KM) und macht etwa 0,8 % aller Neoplasien aus (Becker, 2011). Die Transformation der Plasmazellen in einen malignen, entarteten Klon zeigt einen stufenartigen Verlauf, welcher mit einer Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz beginnt und sich über ein *Smoldering Myeloma* zum MM entwickeln kann. Analog zu dieser progredienten, klinischen Entwicklung, wird ein sequentieller Verlauf in der Genetik der Tumorzellen vermutet. Das MM wird in 2 genetische Gruppen unterteilt, die hyperdiploiden Multiplen Myelome (HMM), bei vorliegenden Trisomien der Chromosomen der ungeraden Zahlen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 und in die nicht-hyperdiploiden Myelome (NHMM), bei Präsenz von 14q32/IGH-Translokationen mit bekannten rekurrenten Translokationspartnern. Ein multifaktorielles Geschehen und die Durchführung von Therapieregimen werden als die Genetik der MM-Zellen beeinflussende Faktoren angenommen und sorgen für die Akquirierung sekundär entstandener chromosomal Aberrationen (CA), was als klonale Evolution bezeichnet wird. Zur näheren Beleuchtung dessen, wurden in dieser Arbeit 24 Fälle mit MM und mindestens 3 vorliegenden, sequentiellen Knochenmarkbiopsien über den kompletten Behandlungszeitraum untersucht, um flächendeckende Ergebnisse zum genetischen Verlauf zu generieren. Die Analyse der Präparate erfolgte mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) an CD138-selektierten Zellen und ergänzend mit der Chromosomen-Bänderungsanalyse, zur möglichst vollständigen Abbildung der Genetik. In dieser Arbeit wurden die Genorte 1q23.1/IRTA1/2, 8q24/MYC, 11q22~23 und Zentromer des Chromosoms 11, 13q14/RB1, 14q32/IGH, 17p13/TP53 und 21q22/RCAN1 untersucht, welche sich an den Empfehlungen der *International Myeloma Working Group* (IMWG) orientieren.

Alle untersuchten Fälle wiesen CA mit den eingesetzten Sonden auf. Es zeigte sich eine nahezu ausgeglichene Verteilung auf die HMM- und NHMM-Gruppe. Die CA, welche vorwiegend bei den HMM detektiert wurden, waren erwartungsgemäß die Tri-/Tetrasomien 11, 17 und 21. Der als prognostisch ungünstig geltende 1q-Zugewinn und die noch ungünstigere 1q-Amplifikation waren ebenso wie der 8q24/MYC-Bruch mit nahezu gleicher Inzidenz in beiden Gruppen anzutreffen. Die 13q- und 17p13/TP53-Deletionen fanden sich häufiger bei den NHMM. Zu den vornehmlich primär vorhandenen CA zählten 1q-Zugewinne, 13q-Deletionen, 14q32/IGH-Translokationen und 17p13/TP53-Deletionen. Von den genannten CA offenbarten der 1q-Zugewinn, die 14q32/IGH-Translokationen und die 17p13/TP53-Deletion genetische Stabilität. Zu den häufiger sekundär aufgetretenen CA zählten die 1q-Amplifikation sowie die 8q- und 13q-Zugewinne. Es gab zudem CA, welche eine Heterogenität bzgl. ihres Entstehungszeitpunktes aufwiesen: Dies waren die Tri-/Tetrasomien 11, 17 und 21 sowie der 8q24/MYC-Bruch.

Die Chromosomen-Bänderungsanalyse trug, wenn erfolgt, nur marginal zur Erweiterung der FISH bei. Allerdings hat sie einen wichtigen Stellenwert in der Identifikation von Zweitneoplasien bei MM, die sich im Rahmen der Behandlung entwickeln können. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde so in 2 Fällen eine Zweitneoplasie detektiert, was für die Prognose und weitere Therapie der Patienten relevant ist.

Eine Entwicklung im Sinne einer klonalen Evolution konnte bei 66,7 % Patienten nachgewiesen werden. Insgesamt war der Anteil der Fälle mit klonaler Evolution in der HMM-Gruppe tendenziell größer als bei den NHMM (72,7 % vs. 61,5 %). Der hohe Anteil an Fällen mit klonaler Evolution in der HMM-Gruppe ist jedoch verglichen mit bekannten Studienergebnissen neu, da HMM der Niedrigrisikogruppe entsprechend, als genetisch stabil und ohne evolutionäre Entwicklung beschrieben wurden. Am ehesten könnte dies auf die flächendeckende Untersuchung sequentieller Knochenmarkbiopsien zurückzuführen sein. Insbesondere sind aus den hier durchgeführten Untersuchungen eine genetische Instabilität für die Tri-/Tetrasomien 11 und 21 sowie die 13q-Deletion hervorzuheben, bei denen es im Rahmen einer klonalen Evolution zum Verlust bzw. Zugewinn dieser Veränderungen kam. Da es Studien gibt, welche eine Verbesserung der infausten Prognose chromosomaler Risikoläsionen wie t(4;14), t(14;16) oder 17p53/TP53-Deletionen bei begleitenden chromosomalen Zugewinnen postulieren, sind die hier gewonnenen Ergebnisse insofern relevant, als dass gezeigt werden konnte, dass sich die genannten CA ab dem Zeitpunkt der Initialdiagnose verändern können. Dies könnte sowohl Konsequenzen für die Risikostratifizierung der Patienten anhand des vorliegenden Karyotyps als auch für die Therapie haben. Im Gegensatz zum prognoseverbessernden Einfluss von Zugewinnen steht die 1q-Amplifikation. Zuletzt wurde ihr prognostisch äußerst ungünstiger Einfluss, v. a. bei simultan vorliegender biallelischer 17p13/TP53-Deletion postuliert. In der vorliegenden Arbeit wurde die 1q-Amplifikation nur in 2 Fällen stabil nachgewiesen, aber in 8 Fällen transient. Somit sollte auch für den angenommenen prognostischen Einfluss der 1q-Amplifikation eine mögliche genetische Instabilität beachtet werden und die genaue Differenzierung zwischen 1q-Zugewinn und 1q-Amplifikation in der Diagnostik sichergestellt werden.

