

Aus dem Fachbereich Klinische Medizin
Klinikum für Innere Medizin I des Universitätsklinikum Homburg/Saar
Direktor Universitätsprofessor Dr. med. M. Pfreundschuh

**Assoziation von Genpolymorphismen
in den Genen des RANK-RANKL-OPG-System bei Patienten
mit Multiplem Myelom und MGUS**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2013

vorgelegt von: Stephanie Keller
geb. am: 22.01.1983 in Bad Friedrichshall

erster Berichterstatter/Doktorvater PD Dr. med Gunter Aßmann

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	II
1. Zusammenfassung (deutsch/englisch)	1
2. Einleitung und Grundlagen	3
2.1 Charakteristika des Multiplen Myelom und MGUS	3
2.2. Pathophysiologie der Knochenläsionen beim Multiplen Myelom	11
2.3 Assoziationsstudien bei SNPs	15
2.4 Fragestellung	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Patienten und Kontrollgruppen	16
3.2 DNS Extraktion	20
3.2.1 DNS Extraktion aus Vollblut	20
3.2.2 DNS Extraktion aus Serum	22
3.3 Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration und -Reinheit	24
3.4 Analyse der SNPs mittels RT- PCR	24
3.4.1 Qantitative realtime PCR (qRT-PCR)	27
3.4.1.1 TaqMan Genotyping Assay	27
3.5 Statistische Verfahren	31
4. Ergebnisse	32
4.1 Genotyp- und Allelfrequenz bei RANKL, RANK und OPG bei Patienten mit Multiplen Myelom und MGUS und der gesunden Kontrollgruppe	32
4.2 Subgruppenanalyse	35
5. Diskussion	63
5.1 Ergebnisse der Analyse Multiples Myelom und MGUS vs. Gesunde Kontrollgruppe	63
5.2. Subgruppenanalyse	64
Quellenangaben	71
Danksagung	79
Curriculum Vitae	80

Abkürzungsverzeichnis

Ala	Alanin
B2M	β2- Mikroglobulin
C	Cytosin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
G	Guanin
Ig	Immunglobulin
Hb	Hämoglobin
Kbp	Kilobasenpaare
LD	Linkage Disequilibrium
ISS	International Staging System for Multiple Myeloma
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MM	Multiples Myelom
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
ml	Milliliter
OPG	Osteoprotegerin
RANK	Rezeptor-Agonist-Nuklear-Faktor-B
RANKL	Rezeptor-Agonist-Nuklear-Faktor-B-Ligand
RF	Rheumafaktor
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
rpm	Rounds per minute
SD	Salmon and Durie Stadium
SNP	Single Nukleotid Polymorphismen
T	Thymin
TNFα	Tumor- Nekrose- Faktor-alpha
χ ² -test	Chiquadrat-Test
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung (deutsch/englisch)

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Assoziation von sechs Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs) in den *RANK- RANKL- OPG-* Genen mit der malignen B-Zell Erkrankung des Multiplen Myeloms und seiner Vorläufer Erkrankung, die „Monoklonale Gammopathie Unklarer Signifikanz“ (MGUS). Die Knochenschädigung beim Multiplen Myelom ist ein Ergebnis von komplexen Interaktionen von Myelomzellen und den Osteoklasten im Zusammenspiel mit anderen Zellbestandteilen und Komponenten des Knochenstoffwechsels [Giuliani et. al. 2006]. Knochenläsionen im Sinne von Osteolysen sind ein Hauptmorbidityfaktor der Erkrankung. Die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz ist ein asymptomatischer prädispositionierender Faktor für die Entwicklung eines Multiplen Myeloms [Landgren et. al. 2009]. Es ist nachgewiesen, dass das RANK-RANKL-OPG-System bei der Entstehung von Osteolysen involviert ist [Li et. al. 2009]. Im Rahmen des hier durchgeführten Forschungsvorhabens konnte zunächst keine Assoziation des Multiplen Myeloms und MGUS mit den untersuchten SNPs des RANK- RANKL- OPG-Systems im Vergleich mit einem gesunden Kontrollkollektiv hergestellt werden. Es zeigten sich aber Assoziationen in der Subgruppenanalyse der Myelom- und MGUS-Patienten. Hierbei zeichnete sich der SNP *RANKL rs 9533156* und dessen Minorallel C als protektive Einflussgröße ab. Trägt ein Patient das homozygote Minorallel, so ist er bei Diagnosestellung häufiger in einer niederen ISS Klassifikation (Genotypenfrequenz $p=0,026$; Allelfrequenz $p=0,044$, OR 1,715 (1,011-2,910), zeigt weniger Osteolysen (Allelfrequenz $p=0,014$, OR 1,706 (1,115-2,611) und seltener eine myelomassoziierte Anämie (Allelfrequenz $p=0,002$, OR 0,542 (0,491-0,598)). Die Anämie Subgruppe war zudem signifikant häufiger Träger des homozygoten Minorallels CC bei SNP *OPG rs2073618*. Inwieweit der SNP *RANKL rs9533156* und der *OPG rs2073618* sich als Risikoparameter etablieren können, müssen nachfolgende Studien anhand größerer Fallstudien noch belegen. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist keine durch die Genvariation veränderte Funktionalität des OPG und des RANKL bei Patienten mit Multiplen Myelom und MGUS bekannt.

Summary

The aim of the present work was to study the association of 6 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *RANK-RANKL-OPG* genes with the malignant B-cell disorder of multiple myeloma and its precursor disease Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). The bone disease in multiple myeloma is a result of complex interactions between myeloma cells and osteoclasts in interaction with other cellular components and components of bone metabolism [Giuliani et. al. 2006]. Osteolytic bone lesions in terms of morbidity is a major factor in the disease. The monoclonal gammopathy of undetermined significance is an asymptomatic predisposing factor for the development of multiple myeloma [Landgren et. al. 2009]. It is shown that the RANK-RANKL-OPG system is involved in the development of osteolysis [Li et. al. 2009].As part of the research being undertaken project initially was no association of multiple myeloma and MGUS are manufactured with the studied SNPs of the RANK-RANKL-OPG system in comparison with a healthy control group.

There were associations in the subgroup analysis of the myeloma and MGUS patients. Here are recorded the *RANKL SNP rs9533156* and whose Minorallele C from a protective influence size. The patient carries a homozygous Minorallele, it is more common at diagnosis in a lower classification ISS (genotype frequency $p=0.026$, allele frequency $p=0.044$, OR 1.715 (1.011-2.910), shows less osteolysis (p allele frequency 0.014, OR 1.706 (1.11-2.611) and rarely a myeloma-associated anemia (allele frequency $p=0.002$, OR 0.542 (0.491-0.598). Anemia subgroup was also significantly more frequent carriers of the homozygous CC Minorallels at *OPG SNP rs2073618*. extent the *RANKL SNP rs9533156* and *rs2073618* of *OPG* as a risk parameter can establish, subsequent studies have shown greater need based on case studies only. To date is not altered functionality of OPG and RANKL in patients with multiple myeloma and MGUS have been investigated by the gene variation.

2. Einleitung und Grundlagen

Die hier vorliegende Promotionsschrift beschreibt das Forschungsvorhaben mit dem Titel:

Assoziation von Genpolymorphismen in den Genen des *RANK-RANKL-OPG*-System bei Patienten mit Multiplen Myelom und MGUS.

Diese Arbeit stütze sich unter anderem auf signifikante Ergebnisse aus der Arbeit von Assmann et. a. 2010, in der ein Zusammenhang der rheumatoiden Arthritis und den *SNP RANKL rs35211496* sowie des homozygoten Minorallels von *RANKL rs2277438* erkannt wurde, und der Kenntnis, dass das *RANKL-RANK-OPG* System in die Krankheitsentstehung des Multiplem Myeloms involviert ist. Grundsätzlich sind für alle untersuchten 6 *SNP* keine Daten vorliegend, die die Funktionalität der Genomvariationen beschreiben, insbesondere hinsichtlich der Rezeptoraffinität der *RANKL*-und *OPG*- exprimierenden Zellen. Osteoblasten, B-Lymphozyten, Osteoklasten wie auch Myelomzellen gehören zu Akteuren im Knochenstoffwechsel, die über das *RANK-RANKL-OPG*-System gesteuert werden.

2.1 Charakteristika des Multiplen Myelom und MGUS

Definition: Beim Multiplen Myelom handelt es sich um ein niedrig malignes Non-Hodgkin Lymphom der B-Zell Reihe mit Infiltration des Knochenmarks in diffuser oder lokulärer Ausbreitung. Es ist der häufigste Tumor von Knochenmark und Knochen. Es macht 1 % aller malignen Erkrankungen von Kaukasiern aus. Das Multiple Myelom zählt 13 % der lymphoretikulären Neoplasien [Devesa et. al. 1992] Die Inzidenz beträgt 4,7/ 100 000 bei Männern und 3,2/ 100 000 bei Frauen, wobei in der schwarzen Bevölkerung die Erkrankungsrate fast doppelt so hoch liegt, wie epidemiologische Untersuchungen in den den USA zeigen [Ries et. al. 1991, Rajkumar et. al. 2007]. Es tritt bevorzugt nach der 4. Lebensdekade auf, mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 6. und 7. Lebensjahrzehnt. Das mittlere Überleben liegt bei 50 Monaten nach Diagnosestellung [Kyle et. al. 2004, Angtuaco et. al. 2004].

Die klonale Erkrankung geht von einer malignen transformierten Plasmazelle aus (B-Zelle), die durch Osteolysen den Knochen zerstört und durch die Infiltration und Verdrängung des Knochenmarks die Granulopoese, Thrombopoese und Erythropoese herabsetzt. Von den transformierten B-Zellen werden zudem Immunglobuline eines einzigen Typs monoklonal (IgA, IgG, IgD) oder Leichtketten (Kappa und Lambda) gebildet, die sekundär ein Antikörpermangelsyndrom mit Infektneigung auslösen können.

Es kann zu Nierenschäden durch Ablagerung der übermäßig produzierten Immunglobuline kommen, zudem werden die sogenannten Bence-Jones- Proteine, bei denen es sich um die freie Leicht- Ketten der Immunglobuline handelt, im Urin ausgeschieden [Angtuaco et. al. 2004] Es kommt zu Infektanfälligkeit durch das geschädigte Knochenmark und fehlende funktionstüchtige Immunglobuline, zu Knochenschmerzen und pathologischen Frakturen durch osteolytische Vorgänge in der betroffenen Knochenmatrix [Kyle et. al 2003].

Die Osteolysen sind die Hauptursache für die Morbidität beim Multiplen Myelom. Eine eigene osteolytische Aktivität besitzen die Myelomzellen nicht, hingegen finden komplexe immunologische Vorgänge zwischen den neoplastischen Zellen und den Osteoklasten des Knochenmarks, den Stromazellen, Fibroblasten, Osteoblasten, Osteoklasten, Makrophagen und deren zytokingesteuerter Interaktion mit Stoffwechselfvorgängen im Knochen statt [Giuliani et. al 2006].

Bei genetischen Untersuchungen von Myelomzellen wurden verschiedene Mutationen im Zusammenhang aufgedeckt, die bekanntesten Mutationen sind auf Chromosom 14q32 und eine Deletion in Chromosom 13 [Avet-Loiseaut et. al. 2007, Rajkumar et. al. 1999] Jedoch sind die spezifischen Mechanismen, die zur Transformation eines gesunden B-Lymphozyten in eine Population von malignen monoklonalen B-Zellen führen, weitgehend unaufgeklärt (**Bild 2.1.1**)[Scharschmid et. al. 2011]

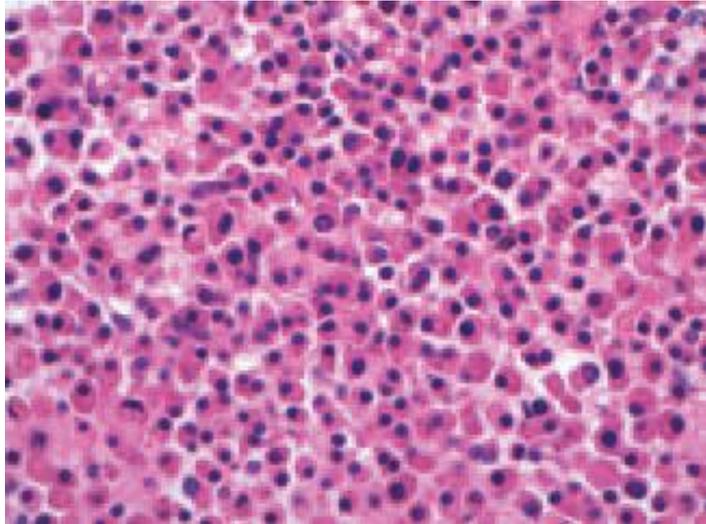


Abb. 2.1.1: Typische Histologie des Multiplen Myeloms mit einer monoklonalen Proliferation von Plasma Zellen (Hämatoxylin-Eosin Färbung, Vergrößerung x200) [Scharschmid et. al. 2011]

Eine Sonderform des Multiplen Myeloms stellt MGUS dar. Mit einer Prävalenz von 3,2 % tritt es bei Patienten in der 5. Lebensdekade und älter auf. Die Patienten weisen wenige unspezifische, oder keine Beschwerden auf und zeigen keine klinisch nachweisbaren Endorganschäden. Bei diesen Patienten finden sich eine limitierte Anzahl von klonal Veränderten B-Zellen, die sich bei einem jährlichen Risiko von mehr als einem Prozent von MGUS in ein Multiples Myelom transformieren [Kyle et. al. 2004], das entspricht ca. 20-30 % im 10 Jahresverlauf. In Studien konnte zudem gezeigt werden, dass Familienangehörige von Patienten mit Multiplen Myelom und MGUS ein zwei-bis dreifach erhöhtes Erkrankungsrisiko haben. In diesem Zusammenhang ist auch die Entwicklung vom Multiplem Myelom und MGUS in Assoziation mit hyperphosphorylierten paratarg-7 (P7), ein autoantigenes Zielprotein mit autosomal dominantem Vererbungsmuster, nachgewiesen worden [Grass et.al 2011].

Diagnosestellung: Nach den **Ossermann Kriterien**, wie sie bereits in den 1960er Jahren formuliert wurden, müssen mindestens zwei von den drei folgenden erfüllt sein:

1. Nachweis monoklonaler Immunglobuline im Plasma und/oder im Urin, sowie
2. Plasmazellnester im Knochenmark und/ oder ein Plasmazellanteil von mindestens 15% und
3. Osteolytische Herde im Knochen oder Osteoporose bei gleichzeitiger Vermehrung von Plasmazellen im Knochenmark. Dabei sind Knochenläsionen hauptsächlich im Schädel mit dem sogenannten „Schrotschusschädel“, Rippen, Wirbelkörper, Becken, Oberschenkelknochen, oder im Oberarm lokalisiert

Die klinische Diagnose wird anhand der Histologie (I) von Knochenmark (>15% Plasmazellen)(a), oder medullären oder extramedullären gelegenen Herden (b) gestellt. Zudem macht die Diagnose eine radiologische Untersuchung (Röntgen, CT, MRT) und eine laborchemische Untersuchung (II) notwendig. Bei der radiologischen Untersuchung wird gezielt nach osteolytischen Herden im Knochen und/oder einer generalisierten Osteoporose (a) gesucht. Laborchemisch sind monoklonale Immunglobuline (M-Komponente) im Serum und/ oder Bence-Jones-Protein im Urin nachweisbar (B). Eine endgültige Diagnose Multiples Myelom kann gestellt werden, wenn die Kriterien (a) und (b) bei I zutreffen, oder bei I und II je ein Kriterium zutrifft.

Stadieneinteilung nach Salmon and Durie und ISS

Anhand von nachfolgend noch näher genannten Labor und Röntgenparametern entwickelten Salmon und Durie 1975 das Salmon and Durie Stadium (SD) zur Einteilung des Multiplen Myeloms. Diese Einteilung ist bis heute in Verwendung um eine prognostische Aussage zu treffen [Greipp et. al. 2005]. **Tabelle 2.1.1** veranschaulicht die Einteilung nach Hb-Wert, Serum-Calcium, Osteolysen und Konzentration der monoklonalen Antikörper im Blut oder Urin. [Durie, Salmon 1975].

Tabelle 2.1.1 Stadieneinteilung nach Salmon und Durie: mit Angabe der Tumorzellmasse: Zellen x $10^{27} / m^2$ Körperoberfläche

Stadium I Niedrige Tumorzellmasse <0,6	Erfüllung aller 4 Kriterien: <ol style="list-style-type: none"> 1. Hb-Wert >10 g/dl 2. Serum Calcium normal 3. Röntgenologisch normales Skelett, oder nur eine solitäre Metastase 4. Geringe Konzentration monoklonaler Immunglobuline a) IgG <5 g/dl b) IgA <3 g/dl c) Leichte Ketten im Urin <4 g/24h
Stadium II	Weder Stadium I noch Stadium II
Stadium III	Eins oder mehr der folgenden Zeichen: <ol style="list-style-type: none"> 1. Hb-Wert <8 g/dl 2. Serum Calcium erhöht 3. Fortgeschrittene osteolytische Knochenveränderungen 4. Hohe Konzentrationen monoklonaler Immunglobuline a) IgA >5 g/dl b) IgG >7 g/dl c) Leichte Ketten im Urin: > 12 g/24h

Hb= Hämoglobin, IgA= Immunglobulin A, IgG= Immunglobulin G
Nach der Nierenfunktion werden die Stadien zusätzlich unterteilt:
A) Serum-Kreatinin <2 mg/dl- B) Serum Kreatinin >2mg/dl

Stadienenteilung nach ISS

Die Röntgendiagnostik bezüglich des Erkennens von Osteolysen ist trotz standardisiertem Pariser Röntgen Schema, bei der Schädel in zwei Ebenen, Wirbelsäule (Halswirbelsäule, Brustwirbelsäule, Lendenwirbelsäule in zwei Ebenen), Thorax mit Rippendarstellung, Becken und proximale Extremitätenabschnitte in zwei Ebenen untersucht werden, nicht sicher aussagekräftig. Die Stadieneinteilung ist hinsichtlich der Prognose nicht zuverlässig sensibel, da die Anzahl und Ausprägung der osteolytischen Läsionen nur schwierig im Verlauf beurteilbar und zudem untersucherabhängig ist, wurde eine neue Stadieneinteilung entwickelt [Merlini et. al. 1980]. Dieser liegt die prognostische Aussagekraft des β_2 -Mikroglobulin und des Albumins beim Multiplen Myelom zugrunde, die ihrerseits in der Salmon und Durie Stadieneinteilung nicht gewertet werden. Aus diesen Gründen entwickelten Greipp et. al. 2005 das "International Staging System for Multiple Myeloma" (ISS) (**Tabelle 2.1.2**).

Tabelle 2.1.2 Stadieneinteilung nach ISS

ISS I	β_2 -Mikroglobulin < 3.5 mg/l und Albumin \geq 35 g/l Mittleres Überleben 62 Monate
ISS II	β_2 -Mikroglobulin < 3.5 mg/l und Albumin < 35 g/l oder β_2 -Mikroglobulin 3.5 - 5.5 mg/l Mittleres Überleben 44 Monate
ISS III	β_2 -Mikroglobulin > 5.5 mg/l Mittleres Überleben 29 Monate

ISS= International Staging System for Multiple Myeloma

β2 Mikroglobulin

Das β2- Mikroglobulin ist ein nicht- glykosiliertes Polypeptid aus 100 Aminosäuren. Es ist ein löslicher Bestandteil des Haupthistokompatibilitätskomplexes I (MHC I). Dieses MHC I befindet sich auf kernhaltigen Zellen und dient der Antigenpräsentation. Seine Funktion besteht in der Interaktion und Stabilisierung der Tertiärstruktur der alpha-Kette. Unter physiologischen Bedingungen ist es in niedriger Konzentration im Urin und anderen Körperflüssigkeiten zu messen. Ist es in höheren Konzentrationen in freier Flüssigkeit, aggregieren die Moleküle zu β-Fibrillen und werden Amyloid genannt. Dieses Amyloid kann sich in Zwischenzellräumen ablagern. Ein erhöhter Wert deutet auf einen gesteigerten Zellumsatz hin und kann somit als Tumormarker und Aktivitätsmarker für das Multiple Myelom verwendet werden. Auch bei anderen Lymphomen, Pankreas und Lebertumoren, sowie bei Autoimmunprozessen kann das β2- Mikroglobulin erhöht sein [Rajkumar; 2011, Yang et. al. 2010].

Therapieansatz

Die Therapie des Multiplen Myeloms richtet sich nach dem Erkrankungsalter und Krankheitsstadium. Therapieziel ist die Elimination des Plasmaklons durch Chemotherapie, sofern die Patienten aufgrund ihrer nicht-Myelom-bedingten Vorerkrankungen dazu in der Lage sind. Patienten mit höherem Lebensalter oder mit Multimorbidität kommen für weniger intensive Therapieformen in Frage. Eine Therapieindikation liegt vor, wenn myelombedingte Endorganschäden, Zytopenien, ein Hyperviskositätssyndrom und Osteolysen vorliegen. Dann erhält der Patient ohne wesentliche Morbidität und Vorerkrankungen bis zu einem Alter von ca. 68 Jahren eine systemische Induktionstherapie (z.B. PAD-Schema: Bortezomib, Doxorubicin und Dexamethason) zur Reduktion der malignen Zellen und im Anschluss eine autologe Stammzeltransplantation (PBSCT). Neuere Therapiekonzepte sind die Erhaltungstherapie mit Thalidomid, Bortezomib oder Dexamethason / Interferon, die

einen Therapieerfolg verbessern sollen und die Rezidivrate vermindern. Zu den weniger aggressiven Therapieverfahren zählen die zytoreduktive Therapie mit Bortezomib in Kooperation mit Melphalan oder Thalidomid, oder die Kombination Lenalidomid mit Dexamethason. Bei hochsymptomatischen Osteolysen ist eine lokale Therapie mit Bestrahlung der Herde oder die orthopädische Stabilisierung indiziert; eine supportive Therapie mit Bisphosphonaten zur Eindämmung der Schädigung der Knochenmatrix wird empfohlen. Komplizierte Verläufe mit Hyperviskositätssyndrom, Nierenversagen, Infektionen oder ungünstigen osteolysebedingten Frakturen machen den Einsatz von Plasmapherese, Dialyse, Bestrahlung, orthopädische Op-Verfahren, sowie regelmäßige Immunglobulin-Substitution erforderlich.

