

Aus der Klinik für Innere Medizin II
Mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie
(Direktorin: Prof. Dr. C. Baldus)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Immungen-basierte Hochdurchsatzsequenzierung zur
Bestimmung minimaler Resterkrankung beim Follikulären
Lymphom**

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

vorgelegt von

Arved Herzog
aus Viersen
Kiel 2020

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Christiane Pott, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Weichenthal, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 30.08.2021

gez.: Frau Priv.-Doz. Dr. Ilske Oschlies
(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung	1
1.1 Die Translokation t(14;18)	3
1.2 Das klonale Immunglobulinschwerkettengen	4
1.3 Hochdurchsatzsequenzierung (Next Generation Sequencing) von Immungenen	6
2 Material und Methoden	9
2.1 Patientenproben	9
2.2 DNA-Extraktion.....	10
2.3 Klonalitätsanalyse mittels IGH-Konsensus-PCR und Genescan-Analyse ...	11
2.4 Quantitative Echtzeit PCR zur MRD Bestimmung	12
2.5 Prinzip der IG-NGS Diagnostik.....	14
2.5.1 Herstellung der IGH-Genbibliothek (Library Präparation)	15
2.5.2 Verwendung interner Kalibratoren „Spike-in's“.....	19
2.5.3 Aufreinigung der PCR-Produkte mittels AMPure-Beads	20
2.5.4 Spezifikationen des Sequenzierlaufs und der bioinformatischen Auswertung	20
2.5.5 Quantifizierung der Indexklonfrequenz und Erhebung von MRD-Werten ..	
.....	21
2.5.6 Definition des Indexklons	22
2.5.7 Definition des MRD Status.....	22
2.5.8 Intermodal vergleichende MRD Analyse	22
2.6 Statistische Auswertung	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Vergleich verschiedener DNA-Polymerasen	24
3.2 Identifikation des Indexklons	25
3.2.1 Vergleich von Blut und Knochenmark zur Indexklonidentifizierung.....	30

3.2.2	IGHV-Verteilung.....	32
3.3	MRD Erfassung mit NGS.....	33
3.3.1	Vergleich der MRD-Bestimmung mittels RQ-PCR und IG-NGS.....	34
3.4	Prognostische Bedeutung des MRD Nachweises mittels NGS	42
4	Diskussion.....	45
4.1	Indexklonidentifizierung	46
4.2	MRD Diagnostik mit IG-NGS	48
4.3	Überlebenszeitanalyse	51
4.4	Zusammenfassende Beurteilung.....	53
5	Zusammenfassung.....	54
6	Literaturverzeichnis.....	56
7	Anhang.....	64
7.1	Arbeitsmaterialien und Geräte	64
7.2	Reagenzien, Chemikalien, Bakterienzellen	65
7.3	Puffer und Stammlösungen	67
7.4	Verbrauchsmaterial	70
7.5	Tabellen.....	71
7.6	Abbildungsverzeichnis.....	73
7.7	Tabellenverzeichnis.....	74
	Danksagung	75
	Lebenslauf.....	76
	Publikationen	77

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute Lymphatischen Leukämie
ASO	allelspezifisches Oligonukleotid
BC	engl. buffy coat, mononukleäre Zellen gesunder Spender
BCL-2	B-cell lymphoma-2-Gen
BLQ	engl. below quantifiable, positiver MRD-Wert unterhalb des quantitativen Messbereichs
BP	Basenpaare
CDR	engl. complementarity determining region
CVP	Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison
DLBCL	engl. diffuse large B-cell lymphoma
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FL	Follikuläres Lymphom
FLIP-Index	engl. Follicular Lymphoma International Prognostic Index
FR	engl. framework region
GLSG	engl. German Low Grade Lymphoma Study Group
IG	Immunglobulin
IGH	engl. immunoglobulin heavy chain,
IGHV	engl. immunoglobulin heavy chain variable region, die Variable Region des IGH-Gens
KM	Knochenmark
MRD	engl. minimal residual disease, minimale Resterkrankung
NGS	engl. Next-Generation-Sequencing
NTC	engl. no template controle, negativ Kontrolle
PB	peripheres Blut

PFS	progressionsfreies Überleben
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin und Prednison
RP	Rückwärtsprimer
RQ-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
VH	engl. variable segment heavy chain, das V-Segment des IGH-Gens, alternativ: IGHV
VP	Vorwärtsprimer

1 Einleitung

Das Follikuläre Lymphom (FL) wird nach der WHO-Definition von 2008 den reifen B-Zell-Neoplasien zugeordnet (Campo et al. 2011). Mit einem Anteil von 20–25 % aller Non-Hodgkin-Lymphome ist es die häufigste Entität der niedrig malignen Lymphome in Westeuropa und den USA (Armitage 1997; G. A. Salles 2007). Wird die Krankheit frühzeitig in einem lokalen Stadium entdeckt, kann mit einer kurativen Bestrahlung eventuell in Kombination mit Immunchemotherapie eine Heilung erreicht werden (Lowry et al. 2011).

Klinisch verläuft das Follikuläre Lymphom häufig weitgehend symptomlos. Die meisten Patienten werden deshalb erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien diagnostiziert. In den fortgeschrittenen Stadien III und IV der Ann-Arbor-Klassifikation wird ein palliativer Therapieansatz gewählt. Trotzdem konnte die Prognose dieser Patienten besonders durch die Hinzunahme des monoklonalen Anti-CD20 Antikörper Rituximab zur konventionellen Chemotherapie seit Anfang 2000 deutlich verbessert werden. Durch die Kombination etablierter Chemotherapie-Protokolle mit Rituximab konnten in vielen Studien deutlich verbesserte Remissionsraten, längeres progressionsfreies Überleben und eine verbesserte Gesamtprognose gezeigt werden (Herold et al. 2007; Hiddemann et al. 2005; Marcus et al. 2005; G. Salles et al. 2011).

Allerdings erleiden etwa 20 Prozent der Patienten frühzeitig ein Rezidiv, resultierend in einer deutlich schlechteren Prognose (Federico et al. 2013; Press et al. 2013; Rummel et al. 2013; G. Salles et al. 2011). Um diese Hochrisikopatienten gegebenenfalls intensiver therapieren zu können, ist es notwendig, sie frühzeitig zu identifizieren. Dazu stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen können Patienten nach dem FLIP-Index (Follicular Lymphoma International Prognostic Index) anhand klinischer Parameter in 3 Risikogruppen eingeteilt werden. Der FLIP-Index reflektiert dabei vor allem die klinisch messbare Tumorlast und bemisst sich aus der Anzahl befallener Lymphknotenregionen (> 4), einer LDH-Erhöhung, einem höheren Lebensalter (> 60 Jahre), einem fortgeschrittenen Stadium III oder IV der Ann-Arbor-Klassifikation sowie einem Hämoglobin < 12 g/dl. Er ermöglicht die Abschätzung des individuellen Krankheitsverlaufs (Federico et al. 2009; Solal-Céliney et al. 2004; The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project 1993). Dieser Index behält auch beim Einsatz einer Immunchemotherapie seine Gültigkeit (Buske et al. 2006). Zusätzlich wird das Ansprechen auf eine Therapie bestimmt. Dies erfolgt bei nodalen

Lymphomen im Allgemeinen durch bildgebende Verfahren wie die Computertomographie oder die Positronen-Emissions-Tomografie. Darüber hinaus kann mit hoch sensitiven Messmethoden das Verbleiben einer minimalen Resterkrankung im Krankheitsverlaufs nachverfolgt werden. Der Begriff der „Minimal residual disease“ (MRD) beschreibt kleinste Mengen maligner Lymphomzellen, die mit klassischen Verfahren der Zytomorphologie und Histopathologie nicht erfasst werden können.

Die große prognostische Relevanz des Nachweises von MRD konnte in den letzten Jahren für zahlreiche verschiedene hämatologische Erkrankungen, wie die Akute (Brüggemann et al. 2006; Campana 2010) und Chronische Leukämie (Böttcher et al. 2012), das Mantelzelllymphom (Pott 2011; Pott et al. 2010) und das Multiple Myelom (Munshi and Anderson 2013), gezeigt werden. Auch für das Follikuläre Lymphom als primär nodale Entität konnten verschiedene Studien die prognostische Bedeutung von MRD in unterschiedlichen therapeutischen Situationen zeigen (Pott et al. 2018). Eine MRD-Bestimmung nach Immunchemotherapie im Knochenmark konnte in Multivarianzanalysen als wichtiger und unabhängiger prognostischer Marker mit einem signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben identifiziert werden (Galimberti et al. 2014; Ladetto et al. 2013; Rambaldi et al. 2002). Das gilt auch für den MRD-Nachweis im Blut nach einer kombinierten Immunchemotherapie (Hirt et al. 2008; Pott et al. 2018). Bei Patienten, die eine autologe Stammzelltransplantation erhalten haben, zeigt die MRD-Diagnostik sowohl am Transplantat in vitro als auch nach der Transplantation in Knochenmarkproben ihre große prognostische Bedeutung (Brown et al. 2007; Ladetto et al. 2008). Zusammenfassend können mit Hilfe der MRD-Diagnostik in Studien sowohl der Mehrwert einer Therapie überprüft als auch das individuelle Ansprechen eines Patienten und seine Langzeitprognose eingeschätzt werden.

Zur MRD-Erfassung stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Die Durchflusszytometrie analysiert mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper Leukozyten in einem Mikrokanal anhand ihrer Oberflächenantigene und ihres Streulichtverhaltens. Die Methode ist allerdings auf vitale Zellen zur Untersuchung angewiesen, sodass die Messung innerhalb von 48 Stunden nach Probenentnahme geschehen muss. Dabei wird eine maximale Sensitivität von 10^{-4} erreicht, was einer entarteten Zelle unter 10.000 gesunden Leukozyten entspricht. Es gibt derzeit für Follikuläre Lymphome jedoch keinen etablierten Ansatz zur durchflusszytometrischen MRD-Bestimmung.

Der derzeitige Goldstandard und die am häufigsten angewandte Methode ist die molekulargenetische MRD-Diagnostik mittels quantitativer Echtzeit-PCR (RQ-PCR). Die RQ-PCR zählt dabei zu den am besten standardisierten und validierten Quantifizierungsmethoden und erreicht eine Sensitivität von bis zu einer Zelle unter 100.000 Leukozyten, also 10^{-5} (Pott, Brüggemann, et al. 2013; Rambaldi et al. 2005). Für das Follikuläre Lymphom können prinzipiell zwei verschiedene Marker für die MRD-Diagnostik verwendet werden.

1.1 Die Translokation t(14;18)

Der häufiger verwendete Marker ist die tumor-spezifische Translokation (14;18)(q32;q21) (Abbildung 1). Dabei führt die Anlagerung des BCL-2-Onkogens auf Chromosom 18 an den Immunglobulin-Promotor auf Chromosom 14 zu einer konstitutionellen Überexpression des „Anti-Apoptose“-Gens BCL2 und somit zur Hemmung der Apoptose und Akkumulation langlebiger Zentrozyten (Yang and Korsmeyer 1996). Etwa 60 % der Bruchpunkte der t(14;18) liegen in der etwa 150 basenpaargroßen „major breakpoint region“. Die „minor cluster region“ ist die zweithäufigste Bruchpunktregion und liegt etwa 25 kb Richtung 3'. Etwa 8–15 % der Bruchpunkte liegen in dieser Region (Cleary, Galili, and Sklar 1986; Cleary and Sklar 1985).

Die t(14;18)-RQ-PCR amplifiziert die Sequenz um den Bruchpunkt mit einem bruchpunktspezifischen Vorwärtsprimer im Chromosom 18, einem Rückwärtsprimer in der J-Region und einer passenden Fluoreszenzsonde. Über Verdünnungsreihen kann anschließend auf die Anzahl an Zellen geschlossen werden, die diesen Bruchpunkt tragen. Dazu stehen validierte Primer, Fluoreszenzsonden und Verdünnungsreihen für verschiedene Bruchpunktregionen zur Verfügung, sodass die Methode standardisiert durchgeführt werden kann (Pott, Brüggemann, et al. 2013).

Auch wenn die Translokation in 80–90 % aller Fälle beim Follikulären Lymphom mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen werden kann (Leich et al. 2011), eignet sich die Translokation nur in 50–65 % als Marker für die RQ-PCR (van Dongen et al. 2003; Evans et al. 2007). Dies liegt an der Streuung der Bruchpunkte innerhalb des Chromosom 18, da standardisierte PCR-Ansätze nur für die häufig vorkommende Bruchpunkte vorhanden sind.

Des Weiteren ist Translokation zwar charakteristisch für Follikuläre Lymphome, aber nicht spezifisch. So zeigen 30 % aller DLBCL diese Translokation und auch in B-Lymphozyten von gesunden Patienten kann sie selten gefunden werden (Schmitt, Balogh, et al. 2006; Schüler, Hirt, and Dölken 2003). Aus diesem Grund sollte die genaue Position des Bruchpunktes an Material mit hoher Tumorlast für die weitere MRD-Diagnostik identifiziert werden. Diese zusätzliche Information ermöglicht eine hoch spezifische MRD-Diagnostik mittels RQ-PCR.

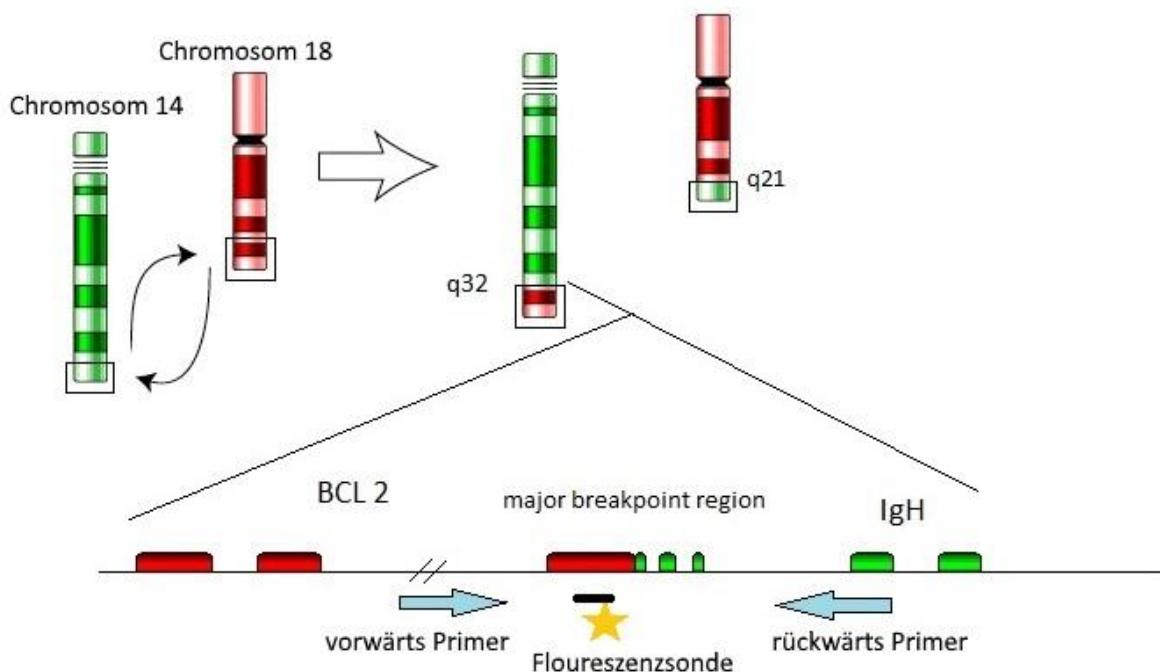


Abbildung 1 (14;18)(q32;q21) Translokation, als Folge der dargestellten Translokation wird das BCL2-Gen von Chromosom 18 in die Nähe des IgH-Gens auf Chromosom 14 transferiert.

1.2 Das klonale Immunglobulinschwerkettengen

Alternativ zur t(14;18) Translokation kann die klonale Immunglobulin-Genumlagerungen reifer B-Lymphozyten als Zielstruktur für die allel spezifische Oligonukleotid RQ-PCR (ASO-RQ-PCR) verwendet werden. Während der natürlichen B-Zell-Reifung durchlaufen die Gene der schweren und leichten Kette des Antikörpers mehrere Umlagerungsprozesse, die eine extreme Antikörpervielfalt ermöglichen (Abbildung 2). Zuerst werden die Gene aus verschiedenen Gensegmenten zusammengesetzt. Das Gen der schweren Kette wird jeweils aus einem zufällig ausgewählten V-, D- und J- Gensegment rekombiniert. Dazu stehen etwa 40 verschiedene V-, 25 verschiedene D- und 6 verschiedene J-Segmente zur Auswahl. Bei

dieser Rekombination wird die Anzahl möglicher Antikörper durch junktionale Diversifizierung weiter gesteigert. Junktionale Diversifizierung bedeutet, dass zufällige Basen an den Übergangsstellen zwischen dem V- und D-, sowie zwischen dem D- und J-Segment von Enzymen abgeschnitten und teilweise andere Basen eingefügt werden. Diese hochvariablen Bereiche werden als N₁ und N₂ Region bezeichnet. Zusammen mit dem so gekürzten D-Segment bilden diese Regionen die NDN-Region. Das so entstandene IGH-Gen wird in vier konservierte „Framework“-Regionen (FR1-4) und drei hypervariablen Regionen (complementarity determining region, CDR1-3) eingeteilt. Innerhalb der CDR liegen die Antikörperbindungsstellen. Die NDN-Region entspricht CDR3. Als letzter Schritt zur Diversifizierung unterlaufen B-Zellen im Keimzentrum eine somatische Hypermutation. Diese dient dazu, die Spezifität von Antikörpern für bestimmte Antigene weiter zu erhöhen. Die somatische Hypermutation findet dabei verstärkt in den CDR statt (Rajewsky 1996; Tonegawa 1983). Beim Follikulären Lymphom ist diese Hypermutation nicht auf das Keimzentrum beschränkt. Sie findet anhaltend in allen Zellen des Follikulären Lymphoms eine anhaltende somatische Hypermutation statt.

Bei gesunden B-Zellen gewährleistet die Antikörpervielfalt, dass für jedes mögliche Antigen ein passender Antikörper exprimiert werden kann. Zusätzlich lässt sich dadurch jede B-Zelle über die Sequenz ihres spezifischen Antikörpers identifizieren und stellt somit den genetischen Fingerabdruck einer Zelle dar. Alle B-Zellen, die aus einer B-Zelle hervorgehen, tragen dieselbe IGH-Sequenz. Diese Zellen bilden eine Familie oder einen Klon. Die CDR3-Region innerhalb des IGH-Gens weist die größte Variabilität auf. Aus diesem Grund gilt die CDR3-Region als hochspezifisch für eine B-Zelle und ihre Klone.

Die allel spezifische RQ-PCR verwendet klonale IGH-Genumlagerungen als Marker. Dazu wird ein CDR3-spezifischer Primer mit einer Fluoreszenzsonde und einem weiteren Primer kombiniert. Die Sonde und der zweite Primer sind so konzipiert, dass sie in konservierten Regionen des IGH-Gens binden, wie FR oder der J-Region. Allerdings muss für jeden Patienten ein Lymphom-spezifischer Primer komplementär zur CDR3-Region designet werden. Die Verdünnungsreihen müssen für jeden Patienten aus diagnostischem Material mit bekannter Zellzahl hergestellt werden. Liegt das Lymphom nur in einer geringen Konzentration in diesem Material vor, kann daraus keine direkte Verdünnungsstufe mit höherer Zellzahl hergestellt werden. Dies stellt besonders für Follikuläre Lymphome als nodale Entität ein Problem dar, da bei vielen Patienten nur eine geringe Knochenmarksinfiltration und periphere Ausschwemmung besteht. In diesen Fällen muss das

IGH-Gen des Lymphoms in ein Plasmid kloniert werden, welches von Bakterien amplifiziert wird. Auf diese Art lässt sich eine Plasmid-Verdünnungsreihe mit hohen Konzentrationen herstellen. Allerdings ist dieser zusätzliche Arbeitsschritt sehr arbeitsintensiv, zeitaufwendig und lässt sich nur schwer standardisieren.

Ein zusätzliches Problem stellt die anhaltende somatische Hypermutation bei Follikulären Lymphomen dar. Da diese besonders in CDR auftritt, kann dadurch die Bindung des patientenspezifischen Primers verhindert werden.