Zusammenfassend konnten durch diese Arbeit neue Einblicke in die evolutionäre Entwicklung bei MM geboten werden. Es konnte eine klonale Evolution demonstriert werden. Zudem wurde bei der 1q-Amplifikation, den Tri-/Tetrasomien 11 und 21 und der 13q-Deletion eine genetische Instabilität detektiert, welche bei einer Risikostratifizierung und ihrer Anwendung als Verlaufsmarker im Monitoring des MM, berücksichtigt werden sollte. Auf der Basis dieser Ergebnisse sollten weitere Studien mit sequentieller genetischer Testung größerer Kohorten, ggf. unter Anwendung neuer Technologien aus dem NGS-Spektrum durchgeführt werden. So können weitere Erkenntnisse zur genetischen Evolution des MM erlangt werden, um eine Verbesserung der Risikostratifizierung zu erreichen und risikoadaptierte Therapieansätze zu entwickeln.

7 Literaturverzeichnis

- Aktas Samur, A., Minvielle, S., Shammas, M., Fulciniti, M., Magrangeas, F., Richardson, P. G., Moreau, P., Attal, M., Anderson, K. C., Parmigiani, G., Avet-Loiseau, H., Munshi, N. C. , Samur, M. K. 2019. Deciphering the chronology of copy number alterations in Multiple Myeloma. *Blood Cancer J*, 9, 39.
- Altieri, A., Chen, B., Bermejo, J. L., Castro, F. , Hemminki, K. 2006. Familial risks and temporal incidence trends of multiple myeloma. *Eur J Cancer*, 42, 1661-70.
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M. , Vardiman, J. W. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127, 2391-405.
- Attal, M., Harousseau, J. L., Facon, T., Guilhot, F., Doyen, C., Fuzibet, J. G., Monconduit, M., Hulin, C., Caillot, D., Bouabdallah, R., Voillat, L., Sotto, J. J., Grosbois, B., Bataille, R. , Intergroupe Francophone Du, M. 2003. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*, 349, 2495-502.
- Avet-Loiseau, H., Facon, T., Daviet, A., Godon, C., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Grosbois, B. , Bataille, R. 1999. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. *Cancer Res*, 59, 4546-50.
- Avet-Loiseau, H., Daviet, A., Sauner, S., Bataille, R. , Myelome, I. F. D. 2000. Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *Br J Haematol*, 111, 1116-7.
- Avet-Loiseau, H., Gerson, F., Magrangeas, F., Minvielle, S., Harousseau, J. L., Bataille, R. , Intergroupe Francophone Du, M. 2001. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*, 98, 3082-6.
- Avet-Loiseau, H., Facon, T., Grosbois, B., Magrangeas, F., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Minvielle, S., Bataille, R. , Intergroupe Francophone Du, M. 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*, 99, 2185-91.
- Avet-Loiseau, H. 2007. Role of genetics in prognostication in myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 20, 625-35.
- Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Leyvraz, S., Michallet, M., Yakoub-Agha, I., Garderet, L., Marit, G., Michaux, L., Voillat, L., Renaud, M., Grosbois, B., Guillerm, G., Benboubker, L., Monconduit, M., Thieblemont, C., Casassus, P., Caillot, D., Stoppa, A. M., Sotto, J. J., Wetterwald, M., Dumontet, C., Fuzibet, J. G., Azais, I., Dorvaux, V., Zandecki, M., Bataille, R., Minvielle, S., Harousseau, J. L., Facon, T. , Mathiot, C. 2007. Genetic abnormalities and survival in

multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*, 109, 3489-95.

Avet-Loiseau, H., Durie, B. G., Cavo, M., Attal, M., Gutierrez, N., Haessler, J., Goldschmidt, H., Hajek, R., Lee, J. H., Sezer, O., Barlogie, B., Crowley, J., Fonseca, R., Testoni, N., Ross, F., Rajkumar, S. V., Sonneveld, P., Lahuerta, J., Moreau, P., Morgan, G. , International Myeloma Working, Group. 2013. Combining fluorescent in situ hybridization data with ISS staging improves risk assessment in myeloma: an International Myeloma Working Group collaborative project. *Leukemia*, 27, 711-7.

Barwick, B. G., Neri, P., Bahlis, N. J., Nooka, A. K., Dhodapkar, M. V., Jaye, D. L., Hofmeister, C. C., Kaufman, J. L., Gupta, V. A., Auclair, D., Keats, J. J., Lonial, S., Vertino, P. M. , Boise, L. H. 2019. Multiple myeloma immunoglobulin lambda translocations portend poor prognosis. *Nat Commun*, 10, 1911.

Becker, N. 2011. Epidemiology of multiple myeloma. *Recent Results Cancer Res*, 183, 25-35.

Behrends, J., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C. , Wischmeyer, E. 2010. *Duale Reihe Physiologie*, S.214-19, Thieme Verlag, Stuttgart.

Bergsagel, P. L. , Kuehl, W. M. 2001. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*, 20, 5611-22.

Bergsagel, P. L. , Kuehl, W. M. 2005. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 23, 6333-8.

Binder, M., Rajkumar, S. V., Ketterling, R. P., Greipp, P. T., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Gertz, M. A., Buadi, F. K., Hayman, S. R., Hwa, Y. L., Zeldenrust, S. R., Lust, J. A., Russell, S. J., Leung, N., Kapoor, P., Go, R. S., Gonsalves, W. I., Kyle, R. A. , Kumar, S. K. 2017. Prognostic implications of abnormalities of chromosome 13 and the presence of multiple cytogenetic high-risk abnormalities in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Cancer J*, 7, e600.

Boveri, T. 1914. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren, Verlag von Gustav Fischer, Jena.

Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H. , Jaffe, E. S. 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117, 5019-32.