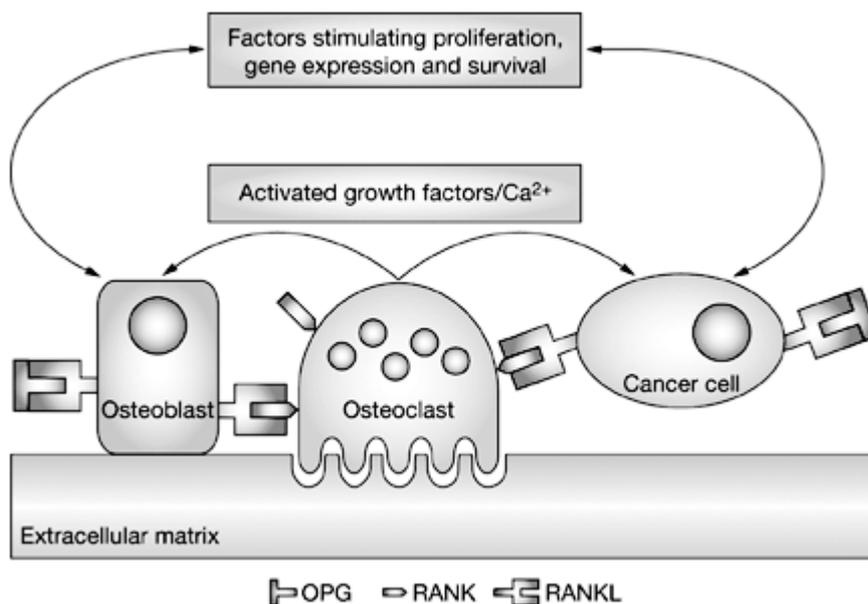
Castellano et. al. beschreiben 2011 die Rolle von Denosumab, einem Monoklonalen Antikörper gegen RANKL, als „targeted therapy“ bei Prostatakarzinom, Brustkrebs und dem Multiplen Myelom als zusätzliche wirksame Therapie von Knochenläsionen. Dieser kann RANKL spezifisch und mit einer hohen Affinität binden und neutralisieren, wie es OPG natürlicherweise vermag. Bis dato zählt dieses Therapieverfahren aber als „add on“ Therapie, vergleichbar mit der Bisphosphonat-Applikation. Grundsätzlich ist das Rezidivrisiko des Multiplen Myeloms selbst unter intensiven Therapieverfahren hoch, so dass man nach heutigem Kenntnisstand von einer möglichen Krankheitskontrolle über Jahre, aber nicht von einer definitiven Heilung ausgehen muss. Therapiekonzepte mit allogener Stammzelltransplantation sind für ausgewählte Patienten jünger als 60 Jahre geeignet.

2.2. Pathophysiologie der Knochenläsionen beim Multiplen Myelom

Bei der Entwicklung von Knochenläsionen beim Multiplen Myelom gibt es einen Zusammenhang mit einer Überexpression des Rezeptor- Aktivator- $\text{NF}\kappa\text{-B}$ - Ligand (RANKL) in den Osteoblasten und der Verminderung seines Gegenspielers dem Osteoprotegerin (OPG). Steigt das Verhältnis von RANKL zu OPG an, findet eine Aktivierung der Osteoklasten und somit eine Resorption von Knochengewebe statt [Kyle et. al 2004]. Dass die pathologische Knochenresorption durch eine vermehrte Anzahl von Osteoklasten und deren Vorläufer Zellen verursacht wird, wurde durch den Nachweis erhöhter Osteoklastenzahlen im peripheren Blut erhärtet [Rotato et. al 2005]. Die Knochenläsionen des Myeloms sind rein osteolytischer Genese ohne eine reaktive Osteoblastenantwort, bedingt durch $\text{TNF}\alpha$ induzierte Osteoblastenapoptose [Pavalko et. al. 2003, Roodman et. al. 2004]. Die Homöostase des Knochenstoffwechsels wird grundsätzlich durch komplexe Steuerungsmechanismen aufrecht erhalten, dabei spielt auch das RANK- RANKL- OPG- System, zugehörig zur TNF-Superfamilie, eine wichtige Rolle [Boyle et. al 2003]. Es zeigte sich in vorangegangenen Studien eine Assoziation mit erhöhten Werten von RANKL bei Patienten mit Multiplem Myelom und ihrer Prognose [Terpos et al 2003]. Durch die erhöhte Freisetzung von RANKL aus Myelomzellen und den indirekten Einflüssen der malignen B-Zellen zeigte sich ein Ungleichgewicht von RANKL und OPG in der Knochenstruktur [Heider et al 2003]. Diese am Knochenstoffwechsel beteiligten Zellen sind wie in bereits veröffentlichten Arbeiten durch ein Ungleichgewicht zwischen Aktivierung und Hemmung der Knochenresorption an der Entstehung von osteolytischen Herden beteiligt [Yaccoby et. al. 2004]. Das Potenzial der Myelomzellen für die Lyse der Knochenmatrix ist eine Hauptursache der Morbidität der klonalen B-Zell Erkrankung des Multiplen Myeloms. Schmiedel et. al 2012 zeigte die Beeinflussung von Myelomzellen und der posttranscriptionale/posttranslationaler Regulation der Freisetzung von RANKL.

RANK, RANKL und OPG

Durch eine lokale Expression von RANK- Ligand (Rezeptor Aktivator NfκB-Ligand) und Osteoprotegerin (OPG) organisiert sich der Knochenstoffwechsel beim Gesunden. Exprimiert werden diese Faktoren hauptsächlich von Osteoblasten, T-Lymphozyten und Fibroblasten. An den Rezeptor RANK bindet der RANK-Ligand (RANKL), der zuvor von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen gebildet wurde und Signale in den Osteoklasten aktiviert. Die Aktivierung führt zur raschen Differenzierung, Hemmung der Apoptose und Steigerung des Überlebens [Hofbauer et. al. 2001]. OPG seinerseits bindet RANKL, dadurch wird die Bindung an RANK unterbunden und die Interaktion mit Aktivierung über RANKL gehemmt. Osteoblasten und Tumorzellen exprimieren RANKL, welches an RANK an der Oberfläche von Osteoklasten bindet. (**Abbildung 2.2.1**) [Blair et. al. 2006].



OPG= Osteoprotegerin, RANK= Rezeptor Aktivator NfκB, RANKL= Rezeptor Aktivator NfκB-Ligand

Abbildung 2.2.1 Rolle des RANK- RANKL- OPG- Systems in der Interaktion der Tumorzellen und dem Knochenstoffwechsel [Blair et. al. 2006]

Bedeutung beim Multiplen Myelom

Beim Multiplen Myelom wurde festgestellt, dass in den Stromazellen des Knochens, in den Osteoblasten und wohl auch bei den Myelomzellen selbst die Expression von RANKL induziert wird [Li et. al. 2009, Yaccoby et. al. 2004]. Des Weiteren wurde beim Multiplen Myelom nachgewiesen, dass Myelomzellen den RANKL- Antagonisten OPG internalisieren und in seiner Wirkung herabstufen [Standal et. al. 2002]. Beide Mechanismen erzeugen ein Ungleichgewicht des RANKL/OPG Verhältnisses [Li et. al. 2009]. Weiterhin konnten Yang et.al zeigen, dass eine erhöhte Heparanase-Expression in den Myelom Zellen eine Knochenzerstörung durch eine signifikante Erhöhung der RANKL- Sekretion bewirkt. Heparanase ist eine Endoglycosidase, die Heparan- Sulfat an bestimmte Stellen der Zelloberflächen abspaltet und an der Tumor- und Metastasenentstehung beteiligt ist. Gesundes Gewebe enthält im Gegensatz dazu nur wenig dieses Enzyms zugunsten der RANKL- Expression [Yang et. al. 2010].

Ausgesuchte Single Nukleotid Polymorphismen (SNP)

Bei SNPs handelt es sich generell um eine kleine Veränderung von vereinzelt Basenpaaren im DNS-Strang. Diese Veränderungen sind an unterschiedlichen Regionen im Genom verteilt und können im Allgemeinen bis zu 10 Millionen mal im Erbgut auftreten. Nur 3-5% der menschlichen DNS kodieren für die Produktion von Proteinen, die meisten SNPs werden in Nicht-kodierenden-Sequenzen gefunden. Jene SNPs die in den kodierenden Sequenzen gefunden werden sind von besonderem Interesse, da diese die Funktion eines Proteins maßgeblich ändern können. SNPs stellen damit per se keinen Krankheitswert, sondern eine Variation dar. Als häufigste Veränderung findet eine spontane Desaminierung von 5-Methylcytosin zu der Base Thymin statt. Dieser Austausch findet sich bei Zweidrittel der bekannten SNPs.

In den drei Genen für *RANK*, *RANKL* und *OPG*, die mehr als 120 kbp umfassten, zeigten sich schwach bis mäßige Muster der Kopplungsungleichgewichte (LD) gemäß den Daten des internationalen HapMap Projekt (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/whatishapmap.html.en>). Aus der Datenbank des US National Center for Biotechnology Information Database (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) wurden die SNPs in den Genen für *RANK*, *RANKL* und *OPG* ausgewählt, die eine potentiell funktionelle Relevanz bezüglich der Expression, beziehungsweise Aminosäuresequenz zeigen können. Als relevant galt der Austausch eines Basenpaares und einer folgenden Änderung der Aminosäurekodierung („missense“-SNP); ebenfalls als relevant wurden SNPs angesehen, die durch ihr Vorkommen in der Promoter- (Regulations-Bereich) oder Intronregion (nicht-kodierender Abschnitt der DNS) lokalisiert waren. Insgesamt wurden 6 SNPs genotypisiert, wie zuletzt für die Psoriasis Arthritis publiziert [Assmann et. al. 2010].

RANKL

Die zwei SNPs im *RANKL* Gen (*TNFSF11*, *OMIM*602642*) auf Chromosom 13q14.11 waren nicht kodierend und in der Promotor Region (*rs9533156*) bzw. im Intron 1 (nah zur Intron 1 / Exon 2 Grenze; *rs2277438*) lokalisiert.

RANK

Die beiden SNPs von *RANK* (*TNFRSF11A*, *OMIM*603499*) auf Chromosom 18q22.1 waren beide „missense“-SNPs, die zu einem Aminosäureaustausch im *RANK* Peptid führten (*rs1805034* (Ala192Val) und *rs35211496* (Thr141His)).

OPG

Auf Chromosom 8q24 wurde in der Promotor Region des *OPG* Gens (*TNFRSF11B*, *OMIM*602643*) der SNP *rs3102735* und ein „missense“-SNP ausgesucht (*rs2073618*, Leu3Asn).

2.3 Assoziationsstudien bei SNPs

Nach der Identifizierung bestimmter SNPs kodierender oder regulatorischen Loci der Gene für *RANK-RANKL* und *OPG* wurde ein Vergleich zwischen Erkrankten und gesundem Kontrollkollektiv im Rahmen einer Assoziationsstudie durchgeführt. Eine solche Assoziationsstudie zeigt die potentiellen Häufigkeitsunterschiede in der Verteilung der Genvariationen der beiden Kollektive und identifiziert bestimmte SNPs als mögliche Risikofaktoren. Damit kann jedoch noch kein unmittelbar ätiologischer Zusammenhang zwischen der Erkrankung und den SNPs bewiesen werden.

2.4 Fragestellung

In der hier vorliegenden Arbeit soll die Assoziation von bestimmten SNPs in den Genen des *RANKL-RANK-OPG*- Systems in Bezug auf deren Auftretungswahrscheinlichkeit beim Multiplem Myelom und MGUS im Vergleich zu gesunden Kontrollen untersucht werden; zudem wird die Auftretungswahrscheinlichkeit der SNPs in definierten Subgruppen der Patienten mit Multiplem Myelom und MGUS aufgezeigt, um Hinweise für mögliche krankheitsfördernde Genvariationen auszumachen.

3. Material und Methoden

3.1 Patienten und Kontrollgruppen

Zunächst erfolgte die Isolierung von DNS aus bereits asservierten Blutproben des José Carreras Forschungszentrum und dem Virologischen Institutes der Uniklinik des Saarlandes von Patienten mit Multiplem Myelom und MGUS. Im nächsten Schritt wurde eine Untersuchung hinsichtlich des Vorkommens von SNPs in den Genen für den *RANKL*, dem *RANK* und dem *OPG* mit dem Nachweis der durch eine Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) durchgeführt. Zur Untersuchung von Unterschieden der untersuchten SNPs in der Häufigkeit der Genotyp- und Allelfrequenz wurde ein gesundes Kontrollkollektiv herangezogen und auf die gleiche Weise genotypisiert. In der anschließend durchgeführten Subgruppenanalyse untersuchte die Auftretungshäufigkeit der untersuchten SNPs hinsichtlich klinisch und serologischen Markern, wie dem Tumormarker β 2- Mikroglobulin, dem Stadium nach ISS, der Anzahl der Osteolysen, dem Hämoglobin- Wert und dem Serumcalcium.

Die primäre Anzahl zu extrahierenden Blut-und Blutbestandteil Asservaten bestand aus 383 Proben von Patienten mit den Diagnosen und Verdachtsdiagnosen Multiples Myelom und MGUS aus der Hämatologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin I der Universitätsklinik des Saarlandes. Die asservierten Vollblut- sowie Serum-Proben setzen sich aus dem Bestand des José Carreras Forschungszentrum (251 Proben) sowie aus dem Institut für Virologie und Immunologie (132 Proben) der Universitätsklinik des Saarlandes zusammen.

Das Virologische und Immunologische Institut der Universität des Saarlandes verfügt über ein Archiv an konservierten Vollblut und Serum Proben der Patienten mit Multiplem Myelom. Jede Probe die einer immunologischen Untersuchung unterzogen wurde ist katalogisiert und nach Jahreszahlen geordnet.

Die auf diese Weise katalogisierten Patienten mit der Diagnose Multiples Myelom und MGUS wurden mit der Datenbank der Virologie abgeglichen und die dort

vorhandenen Proben jeweils zur Untersuchung bereitgestellt. Dadurch flossen 32 Vollblut, sowie 100 Serum Proben ins Kollektiv ein.

Nach Ausschluss doppelt gelisteter Patienten und derer, die nach Durchsicht der klinischen Daten die Diagnosekriterien eines Multiplen Myeloms oder MGUS nicht erfüllten, entstand ein Kollektiv von 276 Patienten.

Von diesen Proben waren bei 62 die DNA Extraktion und/oder die PCR aus technischen Gründen nicht möglich (am ehesten: Probenmaterial fehlerhaft durch Lagerung und Alter).

Bei der Typisierung der SNPs mittels PCR konnten die Genotypen und Allelfrequenzen von 214 Patienten ausgewertet werden. Alle diese Patienten erfüllten die diagnostischen Kriterien für MGUS (n=36), sowie für Multiples Myelom (n=178).

Die Kontrollgruppe bestand zum einen aus 522 gesunden Blutspendern aus dem Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum des Saarlandes. Diese wurde von Herrn PD Dr. G. Aßmann bereitgestellt und entspricht den Daten aus seiner Habilitationsschrift „ Bedeutung von Genpolymorphismen in dem Tumorsupersorgen p53, dem Onkogen Mdm2, sowie in den Genen des RANK-RANKL-OPG System für die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (RA)“ an der Inneren Klinik I für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes bereitgestellt. Weitere gesunde Kontrollen wurden von der Klinik für Innere Medizin II Gastroenterologie des Universitätsklinikum des Saarlandes akquiriert. Es waren 330 gesunden Patienten, die sich einer endoskopischen Vorsorgeuntersuchung zur Früherkennung von kolorektalen Karzinomen unterzogen haben. Patientengruppe wie auch die Kontrollgruppe waren kaukasischer Abstammung. Als gesund im Hinblick auf das hier bearbeitete Thema galt die Abwesenheit einer monoklonalen Gammopathie in der Serum Elektrophorese, sowie eine unauffällige ärztliche Anamnese und Voruntersuchung hinsichtlich einer Rheumaerkrankung, Tumorerkrankung und jeder derzeit aktiven Erkrankung.

Der Altersmedian der Patienten mit Multiplem Myelom inklusive MGUS lag bei 69 Jahren (38-91), die Kontrollgruppe (n=842) war im Schnitt 13,5 Jahre jünger (Kontrolle: 45,5 Jahre (18-72)). Der überwiegende Teil der Myelompatienten war männlich (124 männlich / 90 weiblich). In der Kontrolle 518 männlich / 324 weiblich. Im Stadium ISS I befanden sich die meisten Patienten (n= 137) (Stadium II n= 40; III n=32). Betrachtete man die Stadien nach Salmon und Durie der Multiplen Myelom Patienten, befanden sich 52 Patienten im Stadium I, 20 in Stadium II und 97 Patienten in Stadium III. In der Immunelektrophorese zeigte sich erwartungsgemäß ein Überwiegen des IgG Paraproteins (IgG= 133; IgA= 38). Kappa Leichtketten waren bei 39 Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose nachzuweisen. Bei vier Patienten war die immunologische Zuordnung nicht bekannt. Das Sekretionsprotein β 2-Mikroglobulin war im Median mit 3,1 mg/l (0,6-26,7) erhöht. **(Tabelle 3.1.1)**

Die Studie war durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt. Die Studie trägt die Nummer: Ha 162/II vom 13.09.2011

Die Studie wurde nach Kriterien der Deklaration von Helsinki 2008 durchgeführt.

Tabelle 3.1.1 Patienten Charakteristiken mit Kontrollgruppe I und II

Charakteristika		Myelom/ MGUS	Kontrolle
Alter (Median) in Jahren		69 (38-91)	45,5 (18-72)
Geschlecht: männlich/weiblich		124/90	518/324
MGUS /Multiples Myelom		36/178	
Stadium (ISS)	I	93	
	II	47	
	III	38	
Stadium (Salmon & Durie)	I	64	
	II	23	
	III	87	
Immunglobulin Typen	IgA	38	
	IgG	133	
	kappa/lambda Leichtketten	39	
β2- Mikroglobulin (Median)		3,1 (0,6-26,7)	

ISS= International Staging System for Multiple Myeloma, MGUS= Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz, IgA= Immunglobulin A, IgG= Immunglobulin G

3.2 DNS Extraktion

3.2.1 DNS Extraktion aus Vollblut

Die DNS Extraktion aus den konservierten Vollblut EDTA Proben erfolgte jeweils mittels QIAamp® DNS Mini and Blood Mini Kit 11/2007 anhand des Standardprotokolls gemäß Herstellerangaben (Qiagen). Die Extraktion fand bei Raumtemperatur statt. Vor der ersten Extraktion wurden die benötigten Puffer AW 1 und AW 2 mit 96 %- 100 % Ethanol, sowie die Protease (im Kühlschrank bei maximal 8 °C aufzubewahren) mit dem dazugehörigen Lösungsmittel angemischt. Bei jedem DNA- Extraktions- Durchgang wurde zuerst in 20 beschriftete Mikrozentrifugen- Behälter 1,5 µl Qiagen Protease auf den Boden des Behälters pipettiert. 200 µl bei 8 °C langsam aufgetautes und vorsichtig gemischtes EDTA Vollblut wurden der Protease zugegeben. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 200 µl der Pufferlösung AW1. Das damit erreichte Füllungsvolumen von 401,5 µl wurde 15 s gevortext für eine homogene Lösung nach Lyse der Blut- Zellen. Danach fand eine 10 minütige Inkubation der Lösung bei 56 °C in einem zuvor vorbereiteten Heizblock statt, dadurch wurde die optimal erreichbare DNS Menge durch die Zelllyse erreicht. Im Anschluss wurden die 20 Mikrozentrifugen- Behälter für wenige Sekunden bei 8000rpm zentrifugiert, um Lösungsreste von der Behälterwand zu lösen. Im nächsten Schritt wurden jeweils 200 µl Ethanol (96 %- 100 %) zugegeben und das Gemisch mit 601,5 µl nochmals 15 s für eine homogene Lösung gevortext und anschließend bei 8000 rpm zentrifugiert. Das gesamte Volumen wurde hiernach in ein mit dem vom Hersteller mitgelieferten und zuvor beschrifteten QIAamp © Mini Spin Column pipettiert. Dabei wurde beachtet, dass man die Lösung ohne den Deckelrand zu kontaminieren in den Behälter gab um dadurch eine Aerosol- Bildung im nachfolgenden Schritt auszuschließen. Die Behälter wurden bei 8000 rpm 1 Minute zentrifugiert. In den vom Hersteller bereitgestellten QIAamp © Mini Spin Column ist eine Silikon Membran enthalten, die eine optimale Bindung und Konservierung der DNS ermöglicht. Der Überstand wurde nach Austauschen eines sauberen mitgelieferten 2 ml Sammel Behälters verworfen. Als nächstes wurden 500 µl des Waschpuffers AW1

zugegeben und erneut bei 8000 rpm einer Minute zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Die einmalig gereinigten Säulen wurden wieder in einen neuen 2 ml Behälter überführt. Ein erneuter Waschschrift erfolgte mit der Zugabe von 500 µl AW2 Puffer und einer Zentrifugation von 3 Minuten bei 14 000 rpm. Gemäß Herstellerangaben wurden die Säulen nochmals für eine Minute bei 14000 rpm in einem neuen Behälter zentrifugiert. Mögliche Ethanol Rückstände konnten auf diese Weise endgültig von den Säulen entfernt werden. Um die DNS von der Silikon Membran auszuwaschen, sah der nächste Schritt vor, die Säulen in einen 1,5 ml beschriftetes Eppendorf Gefäße zu geben und 200 µl AE Elutionspuffer zuzufügen. Es erfolgte eine 5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine nachfolgende Zentrifugation von einer Minute bei 8000 rpm. Die Säule wird verworfen und das Eppendorf Gefäß mit der darin enthaltenen DNS bei -20 °C eingefroren bis zur weiteren Verwendung [QIAamp© DNS Mini and Blood Mini Kit 11/2007 Handbook].

