

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

Einfluss des Polymorphismus G870A von *CCND1* (Cyclin D1) auf  
den Verlauf bei Patienten mit Multiplem Myelom und allogener  
Stammzelltransplantation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Fiona Maria Puckert

aus Nordhorn

Datum der Promotion:

17.09.2021

## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden im Jahr 2016 auf der Jahrestagung der DGHO (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie) veröffentlicht:

- Cyclin D1 C.870G>A polymorphism in patients with multiple myeloma, impact of donor Cyclin D1 C.870G>A polymorphism on the outcome after transplantation

*Puckert F.M., Blau I.W., Kühnel A., Nogai A., Rieger K., Kunitz A., Hemmati P., Arnold R., Pezzutto A., Dörken B., Blau O. (Abstract DGHO 2016)*

Es wird auf die ausführliche Anteilserklärung (Seite XVIII) verwiesen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Kurzzusammenfassung</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Multiples Myelom .....	1
1.1.1 Epidemiologie und Pathophysiologie.....	1
1.1.2 Genetische Grundlagen .....	3
1.2 Allogene Stammzelltransplantation .....	5
1.3 Cyclin D1 .....	6
1.3.1 Rolle im Zellzyklus und Bedeutung für die Tumorgenese.....	6
1.3.2 <i>CCND1</i> Polymorphismus G870A .....	11
<b>2 Materialien und Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.1 Materialien.....	16
2.2 Methoden .....	18
2.2.1 DNA-Isolation .....	18
2.2.2 Quantitative Nukleinsäureanalyse (DNA-Konzentrationsmessung) .....	19
2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	19
2.2.4 Agarosegelelektrophorese .....	20
2.3 Erfassung der Patientendaten.....	21
2.4 Statistik.....	21
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
3.1 Gesamtes Patientenkollektiv.....	23
3.1.1 Patientencharakteristika .....	23
3.1.1.1 Geschlecht.....	23
3.1.1.2 Alter bei Erstdiagnose .....	23
3.1.1.3 Risikostratifizierung nach Genetik .....	24
3.1.1.4 Translokation t(11;14)(q13;32) .....	25
3.1.2 Klinischer Verlauf .....	26
3.1.2.1 Therapieansprechen .....	26
3.1.2.2 Erreichen einer klinischen Remission.....	27

3.1.2.3	Zeit bis zum 1. Rezidiv .....	28
3.1.2.4	Progressionsfreies Überleben .....	29
3.1.2.5	Gesamtüberleben .....	30
3.2	Patienten mit allogener Stammzelltransplantation .....	32
3.2.1	Patientencharakteristika .....	32
3.2.1.1	Geschlecht.....	32
3.2.1.2	Alter bei Erstdiagnose .....	32
3.2.1.3	Risikostratifizierung nach Genetik .....	33
3.2.1.4	Translokation t(11;14)(q13;32) .....	34
3.2.2	Klinischer Verlauf .....	34
3.2.2.1	Therapieansprechen .....	34
3.2.2.2	Erreichen einer klinischen Remission.....	35
3.2.2.3	Zeit bis zum 1. Rezidiv .....	35
3.2.2.4	CCND1 Polymorphismus G870A nach alloSZT .....	37
3.2.2.5	Rezidiv nach alloSZT .....	37
3.2.3	Progressionsfreies Überleben nach alloSZT .....	38
3.2.4	Überleben nach alloSZT .....	39
3.2.4.1	Spender-Polymorphismus .....	39
3.2.4.2	Polymorphismus-Veränderung durch alloSZT .....	40
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>43</b>
4.1	Diskussion der Ergebnisse .....	43
4.2	Limitationen .....	47
4.3	Ausblick .....	48
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>6</b>	<b>Erklärung an Eides Statt .....</b>	<b>XVII</b>
<b>7</b>	<b>Ausführliche Anteilserklärung.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>XIX</b>
<b>9</b>	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>XXI</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>XXII</b>

*Anmerkung:*

Aus Gründen der Lesbarkeit ist wurde im Text die männliche Form gewählt, die Angaben beziehen sich aber auf Angehörige aller Geschlechter

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
alloSZT	allogene Stammzelltransplantation
AR	Androgenrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
autoSZT	autologe Stammzelltransplantation
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CAK	CDK Activating Kinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCND1	Cyclin D1
CCND3	Cyclin D3
CDK2	Cyclin-Dependent Kinase 2
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase 4
CDK6	Cyclin-Dependent Kinase 6
CDK7	Cyclin-Dependent Kinase 7
Cip 1	CDK-inhibitor protein 1
CKI	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
CSR	Class Switch Recombination
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
ER	Estrogenrezeptor
E2F	E2F Transkriptionsfaktor
FAM46C	Family With Sequence Similarity 46 Member C
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
g	Gramm
G	Guanin
GSK3-β	Glycogen Synthase Kinase 3 <i>beta</i>
HAT	Histonacetyltransferasen

HDAC	Histondeacetylase
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IGH	Immunoglobulin Heavy Locus
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
IMWG	International Myeloma Working Group
INK4	Inhibitors of CDK4
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
ISS	International Staging System
Kip 1	CDK-inhibitor 1B
Ki-67	Ki-67 Proliferationsmarker
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LDH	Laktatdehydrogenase
MAF	Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Protooncogene
MAFB	V-Maf Musculoaponeurotic Fibrosarcome Oncogene Homolog B
MAT1	Menage A Trois 1
MDR1	Multi-Drug-Resistance-Gene 1
MGUS	Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance
mind.	mindestens
ml	Milliliter
MMSET	Multiple Myeloma SET domain
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
MYC	MYC Proto-Oncogene
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEST	peptide sequence rich in Prolin (P), Glutamic Acid (E), Serine (S), Threonine (T)
PPAR $\gamma$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma

RAD51	RAD51 Recombinase
Ras	Rat Sarcoma
Rb	Retinoblastomprotein
R-ISS	Revised International Staging System
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TP53	Tumor Protein P53
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
WHSC1	Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1
$\mu$ l	Mikroliter

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Genetische Risikostratifizierung	5
<b>Tabelle 2:</b> Chemikalien	16
<b>Tabelle 3:</b> Medien, Lösungen und Puffer	16
<b>Tabelle 4:</b> Enzyme	17
<b>Tabelle 5:</b> Oligonukleotide	17
<b>Tabelle 6:</b> Geräte	17
<b>Tabelle 7:</b> Hilfs- und Verbrauchsmaterialien	18
<b>Tabelle 8:</b> Software	18
<b>Tabelle 9:</b> Literaturverwaltung und Datenbanken	18
<b>Tabelle 10:</b> Geschlecht	23
<b>Tabelle 11:</b> Risikostratifizierung nach Genetik	25
<b>Tabelle 12:</b> Translokation t(11;14)(q13;q32)	25
<b>Tabelle 13:</b> Therapieansprechen im Beobachtungszeitraum	27
<b>Tabelle 14:</b> Zeit bis zum 1. Rezidiv	28
<b>Tabelle 15:</b> Progressionsfreies Überleben - paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen	30
<b>Tabelle 16:</b> Gesamtüberleben – paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen	31
<b>Tabelle 17:</b> Geschlecht (alloSZT)	32
<b>Tabelle 18:</b> Risikostratifizierung nach Genetik (alloSZT)	34
<b>Tabelle 19:</b> Translokation t(11;14)(q13;q32) (alloSZT)	34
<b>Tabelle 20:</b> Therapieansprechen im Beobachtungszeitraum (alloSZT)	35
<b>Tabelle 21:</b> Zeit bis zum 1. Rezidiv (alloSZT)	36
<b>Tabelle 22:</b> Rezidiv nach alloSZT	38
<b>Tabelle 23:</b> Progressionsfreies Überleben nach alloSZT – paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen	39
<b>Tabelle 24:</b> Überleben nach alloSZT, Spender-Polymorphismus – paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen	40
<b>Tabelle 25:</b> Polymorphismus-Veränderung Allelvariante A	41
<b>Tabelle 26:</b> Polymorphismus-Veränderung Allelvariante G	41
<b>Tabelle 27:</b> Überleben nach alloSZT, Polymorphismus-Veränderung A – paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen	42

**Tabelle 28:** Überleben nach alloSZT, Polymorphismus-Veränderung G – paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen

42

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Cytline und Cyclin-abhängige Kinasen im Zellzyklus	7
<b>Abbildung 2:</b> Abläufe am G1/S-Übergang des Zellzyklus	8
<b>Abbildung 3:</b> schematische Darstellung <i>CCND1</i> -Gen	12
<b>Abbildung 4:</b> Beispielbild einer Gelelektrophorese nach Auftrennung der Allele A und G im <i>CCND1</i> -Gen an Position 870	21
<b>Abbildung 5:</b> Alter bei Erstdiagnose	24
<b>Abbildung 6:</b> Translokation t(11;14)(q13;q32) – Vergleich Gruppe GG mit gesamtem Patientenkollektiv	26
<b>Abbildung 7:</b> Therapieansprechen im Beobachtungszeitraum	27
<b>Abbildung 8:</b> Zeit bis zum 1. Rezidiv	29
<b>Abbildung 9:</b> Progressionsfreies Überleben	30
<b>Abbildung 10:</b> Gesamtüberleben	31
<b>Abbildung 11:</b> Alter bei Erstdiagnose (alloSZT)	33
<b>Abbildung 12:</b> Zeit bis zum 1. Rezidiv (alloSZT)	36
<b>Abbildung 13:</b> Veränderung im <i>CCND1</i> Polymorphismus G870A durch alloSZT	37
<b>Abbildung 14:</b> Progressionsfreies Überleben nach alloSZT	38
<b>Abbildung 15:</b> Überleben nach alloSZT, Einflussgröße Spender-Polymorphismus	40
<b>Abbildung 16:</b> Überleben nach alloSZT, Polymorphismus-Veränderung Allelvariante A	41
<b>Abbildung 17:</b> Überleben nach alloSZT, Polymorphismus-Veränderung Allelvariante G	42

# Kurzzusammenfassung

## Einleitung:

Pathophysiologische Grundlage des Multiplen Myeloms ist die Proliferation klonaler Plasmazellen, welche ein monoklonales, zumeist funktionsloses Immunglobulin produzieren. Neben hyperdiploiden Veränderungen spielen sogenannte *IGH*-Translokationen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese. Im Fall der Translokation  $t(11;14)$  kommt es hierdurch zu einer erhöhten Expression des Proteins Cyclin D1, eine Veränderung die auch eine Vielzahl anderer maligner Tumore betrifft. Das menschliche *CCND1*-Gen, welches für Cyclin D1 kodiert, weist mehrere Polymorphismen auf, deren Bedeutung für die Tumorgenese noch weitgehend unverstanden sind. Aufgrund von beschriebenen Assoziationen mit verschiedenen Tumorentitäten hat der Polymorphismus G870A besondere Aufmerksamkeit erhalten. Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Polymorphismus G870A in Myelompatienten vor dem Hintergrund klinischer und prognostischer Merkmale. Zudem wurde ein möglicher Einfluss durch Veränderung des Polymorphismus nach allogener Stammzelltransplantation untersucht.

## Methodik:

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Daten von 200 Myelompatienten ausgewertet, welche im Zeitraum zwischen 1992 und 2017 an der Charité behandelt wurden. Aus Knochenmark- und peripheren Blutproben der Patienten sowie gesunder Stammzellspender wurde mittels PCR und Elektrophorese der Polymorphismus G870A bestimmt und die Patienten daraufhin in Gruppen entsprechend des Genotyps (GG, AA, AG) eingeteilt. Die statistischen Methoden wurden entsprechend Stichprobenverteilung ausgewählt und mit SPSS ausgewertet (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ).

## Ergebnisse:

Die Verteilung der Genotypen im untersuchten Patientenkollektiv betrug 30,5 % für GG, 10,5 % für AA und 59,5 % für AG. Für Gruppe GG ergab sich mit 29,2 % ein häufigeres Vorhandensein von  $t(11;14)$  im Vergleich zur Gesamtheit der Patienten (17,5 %), die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch signifikant ( $p = 0,031$ ).

Im Vergleich der Gruppen zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens zwischen Gruppe AA und Gruppe AG ( $p = 0,044$ ), die Sterblichkeit in Gruppe AA lag mit 55,0 % deutlich über den Gruppen AG (22,7 %) und GG (18,0

%). Weitere Unterschiede in klinischen Merkmalen und Verlaufsparemtern zwischen den Gruppen erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

**Schlussfolgerung:**

Die Beobachtung einer Assoziation zwischen Allelvariante G und dem Vorhandensein von t(11;14) steht im Einklang mit publizierten Forschungsergebnissen. In dieser Arbeit wurde ein statistisch signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben zwischen den Genotypen AA und AG gesehen. Eine hieraus abzuleitende mögliche Hypothese ist der positive Einfluss der Allelvariante G auf das Überleben von Myelompatienten. Diese Beobachtung stellt einen interessanten Ansatz für weitere Untersuchungen in einem größeren Patientenkollektiv dar. Auch die Bedeutung des Expressionsniveaus von Cyclin D1, welches unter anderem durch t(11;14) beeinflusst wird, für den klinischen Verlauf von Myelompatienten bedarf weiterer Forschung.

## Abstract

### Introduction:

The pathophysiological basis of Multiple Myeloma is the proliferation of clonal plasma cells, which produce a monoclonal, mostly non-functional immunoglobulin. In addition to hyperdiploid changes, so-called *IGH* translocation play an important role in the pathogenesis. In the case of translocation t(11;14), this leads to an increased expression of the protein cyclin D1, a change that affects a large number of malignant tumors. The human *CCND1* gene, which codes for cyclin D1, exhibits various polymorphisms whose significance for tumorigenesis is still largely unknown. Due to described associations with different tumor entities, the G870A polymorphism has received special attention. The aim of this work is to investigate this polymorphism in patients with Multiple Myeloma against the background of clinical and prognostic characteristics. In addition, a possible influence of changing genotypes through allogeneic stem cell transplantation was investigated.

### Methodology:

In the course of this work, data from 200 patients with Multiple Myeloma treated at Charité hospital between 1992 and 2017 were evaluated. The polymorphism G870A was determined by PCR and electrophoresis from bone marrow and peripheral blood samples of patients and healthy stem cell donors. The patients were then divided into groups according to genotype (GG, AA, AG). Statistical evaluation was done with SPSS (significance level  $p < 0.05$ ).

### Results:

The distribution of genotypes within our patient collective was 30.5% for GG, 10.5% for AA and 59.5% for AG. Presence of translocation t(11;14) was greater in group GG (29.2%) compared to the entirety of patients (17.5%) with differences between the groups being statistically significant ( $p = 0.031$ ). A comparison of the groups showed a statistically significant difference in overall survival between group AA and group AG ( $p = 0.044$ ), the mortality in group AA was 55.0% compared to 22.7% in group AG and 18.0% in group GG. Other differences in clinical features and course parameters between the groups were not statistically significant.

**Conclusion:**

The observed association between allele variant G and the presence of t(11;14) is consistent with published research results. The statistically significant difference in overall survival between genotypes AA and AG seen here allows for the hypothesis of allele variant G having a positive influence on survival in Multiple Myeloma. This observation represents an interesting approach for future investigations within a larger patient collective. Further research is also required to investigate the significance of cyclin D1 expression levels, being partly regulated through t(11;14), for the clinical course of patients with Multiple Myeloma.

# 1 Einleitung

## 1.1 Multiples Myelom

### 1.1.1 Epidemiologie und Pathophysiologie

Das Multiple Myelom ist mit einem Anteil von ca. 1 % an allen onkologischen Erkrankungen die zweithäufigste hämatologische Neoplasie (1). Während das Erkrankungsalter im Median bei 70 Jahren liegt, werden ca. 15 % der Patienten vor dem 60. Lebensjahr und ca. 2 % der Patienten vor dem 40. Lebensjahr diagnostiziert (2, 3). Epidemiologisch zeigt sich ein gehäuftes Auftreten des Multiplen Myeloms in der afrokaribischen Bevölkerung. Männer erkranken unabhängig von der Ethnizität häufiger als Frauen, und zwar mit einer ca. 50 % höheren Inzidenz (4).

Biologische Grundlage dieser Erkrankung ist die charakteristische Proliferation klonaler Plasmazellen, welche primär im Knochenmark lokalisiert ist (5). Bei den in das Knochenmark migrierten Myelomzellen handelt es sich um entartete B-Zellen, welche die Keimzentrumsreaktion und somit die Reifung zu langlebigen Gedächtnis-Plasmazellen bereits abgeschlossen haben (6). Myelomzellen weisen somatische Mutationen in den für ihr sekretiertes Immunglobulin kodierenden Gensequenzen auf und sind in hohem Maße abhängig von dem umgebenden Knochenmarkstroma (6). Im Gegensatz zu physiologischen Plasmazellen besitzen sie jedoch das Potential zur Proliferation, wenn auch in geringem Ausmaß. Der Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen beträgt typischerweise etwa 1 – 3 % aller Myelomzellen (7).

Charakteristisch für die Erkrankung ist die Produktion eines klonalen, zumeist funktionslosen Immunglobulins, auch Paraprotein oder monoklonales Protein genannt. Zumeist handelt es sich hierbei um IgG oder IgA (8), seltener um IgD oder IgE (3). Weiterhin produzieren die entarteten Plasmazellen häufig monoklonale freie Leichtketten, die in ihrer Menge variieren und sowohl im Blut als auch im Urin nachweisbar sind. In ca. 20 % der Fälle werden lediglich Leichtketten produziert. Weitere 2 % der Patienten weisen weder Paraprotein noch Leichtketten auf, ihre Erkrankung wird dann als asekretorisch bezeichnet (8).

Interessanterweise weisen ca. 3 – 5 % der Allgemeinbevölkerung in Europa ab einem Alter von 50 Jahren ebenfalls eine monoklonale Gammopathie auf, ohne Symptome einer manifesten Myelomerkrankung zu zeigen (9). Diese prämaligene Veränderung, genannt

MGUS, geht dem Multiplen Myelom in nahezu 100 % der Fälle voraus und wird daher als dessen Vorstufe angesehen (10).

Per definitionem zeigen die Betroffenen keine Symptome eines Endorganschadens sowie weniger als 10 % mononukleäre Zellen im Knochenmark (11). Die Progression von MGUS zur manifesten Myelomerkrankung, charakterisiert durch Endorganschäden, welche in Form von Knochenläsionen, Anämie, Immundefizienz und beeinträchtigter Nierenfunktion in Erscheinung treten können, beträgt ca. 1 % pro Jahr (12). Als relevante Risikofaktoren gelten hierbei eine erhöhte Konzentration freier Leichtketten im Serum, das Vorliegen eines anderen Immunglobulins als IgG sowie die Konzentration des Paraproteins im Serum, welche definitionsgemäß bei MGUS-Patienten  $< 30$  g/l liegt (13, 14). Ein höherer Wert wird als deutlicher Hinweis auf eine Myelomerkrankung betrachtet, als alleiniger Marker ist die Serum-Konzentration des Paraproteins jedoch nicht ausreichend für die Diagnose Multiples Myelom. Patienten mit einem sogenannten asymptomatischen Myelom, auch „Smouldering Myeloma“ genannt, weisen ebenfalls ein Paraprotein  $\geq 30$  g/l im Serum und/oder einen Plasmazellgehalt im Knochenmark von  $\geq 10$  % auf. In Abgrenzung zur klinisch manifesten symptomatischen Myelomerkrankung erfordert diese Diagnose jedoch die Abwesenheit der o. g. Endorganschäden und Symptome (2). Das Risiko, bei Vorliegen eines asymptomatischen Myeloms eine symptomatische Myelomerkrankung zu entwickeln, liegt mit jährlich 10 % deutlich höher als das eines MGUS-Patienten (3).

Die für das symptomatische Multiple Myelom charakteristischen Beschwerden ergeben sich aus der Pathophysiologie der Erkrankung. Proliferationen im Knochenmark führen durch Aktivierung von Osteoklasten und Hemmung der Osteoblastendifferenzierung zu lytischen Läsionen im angrenzenden Knochengewebe, was wiederum zur Hyperkalzämie führt (8). Etwa zwei Drittel der Patienten leiden bei Erstdiagnose unter den daraus resultierenden Knochenschmerzen, in nahezu 80 % der Fälle sind zu diesem Zeitpunkt mit konventionellen Röntgenaufnahmen bereits lytische Knochenläsionen, Osteoporose oder sogar pathologische Frakturen nachweisbar. Noch häufiger liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine laborchemisch nachweisbare Anämie vor, die sich in Form von körperlicher Schwäche und Fatigue bemerkbar machen kann (2). Zu einer Beeinträchtigung der Nierenfunktion, welche sich in ca. 20 % der Fälle bereits bei Diagnosestellung zeigt, kommt es unter anderem durch Präzipitation von Leichtketten, sobald deren Menge die Reabsorptionskapazität der Nieren überschreitet. Die hierdurch entstehende tubuläre Obstruktion und tubulo-interstitielle Inflammation wird für ca. 90 % der resultierenden

Nierenschäden im Krankheitsverlauf verantwortlich gemacht, als weitere Ursachen gelten Dehydratation, Hyperkalzämie, Hyperviskosität, Ablagerung von Amyloidern und nephrotoxische Substanzen wie nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente (8). Mit zunehmender Progredienz der Erkrankung sind auch extramedulläre Tumoren möglich, beispielsweise in Lymphknoten, im Pleuraraum oder in der Haut. Eine aggressivere Form der Erkrankung mit einer höheren Proliferationsrate ist die Plasmazelleukämie, bei der die malignen Plasmazellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut ausgeschwemmt werden (6).