Cavo, M., Tacchetti, P., Patriarca, F., Petrucci, M. T., Pantani, L., Galli, M., Di Raimondo, F., Crippa, C., Zamagni, E., Palumbo, A., Offidani, M., Corradini, P., Narni, F., Spadano, A., Pescosta, N., Deliliers, G. L., Ledda, A., Cellini, C., Caravita, T., Tosi, P., Baccarani, M. , Network, G. I. M. 2010. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet*, 376, 2075-85.

- Chang, H., Qi, C., Yi, Q. L., Reece, D. , Stewart, A. K. 2005. 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*, 105, 358-60.
- Chng, W. J., Santana-Davila, R., Van Wier, S. A., Ahmann, G. J., Jalal, S. M., Bergsagel, P. L., Chesi, M., Trendle, M. C., Jacobus, S., Blood, E., Oken, M. M., Henderson, K., Kyle, R. A., Gertz, M. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Greipp, P. R. , Fonseca, R. 2006. Prognostic factors for hyperdiploid-myeloma: effects of chromosome 13 deletions and IgH translocations. *Leukemia*, 20, 807-13.
- Chng, W. J., Price-Troska, T., Gonzalez-Paz, N., Van Wier, S., Jacobus, S., Blood, E., Henderson, K., Oken, M., Van Ness, B., Greipp, P., Rajkumar, S. V. , Fonseca, R. 2007. Clinical significance of TP53 mutation in myeloma. *Leukemia*, 21, 582-4.
- Chng, W. J., Dispenzieri, A., Chim, C. S., Fonseca, R., Goldschmidt, H., Lentzsch, S., Munshi, N., Palumbo, A., Miguel, J. S., Sonneveld, P., Cavo, M., Usmani, S., Durie, B. G., Avet-Loiseau, H. , International Myeloma Working Group. 2014. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia*, 28, 269-77.
- Chretien, M. L., Corre, J., Lauwers-Cances, V., Magrangeas, F., Cleynen, A., Yon, E., Hulin, C., Leleu, X., Orsini-Piocelle, F., Blade, J. S., Sohn, C., Karlin, L., Delbrel, X., Hebraud, B., Roussel, M., Marit, G., Garderet, L., Mohty, M., Rodon, P., Voillat, L., Royer, B., Jaccard, A., Belhadj, K., Fontan, J., Caillot, D., Stoppa, A. M., Attal, M., Facon, T., Moreau, P., Minvielle, S. , Avet-Loiseau, H. 2015. Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood*, 126, 2713-9.
- Croce, C. M. 2008. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*, 358, 502-11.
- Darwin, C. 1859. On the Origin of Species, Appleton and Company, New York.
- Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. 2018. *Onkopedia Leitlinie Multiples Myelom ICD10: C90.0 Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen* [Online]. Available: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@guideline/html/index.html> [Accessed 01.05.2021].
- Dimopoulos, M. A., Moulopoulos, A., Delasalle, K. , Alexanian, R. 1992. Solitary plasmacytoma of bone and asymptomatic multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 6, 359-69.
- Dimopoulos, M. A., Kastritis, E., Rosinol, L., Blade, J. , Ludwig, H. 2008. Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia*, 22, 1485-93.
- Dimopoulos, M. A., Terpos, E., Comenzo, R. L., Tosi, P., Beksac, M., Sezer, O., Siegel, D., Lokhorst, H., Kumar, S., Rajkumar, S. V., Niesvizky, R., Moulopoulos, L. A., Durie, B. G. , Imwg 2009. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma. *Leukemia*, 23, 1545-56.

- Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Corradini, P., Cavo, M., Delforge, M., Di Raimondo, F., Weisel, K. C., Oriol, A., Hansson, M., Vacca, A., Blanchard, M. J., Goldschmidt, H., Doyen, C., Kaiser, M., Petrini, M., Anttila, P., Cafro, A. M., Raymakers, R., San-Miguel, J., De Arriba, F., Knop, S., Rollig, C., Ocio, E. M., Morgan, G., Miller, N., Simcock, M., Peluso, T., Herring, J., Sternas, L., Zaki, M. H. , Moreau, P. 2016. Safety and efficacy of pomalidomide plus low-dose dexamethasone in STRATUS (MM-010): a phase 3b study in refractory multiple myeloma. *Blood*, 128, 497-503.
- Dispenzieri, A., Kyle, R. A., Katzmann, J. A., Therneau, T. M., Larson, D., Benson, J., Clark, R. J., Melton, L. J., 3rd, Gertz, M. A., Kumar, S. K., Fonseca, R., Jelinek, D. F. , Rajkumar, S. V. 2008. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood*, 111, 785-9.
- Drach, J., Schuster, J., Nowotny, H., Angerler, J., Rosenthal, F., Fiegl, M., Rothermundt, C., Gsur, A., Jager, U., Heinz, R. , Et Al. 1995. Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res*, 55, 3854-9.
- Drach, J., Ackermann, J., Fritz, E., Kromer, E., Schuster, R., Gisslinger, H., Desantis, M., Zojer, N., Fiegl, M., Roka, S., Schuster, J., Heinz, R., Ludwig, H. , Huber, H. 1998. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood*, 92, 802-9.
- Durie, B. G. , Salmon, S. E. 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, 842-54.
- Durie, B. G. M., Hoering, A., Abidi, M. H., Rajkumar, S. V., Epstein, J., Kahanic, S. P., Thakuri, M., Reu, F., Reynolds, C. M., Sexton, R., Orlowski, R. Z., Barlogie, B. , Dispenzieri, A. 2017. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 389, 519-27.
- Eisele, L., Durig, J., Hutmänn, A., Duhrsen, U., Assert, R., Bokhof, B., Erbel, R., Mann, K., Jockel, K. H., Moebus, S. , Heinz Nixdorf Recall Study Investigative Group. 2012. Prevalence and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance and light-chain MGUS in Germany. *Ann Hematol*, 91, 243-8.
- Fearon, E. R. , Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-67.
- Fonseca, R., Oken, M. M., Harrington, D., Bailey, R. J., Van Wier, S. A., Henderson, K. J., Kay, N. E., Van Ness, B., Greipp, P. R. , Dewald, G. W. 2001. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia*, 15, 981-6.
- Fonseca, R., Blood, E. A., Oken, M. M., Kyle, R. A., Dewald, G. W., Bailey, R. J., Van Wier, S. A., Henderson, K. J., Hoyer, J. D., Harrington, D., Kay, N. E., Van Ness, B. , Greipp, P. R. 2002a. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood*, 99, 3735-41.