3.2.2 DNS Extraktion aus Serum

Die DNS Extraktion aus konservierten Serum Proben aus dem Bestand des Virologischen Institutes der Universität des Saarlandes erfolgte mittels Qiamp © MiniElute © Virus Spin 02/2007 gemäß des Standardprotokolls. Die Extraktion sollte bei Raumtemperatur stattfinden. Vor der ersten Extraktion war es vorgesehen den benötigten Puffer AW 1 und AW 2 mit 96 %- 100 % Ethanol anzumischen. Zum Resuspendieren der Carrier RNA wurde bei diesem Kit 310 µl der Puffer Lösung AVE zur Carrier RNA gegeben. Diese Lösung wurde leicht gemischt und jeweils 6,2 µl der Lösung in Eppendorf Behälter gegeben, die sofort bei -20 °C weggefroren wurden. In 1,5 ml beschriftete Eppendorf Behälter wurden jeweils 25 µl der mitgelieferten und zuvor gemäß des Protokolls angemischten Protease auf den Grund des Gefäßes pipettiert. Zu der Protease wurden jeweils 200 µl des zuvor langsam aufgetauten Serums gegeben, sowie 200 µl des Puffers AL und die ebenfalls kurzvorher aufgetauten 6,2 µl Carrier RNA gegeben. Es erfolgten 15 s vortexen für ein homogenes Gemisch. Ein homogene Gemisch war nötig, so dass Protease und Carrier RNA wirkten. Nach dem vortexen erfolgte eine Inkubation bei 56 °C für 15 Minuten um eine maximale Lyse der Zellen zu erreichen. Nach beenden der Inkubationszeit wurde erneut bei 8000 rpm für wenige Sekunden zentrifugiert um Lösungsreste vom Rand des Eppendorf Gefäßes zu entfernen. Als nächstes wurden je 250 µl Ethanol zugegeben, erneut für 15 s gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde das Gemisch in die mitgelieferten und zuvor beschrifteten Qiamp © Mini Spin Column pipettiert. Dabei war zu beachten, dass man die Lösung ohne Kontamination des Deckelrandes in den Behälter gab. Somit war eine Aerosol Bildung im nachfolgenden Schritt ausgeschlossen. Die Behälter wurden bei 8000 rpm 1 Minute zentrifugiert. In den vom Hersteller bereitgestellten Qiamp © Mini Spin Column war eine Silikon Membran enthalten die eine optimale Bindung und Konservierung der DNS ermöglichte. Der Überstand wurde verworfen durch Austauschen eines sauberen mitgelieferten 2 ml Sammel Behälters. Als nächstes wurden 500 µl des Waschpuffers AW1 zugegeben und erneut

bei 8000 rpm einer Minute zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Die einmalig gereinigten Säulen wurden in einen neuen 2 ml Behälter überführt. Ein erneuter Waschschrift erfolgte mit der Zugabe von 500 µl AW2 Puffer und einer Zentrifugation von 1 Minuten bei 8000 rpm. Der Überstand wurde hiernach verworfen. Weitere 500 µl Ethanol (96%) wurden auf das Filtrat gegeben und 1 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Filtrat in einen neuen Sammelbehälter gegeben und weitere 3 Minuten bei 14 000rpm zentrifugiert um eine vollständige Entfernung des Ethanols von der Membran zu erreichen. Zur weiteren Trocknung wurden die Säulen in neue Gefäße überführt und bei geöffnetem Deckel wird für 3 Minuten die Membran getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Säulen in ein sauberes und beschriftetes Eppendorf Gefäß gegeben. Es wurden 30 µl AVE Puffer zugegeben und die geschlossene Lösung bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert um eine optimale Auswaschung der DNS zu erreichen. Im Abschluss erfolgte die Zentrifugation bei 14 000 rpm für eine Minute. Hiernach wurden die Säulen verworfen und das Zentrifugat bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren [QIAamp© MiniElute© Virus Spin 02/2007 Handbook].

3.3 Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration und -Reinheit

Mittels des NanoDrop-ND-1000 Spektralphotometers wurde eine Überprüfung der DNS- Konzentration und -Reinheit der extrahierten Proben durchgeführt. Nukleinsäuren haben eine optische Dichte von 260nm (oD260), sie wird zur Bestimmung der Konzentration von DNS herangezogen. Die optische Dichte von 1 bei 260nm entspricht einer Konzentration von ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNS. Durch eine Verunreinigung mit Proteinen verändert sich der oD260/oD280 Quotient. Dieser sollte bei 1,7- 2,0 für verwertbare und zu genotypisierende Proben liegen. Bei Werten oberhalb und unterhalb des Bereiches (1,7-2,0) könnten zu starke Verunreinigung vorgelegen haben, was eine erneute Aufreinigung erforderte. Alle Proben wurden mit *Aqua dest* auf 50 ng / µl verdünnt. Unsere Proben zeigten nach dem Test eine DNA-Konzentration ohne wesentlichen Verunreinigungsgrad

3.4 Analyse der SNPs mittels RT- PCR

Die Genotypisierung wurde mit `` TaqMan Genotyping Assays`` durchgeführt. Es wurde die Technik von Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland anhand des Standard- Anwendungsprotokoll und der Verwendung von Primerexpress 3.0 verwendet.

Auf beschriftete PCR Platten (BIOplastics) (in Pipettierschema eingetragen) mit 95 (für Patienten DNS) + 1(Null-Wert) Kammer, wurden je Patient und SNP 2 µl DNS, mittels Multipipette pipettiert.

Zwei SNPs (*rs2277438*, *rs1805034*) wurden mittels kommerziell erhältlicher ``TaqMan Assays`` genotypisiert (TM ABI, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Der Primer-Sonden-Mix wurde nach Protokoll und Probenanzahl mit *Master Mix* (Applied Biosystems und *Aquadest* angemischt (**Tabelle 3.4.1**) und in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß gegeben. Je 5 µl TM ABI Primer-Sonden-Mix wurde zu der Patienten DNS in die

Kammern der Platten pipettiert mit einer dafür vorgesehenen Folie (BIOplastics optical Disposal Adhesive Seal) beklebt, zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gefroren.

Tabelle 3.4.1 TM ABI Primer-Sonden-Mix nach Protokoll bei 44 Proben (*SNP RANK rs1805034*)

1,25	µl	MasterMix	X	44 Proben	=	55	µl	MasterMix
0,0625	µl	Primersonde ABI	x	44 Proben	=	2,75	µl	Primersonde
3,6875	µl	Aquadest	X	44 Proben	=	162,25	µl	Aquadest

Bei den vier weiteren SNPs (*rs 9533156, rs35211496, rs2073618, rs3102735*) wurden die "TaqMan Genotyping Assays" mit dem Primer Express 3.0 Programm (Applied Biosystems) entworfen und bei Microsynth (Balgach, Schweiz) bezogen, (Primer Sequenzen erhältlich auf Rückfrage) bestimmt. Der Primer-Sonden-Mix wurde ebenfalls nach Protokoll angesetzt. Siehe auch Tabelle **3.4.2**.

Tabelle 3.4.2 MS Primer-Sonden-Mix nach Protokoll bei 44 Proben (*SNP OPG rs3102735*)

1,25	µl	MasterMix	X	44 Proben	=	55	µl	MasterMix
0,25	µl	Primersonde MS	x	44 Proben	=	11	µl	Primersonde
3,5	µl	Aquadest	X	44 Proben	=	154	µl	Aquadest

Die vorbereiteten Platten mit DNS der Multiplen Myelom Patienten und dem Primer-Sonden-Mix wurden nacheinander in das StepOnePlus RealTime PCR Gerät gegeben und über die Menüführung Zyklen Zahl und Temperatur (siehe Tabelle 3.4.3) programmiert. Es folgten drei aufeinander folgende Schritte aus denen sich die PCR zusammensetzte und nach vorgegebener Zyklen Zahl wiederholt wurden. Vorab fand die initiale Denaturierung bei 95 °C über 5 Minuten statt. Schritt 1 beinhaltete die weitere Denaturierung der DNS (Aufspaltung der Doppelstränge), hiernach wurde die Temperatur auf die vorgegebene Temperatur des betreffenden Oligonukleotid-

Primer abgesenkt (Schritt 2) (siehe Tabelle 3.4.3). Nur auf diese Weise konnte die Hybridisierung der Patienten DNS und dem Primer an komplementäre DNS Abschnitte gewährleistet werden (annealing). Hierbei amplifizierte die Polymerase den markierten DNS Bereich. Annealing und Extension konnten hierbei gleichzeitig ablaufen. Diese Schritte wurden nach der vorgegebenen Zyklenzahl wiederholt, um so eine ausreichende DNS Menge zu erhalten.

Tabelle 3.4.3 Optimal Temperatur zur Sondenhybridisierung und Zyklenzahl bei der qRT-PCR zur Genotypisierung der SNPs von *RANK*, *RANKL* und *OPG*

<i>RANK</i> <i>rs35211496</i>	<i>RANK</i> <i>rs1805034</i>	<i>RANKL</i> <i>rs2277438</i>	<i>OPG</i> <i>rs3102735</i>	<i>OPG</i> <i>rs2073618</i>	<i>RANKL</i> <i>rs1054016</i>
60 °C	60 °C	60 °C	60 °C	63 °C	64 °C
40 Zyklen	40 Zyklen	45 Zyklen	40 Zyklen	50 Zyklen	50 Zyklen

RANK=Rezeptor Aktivator *NfκB*, *RANKL*=Rezeptor Aktivator *NfκB*-Ligand, *OPG*=Osteoprotegerin

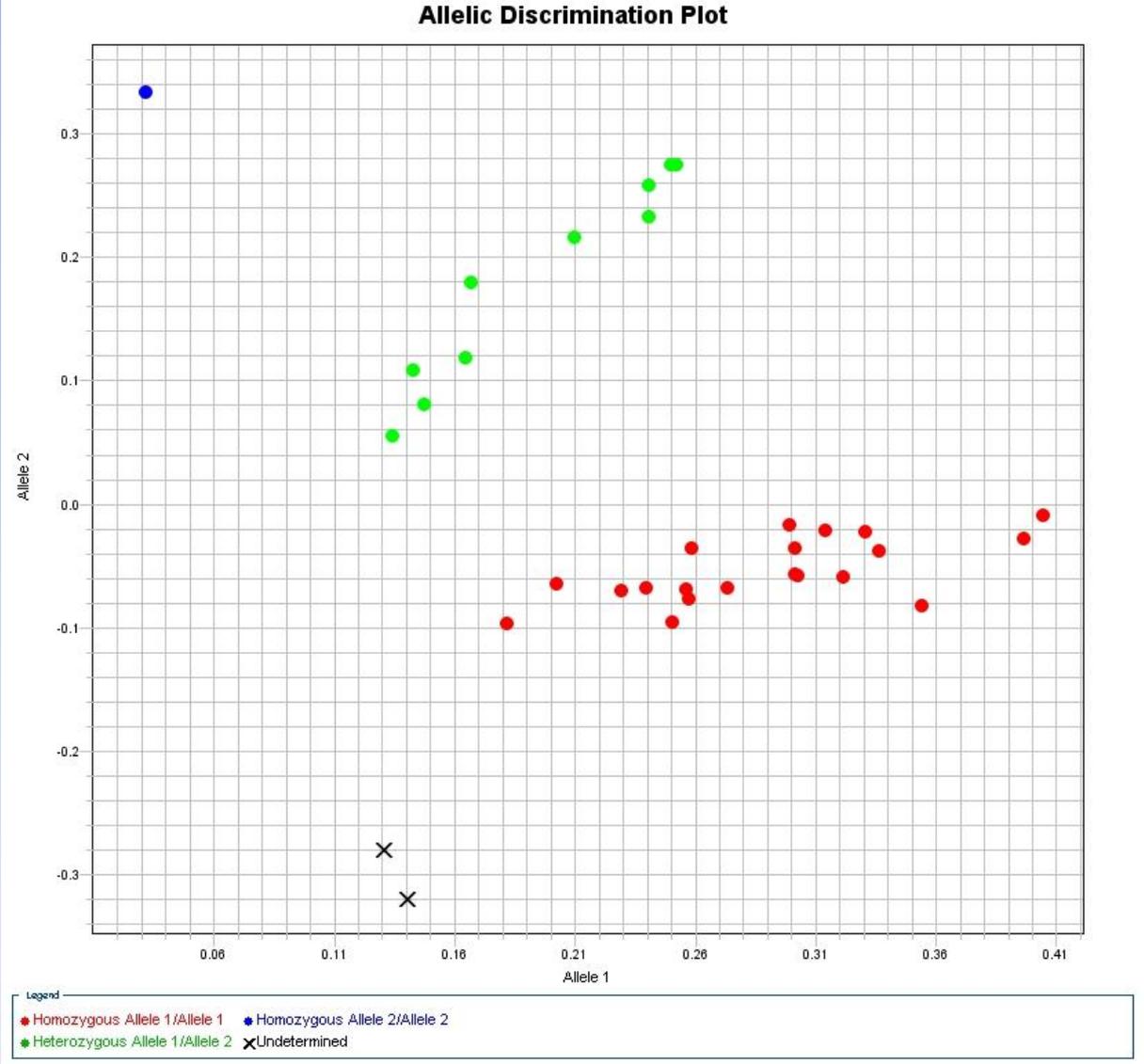
3.4.1 Quantitative realtime PCR (qRT-PCR)

Bei der qRT-PCR wird grundsätzlich bei der amplifizierten DNS simultan ein fluoreszierender Rezeptorfarbstoff detektiert und gemessen. Der Rezeptorfarbstoff bindet nicht-spezifisch, oder spezifisch an die DNS. Man kann somit Rückschlüsse auf die Quantität der detektierten DNS nehmen, da die Bindung proportional zur DNS-Menge stattfindet. Im Anschluss an jeden Zyklus wird mittels eines Detektionsmoduls das Fluoreszenzsignal detektiert und mit spezieller Software ausgewertet.

3.4.1.1 TaqMan Genotyping Assay

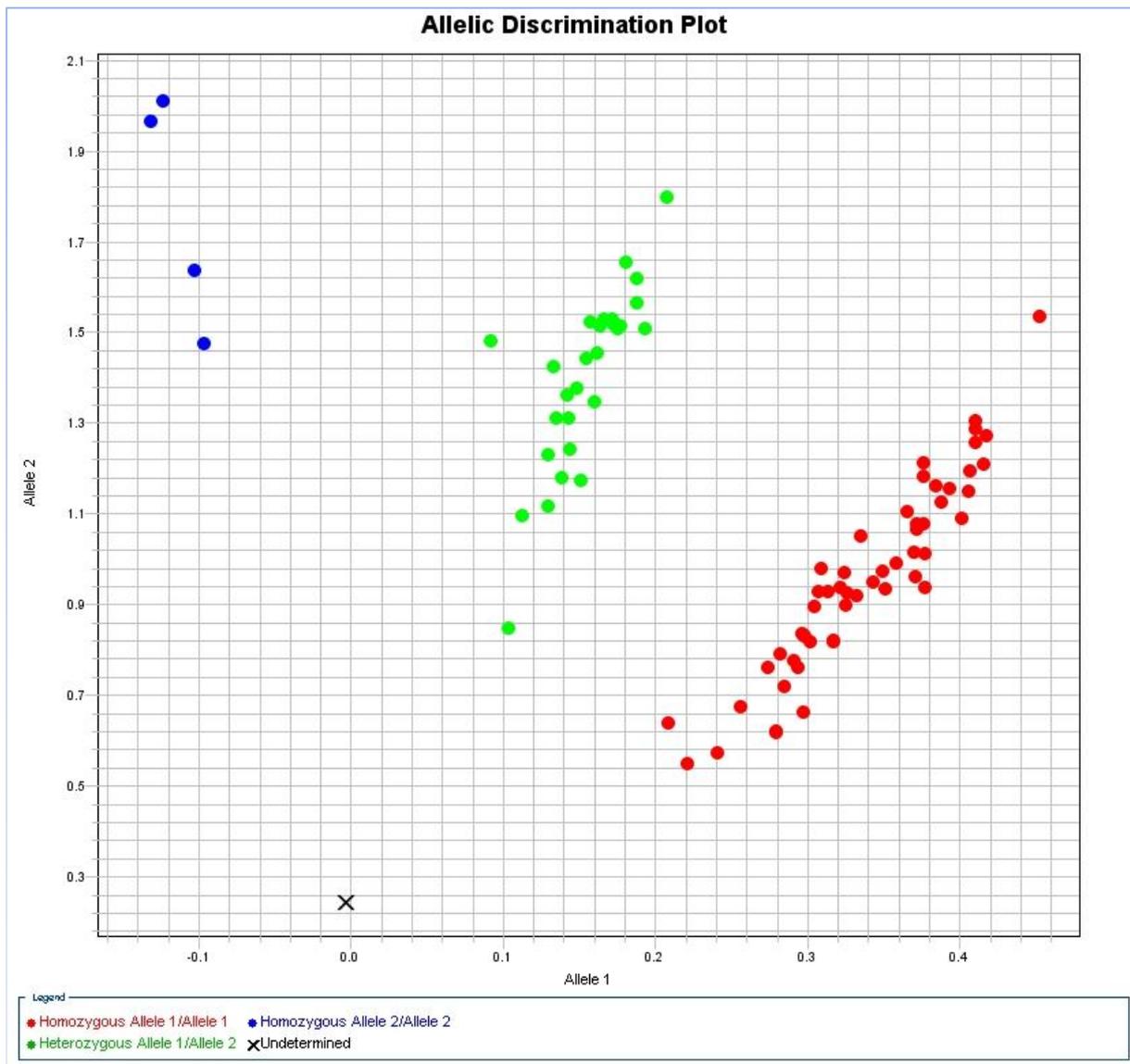
Es handelt sich bei der *TaqMan Genotyping Assay* um eine RT-PCR Methode. Das PCR Produkt wurde hierbei durch allelspezifische DNS-Sonden markiert und deren fluoreszierender Reporterfarbstoff (VIC bzw, Yakima-Yellow für Allel 1, FAM für Allel 2) mittels eines Detektionsmoduls gemessen. Die entsprechenden Sonden enthielten neben dem Reporter Farbstoff auch einen Fluoreszenzlöscher (non-fluorescent quencher, NFQ). Dieser unterdrückte in räumlicher Nähe zum Reporterfarbstoff dessen Fluoreszenz. Es fand eine spezifische Sondenbindung im Bereich des zu untersuchenden Basenaustauschs statt, die während der DNS Amplifikation durch eine 5'-3'Exonukleasenaktivität der *AmpliTaq Gold DNS Polymerase* abgebaut wurden. Nur durch die entstandene räumliche Trennung von *Reporter* und *Quencher* konnte ein Fluoreszenzsignal detektiert werden, das nach jedem Zyklus gemessen wurde. Es wurden jeweils zwei verschiedene Sonden eingesetzt, die sequenzspezifisch je ein Allel markierten. Die Sonden hybridisierten nur bei vollständiger Sequenzübereinstimmung. War ein Allel nicht vollständig komplementär, so konnte die Sonde nicht binden und blieb intakt. Es konnte dadurch keine Fluoreszenz von der Sonde ausgehen. Bei einem homozygoten Allel wurde nur ein *Reporter*-Farbstoff gemessen. War der SNP heterozygot wurden beide *Reporter*-Farbstoffe detektiert. In einem Allelplot (**Abbildung 3.4.1.1-3**) wurden die

Fluoreszenzwerte graphisch dargestellt und die Genotypen konnten abgelesen werden.