### 1.1.2 Genetische Grundlagen

Zur Orientierung über die verschiedenen Subtypen eignet sich eine Einteilung nach genetischen Veränderungen. Grob kann hier zwischen hyperdiploiden und nicht-hyperdiploiden Veränderungen unterschieden werden, wobei ca. 50 % aller MGUS- und Myelom-Patienten Tumorzellen mit hyperdiploidem Chromosomensatz (48 – 75 Chromosomen) aufweisen (7, 15). Charakteristisch für die hyperdiploide Subgruppe sind Trisomien der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21. Eine weitere Einteilung erfolgt nach Vorhandensein sogenannter *IGH*-Translokationen, welche sich in ca. 70 % der nicht-hyperdiploiden oder hypodiploiden, hingegen nur in ca. 10 % der hyperdiploiden Myelome finden (15). Hierzu zählen u. a. die Translokationen  $t(11;14)(q13;q32)$  und  $t(4;14)(p16;q32)$  (16). Erstere kann in ca. 15 – 20 % der diagnostizierten Myelom- und teilweise auch in MGUS-Patienten nachgewiesen werden (17). Resultat einer solchen, zumeist balancierten, Translokation ist die Positionierung von Onkogenen wie *CCND1*, *CCND3*, *FGFR3*, *MMSET*, *MAF* oder *MAFB* in die Nähe eines Enhancers im *IGH*-Genlocus auf Chromosom 14 (18). Diese Translokationen führen entweder direkt oder indirekt zu einer erhöhten Expression des Zellzyklus-regulierenden Cyclin D, welche ein nahezu universelles Merkmal aller Myelom- und MGUS-Tumore darstellt (19).

Zu einer direkten Beeinflussung der Cyclin D1-Expression kommt es durch die Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$ , die Translokation  $t(6;14)(p21;q32)$  führt zu einer erhöhten Expression von Cyclin D3. Die Translokation  $t(4;14)(p16;q32)$  verursacht die Dysregulation des Gens *WHSC1*, auch bekannt als *MMSET*, sowie des *FGFR3*-Gens, welches für eine Rezeptortyrosinkinase kodiert. Im Falle der Translokation  $t(14;16)(q32;q23)$  kommt es zur Dysregulation des *MAF*-Onkogens, die Translokation  $t(14;20)(q32;q11)$  betrifft das *MAFB*-Gen (20).

Beide pathogenetischen Veränderungen, Hyperdiploidität wie auch *IGH*-Translokationen, werden im Allgemeinen zu den frühen primären Veränderungen im Verlauf der Erkrankung gezählt (17). Viele Patienten weisen zumindest eine *IGH*-Translokation auf, bei einigen sind im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung sogar zwei voneinander unabhängige Translokationen detektierbar (18). Ihre Ursache wird in fehlerhaften Prozessen im Rahmen des Immunglobulin-Klassenwechsels (CSR) oder der somatischen Mutationen während der Plasmazellreifung in den Keimzentren gesehen (21). Da diese Veränderungen auch in MGUS-Patienten nachgewiesen werden können, ist davon auszugehen, dass sie nicht allein ursächlich für eine maligne Transformation sein können (18). Tatsächlich sind viele genetische Charakteristika des Multiplen Myeloms bereits in der Vorstufe MGUS zu finden (20). Weitere genetische Veränderungen wie eine Deletion bzw. Monosomie des Chromosoms 13, die Deletion 17p, Veränderungen an Chromosom 1 (Deletion 1p, Amplifikation von 1q) oder *MYC*-Translokationen signalisieren die weitere Tumorprogression im Verlauf der Erkrankung (17).

Mutationen in Genen der Ras-Familie (*NRAS*, *KRAS*) liegen in 40 – 55 % der Myelomerkrankungen, jedoch lediglich in 5 % der MGUS-Fälle vor und werden daher als bedeutender Schritt in der Progression zur malignen Erkrankung gesehen (6, 20). Während gleichartige Mutationen einiger Gene, unter anderem *KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *BRAF* und *FAM46C* in der Mehrzahl der Patienten auftreten, ist das Multiple Myelom vor allem durch große interindividuelle und im Verlauf auch intraindividuelle Heterogenität gekennzeichnet (22). Serielle Analysen von sogenannten Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) zeigen oft einen nichtlinearen Verlauf im Hinblick auf im Krankheitsverlauf erworbene Veränderungen. Typisch sind im Verlauf entstehende Verzweigungen einzelner Subklone, die bereits bei Diagnosestellung häufig ein komplexes Muster aufweisen. Hiervon sind insbesondere Gene betroffen, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung als Hochrisiko-Gruppe klassifiziert wurden. Einzelne Subklone können zu unterschiedlichen Zeitpunkten dominieren, was ebenfalls auf den dynamischen Charakter der Tumorevolution hinweist (23). Ein Erklärungsansatz für die zunehmende Komplexität des genetischen Profils im Verlauf einer Myelomerkrankung ist eine relative Zunahme einzelner Subklone, die eine Therapie überleben und im Anschluss an diese Selektion neue Veränderungen erwerben. Auch das Wiederauftreten von zwischenzeitlich weniger dominanten Subklonen wird beobachtet, was eine erneute erfolgreiche Therapie mit einer bereits eingesetzten Medikation auch im rezidierten Stadium möglich machen kann. Der für das Multiple Myelom typische, disseminierte Befall des Knochenmarks könnte individuell eine noch

größere klonale Heterogenität bedingen, die von den seriellen Analysen jedoch nicht erfasst wird (23).

Eine Analyse des genetischen Profils von über 1000 neu diagnostizierten Myelompatienten im Rahmen des „Myeloma Genome Project“ bildet die Grundlage einer Einteilung in Gruppen mit jeweils typischen Kombinationen genetischer Aberrationen. Das Hinzutreten weiterer Mutationen zu den frühen Veränderungen wird als nicht-zufällige Entwicklung gesehen. Vielmehr könnte das – sich im Verlauf verändernde – genetische Profil der Myelomzellen abhängig von diesen sogenannten primären Ereignissen sein, wodurch typische Muster genetischer Aberrationen entstehen. Die Assoziation der Translokation t(11;14) mit Mutationen im *CCND1*- und *IRF4*-Gen ist ein Beispiel für ein solches Muster (24). Tabelle 1 bietet einen Überblick über typische genetische Veränderungen beim Multiplen Myelom und ihre Einteilung in Standard- vs. Hochrisikoaberrationen.

**Tabelle 1:** Genetische Risikostratifizierung (modifiziert nach (17, 25, 26))

<b>Standardrisiko</b>	<b>Hochrisiko</b>
Hyperdiploidität	+1q
t(11;14)(q13;q32)	Deletion 17p
t(6;14)(p21;q32)	t(14;16)(q32;q23)
Deletion 13q	t(4;14)(p16;q32)
	t(14;20)(q32;q11)

## 1.2 Allogene Stammzelltransplantation

Während die autologe Stammzelltransplantation in der Therapie des Multiplen Myeloms fest etabliert ist, gehört die alloSZT momentan nicht zur Standardtherapie für Myelompatienten (27). Gründe für ihren bislang eher restriktiven Einsatz waren unter anderem das Risiko der therapieassoziierten Mortalität und die Gefahr der Graft-versus-Host-Erkrankung. Auch die Verfügbarkeit geeigneter Spender stellt einen limitierenden Faktor dar (28). Trotz dieser Schwierigkeiten bleibt die alloSZT für junge und fitte Patienten eine attraktive Therapieoption und kann als solche vor allem im Kontext zytogenetischer Hochrisiko-Aberrationen und bei Rezidiven auch im Anschluss an die autologe Stammzelltransplantation in Betracht gezogen werden (29). Interessant ist die alloSZT vor allem aufgrund ihres kurativen Potentials (30), welches zumindest anteilig durch den sog. Graft-versus-Myelom-Effekt erklärt werden kann (31). Gegenstand aktueller Forschung ist die Frage nach dem Stellenwert der alloSZT im Kontext neuer therapeutischer Substanzen.

Dabei steht vor allem die Integration dieser Substanzen in das Therapiekonzept der alloSZT im Fokus (30). Immunmodulatorische Substanzen und Proteasominhibitoren könnten als Konsolidierung nach alloSZT dazu beitragen, das Therapieergebnis zu verbessern (32) und zugleich das Risiko einer Graft-versus-Host-Erkrankung zu reduzieren (30).

## **1.3 Cyclin D1**

### **1.3.1 Rolle im Zellzyklus und Bedeutung für die Tumorgenese**

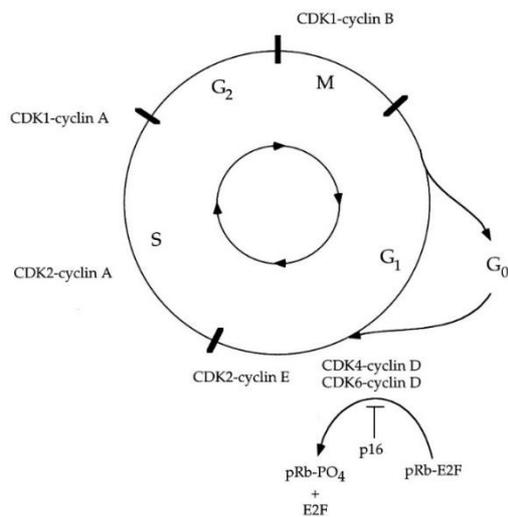
Das Protein Cyclin D1 ist in einer Vielzahl maligner Tumore überexprimiert (33). Die pathophysiologischen Mechanismen unterscheiden sich je nach Tumorentität. Während bei Brustkrebserkrankungen eine Amplifikation auf Chromosom 11 ursächlich ist, führen in der Entstehung des Multiplen Myeloms und des Mantelzelllymphoms vor allem chromosomale Translokationen zur Überexpression des Proteins. Eine Hochregulation von Cyclin D1 durch Punktmutationen wurde bei Karzinomen des Endometriums und des Ösophagus beobachtet (34-38).

Die wohl bekannteste Funktion des Cyclin D1 ist die Aktivierung von CDK4 und CDK6 am Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (39). Die Bildung eines Komplexes aus einem Cyclin mit regulatorischer Funktion und einer Cyclin-abhängigen Kinase als katalytische Untereinheit ist ein allgemeiner Mechanismus in der Progression durch die Phasen des Zellzyklus (siehe Abbildung 1). Neben der Mitose-Phase (M-Phase) und der Synthese-Phase (S-Phase) besteht dieser aus zwei Interphasen (G1-Phase, G2-Phase), welche die M- und die S-Phase voneinander trennen (38).

Die Chromosomen jeder Zelle werden während der S-Phase verdoppelt und anschließend im Zuge der M-Phase voneinander getrennt, wodurch zwei genetisch identische Tochterzellen entstehen (40). Die G1-Phase im Anschluss an die M-Phase und die G2-Phase nach der S-Phase dienen der Reparatur von DNA-Schäden sowie eventuell bei der Replikation entstandenen Fehlern (41). Im Laufe der G1-Phase werden verschiedene extrazelluläre und intrazelluläre Signale integriert, die darüber entscheiden, ob die Zelle in die S-Phase eintritt. Die hierzu erforderlichen Abläufe sind zell- und kontextspezifisch, erfordern jedoch immer die Aktivierung Cyclin-abhängiger Kinasen (41).

Ruhende Zellen befinden sich in der sogenannten G0-Phase und treten infolge einer Stimulation durch ein Wachstumssignal in die G1-Phase ein (42). Umgekehrt können differenzierte Zellen in Abwesenheit stimulierender Einflüsse in die G0-Phase übertreten und

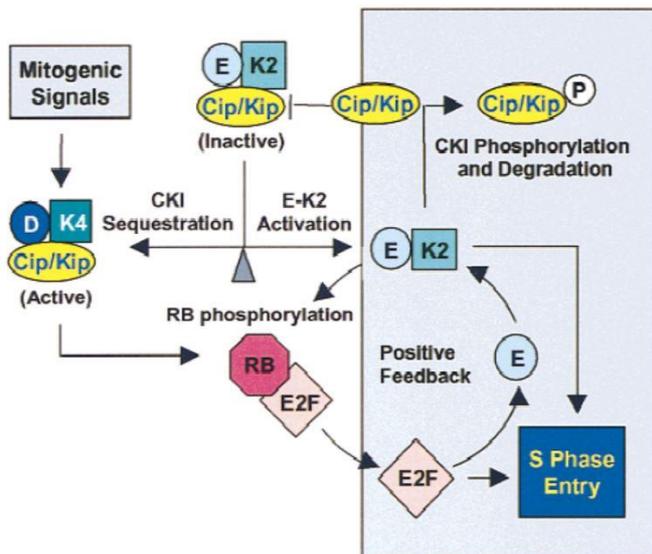
für lange Zeit in einem Zustand, der durch reduzierte Syntheseleistung gekennzeichnet ist, verbleiben (43). Auch andere extrazelluläre Signale durch antiproliferativ wirkende Proteine oder direkten Kontakt zu anderen Zellen können die Zellzyklusprogression während der G1-Phase anhalten. Eine Störung dieser Signalwege kann über Entkopplung der Zelle von äußeren Kontrollen zu einer unkontrollierten Proliferation führen (44).



**Abbildung 1:** Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen im Zellzyklus (40)

Die Progression durch die Phasen des Zellzyklus wird kontrolliert durch ein Zusammenspiel aus Cyclinen, Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und deren Inhibitoren (CKIs) (45). Aktivierung und Inhibierung der Cyclin/CDK-Komplexe zur richtigen Zeit sind entscheidend für einen geordneten Ablauf des Zellzyklus (46). Je nach Zellzyklusphase finden sich verschiedene Kombinationen der Cycline mit den CDKs, welche zum Teil auch in der Transkriptionskontrolle, der Zelldifferenzierung oder in der Aufnahme von Nährstoffen eine Rolle spielen (41).

Neben Cyclin D1 existieren zwei weitere D-Typ Cycline, Cyclin D2 und Cyclin D3, welche gewebespezifisch exprimiert werden. Ihre Aktivität reguliert den Ablauf der G1-Phase und den Übergang in die S-Phase. Alle drei Unterformen besitzen die Fähigkeit an CDK4 und CDK6 zu binden (45, 47). Solange die Zelle durch Wachstumsfaktoren stimuliert wird, erfolgt die Synthese der D-Typ Cycline kontinuierlich, es zeigt sich jedoch ein Peak in der G1-Phase (43).



**Abbildung 2:** Abläufe am G1/S-Übergang des Zellzyklus (48)

Eine Stimulation durch mitogene Signale während der G1-Phase führt über das Protein Ras und eine Signalkaskade mit sequentieller Aktivierung mehrerer Kinasen zur Transkription des *CCND1*-Gens (48). Das überexprimierte Cyclin D bildet daraufhin Komplexe mit den CDK4 oder CDK6 und das entstehende Holoenzym wird durch die CAK, einen Komplex aus CDK7, Cyclin H und MAT1, phosphoryliert (42, 49). Der hierdurch aktivierte Cyclin/CDK-Komplex ermöglicht nun die Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins Rb, welches im hypophosphorylierten Zustand an den Transkriptionsfaktor E2F sowie an eine Histondeacetylase (HDAC) gebunden vorliegt. Durch die Phosphorylierung von Rb wird E2F aus seiner Bindung gelöst und ermöglicht so die Expression mehrerer, für den Eintritt in die S-Phase erforderlicher, Proteine – unter anderem die des Cyclin E (50). Dieses Cyclin, welches während der G1-Phase an CDK2 bindet, ist ebenso wie Cyclin D essentiell für den Eintritt der Zelle in die S-Phase (51, 52). Indem der Komplex aus Cyclin D und CDK4 oder CDK6 die CKIs p21 und p27 bindet, steht CDK2 für eine Verbindung mit Cyclin E zur Verfügung (53). Durch diesen positiven Feedbackmechanismus wird der Übergang in die S-Phase weiter vorangetrieben und durch die zunehmende Unabhängigkeit von mitogener Stimulation zum irreversiblen Ereignis im Ablauf des Zellzyklus (41). Kurz nach Eintritt in die S-Phase kommt es zum nukleären Export und anschließend im Zytoplasma der Zelle durch Ubiquitin vermittelt zum proteasomalen Abbau der D-Typ Cycline (47). Dieser Vorgang wird ermöglicht durch eine Phosphorylierung, die in Anwesenheit mitogener Reize negativ reguliert wird (48). Üben diese einen stimulierenden Einfluss auf die Zelle aus, wird ein Signalweg aktiviert, welcher zur

Hemmung der Kinase GSK3- $\beta$  führt. Eine Aufhebung dieser inhibitorischen Kontrolle ermöglicht die Phosphorylierung von Threonin an Position 286 des Cyclin D1 (43). Im Falle einer DNA-Schädigung wird die Zellzyklusprogression ebenfalls durch verstärkten Abbau des Proteins angehalten (54).

Neben dem regulierenden Einfluss auf den G1/S-Übergang im Zellzyklus werden an CDK2 gebundenes Cyclin D1 und der Komplex aus Cyclin E und CDK2 auch für die Initiation der Centrosomen-Duplikation und -Reifung verantwortlich gemacht (47, 55). Darüber hinaus werden weitere, zum Teil eventuell CDK-unabhängige, Funktionen des Cyclins diskutiert. Hierzu zählt unter anderem die Entstehung chromosomaler Instabilitäten, möglicherweise als direktes Resultat des Einflusses auf die Transkriptionskontrolle durch Cyclin D1. Ein instabiler Karyotyp in Form von strukturellen Aberrationen sowie Verlust oder Gewinn einzelner Chromosomen könnte ein weiterer Mechanismus der durch Cyclin D1 induzierten Tumorgenese sein (47).

Ebenfalls als Funktionen von Cyclin D1 betrachtet werden die Reaktion auf DNA-Schäden (56) sowie die Regulation der Mitochondrienfunktion (57) und Zellmigration (58, 59). So konnte bei einem Mangel an Cyclin D1 eine verminderte Migrationsfähigkeit von Fibroblasten, Makrophagen und Brustepithelzellen nachgewiesen werden (58, 60, 61). Eine verstärkte Expression von Cyclin D1 könnte demnach eine erleichterte Metastasierung zur Folge haben (47). In der Reaktion auf DNA-Schäden fungiert Cyclin D1 unter anderem als Interaktionspartner von RAD51, einem Enzym mit der Fähigkeit zur Rekombination und Reparatur geschädigter DNA. Die Bildung dieses Komplexes wird durch Bestrahlung induziert und führt zur Rekrutierung von RAD51 zur geschädigten DNA. Eine erhöhte Induktion dieses Mechanismus wirkt schützend auf die DNA und wird mit einer höheren Resistenz der Zellen gegen eine Bestrahlung in Verbindung gebracht (47, 62). Untersuchungen zur Bedeutung von Cyclin D1 für die Regulation der Mitochondrienfunktion reifer B-Zellen ergaben eine verringerte mitochondriale Aktivität in Anwesenheit des Proteins. Die Interaktion von Cyclin D1 mit einem spannungsgesteuerten Anionenkanal führte zu einem beeinträchtigten mitochondrialen Metabolismus, was auf eine reduzierte Transportkapazität für ATP, ADP und weitere Metaboliten in das Mitochondrium zurückgeführt wurde (57).

Indem es Bindungen mit mehr als 30 verschiedenen Transkriptionsfaktoren und deren Koregulatoren eingeht, spielt Cyclin D1 auch eine Rolle in der Transkriptionskontrolle verschiedener Gene. So bindet es beispielsweise direkt an den Androgenrezeptor (AR), den Estrogenrezeptor (ER)  $\alpha$ , den Schilddrüsenhormonrezeptor und PPAR $\gamma$ , welche

allesamt nukleär lokalisiert sind. Zudem scheint Cyclin D1 die Aktivität von Histondeacetylasen (HDAC) und Histonacetyltransferasen (HAT) zu beeinflussen und so regulierend auf epigenetische Prozesse einzuwirken (63). Diese Beobachtungen suggerieren eine besondere Bedeutung des Cyclin D1 in der Initiation und Aufrechterhaltung von transformierenden Prozessen (64).

Während Cyclin D1 physiologischerweise in reifen B-Zellen nicht exprimiert wird, findet sich eine Überexpression bei ca. 50 % der Myelomerkrankungen (65, 66).