- Fonseca, R., Bailey, R. J., Ahmann, G. J., Rajkumar, S. V., Hoyer, J. D., Lust, J. A., Kyle, R. A., Gertz, M. A., Greipp, P. R., Dewald, G. W. 2002b. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 100, 1417-24.
- Fonseca, R., Blood, E. A., Rue, M., Harrington, D., Oken, M. M., Kyle, R. A., Dewald, G. W., Van Ness, B., Van Wier, S. A., Henderson, K. J., Bailey, R. J., Greipp, P. R. 2003a. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*, 101, 4569-75.
- Fonseca, R., Debes-Marun, C. S., Picken, E. B., Dewald, G. W., Bryant, S. C., Winkler, J. M., Blood, E., Oken, M. M., Santana-Davila, R., Gonzalez-Paz, N., Kyle, R. A., Gertz, M. A., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Greipp, P. R. 2003b. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood*, 102, 2562-7.
- Fonseca, R., Bergsagel, P. L., Drach, J., Shaughnessy, J., Gutierrez, N., Stewart, A. K., Morgan, G., Van Ness, B., Chesi, M., Minvielle, S., Neri, A., Barlogie, B., Kuehl, W. M., Liebisch, P., Davies, F., Chen-Kiang, S., Durie, B. G., Carrasco, R., Sezer, O., Reiman, T., Pilarski, L., Avet-Loiseau, H., International Myeloma Working, G. 2009. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*, 23, 2210-21.
- Furukawa, Y., Kikuchi, J. 2020. Molecular basis of clonal evolution in multiple myeloma. *Int J Hematol*, 111, 496-511.
- Gabrea, A., Martelli, M. L., Qi, Y., Roschke, A., Barlogie, B., Shaughnessy, J. D., Jr., Sawyer, J. R., Kuehl, W. M. 2008. Secondary genomic rearrangements involving immunoglobulin or MYC loci show similar prevalences in hyperdiploid and nonhyperdiploid myeloma tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 47, 573-90.
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., Schultz, N. 2013. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*, 6, pl1.
- Giralt, S., Stadtmauer, E. A., Harousseau, J. L., Palumbo, A., Bensinger, W., Comenzo, R. L., Kumar, S., Munshi, N. C., Dispenzieri, A., Kyle, R., Merlini, G., San Miguel, J., Ludwig, H., Hajek, R., Jagannath, S., Blade, J., Lonial, S., Dimopoulos, M. A., Einsele, H., Barlogie, B., Anderson, K. C., Gertz, M., Attal, M., Tosi, P., Sonneveld, P., Boccadoro, M., Morgan, G., Sezer, O., Mateos, M. V., Cavo, M., Joshua, D., Turesson, I., Chen, W., Shimizu, K., Powles, R., Richardson, P. G., Niesvizky, R., Rajkumar, S. V., Durie, B. G., Imwg 2009. International myeloma working group (IMWG) consensus statement and guidelines regarding the current status of stem cell collection and high-dose therapy for multiple myeloma and the role of plerixafor (AMD 3100). *Leukemia*, 23, 1904-12.
- Gonsalves, W. I., Rajkumar, S. V., Go, R. S., Dispenzieri, A., Gupta, V., Singh, P. P., Buadi, F. K., Lacy, M. Q., Kapoor, P., Dingli, D., Lust, J. A., Zeldenrust, S. R., Hayman, S. R., Kyle, R. A., Gertz, M. A., Kumar, S. K. 2014. Trends in survival of patients with primary plasma cell leukemia: a population-based analysis. *Blood*, 124, 907-12.
- Greaves, M., Maley, C. C. 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481, 306-13.

Greipp, P. R., San Miguel, J., Durie, B. G., Crowley, J. J., Barlogie, B., Blade, J., Boccadoro, M., Child, J. A., Avet-Loiseau, H., Kyle, R. A., Lahuerta, J. J., Ludwig, H., Morgan, G., Powles, R., Shimizu, K., Shustik, C., Sonneveld, P., Tosi, P., Turesson, I. , Westin, J. 2005. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 23, 3412-20.

Hanahan, D. , Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.

Hanahan, D. , Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.

Hanamura, I., Stewart, J. P., Huang, Y., Zhan, F., Santra, M., Sawyer, J. R., Hollmig, K., Zangarri, M., Pineda-Roman, M., Van Rhee, F., Cavallo, F., Burington, B., Crowley, J., Tricot, G., Barlogie, B. , Shaughnessy, J. D., Jr. 2006. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*, 108, 1724-32.

Harris, N. L., Jaffe, E. S., Stein, H., Banks, P. M., Chan, J. K., Cleary, M. L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K. C. , Et Al. 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84, 1361-92.

Heinrich, P. C., Müller, M., Graeve, L. 2007. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Aufl., S. 1120-4, Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

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, 749-57.

Jimenez, C., Jara-Acevedo, M., Corchete, L. A., Castillo, D., Ordonez, G. R., Sarasquete, M. E., Puig, N., Martinez-Lopez, J., Prieto-Conde, M. I., Garcia-Alvarez, M., Chillon, M. C., Balanzategui, A., Alcoceba, M., Oriol, A., Rosinol, L., Palomera, L., Teruel, A. I., Lahuerta, J. J., Blade, J., Mateos, M. V., Orfao, A., San Miguel, J. F., Gonzalez, M., Gutierrez, N. C. , Garcia-Sanz, R. 2017. A next-generation sequencing strategy for evaluating the most common genetic abnormalities in multiple myeloma. *J Mol Diagn*, 19, 99-106.

Kalff, A. , Spencer, A. 2012. The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies. *Blood Cancer J*, 2, e89.