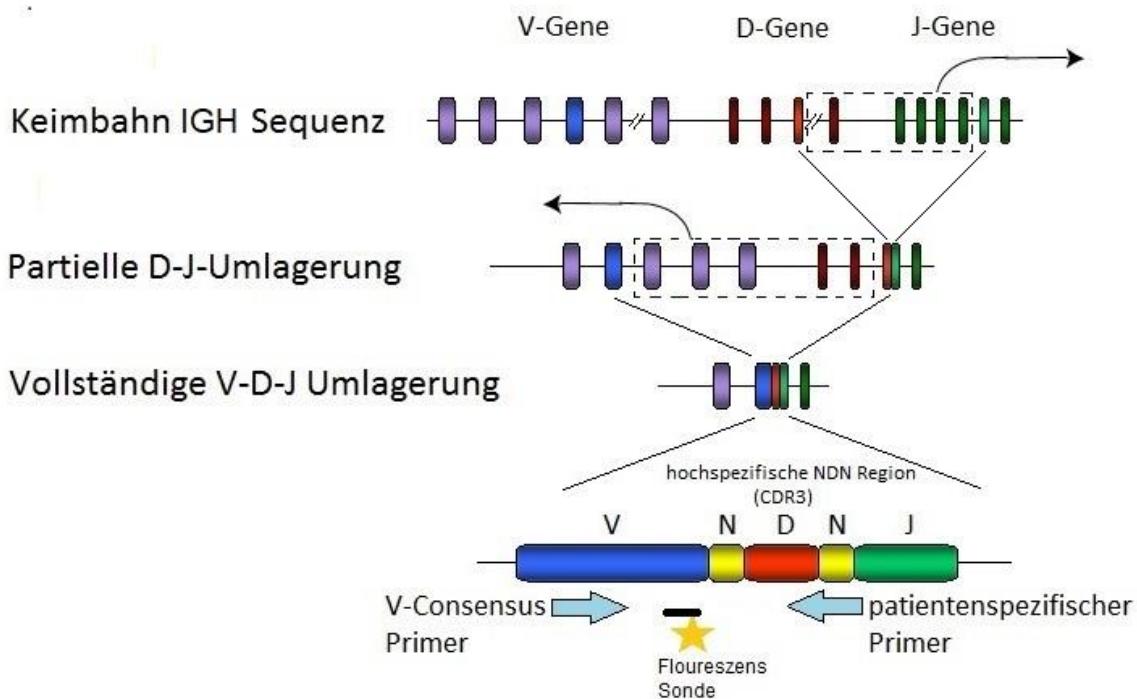


Abbildung 2 IGH VDJ-Genumlagerung, während der B-Zell-Reifung erfolgte die somatische Rekombination, aus welcher ein hochspezifisches IGH-Gen resultiert.

1.3 Hochdurchsatzsequenzierung (Next Generation Sequencing) von Immungenen

Next Generation Sequencing (NGS) ist eine neue Sequenziermethode, die es ermöglicht, Millionen von DNA-Sequenzen (engl. reads) parallel zu sequenzieren. Dadurch können sehr große Mengen DNA, wie zum Beispiel ein DNA-Sequenzabschnitt von sämtlichen B-Zellen einer Blutprobe, sequenziert werden. Passend zu dem Synonym Hochdurchsatzsequenzierung werden dabei gewaltige Mengen an Informationen generiert. Auch wenn die Menge an

generierten Daten die verfügbare Software und Hardware zur Verarbeitung häufig an ihre Grenzen bringt, ist das Potential von NGS kaum zu überschätzen.

Die MRD-Analyse mittels Immungen-NGS könnte prinzipiell die Limitationen PCR-basierter MRD-Diagnostik überwinden und die bestehenden Methoden sinnvoll ergänzen. 2009 wurde von Boyd et al. das erste Mal die Durchführbarkeit von MRD-Diagnostik mittels NGS gezeigt. Seitdem wurden zahlreiche NGS-Ansätze zur Bestimmung von MRD für verschiedene hämatologische Erkrankungen, wie der Akuten Lymphatischen Leukämie (Faham et al. 2012; Gawad et al. 2013) und der Chronischen Lymphatischen Leukämie (Logan et al. 2011, 2013), dem Plasmozytom(Avet-Loiseau et al. 2015) und anderen B-Zell-Lymphomen (Ladetto et al. 2014) entwickelt.

Dabei erfasst die sequenzbasierte MRD-Diagnostik vergleichbar zur RQ-PCR ebenfalls das klonal rearragierte Immun- oder T-Zellrezeptoren des jeweiligen Lymphom- oder Leukämiekrons. Man unterscheidet zwischen Amplikon-basierten oder sogenannten Hybrid-Capture Verfahren, die es ermöglichen, eine bestimmte Genregion zu vervielfältigen (Scherer et al. 2017). Diese Arbeit konzentriert sich auf das Amplikon-basierte NGS unter Verwendung des klonal rearrangierten IGH-Gens. Dazu werden spezifische Primermixe verwendet, um die variable Region des IGH-Gens zu amplifizieren. Die Primer binden in konservierten Bereichen des V- und J-Segments. Anders als bei der ASO-RQ-PCR werden dabei keine patientenspezifischen Primer benötigt.

Die entstehenden DNA-Fragmente oder Amplikons sind mit Adapters für die spätere Sequenzierung und probenspezifischen Barcodes zur späteren Identifikation versehen und bilden die sogenannte Sequenzierbibliothek (engl. Library). Über die Adaptersequenzen binden die DNA-Fragmente an eine sogenannte 'flow cell' des Sequenziergeräts und werden mittels Brücken-PCR (engl. bridge amplification) so vervielfältigt, dass Ampliconcluster entstehen. Das für diese Arbeit verwendete Illumina Sequenziergerät folgt dabei dem Prinzip des „Sequencing-by-Synthesis“. Hier wird ein fluoreszierendes Nukleotid nach dem anderen in den neu entstehenden komplementären DNA-Strang inkorporiert, wobei die emittierte Fluoreszenz detektiert und somit eine Sequenzierung in Echtzeit gewährleistet wird.

Im Anschluss an die Sequenzierung wird im diagnostischen Material eines Patienten die spezifische IGH-Sequenz des Follikulären Lymphoms über seine quantitative Dominanz identifiziert. Der Zellkron mit dieser IGH-Sequenz wird als Indexkron bezeichnet. Für die MRD-Diagnostik wird in Verlaufspröben mit bioinformatischen Methoden nach diesem

Indexklon gesucht. Dabei kann in Abhängigkeit der untersuchten DNA-Menge eine Sensitivität von 10^{-5} prinzipiell übertroffen werden. In ersten Versuchen war es möglich, mittels IG-NGS eine maligne Zelle unter 1.000.000 gesunden zu detektieren (Logan et al. 2014). Potenziell ließe sich dabei auch die klonale Evolution von Lymphomen anhand ihrer IGH-Sequenz verfolgen.

Ziel dieser Arbeit war es, einen NGS-basierten MRD-Ansatz zu etablieren und hinsichtlich seiner Anwendbarkeit für die MRD-Diagnostik Follikulärer Lymphome zu prüfen und vergleichend zu den etablierten Verfahren t(14;18)-RQ-PCR und ASO-RQ-PCR zu analysieren. Hierzu wurde ein gut definiertes Patientenkollektiv einer klinischen Studie zur Primärbehandlung von Patienten mit Follikulären Lymphomen ausgewählt.

Insbesondere stellte sich die Frage, ob die NGS-basierte MRD-Diagnostik die aktuellen technischen Möglichkeiten zur MRD-Erfassung sinnvoll ergänzt, um prognostisch relevante Aussagen zur Bedeutung von MRD nach einer Immunchemotherapie vornehmen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenproben

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Proben aus peripherem Blut, Knochenmark und lymphatischem Gewebe von Patienten mit FL untersucht. Von insgesamt 80 untersuchten Patienten entstammten 65 der „GLSG 2000“-Studie der deutschen Studiengruppe zur Behandlung indolenter Lymphome. Bei dieser Phase-III-Studie erhielten die Patienten randomisiert entweder R-CHOP als kombinierte Immunchemotherapie oder die alleinige Chemotherapie (CHOP). In einer zweiten Randomisation erhielten die Patienten anschließend entweder eine autologe Stammzelltransplantation nach Hochdosismchemotherapie zur Konsolidierung oder eine Interferon-Erhaltungstherapie. Das Hämatologie-Labor Kiel war für diese nationale Studie Referenzlabor für die MRD-Diagnostik und hatte die Aufgabe der zentralen Probenasservierung. Für die vorliegende Arbeit wurden 65 Patienten aus dem Patientenkollektiv der „GLSG 2000“-Studie ausgewählt, bei denen bereits eine klonale IGH-Genumlagerung im diagnostischen Material durch eine Konsensus-PCR (siehe Abschnitt 2.3) und nachfolgenden Genescan-Analyse zum Klonalitätsnachweis identifiziert worden war. Als zweites Auswahlkriterium aus der Studienkohorte musste mindestens ein Verlaufsmaterial des Patienten nach der Induktionstherapie verfügbar sein. Von den 65 Patienten der „GLSG 2000“-Studie wurden 73 Proben vom diagnostischen Zeitpunkt und 123 Verlaufsproben analysiert.

Zusätzlich wurden 15 anonymisierte Patienten mit FL aus der internationalen GLSG-Studie „GA101 versus Rituximab bei fortgeschrittenem niedrig-malignen NHL“ („Gallium Studie“) analysiert. Bei dieser multizentrischen, randomisierten Phase-III-Studie erhielten Patienten entweder eine Immunchemotherapie mit Rituximab oder mit Obinutuzumab als monoklonalen CD20-Antikörper. Als Chemotherapie erhielten die Patienten CHOP, CVP oder Bendamustin. Bei allen Patienten, die sich anschließend in kompletter oder partieller Remission befanden, wurde eine Erhaltungstherapie mit dem jeweiligen Antikörper für zwei Jahre durchgeführt. Von den 15 Patienten wurden 15 Proben vom diagnostischen Zeitpunkt und 31 Verlaufsproben analysiert. Die Patienten wurden nach dem Kriterium ausgewählt, dass bereits eine RQ-PCR mit IGH als Zielgen erfolgreich durchgeführt worden war.

Der Verwendung entnommener Materialien für molekulargenetische Untersuchungen hatten alle Patienten im Rahmen der Aufklärung und konsentierten Patienteneinwilligung vor

Einschluss in die Therapiestudien schriftlich zugestimmt. Die Patientenproben waren im Rahmen des wissenschaftlichen Begleitprogramms der Studien explizit mit dem Ziel der Diagnostik minimal residueller Erkrankung asserviert worden. Ein Ethikvotum für die jeweiligen Studien lag vor. Die experimentellen Arbeiten, einschließlich der Probenannahme und -erfassung, wurden im Hämatologie-Labor Kiel, der Klinik für Innere Medizin II, UKSH, Campus Kiel durchgeführt.

2.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion ist ein Routineverfahren, um DNA aus humanen Zellen für weiterführende molekulargenetische Verfahren zu gewinnen. Die Extraktion erfolgte nach Standardprotokollen und weitgehend automatisiert. Nach Extraktion wurde die Reinheit und Konzentration der DNA mit einem Spektralphotometer gemessen. Dabei wurde die DNA-Konzentration anhand der photometrisch gemessenen Extinktion bei 260 nm ermittelt. Bei einem pH-Wert von 7,0 entspricht eine OD₂₆₀ = 1 einer DNA-Konzentration 50 µg/ml. Die Reinheit wurde als Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm angegeben. Die isolierte DNA wurde maximal 4 Wochen bei +4 °C gelagert. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -20 °C. Wurde die DNA-Konzentration zum Beispiel im Rahmen der Library Preparation erneut bestimmt, erfolgte dies mit Hilfe des PicoGreen-dsDNA Kits. Damit können auch sehr geringe DNA Mengen quantifiziert werden. Die Quantifikation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben auf der Light Cycler 480 II Plattform.

Als zusätzliche Quantifizierungsmethode wurde die Kontrollgen-PCR verwendet. Im Gegensatz zu anderen Verfahren, wird dabei nicht die Menge an Nukleinsäuren ermittelt, sondern die Anzahl amplifizierbarer Kopien eines Kontrollgens. Für diese Arbeit wurde Albumin als Kontrollgen verwendet, da dieses Gen in jedem Genom genau zweimal vorliegt und eine gute Referenz bietet. Die Quantifizierung erfolgte als RQ-PCR. Die verwendeten Sequenzen der Sonde und der Primer wurden aus der Veröffentlichung Pongers-Willemse et al., 1998, übernommen (Pongers-Willemse et al. 1998). Wurde eine Kontrollgen-PCR durchgeführt, ist dies im entsprechenden Abschnitt angegeben.

2.3 Klonalitätsanalyse mittels IGH-Konsensus-PCR und Genescan-Analyse

Die IGH-Konsensus-PCR wurde angewendet um rearragierte IGH-Gene reifer B-Lymphozyten zu amplifizieren und diese darauffolgend durch einer Fragmentlängenanalyse auf Klonalität zu überprüfen. Für diese Arbeit wurden dazu die Primer und Ansätze des europäischen BIOMED-2-Projektes zur Detektion klonaler B-Zell-IGH-Rearrangements verwendet (van Dongen et al. 2003). Da Mutationen an der Primerbindestelle die Detektion eines klonalen Signals beeinträchtigen können, erfolgte die Amplifikation durch drei verschiedene Multiplex-PCR-Ansätze, welche die drei sog. „Framework“ Regionen des IGH-Gens abdecken. Dazu wurde jeweils ein Mix aus verschiedenen Vorwärtsprimern mit einem gleichbleibenden Rückwärtsprimer kombiniert. In Abhängigkeit der verwendeten FR-Region wurden unterschiedlich große Fragmente des IGH-Gens amplifiziert (FR1-Primer: 310-360bp, FR2-Primer: 250-295bp, FR3-Primer: 100-170bp). Die Primer wurden für die spätere Genescan-Analyse mit Fluorophor FAM (6-Carboxyfluorescein) als Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Für diese Arbeit wurde primär der FR1-Ansatz verwendet, da dieser die höchste Detektionsrate aufweist (Evans et al. 2007). Konnte kein klastisches Signal nachgewiesen werden, wurde ergänzend der FR2 und FR3 Ansatz verwendet.

Mittels Genescan-Analyse wurden die PCR-Produkte auf ein bis drei Basenpaare genau nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu waren zuvor fluoreszenzmarkierte Primer verwendet worden. Für die Durchführung wurden 1 μ l der Probe zusammen mit 0,5 μ l RoX500 als Längenstandard und 12 μ l HiDi Formamid 2 Minuten lang bei 92 °C denaturiert. Die anschließende Elektrophorese geschah automatisiert auf dem ABI 3500. Die Ergebnisse wurden mit der Genemapper-Software ausgewertet (Abbildung 3). Sämtliche Proben wurden zur Ergebnisvalidierung doppelt amplifiziert und analysiert.

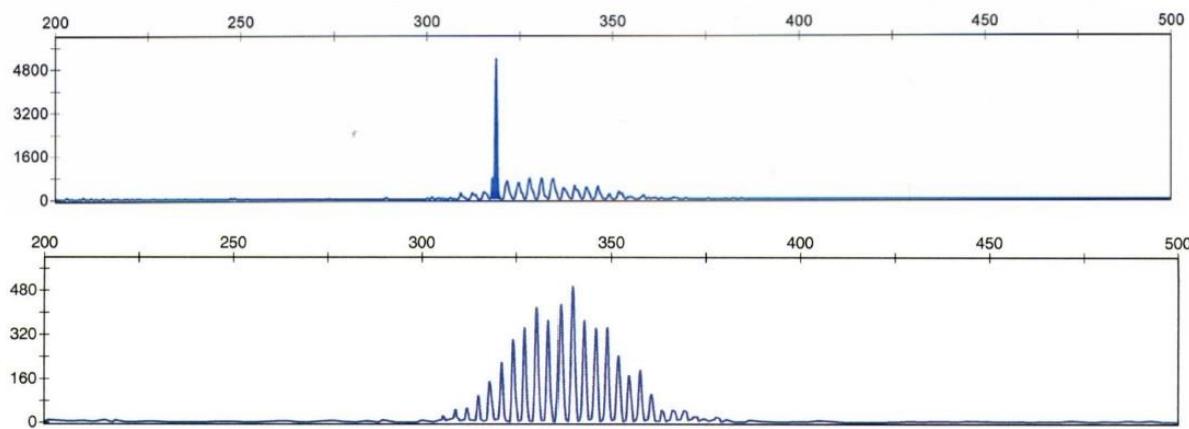


Abbildung 3 Genescan Darstellung einer IGH-Konsensus-PCR, zu sehen sind Genescan Analysen von zwei IGH-Konsensus PCR-Produkten. Oben zeigt sich ein deutlicher klonaler Peak, unten sind multiple Peaks mit Poisson-Verteilung abgebildet, dies entspricht einem polyklonalen Ergebnis.

Bei einer polyklonalen Probe zeigten sich die verschiedenen Genlängen als multiple Peaks mit Poisson-Verteilung. Hob sich ein Peak in seiner Fluoreszenzintensität deutlich von allen anderen ab, wurde dies als klonales Ergebnis gewertet. Nicht eindeutig klonale Peaks und klonale Peaks, die im Doppelansatz nicht klonal reproduzierbar waren, wurden als klonales Ergebnis vor polyklonalem Hintergrund interpretiert.

2.4 Quantitative Echtzeit PCR zur MRD Bestimmung

Für die MRD-Bestimmung gilt die t(14;18)-RQ-PCR als Goldstandard. Für diese Arbeit wurde die RQ-PCR mit der t(14;18)-Translokation und der klonalen IGH-Genumlagerung als Zielgen verwendet. Die RQ-PCR wurden im Hämatologie-Labor Kiel von technischen Mitarbeitern durchgeführt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Für die Proben mit einer nachgewiesenen t(14;18) Translokationen erfolgte die RQ-PCR entsprechend der Publikation von Ladetto et al. (Ladetto et al. 2001). Dazu wurde nach Bestimmung des Bruchpunktes über eine bruchpunktspezifische PCR ein Primersystem für den jeweilig identifizierten Bruchpunkt der MBR-, MCR-, oder 3'MBR-Region verwendet und mittels des Taqman ABI 7900 nach folgendem Cycler Protokoll vervielfältigt: 2 min Vorinkubation bei 50 °C, 10 min Inkubation bei 95 °C, 45 Zyklen Amplifikation mit je 15 Sek. bei 95 °C und 1 min bei 59 °C pro Zyklus. Die RQ-PCR wurde dabei als Triplet mit jeweils 500 ng DNA analysiert, sodass insgesamt 1500 ng DNA untersucht wurden. Die

Konzentrationsbestimmung und Kontrolle der Amplifizierbarkeit der DNA erfolgte mittels Kontrollgen-PCR.

Die Definition des quantitativen Messbereichs und der Sensitivität erfolgte für beide Zielgene auf Grundlage der Standardkurve und des Hintergrundes nach den Richtlinien zur Interpretation von RQ-PCR Daten von van der Velden et al. (Van Der Velden et al. 2007).

Für die IGH-positiven Proben wurde die ASO-RQ-PCR entsprechend der Publikation Pott et al. durchgeführt (Pott, Brüggemann, et al. 2013). Dementsprechend wurden anhand der IGH-FR1-Sequenzen patientenspezifische Primer erstellt und an Material mit ausreichend hoher Tumorlast getestet. Die eigentliche ASO-RQ-PCR wurde auf dem Taqman ABI 7900 nach folgendem Cycler Protokoll durchgeführt: 2 min Vorinkubation bei 50 °C, 10 min Inkubation bei 95 °C, 50 Zyklen Amplifikation mit je 30 Sek. bei 95 °C und 1 min bei 63 °C pro Zyklus. Bei einer DNA-Menge von 500 ng je Ansatz wurde das MRD Niveau jeder Probe in einer ASO-RQ-PCR mit einem Dreifachansatz bestimmt und an der Verdünnungsreihe indirekt quantifiziert.

Zur Bestimmung einer Hintergrundamplifikation durch unspezifische Primerbindungen der ASO-Primer wurden in jedem RQ-PCR-Ansatz zusätzlich mononukleäre Zellen gesunder Spender (eng. buffy coat, BC) in 6 Wiederholungen sowie eine „no template controle“ (NTC) mitgeführt.