In ca. 15 – 20 % aller Myelompatienten kommt es infolge der Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  zur Hochregulation der Cyclin D1-Expression durch Fusion des *CCND1*-Genlocus auf Chromosom 11 mit dem *IGH*-Locus auf Chromosom 14. Die unmittelbare Nähe des starken Enhancers  $E_{\mu}$  des Immunglobulin-Schwerketten-Locus resultiert in einer aberranten transkriptionellen Aktivität des *CCND1*-Gens (16). Dieser Pathomechanismus erklärt jedoch nur einen Teil der beobachteten Cyclin D1-Überexpression in Myelompatienten. In der Mehrzahl der Myelome mit hyperdiploidem Chromosomensatz wird Cyclin D1 über alternative Mechanismen überexprimiert (16). Hierzu zählen die Trisomie 11 sowie Amplifikationen des *CCND1*-Gens (66, 67). 40 % der Myelome zeigen eine biallelische Dysregulation des Proteins (68). Auch andere reifzellige B-Zell-Neoplasien weisen dieses Merkmal auf. So kommt es bei 90 % der Patienten mit einem Mantelzelllymphom infolge der Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  zu einer Überexpression von Cyclin D1, und auch in 50 – 65 % der Haarzelleukämien wird das Protein vermehrt produziert (69). Interessanterweise scheint die Hochregulation des Cyclins nicht per se zu einer erhöhten Proliferationsrate zu führen. Myelompatienten mit einer erhöhten Cyclin D1-Expression weisen sogar einen niedrigeren proliferativen Index auf, zudem lässt sich eine Überexpression des Proteins bereits in MGUS-Patienten nachweisen (68, 70, 71). Vermutlich ist das Gleichgewicht aus Synthese und Abbau von Cyclin D1 sowie die geordnete Abfolge dieser Prozesse essenziell für die proliferative Funktion des Proteins. Eine akute Überexpression kann zumindest in Fibroblasten den Eintritt der Zelle in die S-Phase verhindern, eventuell spielen hier die Bindung von Cyclin D1 an PCNA und CDK2 eine Rolle (72). Analysen an Patienten mit Myelomerkrankung und Mantelzelllymphom legen den Verdacht nahe, dass der onkogene Effekt der Cyclin D1-Überexpression nicht oder nicht allein auf CDK-abhängige Funktionen des Proteins zurückzuführen ist (70). Denkbar wäre auch, dass CDK-unabhängige Funktionen, zum Beispiel der Einfluss des Cyclins auf die Transkriptionskontrolle verschiedener Gene, eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese dieser Erkrankungen spielen (45, 71). Neue Untersuchungen an

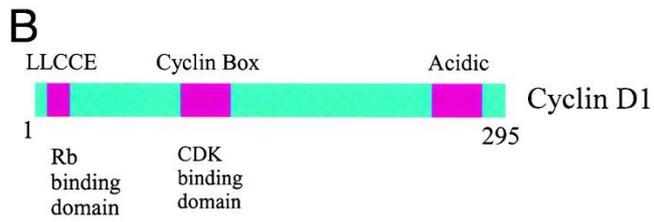
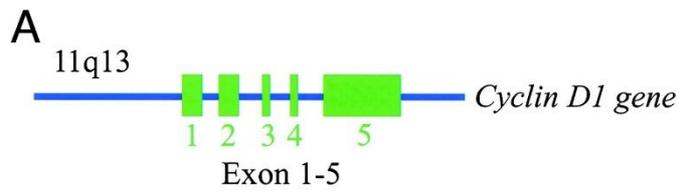
Myelomzellen konnten eine Beeinflussung der Zelladhäsion und -migration durch Cyclin D1 nachweisen. Dieser Effekt wird scheinbar durch erhöhten oxidativen Stress und der damit einhergehenden Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst und könnte eine entscheidende Rolle in der Interaktion der Myelomzellen mit dem umgebenden Knochenmarkstroma spielen (73). Auch die Produktion inflammatorischer Chemokine war bei Expression von Cyclin D1 im Vergleich zu Cyclin D1-negativen Myelomzellen erhöht (74).

Im Hinblick auf die prognostische Bedeutung einer Cyclin D1-Überexpression für den Verlauf einer Myelomerkrankung ergaben sich bislang sehr unterschiedliche Beobachtungen. Während sich in einigen Studien ein besseres Gesamtüberleben und Therapieansprechen zeigte (67, 75), berichten Sewify *et al.* von einem kürzeren Gesamtüberleben sowie einer möglicherweise höheren Therapieresistenz. Dies begründen sie mit einer erhöhten Expression des MDR1-Proteins in Cyclin D1-positiven Patienten. Zudem beobachteten sie in diesem Patientenkollektiv eine stärkere Knochenmarkinfiltration durch Plasmazellen und vermehrte osteolytische Läsionen (76). Andere Studien konnten hingegen keinen signifikanten Einfluss der Cyclin D1-Überexpression auf das Gesamtüberleben nachweisen (77, 78).

### **1.3.2 CCND1 Polymorphismus G870A**

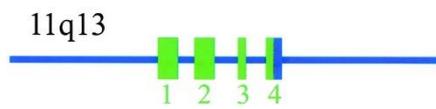
Für das menschliche *CCND1*-Gen konnten über 100 verschiedene SNPs nachgewiesen und in öffentlichen SNP-Datenbanken katalogisiert werden. Eine besondere Beachtung in der weiteren Untersuchung dieser SNPs hat der Polymorphismus G870A erfahren. Lokalisiert in Exon 4 an der Grenze zu Intron 4, beeinflusst dieser das Splicing des *CCND1*-Genproduktes. Durch alternatives Splicing entstehen zwei unterschiedliche Transkripte, das a- und das b-Transkript.

Während beim a-Transkript die Informationen der Exone 1-5 vollständig abgelesen werden, werden für das b-Transkript lediglich die Exone 1-4 transkribiert (63). Die jeweiligen Varianten Cyclin D1a und Cyclin D1b unterscheiden sich hierdurch in ihrer Aminosäuresequenz am C-Terminus, die letzten 55 Aminosäuren sind beim b-Transkript durch eine kürzere Sequenz ausgetauscht (79, 80).



**C**

Alternative Splicing (isoform b)



Legende: A) *CCND1*-Genlocus, B) funktionelle Abschnitte von Cyclin D1, C) alternative Splicingvariante

**Abbildung 3:** schematische Darstellung *CCND1*-Gen (63)

Im Jahr 1995 veröffentlichten Betticher *et al.* ihre Untersuchungen bezüglich der Entstehung dieses alternativen Splicingvorgangs. Demnach sei das Adenosin an Position 870 verantwortlich für die Transkription des Großteils der b-mRNA, während Guanin entweder die Transkription sowohl der a- als auch der b-Form der mRNA ermögliche oder vor allem zur Entstehung der a-mRNA führe (81). Beachtet werden sollte jedoch die Tatsache, dass auch homozygote Träger der Allelvariante A das a-Transkript und homozygote Träger der Allelvariante G das b-Transkript produzieren können (33, 82). Im Falle des Multiplen Myeloms und des Mantelzelllymphoms werden beide Transkripte exprimiert, die Variante Cyclin D1a überwiegt jedoch (33, 83).

In Zellkulturen konnten unterschiedliche Funktionen der beiden Isoformen beobachtet werden. Sawa *et al.* veröffentlichten 1998 ihre Beobachtungen, wonach eine Überexpression des a-Transkripts zu einem höheren Anteil proliferierender Zellen führe, eine Überexpression des b-Transkripts jedoch zu einem gegenteiligen Effekt. So fand sich ein größerer Anteil Ki-67-positiver Zellen im Rahmen einer Hochregulation von Cyclin D1a unter nährstoffarmen Bedingungen. Das Protein Ki-67 ist ein Marker für Zellproliferation und wird dementsprechend nicht in ruhenden Zellen exprimiert, welche sich in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus befinden. Ein geringere Fraktion Ki-67-positiver Zellen, selbst unter nährstoffreichen Bedingungen, zeigte sich bei Hochregulation des b-Transkripts (81). Als Ursache hierfür wird eine gegenläufige Beeinflussung des Zellzyklus durch die jeweiligen Isoformen vermutet. Möglicherweise übt das a-Transkript einen unterstützenden Einfluss auf den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus aus, während die Wirkung des b-Transkripts zum Austritt der Zelle aus dem Zellzyklus führt (81).

Während beide Isoformen nachweislich die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 beeinflussen, konnte gezeigt werden, dass Cyclin D1b im Wesentlichen im Zellkern lokalisiert ist (84), was mit einem erhöhten Potential zur onkogenen Transformation assoziiert wird (85). Untersuchungen an Mantelzelllymphomen ergaben hingegen sowohl eine nukleäre als auch eine zytoplasmatische Lokalisation von Cyclin D1b (33). Eine dauerhafte nukleäre Lokalisation von Cyclin D1b wird durch das Fehlen der sogenannten „PEST destruction box“ sowie von Threonin an Stelle 286 begründet. Letztere ist eine für den nukleären Export und den regulierten Abbau von Cyclin D1 erforderliche Phosphorylierungsstelle (43, 86). Da beide Varianten des Cyclin D1 ähnliche Halbwertszeiten und eine vergleichbare Stabilität zeigten, liegt die Vermutung nahe, dass weitere regulatorische Vorgänge zum Abbau der Proteine existieren (33). Eventuell spielt auch der N-

Terminus des Proteins, welcher sich zwischen Cyclin D1a und Cyclin D1b nicht unterscheidet, eine Rolle in der Regulation der Proteinstabilität (45).

Trotz des angenommenen höheren onkogenen Potentials wird Cyclin D1b mit einer geringeren Kapazität zur Phosphorylierung von Rb und damit zur Zellzyklusprogression in Verbindung gebracht (86, 87). Ursächlich hierfür könnten die unterschiedlichen Sequenzen der Cyclin D1-Varianten a und b an ihrem jeweiligen C-Terminus sein. Die Bildung von Komplexen mit CDK4 scheint hingegen nicht beeinträchtigt, vielmehr wurde CDK4 als exklusiver Partner für die Bindung an Cyclin D1b identifiziert (45). Diese Beobachtung suggeriert alternative Mechanismen als Ursache für das erhöhte Transformationspotential. Diskutiert werden ein Einfluss auf die Transkriptionskontrolle, die Aufhebung der Kontaktinhibition sowie eine mögliche Resistenz gegenüber antiproliferativen Signalen. Auch bislang unbekannte Auswirkungen der Lokalisation im Zellkern könnten eine Rolle spielen (45, 86, 87).

Die genauen Mechanismen einer Cyclin D1b-vermittelten Tumorgenese sind komplex, die Bedeutung der einzelnen Splicingvarianten ist aktuell noch nicht vollständig verstanden. Vermutlich spielen unter anderem das relative Verhältnis der beiden Transkripte zueinander eine Rolle, ebenso das zell- und gewebespezifische Expressionsmuster (80, 87). Eine Assoziation des Polymorphismus G870A mit verschiedenen Tumorentitäten wurde in Studien beschrieben. Die Allelvariante A wird dabei mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Basalzellkarzinomen (88), Ösophagus-Karzinomen (89), Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (90), Prostatakarzinomen (91) und weiteren malignen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Andere Studien weisen hingegen auf ein erhöhtes Risiko durch Allelvariante G hin (92, 93), während wiederum andere keinen Unterschied zwischen den Allelvarianten im Hinblick auf Erkrankungs- und Progressionsrisiko abbilden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung der Allelvarianten A und G und somit die Ausprägung des Polymorphismus G870A in Patienten mit Multiplem Myelom bzw. Plasmozytom untersucht und vor dem Hintergrund klinischer Daten und Verlaufsparmeter betrachtet. Hierzu wurde die Gesamtkohorte in drei Gruppen unterteilt: Gruppe GG (homozygot für Allelvariante G), Gruppe AA (homozygot für Allelvariante A) und Gruppe AG (heterozygot). Zusätzlich wurde für das Patientenkollektiv mit alloSZT die Ausprägung des Polymorphismus bei den gesunden Spendern untersucht. Ziel dieser Arbeit ist die Auseinandersetzung mit folgenden Fragen:

- I. Unterscheiden sich Patienten mit unterschiedlichem Polymorphismus G870A im *CCND1*-Gen im Hinblick auf das Geschlecht, das Alter bei Erstdiagnose und genetische Aberrationen bei Erstdiagnose?
- II. Unterscheiden sich Patienten mit unterschiedlichem Polymorphismus G870A im *CCND1*-Gen im Hinblick auf das Therapieansprechen, das Erreichen einer klinischen Remission oder die Zeit bis zum 1. Rezidiv?
- III. Hat der Polymorphismus G870A im *CCND1*-Gen einen Einfluss auf das Gesamtüberleben oder das Progressionsfreie Überleben der Patienten?
- IV. Hat der Polymorphismus G870A im *CCND1*-Gen gesunder Stammzellspender einen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Patienten nach alloSZT?

## 2 Materialien und Methoden

Im folgenden Kapitel sind die verwendeten Materialien aufgelistet, gefolgt von einer Beschreibung der durchgeführten Methoden. Produktnamen und Herstellerangaben der verwendeten Materialien sind in den Tabellen 2 – 8 aufgelistet, Tabelle 9 informiert über die in der vorliegenden Arbeit genutzte Datenbank und das Programm zur Literaturverwaltung. Beim Hersteller der Oligonukleotide (siehe Tabelle 5) handelt es sich um die Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH in Berlin (Eresburgstrasse 22-23, 12103 Berlin).

### 2.1 Materialien

**Tabelle 2:** Chemikalien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Agarose</b>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<b>Aqua at iniectabilia</b>	Braun, Melsungen
<b>Ethanol (70%)</b>	Qiagen, Hilden
<b>Ethidiumbromid</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Isopropanol</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Nuklease-freies Wasser</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<b>RNase-Free Water</b>	Qiagen, Hilden

**Tabelle 3:** Medien, Lösungen und Puffer

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Auftrags-Puffer</b>	BioLine GmbH, Luckenwalde
<b>Lyse-Puffer</b>	Qiagen, Hilden
<b>Hydratations-Puffer</b>	Qiagen, Hilden
<b>Hyperladder II</b>	BioLine GmbH, Luckenwalde
<b>Prezipitations-Puffer</b>	Qiagen, Hilden
<b>TBE-Puffer</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

**Tabelle 4: Enzyme**

Produkt	Hersteller
<b>Bsrl (10 U/μl)</b>	New England BioLabs, Frankfurt am Main
<b>AmpliTaQ Gold DNA Polymerase (5 U/μl)</b>	Applied Biosystems, Darmstadt

**Tabelle 5: Oligonukleotide**

Name	Sequenz	Molare Konzentration	Schmelzpunkt (°C)
<b>MM rs603965f</b>	5'-GAT GTC CCC ATC ACC TGT C	10 pmol	59,5°C
<b>MM rs603965r</b>	5'-GTC AGT AAG TTC TAG GAG CAG TGG	10 pmol	65,2°C
<b>dNTPs</b>		10 mM	

**Tabelle 6: Geräte**

Gerät	Modell	Hersteller
<b>Computer</b>	Fujitsu Esprimo	Fujitsu, Tokyo
<b>Gelelektrophorese-Kammern</b>	HORIZON ® 58, HORIZON ® 11.14	Life Technologies, Carlsbad
<b>Kamera</b>	Canon eos 1200 D1	Canon, Tokyo
<b>Kühl- und Gefrierschränke</b>	KGV36X27/01	Bosch, Stuttgart
<b>Mikrowelle</b>	SEVERIN 800	Severin, Sundern
<b>PCR-Geräte</b>	2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems, Foster City
<b>Pipette</b>	Eppendorf Reference 0,5-10 μl, 50-200 μl	Eppendorf, Hamburg
<b>Schüttler</b>	IKA MS 1 shaker	Sigma Aldrich, St. Louis
<b>Spektrophotometer</b>	NanoDrop ND-1000	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
<b>Thermocycler</b>	bio-med Thermocycler 60	Braun, Melsungen
<b>Vortexgerät</b>	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia
<b>Waage</b>	EMS 300-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen
<b>Zentrifuge</b>	Centrifuge 5810 Sprout Minizentrifuge  Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf  Eppendorf, Hamburg

**Tabelle 7:** Hilfs- und Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller
<b>Handschuhe</b>	Vasco Nitril white semi-long S	Braun, Melsungen
<b>Pipettenspitzen</b>	Biosphere® Filter Tips, Eppendorf® Reference® Pipette (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg
<b>Reaktionsgefäße</b>	PCR Tubes, 0,2 ml, Strip tubes and caps (0,1 ml)	Qiagen, Hilden
<b>Tücher</b>	KIMTECH SCIENCE Precision Wipes	Kimberley-Clark, Surrey

**Tabelle 8:** Software

Produkt	Hersteller
<b>EOS Utility</b>	Canon, Tokyo
<b>IBM SPSS Statistics (Version 25)</b>	SPSS, Chicago
<b>Microsoft Excel</b>	Microsoft, Redmond
<b>Microsoft Word</b>	Microsoft, Redmond
<b>NanoDrop 1000</b>	Thermo Fisher Scientific, Wilmington

**Tabelle 9:** Literaturverwaltung und Datenbanken

NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>
Thomson Reuters EndNote	<a href="https://projectne.thomsonreuters.com/#/login?app=endnote">https://projectne.thomsonreuters.com/#/login?app=endnote</a>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA-Isolation

Zur DNA-Isolation wurden Puregene-Reagenzien von Qiagen verwendet. Zunächst wurden ca.  $3 - 5 \times 10^6$  Zellen in 600 µl Lyse-Puffer resuspendiert und die Suspension gut mit der Pipette gemischt. Anschließend wurden die Proben mindestens über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine vollständige Auflösung der Zellen zu ermöglichen. Der Lyse-Puffer besteht aus anionischen Detergentien und einem DNA-Stabilisator, wodurch die Zellen lysiert werden und die Aktivität von DNasen inhibiert wird. Im

nächsten Schritt wurden 200 µl Präzipitations-Puffer hinzugefügt und die Lösung gevortext, bis sie gleichmäßig trüb erschien. Dies diente dem Ausfällen von Proteinen. Im Anschluss daran wurden die Proben fünf Minuten auf Eis inkubiert und drei Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, der entstehende Überstand in ein sauberes Reagenzröhrchen überführt und mit 600 µl Isopropanol vermischt. Die Suspension wurde nun so lange geschwenkt, bis ein ausgefallter DNA-Faden sichtbar war. Abschließend wurde die DNA für eine Minute bei 13000 rpm pelletiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet trocken pipettiert war, wurde es über zehn Minuten bei Raumtemperatur mit offenem Deckel stehen gelassen, was der Verdampfung des restlichen Alkohols diente. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung in 110 µl Hydratations-Puffer und die isolierte DNA wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor die Quantifizierung am NanoDrop durchgeführt wurde.

### **2.2.2 Quantitative Nukleinsäureanalyse (DNA-Konzentrationsmessung)**

Die Messung der DNA-Konzentration wurde am NanoDrop-Spectrophometer ND-1000 durchgeführt, wobei RNase-freies Wasser als Referenzwert diente. Für jede Messung wurden 1,5 µl der isolierten, aufgetauten DNA auf die Messoberfläche pipettiert. Aus den bei 260 nm und 280 nm bestimmten Absorptionsmaxima der Probelösungen wurde anschließend ein Quotient gebildet (Absorption bei 260 nm / Absorption bei 280 nm), welcher bei reiner DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Außerdem erfolgte die grafische Darstellung des Absorptionsspektrums zwischen 220 nm und 350 nm. Dies diente der Detektion von Verunreinigungen durch Lösungsmittel oder Proteine. Die Angabe der DNA-Konzentration erfolgte in ng/µl.

### **2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

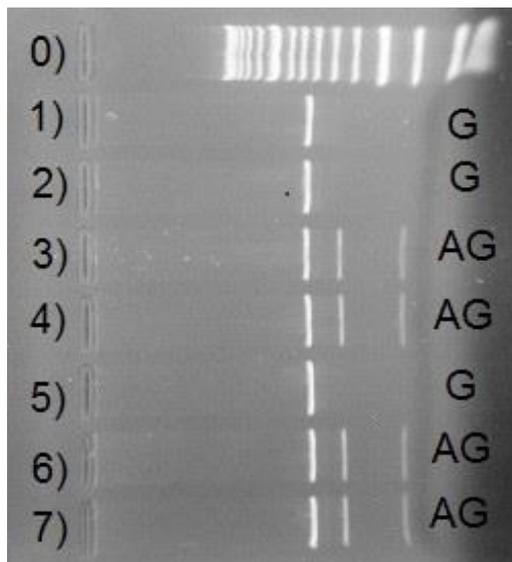
Die PCR ermöglicht durch zyklische Wiederholung von spezifischen Reaktionsschritten eine exponentielle Anreicherung der DNA. Durch Amplifikation der DNA-Fragmente können diese im Anschluss mithilfe der Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Im ersten Schritt wird der DNA-Strang bei 90 – 95 °C denaturiert, anschließend erfolgt die Anlagerung der Primer bei einer spezifischen Temperatur, normalerweise zwischen 45 und 70 °C. Die Primer dienen als Startpunkt für die DNA-Polymerase, welche im letzten Schritt die Elongation der komplementären DNA-Stränge ermöglicht. Hierfür wird eine

für die optimale Enzymaktivität erforderliche Temperatur eingestellt, welche im Falle der verwendeten Taq-Polymerase bei 72 °C liegt.

#### **2.2.4 Agarosegelelektrophorese**

Während der Agarosegelelektrophorese erfolgt die Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld. Die hierzu verwendete Agarose ist ein Polysaccharid aus glykosidisch verknüpfter D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose. Für diese Methode wird sich die unterschiedliche Beweglichkeit der DNA-Moleküle zu Nutze gemacht, welche auf ihrer Größe beruht. Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen wandern die DNA-Moleküle von der Kathode zur Anode, kleinere Moleküle können die Poren der Matrix besser durchwandern und gelangen so schneller durch das Gel. Die Geschwindigkeit der Auftrennung ist zudem abhängig von der angelegten Spannung und der Länge der Laufstrecke.