Katalinic, A. , Pritzkuleit, R. 2013. Hochrechnung des Institut für Krebsepidemiologie e.V., Lübeck für ICD10: C90 auf Basis der Daten der Krebsregister BY, BR, HB, HH, MV, NI, NW (Reg.Bez. Münster) SL, SN, SH (2005-2009).

Kaufmann, H., Ackermann, J., Baldia, C., Nösslinger, T., Wieser, R., Seidl, S., Sagaster, V., Gisslinger, H., Jäger, U., Pfeilstöcker, M., Zielinski, C. , Drach, J. 2004. 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*, 18, 1879-82.

- Keats, J. J., Chesi, M., Egan, J. B., Garbitt, V. M., Palmer, S. E., Braggio, E., Van Wier, S., Blackburn, P. R., Baker, A. S., Dispenzieri, A., Kumar, S., Rajkumar, S. V., Carpten, J. D., Barrett, M., Fonseca, R., Stewart, A. K. , Bergsagel, P. L. 2012. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*, 120, 1067-76.
- Klein, B. , Bataille, R. 1992. Cytokine network in human multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 6, 273-84.
- Knudson, A. G., Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 820-3.
- Kraft, F. , Kurth, I. 2020. Long-read sequencing to understand genome biology and cell function. *Int J Biochem Cell Biol*, 126, 105799.
- Kuehl, W. M. , Bergsagel, P. L. 2002. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*, 2, 175-87.
- Kumar, S., Fonseca, R., Ketterling, R. P., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Gertz, M. A., Hayman, S. R., Buadi, F. K., Dingli, D., Knudson, R. A., Greenberg, A., Russell, S. J., Zeldenrust, S. R., Lust, J. A., Kyle, R. A., Bergsagel, L. , Rajkumar, S. V. 2012. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood*, 119, 2100-5.
- Kyle, R. A., Therneau, T. M., Rajkumar, S. V., Offord, J. R., Larson, D. R., Plevak, M. F. , Melton, L. J., 3rd 2002. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*, 346, 564-9.
- Kyle, R. A., Gertz, M. A., Witzig, T. E., Lust, J. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Rajkumar, S. V., Offord, J. R., Larson, D. R., Plevak, M. E., Therneau, T. M. , Greipp, P. R. 2003. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*, 78, 21-33.
- Kyle, R. A., Therneau, T. M., Rajkumar, S. V., Larson, D. R., Plevak, M. F., Offord, J. R., Dispenzieri, A., Katzmeh, J. A. , Melton, L. J., 3rd 2006. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*, 354, 1362-9.
- Kyle, R. A., Remstein, E. D., Therneau, T. M., Dispenzieri, A., Kurtin, P. J., Hodnefield, J. M., Larson, D. R., Plevak, M. F., Jelinek, D. F., Fonseca, R., Melton, L. J., 3rd , Rajkumar, S. V. 2007. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med*, 356, 2582-90.
- Kyle, R. A. , Rajkumar, S. V. 2009. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, 23, 3-9.
- Landgren, O., Linet, M. S., McMaster, M. L., Gridley, G., Hemminki, K. , Goldin, L. R. 2006. Familial characteristics of autoimmune and hematologic disorders in 8,406 multiple myeloma patients: a population-based case-control study. *Int J Cancer*, 118, 3095-8.
- Landgren, O., Thomas, A. , Mailankody, S. 2011. Myeloma and second primary cancers. *N Engl J Med*, 365, 2241-2.

Landgren, O., Zeig-Owens, R., Giricz, O., Goldfarb, D., Murata, K., Thoren, K., Ramanathan, L., Hultcrantz, M., Dogan, A., Nwankwo, G. 2018. Multiple myeloma and its precursor disease among firefighters exposed to the World Trade Center disaster. *JAMA oncology*, 4, 821-27.

Laubach, J., Garderet, L., Mahindra, A., Gahrton, G., Caers, J., Sezer, O., Voorhees, P., Leleu, X., Johnsen, H. E., Streetly, M., Jurczyszyn, A., Ludwig, H., Mellqvist, U. H., Chng, W. J., Pilarski, L., Einsele, H., Hou, J., Turesson, I., Zamagni, E., Chim, C. S., Mazumder, A., Westin, J., Lu, J., Reiman, T., Kristinsson, S., Joshua, D., Roussel, M., O'gorman, P., Terpos, E., McCarthy, P., Dimopoulos, M., Moreau, P., Orlowski, R. Z., Miguel, J. S., Anderson, K. C., Palumbo, A., Kumar, S., Rajkumar, V., Durie, B., Richardson, P. G. 2016. Management of relapsed multiple myeloma: recommendations of the International Myeloma Working Group. *Leukemia*, 30, 1005-17.

Liebisch, P., Wendl, C., Wellmann, A., Krober, A., Schilling, G., Goldschmidt, H., Einsele, H., Straka, C., Bentz, M., Stilgenbauer, S., Dohner, H. 2003. High incidence of trisomies 1q, 9q, and 11q in multiple myeloma: results from a comprehensive molecular cytogenetic analysis. *Leukemia*, 17, 2535-7.

Lopez-Corral, L., Gutierrez, N. C., Vidriales, M. B., Mateos, M. V., Rasillo, A., Garcia-Sanz, R., Paiva, B., San Miguel, J. F. 2011. The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells. *Clin Cancer Res*, 17, 1692-700.

Mateos, M. V., Dimopoulos, M. A., Cavo, M., Suzuki, K., Jakubowiak, A., Knop, S., Doyen, C., Lucio, P., Nagy, Z., Kaplan, P., Pour, L., Cook, M., Grosicki, S., Crepaldi, A., Liberati, A. M., Campbell, P., Shelekhova, T., Yoon, S. S., Iosava, G., Fujisaki, T., Garg, M., Chiu, C., Wang, J., Carson, R., Crist, W., Deraedt, W., Nguyen, H., Qi, M., San-Miguel, J., Investigators, A. T. 2018. Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med*, 378, 518-28.