Für die Quantifizierung mittels ASO-RQ-PCR ist neben der Verwendung patientenspezifischer Primer für die Spezifität der Untersuchung die Erstellung eines Quantifizierungsstandards aus hochinfiltrierten diagnostischen Proben notwendig. Somit erfordert diese Methode die Erstellung patientenspezifischer Verdünnungsreihen. Limitierend ist hier beim FL die Tatsache, dass die Tumorlast im diagnostischen Material häufig für eine serielle Dilution zu gering ist. Aus diesem Grund wurden zur Standardisierung die patientenspezifische Verdünnungsreihen aus klonierten Plasmiden hergestellt. Dazu wurde die jeweilige patientenspezifische IGH-Sequenz in einen Plasmid Vektor kloniert und zur Amplifikation in E.-coli-Bakterien transfiziert. Die Ligation und die Transformation wurden entsprechend den Herstellerangaben des TOPO® TA Cloning® Kit durchgeführt. Die Extraktion der Plasmide aus den Bakterienkulturen erfolgte, als sogenannte Säulen-Minipräparation mit dem Wizard®Plus Minipreps DNA Purification System entsprechend der Herstellerangabe.

Für die 15 Patienten aus dem Kollektiv der Gallium-Studie lagen jeweils entsprechende Plasmidstandards vor. Die Ergebnisse wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden für 30 Patienten aus dem Kollektiv der GSLG-Studiengruppe Primer für die ASO-RQ-PCR entworfen und deren Anwendbarkeit nach den geltenden Qualitätskriterien für die ASO-RQ-PCR getestet. Bei erfolgreicher Testung wurde eine ASO-RQ-PCR Quantifizierung von MRD durchgeführt.

2.5 Prinzip der IG-NGS Diagnostik

Für die MRD-Bestimmung mittels NGS ist die Identifikation eines MRD-Markers erforderlich. Dies geschieht über die Bestimmung des sogenannten Indexklons, welcher im Falle eines B-Zell-Lymphoms das klonale Immunglobulinenrearrangement repräsentiert. Die Indexklonidentifizierung zur Bestimmung eines MRD-Markers erfolgte an tumorinfiltiertem diagnostischem Material. Der Arbeitsablauf ist in Abbildung 4 zur Übersicht dargestellt.

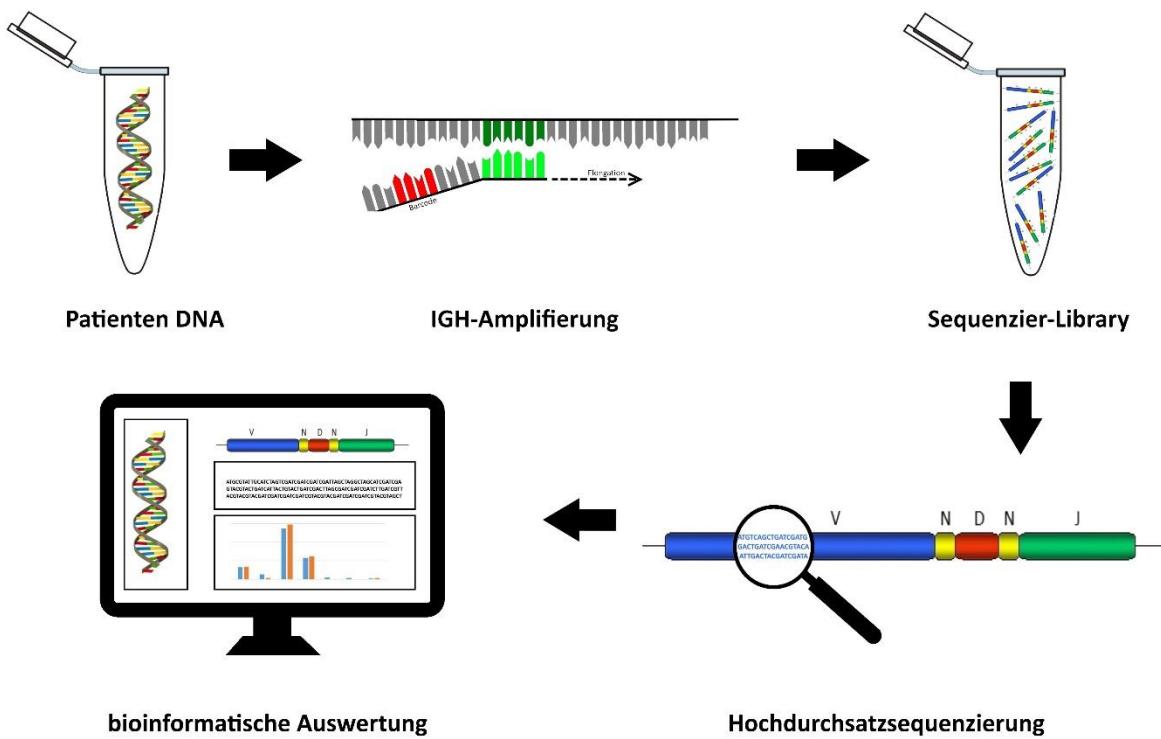


Abbildung 4 Übersicht des IG-NGS Arbeitsablaufes, der abgebildete Ablauf ist zur besseren Übersicht deutlich vereinfacht und auf die entscheidenden Schritte reduziert.

Für NGS-basierte Analysen erfolgt als erster Schritt die Herstellung einer sogenannten Genbibliothek, im nachfolgenden „Library Präparation“ genannt, für die Untersuchungen

dieser Arbeit über eine Amplifikation des IGH-Gens mittels Multiplex-PCR. Die dazu verwendeten Primermixe wurden im Rahmen des europäischen Kooperationsprojektes „EuroClonality NGS“ entwickelt und standen für diese Untersuchungen zur Verfügung (Brüggemann et al. 2019). Das europäische Konsortium ist Teil der europäischen Initiative „European Scientific Foundation for Laboratory Hemato Oncology“ (ESLHO).

Die anschließende Hochdurchsatzsequenzierung erfolgte auf der MiSeq-Plattform von Illumina. Die Sequenzierdaten wurden anschließend über eine standardisierte bioinformatische Plattform (ARResT/Interrogate Plattform) ausgewertet, welche ebenfalls im Rahmen des EuroClonality Netzwerks entwickelt wurde (Knecht et al. 2019).

2.5.1 Herstellung der IGH-Genbibliothek (Library Präparation)

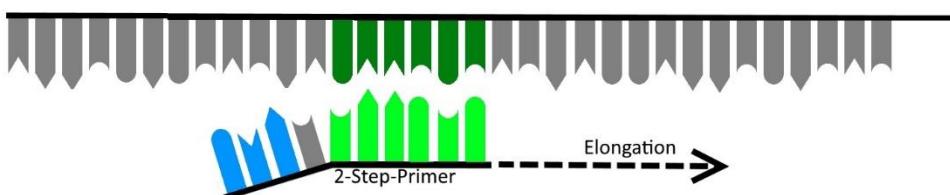
Um die Genbibliothek der IGH-Gene in einer zu untersuchenden Probe zu erstellen, wurde zunächst eine Multiplex-PCR mit einer Primerbibliothek für alle IGHV-Genfamilien durchgeführt. Dabei wurden die IGH-Gene einer Probe mit Multiplexprimern amplifiziert und Nukleotidsequenzen für die Sequenzierung an das PCR-Produkt angefügt. Diese Nukleotidsequenzen enthielten Adaptersequenzen, Primer-Bindestellen und Barcode-Sequenzen. Die Adaptersequenzen ermöglichen das Binden der DNA an die „flow Cell“ und das Unterscheiden des 5‘ vom 3‘ Ende. Die Primer-Bindestellen ermöglichen das Binden der Sequenzierprimer. Die Barcode-Sequenzen werden zur bioinformatischen Identifikation jeder Probe benötigt, da bei jedem Sequenzierlauf mehrere Proben gleichzeitig sequenziert werden. Bei der PCR wurde jeder Probe eine individuelle Kombination aus einem 5‘ Barcode und einem 3‘ Barcode angehängt. Mit Hilfe dieser Kombination war es möglich, jede Sequenz der richtigen Probe zuzuordnen. Die Verwendeten Barcodes sind im Anhang (Tabelle 6) **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** aufgeführt.

Das Anhängen der Nukleotidsequenzen ist prinzipiell in zwei Verfahren möglich als sogenannte 1-Schritt oder 2-Schritt-PCR (Abbildung 5). Beim 2-Schritt-Ansatz wurden in einer ersten PCR die IGH-Gene amplifiziert und ein kurzer, nicht variabler Abschnitt der benötigten Sequenz an das 3‘ und an das 5‘ Ende angehängt. An diese angehängten Sequenzen banden in der zweiten PCR passende Primer, welche jeweils die restliche Nukleotidsequenz mit Barcodes, Adaptersequenzen und Primer-Bindestellen anhängten. Beim 1-Schritt-Ansatz erfolgte die Amplifikation und das Anhängen der Nukleotidsequenzen in

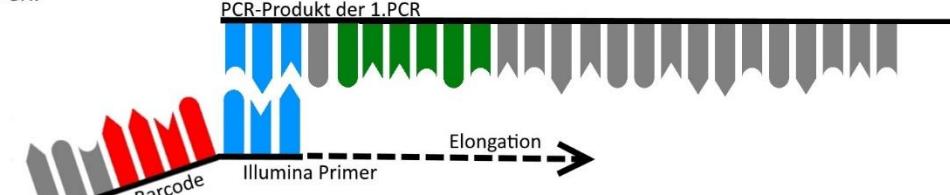
einem Schritt, sodass die verwendeten Primer deutlich länger sind (Tabelle 1). Für diese Arbeit wurden beide Verfahren verwendet.

2-Schritt PCR

1.PCR:



2.PCR:



1-Schritt PCR

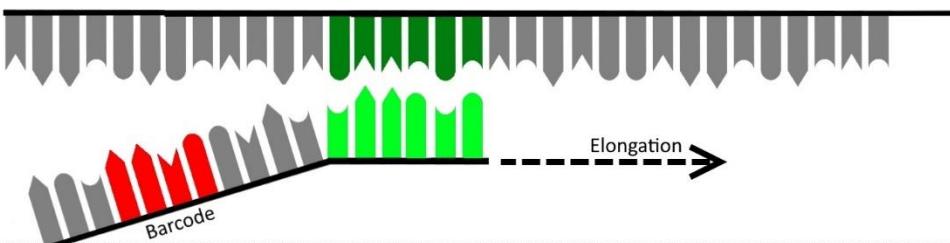


Abbildung 5 Prinzip der 2-Schritt und 1-Schritt-PCR, schematisch ist jeweils der DNA-Strang eines IGH-Gens dargestellt, an den der jeweilige Primer bindet. Die Primerbinderegion am IGH-Gen ist grün, die Primerbinderegion für den zweiten Primer blau und die Barcode-Sequenz rot dargestellt.

Der Vorteil der 2-Schritt-PCR besteht zum einen in geringeren Kosten, da nicht jeder Primer mit einem Barcode versehen werden muss. Zum anderen ist die PCR durch die kürzeren Primer weniger störanfällig.

Der Vorteil der 1-Schritt-PCR auf der anderen Seite besteht erstens in dem verkürzten Arbeitsablaufes und zweitens wird durch nur einen PCR-Arbeitsschritt das Kontaminationspotential verkleinert. Für diese Arbeit wurden beide Methoden für die Indexklonidentifikation und die MRD-Bestimmung verwendet.

Für die Bestimmung des MRD-Markers am diagnostischen Material wurde 100–500 ng DNA eingesetzt, für die MRD Bestimmung in Verlaufsproben jeweils 500 ng. Die verwendete

DNA-Menge von 500 ng entsprechen 75000 Zelläquivalenten, sodass eine theoretische Sensitivität von $1,3 \times 10^{-5}$ erreicht werden konnte.

Die verwendeten Primer waren im Rahmen des EuroClonality Netzwerks entwickelt worden und wurden für dieses Projekt zur Verfügung gestellt. Das Netzwerk hat u. a. Primerbibliotheken für die drei IGHV-Framework-Regionen entwickelt und optimiert, welche alle bekannten IGH-Rearrangements detektieren und quantitativ gleichmäßig amplifizieren. Die Vorwärtsprimer binden im V-Segment jeweils in den konservierten Framework-Regionen FR1-3. Die Rückwärtsprimer binden in einem konservierten Bereich im J-Segment des IGH-Genlocus. Die Primer wurden zur MRD-Markeridentifizierung bei der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) validiert (Brüggemann et al. 2019). In dieser Arbeit wurden die Primer für die IGH-Framework-Regionen FR1, FR2 und FR3 in einem sequentiellen Prozess verwendet.

Aufbau der Primer	Sequenz 5' nach 3'
Vorwärtsprimer 1-Schritt	AATGATA <chem>CCGGCACCACCGAGATCTACANNNNNNNNNACACTTTCCCTACACGACGCTTCCGATCTnnnnnnnnnnnn</chem>
Rückwärtsprimer 1-Schritt	CAAGCAGAACGGCATACGAGAT <chem>NNNNNNNNGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTTCCGATCTnnnnnnnnnnnn</chem>
Vorwärtsprimer 2-Schritt	<chem>CCCTACACGACGCTCTCCGATCTnnnnnnnnnnnn</chem>
Rückwärtsprimer 2-Schritt	<chem>TTCAGACGTGTGCTTCCGATCTnnnnnnnnnnnn</chem>
Barcode-VP	AATGATA <chem>CCGGCACCACCGAGATCTACACNNNNNNNNACACTTTCCCTACACGACGCTC</chem>
Barcode-RP	CAAGCAGAACGGCATACGAGAT <chem>NNNNNNNNGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT</chem>

Tabelle 1 Aufbau der Primer, anstelle der rot markierten Nukleotide ist jeweils der verwendete Barcode einzusetzen; die grün markierten Nukleotide sind Platzhalter für die Nukleotidsequenz, welche an das Zielgen bindet; blau markiert ist der Bereich, an welchen die Barcode-Primer in der zweiten PCR der 2-Schritt-PCR binden.

Die 1-Schritt-Primer bestehen aus zwei konstanten Bereichen, dem Barcode (rot markiert) und der Region, welche an die DNA bindet (grün markiert). Die 2-Schritt-Primer enthalten einen konstanten Bereich, die DNA-bindende Region und die Bindestelle für die Barcode-Primer der zweiten PCR (blau markiert). Die Barcode-Primer, welche für den zweiten Schritt der 2-Schritt-PCR eingesetzt werden, enthalten den Barcode-Bereich (Tabelle 1). Die Zusammensetzung der Primermixe und die Binderegionen der Primer sind im Anhang aufgelistet. Die Pipettieransätze der verschiedenen PCR-Ansätze sind in der Tabelle 2 aufgeführt. Die Angaben der Tabelle sind jeweils die verwendeten Mengen der Reagenzien pro Reaktionsgefäß. Zur Vereinfachung des Arbeitsablaufes wurden einige der Reagenzien vorab zu einem Mastermix zusammengefasst. Die Polymerase (Roche High Fidelity) wurde gekühlt bei einer Temperatur von maximal 4 °C verarbeitet. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Zur Amplifikationskontrolle wurde anschließend eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 3 µl des PCR-Produkts mit 7 µl loading Buffer in Agarosegel 2 % über 40 Minuten bei 130 Volt aufgetrennt. Das Agarosegel wurde vorher mit 0,0001 % GelRed versetzt, um die DNA-Fragmente anzufärben. Als Größenvergleich wurde die FastRuler DNA-Ladder verwendet. Nach den 40 Minuten konnte das Gel mit Hilfe des AlphaManager-HP-System bewertet werden.

Bezeichnung	Stammkonzentration	FR1-2-Schritt PCR	FR2-2-Schritt PCR	FR3-2-Schritt PCR	Barcode PCR	FR1-1-Schritt PCR	FR2-1-Schritt PCR
Puffer mit MgCl ₂	18mM MgCl ₂				5 µl		
PCR Puffer II		5 µl	5 µl	5 µl		5 µl	5 µl
MgCl ₂ -Lösung	25 mM	3 µl	6 µl	3 µl		5 µl	3 µl
dNTP-Mix	10 mM	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Primermix-V-FR1-2-Schritt	100 µM	0.8 µl					
Primermix-V-FR2-2-Schritt	100 µM		1.4 µl				
Primermix-V-FR3-2-Schritt	100 µM			1.6 µl			
Primermix-V-FR1-1-Schritt	100 µM					1 µl	
Primermix-V-FR2-1-Schritt	100 µM						1.6 µl
Barcode-VP	100 µM				1 µl		
Primermix-R-2-Schritt	100 µM	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl			
Primermix-R-1-Schritt	10 µM					1 µl	1 µl
Barcode-RP	100 µM				1 µl		
Roche High Fidelity	5 U/µl				0.5 µl	0.2 µl	0.2 µl
AmpliTaq Gold	5 U/µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl			
DNA		100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	500 ng	500 ng
Aqua dest.					Jeweils auffüllen auf 50 µl		

Tabelle 2 Pipettieransatz der IGH-PCR, dargestellt sind die Pipettieransätze für die 2-Schritt-PCR FR1 bis 3, die Barcode-PCR als zweiter Schritt der 2-Schritt-PCR und die 1-Schritt-PCR FR1 und 2.

Phase	2-Schritt PCR FR1, 2 & 3			Barcode PCR			1-Schritt PCR FR1 & 2		
	Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen
initiales denaturieren	94° C	10 min	1	95° C	2 min	1	94° C	10 min	1
denaturieren	94° C	1 min		95° C	30 sec		94° C	1 min	
Anlagerung	63° C	1 min		63° C	30 sec		63° C	1 min	
Verlängerung	72° C	30 sec	35	72° C	30 sec	20	72° C	30 sec	35
letzte Verlängerung	72° C	30 min	1	72° C	5 min	1	72° C	30 min	1
kühlen	12° C	10 min	1	4° C	10 min	1	12° C	10 min	1

Tabelle 3 Thermocyclerprofil, der IGH-PCR dargestellt sind die Thermocyclerprofile für die 2-Schritt-PCR FR1-3, die Barcode-PCR als zweiter Schritt der 2-Schritt-PCR und die 1-Schritt-PCR FR1 und 2.

2.5.2 Verwendung interner Kalibratoren „Spike-in’s“

Für die quantitative Erfassung des Tumorklons ist die Verwendung interner Kalibratoren notwendig. Für diese Arbeit wurde bei allen Verlaufsproben patientenfremde DNA in bekannter Menge als Kalibrator zu jedem Reaktionsansatz gegeben. Bei den Kalibratoren, im Folgenden „Spike-in’s“ genannt, handelt es sich um Zelllinien-DNA, die in bekannter Konzentration zu jeder Verlaufsprobe beim Ansetzen der PCR gegeben wurde. Dadurch lässt sich ein Korrekturfaktor für die erhaltene Menge an Sequenzen herstellen, der eine Berechnung des MRD-Wertes in Bezug zur Anzahl der eingesetzten Zelläquivalente erlaubt. Die Berechnung des MRD-Wertes anhand von Spike-in’s wird im Abschnitt 2.5.5 beschrieben.

Als Zelllinien wurden Namalwa, SMS-SB und RCH-ACV verwendet. Um die Zelllinien-DNA auf die richtige Konzentration zu verdünnen, wurde zuerst in einer Kontrollgen-PCR die Konzentration und Amplifizierbarkeit bestimmt. Die Verdünnung erfolgte unter der Voraussetzung, dass 1 ng DNA 150 Zelläquivalenten entspricht. Um die Verdünnung möglichst präzise durchzuführen, erfolgte sie in zwei Schritten. Die Zelllinien wurden in einem ersten Schritt auf die folgende Verdünnung eingestellt:

Namalwa 1400 Zellen/ μ l 9,33 ng/ μ l

SMS-SB 140 Zellen/ μ l 0,93 ng/ μ l

RCH-ACV 14 Zellen/ μ l 0,09 ng/ μ l

Anschließend wurde die Konzentration erneut in einer Kontrollgen-PCR bestimmt und die Zelllinien auf die endgültige Konzentration verdünnt.

Namalwa 1000 Zellen/ μ l 6,6666 ng/ μ l

SMS-SB 100 Zellen/ μ l 0,6666 ng/ μ l

RCH-ACV 10 Zellen/ μ l 0,0666 ng/ μ l

Alle drei Zelllinien wurden im gleichen Verhältnis vermischt und 3 μ l der Mischung zu der PCR pipettiert.

2.5.3 Aufreinigung der PCR-Produkte mittels AMPure-Beads

Vor der Sequenzierung ist eine Aufreinigung der PCR-Produkte zur Entfernung von Primer- und Polymerasenresten notwendig. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit AMPure beads, wie im „Amplicon Library Preparation Method Manual 3.2.2“ von GS Junior beschrieben. Als einzige Abweichung vom Protokoll wurde das eingesetzte AMPure Bead DNA-Verhältnis zu 0,9:1 verändert. Es wurden also in den Schritten 4 und 5 jeweils 40 µl Wasser und PCR-Produkt verwendet anstatt 22,5 ml. Die Aufreinigung wurde zweimal durchgeführt. Bei der zweiten Aufreinigung wurden 10 µl gereinigte DNA mit 70 µl Wasser gemischt verwendet. Der gesamte Prozess wurde in Low-Binding-Tubes als Reaktionsgefäß durchgeführt.