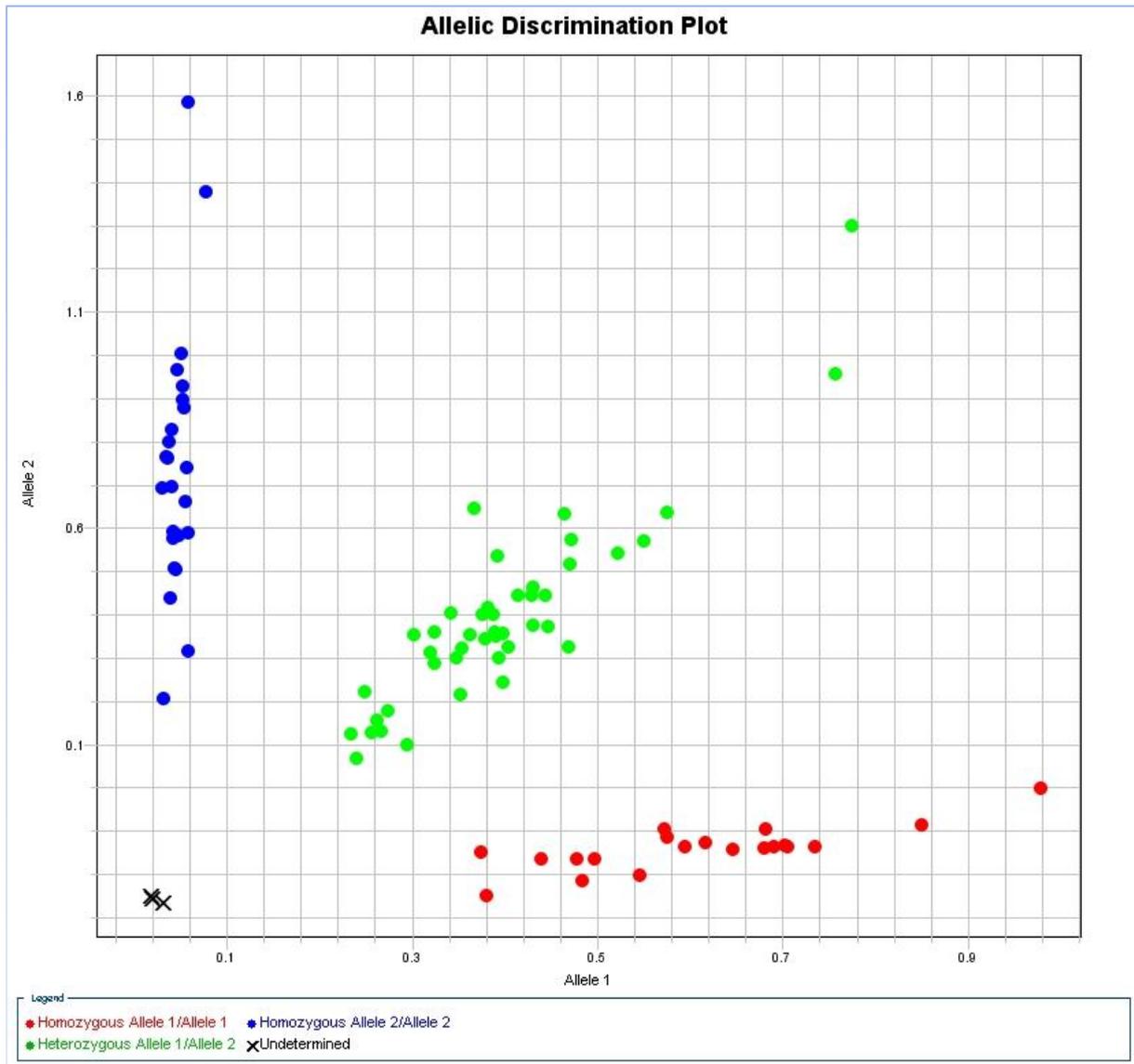
SNP=Single Nukleotid Polymorphism, RANKL=Rezeptor Aktivator NfκB-Ligand,

Abbildung 3.4.1.1 Fluoreszenz Allelplot zu SNP RANKL rs 2277438



SNP=Single Nukleotid Polymorphism, RANK=Rezeptor Aktivator NfκB

Abbildung 3.4.1.2 Fluoreszenz Allelplot zu SNP RANK rs 35211496



SNP=Single Nukleotid Polymorphism, OPG=Osteoprotegerin

Abbildung 3.4.1.3 Fluoreszenz Allelplot zu SNP OPG rs 2073618

3.5 Statistische Verfahren

Durch Verwendung des Statistikprogrammes SPSS wurden die jeweiligen SNPs in der Genotyp- und Allelfrequenz auf Unterschiede untersucht. Zur Analyse der Genotypenfrequenz wurden 2x3 Feldertafeln beim Chi-Quadrat-Test (χ^2 -test), sowie 2x2 Feldertafeln bei der Analyse der Allelfrequenzen erstellt. Bei der Allelfrequenz wurde ergänzend die Odds Ratio und das 95% -Konfidenzintervall bestimmt um die Unterschiede in der Allelfrequenz zu quantifizieren. Im Odds Ratio wird veranschaulicht, inwieweit eine Assoziation der untersuchten SNPs und dem Krankheitsrisiko zusammen hängt. Das 95 % Konfidenzintervall gibt die Unsicherheit der Schätzung des OR an. Ist das Konfidenzintervall breit, deutet es auf eine große Variabilität der Daten hin. Bei den Analysen wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant gewertet. Weiterhin wurde der Cochran-Armitage Test angewendet, wobei zu möglichen Genotypen der beiden Größen in der Subgruppenanalyse ein einseitiger p-Wert errechnet wurde. Dadurch wird eine weitere Abschätzung ermöglicht, in welchem Maß die Assoziation der Allele und Genotypen beeinflusst wird.

Die Anpassung der signifikanten Unterschiede an multiples Testen war bei Untersuchung der 6 SNP auf Unterschiede zwischen Myelompatienten und gesunden Kontrollen nicht erforderlich, da die 6 SNP jeweils als unabhängige Risikofaktoren untersucht werden (explorative Analyse ohne Hinweis auf Interaktionen, moderates Linkage-equilibrium, [Assmann et al 2010]). Bei der Subgruppenanalyse wurde die Anpassung an multiples Testen für nicht-unabhängige Subgruppen (abhängige Variablen) nicht durchgeführt, da die Subgruppen Multiples Myelom/MGUS und Myelom getrennt ausgewertet, nach nicht-abhängigen Parametern, wurden; dies für die Anwendung der Auswertung nach Hypercalcämie, Osteolysen, ISS-Stadien und β -Mikroglobulin kann eine Korrektur nach multiplen Testen sinnvoll sein und wird im Diskussionsteil mit Angabe korrigierter Werte besprochen.

4. Ergebnisse

4.1 Genotyp- und Allelfrequenz bei *RANKL*, *RANK* und *OPG* bei Patienten mit Multiplem Myelom und MGUS und der gesunden Kontrollgruppe.

Bei der PCR- gestützten Genotypisierung der Single Nucleotide Polymorphismen *RANK* (2 SNPs: *rs35211496* und *rs1805034*), *RANKL* (2 SNPs *rs2277438*, *rs9533156*) und *OPG* (2 SNPs: *rs3102735* und *rs2073618*) konnte bei keinem der 6 SNPs eine signifikante Abweichung vom das Hardy Weinberg Äquilibrium festgestellt werden. In **Tabelle 4.1.1 a-c** sind die Ergebnisse der Genotyp-und Allelfrequenzen von *RANK*, *RANKL* und *OPG* zusammengefasst. Es wurden die Verteilung der Allel und Genotypenfrequenz der kranken Patienten mit Multiples Myelom /MGUS (n=214) mit der Allel-und Genotypenfrequenz von der gesunden Kontrollgruppen verglichen (n=841). (Der Vergleich mit der Kontrolle der gesunden Patienten zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Allel- oder Genotypenfrequenz.)

Tabelle 4.1.1 Allel- und Genotypenfrequenz der genetischen Variationen in den Genen für *RANKL*, *RANK* und *OPG* bei Patienten mit Multiples Myelom und der gesunden Kontrollgruppe.

a) ***RANKL* rs 02277438 und rs 09533156**

Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	Myelom	Kontrolle	OR (95% CI)	p-Wert
<i>RANKL rs0 2277438</i>					
Allele	A	n=424 (%) 353 (83,3)	n= 1682 (%) 1406 (83,6)	0,976 (0,733-1,299)	0,868
	G	71 (16,7)	276 (16,4)		
Genotyp		n= 212 (%)	n=841 (%)		
	AA	147(69,3)	586(69,7)		0,963
	AG	59 (27,8)	234 (27,8)		
	GG	6 (2,8)	21 (2,5)		
<i>RANKL rs9533156</i>					
Allele	C	n=426 (%) 187 (43,9)	n= 1686 (%) 805 (47,7)	0,856 (0,691-1,061)	0,155
	T	239 (56,1)	881 (52,3)		
Genotyp		n=213 (%)	n= 843 (%)		
	CC	45 (21,1)	193 (22,9)		0,231
	CT	97 (45,5)	419 (49,7)		
	TT	71 (33,3)	231 (27,4)		

b) RANK rs35211496 und rs1805034

Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	Myelom	Kontrolle	OR (95% CI)	p-Wert
RANK rs35211496					
Allele	C	n=426 (%) 334 (78,4)	n=1690 (%) 1365 (80,8)	0,864	0,273
	T	92 (21,6)	325(19,2)	(0,666-1,122)	
Genotyp		n= 213 (%)	n= 845 (%)		0,467
	CC	132 (62,0)	550 (65,1)		
	CT	70 (32,9)	265 (31,4)		
	TT	11 (5,2)	30 (3,6)		
RANK rs1805034					
Allele	C	n=420(%) 194 (46,4)	n=1690 (%) 783 (46,3)	0,994	0,959
	T	226 (53,6)	907 (53,7)	(0,803-1,232)	
Genotyp		n=210 (%)	n= 845(%)		0,092
	CC	52 (24,8)	175 (20,7)		
	CT	90 (42,9)	433 (51,2)		
	TT	68 (32,4)	237 (28,0)		

c) OPG rs2073618 und rs3102735

Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	Myelom	Kontrolle	OR (95% CI)	p-Wert
OPG rs2073618					
Allele	C	n=416 (%) 222 (53,4)	n= 1682(%) 853(50,7)	1,112	0,333
	G	194 (46,6)	829(49,3)	(0,897-1,379)	
Genotyp		n=208 (%)	n=841 (%)		0,619
	CC	59 (28,4)	214 (25,4)		
	CG	104 (50,0)	425 (50,5)		
	GG	45 (21,6)	202 (24,0)		
OPG rs3102735					
Allele	T	n=418(%) 52 (12,4)	n= 1682 (%) 197 (11,7)	1,071	0,680
	C	366 (87,6)	1485 (88,3)	(0,773-1,484)	
Genotyp		n= 209 (%)	n= 841 (%)		0,091
	TT	5 (2,4)	6 (0,7)		
	TC	42 (20,1)	185 (22,0)		
	CC	162 (77,5)	650 (77,3)		

SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, RANK=Rezeptor Aktivator $Nf\kappa B$, RANKL=Rezeptor Aktivator $Nf\kappa B$ -Ligand, OPG=Osteoprotegerin, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Insgesamt betrachtet gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Vergleich der 6 SNPs *RANK* (2 SNPs: *rs35211496*, *rs1805034*), *RANKL* (2SNPs *rs2277438*, *rs9533156*) und *OPG* (2SNPs: *rs3102735*, *rs2073618*) im Vergleich mit den Gesunden aus der Kontrollgruppe. Die Allelfrequenz- und Genotypverteilungen der jeweiligen SNPs zeigten keine Unterschiede in den zwei Kollektiven. Für den SNP *RANK rs1805034* ergab die Genotypverteilung ein tendenziell, aber nicht signifikant häufigeres Auftreten des homozygoten Genotyp CC bei Myelompatienten ($p=0,092$), die Allelfrequenzen jedoch waren ohne Unterschiede (C/T: 46,4%/53,6% versus 46,3%/53,7%, **Tab 4.1.1 b**) Die Genotypenverteilung des SNP *OPG rs3102735* zeigte ebenfalls einen Trend zu dem häufigeren Vorkommen der Träger TT (homozygotes Allel) bei Myelompatienten (TT 2,4% versus 0,7%, $p=0,091$, **Tab 4.1.1 c**). Die Verteilung der Allele zeigte jedoch kein häufigeres Vorkommen des Minorallels bei Myelompatienten (T 12,4% versus 11,7%, $p=0,680$)

4.2 Subgruppenanalyse

Die Subgruppenanalyse bei den genotypisierten Myelom- und MGUS Patienten (n=214) wurde nach Geschlecht (männlich versus weiblich) und nach dem β_2 -Mikroglobulinwert (kleiner versus größer 3,5 mg/l) zum Zeitpunkt der Diagnose vorgenommen.

Bei der Subgruppenanalyse des Hämoglobinwertes (kleiner versus größer 8,5 g/dl), des ISS Stadium (I und II versus III), der Analyse der Osteolysen (0-1 vs. >1) und des Calcium-Serum-Spiegels (Normacalcämie versus Hypercalcämie), wurde nur das Patientenkollektiv mit der Diagnose Multiples Myelom (n=178) unter Ausschluss der Patienten mit der Diagnose MGUS jeweils zum Zeitpunkt der Diagnose berücksichtigt.

Tabelle 4.2.1 Subgruppenanalyse auf Unterschiede im Geschlecht bei SNP *RANK*: *rs35211496* und *rs1805034*; SNP *RANKL* *rs2277438* und *rs9533156*; SNP *OPG* *rs 3102735* und *rs2073618* bei Multiples Myelom /MGUS

Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	Männlich	Weiblich	OR (95% CI)	p-Wert
<i>RANKL rs2277438</i>					
Allele	A	n=246 (%) 204 (82,9)	n= 178 (%) 149 (83,7)	0,945 (0,563-1,587)	0,832
	G	42 (17,1)	29 (16,3)		
Genotyp		n=123 (%)	n=89 (%)		0,841
	AA	87 (70,7)	60 (67,4)		
	AG	33 (26,8)	26 (29,2)		
	GG	3 (2,4)	3 (3,4)		
<i>RANKL rs9533156</i>					
Allele	C	n=248 (%) 116 (46,8)	n= 178 (%) 71 (39,9)	1,324 (0,897-1,956)	0,158
	T	132 (53,2)	107 (60,1)		
Genotyp		n=124 (%)	n=89 (%)		0,202
	CC	31 (25,0)	14 (15,7)		
	CT	56 (45,2)	41 (46,1)		
	TT	37 (29,8)	34 (38,2)		
<i>RANK rs35211496</i>					
Allele	C	n=246 (%) 198 (80,5)	n=180 (%) 136 (75,6)	1,335 (0,839-2,122)	0,222
	T	48 (19,5)	44 (24,4)		
Genotyp		n= 123 (%)	n= 90 (%)		0,165
	CC	82 (66,7)	50 (55,6)		
	CT	34 (27,6)	36 (40,0)		
	TT	7 (5,7)	4 (4,4)		
<i>RANK rs1805034</i>					
Allele	C	n=246 (%) 119 (48,4)	n=174 (%) 75 (43,1)	1,237 (0,837-1,828)	0,286
	T	127 (51,6)	99 (56,9)		
Genotyp		n=123 (%)	n= 87(%)		0,326
	CC	28 (22,8)	24 (27,6)		
	CT	58 (47,2)	32 (36,8)		
	TT	37 (30,1)	31 (35,6)		
<i>OPG rs2073618</i>					
Allele	C	n=244 (%) 136 (55,7)	n=172 (%) 86 (50,0)	1,259 (0,851-1,862)	0,248
	G	108 (44,3)	86 (50,0)		
Genotyp		n=122 (%)	n=86 (%)		0,892
	CC	35 (28,7)	24 (27,9)		
	CG	62 (50,8)	42 (48,8)		
	GG	25 (20,5)	20 (23,3)		

Fortsetzung Tabelle 4.2.1 Subgruppenanalyse auf Unterschiede im Geschlecht bei *SNP RANK: rs35211496 und rs1805034; SNP RANKL rs2277438 und rs9533156; SNP OPG rs3102735 und rs2073618* bei Multiples Myelom /MGUS

OPG rs3102735		n=244 (%)	n= 174 (%)		
Allele	T	33 (13,5)	19 (10,9)	1,276	0,426
	C	366 (87,6)	155 (89,1)	(0,699-2,328)	
Genotyp		n=122 (%)	n=87 (%)		0,608
	TT	4 (3,3)	1 (1,1)		
	TC	24 (19,7)	18 (20,7)		
	CC	94 (77,0)	68 (78,2)		

SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, RANK=Rezeptor Aktivator NfκB, RANKL=Rezeptor Aktivator NfκB-Ligand, OPG=Osteoprotegerin, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Tabelle 4.2.2 Subgruppenanalyse des β 2-Mikroglobulinwertes auf Unterschiede <3,5 mg/l vs. >3,5 mg/l bei SNP RANK: rs 35211496 und rs 1805034; SNP RANKL rs2277438 und rs9533156; SNP OPG rs3102735 und rs2073618 bei Multiples Myelom /MGUS

Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	<3,5 mg/l	>3,5 mg/l	OR (95% CI)	p-Wert
RANKL rs2277438					
Allele	A	n=230 (%) 189 (82,2)	n=160 (%) 134 (83,7)	0,894 (0,522-1,533)	0,685
	G	41 (17,8)	26 (16,3)		
Genotyp	AA	n=115 (%) 79 (68,7)	n=80 (%) 55 (68,8)		0,609
	AG	32 (27,8)	24 (30,0)		
	GG	4 (3,5)	1 (1,2)		
RANKL rs9533156					
Allele	C	n=230 (%) 110 (47,8)	n= 1686 (%) 63 (38,9)	1,44 (0,958-2,167)	0,079
	T	120 (52,2)	99 (61,1)		
Genotyp	CC	n=115 (%) 26 (22,6)	n=81 (%) 13 (16,0)		0,463
	CT	52 (45,2)	37 (45,7)		
	TT	37 (32,2)	31 (38,3)		
RANK rs35211496					
Allele	C	n=228 (%) 179 (78,5)	n=164 (%) 129 (78,7)	0,991 (0,608-1,617)	0,972
	T	49 (21,5)	35 (21,3)		
Genotyp	CC	n=114 (%) 72 (63,2)	n=82 (%) 50 (61,0)		0,628
	CT	35 (30,7)	29 (35,4)		
	TT	7 (6,1)	3 (3,6)		
RANK rs1805034					
Allele	C	n=224 (%) 107 (47,8)	n=1690 (%) 78 (48,1)	0,985 (0,657-1,476)	0,941
	T	117 (52,2)	84 (51,9)		
Genotyp	CC	n=112 (%) 28 (25,0)	n=81 (%) 21 (25,9)		0,670
	CT	51 (45,5)	32 (39,5)		
	TT	33 (29,5)	28 (34,6)		
OPG rs2073618					
Allele	C	n=222 (%) 122 (55,0)	n=160 (%) 87 (54,4)	1,024 (0,681-1,540)	0,911
	G	100 (45,0)	73 (45,6)		
Genotyp	CC	n=111 (%) 32 (28,8)	n=80 (%) 24 (30,0)		0,239
	CG	60 (54,1)	35 (43,8)		
	GG	19 (17,1)	21 (26,3)		

Fortsetzung Tabelle 4.2.2 Subgruppenanalyse des β 2-Mikroglobulinwertes auf Unterschiede <3,5 mg/l vs. >3,5 mg/l bei SNP RANK: *rs35211496* und *rs1805034*; SNP RANKL *rs2277438* und *rs9533156*; SNP OPG *rs3102735* und *rs2073618* bei Multiples Myelom /MGUS

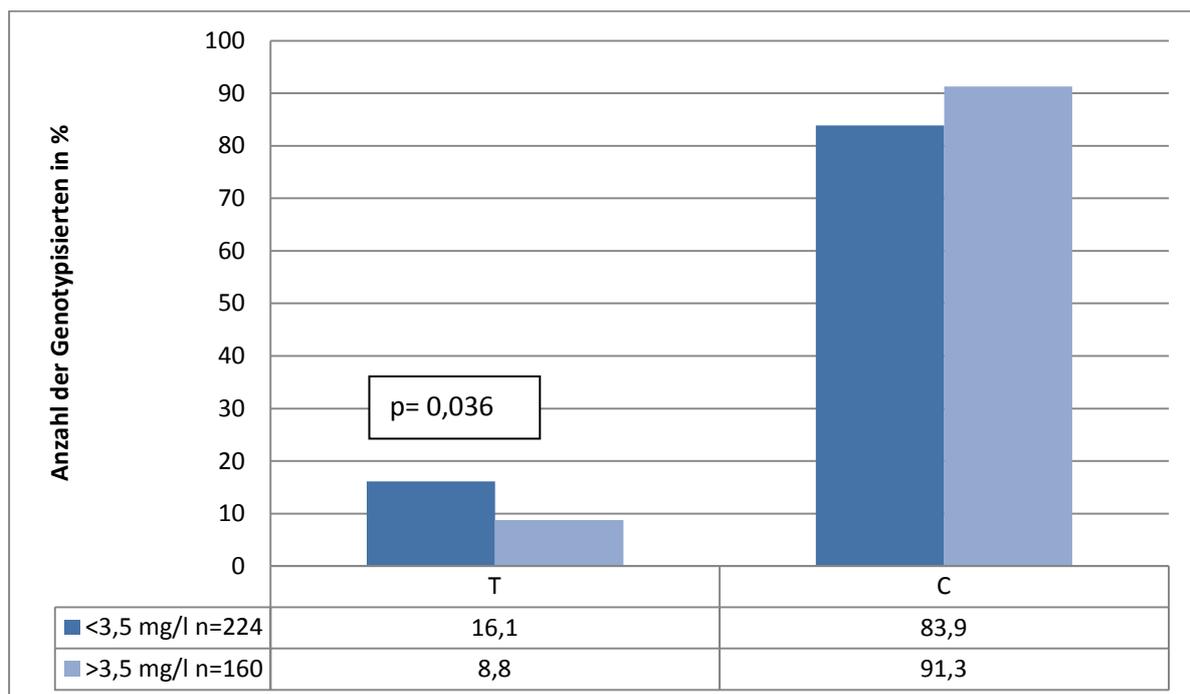
Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	<3,5 mg/dl	>3,5 mg/dl	OR (95% CI)	p-Wert
<i>OPG rs3102735</i>		n=224 (%)	n=160 (%)		
Allele	T	36 (16,1)	14 (8,8)	1,997	0,036
	C	188 (83,9)	146 (91,3)	(1,038-3,841)	
		n=112 (%)	n=80 (%)		
Genotyp	TT	4 (3,6)	1 (1,3)		0,405
	TC	25 (22,3)	14 (17,5)		
	CC	83 (74,1)	65 (81,3)		

SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, RANK=Rezeptor Aktivator Nf κ B, RANKL=Rezeptor Aktivator Nf κ B-Ligand, OPG=Osteoprotegerin, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Myelom und MGUS (n= 214)

Bei der Untersuchung auf Unterschiede bei Geschlecht (männlich versus weiblich) (**Tabelle 4.2.1**) waren bei allen 6 SNPs keine statistischen Unterschiede in der Allel- und Genotypenverteilung auszumachen.