Merz, M., Jauch, A., Hielscher, T., Mai, E. K., Seckinger, A., Hose, D., Bertsch, U., Neben, K., Raab, M. S., Salwender, H., Blau, I. W., Lindemann, H. W., Schmidt-Wolf, I., Scheid, C., Haenel, M., Weisel, K., Goldschmidt, H., Hillengass, J. 2017. Longitudinal fluorescence in situ hybridization reveals cytogenetic evolution in myeloma relapsing after autologous transplantation. *Haematologica*, 102, 1432-38.

Merz, M., Jauch, A., Hielscher, T., Bochtler, T., Schonland, S. O., Seckinger, A., Hose, D., Bertsch, U., Neben, K., Raab, M. S., Hillengass, J., Salwender, H., Blau, I. W., Lindemann, H. W., Schmidt-Wolf, I. G. H., Scheid, C., Haenel, M., Weisel, K. C., Goldschmidt, H. 2018. Prognostic significance of cytogenetic heterogeneity in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Adv*, 2, 1-9.

Morgan, G. J., Walker, B. A., Davies, F. E. 2012. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*, 12, 335-48.

Murga Penas, E. M., Pomplun, C., Paul, U., Nagel, I., Becher, C., Gramatzki, M., Günther, A., Siebert, R. 2015. Identification of somatic mutations by next-generation sequencing in secondary myelodysplastic syndromes of multiple myeloma patients. *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinischen Onkologie*, Oncol Res Treat 38, Suppl. 5:70, 236.

Nowell, P. C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194, 23-8.

Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., Lokhorst, H. M., Goldschmidt, H., Rosinol, L., Richardson, P., Caltagirone, S., Lahuerta, J. J., Facon, T., Bringhen, S., Gay, F., Attal, M., Passera, R., Spencer, A., Offidani, M., Kumar, S., Musto, P., Lonial, S., Petrucci, M. T., Orlowski, R. Z., Zamagni, E., Morgan, G., Dimopoulos, M. A., Durie, B. G., Anderson, K. C., Sonneveld, P., San Miguel, J., Cavo, M., Rajkumar, S. V. , Moreau, P. 2015. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A report from International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*, 33, 2863-9.

Paul, U., Pomplun, C., Nagel, I., Becher, C., Gramatzki, M., Siebert, R., Günther, A. , Murga Penas, E. M. 2015. Molecular genetic and cytogenetic characteristics of secondary myelodysplastic syndromes in refractory multiple myeloma patients. *Tumorgenetische Arbeitstagung Göttingen*.

Payne, S. R. , Kemp, C. J. 2005. Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis*, 26, 2031-45.

Perez-Persona, E., Vidriales, M. B., Mateo, G., Garcia-Sanz, R., Mateos, M. V., De Coca, A. G., Galende, J., Martin-Nunez, G., Alonso, J. M., De Las Heras, N., Hernandez, J. M., Martin, A., Lopez-Berges, C., Orfao, A. , San Miguel, J. F. 2007. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*, 110, 2586-92.

Perez-Simon, J. A., Garcia-Sanz, R., Tabernero, M. D., Almeida, J., Gonzalez, M., Fernandez-Calvo, J., Moro, M. J., Hernandez, J. M., San Miguel, J. F. , Orfao, A. 1998. Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood*, 91, 3366-71.

Pomplun, C., Bergmann, A. K., Becher C, Gramatzki, M., Günther A , Murga Penas, E. M. 2017. In Multiple Myeloma trisomy 11 reveals an unstable pattern of clonal evolution: Implications for prognosis. *Annual Meeting of the German, Switzerland and Austrian Society for Hematology and Oncology, Stuttgart, September 2017. Oncol Res Treat 40, Suppl. 3:40*, 301.

Rajkumar, S., Fonseca, R., Lacy, M., Witzig, T., Lust, J., Greipp, P., Therneau, T., Kyle, R., Litzow, M. , Gertz, M. 1999a. Abnormal cytogenetics predict poor survival after high-dose therapy and autologous blood cell transplantation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*, 24, 497-503.

Rajkumar, S. V., Fonseca, R., Dewald, G. W., Therneau, T. M., Lacy, M. Q., Kyle, R. A., Greipp, P. R. , Gertz, M. A. 1999b. Cytogenetic abnormalities correlate with the plasma cell labeling index and extent of bone marrow involvement in myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*, 113, 73-7.

Rajkumar, S. V., Kyle, R. A., Therneau, T. M., Melton, L. J., 3rd, Bradwell, A. R., Clark, R. J., Larson, D. R., Plevak, M. F., Dispenzieri, A. , Katzmann, J. A. 2005. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 106, 812-7.

Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M. V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastritis, E., Richardson, P., Landgren, O., Paiva, B., Dispenzieri, A.,