2.5.4 Spezifikationen des Sequenzielaufs und der bioinformatischen Auswertung

Um eine exakte DNA-Menge pro Probe zu erreichen, wurden nach der Aufreinigung sämtliche Proben mittels der PicoGreen Methode quantifiziert. Entsprechend der ermittelten Konzentration wurden sämtliche Proben äquimolar gemischt.

Der DNA-Mix wurde danach erneut quantifiziert und auf eine Konzentration zwischen 7 pm/µl und 11 pm/µl eingestellt. Die jeweils verwendete Konzentration wurde entsprechend der Cluster-Dichte des letzten Laufes angepasst. Es wurde eine Cluster-Dichte von 700.000 Clustern pro mm² angestrebt. Die Beladung des Illumina MiSeq wurde entsprechend des Benutzerhandbuchs durchgeführt. Die verwendeten Chemikalien und Materialien wurden dem MiSeq-Reagent-Kit-v2 entnommen. Sequenziert wurden 251 Bp lange Paired-End Libraries. Nach den ersten beiden Läufen wurde die maximale Probenanzahl auf 53 Proben je Sequenzielauf begrenzt.

Jedes sequenzierte IGH-Molekül resultiert in mindestens einer IGH-Sequenz, diese wird als „Read“ bezeichnet. Es wurde eine durchschnittliche Readzahl von 150.000 Reads pro Probe für die diagnostischen Proben und Verlaufspröben kalkuliert. Die generierten Reads eines Sequenzielaufs durchliefen mehrere Qualitätsfilter. Der MiSeq selbst verwirft basierend auf internen Algorithmen alle Reads, die nicht mindestens einen Q-Score von 30 aufweisen, was einem erwarteten Sequenzierfehler von unter eins zu 1000 entspricht. Die Indexklonidentifizierung und MRD-Diagnostik wurden mit Hilfe der ARResT/Interrogate Plattform durchgeführt (Bystry et al. 2016; Knecht et al. 2019). Auch diese Plattform

überprüft die Read Qualität anhand interner Algorithmen und verwendet nur qualitätskontrollierte Reads zur weiteren Analyse.

Bei der Planung der verschiedenen Sequenzierläufe wurde diagnostisches Material und Verlaufsproben eines Patienten in getrennten Läufen sequenziert, um eine Kontamination während des Arbeitsprozesses zu verhindern. Außerdem wurde nie der gleiche Barcode für verschiedene Proben eines Patienten verwendet, um eine Kontamination von Lauf-zu-Laufen und eine bioinformatische Barcode-Kontamination zu verhindern.

Nach jedem Lauf wurde der „Post-Run Wash“ durchgeführt. Vor dem nächsten Lauf wurde der „Maintenance Wash“ zweimal durchgeführt, um die Lauf-zu-Laufen Kontamination zu minimieren. Wurde das Gerät länger als sieben Tage nicht verwendet, wurde der „Standby Wash“ durchgeführt. Alle Waschprozesse wurden entsprechend dem Benutzerhandbuch durchgeführt.

2.5.5 Quantifizierung der Indexklonfrequenz und Erhebung von MRD-Werten

Es wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet, um NGS Ergebnisse zu quantifizieren. Die Frequenz eines Klons wurde berechnet, indem die Reads dieses Klons durch die gesamten IGH-Reads der Patienten-DNA einer Probe geteilt wurden. Diese Indexklonfrequenz wurde für diagnostische Proben zur Indexklon-Identifizierung verwendet.

MRD-Werte wurden über die Korrektur mit Spike-in's in Bezug zur eingesetzten Menge an Zelläquivalenten berechnet. Die Umrechnung von Reads zu MRD-Werten erfolgte entsprechend der von Faham et al. veröffentlichten Formel (Faham et al. 2012).

$$\frac{Reads_{Lymphom} \times \frac{Zellen_{Spike\ ins}}{Reads_{Spike\ ins}}}{Zellen_{Probe\ gesamt}}$$

Bei allen mittels 1-Schritt-PCR amplifizierten Proben wurde zusätzlich 5 % BC zur PCR gegeben. Da unter einer auf B-Zellen gerichteten Therapie wie Rituximab der normale B-Zell-Hintergrund fehlen kann, sollte dadurch ein normaler B-Zell-Hintergrund simuliert und so konstantere Bedingungen geschaffen werden.

2.5.6 Definition des Indexklons

Grundlage für die Definition des Indexklons bildet die bioinformatische Definition eines Klonotyps, der in der Arrest-Datenbank hinterlegt ist. Da jede B-Zelle einen eigenen Klonotyp besitzt, wurde die Identifikation des Indexklons über die quantitative Erfassung der spezifischen Reads vorgenommen, deren Häufigkeit mindestens dreifach höher sein musste als die des zweithöchsten Klonotyps in der untersuchten Probe. Erfüllte ein Klonotyp diese Bedingung wurde er zunächst als dominanter Klonotyp definiert. Für die sichere Identifikation des Indexklons wurde für den dominanten Klonotyp ein Grenzwert von 5 % aller IGH-Reads definiert.

Die Identität der Indexklone wurde durch den Abgleich mit anderen Methoden überprüft. Dazu wurde die Fragmentlänge des Indexklons mit der im Genescan bestimmten Fragmentlänge zur Überprüfung verglichen.

2.5.7 Definition des MRD Status

Verlaufsproben wurden als MRD-positiv gewertet, wenn der Indexklon des Patienten mit mindestens 5 qualitätskontrollierten Reads detektiert wurde. Im Umkehrschluss wurde eine Probe als MRD-negativ gewertet, wenn weniger als 5 Reads detektiert wurden. Entsprach die Menge an Reads einer MRD-positiven Probe nach Spike-in-basierter Umrechnung weniger als 0,9 Zelläquivalenten, wurde die Probe als MRD-positiv unterhalb des quantifizierbaren Messbereichs definiert.

2.5.8 Intermodal vergleichende MRD Analyse

Für den Vergleich der NGS-Daten mit RQ-PCR Ergebnissen wurden die folgenden Kriterien gewählt: Misst eine Methode einen positiven MRD-Wert, während die andere einen negativen misst, wurde dies als eine qualitative Abweichung definiert. Liegt der positive Messwert über 10^{-4} , ist dies eine schwerwiegende qualitative Abweichung. Liegt der positive Messwert unter 10^{-4} und damit im Grenzgebiet der Sensitivität, gilt dies als grenzwertige qualitative Abweichung. Eine quantitative Abweichung liegt vor, wenn beide Methoden einen positiven Messwert messen, dieser jedoch eine Differenz von mehr als einer Zehnerpotenz aufweist. Misst die RQ-PCR einen positiven Wert, der unterhalb des quantitativen Messbereichs liegt, wird der Bereich zwischen quantitativem und sensitivem Messbereich als Messwert für den

Vergleich angenommen. Misst NGS einen positiven Wert unterhalb des quantitativen Messbereichs, wird der Kehrwert aller untersuchten Zellen einer Probe als Messwert angenommen. Das entspricht dem MRD-Wert von einer Lymphomzelle in der untersuchten Probe.

2.6 Statistische Auswertung

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten und Messwerte wurden mittels kommerzieller (Microsoft Excel 365) und „Open-Source-“ (R, R-Studio) Software statistisch analysiert. Hierbei kamen gängige statistische Methoden und Parameter, wie Minima und Maxima, Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen zur Anwendung. Sollten Korrelationen zweier Variablen untersucht werden, so wurde im Falle eines linearen Zusammenhangs der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet. Zum Vergleich zweier Stichproben wurden der t-Test und Fishers Exakter Test verwendet. Welcher Test jeweils verwendet wurde, ist im Ergebnisteil beschrieben.

Sämtliche MRD-Werte wurden vor der weiteren statistischen Auswertung zur Basis 10 logarithmiert.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden zunächst verschiedene methodische Aspekte der IG-NGS-Diagnostik im Hinblick auf die Anwendbarkeit bei Follikulären Lymphomen untersucht. Zunächst wurde untersucht, ob die Verwendung der 1-Schritt-PCR oder der 2-Schritt-PCR zur Herstellung der IGH-Genbibliotheken einen Einfluss auf die Identifikation der Indexklone hat.

Diagnostische Proben wurden mit 1-Schritt- (59) und/oder der 2-Schritt-PCR (41) amplifiziert. Es ergaben sich kongruente Ergebnisse für beide Amplifizierungsmethoden hinsichtlich der Frequenz der erfolgreichen Indexklon-Identifizierung. In 93 % der Proben (2-Schritt-PCR: 55/59, 1-Schritt-PCR: 38/41) konnte mit beiden Multiplexverfahren ein dominanter Klon gefunden werden. Dieser fand sich in 90 % (53/59) mittels 2-Schritt- und in 70 % (29/41) mittels 1-Schritt-PCR mit einer Abundanz von über 5 %.

3.1 Vergleich verschiedener DNA-Polymerasen

DNA-Polymerasen haben eine entscheidende Bedeutung für die Spezifität und Geschwindigkeit des Amplifikationsprozesses der PCR-Reaktion. Die sogenannten „High-fidelity Polymerasen“ verfügen über eine Korrekturlese-Funktion (engl. proof reading), d. h., sie sind in der Lage, den Einbau eines unpassenden Nukleotids zu erkennen und dieses anschließend durch die Exonuclease-Aktivität wieder aus der DNA zu entfernen. Damit ist die Spezifität der Amplifikation im Vergleich zu normalen Taq-Polymerasen drastisch erhöht.

Um die optimale DNA-Polymerase für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zu bestimmen wurden, zunächst fünf diagnostische und fünf Verlaufsproben mit einer High-Fidelity-Polymerase („FastStart High Fidelity“; Firma „Roche“) und einer normalen DNA Polymerase („Eagle-Taq Polymerase“ Firma „Roche“) analysiert. Die jeweils gemessenen MRD-Werte der diagnostischen Proben und der Verlaufsproben sind in Abbildung 6 dargestellt. Bei den Proben eins bis fünf handelt es sich um diagnostische Proben, die restlichen sind Verlaufsproben. Es zeigte sich keine quantitative oder qualitative Abweichung.

Bei gleichwertigen Ergebnissen wurde daher für diese Arbeit aus Gründen eines einfacheren Arbeitsprozesses die „Eagle-Taq Polymerase“ verwendet.

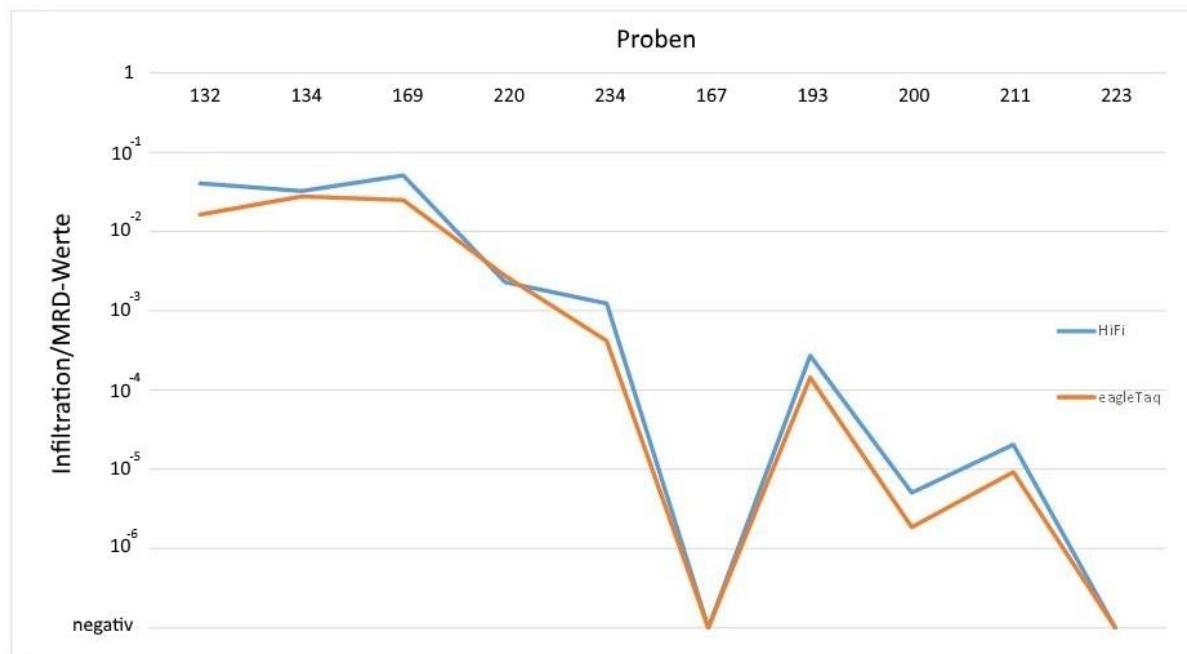


Abbildung 6 Infiltrationsgrade und MRD-Werte in Abhängigkeit der verwendeten Polymerase, die Ordinate ist logarithmiert und zeigt die mit Spike-in's berechnete Infiltration für diagnostische Proben bzw. den MRD-Wert für Verlaufsproben, entlang der Abszisse sind die Probennummern aufgetragen. HiFi steht für die „FastStart High Fidelity“ Polymerase der Firma „Roche“, eagleTaq steht für die „Eagle-Taq Polymerase“ der Firma „Roche“.

3.2 Identifikation des Indexklons

Um die Anwendbarkeit und Leistungsfähigkeit eines NGS-basierten Ansatzes für die MRD-Diagnostik zu analysieren, wurden zunächst 88 diagnostische Proben von 80 Patienten mittels IG-NGS zur Erfassung eines MRD-Markers untersucht. Alle diagnostischen Proben waren mittels IGH-Konsensus-PCR und Genescan analysiert worden und waren diesbezüglich als „klonal“ (61) oder „klonal vor polyklonalem Hintergrund“ (19) klassifiziert. Die Patientencharakteristika der 65 Patienten aus der GLSG-Kohorte standen uns zur Verfügung und sind im Anhang dargestellt (Tabelle 7 im Anhang). Für die 15 Patienten aus der „Gallium-Studie“ lagen keine klinischen Daten vor.

Die Indexklon-Identifizierung erfolgte mittels IG-NGS für die Frameworkregionen FR1 bis 3. Der Nachweis eines dominanten IGH-Klonotyps mit einer Abundanz von > 5 % wird im Allgemeinen als Indexklon akzeptiert, der im Verlauf als Marker für die MRD-Erfassung herangezogen werden kann (Ladetto et al. 2014; Pulsipher et al. 2015). Bei Follikulären Lymphomen mit einem Hintergrund polyklonaler B-Zellen finden sich jedoch mehrheitlich weitere höher abundante IGH-Klonotypen. Für diese Arbeit wurde daher als zusätzliches Qualitätskriterium ein Klon dann als Indexklon definiert, wenn dieser als Klon mit einer mindestens dreifach höheren Abundanz als der zweithäufigste IGH-Klon nachweisbar war.

Mit dieser Vorgehensweise war es in der untersuchten Kohorte möglich, mittels NGS in 89 % (71/80) der diagnostischen Blut- und /oder Knochenmarkproben einen Indexklon mit einer Abundanz von > 5 % sicher zu identifizieren (Abbildung 7).

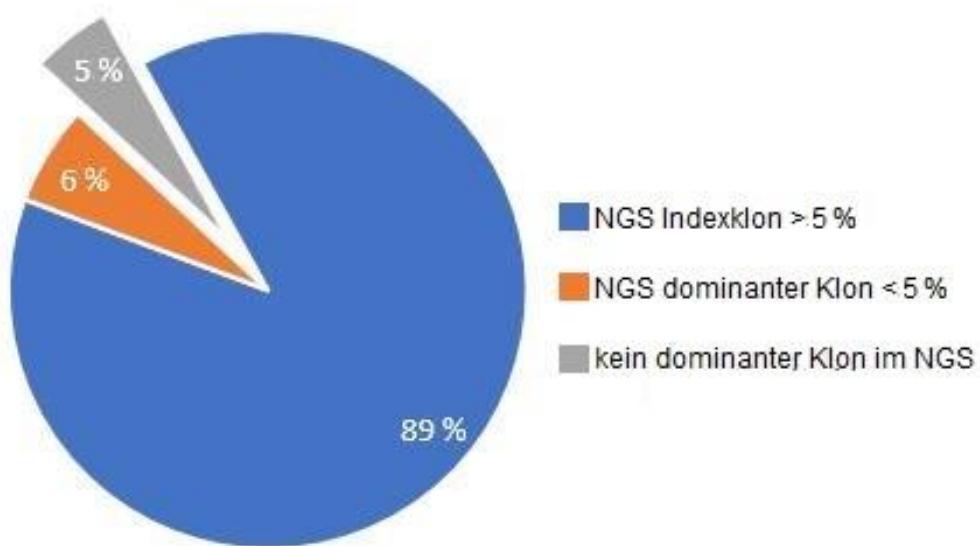


Abbildung 7 NGS-basierte Indexklonidentifizierung, in blau dargestellt, ist der prozentuale Anteil an Patienten, bei denen NGS einen Indexklons über 5 % mit einer mindestens dreifach höheren Abundanz als der zweithäufigste IGH-Klon identifizierte. Orange entspricht dem Anteil, bei dem ein dominanter Klon mit einer mindestens dreifach höheren Abundanz als der zweithäufigste IGH-Klon gefunden wurde, dieser jedoch unter 5 % lag. Grau ist der Patienten-Anteil, bei dem mittels NGS kein dominanter Klon identifiziert wurde.

Die Korrektheit der NGS-Indexklone wurde sowohl umfassend als auch stichprobenartig mit anderen Verfahren bestätigt. Dazu erfolgte zunächst ein Abgleich der Fragmentlänge des Indexklons und des klonalen Rearrangements, das in der Genescananalyse identifiziert werden konnte. Mit einer tolerierten Ungenauigkeit von zwei Basenpaaren zeigten alle 71 Proben mit Indexklon dieselbe Fragmentlänge im Genescan und der NGS-Sequenz.

Bei 18 von 71 Patienten lagen bereits IGH-Sequenzen aus einer Sangersequenzierung vor, die zum Vergleich herangezogen werden konnte. In allen Fällen stimmte die Indexklonsequenz mit der Sangersequenz überein.

Zur weiteren Validierung wurden für 30/71 Patienten basierend auf den NGS-Indexklonsequenzen allelspezifische Primer hergestellt und in einer ASO-RQ-PCR am diagnostischen Material hinsichtlich ihrer Spezifität in einem Primertest getestet. Bei 13/30 konnte nachfolgend ein sensitiver ASO-RQ-PCR-Ansatz etabliert werden. Bei 17 Patienten

ließ sich im RQ-Primertest kein qualitativ ausreichendes Fluoreszenzsignal generieren, hier lagen bei allen Fällen Mutationen in der Bindungsstelle der Sonde vor, sodass durch fehlende Sondenhydrolyse in diesen Fällen kein Fluoreszenzsignal in der RQ-PCR generiert werden konnte.

Bei fünf Patienten (6,2 % der Gesamtkohorte) zeigte sich in der diagnostischen Probe ein dominanter Klon, welcher jedoch unterhalb des Schwellenwertes von 5 % lag, sodass eine Validierung durch zusätzliche Methoden erforderlich war. Bei allen fünf Patienten konnte der dominante Klon durch zusätzliche Methoden als Indexklon bestätigt werden, sodass die Indexklone für die spätere MRD-Diagnostik verwendet werden konnten. Bei allen entsprach die Genescan-Fragmentlänge mit einer tolerierten Ungenauigkeit von zwei Basenpaaren der NGS-Fragmentlänge. Bei 4/5 Patienten konnte zusätzlich mittels Sanger-Sequenzierung die NGS-Sequenzen bestätigt werden. Bei einem Patienten war aufgrund mangelnden diagnostischen Materials keine Sanger-Sequenzierung mehr durchführbar.

Somit konnte bei insgesamt 76/80 Patienten auf Basis dieser Marker eine IG-NGS-basierte MRD-Diagnostik im Verlauf erfolgen.

Die Hauptursache einer Indexklonfrequenz unter 5 % liegt in einer geringen Tumorlast in der diagnostischen Probe. Auf Grundlage Indexklonsequenzen wurden bei den oben genannten 4/5 Patienten allel spezifische Primer erstellt und eine ASO-RQ-PCR durchgeführt. Die so ermittelten RQ-PCR-Werte zeigen in Übereinstimmung mit den NGS-Ergebnissen eine Infiltration der diagnostischen Probe unter 5 % (zwischen 1,2 % und 0,01 %).