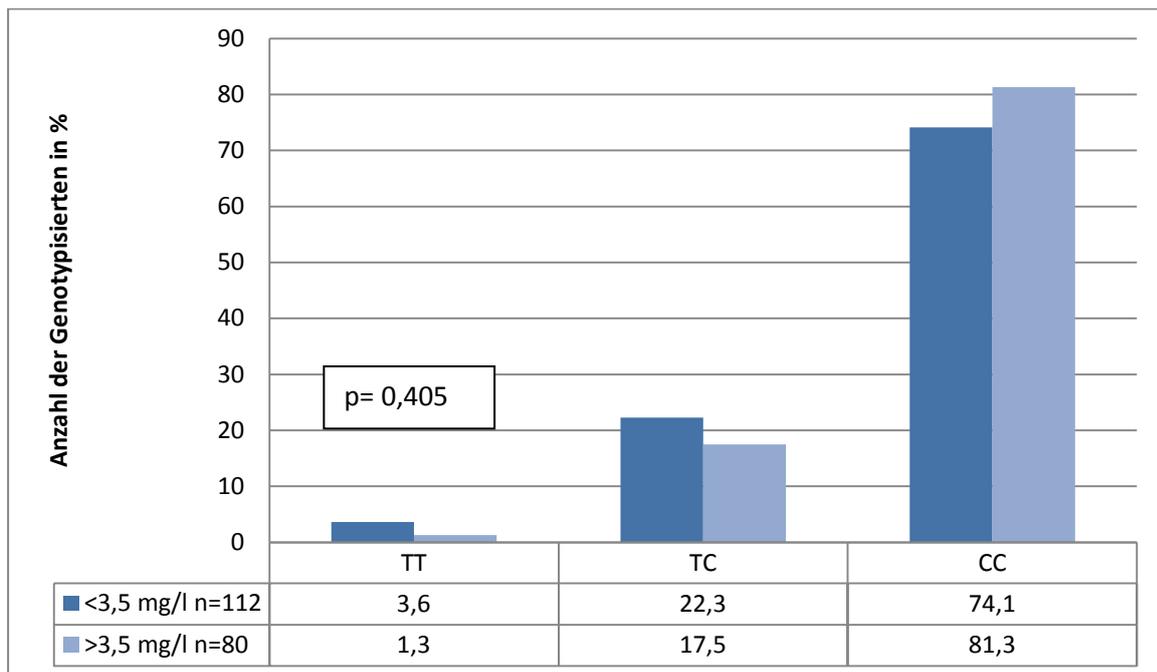
Bei der Analyse des SNP *OPG rs3102735* auf Unterschiede in der Allel- und Genotypenverteilung bei β 2-Mikroglobulin (β 2M) < 3,5 mg/l vs. >3,5 mg/l konnte ein signifikant häufigeres Vorkommen ($p=0,036$) bei dem Minorallel T für die Patienten mit einem β 2M- Wert <3,5 mg/l (OR 1,997; 95 % KI 1,038-3,841). Das Majorallel C konnte in der Gruppe mit dem nicht erhöhten β 2M dagegen 1,09 mal weniger nachgewiesen werden. **Abbildung 4.2.1** veranschaulicht die Verteilung der Allele im oben genannten Vergleich.



SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, OPG=Osteoprotegerin

Abbildung 4.2.1 Allelfrequenz bei β 2-Mikroglobulin <3,5 mg/l vs. >3,5 mg/l des SNP *OPG rs3102735*

Die Verteilung der Genotypen zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede der beiden Gruppen (β 2M: <3,5 mg/l vs. >3,5 mg/l). Der p Wert betrug 0,405, hierbei war das homozygote Minorallel TT 2,3 % weniger, der heterozygote Typ TC 4,8 % häufiger und der homozygote Typ des Majorallels 7,1 % weniger nachzuweisen in der Gruppe des β 2M unter 3,5 mg/l (**Abbildung 4.2.2**).



SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, OPG=Osteoprotegerin

Abbildung 4.2.2 Genotypenfrequenz bei β 2-Mikroglobulin <3,5 mg/l vs. >3,5 mg/l des SNP OPG rs3102735

In den weiteren Analysen auf Unterschiede in den Gruppen nicht erhöhtes gegen erhöhtes β 2M der SNPs RANK rs35211496 und rs1805034, RANKL rs2277438, rs9533156 und OPG rs3102735 bei Patienten mit Multiplen Myelom und MGUS (n=214) zeigten sich keine weiteren signifikanten Unterschiede (**Tabelle 4.2.2**). Lediglich ein Trend zu vermehrter Häufigkeit der Minorallel Träger bei den Subgruppen mit β 2M < 3,5mg/l war festzustellen (C 47,8% versus 38,9%)

Multiples Myelom (n=178)

Die weiteren Subgruppenanalyse der 6 SNPs *RANK* (2 SNPs: *rs35211496*, *rs1805034*), *RANKL* (2 SNPs *rs2277438*, *rs9533156*) und *OPG* (2 SNPs: *rs3102735* , *rs2073618*) erfolgte zu Unterschieden bei ISS Stadium (I und II versus III), Osteolysen (0-1 vs. >1), Hämoglobinwert (kleiner versus größer 8,5 g/dl), und Serumcalcium (Normocalcämie vs. Hypercalcämie) mit dem Patientenkollektiv mit der Diagnose Multiples Myelom (n=178) wobei Patienten mit der Diagnose MGUS (n=36) jeweils ausgeschlossen wurden.

Tabelle 4.2.4 Subgruppenanalyse des ISS Stadium auf Unterschiede Stadium I/II vs. Stadium III bei SNP RANK: rs35211496 und rs1805034; SNP RANKL rs2277438 und rs9533156; SNP OPG rs3102735 und rs2073618 beim Multiplen Myelom

Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	ISS I/II	ISS III	OR (95% CI)	p-Wert
RANKL rs2277438					
Allele	A	n=278 (%) 235 (84,5)	n= 76 (%) 59 (77,6)	1,575 (0,839-2,956)	0,155
	G	43 (15,5)	17 (22,4)		
Genotyp		n= 139 (%)	n=38 (%)		
	AA	98 (70,5)	24 (63,2)		0,654
	AG	37 (26,6)	13 (34,2)		
	GG	4 (2,9)	1 (2,6)		
RANKL rs9533156					
Allele	C	n=280 (%) 132 (47,1)	n= 76 (%) 26 (34,2)	1,715 (1,011-2,910)	0,044
	T	148 (52,9)	50 (65,8)		
Genotyp		n=140 (%)	n= 38 (%)		
	CC	32 (22,9)	5 (13,2)		0,026
	CT	70 (50,0)	14 (36,8)		
	TT	38 (27,1)	19 (50,0)		
RANK rs35211496					
Allele	C	n=278 (%) 216 (77,7)	n=76 (%) 57 (75,0)	1,161 (0,643-2,097)	0,620
	T	62 (22,3)	19 (25,0)		
Genotyp		n= 139 (%)	n=38 (%)		
	CC	86 (61,9)	21 (55,3)		0,659
	CT	44 (31,7)	15 (39,5)		
	TT	9 (6,5)	2 (5,3)		
RANK rs1805034					
Allele	C	n=276 (%) 128 (46,4)	n=76 (%) 30 (39,5)	1,326 (0,791-2,224)	0,284
	T	148 (53,8)	46 (60,5)		
Genotyp		n=138 (%)	n= 38(%)		
	CC	32 (23,2)	10 (26,3)		0,092
	CT	62 (44,9)	12 (31,6)		
	TT	44 (31,9)	16 (42,1)		

Fortsetzung Tabelle 4.2.4 Subgruppenanalyse des ISS Stadium auf Unterschiede Stadium I/II vs. Stadium III bei SNP RANK: *rs35211496* und *rs1805034*; SNP RANKL *rs2277438* und *rs9533156*; SNP OPG *rs3102735* und *rs2073618* beim Multiplen Myelom

Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	ISS I/II	ISS III	OR (95% CI)	p-Wert
OPG rs2073618					
Allele	C	n=274 (%) 142 (51,8)	n=76 (%) 37 (48,7)	1,134 (0,682-1,885)	0,628
	G	132 (48,8)	39 (51,3)		
Genotyp		n=137 (%)	n=38 (%)		
	CC	35 (25,5)	10 (26,3)		0,701
	CG	68 (49,6)	21 (55,3)		
	GG	34 (24,8)	7 (18,4)		
OPG rs3102735					
Allele	T	n=272 (%) 25 (9,2)	n=76 (%) 16 (21,1)	0,38 (0,191-0,755)	0,005
	C	247 (90,8)	60 (78,9)		
Genotyp		n= 136 (%)	n= 38 (%)		
	TT	3 (2,2)	0 (0,0)		0,219
	TC	24 (17,6)	11 (28,9)		
	CC	109 (80,1)	27 (71,7)		

RANK=Rezeptor Aktivator $Nf\kappa B$, SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, RANKL=Rezeptor Aktivator $Nf\kappa B$ -Ligand, OPG=Osteoprotegerin, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Tabelle 4.2.5 Subgruppenanalyse von Osteolysen auf Unterschiede 0-1 Osteolyse vs. > 1 Osteolyse bei SNP RANK: *rs35211496* und *rs1805034*; SNP RANKL *rs2277438* und *rs9533156*; SNP OPG *rs3102735* und *rs2073618* beim Multiplen Myelom

Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	0-1	>1	OR (95% CI)	p-Wert
RANKL rs2277438					
Allele	A	n=150 (%) 123 (82,0)	n=204 (%) 171 (83,8)	0,879 (0,503-1,537)	0,651
	G	27 (18,0)	33 (16,2)		
Genotyp		n= 75 (%)	n=102 (%)		0,960
	AA	51 (68,0)	71 (69,6)		
	AG	22 (29,3)	28 (27,5)		
	GG	2 (2,7)	3 (2,9)		
RANKL rs9533156					
Allele	C	n=150 (%) 78 (52,0)	n= 206 (%) 80 (38,8)	1,706 (1,115-2,611)	0,014
	T	72 (48,0)	126 (61,2)		
Genotyp		n=75 (%)	n= 103 (%)		0,264
	CC	17 (22,7)	20 (19,4)		
	CT	39 (52,0)	45 (43,7)		
	TT	19 (25,3)	38 (36,9)		
RANK rs35211496					
Allele	C	n=150 (%) 117 (78,0)	n=204 (%) 156 (76,5)	1,091 (0,659-1,806)	0,735
	T	33 (22,0)	48 (23,5)		
Genotyp		n= 75 (%)	n= 102 (%)		0,148
	CC	44 (58,7)	63 (61,8)		
	CT	29 (38,7)	30 (29,4)		
	TT	2 (2,7)	9 (8,8)		
RANK rs1805034					
Allele	C	n=148(%) 69 ()	n=204 (%) 89 ()	1,129 (0,738-1,727)	0,577
	T	79 ()	115 ()		
Genotyp		n=74 (%)	n=102 (%)		0,628
	CC	15 (20,3)	27 (26,5)		
	CT	33 (44,6)	41 (40,2)		
	TT	26 (35,1)	34 (33,3)		

Fortsetzung Tabelle 4.2.5 Subgruppenanalyse von Osteolysen auf Unterschiede 0-1 Osteolyse vs. > 1 Osteolyse bei SNP RANK: rs35211496 und rs1805034; SNP RANKL rs2277438 und rs9533156; SNP OPG rs3102735 und rs2073618 beim Multiplen Myelom

Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	0-1	>1	OR (95% CI)	p-Wert
OPG rs2073618					
Allele	C	n=148 (%) 81 (54,7)	n= 202(%) 98 (48,5)	1,283 (0,839-1,963)	0,251
	G	67 (45,3)	104 (51,5)		
Genotyp		n=74 (%)	n=101 (%)		
	CC	21 (28,4)	24 (23,8)		0,288
	CG	40 (54,1)	49 (48,5)		
	GG	13 (17,6)	28 (27,7)		
OPG rs3102735					
Allele	T	n=146 (%) 19 (13,0)	n= 202 (%) 22 (10,9)	1,224 (0,636-2,355)	0,544
	C	127 (87,0)	180 (89,1)		
Genotyp		n= 73 (%)	n= 101 (%)		
	TT	2 (2,7)	1 (1,0)		0,668
	TC	14 (19,2)	21 (20,8)		
	CC	57 (78,1)	79 78,2)		

RANK=Rezeptor Aktivator $Nf\kappa B$, SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, RANKL=Rezeptor Aktivator $Nf\kappa B$ -Ligand, OPG=Osteoprotegerin, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Tabelle 4.2.6 Subgruppenanalyse von Hb-Serum Werten auf Unterschiede >8,5 g/dl vs. < 8,5 g/dl bei SNP RANK: rs35211496 und rs1805034; SNP RANKL rs2277438 und rs9533156; SNP OPG rs 03102735 und rs2073618 beim Multiplen Myelom

Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	>8,5g/dl	<8,5 g/dl	OR (95% CI)	p-Wert
RANKL rs2277438					
Allele	A	277 (83,4)	10 (83,3)	1,007 (0,215-4,724)	0,993
	G	55 (16,6)	2 (16,7)		
Genotyp		n= 166 (%)	n=6 (%)		
	AA	115 (69,3)	4 (66,7)		0,055
	AG	48 (28,9)	1 (16,7)		
GG	3 (1,8)	1 (16,7)			
RANKL rs9533156					
Allele	C	153 (45,8)	0 (0)	0,542 (0,491-0,598)	0,002
	T	181 (54,2)	12 (100)		
Genotyp		n=167 (%)	n=6 (%)		
	CC	35 (21,0)	0 (0)		0,424
	CT	79 (47,3)	4 (66,7)		
TT	53 (31,7)	2 (33,3)			
RANK rs35211496					
Allele	C	256 (77,1)	10 (83,3)	0,674 (0,144-3,141)	0,613
	T	76 (22,9)	2 (16,7)		
Genotyp		n=166 (%)	n=6 (%)		
	CC	101 (60,8)	4 (66,7)		0,806
	CT	54 (32,5)	2 (33,3)		
TT	11 (6,6)	0 (0)			
RANK rs1805034					
Allele	C	145 (43,9)	8 (66,7)	0,392 (0,116-1,327)	0,120
	T	185 (56,1)	4 (33,3)		
Genotyp		n=165 (%)	n=6 (%)		
	CC	38 (23,0)	3 (50,0)		0,297
	CT	69 (41,8)	2 (33,3)		
TT	58 (35,2)	1 (16,7)			

Fortsetzung Tabelle 4.2.6 Subgruppenanalyse von Hb-Serum Werten auf Unterschiede >8,5 g/dl vs. < 8,5 g/dl bei SNP RANK: rs35211496 und rs1805034; SNP RANKL rs2277438 und rs9533156; SNP OPG rs3102735 und rs2073618 beim Multiplen Myelom

Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	>8,5g/dl	<8,5 g/dl	OR (95% CI)	p-Wert
OPG rs2073618					
Allele	C	n=328 (%) 173 (52,7)	n= 12(%) 4 (33,3)	2,232 (0,659-7,558)	0,186
	G	155 (47,3)	8 (66,7)		
Genotyp	CC	n=164 (%) 44 (26,8)	n=6 (%) 1 (16,7)		0,028
	CG	86 (52,4)	1 (16,7)		
	GG	34 (20,7)	4 (66,7)		
OPG rs3102735					
Allele	T	n=326 (%) 40 (12,3)	n=12 (%) 0 (0)	0,877 (0,842-0914)	0,196
	C	286 (87,7)	12 (100)		
Genotyp	TT	n=163 (%) 3 (1,8)	n=6 (%) 0 (0,0)		0,418
	TC	34 (20,9)	0 (0,0)		
	CC	126 (77,3)	6 (100)		

RANK=Rezeptor Aktivator $Nf\kappa B$, SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, RANKL=Rezeptor Aktivator $Nf\kappa B$ -Ligand, OPG=Osteoprotegerin, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Tabelle 4.2.7 Subgruppenanalyse des Serumcalciumwertes auf Unterschiede Normocalcämie vs Hypercalcämie *SNP RANK: rs35211496 und rs1805034; SNP RANKL rs2277438 und rs9533156; SNP OPG rs3102735 und rs2073618* bei Multiples Myelom /MGUS

Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	normocalcämisch	hypercalcämisch	OR (95% CI)	p-Wert
RANKL rs2277438					
Allele	A	n=242 (%) 204 (84,3)	n=90 (%) 74 (82,2)	1,161 (0,611- 2,205)	0,649
	G	38 (15,7)	16 (17,8)		
Genotyp		n= 121 (%)	n=45 (%)		
	AA	83 (68,6)	34 (75,6)		0,296
	AG	36 (29,8)	9 (20,0)		
GG	2 (1,7)	2 (4,4)			
RANKL rs9533156					
Allele	C	n=242 (%) 104 (42,9)	n=92 (%) 46 (50,0)	0,754 (0,466- 1,220)	0,249
	T	138 (57,1)	46 (50,0)		
Genotyp		n=121 (%)	n=79 (%)		
	CC	26 (21,5)	9 (19,6)		0,869
	CT	58 (47,9)	21 (45,7)		
TT	37 (30,6)	19 (34,8)			
RANK rs35211496					
Allele	C	n=240 (%) 188 (78,3)	n=92 (%) 68 (73,9)	1,276 (0,731- 2,228)	0,391
	T	52 (21,7)	24 (26,1)		
Genotyp		n= 120 (%)	n=46 (%)		
	CC	77 (64,2)	24 (52,2)		0,163
	CT	34 (28,3)	20 (43,5)		
TT	9 (7,5)	2 (4,3)			
RANK rs1805034					
Allele	C	n=240 (%) 112 (46,7)	n=90 (%) 40 (44,4)	1,094 (0,672- 1,780)	0,718
	T	128 (53,3)	50 (55,6)		
Genotyp		n=120 (%)	n=45 (%)		
	CC	24 (20,0)	15 (33,3)		0,159
	CT	55 (45,8)	15 (33,3)		
TT	41 (34,2)	16 (33,4)			

Fortsetzung Tabelle 4.2.7 Subgruppenanalyse des Serumcalciumwertes auf Unterschiede Normocalcämie vs Hypercalcämie SNP *RANK*: *rs35211496* und *rs1805034*; SNP *RANKL* *rs2277438* und *rs9533156*; SNP *OPG* *rs3102735* und *rs2073618* bei Multiples Myelom /MGUS

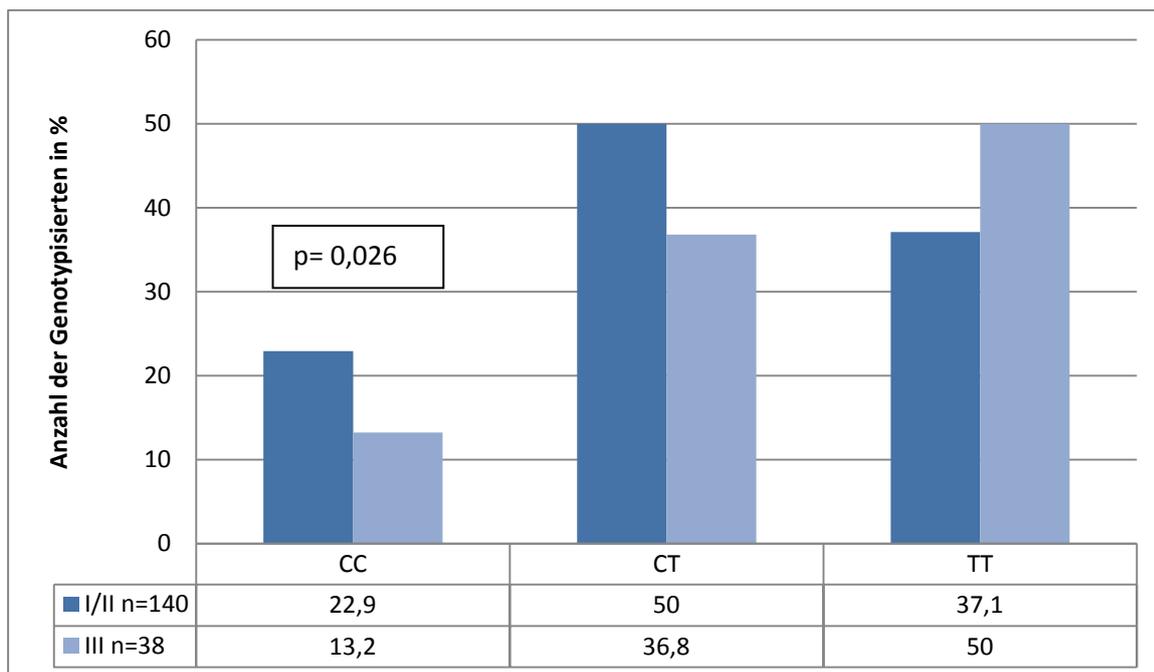
Allel- und Genotypenfrequenz	Allele	normocalcämisch	hypercalcämisch	OR (95% CI)	p-Wert
<i>OPG rs2073618</i>		n=238 (%)	n=90 (%)		
Allele	C	124 (52,1)	49 (54,4)	0,91 (0,559- 1,481)	0,704
	G	114 (47,9)	41 (45,6)		
Genotyp		n=119 (%)	n=45 (%)		0,803
	CC	32 (26,9)	11 (24,4)		
	CG	61 (51,3)	22 (48,9)		
	GG	26 (21,8)	12 (26,7)		
<i>OPG rs3102735</i>		n=236 (%)	n=90 (%)		
Allele	T	29 (12,3)	12 (13,3)	0,911 (0,443- 1,873)	0,799
	C	207 (87,7)	78 (86,7)		
Genotyp		n=118 (%)	n=45 (%)		0,548
	TT	3 (2,5)	0 (0,0)		
	TC	24 (20,3)	10 (22,2)		
	CC	91 (77,1)	35 (77,8)		

RANK=Rezeptor Aktivator *NfκB*, *SNP*=Single Nukleotid Polymorphismus, *RANKL*=Rezeptor Aktivator *NfκB*-Ligand, *OPG*=Osteoprotegerin, *T*=Thymin, *C*=Cytosin, *G*=Guanin

Untersuchung auf Unterschiede in der Verteilung der Allele und Genotypen beim Stadium nach ISS bei *RANKL rs9533156* und *OPG rs3102735* (n= 178)

Bei der Subgruppenanalyse der Patienten mit Multiples Myelom des Stadiums ISS auf Unterschieden der Gruppe ISS I und II vs. Gruppe III waren signifikante Unterschiede der Allel- und Genotypenfrequenz bei SNP *RANKL rs9533156*, sowie bei der Allelfrequenz des SNPs *OPG rs3102735* aufzuweisen.

Bei SNP *RANKL rs9533156* waren die Unterschiede der Verteilung in den Gruppen ISS I/II vs. ISS III der Allele C und T signifikant ($p=0,044$). Dabei war eine Assoziation der Patienten mit Myelom der früheren Krankheitsstadien ISS I/II und dem Minorallel C zu erkennen. In der Gruppe der früheren Myelomstadien konnte das Minorallel 1,37 mal (I/II 47,1 % vs. III 34,2 %) häufiger nachgewiesen werden als beim fortgeschrittenem Stadium III (OR 1,715; 95 % KI (1,011-2,910)). Auch in der Genotypenverteilung zeigte sich eine Assoziation des homozygoten Minorallels CC mit dem Krankheitsstadium ISS I/II. **Abbildung 4.2.3** verdeutlicht, dass der Genotyp CC in der Gruppe des fortgeschrittenem Myelomstadium nach ISS (13,2 %) 1,7 mal weniger häufig vorkam als in der Gruppe ISS I/II (22,9 %, $p= 0,026$). Im Armitage-Test auf Unterschiede in der Verteilung der Allele und Genotypen untereinander konnten signifikante Werte (TT vs. CC $p 0,031$; C vs. T $p 0,011$), wie in **Tabelle 4.2.8** aufgeführt, nachgewiesen werden.