Zur Herstellung des Gels wurden 0,45 g Agarose mit 30 ml 1x TBE-Puffer vermischt, zwei- bis dreimal in der Mikrowelle aufgekocht und kurz abgekühlt. Anschließend wurden 3 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Durch Interkalierung zwischen die Basen der DNA und seine Fluoreszenz bei 260 nm unter UV-Licht ermöglicht Ethidiumbromid die Visualisierung der DNA-Moleküle. Hierauf wurde die Suspension in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm zur Ausbildung der Probenaschen eingesetzt. Sobald das Gel fest war, wurde der Kamm entfernt und die Kammer mit dem TBE-Puffer gefüllt, sodass das Gel vollständig umspült war. Auf einer Mikrotiterplatte wurden je Probe 3 µl Auftragspuffer aufgetragen und 8 µl PCR-Produkt dazugegeben. Nach Mischung durch Auf- und Abziehen mit der Pipette wurden hiervon 8 µl aufgezogen und in die jeweilige Kammer im Gel pipettiert. In die erste Kammer wurde Hyperladder II pipettiert, welcher als Längenstandard diente. Anschließend wurden die DNA-Fragmente bei 150 V über ca. 30 Minuten aufgetrennt. Mittels UV-Kamera und zugehöriger Software wurden die Ergebnisse der Gelelektrophorese visualisiert. Bei Vorliegen des G-Allels ergibt sich nach Durchführung der Gelelektrophorese eine Bande bei 643 Basenpaaren, das A-Allel wird durch zwei Banden bei jeweils 450 und 192 Basenpaaren repräsentiert. Treten alle drei Banden auf, so handelt es sich um einen heterozygoten Genotyp (AG) an Position 870 im *CCND1*-Gen.



Legende: 0) Längenstandard, 1-7) Patientenproben

**Abbildung 4:** Beispielbild einer Gelelektrophorese nach Auftrennung der Allele A und G im *CCND1*-Gen an Position 870

## 2.3 Erfassung der Patientendaten

Die vorliegende Arbeit basiert auf retrospektiven Untersuchungen an Knochenmarkproben und peripheren Blutproben. Eine schriftliche Einwilligung der Patienten zur Entnahme und Untersuchung dieser Proben wurde eingeholt. Für die molekulargenetischen Untersuchungen, die am Labor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin der Charité erfolgten, lag eine Genehmigung der Ethikkommission vor. In der Erstellung der vorliegenden Dissertation wurden die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ eingehalten (94).

## 2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics (Version 25). Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant betrachtet. Metrische Daten wurden mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft. Zusätzlich wurde die optische Kontrolle der Verteilung mittels Histogramm und Q-Q-Plot berücksichtigt. Sofern eine Normalverteilung vorlag, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Bestimmung der zentralen Tendenz durchgeführt. Der Kruskal-Wallis-Test als nichtparametrisches Verfahren wurde als Alternative genutzt, wenn keine Normalverteilung vorlag.

Häufigkeiten und Zusammenhänge wurden mithilfe des Pearson-Chi-Quadrat-Tests analysiert. Zur Abschätzung des Gesamtüberlebens und des Progressionsfreien Überlebens wurde die Kaplan-Meier-Methode angewandt (95). Vergleiche zwischen den verschiedenen Gruppen erfolgten mittels log-rank Test.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Gesamtes Patientenkollektiv

Insgesamt wurden die Daten von 200 Patienten ausgewertet, welche im Zeitraum 1992-2017 an verschiedenen Standorten der Charité Universitätsmedizin Berlin betreut wurden. Als Einschlusskriterien wurden der Nachweis eines Multiplen Myeloms (n=194), eines Plasmozytoms (n=5) oder einer primären Plasmazelleukämie (n=1) gewählt. Die molekulargenetische Analyse des Polymorphismus G870A wurden zusätzlich zu den 200 eingeschlossenen Patienten auch an Blutproben gesunder Stammzellspender (n=72) durchgeführt. Von den 200 untersuchten Patienten waren 61 (30,5 %) homozygot für Allelvariante G, 20 Patienten (10,5 %) waren homozygot für Allelvariante A und 119 Patienten (59,5 %) waren heterozygot an Position 870 im *CCND1*-Gen.

#### 3.1.1 Patientencharakteristika

##### 3.1.1.1 Geschlecht

Von 200 untersuchten Patienten waren 61 weiblich (30,5 %) und 139 männlich (69,5 %). Tabelle 10 zeigt die Geschlechterverteilung auf die Gruppen GG, AA und AG. Unterschiede zwischen diesen Gruppen bzgl. der Geschlechterverteilung erwiesen sich als nicht statistisch signifikant ( $p=0,991$ ).

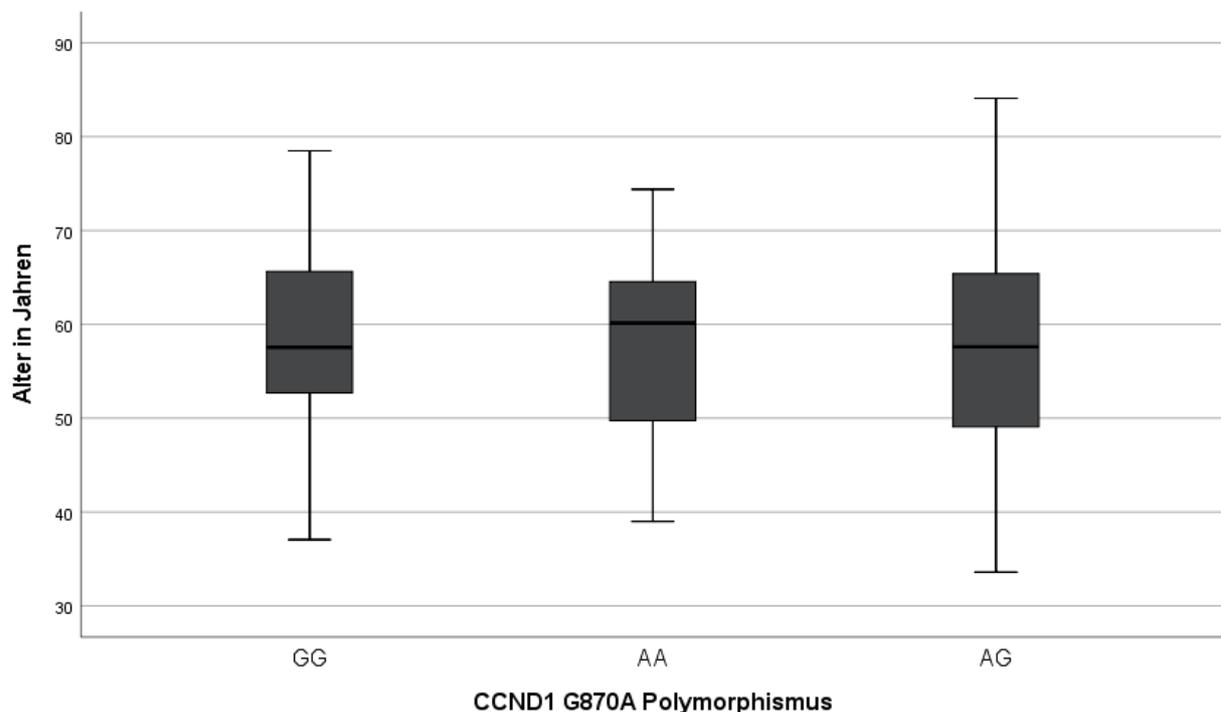
**Tabelle 10:** Geschlecht

	<b>weiblich</b>	<b>männlich</b>
<b>GG (n=61)</b>	19 (31,1 %)	42 (68,9 %)
<b>AA (n=20)</b>	6 (30,0 %)	14 (70,0 %)
<b>AG (n=119)</b>	36 (30,3 %)	83 (69,7 %)

##### 3.1.1.2 Alter bei Erstdiagnose

Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag bei 58 Jahren (Spanne: 34 – 84 Jahre). Für das gesamte Patientenkollektiv zeigte sich bei Überprüfung durch den Shapiro-Wilk-Test eine Normalverteilung ( $p=0,09$ ). Patienten, die homozygot die Allelvariante G tragen, waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose im Median 58 Jahre alt, Patienten

mit homozygotem Status für die Allelvariante A waren im Median 60 Jahre und heterozygote Patienten 58 Jahre alt. Bei Überprüfung durch den Shapiro-Wilk-Test zeigte sich für die Gruppen GG und AA eine Normalverteilung, jedoch nicht für Gruppe AG ( $p=0,371$ ;  $p=0,181$  und  $p=0,046$  respektive). In der anschließenden Durchführung eines nichtparametrischen Tests zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Medianen der jeweiligen Gruppen ( $p=0,837$ ). Abbildung 5 zeigt die Altersverteilung in den Gruppen anhand eines Boxplots.



Legende: x-Achse: *CCND1* G870A Polymorphismus, y-Achse: Alter in Jahren

**Abbildung 5:** Alter bei Erstdiagnose

### 3.1.1.3 Risikostratifizierung nach Genetik

Als Grundlage der Risikostratifizierung dienten genetische Aberrationen, für die ein erhöhtes Risiko für einen ungünstigeren Krankheitsverlauf nachgewiesen werden konnte (vgl. Tabelle 4). Dementsprechend wurden 112 Patienten (56,0 %) einem Standardrisiko zugeordnet, 54 Patienten (27,0 %) wurden als Hochrisikogruppe klassifiziert. In 34 Fällen (17,0 %) lagen keine Angaben zur Genetik vor. Bezogen auf die Gesamtheit der Patienten, zu denen Informationen vorlagen ( $n=166$ ) betrug der Anteil der Patienten mit Hochrisikoaberrationen 32,5 % ( $n=54$ ). Tabelle 11 zeigt die genetische Risikostratifizierung für

diese 166 Patienten, aufgeteilt nach Gruppe GG, AA und AG. Unterschiede zwischen diesen Gruppen in Bezug auf die genetische Risikostratifizierung erwiesen sich als nicht statistisch signifikant ( $p=0,193$ ).

**Tabelle 11:** Risikostratifizierung nach Genetik

	<b>Standardrisiko</b>	<b>Hochrisiko</b>
<b>GG (n=48)</b>	32 (66,7 %)	16 (33,3 %)
<b>AA (n=16)</b>	14 (87,5 %)	2 (12,5 %)
<b>AG (n=102)</b>	66 (64,7 %)	36 (35,3 %)

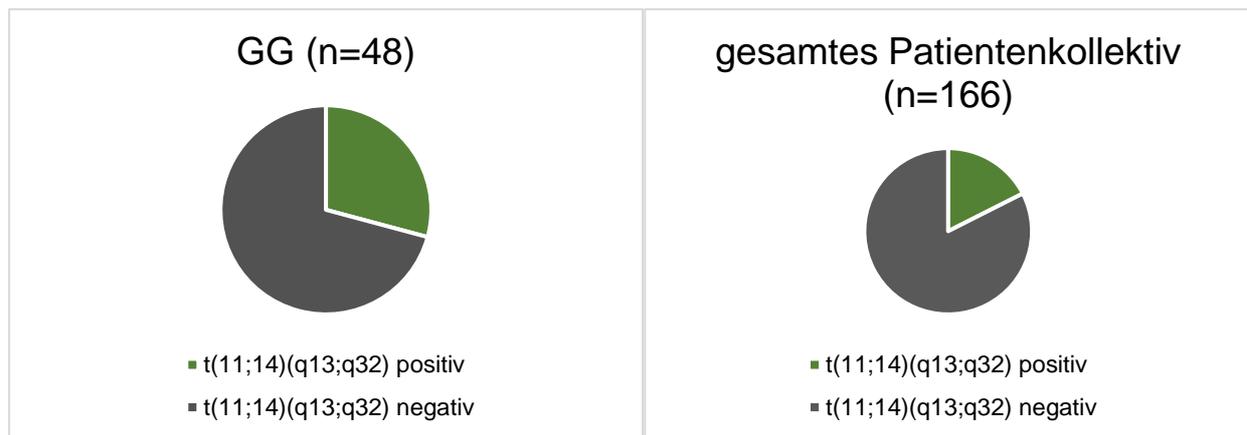
### 3.1.1.4 Translokation t(11;14)(q13;32)

Die Translokation t(11;14)(q13;32) konnte bei 29 Patienten (14,5 %) nachgewiesen werden. In 137 Fällen (68,5 %) lag die Translokation nicht vor, über 34 Patienten (17,0 %) konnte aufgrund fehlender genetischer Daten keine Angabe bzgl. des Vorliegens der Translokation gemacht werden.

Tabelle 12 zeigt die Häufigkeit der untersuchten Translokation für die 166 Patienten, zu denen Informationen vorlagen, aufgeteilt nach Gruppe GG, AA und AG. Unterschiede zwischen den Gruppen bezogen auf die Häufigkeit der Translokation erwiesen sich als statistisch signifikant ( $p=0,031$ ). Der Anteil der t(11;14)-positiven Patienten fiel dabei in Gruppe GG mit 29,2 % deutlich höher aus als im gesamten Patientenkollektiv (17,5 %), wie Abbildung 6 veranschaulicht. Aufgrund der kleinen Fallzahlen in Gruppe AA wurden anschließend lediglich die Gruppen GG (n=48) und AG (n=102) gegeneinander getestet. Hier ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Polymorphismusvariante und dem Auftreten der Translokation t(11;14)( $p=0,024$ ).

**Tabelle 12:** Translokation t(11;14)(q13;q32)

	<b>GG</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>
<b>t(11;14)(q13;q32) positiv (n=29)</b>	14 (48,3 %)	1 (3,4 %)	14 (48,3 %)
<b>t(11;14)(q13;q32) negativ (n=137)</b>	34 (24,8 %)	15 (11,0 %)	88 (64,2 %)

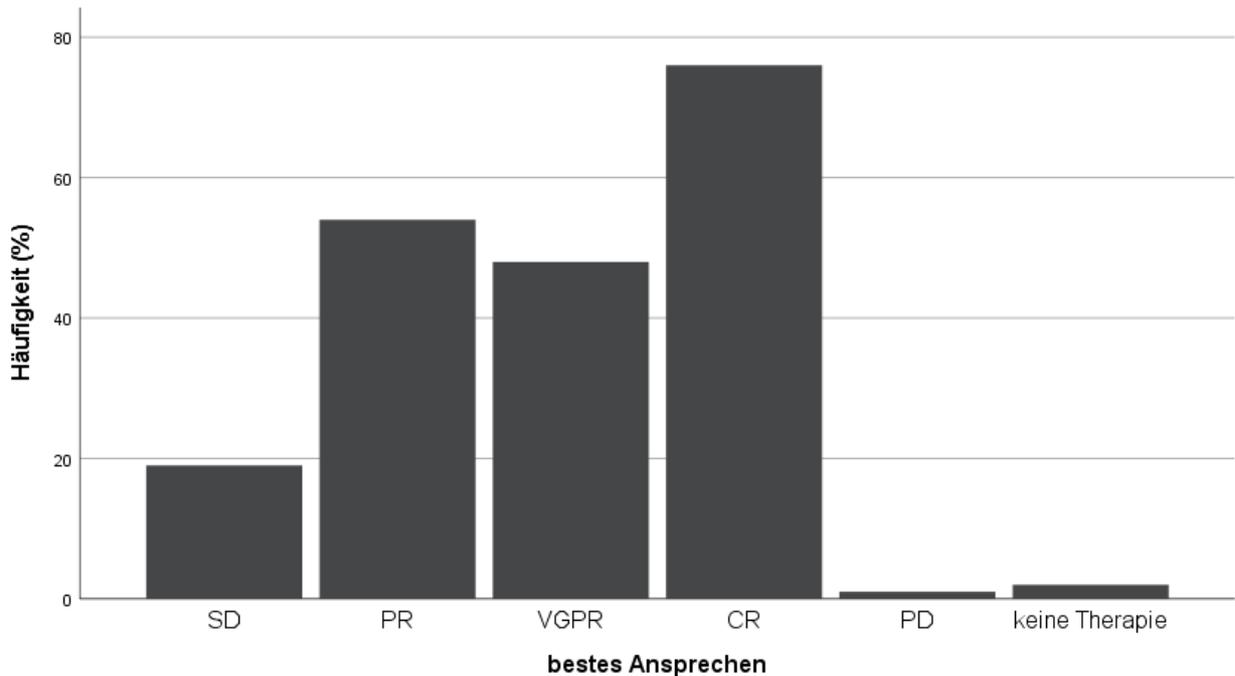


**Abbildung 6:** Translokation t(11;14)(q13;q32) – Vergleich Gruppe GG mit gesamtem Patientenkollektiv

### 3.1.2 Klinischer Verlauf

#### 3.1.2.1 Therapieansprechen

Für die Untersuchung des Therapieansprechens wurde das beste jemals erzielte Ergebnis einer im Beobachtungszeitraum durchgeführten Therapie berücksichtigt. Eine komplette Remission erreichten 76 (38,0 %), eine sehr gute partielle Remission 48 (24,0 %) und eine partielle Remission 54 Patienten (27,0 %), hingegen kam es in einem Fall (0,5 %) zum Progress der Erkrankung ohne Therapieansprechen im Beobachtungszeitraum. Weiterhin konnte bei 19 Patienten (9,5 %) lediglich eine stabile Erkrankung erreicht werden, zwei Patienten (1,0 %) erhielten zu keinem Zeitpunkt eine Therapie ihrer Erkrankung. Visualisiert sind diese Ergebnisse in Abbildung 7; Tabelle 13 zeigt die Verteilung der Kategorien auf die Gruppen GG, AA und AG.



Legende: SD= stabile Erkrankung, PR= partielle Remission, VGPR= sehr gute partielle Remission, CR= komplette Remission, PD= Progress; x-Achse: bestes Ansprechen, y-Achse: Häufigkeit (%)

**Abbildung 7:** Therapieansprechen im Beobachtungszeitraum

**Tabelle 13:** Therapieansprechen im Beobachtungszeitraum

	SD	PR	VGPR	CR	PD	keine Therapie
<b>GG (n=61)</b>	5 (8,2 %)	16 (26,2 %)	19 (31,1 %)	21 (34,4 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
<b>AA (n=20)</b>	1 (5,0 %)	8 (40,0 %)	2 (10,0 %)	9 (45,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
<b>AG (n=119)</b>	13 (10,9 %)	30 (25,2 %)	27 (22,7 %)	46 (38,7 %)	1 (0,8 %)	2 (1,7 %)

Legende: SD= stabile Erkrankung, PR= partielle Remission, VGPR= sehr gute partielle Remission, CR= komplette Remission, PD= Progress

### 3.1.2.2 Erreichen einer klinischen Remission

Insgesamt 178 Patienten (89,0 %) erzielten zu mindestens einem Zeitpunkt im Beobachtungszeitraum eine Remission, definiert als partielle Remission (PR), sehr gute partielle

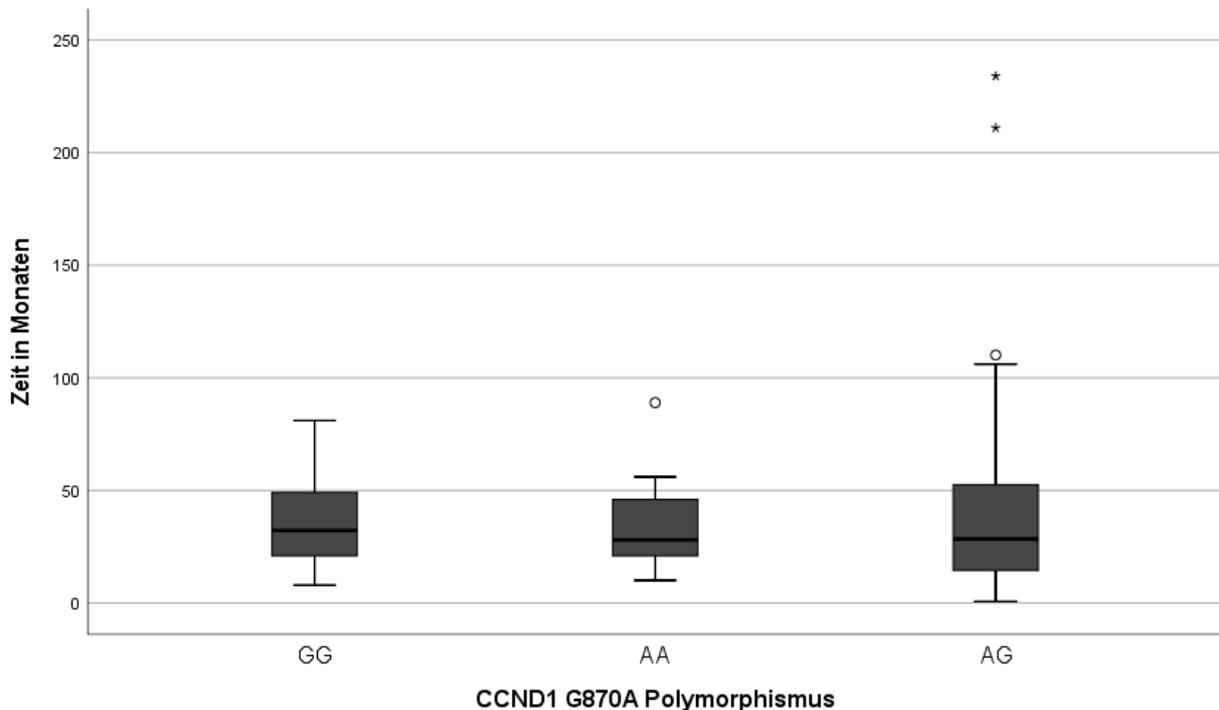
Remission (VGPR) oder komplette Remission (CR) nach klinischen Kriterien. Diese Ereignisse verteilen sich folgendermaßen: 56 Patienten (91,8 %) in Gruppe GG, 19 Patienten (95,0 %) in Gruppe AA, 103 Patienten (86,6 %) in Gruppe AG. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf den relativen Anteil innerhalb der jeweiligen Gruppe. Unterschiede zwischen diesen Gruppen in Bezug auf den Anteil an Patienten mit klinischer Remission erwiesen sich als nicht statistisch signifikant ( $p=0,377$ ).