Bei vier Patienten (5 % der Gesamtkohorte) konnte kein dominanter Klon mittels IG-NGS identifiziert werden. Sowohl eine geringe Tumorinfiltration als auch degradierte DNA, wodurch besonders die Amplifikation von längeren Fragmenten erschwert wird, können dafür mögliche Ursachen sein. Passend dazu konnte bei einem der vier Patienten das klonale Signal im Genescan nur in den kurzen Fragmenten der FR3-PCR nachgewiesen werden. Bei einem zweiten Patienten zeigte sich im NGS nur eine schlechte Amplifikation mit wenigen Gesamt-Reads. Bei den zwei restlichen weiteren Patienten ohne NGS-Indexklon lag in der Genscan-Analyse lediglich ein klonaler Peak vor polyklonalem Hintergrund vor, dies reflektiert im Allgemeinen eine geringe Infiltration des diagnostischen Materials. Die Genescan-Ergebnisse sind in Abbildung 8 und Abbildung 9 dargestellt.

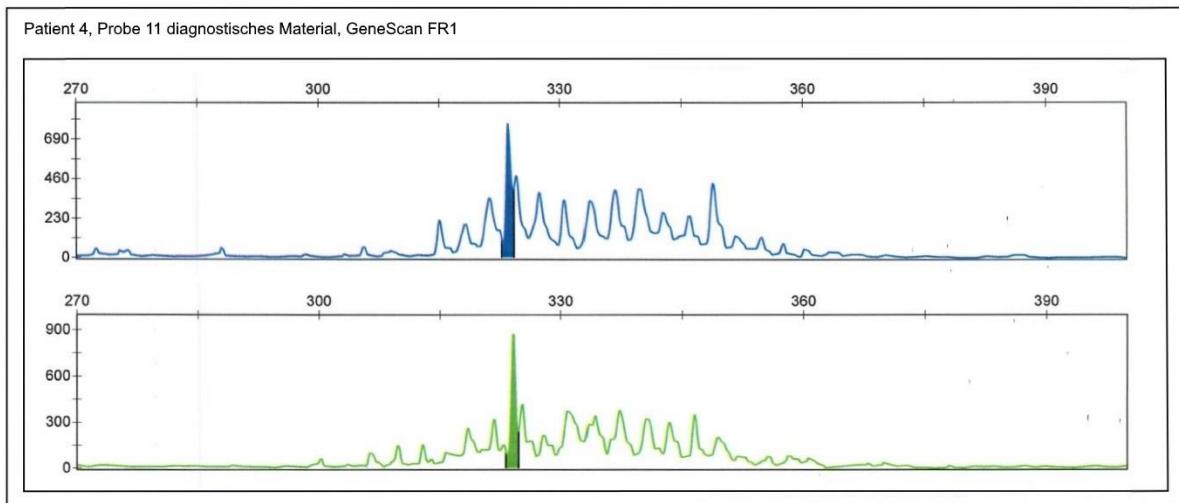


Abbildung 8 Genescan-Ergebnis des diagnostischen Materials eines Patienten in FR1 im Doppelansatz, der Genescan zeigt ein schwach klonales Signal bei 324 Bp. Nach Sanger-Sequenzierung passt die Sequenz zum größten, im NGS gefundenen Klon.

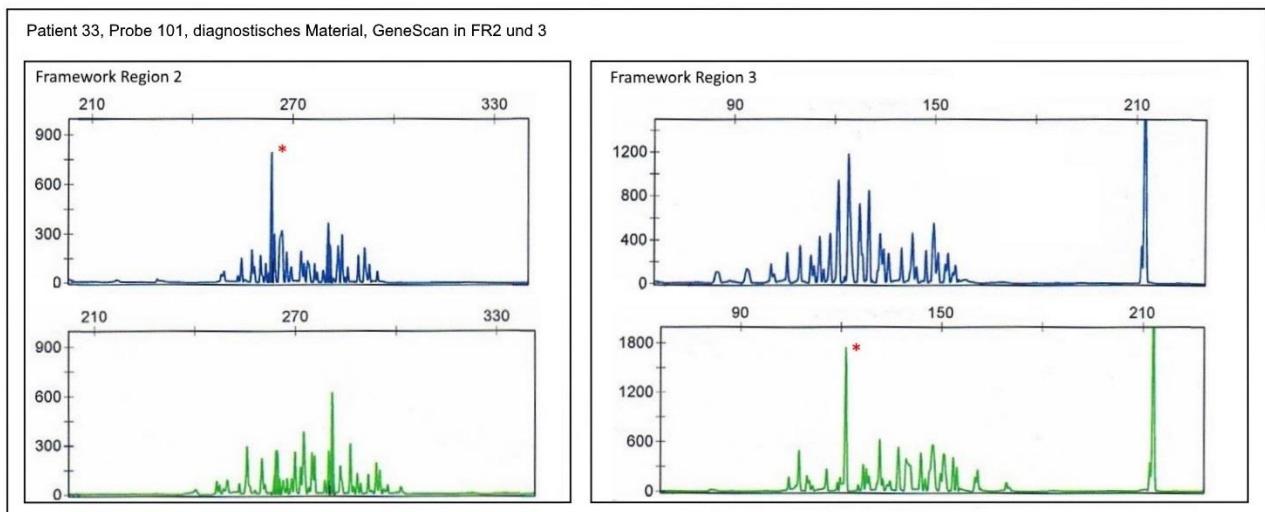


Abbildung 9 Genescan-Ergebnis des diagnostischen Materials eines Patienten in FR2 und 3, das klonale Signal ist jeweils mit einem Sternchen markiert. Das dargestellte Ergebnis wurde zunächst als nicht klonal gewertet. Da sich der Peak in FR2 und 3 jedoch in einer Wiederholung des Doppelansatz reproduzieren ließ, wurde das Ergebnis als klonal vor polyklonal gewertet.

Auf den gesamten Patientenpool übertragen ließ sich bei Proben mit klonalem Signal vor polyklonalem Hintergrund deutlich häufiger keine Indexklon mittels NGS identifizieren als bei Proben mit eindeutigem klonalem Genescan-Signal (21 % vs. 8 %). Aufgrund der Vorselektion der Kohorte zeigten alle Patienten in der Genescan-Analyse ein „klonales Signal“ oder ein „klonales Signal vor polyklonalem Hintergrund“. In Tabelle 4 ist die Häufigkeit der Indexklonidentifizierung zusammen mit den Genescan Ergebnis dargestellt.

NGS	Indexklon > 5 %	GeneScan	
		klonales Signal	klonal vor polyklonalem
	71	56	15
dominanter Klon < 5 %	5	3	2
kein dominanter Klon	4	2	2

Tabelle 4 Indexklonidentifizierung NGS im Vergleich zu Genescan-Ergebnissen

Zusammenfassend zeigte sich in der vergleichenden Analyse mittels Genescan, dass der Infiltrationsgrad der diagnostischen Probe ein kritischer Faktor für die Klonotyp-Identifikation mittels IGH-NGS war. Zur Bestimmung einer möglichen kritischen Infiltrationsgrenze wurden 46 diagnostische Proben mittels RQ-PCR quantifiziert und die Ergebnisse mit dem so ermittelten Infiltrationsgrad korreliert.

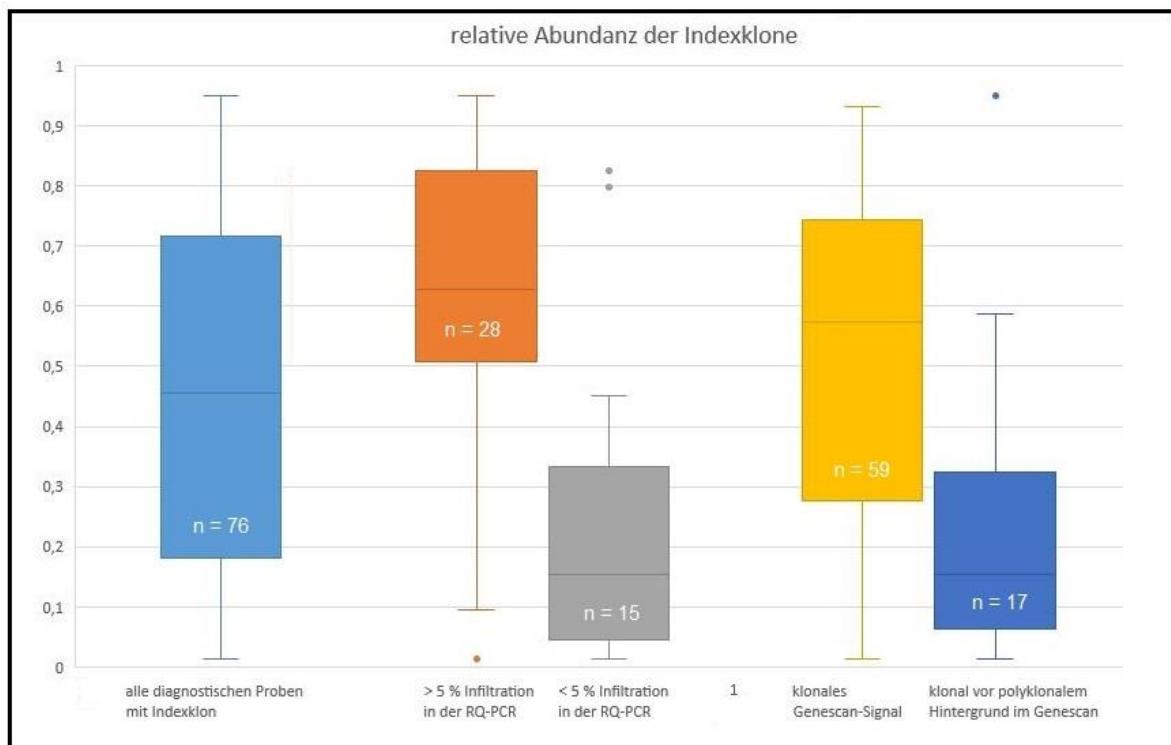


Abbildung 10 im NGS ermittelte Frequenz aller identifizierten Indexklone, links ist die Frequenz aller im NGS identifizierten Indexklone abgebildet. Rechts davon sind verschiedener Subgruppen in Abhängigkeit davon abgebildet, ob die Infiltration in der RQ-PCR über oder unter 5 % liegt, bzw. ob der Genescan ein eindeutig klonales Signal zeigt, oder ein klonales Signal vor polyklonalem Hintergrund.

Die Ergebnisse zeigen (Abbildung 10), dass die Infiltration des diagnostischen Materials eng mit der Detektion eines Indexklons korreliert. Es zeigt sich, dass eine Tumorinfiltration von mindestens 5 % in 97 % aller untersuchten Proben die Identifikation eines Indexklon erlaubt. Bei einem Infiltrationsgrad von < 5 % konnte ein Indexklon nur noch in 57 % der Fälle mit den gewählten Kriterien sicher identifiziert werden. Der Unterschied war im Fisher-Exakt-Test hoch signifikant ($p = 0,0036$).

3.2.1 Vergleich von Blut und Knochenmark zur Indexklonidentifizierung

Das Knochenmark ist bei Diagnose eines Follikulären Lymphoms im fortgeschrittenen Stadium häufig infiltriert, wohingegen eine messbare periphere Ausschwemmung durch Lymphomzellen häufig fehlt. Hinsichtlich der Indexklonidentifizierung wurde bei 8 Patienten mit parallelen Blut- und Knochenmarkproben bei Diagnose eine NGS-Analyse in jeweils beiden Proben durchgeführt.

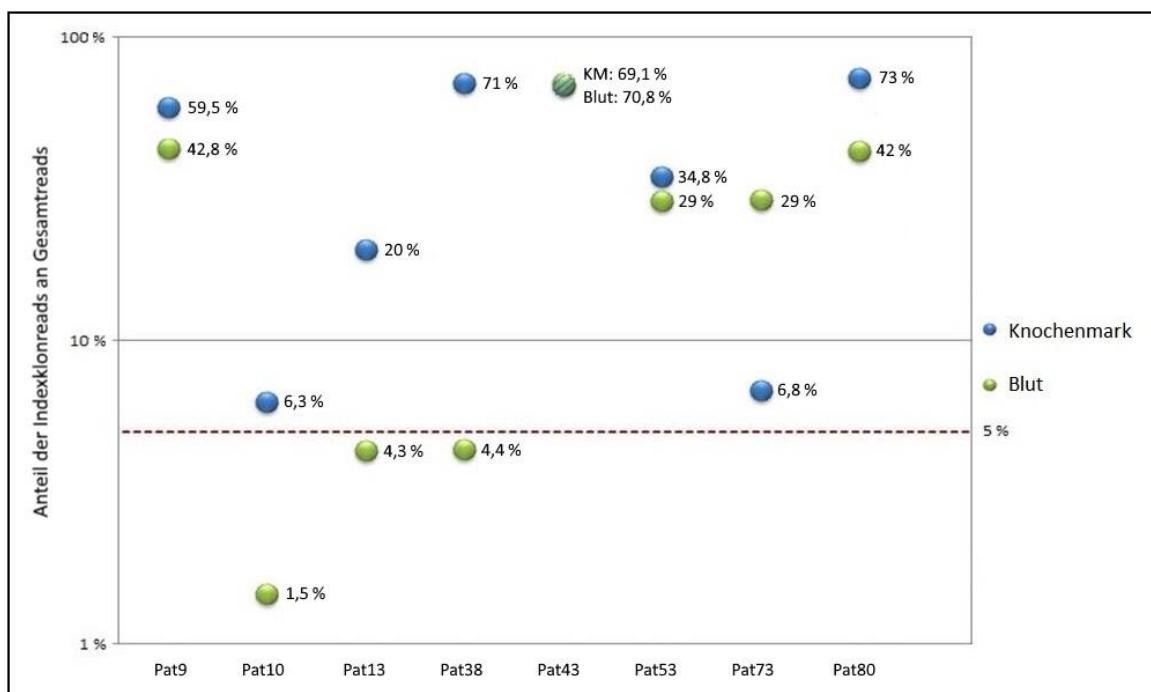


Abbildung 11 Infiltration der Indexklone in Blut und Knochenmark, dargestellt sind 8 Patienten, von denen sowohl Blut, als auch Knochenmark zum diagnostischen Zeitpunkt analysiert wurde. Die rote Linie stellt die 5 % Grenze dar, unterhalb derer ein Indexklon als unsicher identifiziert gilt.

Die jeweilige Indexklonfrequenz in Blut und Knochenmark der parallel untersuchten Proben ist in Abbildung 11 aufgetragen. Bei sechs Patienten konnte eine höhere Indexklonfrequenz im Knochenmark im Vergleich zum peripheren Blut bestimmt werden, bei einem Patienten

waren Blut und Knochenmark gleich stark infiltriert. Lediglich bei einem Patienten wurde der Indexklon im peripheren Blut höher als im Knochenmark bestimmt.

Bei allen Patienten lag die Abundanz im Knochenmark über 5 %, während bei drei Patienten der Indexklon nicht allein mittels der Blutprobe sicher mit einer Abundanz von > 5 % identifiziert werden konnte. Im Durchschnitt lag die Abundanz bei diesen 8 Patienten im Knochenmark um den Faktor 3,8 höher als im Blut.

Im Gesamtkollektiv aller diagnostischen Proben ließ sich kein Unterschied in der durchschnittlichen Abundanz des Indexklons zwischen Blut und Knochenmark finden, die mittlere Indexklonfrequenz lag bei 42 % im Blut und bei 43 % im Knochenmark. Auch die Indexklonfrequenz über 5 % war im Blut mit 86,7 % und im Knochenmark mit 87,5 % vergleichbar.

Dies ist auf die Patientenselektion für die untersuchte Patientenkohorte zurückzuführen, die anhand eines positiven Klonalitätsnachweises mittels Genescan in Blut oder Knochenmark ausgewählt worden war. Anhand der Ergebnisse der parallelen Blut- und Knochenmarkproben würde man für die Indexklonidentifizierung einer unselektierten Kohorte präferentiell Knochenmark als diagnostisches Material auswählen.

3.2.2 IGHV-Verteilung

Die IGHV-Genverwendung Follikulärer Lymphome anhand im NGS identifizierten Indexklone ist in Abbildung 12 dargestellt. Repräsentativ für normale B-Zellen ist die IGHV-Genverwendung einer gesunden Population anhand einer Buff-coat-Probe dargestellt.

Insgesamt verteilten sich die Indexklone der Follikulären Lymphome dieser Arbeit auf 27 verschiedene IGHV-Genfamilien. Mit 59 % zeigt sich eine präferentielle Verwendung der VH-3 Genfamilie. Die Verteilung der Genfamilien der Indexklone entsprach im Wesentlichen der IGHV-Genverwendung gesunder B-Zellen, wie der Vergleich mit den IGHV-Genfamilien im Buffy-coat zeigt.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der gesunden Population und den Indexklonen zeigte sich bei der deutlich häufigeren Verwendung des VH 3-48 Gens in der Kohorte der Follikulären Lymphome, während dies zusammen mit VH-3-23 das am häufigsten verwendete Gen darstellte, war VH 3-48 im BC deutlich weniger vertreten. Die Häufigkeit des VH 3-48 Gens war nach Fisher-Exakt-Test signifikant unterschiedlich ($p = 0,008$).

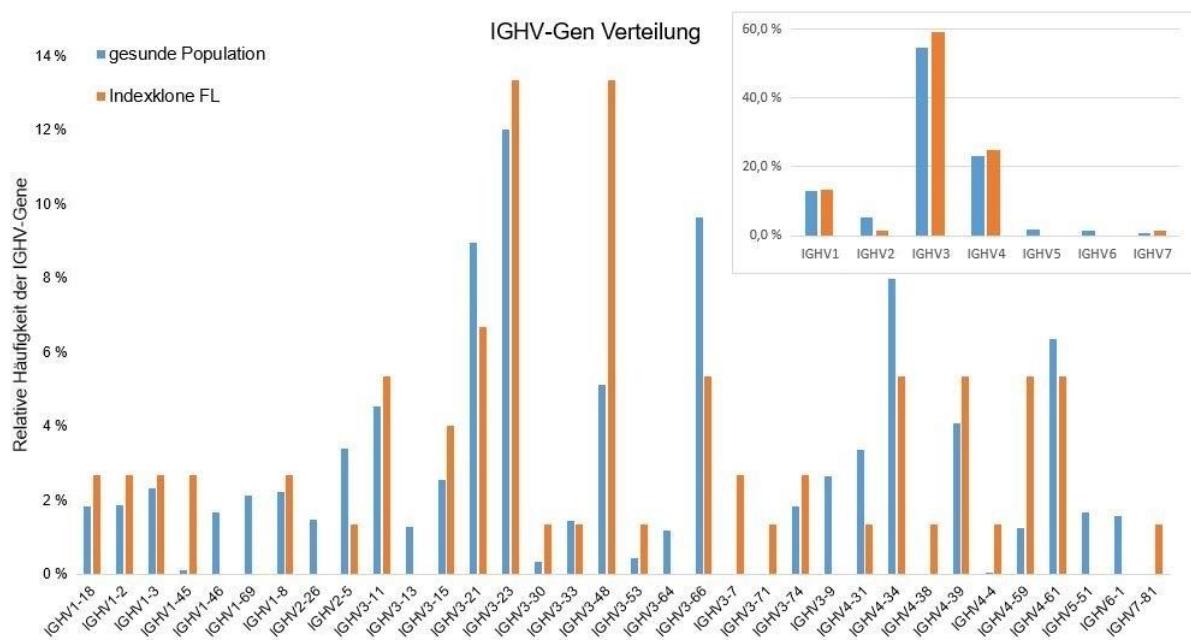


Abbildung 12 IGHV-Genverwendung, entlang der Abszisse sind die IGHV-Genfamilien der identifizierten Indexklone und einer gesunden Population dargestellt. Die Ordinate zeigt die relative Häufigkeit dieser Gene an. Das Balkendiagramm oben rechts zeigt die Häufigkeit der sieben IGHV-Genfamilien. Die Daten für die gesunde Vergleichsgruppe wurden durch das Sequenzieren einer BC-Probe gewonnen.

3.3 MRD Erfassung mit NGS

Nach der Identifizierung des Indexklons erfolgte der Einsatz von IG-NGS für die MRD-Erfassung in Verlaufsproben. Es wurden insgesamt 149 Verlaufsproben von 76 Patienten mit einem Indexklon untersucht. Von diesen konnte bei 34 % (50/149) aller Proben eine minimale Resterkrankung mittels NGS detektiert werden, 99 Proben waren negativ.