- Weiss, B., Leleu, X., Zweegman, S., Lonial, S., Rosinol, L., Zamagni, E., Jagannath, S., Sezer, O., Kristinsson, S. Y., Caers, J., Usmani, S. Z., Lahuerta, J. J., Johnsen, H. E., Beksac, M., Cavo, M., Goldschmidt, H., Terpos, E., Kyle, R. A., Anderson, K. C., Durie, B. G. , Miguel, J. F. 2014. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 15, e538-48.
- Richardson, P. G., Weller, E., Lonial, S., Jakubowiak, A. J., Jagannath, S., Raje, N. S., Avigan, D. E., Xie, W., Ghobrial, I. M., Schlossman, R. L., Mazumder, A., Munshi, N. C., Vesole, D. H., Joyce, R., Kaufman, J. L., Doss, D., Warren, D. L., Lunde, L. E., Kaster, S., Delaney, C., Hideshima, T., Mitsiades, C. S., Knight, R., Esseltine, D. L. , Anderson, K. C. 2010. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, 116, 679-86.
- Rink, L., Kruse, A., Haase, H. , Lay, M. 2015. Immunologie für Einsteiger, 2. Aufl., S.86-8 Springer Spektrum, Heidelberg.
- San Miguel, J. F., Schlag, R., Khuageva, N. K., Dimopoulos, M. A., Shpilberg, O., Kropff, M., Spicka, I., Petrucci, M. T., Palumbo, A., Samoilova, O. S., Dmoszynska, A., Abdulkadyrov, K. M., Schots, R., Jiang, B., Mateos, M. V., Anderson, K. C., Esseltine, D. L., Liu, K., Cakana, A., Van De Velde, H., Richardson, P. G. , Investigators, V. T. 2008. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*, 359, 906-17.
- Sawyer, J. R., Waldron, J. A., Jagannath, S. , Barlogie, B. 1995. Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*, 82, 41-9.
- Sawyer, J. R. 2011. The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genet*, 204, 3-12.
- Sawyer, J. R., Tian, E., Heuck, C. J., Epstein, J., Johann, D. J., Swanson, C. M., Lukacs, J. L., Johnson, M., Binz, R., Boast, A., Sammartino, G., Usmani, S., Zangari, M., Waheed, S., Van Rhee, F. , Barlogie, B. 2014. Jumping translocations of 1q12 in multiple myeloma: a novel mechanism for deletion of 17p in cytogenetically defined high-risk disease. *Blood*, 123, 2504-12.
- Saxe, D., Seo, E. J., Bergeron, M. B. , Han, J. Y. 2019. Recent advances in cytogenetic characterization of multiple myeloma. *Int J Lab Hematol*, 41, 5-14.
- Schultheis, B., Kramer, A., Willer, A., Hegenbart, U., Goldschmidt, H. , Hehlmann, R. 1999. Analysis of p73 and p53 gene deletions in multiple myeloma. *Leukemia*, 13, 2099-103.
- Smadja, N. V., Bastard, C., Brigaudeau, C., Leroux, D., Fruchart, C. , Groupe Francais De Cytogenetique, H. 2001. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*, 98, 2229-38.
- Sonneveld, P., Avet-Loiseau, H., Lonial, S., Usmani, S., Siegel, D., Anderson, K. C., Chng, W. J., Moreau, P., Attal, M., Kyle, R. A., Caers, J., Hillengass, J., San Miguel, J., Van De Donk, N. W., Einsele, H., Blade, J., Durie, B. G., Goldschmidt, H., Mateos, M. V., Palumbo, A. , Orlowski, R. 2016. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*, 127, 2955-62.

- Testoni, N., Marzocchi, G., Pantani, L., Ameli, G., Dozza, L., Gay, F., Petrucci, M. T., Di Raimondo, F., Patriarca, F., Galli, M., Montefusco, V., Gamberi, B., Crippa, C., Vincelli, D. I., Offidani, M., Terragna, C., Mancuso, K., Rocchi, S., Sonneveld, P., Boccadoro, M. , Cavo, M. 2017. High-risk cytogenetics in newly diagnosed multiple myeloma: prognostic relevance of co-segregations and analysis of the role of double versus single autotransplantation. *Blood*, 130, 394.
- Thomas, R. K. , Diehl, V. 2003. Unhappy neighbourhood: spatial genome organisation and lymphomagenesis in B cells. *Lancet*, 362, 1868-70.
- Tricot, G., Barlogie, B., Jagannath, S., Bracy, D., Mattox, S., Vesole, D. H., Naucke, S. , Sawyer, J. R. 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*, 86, 4250-6.
- Vu, T., Gonsalves, W., Kumar, S., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Buadi, F., Gertz, M. A. , Rajkumar, S. V. 2015. Characteristics of exceptional responders to lenalidomide-based therapy in multiple myeloma. *Blood Cancer J*, 5, e363.
- Walker, B. A., Leone, P. E., Chiechio, L., Dickens, N. J., Jenner, M. W., Boyd, K. D., Johnson, D. C., Gonzalez, D., Dagrada, G. P., Protheroe, R. K., Konn, Z. J., Stockley, D. M., Gregory, W. M., Davies, F. E., Ross, F. M. , Morgan, G. J. 2010. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*, 116, e56-65.
- Walker, B. A., Wardell, C. P., Melchor, L., Hulkki, S., Potter, N. E., Johnson, D. C., Fenwick, K., Kozarewa, I., Gonzalez, D., Lord, C. J., Ashworth, A., Davies, F. E. , Morgan, G. J. 2012. Intraclonal heterogeneity and distinct molecular mechanisms characterize the development of t(4;14) and t(11;14) myeloma. *Blood*, 120, 1077-86.
- Walker, B. A., Wardell, C. P., Johnson, D. C., Kaiser, M. F., Begum, D. B., Dahir, N. B., Ross, F. M., Davies, F. E., Gonzalez, D. , Morgan, G. J. 2013. Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. *Blood*, 121, 3413-9.
- Walker, B. A., Wardell, C. P., Brioli, A., Boyle, E., Kaiser, M. F., Begum, D. B., Dahir, N. B., Johnson, D. C., Ross, F. M., Davies, F. E. , Morgan, G. J. 2014. Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. *Blood Cancer J*, 4, e191.
- Walker, B. A., Mavrommatis, K., Wardell, C. P., Ashby, T. C., Bauer, M., Davies, F. E., Rosenthal, A., Wang, H., Qu, P., Hoering, A., Samur, M., Towfic, F., Ortiz, M., Flynt, E., Yu, Z., Yang, Z., Rozelle, D., Obenauer, J., Trotter, M., Auclair, D., Keats, J., Bolli, N., Fulciniti, M., Szalat, R., Moreau, P., Durie, B., Stewart, A. K., Goldschmidt, H., Raab, M. S., Einsele, H., Sonneveld, P., San Miguel, J., Lonial, S., Jackson, G. H., Anderson, K. C., Avet-Loiseau, H., Munshi, N., Thakurta, A. , Morgan, G. J. 2018. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood*, 132, 587-97.
- Walker, B. A., Mavrommatis, K., Wardell, C. P., Ashby, T. C., Bauer, M., Davies, F., Rosenthal, A., Wang, H., Qu, P., Hoering, A., Samur, M., Towfic, F., Ortiz, M., Flynt, E., Yu, Z., Yang, Z., Rozelle, D., Obenauer, J., Trotter, M., Auclair, D., Keats, J., Bolli, N., Fulciniti,