### 3.1.2.3 Zeit bis zum 1. Rezidiv

Bei einem großen Teil der Patienten ( $n=127$ ; 63,5 %) kam es mindestens zu einem Zeitpunkt im Krankheitsverlauf zum Progress oder zum Auftreten eines Rezidivs. Die Zeit bis zur Detektion des ersten Rezidivs oder Krankheitsprogresses in diesem Patientenkollektiv betrug im Median 29 Monate ab Erstdiagnose (Spanne: 1-234). Tabelle 14 beinhaltet Informationen zur Anzahl der rezidierten Patienten pro Gruppe sowie zur jeweiligen medianen Zeit bis zum 1. Rezidiv. Abbildung 8 zeigt die Zeit bis zum 1. Rezidiv in jeder Gruppe als Boxplot. Für die Gesamtheit der rezidierten Patienten ( $n=127$ ) zeigte sich bzgl. der Zeit bis zum 1. Rezidiv keine Normalverteilung ( $p<0,05$ ). Unterschiede zwischen den Medianen der Gruppen waren nicht statistisch signifikant ( $p=0,560$ ).

**Tabelle 14:** Zeit bis zum 1. Rezidiv

	<b>Patienten mit mind. einem Rezidiv (%)</b>	<b>mediane Zeit bis zum 1. Rezidiv (in Monaten)</b>
<b>GG (n=61)</b>	38 (62,3 %)	32,2
<b>AA (n=20)</b>	13 (65,0 %)	28,0
<b>AG (n=119)</b>	76 (63,9 %)	28,5

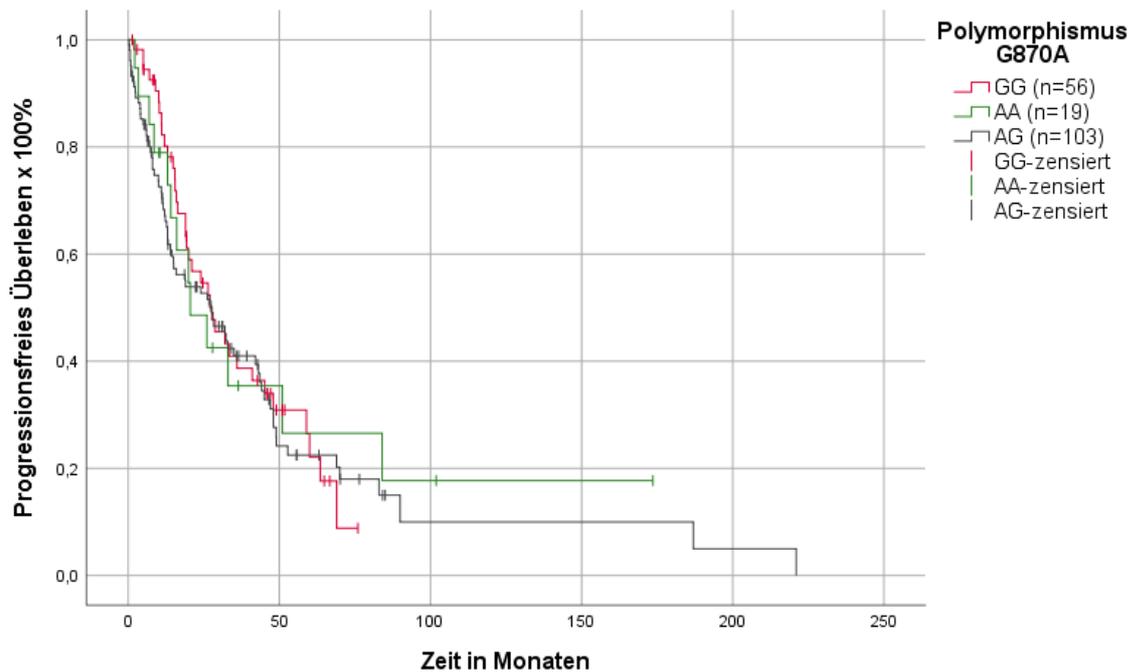


Legende: x-Achse: CCND1 G870A Polymorphismus, y-Achse: Zeit in Monaten

**Abbildung 8:** Zeit bis zum 1. Rezidiv

### 3.1.2.4 Progressionsfreies Überleben

Das Progressionsfreie Überleben ist definiert als Zeitraum vom Diagnosezeitpunkt der Remission bis zum Diagnosezeitpunkt des darauffolgenden Rezidivs und konnte demnach für diejenigen Patienten errechnet werden, die sich im Krankheitsverlauf zumindest einmal in Remission befanden (n=178). Insgesamt kam es bei 120 Patienten (67,4 %) im Beobachtungszeitraum zu einem Rezidiv im Anschluss an die Remission. Diese Ereignisse verteilen sich folgendermaßen: 36 Patienten (64,3 %) in Gruppe GG, 13 Patienten (68,4 %) in Gruppe AA, 71 Patienten (68,9 %) in Gruppe AG. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf den relativen Anteil innerhalb der jeweiligen Gruppe. Abbildung 9 zeigt die Kaplan-Meier-Analyse für das Progressionsfreie Überleben. Zensiert wurden Patienten, die nicht im Beobachtungszeitraum rezidierten und deren Beobachtungszeitraum kürzer war als die längste beobachtete progressionsfreie Zeit. Im Vergleich der Gruppen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Progressionsfreien Überlebens (vgl. Tabelle 15).



Legende: x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: Progressionsfreies Überleben x 100 %

**Abbildung 9:** Progressionsfreies Überleben

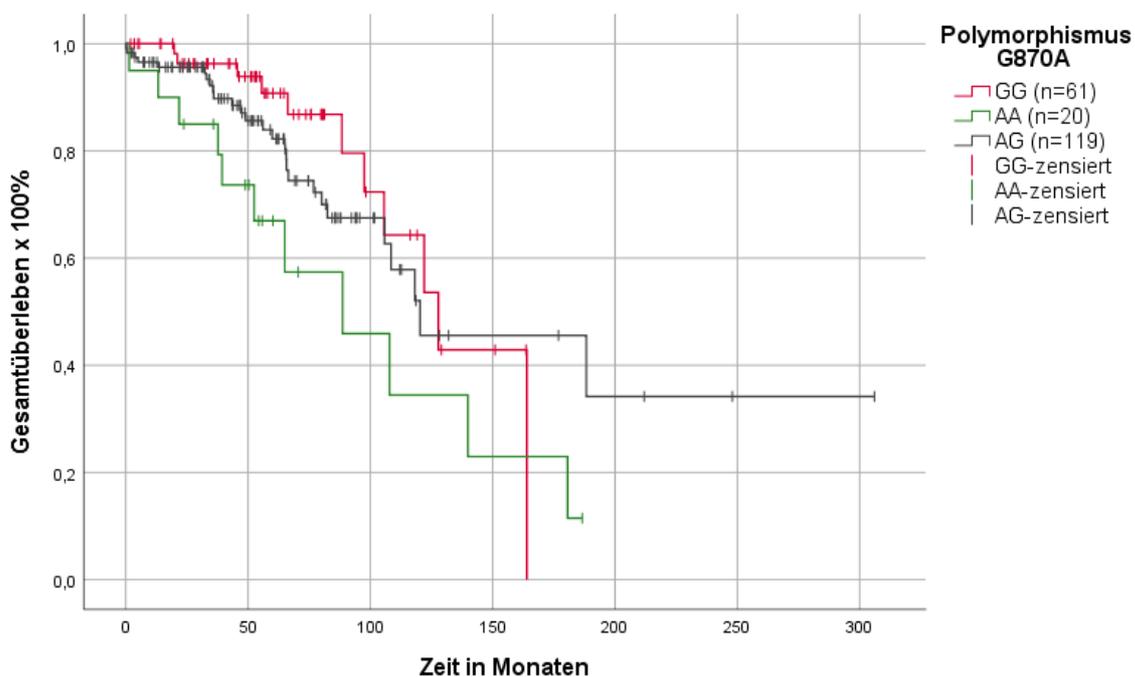
**Tabelle 15:** Progressionsfreies Überleben - paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen

		GG		AA		AG	
		Chi-Quadrat	Signifikanz	Chi-Quadrat	Signifikanz	Chi-Quadrat	Signifikanz
<b>Log Rank</b>	<b>GG</b>			0,011	0,915	0,261	0,610
	<b>AA</b>	0,011	0,915			0,188	0,664
	<b>AG</b>	0,261	0,610	0,188	0,664		

### 3.1.2.5 Gesamtüberleben

Der Beobachtungszeitraum aller Patienten umfasste im Median 52 Monate, wobei die individuellen Fälle mit Beobachtungszeiträumen zwischen 0 und 306 Monaten stark variierten. Die Beobachtungszeit in Monaten war für keine der drei Gruppen normalverteilt, wie eine Überprüfung mit dem Shapiro-Wilk-Test ergab ( $p < 0,05$ ). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den medianen Beobachtungszeiträumen der Gruppen ( $p = 0,313$ ).

Insgesamt sind im Beobachtungszeitraum 49 Patienten (24,5 %) verstorben. Die Todesfälle verteilen sich wie folgt: 11 Patienten (18,0 %) in Gruppe GG, 11 Patienten (55,0 %) in Gruppe AA, 27 Patienten (22,7 %) in Gruppe AG. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf den relativen Anteil innerhalb der jeweiligen Gruppe. Abbildung 10 zeigt die Kaplan-Meier-Analyse für das Gesamtüberleben. Zensiert wurden Patienten, die nicht im Beobachtungszeitraum verstarben und deren Beobachtungszeitraum vor dem des am längsten beobachteten Patienten endete. Im Vergleich der Gruppen zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied bzgl. des Gesamtüberlebens zwischen Gruppe AA und Gruppe AG (vgl. Tabelle 16).



Legende: x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: Gesamtüberleben x 100 %

**Abbildung 10:** Gesamtüberleben

**Tabelle 16:** Gesamtüberleben – paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen

		GG		AA		AG	
		Chi-Quadrat	Signifikanz	Chi-Quadrat	Signifikanz	Chi-Quadrat	Signifikanz
Log Rank	GG			3,257	0,071	0,669	0,413
	AA	3,257	0,071			4,064	<b>0,044</b>
	AG	0,669	0,413	4,064	<b>0,044</b>		

## 3.2 Patienten mit allogener Stammzelltransplantation

Von den 200 Patienten erhielten 73 im Laufe ihrer Erkrankung eine allogene Stammzelltransplantation. Für 72 Spender dieser allogenen Stammzelltransplantationen konnte der *CCND1* Polymorphismus G870A untersucht werden, weshalb sich die folgenden Analysen auf 72 Patienten beziehen. In dieser Stichprobe waren 18 Patienten (25,0 %) homozygot für Allelvariante G, 10 Patienten (13,9 %) waren homozygot für Allelvariante A und 44 Patienten (61,1 %) waren heterozygot für den Polymorphismus. Eine ähnliche Verteilung ließ sich auch im Kollektiv der gesunden Spender finden: hier waren 24 Personen (33,3 %) homozygot für Allelvariante G, 10 Personen (13,9 %) waren homozygot für Allelvariante A und 38 Personen (52,8 %) waren heterozygot. Im Folgenden wird ebenso wie für das gesamte Patientenkollektiv auf Patientencharakteristika und Verlaufsparemeter eingegangen, darüber hinaus wird ein möglicher Einfluss des Spenderpolymorphismus auf den Krankheitsverlauf der transplantierten Patienten untersucht.

### 3.2.1 Patientencharakteristika

#### 3.2.1.1 Geschlecht

Von den 72 Patienten waren 17 weiblich (23,6 %) und 55 männlich (76,4 %). Tabelle 17 zeigt die Geschlechterverteilung auf die Gruppen GG, AA und AG. Eine Prüfung dieser Ergebnisse auf statistische Signifikanz war nicht möglich, da die erwartete Häufigkeit in zwei Zellen weniger als 5 betrug.

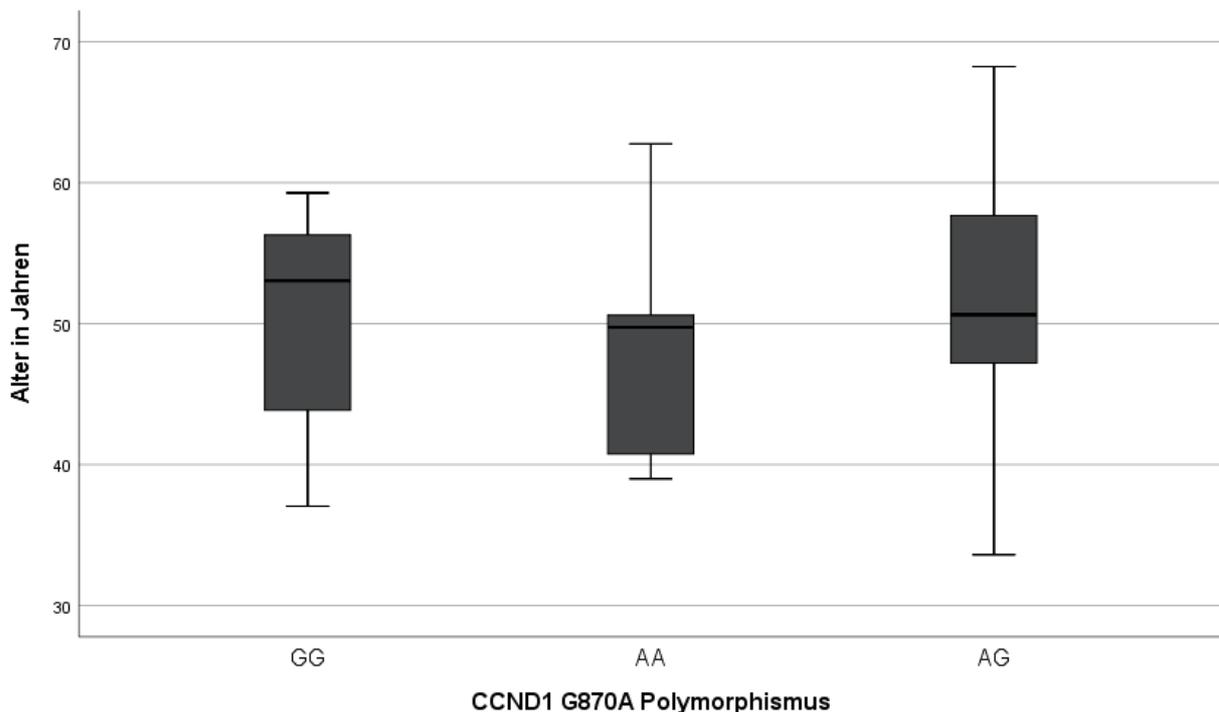
**Tabelle 17:** Geschlecht (alloSZT)

	<b>weiblich</b>	<b>männlich</b>
<b>GG (n=18)</b>	6 (33,3 %)	12 (66,7 %)
<b>AA (n=10)</b>	3 (30,0 %)	7 (70,0 %)
<b>AG (n=44)</b>	8 (18,2 %)	36 (81,8 %)

#### 3.2.1.2 Alter bei Erstdiagnose

Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag in dieser Stichprobe bei 51 Jahren (Spanne: 34-68 Jahre). Bei Überprüfung durch den Shapiro-Wilk-Test zeigte sich eine Normalverteilung ( $p=0,486$ ). Patienten, die homozygot die Allelvariante G tragen, waren

zum Zeitpunkt der Erstdiagnose im Median 53 Jahre alt, Patienten mit homozygotem Status für die Allelvariante A waren im Median 50 Jahre alt und heterozygote Patienten 51 Jahre. Bei Überprüfung durch den Shapiro-Wilk-Test zeigte sich für die Gruppen AA und AG eine Normalverteilung, jedoch nicht für Gruppe GG ( $p=0,094$ ;  $p=0,667$  und  $p=0,046$  respektive). In der anschließenden Durchführung eines nichtparametrischen Tests zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Medianen der jeweiligen Gruppen ( $p=0,061$ ). Abbildung 11 zeigt die Altersverteilung in den Gruppen anhand eines Boxplots.



Legende: x-Achse: CCND1 G870A Polymorphismus, y-Achse: Alter in Jahren

**Abbildung 11:** Alter bei Erstdiagnose (alloSZT)

### 3.2.1.3 Risikostratifizierung nach Genetik

Als Grundlage der Risikostratifizierung dienten die in Abschnitt 3.1.3 dargelegten Kriterien. Entsprechend dieser Definition wurden 48 Patienten (66,7 %) einem Standardrisiko zugeordnet, 18 Patienten (25,0 %) wurden als Hochrisikogruppe klassifiziert. In 6 Fällen (8,3 %) lagen keine Angaben zur Genetik vor. Tabelle 18 zeigt die genetische Risikostratifizierung für die 66 Patienten, zu denen Informationen vorlagen, aufgeteilt nach Gruppe

GG, AA und AG. Eine Prüfung dieser Ergebnisse auf statistische Signifikanz war nicht möglich, da die erwartete Häufigkeit in zwei Zellen weniger als 5 betrug.

**Tabelle 18:** Risikostratifizierung nach Genetik (alloSZT)

	<b>Standardrisiko</b>	<b>Hochrisiko</b>
<b>GG (n=16)</b>	11 (68,8 %)	5 (31,3 %)
<b>AA (n=9)</b>	7 (77,8 %)	2 (22,2 %)
<b>AG (n=41)</b>	30 (73,2 %)	11 (26,8 %)

### 3.2.1.4 Translokation t(11;14)(q13;32)

Die Translokation t(11;14)(q13;32) konnte bei 13 Patienten (18,1 %) in dieser Stichprobe nachgewiesen werden. In 53 Fällen (73,6 %) lag die Translokation nicht vor, über 6 Patienten (8,3 %) konnte aufgrund fehlender genetischer Daten keine Angabe bzgl. des Vorliegens der Translokation gemacht werden.

Tabelle 19 zeigt die Häufigkeit der untersuchten Translokation für die 66 Patienten, zu denen Informationen vorlagen, aufgeteilt nach Gruppe GG, AA und AG. Eine Prüfung dieser Ergebnisse auf statistische Signifikanz war nicht möglich, da die erwartete Häufigkeit in zwei Zellen weniger als 5 betrug.

**Tabelle 19:** Translokation t(11;14)(q13;q32) (alloSZT)

	<b>t(11;14)(q13;q32) positiv</b>	<b>t(11;14)(q13;q32) negativ</b>
<b>GG (n=16)</b>	7 (43,8 %)	9 (56,3 %)
<b>AA (n=9)</b>	0 (0,0 %)	9 (100 %)
<b>AG (n=41)</b>	6 (13,7 %)	35 (86,3 %)

## 3.2.2 Klinischer Verlauf

### 3.2.2.1 Therapieansprechen

Für die Untersuchung des Therapieansprechens wurde das beste jemals erzielte Ergebnis einer im Beobachtungszeitraum durchgeführten Therapie berücksichtigt. Eine komplette Remission erreichten 38 Patienten (52,8 %), eine sehr gute partielle Remission 11

(15,3 %) und eine partielle Remission 21 Patienten (29,2 %). In zwei Fällen (2,8 %) konnte lediglich eine stabile Erkrankung erzielt werden. Tabelle 20 zeigt die Verteilung der Kategorien auf die Gruppen GG, AA und AG.

**Tabelle 20:** Therapieansprechen im Beobachtungszeitraum (alloSZT)

	<b>SD</b>	<b>PR</b>	<b>VGPR</b>	<b>CR</b>
<b>GG (n=18)</b>	0 (0,0 %)	5 (27,7 %)	4 (22,2 %)	9 (50,0 %)
<b>AA (n=10)</b>	0 (0,0 %)	4 (40,0 %)	0 (0,0 %)	6 (60,0 %)
<b>AG (n=44)</b>	2 (4,5 %)	12 (27,3 %)	7 (15,9 %)	23 (52,3 %)

Legende: SD= stabile Erkrankung, PR= partielle Remission, VGPR= sehr gute partielle Remission, CR= komplette Remission

### 3.2.2.2 Erreichen einer klinischen Remission

Insgesamt 70 Patienten (97,2 %) erzielten zu mindestens einem Zeitpunkt im Beobachtungszeitraum eine Remission, definiert als partielle Remission (PR), sehr gute partielle Remission (VGPR) oder komplette Remission (CR) nach klinischen Kriterien. Diese Ereignisse verteilen sich folgendermaßen: 18 Patienten (100 %) in Gruppe GG, 10 Patienten (100 %) in Gruppe AA, 42 Patienten (95,5 %) in Gruppe AG. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf den relativen Anteil innerhalb der jeweiligen Gruppe. Eine Prüfung dieser Ergebnisse auf statistische Signifikanz war nicht möglich, da die erwartete Häufigkeit in drei Zellen weniger als 5 betrug.