Die NGS-MRD-Werte der positiven Proben lagen zwischen $6,8 \times 10^{-1}$ und $1,1 \times 10^{-5}$, wobei 70 % der positiven Proben in einem niedrigen MRD-Bereich zwischen 10^{-5} und 10^{-3} lagen. Bei 4 % (6) der Proben wurde ein positives MRD-Ergebnis unterhalb des quantitativen Messbereichs der Methode festgestellt. Beispielhaft sind 10 mittels NGS quantifizierte MRD-Verläufe in Abbildung 13 abgebildet.

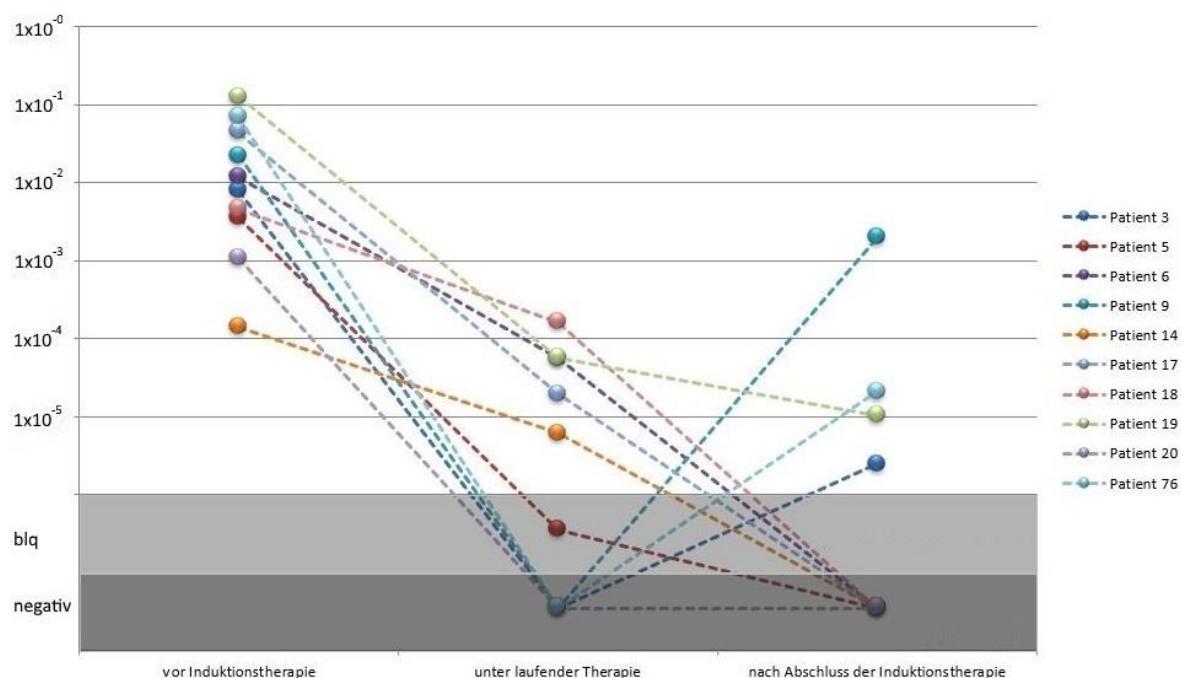


Abbildung 13 MRD-Verlauf von 10 zufälligen Patienten, dargestellt ist der MRD-Verlauf von 10 Patienten mit einer diagnostischen Probe, einer Verlaufsprobe unter laufender Induktionstherapie und einer Verlaufsprobe nach Abschluss der Induktionstherapie. Der hellgraue Bereich stellt Proben mit positivem MRD-Wert unterhalb des quantitativen Messbereichs dar (blq, engl. below quantifiable), im dunkelgrauen Bereich liegen negative Proben.

Die Verlaufsproben wurden sowohl mittels 2-Schritt-PCR als auch mittels 1-Schritt-PCR analysiert. Um einen möglichen Einfluss der beiden PCR-Verfahren auf die MRD-Detektion zu untersuchen wurden 22 Proben mit 2-Schritt und 1-Schritt-PCR der gleichen Framework-Region quantifiziert. Mit beiden Verfahren konnte in 95 % (21/22) der Proben konkordante MRD-Ergebnisse generiert werden. Bei einer Probe wurde nur mittels 1-Schritt-PCR mit $4,6 \times 10^{-6}$ ein sehr niedrig positives MRD-Ergebnis gemessen, während in der 2-Schritt-PCR ein

negatives Ergebnis gemessen wird. Bei der verwendeten DNA-Menge von 500 ng und so geringen MRD-Werten ist ein negatives Ergebnis in einer Messwiederholung statistisch wahrscheinlich. Somit lassen sich keine relevanten Differenzen zwischen den PCR-Methoden zeigen.

3.3.1 Vergleich der MRD-Bestimmung mittels RQ-PCR und IG-NGS

Bei 95/149 Verlaufsproben wurde eine RQ-PCR zum Vergleich mit IG-NGS zur MRD-Bestimmung durchgeführt. Als Zielgen für die RQ-PCR wurde bei 30 Proben die t(14;18) Translokation und bei 65 Proben die klonale IGH-Genumlagerung verwendet. Für die vergleichende Analyse wurden die ASO-RQ-PCR und t(14;18)-RQ-PCR Ergebnisse zusammengefasst.

Zusätzlich zu den 95 Verlaufsproben lagen bei 27 diagnostische Proben RQ-PCR Ergebnisse vor, so dass insgesamt 122 Proben für den Vergleich zwischen RQ-PCR und NGS zur Verfügung standen. Für die Quantifizierung mittels IG-NGS wurden alle Proben unter Verwendung von Spike-in's als Kalibrator analysiert. Die gemessenen MRD-Werte sind in Abbildung 14 als Streudiagramm dargestellt.

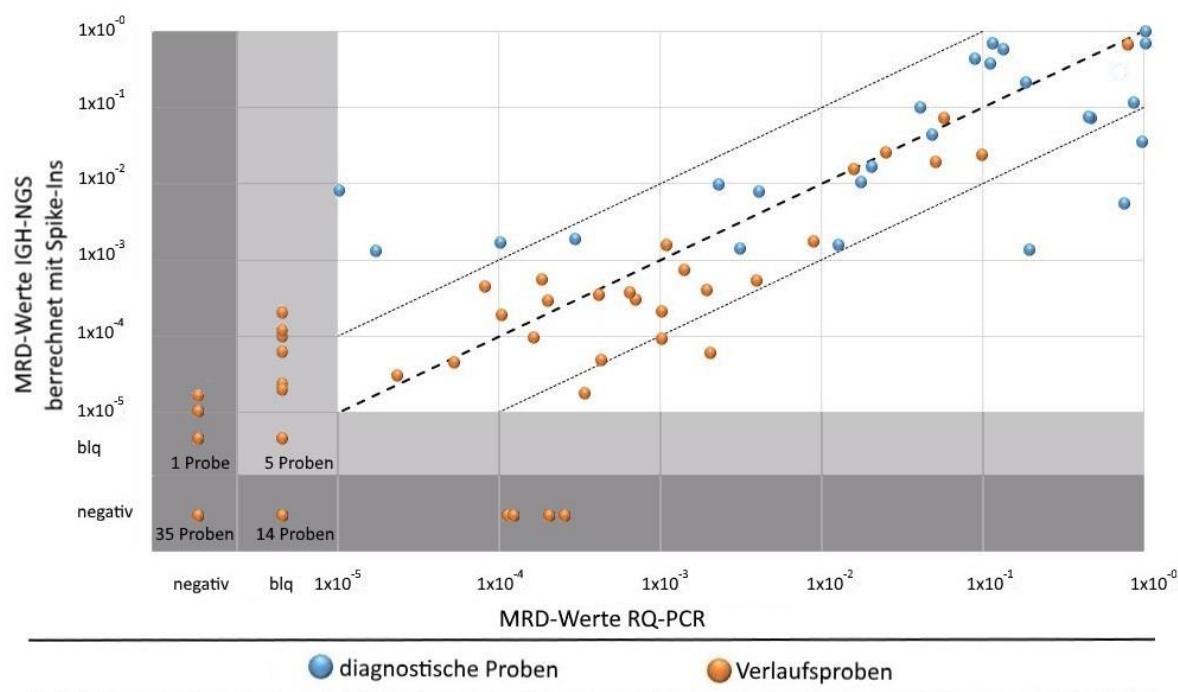


Abbildung 14 Streudiagramm der MRD-Werte gemessen mit RQ-PCR und NGS, entlang der Abszisse sind in der RQ-PCR gemessene MRD-Werte abzulesen, entlang der Ordinate im NGS ermittelte MRD-Werte. Der hellgraue Bereich stellt Proben mit positivem MRD-Wert unterhalb des quantitativen Messbereichs dar, im dunkelgrauen Bereich liegen negative Proben. Die gestrichelte Linie markiert eine theoretische perfekte Übereinstimmung der beiden Methoden. Die gepunkteten Linien umfassen einen Toleranzbereich von einer Zehnerpotenz nach oben und unten.

Im Folgenden wird zunächst betrachtet, wie oft NGS und die RQ-PCR zu einem nominal gleichen MRD-Ergebnis kommen und in welchen Fällen Abweichungen auftreten. Dazu werden nur die Daten der Verlaufsproben betrachtet, da diese Betrachtung für diagnostische Proben bereits in Abschnitt 3.2 erfolgt ist.

NGS	RQ-PCR		Proben ohne RQ-PCR Ergebnis	gesamt
	MRD positiv	MRD negativ		
MRD positiv	39	3	8	50
MRD negativ	18	35	46	99

Tabelle 5 MRD-Werte im NGS im Vergleich zur RQ-PCR, bei 30/95 Fällen war das Zielgen der RQ-PCR die t(14;18) Translokation und in 65/95 Fällen das IGH-Gen. Bei den diskrepanten Fällen war das Zielgen der RQ-PCR war in 11/21 Fällen die t(14;18) Translokation und in 10/21 Fällen das IGH-Gen.

In 78 % (74/95) der Verlaufsproben ergab die MRD-Bestimmung mit NGS und RQ-PCR ein kongruentes Ergebnis. Davon waren, wie in Tabelle 5 dargestellt, 39 Proben kongruent positiv und 35 kongruent negativ. 21 (22 %) Proben waren nicht kongruent, dabei misst in 18 Proben nur die RQ-PCR das positive Signal und in 3 Fällen nur NGS. Diese abweichenden Proben sind in Abbildung 15 dargestellt.

Ein Großteil der Diskrepanzen bestand aus Proben (15/21) bei denen die RQ-PCR einen positiven MRD-Wert unterhalb des quantitativen Messbereichs maß, welcher mittels NGS nicht bestätigt werden konnte.

Es gab keine hochfiltrierten Verlaufsproben mit qualitativer Abweichung. Der höchste positive Messwert aller qualitativen Abweichung lag bei $2,5 \times 10^{-4}$. Bis auf vier Abweichungen traten alle in einem MRD-Niveau unter 1×10^{-4} oder unterhalb des quantifizierbaren Messbereichs auf. Alle 4 Proben mit positivem MRD-Wert über 10^{-4} wurden mit der t(14;18) Translokation als Zielgen untersucht.

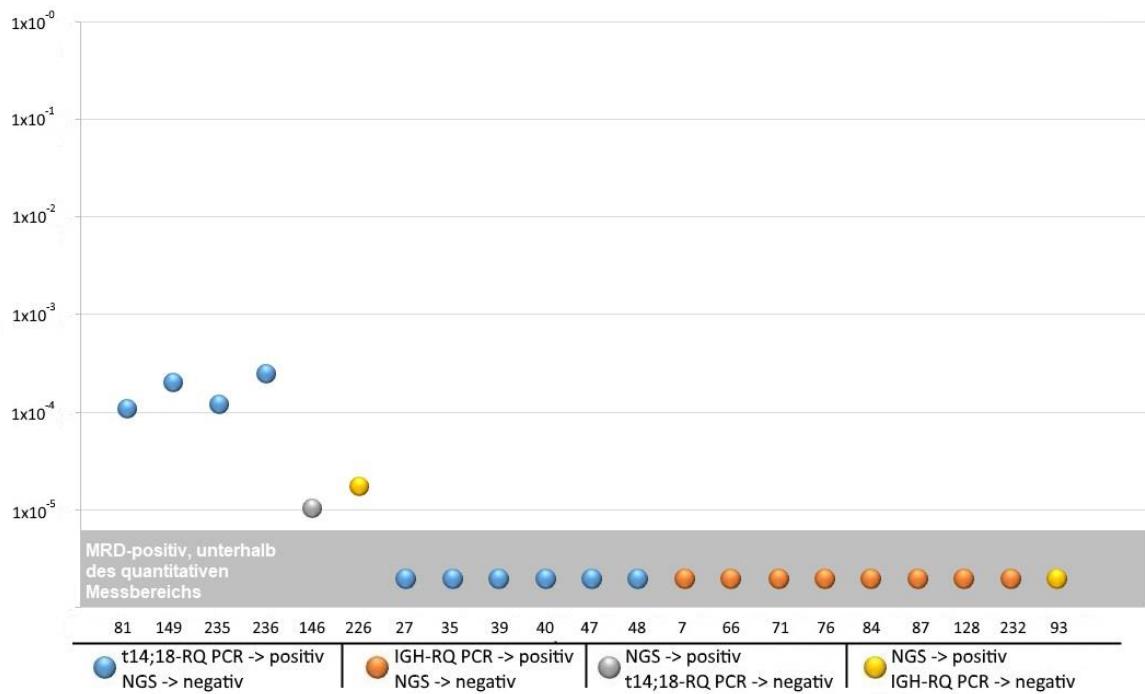


Abbildung 15 Darstellung aller diskrepanten Verlaufsproben, Entlang der Abszisse sind die Probennummern zu sehen, entlang der Ordinate die jeweiligen MRD-Werte. Der hellgraue Bereich ist hier als positiv unterhalb des quantitativen Messbereichs der jeweiligen RQ-PCR oder NGS definiert.

Das Auftreten von Diskrepanzen im Graubereich der RQ-PCR lässt sich anhand des MRD-Verlaufs des Patienten 15 darstellen (Abbildung 16). Die diagnostische Probe und die Verlaufsproben, welche durch die RQ-PCR im quantitativen Bereich gemessen wurden, zeigten eine gute Übereinstimmung zwischen NGS und der t(14;18)-RQ-PCR. Bei drei Proben maß die RQ-PCR einen positiven Messwert unterhalb des quantitativen Messbereichs. Eine Probe davon konnte NGS bei $6,4 \times 10^{-5}$ quantifizieren, bei den anderen beiden Proben bestätigte NGS den positiven MRD-Wert nicht.

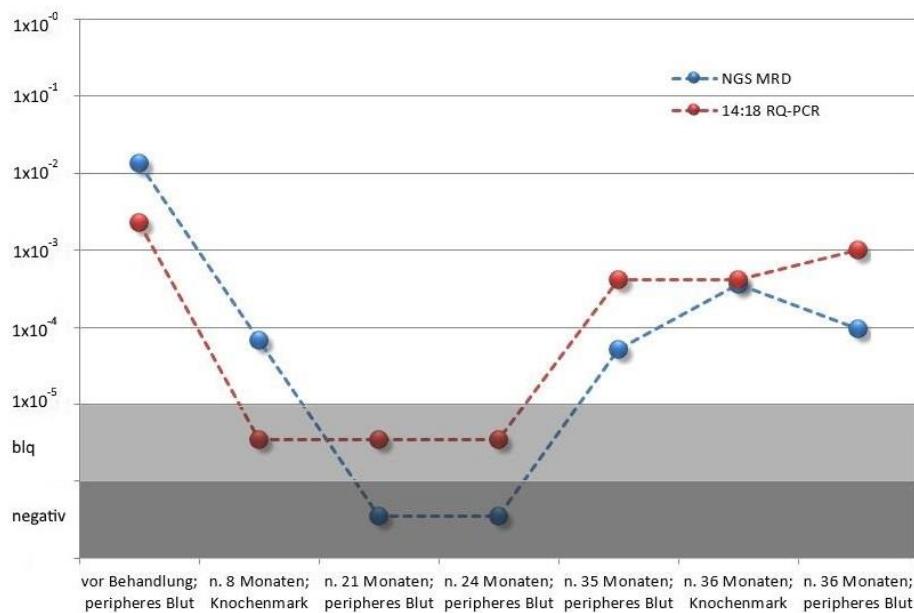


Abbildung 16 MRD-Verlauf Patient 15, dargestellt ist der MRD-Verlauf eines Patienten mit einer diagnostischen Probe und sechs Verlaufsproben. Entsprechend der Legende ist von jedem Zeitpunkt der NGS-MRD-Wert und der MRD-Wert der RQ-PCR dargestellt. Der hellgraue Bereich stellt Proben mit positivem MRD-Wert unterhalb des quantitativen Messbereichs dar, im dunkelgrauen Bereich liegen negative Proben.

Neben dem absoluten Vergleich des MRD-Status wurden auch die NGS-Messwerte mit den Werten der RQ-PCR korreliert. Dazu wurden die Spike-in-basierten Werte der diagnostischen- und Verlaufsproben zusammen untersucht (Abbildung 14). Es zeigte sich eine gute lineare Korrelation zwischen NGS und der RQ-PCR. Der Pearson-Korrelationskoeffizient betrug für alle positiv quantifizierbaren Proben ohne qualitative Abweichung (53) 0,81. Die Standardabweichung als Maß für die Streuung betrug 0,87 Zehnerpotenzen über alle Proben und 0,55 Zehnerpotenzen für die Verlaufsproben. Besonders für die Verlaufsproben lag hier eine sehr gute lineare Korrelation zwischen RQ-PCR und NGS mit einer geringen Streuung vor.

Die etwas höhere Streuung der diagnostischen Proben war insbesondere auf sechs Proben mit einer Abweichung von mehr als einer Zehnerpotenz zurückzuführen. Bei 2/6 diagnostischen Proben mit quantitativer Abweichung zeigte sich auch in den dazugehörigen Verlaufsproben relevante Abweichungen. Die MRD-Verläufe dieser beiden Patienten sind in Abbildung 17 dargestellt. Es zeigt sich, dass NGS in diesen beiden Fällen konsistent niedrigere Werte als die RQ-PCR misst. Bei beiden Patienten war das Zielgen der RQ-PCR die t(14;18) Translokation, sodass eine zielgenabhängige Beeinträchtigung der NGS-basierten MRD-Diagnostik durch Mutationen im IGH-Gen naheliegend ist.

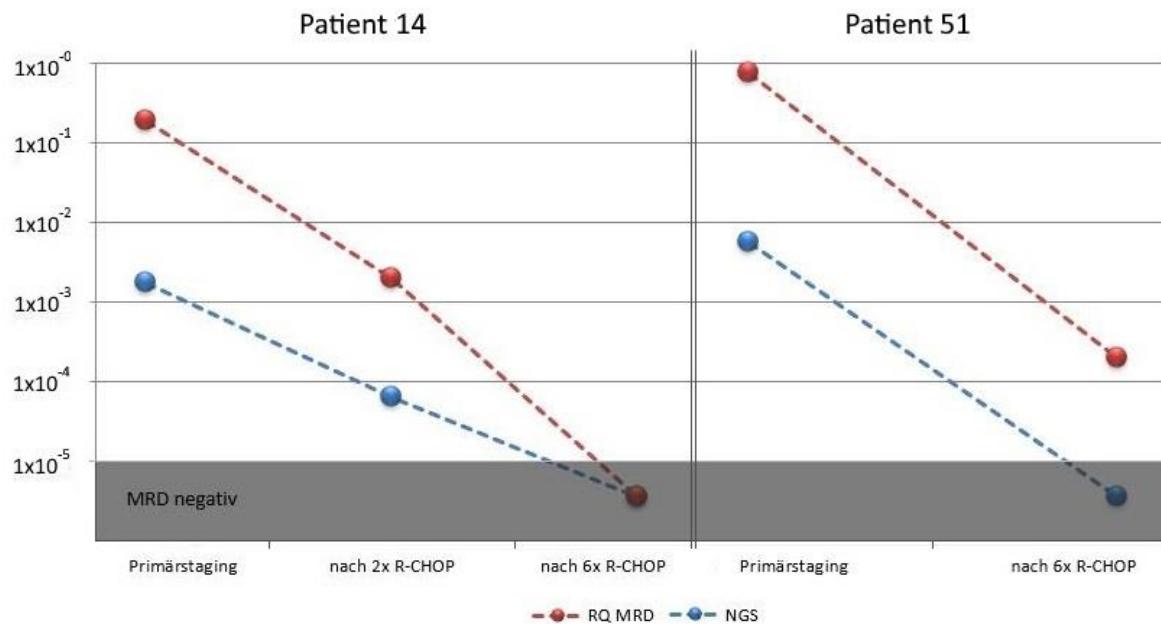


Abbildung 17 MRD-Verlauf Patient 14 und 51, dargestellt ist der MRD-Verlauf von zwei Patienten. Es sind jeweils die NGS-MRD-Werte und die MRD-Werte der RQ-PCR dargestellt. Im dunkelgrauen Bereich liegen negative Proben.