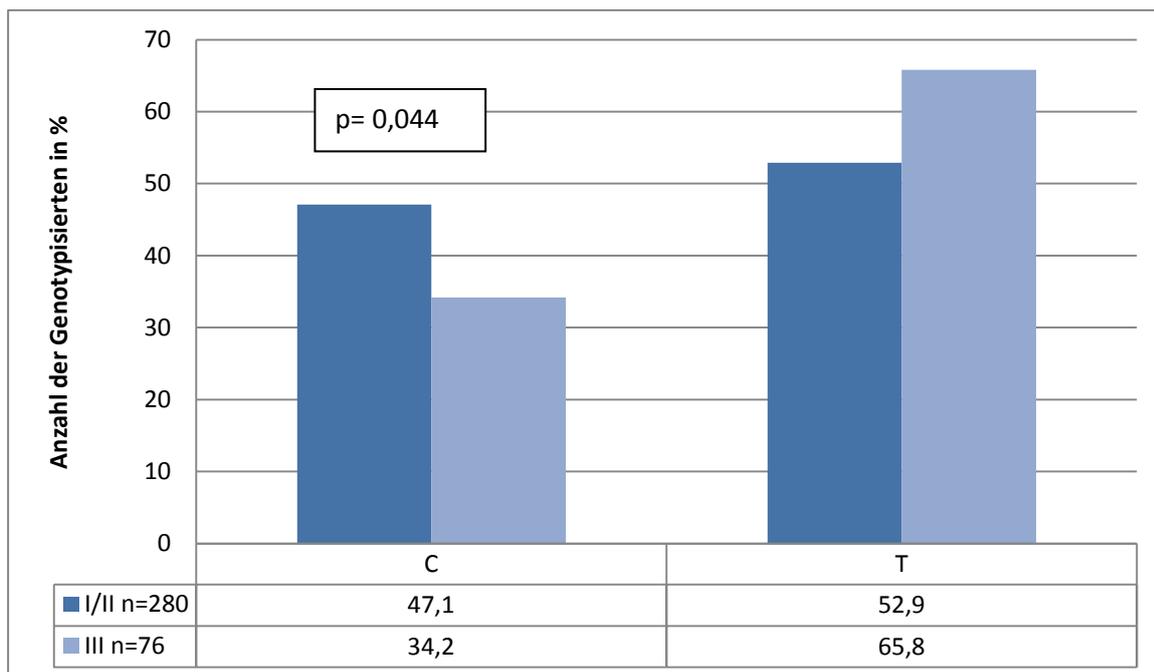
ISS=International Staging System for Multiple Myeloma, SNP=Single Nukleotid Polymorphism, RANKL=Rezeptor Aktivator NfκB-Ligand, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Abbildung 4.2.3 Genotypenfrequenz bei ISS I/II vs III des SNP RANKL rs9533156

Tabelle 4.2.8 Armitage-Test der Genotypen für SNP RANKL rs 9533156

Verteilung der Allele und Genotypen	Genotypenvergleich
OR	TT vs. CC
95 % KI	0,312
p-Wert	(0,105-0,931)
	0,031

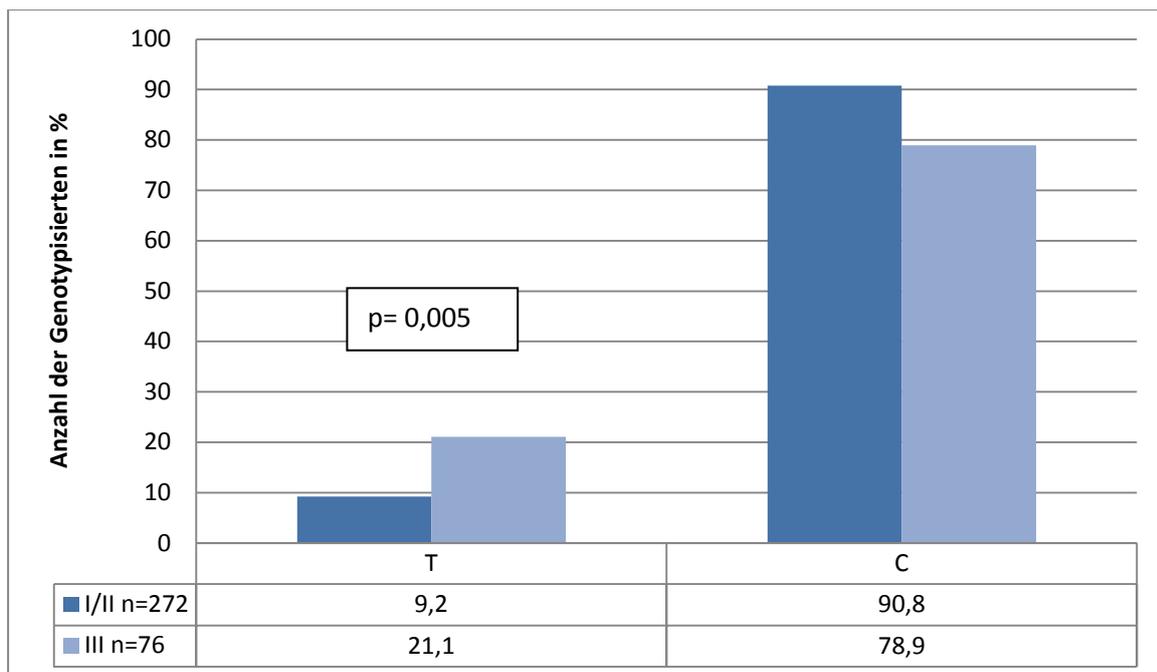
T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin



ISS=International Staging System for Multiple Myeloma, SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, RANKL=Rezeptor Aktivator NfκB-Ligand, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

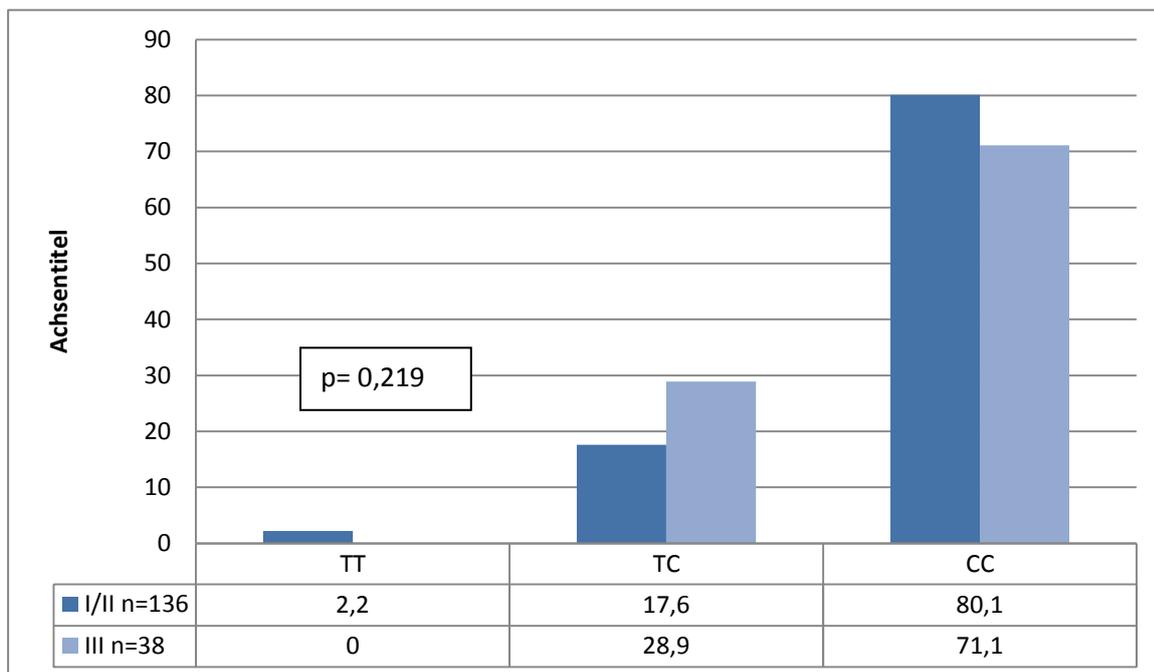
Abbildung 4.2.4 Allelfrequenz bei ISS I/II vs III des SNP RANKL rs9533156

Bei Patienten im fortgeschrittenem Stadium III zeigte sich bei SNP *OPG rs3102735* signifikant höhere Allelfrequenzen für das Minorallel T (21,1% vs. 9,2%; $p=0,005$; OR 0,380 95 % KI (0,191-0,755)), so zeigt sich das Minorallel T 2,3 mal häufiger im Stadium ISS III als im Stadium ISS I/II (I/II 9,2 %; III 21,1 %). Das Majorallel C mit 90,8 % bei Stadium I/II und 78,9 % bei Stadium III war in diesem Fall 1,2 mal weniger häufige im hohen Stadium aufgetreten als im Stadium I/II **Abbildung 4.2.5** Die Verteilung der entsprechenden Genotypen des SNP *OPG rs3102735* war ohne signifikante Unterschiede der Krankheitsstadien (p 0,219). Der durchgeführte Armitage-Test auf Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen (**Tabelle 4.2.9**) bestätigte die Ergebnisse aus der Genotypenauswertung.



ISS=International Staging System for Multiple Myeloma, SNP=Single Nukleotid Polymorphism, OPG=Osteoprotegerin, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Abbildung 4.2.5 Allelfrequenz bei ISS I/II vs III des SNP *OPG rs3102735*



ISS=International Staging System for Multiple Myeloma, SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, OPG=Osteoprotegerin, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Abbildung 4.2.6 Genotypenfrequenz bei ISS I/II vs III des SNP OPG rs3102735

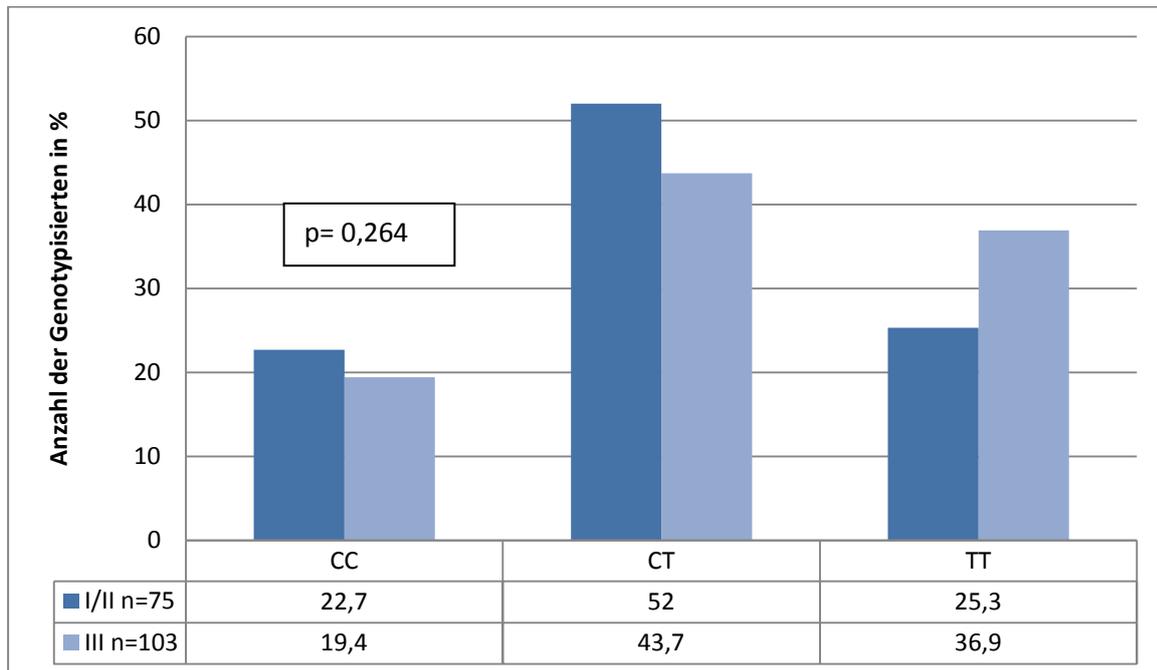
Tabelle 4.2.9 Armitage-Test der Genotypen für SNP OPG rs3102735

Verteilung der Allele und Genotypen	Genotypenvergleich
OR	CC vs. TT
95 % KI	0,569
p-Wert	(0,029-11,340)
	0,3899

OPG=Osteoprotegerin, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Untersuchung auf Unterschiede in der Verteilung der Allele und Genotypen bei den Gruppen 0-1 Osteolyse vs. >1 Osteolyse bei Multiplen Myelom (n=178)

In der Betrachtung der Osteolysen bei Multiples Myelom worin die Patientengruppen 0- 1 Osteolyse gegen mehr als eine Osteolyse untersucht wurde, zeigte der SNP *RANKL rs9533156* eine statistisch unterschiedliche Allelfrequenz. Hierbei konnte wie in **Abbildung 4.2.8** graphisch dargestellt 1,27mal mehr von Majorallel T bei Patienten mit mehr als einer Osteolyse festgestellt werden. In der Genotypenverteilung zeichnete sich kein Unterschied ($p=0,264$) der Gruppen ab. Das homozygote Minorallel war 1,1 mal mehr bei Patienten mit einer höheren Zahl an Osteolysen zu verzeichnen, das homozygote Majorallel TT war zweimal mehr bei Patienten mit Osteolysen >1. Vergleicht man im Armitage-Test die Genotypen und Allele, veranschaulicht in **Tabelle 4.2.10** konnten keine statistischen Unterschiede adjustiert nach Osteolysen 0-1 und mehr als einer Osteolyse gezeigt werden.



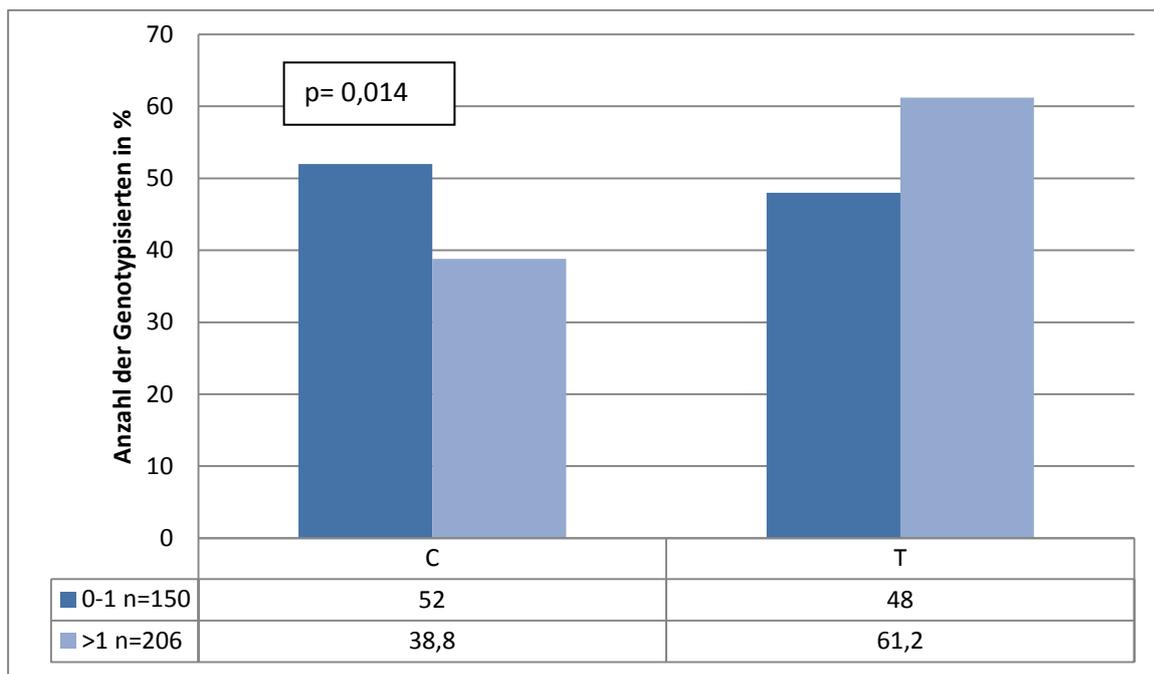
SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, RANKL=Rezeptor Aktivator NfκB-Ligand, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Abbildung 4.2.7 Genotypenfrequenz bei Osteolysen 0-1 vs. >1 bei SNP RANKL rs9533156

Tabelle 4.2.10 Armitage-Test der Genotypen und Allele für SNP RANKL rs9533156

Verteilung der Allele und Genotypen	Genotypenvergleich	Allelvergleich
OR	TT vs. CC 0,588	T vs. C 0,164
95 % KI	(0,,252-1,375)	(0,485-1,132)
p-Wert	0,219	0,741

T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin



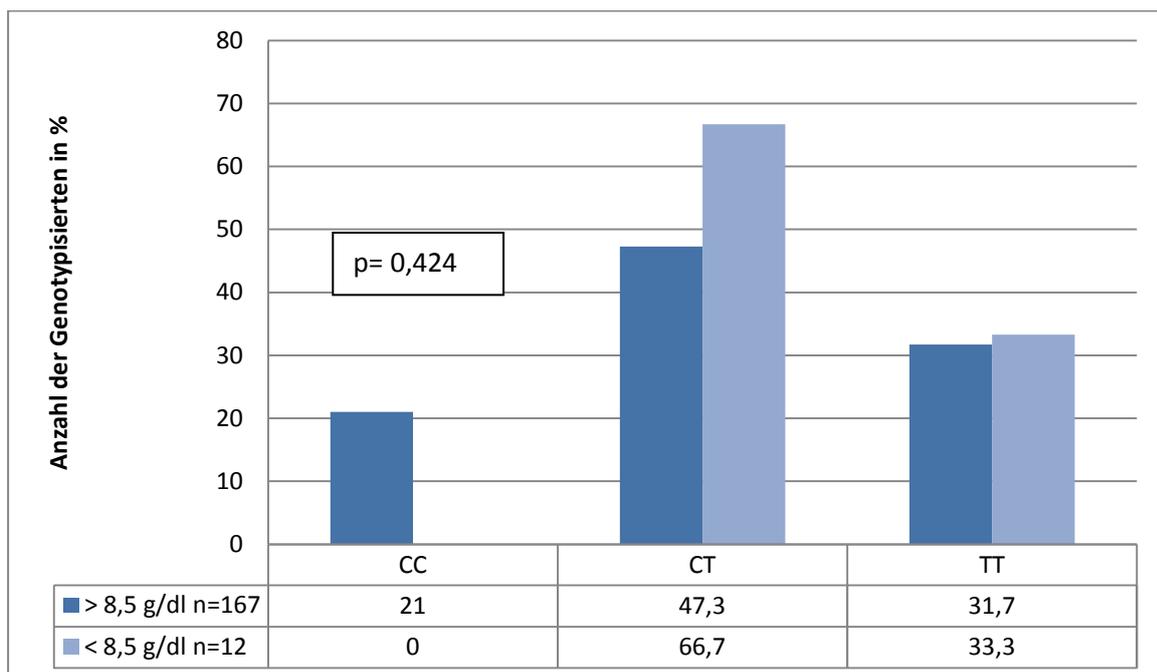
SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, RANKL=Rezeptor Aktivator NfκB-Ligand, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Abbildung 4.2.8 Allelfrequenz bei Osteolysen 0-1 vs. >1 bei SNP RANKL rs9533156

Die Betrachtung der 5 weiteren SNPs RANK rs35211496 und rs1805034, RANKL rs2277438 und OPG rs3102735 und rs2073618 die Anzahl der Osteolysen betreffend in der Kombinationsanalyse mit 4 Freiheitsgraden in der Allel und Genotypenfrequenz, waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar (**Tabelle 4.2.5**).

Untersuchung auf Unterschiede in der Verteilung der Allele und Genotypen bei Hämoglobin Werten >8,5 g/dl vs. < 8,5g/dl RANKL rs9533156 und OPG rs2073618.

In der Auswertung von RANKL rs9533156 nach Unterschieden in der Verteilung des Hämoglobin Wertes im Serum der Kranken zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Allele. Das Minorallel C wurde bei Patienten mit einem Hb- Wert unter 8,5 g/dl nicht nachgewiesen. (OR 0,542 95 % KI 0,491-0,598; p=0,002), so dass alle Patienten mit einem Hb- Wert unter 8,5 g/dl das Majorallel T aufzeigten. In der Verteilung der Genotypen zeigte sich aber kein statistischer Unterschied der beiden Gruppen (p=0,424) (**Abbildung 4.2.9** und **Abbildung 4.2.10**. Der Armitage Test (**Tabelle 4.2.11**) zeigt aufgrund der kleinen Fallzahlen (n=6 bei Hb < 8,5 g/dl) keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen TT vs. CC.