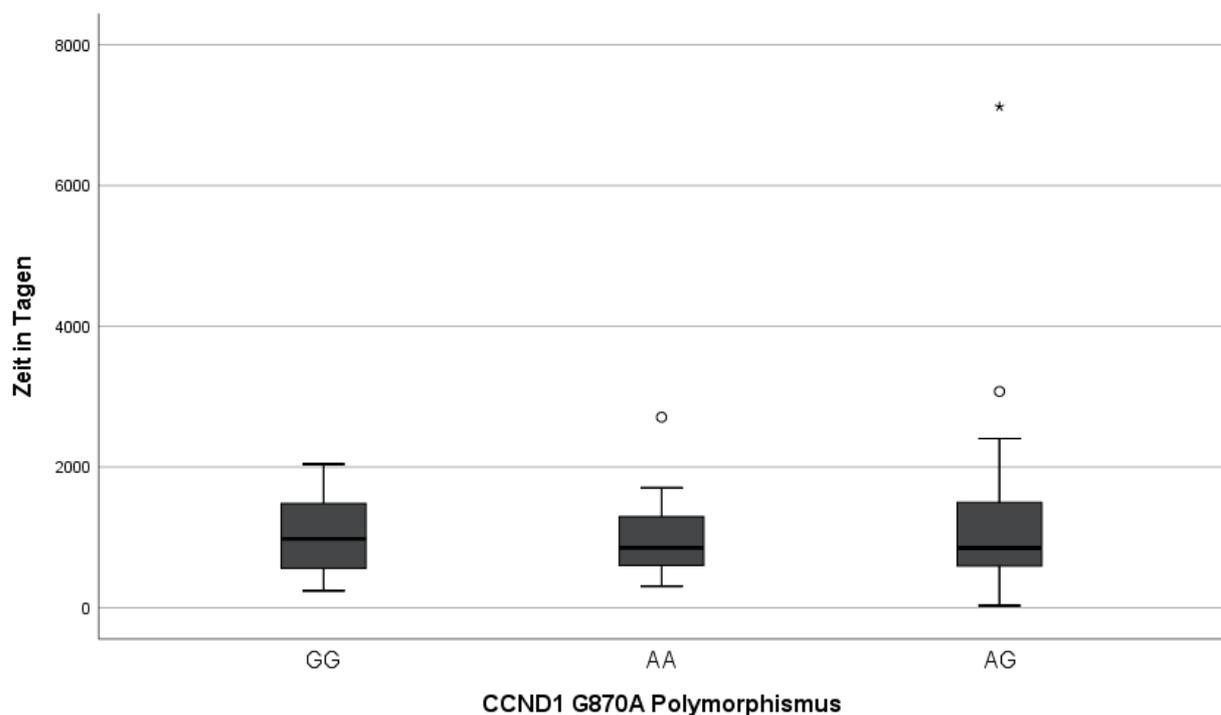
### 3.2.2.3 Zeit bis zum 1. Rezidiv

Von 72 untersuchten Patienten erlitten 58 (80,6 %) mindestens zu einem Zeitpunkt im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv oder einen Progress ihrer Erkrankung. Die Zeit bis zur Detektion des ersten Rezidivs oder Krankheitsprogresses in diesem Patientenkollektiv betrug im Median 867 Tage ab Erstdiagnose (Spanne: 30-7121 Tage). Tabelle 21 zeigt die Anzahl der rezidierten Patienten pro Gruppe sowie die jeweilige mediane Zeit bis zum 1. Rezidiv. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf den relativen Anteil

innerhalb der jeweiligen Gruppe. Abbildung 12 zeigt die Zeit bis zum 1. Rezidiv in jeder Gruppe als Boxplot. Für die Gesamtheit der rezidierten Patienten (n=58) zeigte sich bzgl. der Zeit bis zum 1. Rezidiv keine Normalverteilung ( $p < 0,01$ ), für die Untergruppen GG (n=16) und AA (n=7) konnte eine Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test nachgewiesen werden ( $p = 0,626$  respektive  $p = 0,102$ ). In einem nichtparametrischen Test zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Medianen der Gruppen ( $p = 0,810$ ).

**Tabelle 21:** Zeit bis zum 1. Rezidiv (alloSZT)

	Patienten mit mind. einem Rezidiv (%)	mediane Zeit bis zum 1. Rezidiv (in Tagen)
<b>GG</b>	16 (88,9 %)	978
<b>AA</b>	7 (70,0 %)	853
<b>AG</b>	35 (79,5 %)	851

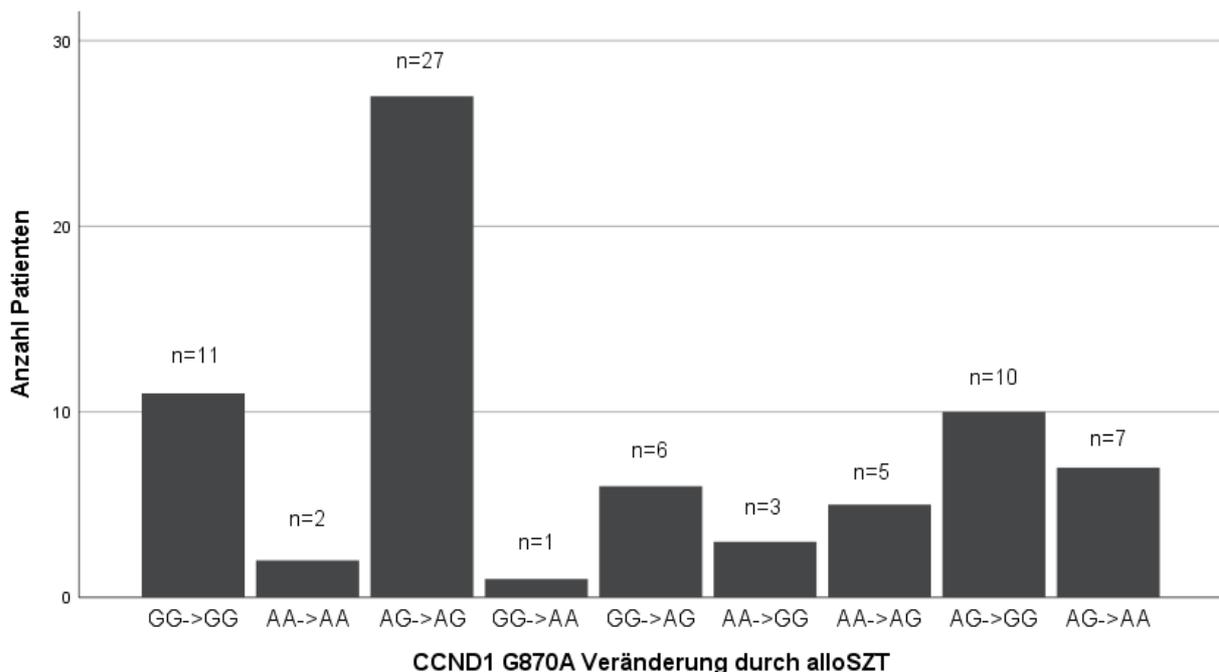


Legende: x-Achse: CCND1 G870A Polymorphismus, y-Achse: Zeit in Tagen

**Abbildung 12:** Zeit bis zum 1. Rezidiv (alloSZT)

### 3.2.2.4 CCND1 Polymorphismus G870A nach alloSZT

Bei 32 Patienten (44,4 %) unterschied sich die Ausprägung des Polymorphismus G870A im *CCND1*-Gen von der ihres gesunden Spenders. Eine detaillierte Übersicht über die Veränderung dieses genetischen Merkmals in den transplantierten Stammzellen bietet Abbildung 13.



Legende: x-Achse: *CCND1* G870A Veränderung durch alloSZT, y-Achse: Anzahl Patienten

**Abbildung 13:** Veränderung im *CCND1* Polymorphismus G870A durch alloSZT

### 3.2.2.5 Rezidiv nach alloSZT

Im Anschluss an die alloSZT kam es bei 39 (54,2 %) Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraums zum Rezidiv. Die mediane Zeit bis zum Rezidiv betrug in diesem Kollektiv 13,6 Monate (Spanne: 1-221) und zeigte im Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung ( $p < 0,001$ ).

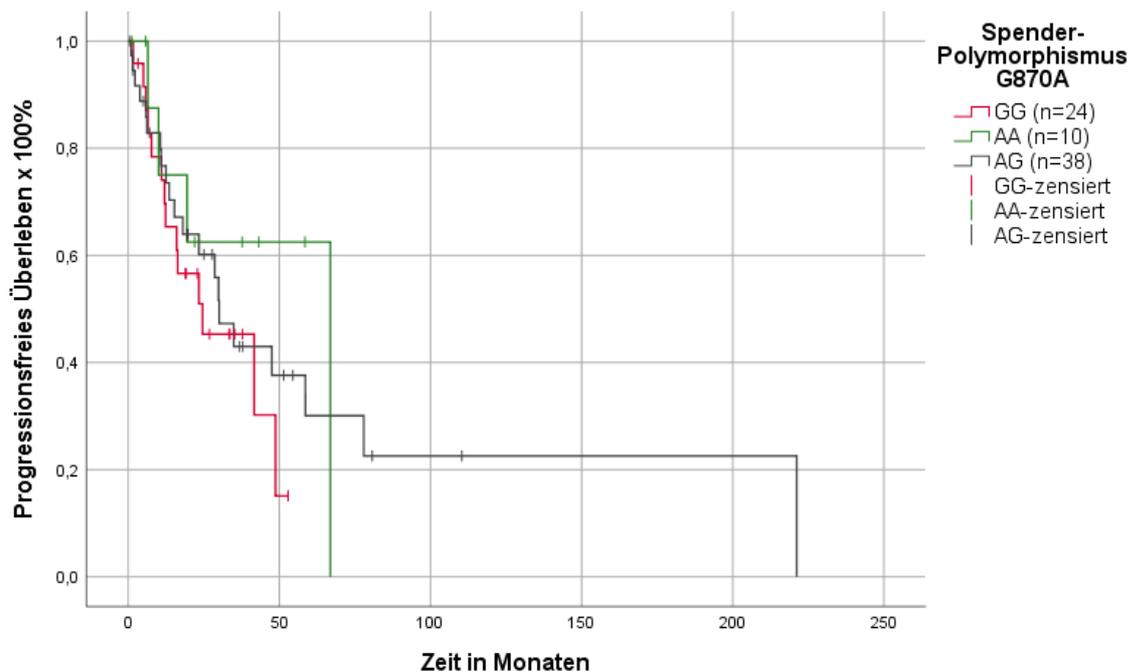
Tabelle 22 bildet die Häufigkeit der Rezidive und mediane Zeit bis zum Rezidiv ab. Die Einteilung der Gruppen erfolgte hier nach Polymorphismus G870A der gesunden Spender. In einem nichtparametrischen Test zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bzgl. der medianen Zeit bis zum Rezidiv ( $p = 0,857$ ).

**Tabelle 22:** Rezidiv nach alloSZT

	Patienten mit mind. einem Rezidiv (%)	mediane Zeit bis zum Rezidiv (in Monaten)
<b>GG (n=24)</b>	14 (58,3 %)	12,2
<b>AA (n=10)</b>	4 (40,0 %)	14,8
<b>AG (n=38)</b>	21 (55,3 %)	15,3

### 3.2.3 Progressionsfreies Überleben nach alloSZT

Das Progressionsfreie Überleben nach alloSZT beschreibt die Zeit von der Durchführung der alloSZT bis zum Auftreten eines Rezidivs innerhalb des Beobachtungszeitraums. Abbildung 14 zeigt die Kaplan-Meier-Analyse für das Progressionsfreie Überleben in diesem Patientenkollektiv. Die Einteilung der Patienten in Gruppen erfolgte nach Polymorphismus G870A der gesunden Spender. Angaben zur Gruppengröße und zur Anzahl der Rezidive pro Gruppe sind Tabelle 22 zu entnehmen. Zensiert wurden Patienten, die nicht im Beobachtungszeitraum rezidierten und deren Beobachtungszeitraum kürzer war als die längste beobachtete progressionsfreie Zeit. Im Vergleich der Gruppen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Progressionsfreien Überlebens (vgl. Tabelle 23).



Legende: x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: Progressionsfreies Überleben x 100%

**Abbildung 14:** Progressionsfreies Überleben nach alloSZT

**Tabelle 23:** Progressionsfreies Überleben nach alloSZT – paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen

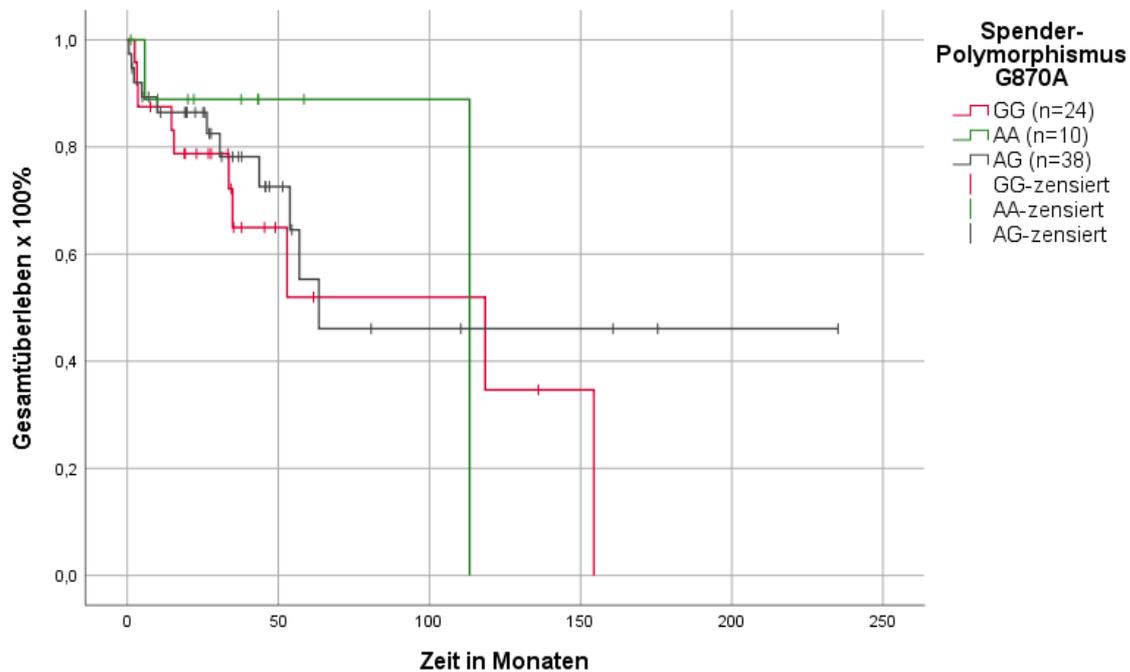
		GG		AA		AG	
		Chi- Quadrat	Signifikanz	Chi- Quadrat	Signifikanz	Chi- Quadrat	Signifikanz
<b>Log Rank</b>	<b>GG</b>			1,430	0,232	0,492	0,483
	<b>AA</b>	1,430	0,232			0,202	0,653
	<b>AG</b>	0,492	0,483	0,202	0,653		

### 3.2.4 Überleben nach alloSZT

Der Beobachtungszeitraum im Anschluss an die allogene Stammzelltransplantation umfasste im Median 31,0 Monate (Spanne: 1-235). Der Shapiro-Wilk-Test ergab keine Normalverteilung für die Gesamtheit der Stichprobe ( $p < 0,01$ ). Eine Einteilung in Gruppen erfolgte nach Polymorphismus der Spender. In einem nichtparametrischen Testverfahren zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den medianen Beobachtungszeiträumen der Gruppen ( $p = 0,873$ ).

#### 3.2.4.1 Spender-Polymorphismus

Das Überleben im Anschluss an die alloSZT wurde im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung durch den Polymorphismus der Spender untersucht. Hierzu erfolgte eine Einteilung der Patienten in Gruppen entsprechend des G870A-Polymorphismus ihrer gesunden Spender. Insgesamt sind im Beobachtungszeitraum 23 Patienten (31,9 %) verstorben. Die Todesfälle verteilen sich wie folgt: 10 Patienten (41,7 %) in Gruppe GG, 2 Patienten (20,0 %) in Gruppe AA, 11 Patienten (28,9 %) in Gruppe AG. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf den relativen Anteil innerhalb der jeweiligen Gruppe. Abbildung 15 zeigt die Kaplan-Meier-Analyse für das Überleben nach allogener Stammzelltransplantation. Zensiert wurden Patienten, die nicht im Beobachtungszeitraum verstarben und deren Beobachtungszeitraum vor dem des am längsten beobachteten Patienten endete. Beim Vergleich der Gruppen zeigte sich kein statistisch signifikantes Ergebnis bezüglich des Gesamtüberlebens (vgl. Tabelle 24).



Legende: x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: Überleben nach alloSZT x 100 %

**Abbildung 15:** Überleben nach alloSZT, Einflussgröße Spender-Polymorphismus

**Tabelle 24:** Überleben nach alloSZT, Spender-Polymorphismus – paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen

		GG		AA		AG	
		Chi-Quadrat	Signifikanz	Chi-Quadrat	Signifikanz	Chi-Quadrat	Signifikanz
<b>Log Rank</b>	<b>GG</b>			0,345	0,557	0,802	0,371
	<b>AA</b>	0,345	0,557			0,152	0,696
	<b>AG</b>	0,802	0,371	0,152	0,696		

### 3.2.4.2 Polymorphismus-Veränderung durch alloSZT

Weiterhin wurde das Überleben nach allogener Stammzelltransplantation auf eine mögliche Beeinflussung durch die Veränderung des Polymorphismus G870A im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantation untersucht. Die Patienten wurden hierzu wie folgt eingeteilt: Patienten, die Allelvariante A hinzugewannen (GG → AA/AG), wurden als Gruppe „+A“ klassifiziert. Umgekehrt wurden Patienten, die Allelvariante A verloren (AA/AG → GG) als Gruppe „-A“ klassifiziert. Die gleiche Analyse wurde anschließend für

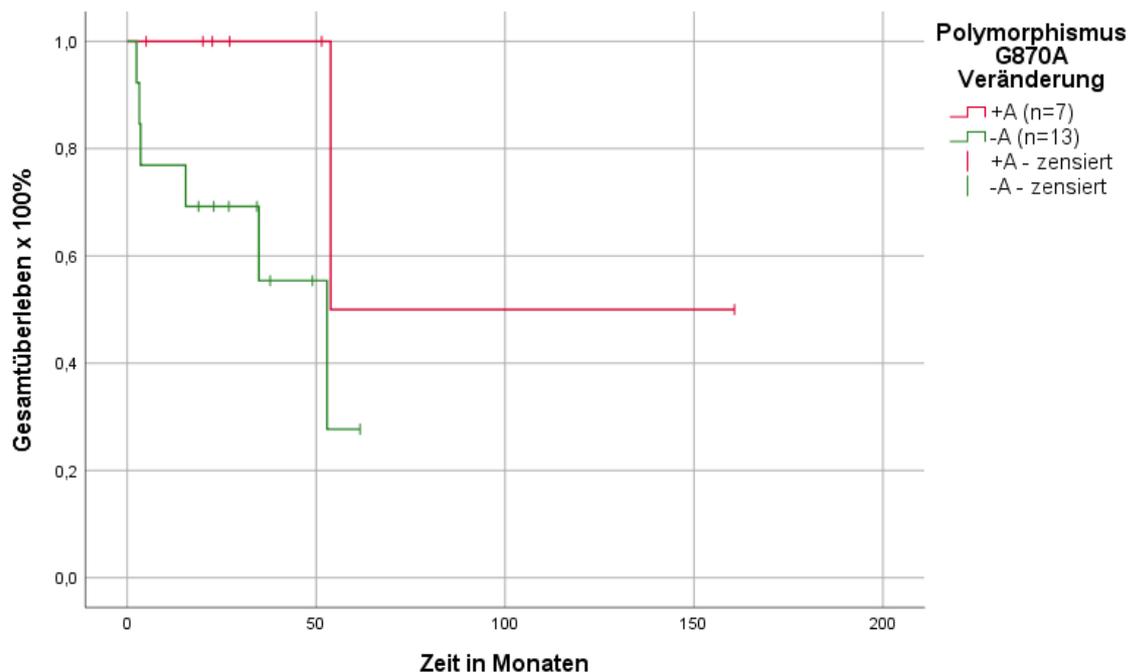
den Gewinn bzw. den Verlust der Allelvariante G durchgeführt (Gruppe „+G“ (AA → GG/AG) vs. Gruppe „-G“ (GG/AG → AA)). Angaben zu den Gruppengrößen und der Anzahl der Ereignisse pro Gruppe finden sich in den Tabellen 25 und 26. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen die Kaplan-Meier-Analysen für die Einflussgröße Polymorphismus-Veränderung. Zensiert wurden Patienten, die nicht im Beobachtungszeitraum verstarben und deren Beobachtungszeitraum vor dem des am längsten beobachteten Patienten endete.