Die anderen vier Patienten mit quantitativer Abweichung in der diagnostischen Probe zeigten keine Diskrepanzen in den dazugehörigen Verlaufsproben.

Anhand des MRD-Verlaufes des Patienten 60 (Abbildung 18) lässt sich beispielhaft das Auftreten von zielgenabhängigen Diskrepanzen darstellen. Hier detektierte NGS-FR1 und FR2 zum diagnostischen Zeitpunkt Werte passend zur t(14;18)RQ-PCR. Bei den Verlaufsproben zeigte sich weiterhin eine gute Übereinstimmung der NGS-FR2-MRD-Werte mit den RQ-PCR-Werten. Diese MRD-Werte lassen sich jedoch nicht im NGS-FR1 messen. Eine mangelnde Amplifikation in der FR1-Multiplex-PCR durch die anhaltende somatische Hypermutation ist eine plausible Erklärung dafür.

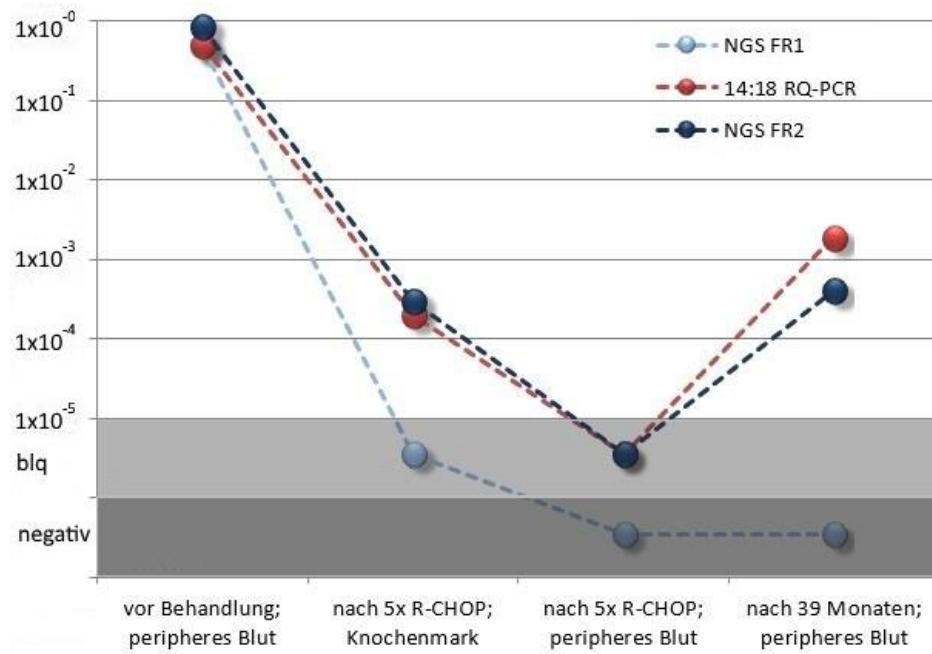


Abbildung 18 MRD-Verlauf Patient 60, dargestellt ist der MRD-Verlauf eines Patienten mit einer diagnostischen Probe und drei Verlaufsproben. Entsprechend der Legende ist von jedem Zeitpunkt der NGS-FR1 und NGS-FR2-MRD-Wert, sowie der MRD-Wert der RQ-PCR dargestellt. Der hellgraue Bereich stellt Proben mit positivem MRD-Wert unterhalb des quantitativen Messbereichs dar, im dunkelgrauen Bereich liegen negative Proben.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, den NGS-MRD-Wert auf Basis der Indexklonreads zu berechnen. In anderen Arbeiten wird dazu sowohl die unbereinigte Abundanz des Indexklons als auch, wie in dieser Arbeit, ein auf Zelläquivalenten beruhender MRD-Wert verwendet, der mittels Spike-in-basiertem Korrekturfaktor berechnet wird. Zur Untersuchung, ob die Verwendung von Spike-in's notwendig für eine korrekte Quantifizierung ist, sind in Abbildung 19 vergleichend die mittels Spike-in-basierten NGS-MRD-Werte und die unbereinigte Indexklonfrequenzen als Bland-Altman-Plot dargestellt.

Beide Berechnungsmethoden zeigten eine sehr gut lineare Korrelation mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,92$ zueinander. Allerdings zeigte sich eine systematische Abweichung zwischen den Messwerten, wobei jeweils über die unbereinigte Indexklonfrequenz höhere MRD-Werte gemessen werden.

Im Durchschnitt lag die Indexklonfrequenz eine Zehnerpotenz über den Spike-in-basierten MRD-Werten. Bei MRD-Werten unter 10^{-2} verstärkt sich dieser Effekt noch, hier liegen die Werte regelhaft 1,5 Zehnerpotenzen auseinander.

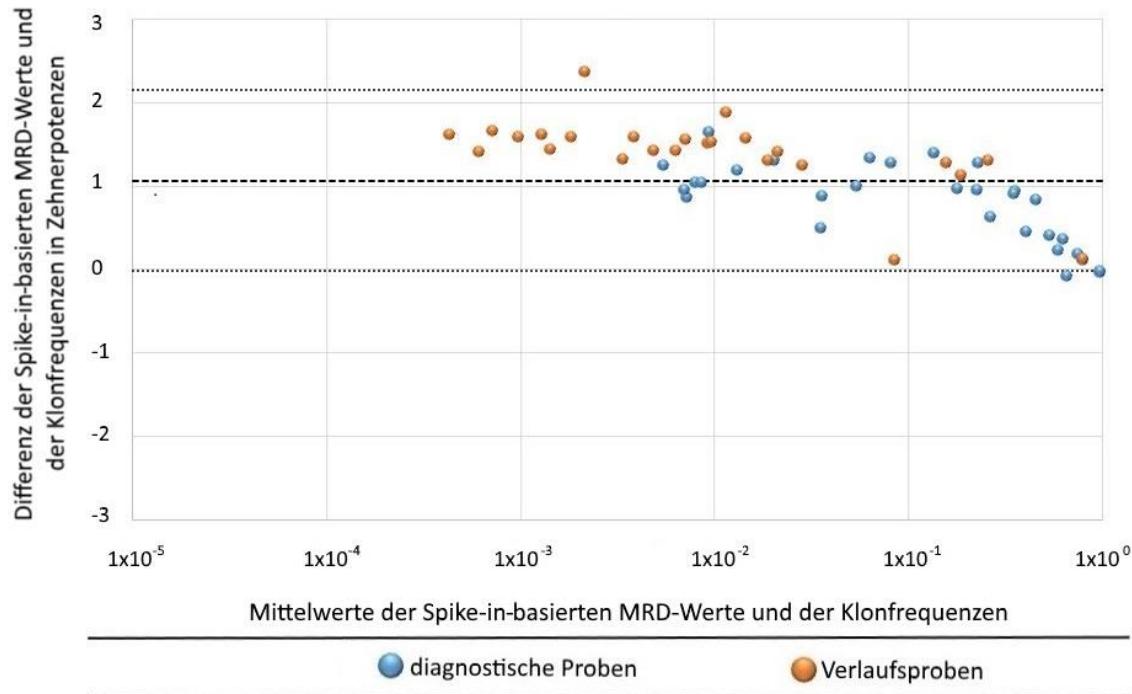


Abbildung 19 Bland-Altman Plot der Spike-in-basierten MRD-Werte und der Klonfrequenz, entlang der Abszisse sind die Mittelwerte der jeweiligen Messwerten dargestellt, entlang der Ordinate ist die Differenz in Zehnerpotenzen der jeweiligen Messwerten abgebildet. Die gestrichelte Linie markiert die mittlere Differenz, also den Mittelwert aller Differenzen. Die gepunkteten Linien liegen 1,96 Standardabweichungen über bzw. unter der mittleren Differenz.

Dieser Sachverhalt zeigte sich anschaulich in Abbildung 20. Hier ist der MRD-Verlauf des Patienten 1 dargestellt. Bei der diagnostischen Probe zeigt sich eine gute Deckung zwischen der Indexklonfrequenz und der RQ-PCR. Betrachtet man allerdings die Verlaufsproben, lag die Klonfrequenz im Mittel 1,4 Zehnerpotenzen über den MRD-Werten von RQ-PCR und NGS. Die MRD-Werte der beiden Methoden zeigten hier lediglich eine mittlere Differenz von 0,12 Zehnerpotenzen.

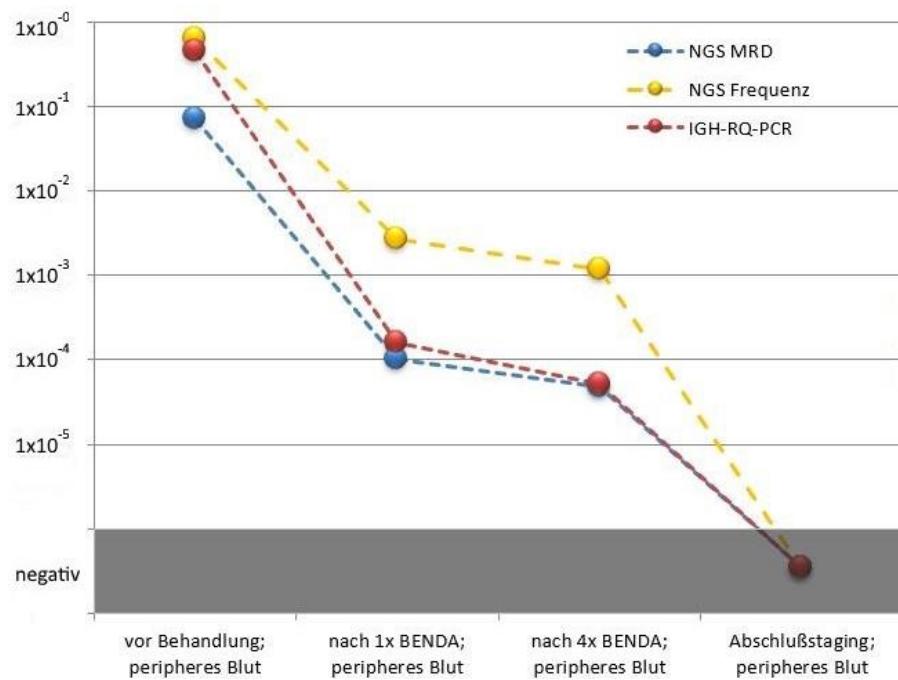


Abbildung 20 MRD-Verlauf Patient 1, dargestellt ist der MRD Verlauf eines Patienten mit einer diagnostischen Probe und drei Verlaufsproben. Entsprechend der Legende sind von jedem Zeitpunkt der Spike in-basierte MRD-Wert, die Klonfrequenz und der MRD-Wert der RQ-PCR dargestellt. Im dunkelgrauen Bereich liegen negative Proben.

Um zu untersuchen, ob die höheren Werte der Indexklonfrequenzen oder die niedrigeren Spike-in-basierten Werte die realen MRD-Werte abbilden, erfolgte die Validierung der Messwerte über die RQ-PCR. In Abbildung 21 sind alle Proben, die mit NGS und RQ-PCR im positiven und quantifizierbaren Bereich gemessen wurden (53) als Bland-Altman-Plot abgebildet. Alle NGS-Werte in dieser Abbildung sind Spike-in-basiert berechnet.

Es zeigte sich, dass die Messwerte über alle MRD-Niveaus hinweg in einer konstanten Streuung um den Null-Wert herum lagen. Die mittlere Differenz beträgt hier 0,12 Log-Stufen, wobei die durchschnittlich leicht größeren Werten in der RQ-PCR gemessen wurden. Vergleicht man die NGS-Werte basierend auf der Indexklonfrequenz betrug die mittlere Differenz zur RQ-PCR 0,92 Log-Stufen (nicht dargestellt).

Dies zeigt im Abgleich zur RQ-PCR, dass regelmäßig falsch hohe MRD-Werte gemessen werden, wenn die Indexklonfrequenz zur Quantifizierung der NGS-MRD-Ergebnisse verwendet wird. Bei Verwendung von Spike-in-basierten Korrekturfaktoren liegt diese systematische Abweichung nicht vor.

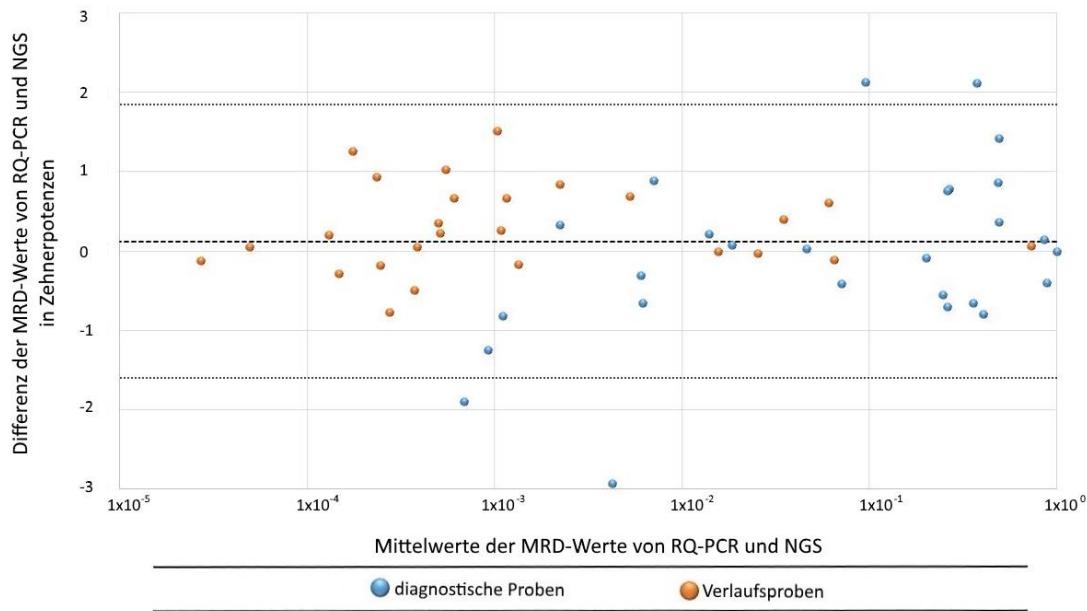


Abbildung 21 Bland-Altman-Plot der MRD-Werte gemessen in RQ-PCR und NGS, dargestellt sind alle quantifizierbaren positiven Proben. Entlang der Abszisse sind die Mittelwerte von Messwerten der RQ-PCR und NGS dargestellt, entlang der Ordinate ist die Differenz der Zehnerpotenzen von Messwerten der RQ-PCR und NGS abgebildet. Die gestrichelte Linie markiert die mittlere Differenz, also den Mittelwert aller Differenzen. Die gepunkteten Linien liegen 1,96 Standardabweichungen über bzw. unter der mittleren Differenz.

3.4 Prognostische Bedeutung des MRD Nachweises mittels NGS

Um die prognostische Relevanz der mittels IG-NGS gewonnenen MRD-Daten zu ermitteln, wurde das progressionsfreie Überleben (PFS) der Patienten in Abhängigkeit vom IG-NGS-MRD-Status direkt nach der Induktion und/oder in einem Intervall von 6-8 Monaten nach Abschluss der Induktion berechnet. Für die Überlebensanalyse standen klinische Daten von 43 der 65 Patienten aus der Studie GLSG2000 zur Verfügung.

Nach Ende der Induktionstherapie waren 83 % der Blutproben und 46 % der Knochenmarksproben MRD-negativ. Im Blut zeigte sich damit auf molekularer Ebene ein besseres Therapieansprechen als im Knochenmark.

Die Ergebnisse der Überlebensanalyse in Abhängigkeit vom IG-NGS-MRD-Status sind als Kaplan-Meier Kurve in Abbildung 22 dargestellt. Patienten die nach der Induktionstherapie oder im 6–8 monatlichen Intervall danach ein MRD negatives Ergebnis erzielten, hatten ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben von 11 Jahren im Vergleich zu Patienten mit einem MRD positivem Ergebnis, die im Median bereits nach 2,2 Jahren ein klinisches Rezidiv aufwiesen. ($p = 0,0085$).

Betrachtet man die Ergebnisse der MRD-Bestimmung im Blut (39) und Knochenmark (23) getrennt, so zeigt sich, dass ein positiver MRD-Nachweis nach Abschluss der Therapie unabhängig vom Untersuchungsmaterial mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Aufgrund der kleinen Patientenzahlen in den jeweiligen Subgruppen (NGS neg. und NGS pos.) der Analyse von Blut und Knochenmark war der Unterschied nur in der Gesamtkohorte signifikant.

Ein Vorteil für die MRD-Erfassung an Knochenmark oder Blut ließ sich anhand der Überlebenszeitanalysen nicht zeigen.

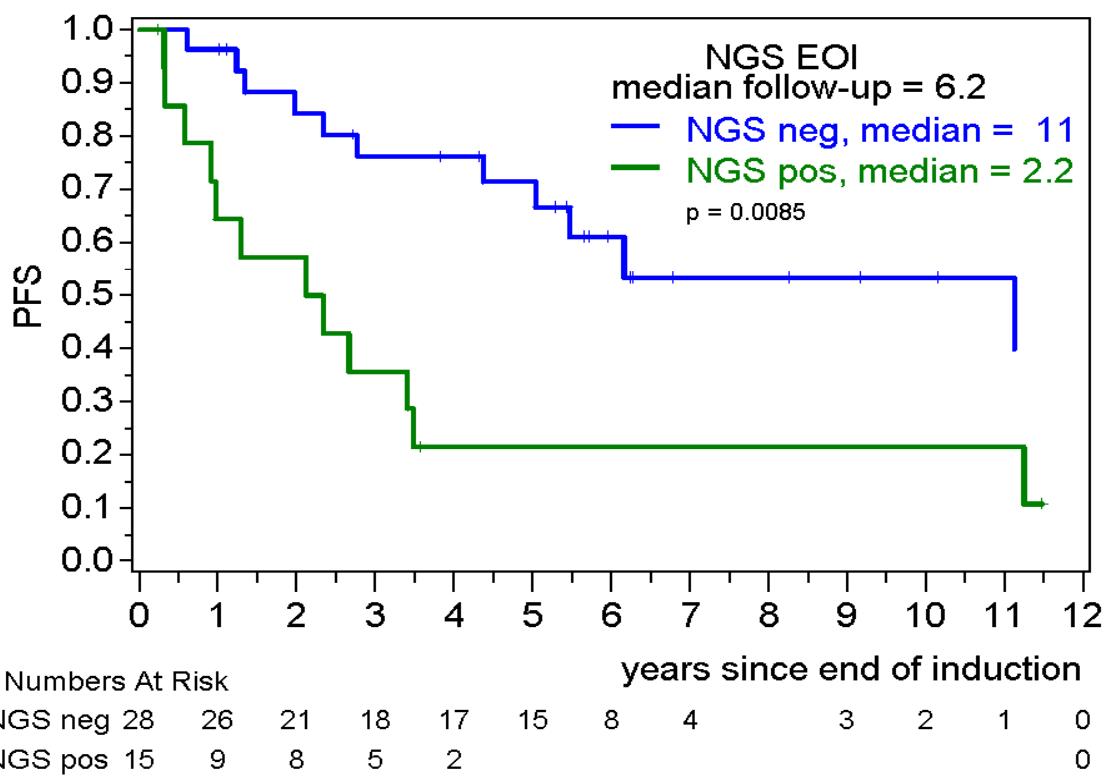


Abbildung 22 Überlebenszeitanalyse von allen 43 Patienten aus der GLSG Kohorte, bei denen die notwendigen klinischen Daten zur Verfügung standen

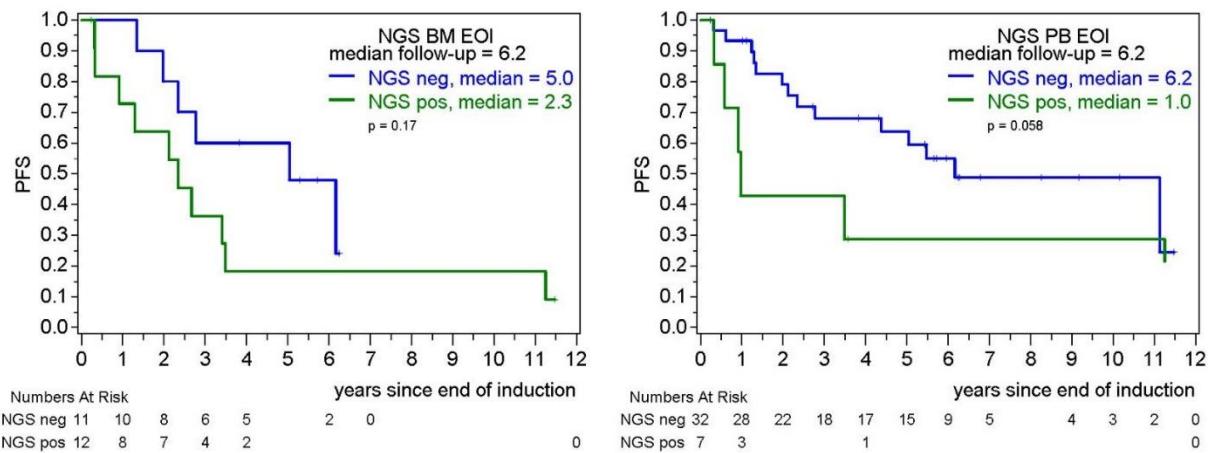


Abbildung 23 Überlebenszeitanalyse getrennt nach dem Kriterium, ob Knochenmarksproben (23) oder Blutproben (39) untersucht wurden.