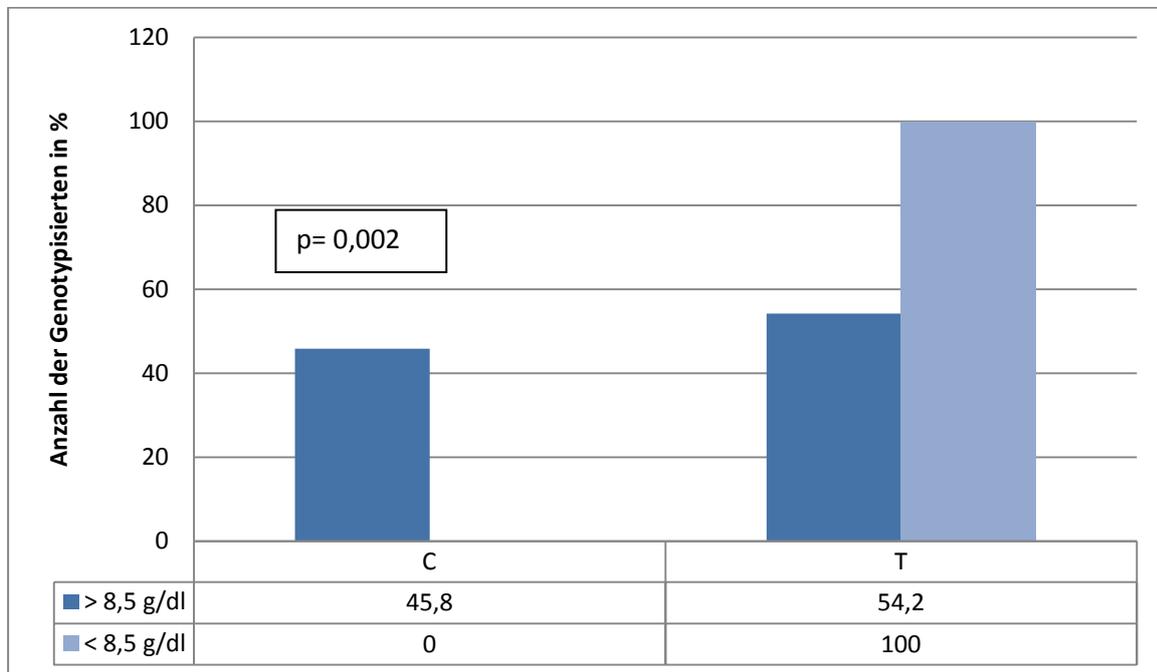
SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, RANKL=Rezeptor Aktivator NfκB-Ligand, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Abbildung 4.2.9 Genotypenfrequenz bei Hb >8,5 g/dl vs. <8,5 g/dl bei SNP RANKL rs9533156

Tabelle 4.2.11 Armitage Test der Genotypen für SNP *RANKL rs9533156*

Verteilung der Genotypen	Genotypenvergleich
OR	TT vs. CC
95 % KI	0,301 (0,014-6,466)
p-Wert	0,73867

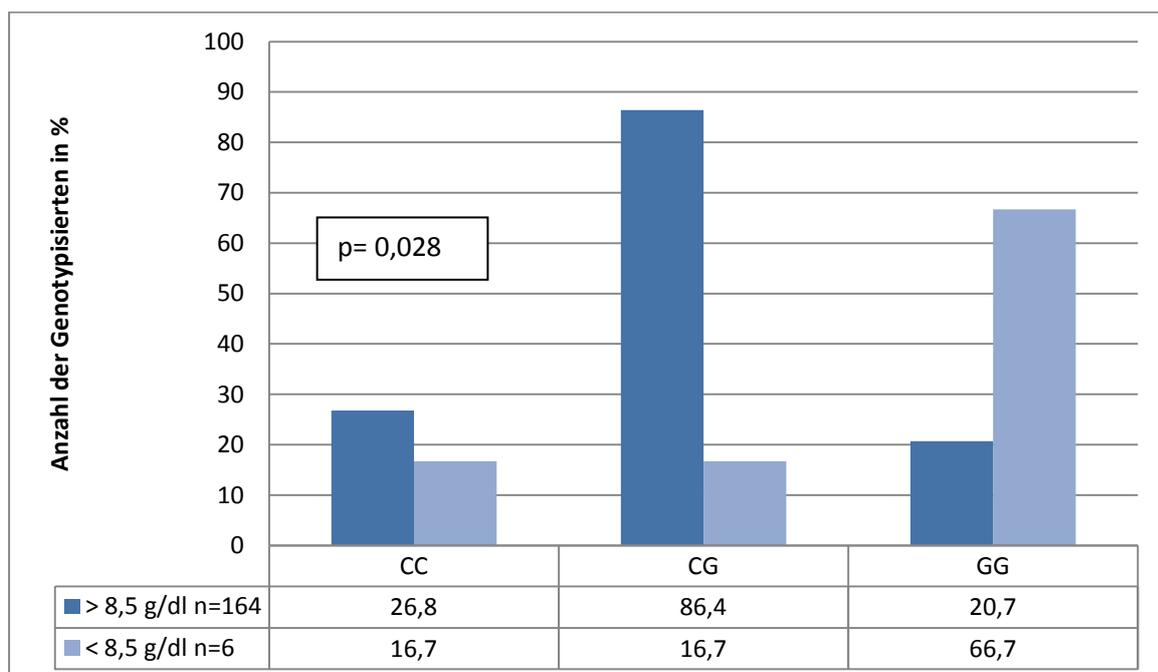
T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin



Hb=Hämoglobin, SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, RANKL=Rezeptor Aktivator $Nf\kappa B$ -Ligand, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Abbildung 4.2.10 Allelfrequenz bei Hb >8,5 g/dl vs. <8,5 g/dl bei SNP *RANKL rs9533156*

Bei *SNP OPG rs2073618* im Vergleich der Hämoglobin Werte über 8,5 g/dl und unter 8,5 g/dl konnte das homozygote Minorallel GG in dem Patientenkollektiv mit einem niedrigen Hb- Wert 3,2 mal mehr nachgewiesen werden, als in dem Kollektiv mit einem Hb-Wert über 8,5 g/dl ($p=0,028$). Die **Abb 4.2.11** verdeutlicht die Abweichung in der Verteilung der Genotypen zwischen den beiden Subgruppen. Der in **Tabelle 4.2.12** aufgeführte Armitag-Test zeigt signifikante p Werte in der Testung des homozygoten Majorallel CC gegen den heterozygoten Typ CG ($p=0,008$), sowie beim Vergleich des homozygoten Minorallel GG vs. CG mit einem p Wert von 0,014. Die Verteilung der Allele war ohne signifikanten Unterschied in den beiden Gruppen ($p=0,186$) (**Abbildung 4.2.12**).



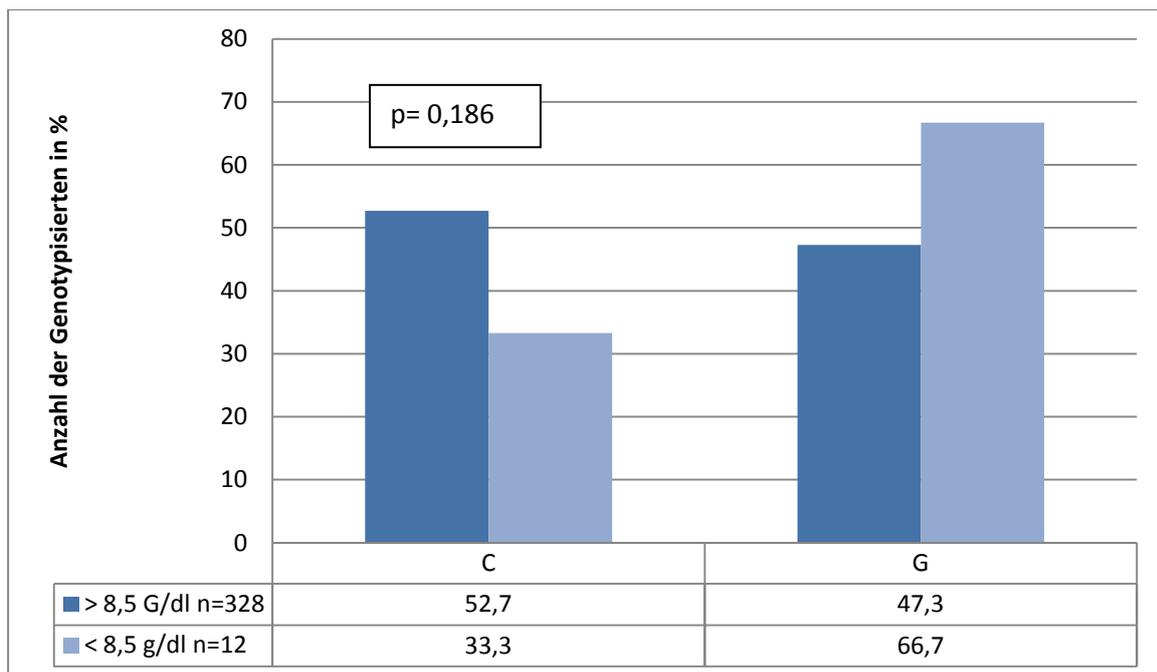
Hb=Hämoglobin, SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, RANKL=Rezeptor Aktivator NfκB-Ligand, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Abbildung 4.2.11 Genotypenfrequenz bei Hb >8,5 g/dl vs. <8,5 g/dl bei *OPG rs2073618*

Tabelle 4.2.12 Armitage Test der Genotypen und Alle für *SNP OPG rs2073618*

Verteilung der Genotypen	Genotypenvergleich
OR	GG vs. CG
95 % KI	0,099
p-Wert	(0,011-0,916)
	0,01386

T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin



Hb=Hämoglobin, SNP=Single Nukleotid Polymorphismus, RANKL=Rezeptor Aktivator $Nf\kappa B$ -Ligand, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin

Abbildung 4.2.12 Allelfrequenz bei Hb >8,5 g/dl vs. <8,5 g/dl bei SNP *OPG rs2073618*

Bei den weiteren SNPs *RANK rs35211496* und *rs1805034*, *RANKL rs2277438*, und *OPG rs3102735* waren sowohl bei der Verteilung der Genotypen, als auch in der Verteilung der Allele keine statistischen Unterschiede in der Gruppen Hb- Wert > 8,5 g/dl vs. < 8,5 g/dl errechnet worden. Allenfalls der SNP *RANKL rs2277438* zeigte in der Genotypen Verteilung einen Trend bei einem p Wert von 0,055 (**Tabelle 4.2.6**).

Die Auswertung der Calcium- Serum- Werte im Vergleich Normocalcämie vs. Hypercalcämie. Zeigte keiner der ausgewählten SNPs eine statistische Signifikanz. (**Tabelle 4.2.7**).

5. Diskussion

5.1 Ergebnisse der Analyse Multiples Myelom und MGUS vs. Gesunde Kontrollgruppe

In dieser Arbeit wurde DNS einer peripheren Blutabnahme von 214 Patienten mit Multiplen Myelom und der Sonderform des MGUS auf SNPs in den Genen für *RANKL*, *RANK* und *OPG* untersucht. Insgesamt waren es 6 SNPs: *RANK* (2 SNPs: *rs35211496* und *rs1805034*), *RANKL* (2 SNPs *rs2277438*, *rs9533156*) und *OPG* (2 SNPs: *rs3102735* und *rs2073618*), die auf Unterschiede mit gesunden Kontrollen und in Subgruppenanalysen untersucht wurden. Im Vergleich mit den Personen aus der gesunden Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikante Assoziation der 6 SNPs mit den an Myelom erkrankten Patienten. Bei den SNPs *OPG rs3102735* und *RANK rs1805034* war zwar ein Trend (2,4% vs. 0,7% TT, $p=0,091$ und 24,8% vs. 20,7%, $p=0,092$) zum häufigeren Auftreten des bei Multiplen Myelom homozygoten Minorallel erkennbar, die korrespondierenden Allelfrequenzen der beiden SNP zeigten aber keine unterschiedliche Verteilung, so dass kein sicherer krankheitsfördernder Effekt des homozygoten Minorallels TT bei SNPs *OPG rs3102735* sowie des homozygoten Minorallels CC bei *RANK rs1805034* angenommen werden kann. In dieser Situation wäre zu überprüfen, ob Merkmalsträger beider Risikogenotypen (der beiden SNP) ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko haben; allerdings ist für diese erweiterte Analyse die vorliegende Fallzahl an Patienten zu gering.

5.2. Subgruppenanalyse

Bei der Untersuchung der Subgruppen wurden zwei Gruppen erstellt: in der einen wurde das komplette Patientenkollektiv (n=214, Multiples Myelom und MGUS), in der anderen die Patienten mit der Diagnose Multiples Myelom (n=178) untersucht. Bei der Subgruppenanalyse des ISS Stadiums (I und II versus III), Osteolysen (0-1 vs. >1), Hämoglobinwert (kleiner versus größer 8,5 g/dl) und die Unterschiede Normocalcämie vs. Hypercalcämie zum Zeitpunkt der Diagnose wurde das Patientenkollektiv mit der Diagnose Multiples Myelom (n=178) unter Ausschluss der Patienten mit der Diagnose MGUS für die Untersuchung herangezogen.

In der Betrachtung des SNP *RANKL rs9533156* zeigten sich in der Analyse von folgenden drei Subgruppen signifikant veränderte Verteilungsmuster, die gemeinsam das Minorallel als Krankheitsprotektiv ausweisen: Krankheitsstadium nach ISS, Anzahl der Osteolysen und Hb-Werte. Nach Einteilung der Myelompatienten in Stadium nach ISS I+ II versus III bei Diagnosestellung trat das Minorallel C sowohl in der Allelfrequenz wie auch in der Genotypenfrequenz signifikant seltener im Stadium ISS III auf. (34,2% vs. 47,1%, p=0,044 bzw. 22,9% vs.13,2%, p=0,026) Eine solche Verteilung kann für einen protektiven Effekt des SNP *RANKL rs9533156* in Bezug auf die Entwicklung eines fortgeschrittenen Stadiums der Erkrankung sprechen.

Dieser Hinweis auf einen protektiven Effekt des SNP *RANKL rs9533156* wurde bei der Auswertung der Anzahl bestehender Osteolysen bei Diagnosestellung unterstützt. Verglichen wurden die Häufigkeiten bei allen 6 SNPs die Patienten mit 0- 1 Osteolyse und >1 Osteolyse. In der Betrachtung von SNP *RANKL rs9533156* waren Myelompatienten signifikant seltener Träger des Minorallel C wenn sie bei Diagnosestellung mehr als eine Osteolyse aufwiesen: (38,8% vs. 52,0%, p=0,014).

Ein weiterer protektiver Effekt des SNP *RANKL rs9533156* wurde im Vergleich der Hb-Werte > 8,5g/dl und < 8,5 g/dl entdeckt. Es zeigte sich, dass keiner der Patienten mit einem Wert unter 8,5 g/dl das Minorallel trug, limitierend an der Auswertung nach verschiedenen Hb-Werten der Subgruppen war, dass es nur 6 Patienten mit einem Hb- Wert unter 8,5 g/dl in dem ausgewerteten Patientenkollektiv gab.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung existierte keine vergleichende Literatur, die den Einfluss des SNP *RANKL rs9533156* und einem protektiven, beziehungsweise krankheitsförderndem Einfluss beim Multiplen Myelom verfolgte.

Assmann et al 2010 zeigte einen Zusammenhang des Minorallel des SNP *RANKL rs9533156* und der rheumatoiden Arthritis im Vergleich mit der gesunden Kontrolle. Hierbei zeigte sich das Minorallel als krankheitsfördernd. Die Verteilung der Genotypen war auch hier ohne signifikante Ergebnisse. In einer Studie über genetische Polymorphismen bei Patienten mit Brustkrebs konnte das Minorallel von SNP *RANKL rs9533156* häufiger bei Patienten mit Übergewicht, sowohl in der Allelfrequenz, wie auch in der Verteilung der Genotypen, gezeigt werden [Ney et al 2012]. Statistisch Signifikante Ergebnisse hinsichtlich einer krankheitsfördernden Effektes des SNP *RANKL rs9533156* konnten bei Patienten mit chronischer Peridontitis und Periimplantitis festgestellt werden [Kadkhodazadeh et al 2012]. In einer weiteren Arbeit über genetische Polymorphismen wurde der Zusammenhang bei Patienten mit Psoriasisarthritis und dem SNP *RANKL rs9533156* untersucht, hierbei zeigten sich keine Häufigkeitsunterschiede zwischen Patienten und gesunden Kontrollen [Assmann et al.2011].

Eine Einschränkung der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse bezieht sich zum einen auf das multiple Testen. Auf der einen Seite ist die Betrachtung der drei Subgruppen nach der Anzahl der Osteolysen, dem Hb-Wert und ISS Stadium von uns als unabhängige Analyse erfolgt, da das ISS-Stadium nicht über den Hb-Wert und die Osteolysen definiert ist. Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, dass aufgrund verschiedener Subgruppenanalysen der gleichen SNPs die signifikanten Unterschiede im Einzelfall auf einem Zufallsprinzip beruhen und somit kein relevantes Ergebnis liefern. Passt man die Ergebnisse dem multiplen Testen an, bleibt die Signifikanz der Ergebnisse nur für die Auswertung nach Osteolysen ($p=0,042$) und nach Hb-Wert bestehen ($p=0,015$), nicht aber nach dem Krankheitsstadium nach ISS. Des weiteren gilt als Einschränkung, dass die Untersuchung der Auftretungshäufigkeit der SNPs in einzelnen Subgruppen keine primären Stadien-Endpunkte darstellten. Als weitere

Begrenzung zeigt sich, dass bei den vier signifikant getesteten Unterschieden nur bei der Unterteilung der Stadien nach ISS, die unterschiedliche Verteilung der Allele auch den Unterschieden der Genotypenhäufigkeit entspricht.

In der Gruppe mit Multiplem Myelom und MGUS zusammen wurde eine nach Geschlecht und nach β 2-Mikroglobulinwert getrennte Auswertung vorgenommen. Bei der Untersuchung auf Unterschiede bei β 2- Mikroglobulin im Serum konnte eine Assoziation mit dem Minorallel T bei SNP *OPG rs3102735* und niedrigeren β 2-Mikroglobulin-Konzentrationen festgestellt werden (16,1% $<3,5\text{mg/l}$ vs. 8,8%, $p=0,036$). Hierbei erscheint das Minorallel protektiv zu sein; die Betrachtung der Genotypen in der homozygoten Minor-Form jedoch zeigen keine Unterschiede der Subgruppen nach dem β 2- Mikroglobulin-Werten. Interessanterweise tritt der gleiche SNP bei der Kohorte MGUS und Multiples Myelom zusammen häufiger bei Patienten mit fortgeschrittenem Stadium auf (Minorallel 21,1% vs. 9,2%, $p=0,005$) Die ISS Stadieneinteilung und das β 2-Mikroglobulin sind zusammenhängende Variablen. Dieses Ergebnis ist im Hinblick auf zwei Aspekte kritisch zu beurteilen; bei der Auswertung der Stadien sind die MGUS Patienten nicht mit einbezogen worden und so keine heterogene Vergleichsgruppe. Außerdem muss wie zuvor bereits ausgeführt das Vorliegen eines statistischen „Meßfehlers“ aufgrund multiplen Testens erwogen werden. Um die Relevanz unserer Ergebnisse weiter einordnen zu können, wurden vorangegangene Studien zu diesem SNP durchgesehen. Diesen SNP betreffend war bisher keine Studie mit der hier untersuchte Krankheitsentität durchgeführt worden. Ney et al zeigte 2012 einen Zusammenhang des SNP *OPG rs3102735*, sowohl in der Allel- wie auch in der Genotypenfrequenz und Brustkrebs, hierbei zeigte sich das Minorallel C häufiger in der Gruppe der Erkrankten und konnte als krankheitsfördernder Effekt interpretiert werden und nicht wie hier als protektive Einflußgröße. Anhand der vorliegenden Daten kann unser Ergebnis zu diesem SNP *OPG* nicht sicher einen krankheitsfördernden oder krankheitsprotektiven Effekt zugeordnet werden.

Der SNP *OPG rs2073618* zeigte in der Auswertung, dass sein homozygotes Minorallel 3,2 mal häufiger ($p=0,028$) bei Patienten mit einer hochgradigen Tumor bedingten Anämie auftritt und somit als krankheitsfördernd zu werten ist. Dieser Einfluss des SNP *OPG rs2073618* auf die Höhe des Hb- Wertes bei Diagnosestellung spiegelte sich allerdings nicht in der errechneten Allelfrequenz des Minorallel wieder. Das Ergebnis wird relativiert durch die kleine Fallzahl der Patienten mit $Hb < 8,5$ mg/dl ($n=6$) und bedarf zur weiteren Beurteilung einer Reproduktion in größerer Kohorten.

Bei den anderen Untersuchungen auf Unterschiede in der Geschlechterverteilung und dem Calcium-Serum Gehalt waren in der hier durchgeführten Statistik keine Assoziationen mit den SNPs feststellbar. Die Auswertung des Calcium Serum Wertes zeigte sich ohne signifikanten Werte in den Analysen nach Normocalcämie und Hypercalcämie.

Nicht nur für den SNP *RANKL rs9533156*, wie zuvor beschrieben, gibt es Voruntersuchungen zu Krankheitsentitäten, die mit einer Affektion des Knochens typischerweise einhergehen. Bei meist höherer Patientenzahl zeigten sich hier signifikante Unterschiede bei anderen Fragestellungen. In einer bei der Rheumatoiden Arthritis durchgeführten Studie wurde erkannt, dass Patienten signifikant häufiger Träger des Majorallels von *RANKL rs35211496*, sowie des homozygoten Minorallels von *RANKL rs2277438* im Vergleich zu der herangezogenen gesunden Kontrollgruppe sind [Assmann et al. 2010]. Weiter konnte Chung et al. 2010 einen Zusammenhang mit dem Vorliegen des SNP *RANKL rs35211496* und dem erhöhten Risiko der Entstehung von Morbus Paget erkennen. In einer japanischen Studie wurden verstärkte Knochenerosionen in Assoziation des SNPs *RANKL rs 2277438* bei dem Krankheitsverlauf von RA gezeigt [Furuya et. al. 2007]. Auch in einer Arbeit über primären Hyperparathyreodismus zeigten sich die Assoziation einer niedrigen Knochendichte mit dem häufigeren auftreten des SNP *OPG rs3102735* und dessen homozygoten Minorallels; keine Unterschiede zeigten sich hierbei in den Untersuchungen mit SNP *OPG rs2073618* , sowie einen nicht signifikanten Trend des SNP *RANKL rs2277438* zu niedrigerer Knochendichte [Piedra et. al. 2011]. Hsu et. al.

zeigten 2006 einen höheren Verlust von Knochendichte bei Osteoporose-Patienten, die das Minorallel von SNP *RANKL rs2277438* trugen.