- M., Szalat, R., Moreau, P., Durie, B., Stewart, A. K., Goldschmidt, H., Raab, M. S., Einsele, H., Sonneveld, P., San Miguel, J., Lonial, S., Jackson, G. H., Anderson, K. C., Avet-Loiseau, H., Munshi, N., Thakurta, A. , Morgan, G. 2019. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia*, 33, 159-70.
- Wallin, A. , Larsson, S. C. 2011. Body mass index and risk of multiple myeloma: a meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer*, 47, 1606-15.
- Watson, C. T. , Breden, F. 2012. The immunoglobulin heavy chain locus: genetic variation, missing data, and implications for human disease. *Genes Immun*, 13, 363-73.
- Weh, H. J., Guttensohn, K., Selbach, J., Kruse, R., Wacker-Backhaus, G., Seeger, D., Fiedler, W., Fett, W. , Hossfeld, D. K. 1993. Karyotype in multiple myeloma and plasma cell leukaemia. *Eur J Cancer*, 29A, 1269-73.
- Weiss, B. M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R. S. , Kuehl, W. M. 2009. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*, 113, 5418-22.
- Zentrum Für Krebsregisterdaten, R. K. I. 2019. *Multiples Myelom ICD-10 C90* [Online]. Available:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Multiples%20Myelom/multiples_myelom_node.html [Accessed 10.10.2020].

8 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Eva Maria Murga Penas für die tatkräftige Unterstützung während des gesamten Zeitraumes, welchen diese Arbeit umfasste. Sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch bei der Auswertung der Daten und schließlich Verfassung der Dissertationsschrift stand sie mir mit wissenschaftlicher Kompetenz und Geduld jederzeit bei Fragen zur Seite.

Mein Dank gilt dem ehemaligen Leiter des Institutes für Humangenetik, des UKSH, Campus Kiel, Herrn Prof. Siebert für die Auswahl des interessanten Dissertationsthemas. Ebenfalls bedanke ich mich bei der aktuellen und ehemaligen kommissarischen Leitung des humangenetischen Institutes des UKSH, Campus Kiel, Herrn Prof. Spielmann und Frau PD Dr. Caliebe.

Außerdem möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel, für die Unterstützung während der Durchführung der Experimente und Auswertung der Proben bedanken.

Ich möchte mich zudem bei meinen Eltern für die stetige Motivation und Unterstützung während des Studiums sowie in allen Phasen der Doktorarbeit bedanken. Ihre lieben, aufbauenden Worte haben wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Ein großes Dankeschön gilt meinem Freund Markus, für die Anteilnahme an dieser Dissertation und Unterstützung in schwierigen Zeiten in Form von Trost und Motivation, vor allem in der Schlussphase. Außerdem bedanke ich mich bei meiner besten Freundin Claudia für die finale Durchsicht und Korrektur.

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst, andere als die in ihr angegebene Literatur nicht benutzt und dass ich alle ganz oder annähernd übernommenen Textstellen sowie verwendete Grafiken, Tabellen und Auswertungsprogramme kenntlich gemacht habe. Außerdem versichere ich, dass die vorgelegte elektronische mit der schriftlichen Version der Dissertation übereinstimmt und die Abhandlung in dieser oder ähnlicher Form noch nicht anderweitig als Promotionsleistung vorgelegt und bewertet wurde.

Köln, den

.....
Christiane Viktoria Pomplun

10 Publikationen

Pomplun, C., Bergmann, A. K., Becher, C., Gramatzki, M., Günther, A., Murga Penas, E.M. In multiple myeloma trisomy 11 reveals an unstable pattern of clonal evolution: implications for prognosis. Annual Meeting of the German, Switzerland & Austrian Society for Hematology & Oncology, Stuttgart, September 2017. *Oncol Res Treat* 40, Suppl. 3:40, P301, 2017.

Murga Penas, E. M., Pomplun, C., Paul, U., Nagel, I., Becher, C., Gramatzki, M., Günther, A., Siebert, R. Identification of somatic mutations by next-generation sequencing in secondary myelodysplastic syndromes of multiple myeloma patients. Annual Meeting of the German, Switzerland & Austrian Society for Hematology & Oncology, Basel, October 2015. *Oncol Res Treat* 38, Suppl. 5:70, P236, 2015.

Guenther, A., Murga Penas, E. M., Pomplun, C., Thieme, F., Bulduk, M., Oschlies, I., Klapper, W., Gramatzki, M. Clonal tides of multiple myeloma: Report of an informative case. 7th International Symposium on clinical applications of free light chain & heavy/light chain analysis, Edinburgh, April 2015. *Hematology Reports*. 7, Suppl. 1:D76, 2015.

Murga Penas, E. M., Pomplun, C., Paul, U., Nagel, I., Becher, C., Gramatzki, M., Günther, A., Siebert, R. Mutations in the TP53 gene are recurrent in secondary myelodysplastic syndromes in patients with refractory multiple myeloma. Annual Conference of the German Genetics Society, Kiel, September 2015. *Genetics 2015: Abstract Supplement P38*, 2015.

Paul, U., Pomplun, C., Nagel, I., Becher, C., Gramatzki, M., Siebert, R., Günther, A., Murga Penas, E. M. Molecular genetic & cytogenetic characteristics of secondary myelodysplastic syndromes in refractory multiple myeloma patients. Tumorgenetische Arbeitstagung Göttingen, 2015.

Oralpräsentation bei Kongress (Herbsttreffen der Norddeutschen Humangenetiker, Lübeck, 2016):

Pomplun, C., Paul, U., Becher, C., Gramatzki, M., Günther, A., Murga Penas, E. M. Landscape of somatic mutations & cytogenetic characteristics in secondary myelodysplastic syndromes of multiple myeloma patients. Herbsttreffen der Norddeutschen Humangenetiker, Lübeck, Oktober 2016.