**Tabelle 25:** Polymorphismus-Veränderung Allelvariante A

	Anzahl Patienten	Anzahl Ereignisse
<b>+A (GG → AA/AG)</b>	7	1
<b>-A (AA/AG → GG)</b>	13	6

**Tabelle 26:** Polymorphismus-Veränderung Allelvariante G

	Anzahl Patienten	Anzahl Ereignisse
<b>+G (AA → GG/AG)</b>	8	4
<b>-G (GG/AG → AA)</b>	8	1

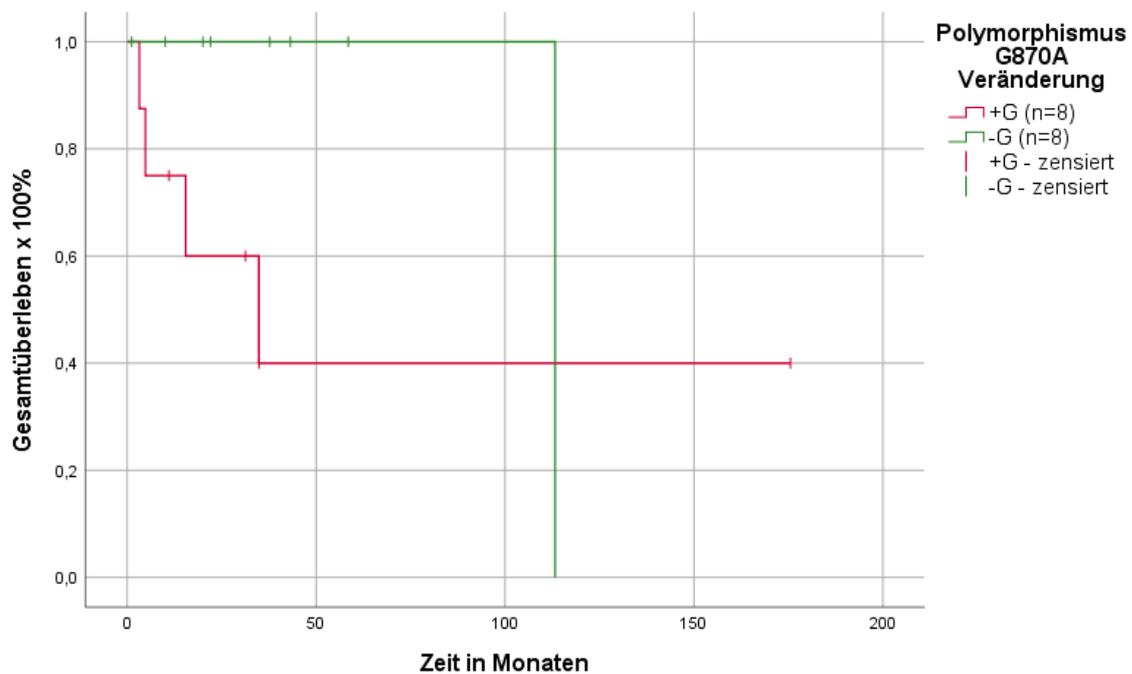


Legende: x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: Überleben x 100 %

**Abbildung 16:** Überleben nach alloSZT, Polymorphismus-Veränderung Allelvariante A

**Tabelle 27:** Überleben nach alloSZT, Polymorphismus-Veränderung A – paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen

		+A		-A	
		Chi- Quadrat	Signifikanz	Chi- Quadrat	Signifikanz
<b>Log</b>	<b>+A</b>			2,500	0,114
<b>Rank</b>	<b>-A</b>	2,500	0,114		



Legende: x-Achse: Zeit in Monaten, y-Achse: Überleben x 100 %

**Abbildung 17:** Überleben nach alloSZT, Polymorphismus-Veränderung Allelvariante G

**Tabelle 28:** Überleben nach alloSZT, Polymorphismus-Veränderung G – paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen

		+G		-G	
		Chi- Quadrat	Signifikanz	Chi- Quadrat	Signifikanz
<b>Log</b>	<b>+G</b>			2,019	0,155
<b>Rank</b>	<b>-G</b>	2,019	0,155		

## 4 Diskussion

Die Untersuchung von SNPs spielt zunehmend eine größere Rolle in der Diagnostik und Erforschung hämato-onkologischer Krankheitsbilder. Der Polymorphismus G870A im *CCND1*-Gen wird mit der Pathogenese mehrerer Tumorentitäten in Verbindung gebracht, wobei die Bedeutung der einzelnen Allelvarianten weiterhin unklar ist. So zeigen sich auch innerhalb einer Tumorentität inkongruente Ergebnisse bzgl. der ursächlichen Allelvariante und auch die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung zweier verschiedener Transkripte von Cyclin D1 führen, sind nicht vollständig verstanden.

Während für viele andere onkologische Krankheitsbilder eine Assoziation mit Allelvariante A beschrieben wurde, konnte für Allelvariante G ein erhöhtes Risiko für die t(11;14)-tragende Subgruppe des Multiplen Myeloms festgestellt werden (16). Insgesamt ist jedoch wenig über die Rolle des Polymorphismus in der Pathogenese und dessen Bedeutung für den Krankheitsverlauf beim Multiplen Myelom bekannt. Ziel dieser Arbeit war die molekulargenetische Detektion des Polymorphismus bei Patienten, die an einem Multiplen Myelom bzw. einem Plasmozytom oder einer Plasmazelleukämie erkrankt sind. In der Zusammenschau mit Patientencharakteristika und klinischen Parametern sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus G870A und dem Krankheitsverlauf in diesem Patientenkollektiv untersucht werden.

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse

Im Folgenden werden die Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Beantwortung der eingangs formulierten Fragestellungen herangezogen und im Kontext aktueller Literatur betrachtet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für 200 Patienten und 72 gesunde Stammzellspender eine Analyse des Polymorphismus G870A im *CCND1*-Gen durchgeführt. Die Frequenz der Allelvariante A im Patientenkollektiv (n=200) betrug 39,75 %, die Frequenz der Allelvariante G 60,25 %. Die Allelfrequenzen der gesunden Spender (n=72) unterschieden sich mit 59,7 % für Allelvariante G und 40,3 % für Allelvariante A kaum von denen der Patienten.

Simpson *et al.* beschreiben in ihrer Publikation aus dem Jahr 2001 mit 43 % für Allelvariante A und 57 % für Allelvariante G ähnliche Häufigkeitsverteilungen. Die Distribution der Genotypen betrug 32 % für GG, 18 % für AA und 50 % für AG. Diese Zahlen entsprechen

gemittelten Angaben zu europäischen Kontrollpopulationen aus mehreren Studien (96-98). Ergebnisse einer im Jahr 2015 von Wang *et al.* publizierten Studie deuten auf ein erhöhtes Risiko für eine Myelomerkrankung durch die Allelvariante G hin. Anders als in der vorliegenden Arbeit unterschieden sich die Frequenzen der Allelvarianten im Patientenkollektiv deutlich von denen in der gesunden Kontrollpopulation. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gestaltet sich allerdings schwierig, da es sich in der Studie von Wang *et al.* um eine asiatische Population handelt und der Zusammenhang zwischen Allelvariante G und einer höheren Erkrankungsrate lediglich bei Patienten ab 60 Jahren gezeigt werden konnte (91).

In unserem Patientenkollektiv waren 30,5 % der Patienten weiblich und 69,5 % männlich. Diese Häufigkeiten unterscheiden sich nur unwesentlich von den Angaben anderer Publikationen, wonach Männer ca. zweimal so häufig wie Frauen am Multiplen Myelom erkranken (4). Das mediane Alter bei Erstdiagnose in unserem Patientenkollektiv war hingegen mit 58 Jahren deutlich niedriger als in anderen Quellen angegeben (3). Diese Differenz könnte unter anderem darin begründet sein, dass der Anteil der Patienten, welche sich einer alloSZT unterzogen, mit 73 von 200 Patienten relativ hoch ausfiel. Zudem wurde ein Großteil der von uns untersuchten Patienten im Rahmen von Studien behandelt; die Altersverteilung ist demnach vermutlich nicht repräsentativ für die Gesamtheit der Myelompatienten. Eine Risikostratifizierung anhand genetischer Aberrationen konnte bei 166 von 200 Patienten durchgeführt werden. Etwas weniger als ein Drittel (32,5 %) der Patienten wiesen zytogenetische Merkmale auf, die mit einem erhöhten Risiko für einen ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert werden (25, 26). Der Anteil an Hochrisiko-Aberrationen war in der Gruppe AA mit 12,5 % zwar niedriger als in den Gruppen GG und AG, die Gruppengrößen unterschieden sich jedoch deutlich voneinander. In einer von Morgan *et al.* im Jahr 2012 veröffentlichten Studie lag der Anteil an Patienten mit Hochrisiko-Aberrationen bei ca. 43 % (99).

Für Allelvariante G wurde ein erhöhtes Risiko für das Vorhandensein der Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  (16) bei Myelompatienten beschrieben. In der vorliegenden Arbeit betrug der Anteil der  $t(11;14)$ -positiven Patienten an der gesamten Patientenkohorte 17,5 %, fiel jedoch in der Gruppe GG mit 29,2 % deutlich höher aus. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den von Weinhold *et al.* publizierten Daten (16). Die Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf die Translokation  $t(11;14)$  erwiesen sich als statistisch signifikant ( $p=0,031$ ). Für die übrigen Parameter Geschlecht, Alter bei

Erstdiagnose und genetische Risikostratifizierung zeigten sich hingegen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Der überwiegende Teil, der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Patienten, erreichte zu mindestens einem Zeitpunkt im Beobachtungszeitraum eine klinische Remission (89,0 %). Ebenfalls häufig, wenn auch etwas geringer, fiel der Anteil derjenigen aus, die zu mindestens einem Zeitpunkt im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv oder einen Krankheitsprogress erlitten (63,5 %). Eine Analyse dieser Parameter sowie der medianen Zeit bis zum Auftreten des ersten Rezidivs ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

Das häufige Auftreten von Rezidiven, oft abwechselnd mit Remissionen, ist typisch für das Multiple Myelom (100); auch wenn die neueren Therapien vielen Patienten zu länger andauernden Remissionen verhelfen (101). Die Bedeutung des Polymorphismus G870A im *CCND1*-Gen für den klinischen Verlauf beim Multiplen Myelom ist bis dato nicht bekannt. Zwar wurde ein Zusammenhang zwischen einer Überexpression von Cyclin D1 mit einer höheren Resistenzrate, eventuell im Rahmen einer erhöhten Expression von sogenannten „Multi Drug Resistance“-Proteinen, vermutet (76). Ob und wie der Polymorphismus G870A das Expressionsniveau von Cyclin D1 beeinflusst, ist jedoch nicht abschließend geklärt. Auch konnte in der vorliegenden Arbeit keine Assoziation einer Allelvariante mit einem schlechteren Therapieansprechen beobachtet werden. Von 200 untersuchten Patienten erlitten 120 ein Rezidiv im Anschluss an eine Remission. Der paarweise Vergleich zwischen den Gruppen GG, AA und AG zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede im progressionsfreien Überleben.

Insgesamt 49 Patienten verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraums. Der Anteil der Todesfälle lag in der Gruppe AA mit 55,0 % deutlich über dem der anderen beiden Gruppen (18,0 % in Gruppe GG, 22,7 % in Gruppe AG). Im paarweisen Vergleich zwischen den Gruppen konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Gruppe AA und AG bzgl. des Gesamtüberlebens gezeigt werden ( $p=0,044$ ). Eine hieraus abzuleitende mögliche Hypothese ist der positive Einfluss der Allelvariante G im Polymorphismus G870A auf das Überleben von Myelompatienten. Hinzu kommt, dass die in diesem Zusammenhang häufiger vorliegende Translokation  $t(11;14)$  nicht zu den Hochrisiko-Aberationen gezählt wird, was die Hypothese einer Assoziation der Allelvariante G mit einem besseren Gesamtüberleben bei Myelomerkrankung unterstützen würde.

In der Interpretation der Ergebnisse ist allerdings zu berücksichtigen, dass Gruppe AA ( $n=20$ ) deutlich kleiner ist als Gruppe AG ( $n=119$ ). Die Berechnung einer

Überlebensanalyse für eine deutlich größere Stichprobe wäre eine interessante Option für zukünftige Studien.

Trotz ausgiebiger Literaturrecherche zur prognostischen Bedeutung des Polymorphismus G870A im *CCND1*-Gen für den Krankheitsverlauf beim Multiplen Myelom wurden keine Publikationen hierzu gefunden, es finden sich jedoch mehrere Veröffentlichungen zur Untersuchung der Bedeutung des Cyclin D1-Expressionsniveaus.

So berichten beispielsweise Soverini *et al.* in einer 2003 veröffentlichten Studie von einer längeren Remissionsdauer und entsprechend längerem PFS nach Hochdosis-Therapie und autoSZT bei Cyclin D1-positiven Patienten (67). Hiermit im Einklang stehen im Jahr 2006 veröffentlichte Ergebnisse einer Studie von Cook *et al.* Demnach wurde bei immunhistochemischem Nachweis von Cyclin D1 mithilfe eines monoklonalen Antikörpers ein längeres Gesamtüberleben beobachtet (75).

Diese Beobachtungen erlauben eine Weiterentwicklung der zuvor genannten Hypothese einer positiven Beeinflussung durch Allelvariante G, da das Vorliegen der Translokation t(11;14) als genetische Grundlage einer verstärkten Expression von Cyclin D1 angesehen wird. Ein linearer Zusammenhang zwischen dieser zytogenetischen Aberration und dem Expressionsniveau von Cyclin D1 ist jedoch angesichts der Komplexität der expressionsregulatorischen Vorgänge eher unwahrscheinlich. Zudem handelt es sich beim Multiplen Myelom um eine Erkrankung mit vielfältigen zytogenetischen Veränderungen, so dass eine einzelne Translokation kaum als alleiniger Faktor für das Expressionsniveau von Cyclin D1 und anderen Zellzyklus-regulierenden Proteinen betrachtet werden kann. Im Widerspruch zu den Beobachtungen von Soverini *et al.* und Cook *et al.* steht das Ergebnis einer 2012 veröffentlichten Studie von Tasidou *et al.* Hier wurde eine Assoziation zwischen dem immunhistochemischen Nachweis von Cyclin D1 an Proben aus dem Knochenmark von Patienten mit einem kürzeren Gesamtüberleben gefunden. Allerdings unterzogen sich in dieser Studie weniger Patienten einer autoSZT (65). Auch in einem 2012 von Sewify *et al.* veröffentlichten Artikel beschreiben die Autoren einen Zusammenhang zwischen der Überexpression von Cyclin D1 und einem ungünstigen Krankheitsverlauf bei Patienten mit Multiplem Myelom (76).

Vor diesem Hintergrund stellt sich nicht nur die Frage, ob und auf welche Weise der Polymorphismus G870A direkt oder indirekt das Expressionsniveau von Cyclin D1 beeinflusst. Auch die Bedeutung der Überexpression von Cyclin D1 für den Krankheitsverlauf gilt es weiter zu erforschen.

Für die Analyse der klinischen Verlaufparameter ab dem Zeitpunkt der alloSZT erfolgte eine Einteilung der Patienten in Gruppen entsprechend des Polymorphismus ihrer gesunden Spender. Innerhalb des Beobachtungszeitraums entwickelten 39 ein Rezidiv nach alloSZT. Bezüglich der medianen Zeit bis zur Detektion des Rezidivs ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Unterschiede im progressionsfreien Überleben waren nicht statistisch signifikant.

Das Gesamtüberleben nach alloSZT wurde ebenfalls unter Berücksichtigung des Spender-Polymorphismus analysiert. Hier zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen GG, AA und AG. Insgesamt traten 23 Todesfälle im Beobachtungszeitraum ab dem Zeitpunkt der alloSZT auf. Der Anteil der verstorbenen Patienten war in Gruppe GG mit 41,7 % am Höchsten und in Gruppe AA mit 20,0 % am Niedrigsten. Eine Interpretation dieser Ergebnisse ist aufgrund sehr kleiner Fallzahlen in Gruppe AA nur schwer möglich. Weiterhin wurde das Gesamtüberleben nach alloSZT im Hinblick auf die Polymorphismus-Veränderung im Zuge der alloSZT betrachtet. In 32 Fällen wiesen die Patienten vor der alloSZT an Position 870 im *CCND1*-Gen einen anderen Genotyp auf als ihre gesunden Spender. Basierend auf diesen Daten wurden zwei weitere Überlebensanalysen durchgeführt: zunächst wurde das Gesamtüberleben der Patienten danach verglichen, ob sie durch die alloSZT die Allelvariante A verloren (AA/AG → GG) oder hinzugewannen (GG → AA/AG). Anschließend wurde auf dieselbe Weise der Verlust bzw. der Gewinn der Allelvariante G berücksichtigt. Im paarweisen Vergleich zeigten sich in beiden Fällen keine statistisch signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben nach alloSZT. Da nur ein kleiner Teil der Patienten von den o. g. Veränderungen im *CCND1* Polymorphismus G870A betroffen war, fielen die Fallzahlen insgesamt sehr klein aus. Ursächlich hierfür ist vermutlich, dass sich die Allelfrequenzen der gesunden Spender kaum von denen der Patienten unterschieden und der Heterozygotenstatus jeweils die häufigste Variante darstellte.

Eine zukünftige Analyse dieses Parameters in einem größeren Patientenkollektiv wäre daher durchaus interessant.

## 4.2 Limitationen

Unser Patientenkollektiv umfasste 200 Patienten, die im Zeitraum zwischen 1992 und 2017 an der Charité in Behandlung waren. Hieraus ergeben sich mehrere Limitationen: durch die natürlicherweise vorhandene Alleldistribution stellen die homozygoten Träger

des A-Allels mit einer absoluten Anzahl von 20 eine deutlich kleinere Gruppe als die Vergleichsgruppen dar. In der statistischen Auswertung wurden daher stark unterschiedliche Gruppengrößen verglichen, was bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden sollte. Mit einem insgesamt größeren Patientenkollektiv wäre diesem Problem vermutlich nur teilweise begegnet worden, da sich hierdurch zwar die absoluten Patientenzahlen erhöhen würden, das relative Ungleichgewicht jedoch weiter bestehen würde. Diese Limitation ist daher zum Teil bedingt durch die natürlich vorhandenen Verteilungshäufigkeiten der einzelnen Allele.

Eine weitere Limitation der vorliegenden Arbeit ist der große Zeitraum, innerhalb welchem die Patienten diagnostiziert und behandelt wurden. Zwischen 1992 und 2017 kam es zu deutlichen Fortschritten in den therapeutischen Möglichkeiten, wodurch die 5-Jahres-Überlebensrate eines Myelompatienten in den USA von 29,9 % bei Erstdiagnose im Jahr 1992 auf 53,0 % bei Erstdiagnose im Jahr 2010 anstieg (102).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswahl der medikamentösen Therapien im untersuchten Patientenkollektiv nicht berücksichtigt. Auch die Anzahl der Therapien eines einzelnen Patienten ist bewusst nicht in die Auswertung eingegangen, da in beiden Fällen eine große Heterogenität vorliegt. Die Unterteilung in Gruppen nach Therapieschema zur Untersuchung eines möglichen Einflusses des Polymorphismus G870A auf das Therapieansprechen bei einzelnen Substanzen erschien bei einem Patientenkollektiv von n=200 nicht sinnvoll. Die individuellen Unterschiede in der medikamentösen Therapie stellen somit eine weitere Limitation der vorliegenden Arbeit dar, da der Einfluss der einzelnen Substanzen auf das Therapieansprechen nicht beurteilt werden kann.

### **4.3 Ausblick**

Neue Forschungsergebnisse zur Bedeutung aberranter molekularer Signalwege für die Pathogenese diverser maligner Erkrankungen bieten aktuell großes Potenzial für die Entwicklung zielgerichteter und personalisierter Therapien. Der Bcl-2 Inhibitor Venetoclax ist ein Beispiel für die zielgerichtete Therapie des Multiplen Myeloms. Seine Verträglichkeit wurde bereits in klinischen Studien getestet, bei akzeptabler Toxizität zeigte sich in einer Phase-1-Studie (103) vor allem ein hohes Ansprechen in der Untergruppe der Patienten mit t(11;14). Hier lag das Therapieansprechen mit 86 % deutlich höher als im gesamten untersuchten Patientenkollektiv (21 %) (104). Die Auswahl einer zielgerichteten Therapie nach genetischem Profil des Patienten könnte in Zukunft dafür sorgen, dass weniger

Patienten Therapien zugeführt werden, von denen sie nur wenig profitieren. Unnötige Nebenwirkungen könnten so vermieden werden.

Die Rolle des Polymorphismus G870A für das Ansprechen auf einzelne in der Therapie des Multiplen Myeloms eingesetzte Substanzen ist derzeit noch weitgehend unklar, ebenso seine Bedeutung für das Therapieansprechen allgemein. Zudem stellt sich die Frage, auf welchem Wege und in welchem Ausmaß die jeweiligen Allelvarianten das Expressionsniveau von Cyclin D1 beeinflussen.

Zukünftige Untersuchungen bezüglich eines etwaigen Zusammenhangs zwischen Genotyp, zellulärem Expressionsniveau von Zellzyklus-regulierenden Proteinen und klinischem Verlauf von Myelompatienten könnten der Etablierung neuer prognostischer Marker dienen und langfristig zur Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien beitragen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet*. 2009;Vol 374:324-39.
2. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology*. 2003;121(5):749-57.
3. Bird JM, Owen RG, D'Sa S, Snowden JA, Pratt G, Ashcroft J, Yong K, Cook G, Feyler S, Davies F, Morgan G, Cavenagh J, Low E, Behrens J. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011. *British Journal of Haematology*. 2011;154(1):32-75.
4. Waxman AJ, Mink PJ, Devesa SS, Anderson WF, Weiss BM, Kristinsson SY, McGlynn KA, Landgren O. Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population-based study. *Blood*. 2010;116(25):5501.
5. Anderson KC, Carrasco RD. Pathogenesis of Myeloma. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011;6:249-74.
6. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2:175-87.
7. Chesi M, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *International journal of hematology*. 2013;97(3):313-23.
8. Smith D, Yong K. Multiple myeloma. *BMJ : British Medical Journal*. 2013;346.
9. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*. 2009;113(22):5418-22.
10. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Dispenzieri A, Kumar S, Clark RJ, Baris D, Hoover R, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009;113(22):5412.
11. Kyle RA, Durie BGM, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G, Kröger N, Einsele H, Vesole DH, Dimopoulos M, San Miguel J, Avet-Loiseau H, Hajek R, Chen WM, Anderson KC, Ludwig H, Sonneveld P, Pavlovsky S, Palumbo A, Richardson PG, Barlogie B, Greipp P, Vescio R, Turesson I, Westin J, Boccadaro M. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*. 2010;24(6):1121-7.
12. Morgan GJ, Johnson DC, Weinhold N, Goldschmidt H, Landgren O, Lynch HT, Hemminki K, Houlston RS. Inherited genetic susceptibility to multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28:518-24.
13. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: emphasis on risk factors for progression. *British Journal of Haematology*. 2007;139(5):730-43.
14. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ. A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(8):564-9.
15. Kuehl WM, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3456-63.
16. Weinhold N, Johnson DC, Chubb D, Chen B, Forsti A, Hosking FJ, Broderick P, Ma YP, Dobbins SE, Hose D, Walker BA, Davies FE, Kaiser MF, Li NL, Gregory WA, Jackson GH, Witzens-Harig M, Neben K, Hoffmann P, Nothen MM, Muhleisen TW, Eisele L, Ross FM, Jauch A, Goldschmidt H, Houlston RS, Morgan GJ, Hemminki K. The CCND1 c.870G>A polymorphism is a risk factor for t(11;14)(q13;q32) multiple myeloma. *Nat Genet*. 2013;45(5):522-5.
17. Stella F, Pedrazzini E, Agazzoni M, Ballester O, Slavutsky I. Cytogenetic Alterations in Multiple Myeloma: Prognostic Significance and the Choice of Frontline Therapy. *Cancer Investigation*. 2015;33(10):496-504.

18. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular Pathogenesis and a Consequent Classification of Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(26):6333-8.
19. Sawyer JR. The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genetics*. 2011;204:3-12.
20. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7:585.
21. Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*. 2001;20:5611.
22. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, Dawson KJ, Iorio F, Nik-Zainal S, Bignell GR, Hinton JW, Li Y, Tubio JMC, McLaren S, O' Meara S, Butler AP, Teague JW, Mudie L, Anderson E, Rashid N, Tai Y, Shammas MA, Sperling AS, Fulciniti M, Richardson PG, Parmigiani G, Magrangeas F, Minvielle S, Moreau P, Attal M, Facon T, Futreal PA, Anderson KC, Campbell PJ, Munshi NC. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature Communications*. 2014;5:2997.
23. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, Van Wier S, Blackburn PR, Baker AS, Dispenzieri A, Kumar S, Rajkumar SV, Carpten JD, Barrett M, Fonseca R, Stewart AK, Bergsagel PL. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012;120(5):1067-76.
24. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, Ashby TC, Bauer M, Davies FE, 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 AK, Goldschmidt H, Raab MS, Einsele H, Sonneveld P, San Miguel J, Lonial S, Jackson GH, Anderson KC, Avet-Loiseau H, Munshi N, Thakurta A, Morgan GJ. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood*. 2018;132(6):587.
25. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S, Neri A, Barlogie B, Kuehl WM, Liebisch P, Davies F, Chen-Kiang S, Durie BGM, Carrasco R, Sezer O, Reiman T, Pilarski L, Avet-Loiseau H. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009;23:2210.
26. Joseph NS, Gentili S, Kaufman JL, Lonial S, Nooka AK. High-risk Multiple Myeloma: Definition and Management. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2017;17:S80-S7.
27. Shimoni A, Hardan I, Ayuk F, Schilling G, Atanackovic D, Zeller W, Yerushalmi R, Zander AR, Kroger N, Nagler A. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning in patients with refractory and recurrent multiple myeloma. *Cancer*. 2010;116(15):3621-30.
28. Yin X, Tang L, Fan F, Jiang Q, Sun C, Hu Y. Allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis from 2007 to 2017. *Cancer cell international*. 2018;18:62-.
29. Lokhorst H, Einsele H, Vesole D, Bruno B, Miguel JS, Pérez-Simon JA, Kröger N, Moreau P, Gahrton G, Gasparetto C, Giralt S, Bensinger W. International Myeloma Working Group Consensus Statement Regarding the Current Status of Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(29):4521-30.
30. Festuccia M, Martino M, Ferrando F, Messina G, Moscato T, Fedele R, Boccadoro M, Giaccone L, Bruno B. Allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma: immunotherapy and new drugs. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2015;15(6):857-72.
31. Tricot G, Vesole DH, Jagannath S, Hilton J, Munshi N, Barlogie B. Graft-versus-myeloma effect: proof of principle. *Blood*. 1996;87(3):1196.
32. Bashir Q, Qazilbash MH. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Myeloma: When and in Whom Does It Work. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2017;12(2):126-35.
33. Krieger S, Gauduchon J, Roussel M, Troussard X, Sola B. Relevance of cyclin D1b expression and CCND1 polymorphism in the pathogenesis of multiple myeloma and mantle cell lymphoma. *BMC Cancer*. 2006;6:238.

34. Dickson C, Fantl V, Gillett C, Brookes S, Bartek J, Smith R, Fisher C, Barnes D, Peters G. Amplification of chromosome band 11q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Letters*. 1995;90(1):43-50.
35. Pruneri G, Fabris S, Baldini L, Carboni N, Zagano S, Colombi MA, Ciceri G, Lombardi L, Rocchi M, Buffa R, Maiolo AT, Neri A. Immunohistochemical Analysis of Cyclin D1 Shows Deregulated Expression in Multiple Myeloma with the t(11;14). *The American Journal of Pathology*. 2000;156(5):1505-13.
36. Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, Tassies D, Jaffe ES, Montserrat E, Rozman C. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood*. 1994;84(8):2726.
37. Moreno-Bueno G, Rodríguez-Perales S, Sánchez-Estévez C, Hardisson D, Sarrió D, Prat J, Cigudosa JC, Matias-Guiu X, Palacios J. Cyclin D1 gene (CCND1) mutations in endometrial cancer. *Oncogene*. 2003;22:6115.
38. Benzeno S, Lu F, Guo M, Barbash O, Zhang F, Herman JG, Klein PS, Rustgi A, Diehl JA. Identification of mutations that disrupt phosphorylation-dependent nuclear export of cyclin D1. *Oncogene*. 2006;25:6291.
39. Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes & Development*. 2004;18:2699–711.
40. Collins K, Jacks T, Pavletich NP. The cell cycle and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(7):2776.
41. Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 2004;432:298.
42. Sherr CJ. G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell*. 1994;79(4):551-5.
43. Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & Development*. 1997;11(8):957-72.
44. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes & Development*. 1994;8(1):9-22.
45. Lévêque C, Marsaud V, Renoir J-M, Sola B. Alternative cyclin D1 forms a and b have different biological functions in the cell cycle of B lymphocytes. *Exp Cell Res*. 2007;313(12):2719-29.
46. Murray AW. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*. 1992;359:599.
47. Casimiro MC, Velasco-Velázquez M, Aguirre-Alvarado C, Pestell RG. Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2014;23(3):295-304.
48. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*. 1999;13(12):1501-12.
49. Lolli G, N Johnson L. CAK—Cyclin-Dependent Activating Kinase: A Key Kinase in Cell Cycle Control and a Target for Drugs? 2005. 572-7 p.
50. Stevaux O, Dyson NJ. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Current Opinion in Cell Biology*. 2002;14(6):684-91.
51. Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Molecular and Cellular Biology*. 1994;14(3):1669-79.
52. Ohtsubo M, Roberts JM. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science*. 1993;259(5103):1908.
53. Smith D, Mann D, Yong K. Cyclin D type does not influence cell cycle response to DNA damage caused by ionizing radiation in multiple myeloma tumours. *British Journal of Haematology*. 2016;173(5):693-704.
54. Agami R, Bernards R. Distinct Initiation and Maintenance Mechanisms Cooperate to Induce G1 Cell Cycle Arrest in Response to DNA Damage. *Cell*. 2000;102(1):55-66.
55. Blagden SP, Glover DM. Polar expeditions — provisioning the centrosome for mitosis. *Nature Cell Biology*. 2003;5:505.

56. Li Z, Jiao X, Wang C, Shirley LA, Elsaleh H, Dahl O, Wang M, Soutoglou E, Knudsen ES, Pestell RG. Alternative Cyclin D1 Splice Forms Differentially Regulate the DNA Damage Response. *Cancer Research*. 2010;70(21):8802-11.
57. Tchakarska G, Roussel M, Troussard X, Sola B. Cyclin D1 Inhibits Mitochondrial Activity in B Cells. *Cancer Research*. 2011;71(5):1690-9.
58. Li Z, Jiao X, Wang C, Ju X, Lu Y, Yuan L, Lisanti MP, Katiyar S, Pestell RG. Cyclin D1 Induction of Cellular Migration Requires p27(KIP1). *Cancer Research*. 2006;66:9986-94.
59. Li Z, Wang C, Jiao X, Katiyar S, Casimiro MC, Prendergast GC, Powell MJ, Pestell RG. Alternate Cyclin D1 mRNA Splicing Modulates p27KIP1 Binding and Cell Migration. *J Biol Chem*. 2008;283(11):7007-15.
60. Li Z, Wang C, Jiao X, Lu Y, Fu M, Quong AA, Dye C, Yang J, Dai M, Ju X, Zhang X, Li A, Burbelo P, Stanley ER, Pestell RG. Cyclin D1 Regulates Cellular Migration through the Inhibition of Thrombospondin 1 and ROCK Signaling. *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26(11):4240-56.
61. Neumeister P, Pixley FJ, Xiong Y, Xie H, Wu K, Ashton A, Cammer M, Chan A, Symons M, Stanley ER, Pestell RG. Cyclin D1 Governs Adhesion and Motility of Macrophages. *Molecular Biology of the Cell*. 2003;14(5):2005-15.
62. Jirawatnotai S, Hu Y, Michowski W, Elias JE, Becks L, Bienvenu F, Zagozdzon A, Goswami T, Wang YE, Clark AB, Kunkel TA, van Harn T, Xia B, Correll M, Quackenbush J, Livingston DM, Gygi SP, Sicinski P. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by interactome analyses in human cancers. *Nature*. 2011;474(7350):230-4.
63. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology*. 2004;145(12):5439-47.
64. Bustany S, Cahu J, Guardiola P, Sola B. Cyclin D1 sensitizes myeloma cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis by activating the unfolded protein response pathway. *BMC Cancer*. 2015;15:262.
65. Tasidou A, Roussou M, Terpos E, Kastiritis E, Gkatzamanidou M, Gavriatopoulou M, Migkou M, Eleutherakis-Papaiakevou E, Nikitas N, Anagnostou D, Dimopoulos MA. Increased expression of cyclin-D1 on trephine bone marrow biopsies independently predicts for shorter overall survival in patients with multiple myeloma treated with novel agents. *American Journal of Hematology*. 2012;87(7):734-6.
66. Specht K, Haralambieva E, Bink K, Kremer M, Mandl-Weber S, Koch I, Tomer R, Hofler H, Schuurung E, Kluin PM, Fend F, Quintanilla-Martinez L. Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels. *Blood*. 2004;104(4):1120-6.
67. Soverini S, Cavo M, Cellini C, Terragna C, Zamagni E, Ruggeri D, Testoni N, Tosi P, de Vivo A, Amabile M, Grafone T, Ottaviani E, Giannini B, Cangini D, Bonifazi F, Neri A, Fabris S, Tura S, Baccarani M, Martinelli G. Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation. *Blood*. 2003;102(5):1588.
68. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005;106(1):296-303.
69. Specht K, Kremer M, Müller U, Dirnhofer S, Rosemann M, Höfler H, Quintanilla-Martinez L, Fend F. Identification of Cyclin D1 mRNA Overexpression in B-Cell Neoplasias by Real-Time Reverse Transcription-PCR of Microdissected Paraffin Sections. *Clinical Cancer Research*. 2002;8(9):2902.
70. Lesage D, Troussard X, Sola B. The enigmatic role of cyclin D1 in multiple myeloma. *International Journal of Cancer*. 2005;115(2):171-6.
71. Ewen ME, Lamb J. The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis. *Trends in Molecular Medicine*. 2004;10(4):158-62.
72. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Molecular Cancer*. 2007;6:24-.
73. Berenstein R, Blau O, Nogai A, Waechter M, Slonova E, Schmidt-Hieber M, Kunitz A, Pezzutto A, Doerken B, Blau IW. Multiple myeloma cells alter the senescence phenotype of

bone marrow mesenchymal stromal cells under participation of the DLK1-DIO3 genomic region. *BMC Cancer*. 2015;15(1):68.

74. Bustany S, Bourgeais J, Tchakarska G, Body S, Hérault O, Gouilleux F, Sola B. Cyclin D1 unbalances the redox status controlling cell adhesion, migration, and drug resistance in myeloma cells. *Oncotarget*. 2016;7(29):45214-24.
75. Cook JR, Hsi ED, Worley S, Tubbs RR, Hussein M. Immunohistochemical Analysis Identifies Two Cyclin D1+ Subsets of Plasma Cell Myeloma, Each Associated With Favorable Survival. *American Journal of Clinical Pathology*. 2006;125(4):615-24.
76. Sewify EM, Afifi OA, Mosad E, Zaki AH, El Gammal SA. Cyclin D1 Amplification in Multiple Myeloma Is Associated With Multidrug Resistance Expression. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2014;14(3):215-22.
77. Kelley TW, Baz R, Hussein M, Karafa M, Cook JR. Clinical significance of cyclin D1, fibroblast growth factor receptor 3, and p53 immunohistochemistry in plasma cell myeloma treated with a thalidomide-based regimen. *Human Pathology*. 2009;40(3):405-12.
78. Rasmussen T, Knudsen LM, Johnsen HE. Frequency and prognostic relevance of cyclin D1 dysregulation in multiple myeloma. *European Journal of Haematology*. 2003;67(5-6):296-301.
79. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene*. 2006;25:1620-8.
80. Marsaud V, Tchakarska G, Andrieux G, Liu JM, Dembele D, Jost B, Wdzieczak-Bakala J, Renoir JM, Sola B. Cyclin K and cyclin D1b are oncogenic in myeloma cells. *Mol Cancer*. 2010;9:103.
81. Sawa H, Ohshima TA, Ukita H, Murakami H, Chiba Y, Kamada H, Hara M, Saito I. Alternatively spliced forms of cyclin D1 modulate entry into the cell cycle in an inverse manner. *Oncogene*. 1998;16:1701.
82. Bala S, Peltomäki P. CYCLIN D1 as a Genetic Modifier in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Cancer Research*. 2001;61(61):6042-5.
83. Marzec M, Kasprzycka M, Lai R, Gladden AB, Wlodarski P, Tomczak E, Nowell P, DePrimo SE, Sadis S, Eck S, Schuster SJ, Diehl JA, Wasik MA. Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity. *Blood*. 2006;108(5):1744.
84. Lu F, Gladden AB, Diehl JA. An Alternatively Spliced Cyclin D1 Isoform, Cyclin D1b, Is a Nuclear Oncogene. *Cancer Research*. 2003;63(21):7056.
85. Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes & Development*. 2000;14(24):3102-14.
86. Solomon DA, Wang Y, Fox SR, Lambeck TC, Giesting S, Lan Z, Senderowicz AM, Conti CJ, Knudsen ES. Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(8):30339-47.
87. Knudsen KE. The cyclin D1b splice variant: an old oncogene learns new tricks. *Cell Division*. 2006;1:15-.
88. Zhang Z, Liu W, Jia X, Gao Y, Hemminki K, Lindholm B. Use of Pyrosequencing to detect clinically relevant polymorphisms of genes in basal cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta*. 2004;342(1):137-43.
89. Casson AG, Zheng Z, Evans SC, Geldenhuis L, van Zanten SV, Veugelers PJ, Porter GA, Guernsey DL. Cyclin D1 polymorphism (G870A) and risk for esophageal adenocarcinoma. *Cancer*. 2005;104(4):730-9.
90. Zheng Y, Shen H, Sturgis EM, Wang L-E, Eicher SA, Strom SS, Frazier ML, Spitz MR, Wei Q. Cyclin D1 polymorphism and risk for squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Carcinogenesis*. 2001;22(8):1195-9.
91. Wang L, Habuchi T, Mitsumori K, Li Z, Kamoto T, Kinoshita H, Tsuchiya N, Sato K, Ohyama C, Nakamura A, Ogawa O, Kato T. Increased risk of prostate cancer associated with AA genotype of cyclin D1 gene A870G polymorphism. *International Journal of Cancer*. 2002;103(1):116-20.

92. Holley SL, Matthias C, Jahnke V, Fryer AA, Strange RC, Hoban PR. Association of cyclin D1 polymorphism with increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2005;41(2):156-60.
93. Hong Y, Eu KW, Seow-Choen F, Fook-Chong S, Cheah PY. GG genotype of cyclin D1 G870A polymorphism is associated with increased risk and advanced colorectal cancer in patients in Singapore. *European Journal of Cancer*. 2005;41(7):1037-44.
94. Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis (Zugriff am 12.03.2018 unter [https://www.charite.de/fileadmin/user\\_upload/portal/charite/presse/publikationen/amtl-mitteilungsblatt/2014/AMB140610-130\\_.pdf](https://www.charite.de/fileadmin/user_upload/portal/charite/presse/publikationen/amtl-mitteilungsblatt/2014/AMB140610-130_.pdf))
95. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*. 1958;53(282):457-81.
96. Simpson DJ, Fryer AA, Grossman AB, Wass JAH, Pfeifer M, Kros JM, Clayton RN, Farrell WE. Cyclin D1 (CCND1) genotype is associated with tumour grade in sporadic pituitary adenomas. *Carcinogenesis*. 2001;22(11):1801-7.
97. Matthias C, Branigan K, Jahnke V, Leder K, Haas J, Heighway J, Jones PW, Strange RC, Fryer AA, Hoban PR. Polymorphism within the cyclin D1 gene is associated with prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research*. 1998;4(10):2411.
98. McKay JA, Douglas JJ, Ross VG, Curran S, Murray GI, Cassidy J. Cyclin D1 protein expression and gene polymorphism in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*. 2000;88(1):77-81.
99. Morgan GJ, Gregory WM, Davies FE, Bell SE, Szubert AJ, Brown JM, Coy NN, Cook G, Russell NH, Rudin C, Roddie H, Drayson MT, Owen RG, Ross FM, Jackson GH, Child JA. The role of maintenance thalidomide therapy in multiple myeloma: MRC Myeloma IX results and meta-analysis. *Blood*. 2012;119(1):7.
100. Dingli D, Ailawadhi S, Bergsagel PL, Buadi FK, Dispenzieri A, Fonseca R, Gertz MA, Gonsalves WI, Hayman SR, Kapoor P, Kourelis T, Kumar SK, Kyle RA, Lacy MQ, Leung N, Lin Y, Lust JA, Mikhael JR, Reeder CB, Roy V, Russell SJ, Sher T, Stewart AK, Warsame R, Zeldenrust SR, Rajkumar SV, Chanan Khan AA. Therapy for Relapsed Multiple Myeloma: Guidelines From the Mayo Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy. *Mayo Clinic Proceedings*. 2017;92(4):578-98.
101. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Zeldenrust SR, Dingli D, Russell SJ, Lust JA, Greipp PR, Kyle RA, Gertz MA. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008;111(5):2516.
102. Noone AM HN, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). . SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015, National Cancer Institute. [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2015/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/), based on November 2017 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2018.; 2017.
103. Kumar S, Kaufman JL, Gasparetto C, Mikhael J, Vij R, Pegourie B, Benboubker L, Facon T, Amiot M, Moreau P, Punnoose EA, Alzate S, Dunbar M, Xu T, Agarwal SK, Enschede SH, Leverson JD, Ross JA, Maciag PC, Verdugo M, Touzeau C. Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood*. 2017;130(22):2401.
104. Anwer F, Gee KM, Iftikhar A, Baig M, Russ AD, Saeed S, Zar MA, Razzaq F, Carew J, Nawrocki S, Al-Kateb H, Cavalcante Parr NN, McBride A, Valent J, Samaras C. Future of Personalized Therapy Targeting Aberrant Signaling Pathways in Multiple Myeloma. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2019;19(7):397-405.

## 6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Fiona Maria Puckert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss des Polymorphismus G870A von *CCND1* (Cyclin D1) auf den Verlauf bei Patienten mit Multiplem Myelom und allogener Stammzelltransplantation“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum:

Fiona Maria Puckert

## 7 Ausführliche Anteilserklärung

Fiona Maria Puckert hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

- Cyclin D1 C.870G>A polymorphism in patients with multiple myeloma, impact of donor Cyclin D1 C.870G>A polymorphism on the outcome after transplantation  
*Puckert F.M., Blau I.W., Kühnel A., Nogai A., Rieger K., Kunitz A., Hemmati P., Arnold R., Pezzutto A., Dörken B., Blau O. (Abstract DGHO 2016)*

Beitrag im Einzelnen:

DNA-Isolation, Polymorphismus-Analyse von Patienten- und Spenderproben, Beteiligung an Sammlung klinischer Daten, statistische Auswertung, Erstellung einer Posterpräsentation, Verfassen des Abstracts

Fiona Maria Puckert

## **8 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 9 Publikationsliste

Cyclin D1 C.870G>A polymorphism in patients with multiple myeloma, impact of donor  
Cyclin D1 C.870G>A polymorphism on the outcome after transplantation

*Puckert F.M., Blau I.W., Kühnel A., Nogai A., Rieger K., Kunitz A., Hemmati P., Arnold R., Pezzutto A., Dörken B., Blau O. (Abstract DGHO 2016)*

Fiona Maria Puckert

## **10 Danksagung**

Zunächst möchte ich Frau Dr. med. Olga Blau und Herrn Prof. Dr. med. Igor-Wolfgang Blau für ihre Anleitung während der Arbeit im Labor, ihre Unterstützung und Kritik bei der Erstellung dieser Dissertation und ihre warmherzige Betreuung danken.

Des Weiteren möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe Blau, insbesondere Franziska Behrenbeck, Aline Kühnel und Marlies Wächter, von denen ich viel gelernt habe, für die familiäre Atmosphäre und die schöne Zusammenarbeit danken.

Großer Dank gilt zudem meiner Familie, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit immer unterstützt hat.