Die dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten SNPs grundsätzlich relevant für verschiedene den Knochen destruierende Entitäten sind. Trotz der nachgewiesenen physiologischen Beteiligung des RANK-OPG-Netzwerkes bei Multiplen Myeloms konnte in der vorliegenden Arbeit keine sicher krankheitsfördernde Variation ausgemacht werden. Soweit für den Vergleich mit Gesunden als auch für die Subgruppenanalyse könnten mehrere Gründe eine Rolle bei der Nicht-Entdeckung eines Effektes in dieser Arbeit einnehmen. Der Effekt der genetischen Variationen könnte kleiner sein, so dass mit der zu Verfügung stehenden Population eine zu geringe Fallzahlgröße (Myelom/MGUS n=214; Myelom=178) erreicht wurde, um einen Effekt zu entdecken. Aber genau mit diesem Vorschlag muss die Frage besprochen werden, welche Relevanz überhaupt SNP-Assoziationen für die Krankheitsentstehung und Krankheitsverlauf haben. Für keinen der hier untersuchten sechs SNPs ist eine funktionelle Relevanz für eine veränderte Aktivität im RANK-RANKL-OPG-Netzwerk nachgewiesen worden. In diesem Sinne können einzelne SNPs im *RANK-RANKL-OPG*-System lediglich als mögliche Risikofaktoren bei Subgruppen für das Multiple Myelom bzw. für die Entstehung einer Osteoporose oder rheumatoiden Arthritis herangezogen werden. Aber die klinische Relevanz ist bis dato sehr fraglich, da für die oben genannten Krankheiten wesentlich aussagekräftigere Parameter für die Prognose bzw. Risiko bekannt sind und in der klinischen Praxis bereits angewendet werden: z.B. β 2-Mikroglobulin, freie Leichtketten, Nachweis Paratarg für das Multiple Myelom; Körpergewicht, Hormonstatus und Vitamin-D Spiegel für die Osteoporose; Anti-CCP und RF für die rheumatoide Arthritis

Nur sehr wenige Studien haben sich mit genetischen Polymorphismen und dem Zusammenhang mit dem Multiplen Myelom und MGUS beschäftigt. Die Datenlage zu den einzelnen SNPs ist noch unzureichend und erlaubt somit keine endgültige Bewertung der Ergebnisse. Keine durchgeführte Arbeit außer der hier ausgeführten

hat sich zuvor mit dem Zusammenhang von SNPs des *RANKL-RANK-OPG*-Systems und Knochenläsionen bei Multiplem Myelom beschäftigt. Unter den genannten Vorbehalten scheint es nur ein weiter zu verfolgender Ansatz unter mehreren auf diesem Gebiet zu sein. Bei einer größeren Fallzahl könnten weitere signifikante Ergebnisse gezeigt werden, besonders im Hinblick auf Osteolysen und der Prognose der Erkrankung. Gerade im Hinblick auf Risikoevaluation sind sogenannte GWAS zielführender als SNP Untersuchungen kleiner Kohorten. Bei genomweiten Assoziationsstudien (GWAS), die zum Ziel haben, die hereditären Faktoren komplexer Krankheiten und individueller Eigenschaften zu entdecken, wurden in den letzten Jahren ca. 150 Genloci identifiziert, die mit etwa 60 Erkrankungen in Verbindung zu bringen sind. Die meisten Entdeckungen auf genetischer Ebene in letzter Zeit, die durch genomweite Assoziationsstudien gezeigt wurden, machten häufig eine hohe Zahl von Probanden bei verhältnismäßig kleinen Effekten notwendig. Neue Verfahren die mit Mikroarray-Technik erlauben zudem die gleichzeitige Untersuchung von > 1 Millionen SNPs pro Untersuchungsdurchgang.

In verschiedenen Studien zu genetischen Variationen in den Genen des angeborenen Immunsystems, den Genen für die Immunregulation, oder in der Familie des $\text{Nf } \kappa \text{ B}$ wurden über 1400 SNPs in mehr als 100 Genregionen gefunden [Perdue et. al. 2011; Lee et. al. 2010; Du et. al. 2011]. Bei 500 000 SNPs von 192 Myelom Patienten wurden Genotypisierungen durchgeführt, die ein Pathway- basiertes Überleben vorhersagen [Pang et. al. 2011]. Bei Patienten mit Multiplem Myelom wurden Studien veröffentlicht, die genetische Assoziationen mit dem Ansprechen auf eine Therapie oder das Auftreten von Komplikationen mit gezielter Genotypisierungen erforschten [Johnson et. al. 2008]. In der ursprünglichen Sequenzierung und Analyse des Multiplen Myeloms wurden Mutationen in den Genen der Histon- Methylierung, Blutgerinnung dem $\text{Nf } \kappa \text{ B}$ Signalweg und der BRAF Kinase gefunden [Chapman et. al. 2011]. Trotz allem wurden keine spezifischen Assoziationen in den Genen für *RANKL*, *RANK* und *OPG* aufgedeckt, wenn auch der Einfluss des *RANKL-OPG* Netzwerkes in der Pathogenese des Multiplen Myeloms bewiesen wurde. Dabei gibt es eine Studie,

die Polymorphismen von *TNFSF8* beim Myelom verbunden mit DKK-1 Expression und Osteolysen untersuchte, jedoch keine bestimmten Variationen dabei betrachtete [Durie et. al. 2009].

Durch Studien, die den Effekt der Blockierung von RANKL an Modellen erforschten, konnte eine erhöhte RANKL Expression bei Myelom Patienten gezeigt werden. Zudem wurde rekombinantes OPG verwendet, um die Osteoklastengnese zu inhibieren und somit die Schädigung der Knochen durch die Tumorzellen zu verhindern [Croucher et.al. 2001, Fowler et al. 2010] In Bezug auf das Wissen der Pathogenese des Multiplen Myeloms wurde RANKL ein therapeutisches Ziel mit der Entwicklung von des RANKL Inhibitors und monoklonalem Antikörper Denosumab, welches erfolgreich die Entstehung von Knochenläsionen verhindert [Body et. al. 2006, Fizazi et. al. 2009, Lipton et. al. 2007]

In keiner der aufgezeigten Studien jedoch konnte ein Zusammenhang mit funktionell wirksamer genetischer Variation im *RANKL*- oder *OPG-Gen* entdeckt werden. Aus diesem Grund halten wir fest, dass weiter SNP-Auswertungen in den Genen für *RANK*, *RANKL* und *OPG*, in relativ kleiner Kohorte wie bei uns, in Zukunft nur dann sinnvoll erscheinen, wenn eine damit einhergehende veränderte Genexpression, oder abweichende Aktivität des RANKL-oder OPG Proteins nachgewiesen werden sollte.

Quellenangaben

Angtuaco EJ, Fassas AB, Walker R, Sethi R, Barlogie B: Multiple myeloma: Clinical review and diagnostic imaging. *Radiology* 2004;231:11-23.

Assmann G: Habilitationsschrift „ Bedeutung von Genpolymorphismen in dem Tumorsupressorgen p53, dem Onkogen Mdm2, sowie in den Genen des RANK-RANKL-OPG System für die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (RA)“ an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes.

Assmann G, Koenig J, Pfreundschuh M, Epplen JT, Kekow J, Roemer K, Wiczorek S. Genetic variations in genes encoding RANK, RANKL, and OPG in rheumatoid arthritis: a case-control study. *J Rheumatol.* 2010 May;37:900-4.

Assmann G, Pfoehler C, Simon P, Pfreundschuh M, Tilgen W, Wiczorek S. Genetic variations in the genes encoding receptor activator nuclear factor κ B (RANK), receptor activator nuclear factor κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in patients with psoriasis and psoriatic arthritis: a case-control study. *J Dermatol.* 2011 Jun;38:519-23.

Avet-Loiseau H: Role of genetics in prognostication in myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:625-635.

Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al: Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: The experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* 2007;109:3489-3495.

Blair JM, Zhou H, Seibel MJ, Dunstan CR: Mechanisms of Disease: roles of OPG, RANKL and RANK in the pathophysiology of skeletal metastasis *Nature Clinical Practice Oncology* (2006) 3, 41-49.

Body JJ, Facon T, Coleman RE, et al: A study of the biological receptor activator of nuclear factor κ B ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006 12:1221-1228.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423:337-42. Review.

Castellano D, Sepulveda JM, García-Escobara I, Rodríguez-Antolína A, Sundlövc A and Cortes-Funesa H: The Role of RANK-Ligand Inhibition in Cancer: The Story of Denosumab; *The Oncologist* February 2011: 136-145.

Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, Harview CL, Brunet JP, Ahmann GJ, Adli M, Anderson KC, Ardlie KG, Auclair D, Baker A, Bergsagel PL, Bernstein BE, Drier Y, Fonseca R, Gabriel SB, Hofmeister CC, Jagannath S, Jakubowiak AJ, Krishnan A, Levy J, Liefeld T, Lonial S, Mahan S, Mfuko B, Monti S, Perkins LM, Onofrio R, Pugh TJ, Rajkumar SV, Ramos AH, Siegel DS, Sivachenko A, Stewart AK, Trudel S, Vij R, Voet D, Winckler W, Zimmerman T, Carpten J, Trent J, Hahn WC, Garraway LA, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Golub TR. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011 Mar 24; 471:467-72.

Chung PY, Beyens G, Riches PL, Van Wesenbeeck L, de Freitas F, Jennes K, Daroszewska A, Fransen E, Boonen S, Geusens P, Vanhoenacker F, Verbruggen L, Van Offel J, Goemaere S, Zmierzak HG, Westhovens R, Karperien M, Papapoulos S, Ralston SH, Devogelaer JP, Van Hul W. (2010) Genetic variation in the TNFRSF11A gene encoding RANK is associated with susceptibility to Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*. 2010.

Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, Hijzen A, Brabbs AC, van Beek EJ, Holen I, Skerry TM, Dunstan CR, Russell GR, Van Camp B, Vanderkerken K. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*. 2001 Dec 15;98:3534-40.

Devesa SS, Fears T. Non-Hodgkin's lymphoma time trends: United States and international data. *Cancer Res (Supplement)* 1992, 52, 5432-5440.

Du J, Huo J, Shi J, Yuan Z, Zhang C, Fu W, Jiang H, Yi Q, Hou J. Polymorphisms of nuclear factor- κ B family genes are associated with development of multiple myeloma and treatment outcome in patients receiving bortezomib-based regimens. *Haematologica*. 2011 May;96:729-37.

Durie BGM, Salmon SE: A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer* 1975 : 842 -854.

Durie BG, Van Ness B, Ramos C, Stephens O, Haznadar M, Hoering A, Haessler J, Katz MS, Mundy GR, Kyle RA, Morgan GJ, Crowley J, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. Genetic polymorphisms of EPHX1, Gsk3beta, TNFSF8 and myeloma cell DKK-1 expression linked to bone disease in myeloma. *Leukemia*. 2009 Oct;23:1913-9.

Fizazi K, Lipton A, Mariette X, et al: Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer, breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates. *J Clin Oncol* 2009:1564-1571.

Fowler JA, Edwards CM, Croucher PJ. Tumor-host cell interactions in the bone disease of myeloma. *Bone*. 2011 Jan;48:121-8.

Furuya T, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Yago T, Kamatani N, Kotake S, Associations between HLA-DRB 1, RANK; RANKL; OPG and IL-7 genotypes and disease severity phenotypes in Japanese patients with early rheumatoid arthritis., *Clin. Rheumatol*. 2007 Dec; 26:2137-41.

Giuliani N, Rizzoli V, Roodman GD. Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood*. 2006 Dec 15;108(13):3992-6. Epub 2006 Aug 17. Review.

Grass S, Preuss KD, Ahlgrimm M, Fadle N, Regitz E, Pfoehler C, Murawski N, Pfreundschuh M: Association of a dominantly inherited hyperphosphorylated paraprotein target with sporadic and familial multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a case-control study; *Lancet Oncol* 2009; 10: 950-956.

Greipp P, Jesus San Miguel, Brian G.M. Durie, John J. Crowley, Bart Barlogie, Joan Bladé, Mario Boccadoro, J. Anthony Child, Herve' Avet-Loiseau, Robert A. Kyle, Juan J. Lahuerta, Heinz Ludwig, Gareth Morgan, Raymond Powles, Kazuyuki Shimizu, Chaim Shustik, Pieter Sonneveld, Patrizia Tosi, Ingemar Turesson, and Jan Westin International Staging System for Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* 23:3412-3420, 2005.

Gudkov AV, Komarova EA. Dangerous habits of a security guard: the two faces of p53 as a drug target. *Hum Mol Genet.* 2007Apr 15;16 :67-72

Heider U, Langelotz C, Jakob C, Zavrski I, Fleissner C, Eucker J, et al. Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on bone marrow plasma cells correlates with osteolytic bone disease in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1436–40.

Hofbauer LC, Heufelder AE. The role of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001Feb;44:253-9.

Hsu YH, Niu T, Terwedow HA, Xu X, Feng Y, Li Z, Brain JD, et al. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. *Hum Genet* 2006;118:568-77.

Johnson DC, Corthals S, Ramos C, Hoering A, Cocks K, Dickens NJ, Haessler J, Goldschmidt H, Child JA, Bell SE, Jackson G, Baris D, Rajkumar SV, Davies FE, Durie BG, Crowley J, Sonneveld P, Van Ness B, Morgan GJ. Genetic associations with thalidomide mediated venous thrombotic events in myeloma identified using targeted genotyping. *Blood.* 2008 Dec 15;112:4924-34.

Kadkhodazadeh M, Ebadian AR, Gholami GA, Khosravi A, Tabari ZA. Analysis of RANKL gene polymorphism (rs9533156 and rs2277438) in Iranian patients with chronic periodontitis and periimplantitis. *Arch Oral Biol.* 2012 Nov 20.: S0003-9969:00376-7

Kyle R, M.D., and S. Vincent Rajkumar, M.D.: Drug therapy Multiple Myeloma *N Engl J Med* 2004;351: 1860-73.

Kyle R, MD; Morie A. Gertz, MD; Thomas E. Witzig, MD; John A. Lust, MD, PHD; Martha Q. Lacy, MD; Angela Dispenzieri, MD; Rafael Fonseca, MD; S. Vincent Rajkumar, MD; Janice R. OffordBS; Dirk R. Larson, MS; Mattiew E. Plevak, BS; Terry M.Landgren O, Katzmann JA, Hsing AW: Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance among men in Ghana. Mayo Clin Proc 82: 1468-1473; 2007.

Landgren O, Kyle RA, Hoppin JA, Beane Freeman LE, Cerhan JR, Katzmann JA, Rajkumar SV, Alavanja MC. Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the Agricultural Health Study. Blood. 2009 Jun 18;113:6386-91.

Lee KM, Baris D, Zhang Y, Hosgood HD 3rd, Menashe I, Yeager M, Zahm SH, Wang SS, Purdue MP, Chanock S, Zheng T, Rothman N, Lan Q. Common single nucleotide polymorphisms in immunoregulatory genes and multiple myeloma risk among women in Connecticut. Am J Hematol. 2010 Aug;85:560-3.

Li Q, Yu K, Tian X, Kong F, You Y, Chen Z, Zou P. 17beta-Estradiol overcomes human myeloma RPMI8226 cell suppression of growth, ALP activity, and mineralization in rat osteoblasts and improves RANKL/OPG balance in vitro. Leuk Res. 2009 Sep;33:1266-71.

Lipton A, Steger GG, Figueroa J, et al: Randomized active-controlled phase II study of denosumab efficacy and safety in patients with breast cancer-related bone metastases. J Clin Oncol 25: 4431-4437, 2007.

Merlini G, Waldenström JG, Jayakar SD: A new improved clinical staging system for multiple myeloma based on analysis of 123 treated patients. Blood 55:1011-1019, 1980.

Ney JT, Juhasz-Boess I, Gruenhage F, Graeber S, Bohle RM, Pfreundschuh M, Solomayer EF, Assmann G. Genetic polymorphism of the OPG gene associated with breast cancer. BMC Cancer. 2013 Jan 31;13 :40: 10.1186/1471-2407-13-40.

Pang H, Hauser M, Minvielle S.: Pathway-based identification of SNPs predictive of survival. *Eur J Hum Genet.* 2011 Jun;19:704-9.

Pavalko FM, Gerard RL, Ponik SM, Gallagher PJ, Jin Y, Norvell SM. Fluid shear stress inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: a role for fluid shear stress-induced activation of PI3-kinase and inhibition of caspase-3. *J Cell Physiol.* 2003 Feb;194:194-205.

Piedra M, Garcia-Unzueta G, Berja A, Paule B, Lavin BA, Valero C, Riancho JA, Amando JA; Single Nucleotide polymorphisms of the OPG/RANKL/ system genes in primary hyperparathyroidism and their relationship with bone mineral density. *BMC Medical Genetics* 2011, 12:168.

Purdue MP, Lan Q, Menashe I, Zheng T, Zhang Y, Yeager M, Hosgood HD 3rd, Zahm SH, Chanock SJ, Rothman N, Baris D. Variation in innate immunity genes and risk of multiple myeloma. *Hematol Oncol.* 2011 Mar;29:42-6.

QIAamp© DNS Mini and Blood Mini Kit 11/2007 Handbook.

QIAamp© MiniElute© Virus Spin 02/2007 Handbook.

Ries LAG, Hankey BF, Miller BA et. al. 1992: *Cancer Statistics Review 1973-1988.* Washington DC US government printing office.

Rajkumar S, Fonseca R, Lacy M, et al: Abnormal cytogenetics predict poor survival after high-dose therapy and autologous blood cell transplantation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:497-503.

Rajkumar SV, Palumbo A: Management of newly diagnosed myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21:1141-1156.

Rajkumar SV: Multiple myeloma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management; *J. Hematol.* 87:79–88 2012.

Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med.* 2004 Apr 15;350:1655-64. Review.

Roato I, Grano M, Brunetti G, Colucci S, Mussa A, Bertetto O, Ferracini R. Mechanisms of spontaneous osteoclastogenesis in cancer with bone involvement. *FASEB J.* 2005 Feb;19:228-30.

Standal T, Seidel C, Hjertner Ø, Plesner T, Sanderson RD, Waage A, Borset M, Sundan A. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood.* 2002 Oct 15;100:3002-7.

Therneau, PHD; And Philip R. Greipp, MD Review of 1027 Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma *Mayo Clin Proc.* 2003; 78:21-33.

Scharschmidt TJ, Lindsey JD, Becker PS, Conrad EU. Multiple myeloma: Diagnosis and orthopaedic implications. *J Am Acad Orthop Surg* 2011;19: 410-419.

Schmieder B, Scheible C, Nuebling T, Kopp H, Wirths S, Azuma M, Schneider P, Jung G, Grosse-Hovest L, Salih H. RANKL Expression, Function, and Therapeutic Targeting in Multiple Myeloma and Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer.* 2012 Nov8.

Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, Hatjiharissi E, Politou M, Meletis J, Viniou N, Yataganas X, Goldman JM, Rahemtulla A. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood.* 2003 Aug 1;102:1064-9.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Natur.* 2000 Nov 16;408:307-10.

Wawrzynow B, Zyllic A, Wallace M, Hupp T, Zyllicz M. MDM2 chaperone the p53 tumor suppressor. *J Biol. Chem.* 2007Apr;42:609-21.

Yaccoby S, Wezeman MJ, Henderson A, Cottler-Fox M, Yi Q, Barlogie B, Epstein J. Cancer and the microenvironment: myeloma-osteoclast interactions as a model. *Cancer Res.* 2004 Mar 15;64:2016-23.

Yang Y, Ren Y, Ramani VC, Nan L, Suva LJ, Sanderson RD. Heparanase enhances local and systemic osteolysis in multiple myeloma by upregulating the expression and secretion of RANKL. *Cancer Res.* 2010 Nov 1;70:8329-38.

Yang Y, Yi Q,: Killing Tumor Cells Through Their Surface b2-Microglobulin or Major Histocompatibility Complex Class I Molecules *Cancer* 2010;116:1638–45.

Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas und der technischen Mittel möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr.med. Assmann, Geschäftsführender Oberarzt, sowie dem Chefarzt Herrn Prof. Dr. med. Pfreundschuh der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Universitätsklinik des Saarlandes, für die ausdauernde Betreuung, trotz eingetretener Rückschläge, sowie Organisation und Einführung ins wissenschaftliche Arbeiten danken.

Frau Prof. Dr. med. Gärtner für die Bereitstellung von zahlreichen asservierten Blutproben aus dem Virologischen Institut der Universität des Saarlandes.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Römer im José-Carreras-Forschungszentrum der Universität des Saarlandes, dass sie immer mit Geduld und Interesse die praktischen Maßnahmen unterstützt haben.

Desweiteren gilt Dank an Prof. Dr. med. Epplen und Herrn Dr. med. Wieczorek, sowie den wissenschaftlichen Mitarbeitern aus der Abteilung für Humangenetik des Universitätsklinikums Bochum, für die persönliche Betreuung und Bereitstellung besonderer technischer Maßnahmen.

Herrn Dr. med. Florian Schwarz und meiner Familie für die Motivation und Unterstützung zu allen Phasen der hier verfassten Arbeit.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Stephanie Keller,

Wohnhaft:

Albert-Weisgerber-Allee 44, 66386 St. Ingbert

Geboren:

22.01.1983 in Bad Friedrichshall.

Beruflicher Werdegang:

Anstellung ab 01.03.2012 als Assistenzarzt am Zentrum für allgemeine und operative Kinder- und Jugendmedizin am Klinikum Saarbrücken, Chefarzt Prof. Dr. med. Jens Möller.

Praktisches Jahr:

8/2010-08/2011

Wahlfach Pädiatrie am Klinikum Saarbrücken

Studium:

November 2011

2. Staatsexamen und Approbation

Herbst 2007

1. Ärztliche Prüfung

17.10.2005

Beginn Medizinstudium in Homburg

Famulaturen:

Chirurgie und Orthopädie, Gynäkologie und Geburtsmedizin, Kardiologie

Plastische Chirurgie, Traditionell Chinesische Medizin (Tongji Hospital, Wuhan, China):

Ehrenamt:

06-08/2005-

Hilfseinsatz an Südküste Sri Lankas für Tsunamiopfer

2003-2005

FSJ im Rettungsdienst: Krankenwagen, Rettungswagen, Sanitätsdienste,

Schule:

2000-2003

Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Heilbronn

Christiane-Herzog-Schule, Abschluß: ABITUR (1,7)

1994-2000

Wilhelm- Hauff Realschule Bad Rappenau

1993-1994

Grundschule Bad Rappenau- Fürfeld

1989-1993

Grundschule Neuenstadt