4 Diskussion

Die prognostische Bedeutung von MRD-Diagnostik bei Follikulären Lymphomen mit PCR-basierten Methoden konnte durch zahlreiche Studien belegt werden (Apostolidis et al. 2000; Brown et al. 2007; Galimberti et al. 2014; Ghielmini et al. 2004; Goff et al. 2009; Hirt et al. 2008; Ladetto et al. 2006, 2008, 2013; Rambaldi et al. 2005, 2002).

Hierbei wurde die MRD-Diagnostik verwendet, um die Effizienz neuer Behandlungsprotokolle bei Follikulären Lymphomen zu evaluieren und das Ansprechen auf molekularer Ebene als möglichen Prognosefaktor zu etablieren. Die publizierten Daten zur klinischen Relevanz von MRD fokussieren sich jedoch im Wesentlichen auf 50 bis 65 % aller Patienten mit Follikulärem Lymphom die eine t(14;18) Translokation aufweisen, da hierfür die MRD-Diagnostik mittels t(14;18)-RQ-PCR standardisiert und mit vertretbarem Aufwand durchführbar ist (van Dongen et al. 2003; Evans et al. 2007; Gritti, Pavoni, and Rambaldi 2017). Die derzeit einzige etablierte Alternative zur t(14;18)-RQ-PCR stellt die ASO-RQ-PCR des Immunglobulinschwerkettengens dar, das als klonaler Marker in bis zu 70 % aller Follikulären Lymphome nachweisbar ist. Diese Methode erlaubt mittels allelenspezifischer Primer, welche in der V-D-J Region binden, eine hochsensitive Quantifizierung bis zu einem Sensitivitätsbereich von 10^{-5} . Allerdings ist die Methode jedoch arbeitsaufwändig und benötigt neben patientenspezifischen Primern auch patientenspezifische Verdünnungskurven, die für die ASO-RQ-PCR arbeitsaufwendig kloniert werden müssen. Alternativ bedarf es Tumormaterial mit einer hohen Tumorlast für die Erstellung serieller Verdünnungsreihen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, eine NGS-basierte Methode für die MRD-Erfassung bei Follikulären Lymphomen zu etablieren und zu prüfen, ob dieser Ansatz eine sinnvolle Erweiterung der bisherigen MRD-Diagnostik darstellt.

Die Untersuchungen fokussierten sich auf die Fragestellungen inwiefern IG-NGS

- 1) in der Lage ist, den Indexklon als MRD-Marker des Lymphoms korrekt und zuverlässig zu identifizieren
- 2) in der Lage ist, diesen Klon als Marker für residuelle Lymphomzellen in Verlaufsproben zu verfolgen und dabei eine zur RQ-PCR vergleichbare Sensitivität und Spezifität zu demonstrieren
- 3) MRD-Ergebnisse misst, die eine signifikante Korrelation zum klinischen Verlauf der Patienten zeigen.

4.1 Indexklonidentifizierung

Die Identifizierung des Indexklons als MRD-Marker erfolgte über die quantitative Erfassung des jeweiligen dominanten Klonotyp mit einer Abundanz von mindestens 5 % aller IGH-Reads. Zur sicheren Abgrenzung von polyklonalen B-Zellen (Spezifität) legten wir als Kriterium eine dreifach höhere Abundanz im Vergleich zum zweithöchsten Klonotyp fest. Mit diesen Kriterien konnte in der untersuchten Patientenkollektiv mittels IG-NGS bei 89 % der Patienten ein Indexklon sicher identifiziert werden, lediglich bei 5/80 untersuchten Proben ließ sich zwar ein Indexklon nachweisen, die Frequenz lag jedoch unter 5 %. Somit zeigen sich die gewählten Kriterien als robuste Definition für die Indexklonidentifizierung.

Einschränkend muss bemerkt werden, dass die Patientenkollektiv für diese Arbeit nach dem Vorhandensein eines klonalen Signals in der IGH-Konsensus-PCR selektiert worden war, um nachfolgend die Eignung der NGS-Methode für die MRD-Erfassung zu prüfen. Die Detektionsrate eines Indexklons von 89 % ist somit nicht unbedingt repräsentativ für eine unselektierte Patientenkollektiv Follikulärer Lymphome, dokumentiert aber, dass die Mehrzahl der Patienten mit einem Klonalitätsnachweis in einer IGH-Konsensus-PCR NGS-basiert erfasst werden können. Da bei Follikulären Lymphomen mittels Konsensus-PCR ein klonales IGH in ca. 66–84 % der Fälle detektierbar ist (Evans et al. 2007; McClure et al. 2006) kann davon ausgegangen werden, dass in 60–70 % der Follikulären Lymphome eine NGS-basierten MRD-Diagnostik einsetzbar ist. Damit kann die NGS-basierte MRD-Diagnostik einen wesentlichen Beitrag für die MRD-Diagnostik beim Follikulären Lymphom leisten, da mittels t(14;18) RQ-PCR nur 50–65 % aller Patienten mit Follikulärem Lymphom mit einer PCR-detektierbaren Translokation quantifizierbar sind (Ladetto et al. 2013)

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Tumorlast in der diagnostischen Probe ein entscheidendes Kriterium für eine erfolgreiche Indexklonidentifizierung darstellt.

Bei einem Infiltrationsgrad der diagnostischen Probe über 5 %, (RQ-PCR quantifiziert) konnte in 97 % der Proben unabhängig vom Probenmaterial (Blut oder Knochenmark) ein Indexklon sicher identifiziert werden. Bei einem Infiltrationsgrad unter < 5 % reduzierte sich die Identifizierungsrate auf 57 %. Somit ist für die Anwendung von IG-NGS zur MRD-Bestimmung in klinischen Studien für die Auswahl des diagnostischen Materials eine ausreichende Tumorlast zu berücksichtigen. Dies ist bei Follikulären Lymphomen als primär nodaler Erkrankung jedoch durchaus schwierig. Für die Patienten, bei denen eine Indexklonidentifizierung in Blut und Knochenmark aufgrund geringer Infiltration nicht

gelingt, besteht prinzipiell die Möglichkeit, paraffinfixiertes diagnostisches Lymphknotengewebe zum Markerscreening zu verwenden. Hierbei ist jedoch häufig die Materialqualität problematisch, da bei der Fixierung DNA-degradierende Substanzen wie Formalin zur Gewebekonservierung verwendet werden. Mehrere Arbeiten zeigen, dass dies einen negativen Einfluss auf die Amplifizierbarkeit besonders von längeren DNA-Sequenzen hat (Halldórsdóttir, Zehnbauer, and Burack 2007; McClure et al. 2006). Auch in dieser Arbeit ließ sich in einer Probe mit paraffinfixiertem Lymphknotenmaterial kein Indexklon mittels IGH-FR1-NGS amplifizieren, während die Konsensus-PCR das klonale Signal nur in den sehr kurzen Fragmenten von FR3 messen konnte.

Im Hinblick auf die Tumorlast im untersuchten Gewebe wurde die Bedeutung des Ausgangsmaterials für die Indexklonidentifizierung untersucht. Das Knochenmark von Patienten mit Follikulären Lymphomen in fortgeschrittenem Stadium weist bei Diagnosestellung in ca. 50–60 % der Fälle eine messbare Infiltration auf und erscheint damit für die Indexklon-Identifizierung besonders geeignet(Gritti, Pavoni, and Rambaldi 2017; Rambaldi et al. 2005). Zwar ließ sich im Gesamtkollektiv aller diagnostischen Proben in dieser Arbeit kein Unterschied in der durchschnittlichen Abundanz des Indexklons in Blut und Knochenmark finden, dies ist jedoch möglicherweise auf die getroffene Selektion des Patientenkollektivs zurückzuführen. Im direkten Vergleich von parallel bei Diagnose entnommenen Blut und Knochenmarkproben von acht Patienten zeigte sich jeweils eine höhere Abundanz des Klonotyps und eine bessere Identifizierungsrate im Knochenmark. Für die Wahl des Ausgangsmaterials zur Indexklon-Identifizierung sollte somit präferentiell auf Knochenmark zurückgegriffen werden.

Ein weitere Einflussfaktor für die Indexklon-Identifizierung und die MRD-Quantifizierung ist die Amplifizierbarkeit des klonalen IGH-Gen rearrangements. Diese ist neben der Zusammensetzung der V-N-D-N-J-Region und dem GC-Gehalt besonders bei Follikulären Lymphomen abhängig von der somatischen Hypermutation des IGH-Gens. Als reifes B-Zell-Lymphom sind Follikuläre Lymphome im Bereich des IGH-Gens stark mutiert und unterliegen der fortwährenden somatischen Hypermutation (Stamatopoulos et al. 2000). Da der erste Schritt der Library-Präparation für die IG-NGS Analyse eine Multiplex-PCR ist, kann die somatische Hypermutation des IGH-Gens durch Mutationen an den Primerbindungsstellen auch die Indexklon-Identifizierung und MRD-Erfassung negativ beeinflussen. Aufgrund der oben beschriebenen Selektion des Patientenkollektives anhand einer IGH-Konsensus-PCR wurde dieses Problem in dieser Arbeit verhältnismäßig selten

beobachtet. Grundsätzlich ist aufgrund der hohen Mutationsfrequenz des IGH-Gens bei Follikulären Lymphomen die Sequenzierung verschiedener Zielgenregionen sinnvoll, neben den IG-Schwerkettenregionen IGH-FR1-3 kann dabei auch auf IG-Leichtkettengen rearrangements zurückgegriffen werden (Scheijen et al. 2019). Für die MRD-Diagnostik wurden Leichtkettenrearrangements bei Follikulären Lymphomen jedoch noch nicht untersucht.

Um die Spezifität der identifizierten Indexklone zu überprüfen, wurde der im NGS gefundene Indexklon über eine ASO-RQ-PCR validiert. Die ASO-RQ-PCR bestätigte bei 13/30 Patienten das NGS-Ergebnis im diagnostischen Material und konnte dann für eine Verdünnungsreihe und MRD-Quantifizierung verwendet werden. In den verbleibenden 17 Fällen ließ sich kein qualitativ ausreichendes RQ-PCR-Signal im diagnostischen Material generieren. Dies ist plausibel erklärbar, da alle 17 Patienten in der bioinformatischen Sequenzanalyse Mutationen an den Bindungsstelle der Sonde zeigten. Dadurch findet keine Sondenhydrolyse statt und es wird kein Fluoreszenzsignal messbar.

Die Validierung des Indexklons bei 18 Patienten über vorbekannte Sangersequenzen und der Abgleich zur Konsensus-PCR über einen Fragmentlängenvergleich zeigte ebenfalls keinerlei Abweichungen und dokumentiert die hohe Spezifität der Indexklonidentifizierung von IG-NGS. Vergleichbare Untersuchungen zur NGS-basierten Indexklonidentifizierung sind für Follikuläre Lymphome bislang nicht publiziert.

Zusammenfassend ist der IGH-basierte NGS-Ansatz eine sehr sichere und zuverlässig anwendbare Methode zur Identifizierung des Indexklons bei Follikulären Lymphomen und kann für 60–70 % der Patienten für die MRD-Diagnostik potenziell verwendet werden.

4.2 MRD Diagnostik mit IG-NGS

Um die Anwendbarkeit von IG-NGS zur MRD-Diagnostik nach erfolgreicher Indexklon-Identifizierung zu analysieren wurden 149 Verlaufsproben untersucht. Davon zeigten 34 % ein MRD-positives Ergebnis. Dies belegt die grundsätzliche Eignung von IG-NGS zur MRD-Erfassung bei Follikulären Lymphomen.

Um die Vergleichbarkeit von IG-NGS mit etablierten PCR-basierten Methoden der MRD-Bestimmung zu beurteilen, wurden die NGS-MRD Ergebnisse mit den Daten der als Goldstandard für die MRD-Bestimmung geltenden RQ-PCR an 95 Proben verglichen. Bei

74 % der Proben gab es eine sehr gute Konkordanz zur RQ-PCR ohne qualitative oder quantitative Abweichung > 1 Log-Stufe. In der Literatur finden sich wenige vergleichende Untersuchungen zur MRD-Diagnostik bei NHL mittels NGS. In einer Arbeit unserer Gruppe an einem kleineren Patientenkollektiv zeigte sich eine vergleichbare Konkordanz zwischen NGS und RQ-PCR bei 80 % für FL und 82 % für MCL (Ladetto et al. 2014; Pott, Monitillo, et al. 2013).

Vergleicht man die positiv quantifizierbaren Messwerte von NGS und der RQ-PCR zeigte sich eine sehr gute lineare Korrelation ($R^2 = 0,81$) zwischen den beiden Methoden. Dabei zeigt sich unter Verwendung von internen Kalibratoren (Spike-in's) keine systematische Abweichung der Messwerte. Die auf Basis von Spike-in's berechneten NGS-MRD-Werte sind somit für die Quantifizierung von MRD in klinischen Studien gut geeignet und bieten die Möglichkeit, in Zukunft einen Anteil von bis zu 80 % von Patienten mit Follikulären Lymphomen hinsichtlich des MRD Status zu untersuchen.

Im Folgenden sollen Proben näher betrachtet werden, bei denen sich Diskrepanzen zwischen NGS und der RQ-PCR zeigten. Diskrepante Ergebnisse ergaben sich am häufigsten bei positiven Ergebnissen unterhalb des quantitativen Messbereichs der RQ-PCR im direkten Vergleich mit NGS. Der nicht quantitative Bereich der RQ-PCR stellt einen Graubereich der RQ-PCR dar (Bruggemann et al. 2010). In diesem Bereich kann trotz Verwendung allelenspezifischer Primer insbesondere in der Situation von geringer residueller Erkrankung nicht sicher zwischen einem spezifischen Fluoreszenzsignal, und damit einer Amplifikation einer Lymphomzelle, und einer unspezifischen Amplifikation von polyklonalen B-Zellen unterschieden werden (Van Der Velden et al. 2007). Dies ist insbesondere für die ALL gut belegt und stellt ein Problem für eine MRD-basierte Behandlungsstrategie lymphatischer Erkrankungen dar (Fronkova et al. 2008). Die Arbeit von Kotrova et al. konnte zeigen, dass NGS im niedrigen MRD-Bereich eine bessere Spezifität aufweist und die NGS-MRD-Werte hier besser mit dem klinischen Verlauf korrelieren (M. Kotrova et al. 2017). Dazu wurden die Patienten nach dem Kriterium, ob ein Rezidiv im Verlauf auftrat, in zwei Kohorten unterteilt. In der Kohorte von Patienten mit niedrig positivem RQ-PCR-MRD-Signal ohne Rezidiv im Verlauf bestätigte NGS das MRD Signal nur in 1/27 Proben. In der anderen Kohorte, bei denen ein Rezidiv auftrat, bestätigte NGS hingegen die niedrig positiven MRD-Signale in 10/15 Proben. Es ist daher davon auszugehen, dass ein Großteil der diskrepanten MRD-Ergebnisse mit positiver RQ-PCR und negativem NGS-Ergebnis in dieser Arbeit ebenfalls auf eine unspezifische Amplifikation der RQ-PCR im niedrigen MRD Bereich zurückzuführen

ist, die durch die höhere Spezifität von NGS als falsch positiv identifiziert wird. Um hier eine Aussage bezüglich einer präziseren prognostischen Aussage der NGS-basierten MRD Diagnostik treffen zu können, wäre eine vergleichende Untersuchung mit beiden Methoden in einem Studienkollektiv Follikulärer Lymphome nötig.

Eine alternative Erklärung für eine geringere Häufigkeit MRD-positiver Ergebnisse mit IG-NGS ist eine mögliche geringere Sensitivität von NGS aufgrund einer geringeren DNA-Menge pro Probe. Für diese Arbeit wurde pro Verlaufsprobe aufgrund der Verfügbarkeit des Materials nur 500 ng DNA mit NGS analysiert (entsprechend 75.000 Zelläquivalenten), während für die RQ-PCR Triplikate von 500 ng pro Probe (entsprechend 225.000 Zelläquivalenten) untersucht wurden. Für eine vergleichende Analyse in klinischen Studien sollte die Analyse äquivalenter DNA-Mengen angestrebt werden.

Nur 4 Proben aus der vergleichend untersuchten Kohorte waren NGS-negativ bei einem quantifizierbaren Ergebnis in der RQ-PCR. Diese Proben wurden alle mit der t(14;18) Translokation als Zielgen in der RQ-PCR untersucht. Ein negatives Ergebnis mittels NGS könnte in diesen Fällen prinzipiell auf Mutationen im IGH-Gen zurückzuführen sein, da IG-NGS als amplikon-basierte Methode durch die initiale PCR potenziell anfällig für Mutationen im Bereich der Primerbindestellen ist. Da Follikuläre Lymphome einer anhaltenden somatischen Hypermutation unterliegen, können neue Mutationen an Primerbindungsstellen auch im Krankheitsverlauf auftreten und hier zu falsch negativen oder falsch niedrigen MRD Ergebnissen führen (Stamatopoulos et al. 2000). Dies zeigt sich eindrucksvoll bei einem Patienten, dessen Verlaufsproben sowohl mit FR1-, als auch mit FR2-NGS Ansätzen amplifiziert wurden (Abbildung 18). In der diagnostischen Probe wurden methodenübergreifend vergleichbare MRD-Werte mittels FR1-NGS, FR2-NGS und der t(14;18)-RQ-PCR bestimmt. Bei den Verlaufsproben zeigte sich weiterhin eine gute Übereinstimmung zwischen FR2-NGS und der RQ-PCR, während die FR1-NGS-Werte deutlich nach unten abweichen.

Durch das standardmäßige Verwenden von verschiedenen Zielgenen (FR1, FR2, IG-Kappa) als MRD-Zielsequenzen ist es potenziell möglich, das Problem fortlaufender Mutationen deutlich zu minimieren.

Die höchste Mutationsfrequenz im IGH-Gen findet sich grundsätzlich im Bereich der Antigenbindestellen CDR1-3 des IGH-Gens. Die hohe Mutationsfrequenz speziell bei Follikulären Lymphomen erschwert die MRD-Diagnostik mit IGH als Zielgen daher

unabhängig von der verwendeten Methode. Bei der ASO-RQ-PCR kann die anhaltende somatische Hypermutation die Primerbindung der patientenspezifischen Primer verschlechtern und verhindern. Bei der NGS-basierten MRD-Diagnostik kann die anhaltende somatische Hypermutation und die daraus resultierende klonale Evolution des Indexklons neben der bereits diskutierten verminderten Primerbindung dazu führen, dass der Indexklon bioinformatisch nicht mehr erkannt wird. Hier bedarf es bioinformatisch gut definierter Algorithmen, um die klonale Verwandtschaft somatisch mutierter Subklone nachzuweisen. Neben diesen Aspekten bietet die NGS-basierte MRD-Diagnostik jedoch darüber hinaus weitergehende wissenschaftliche Aspekte. Über die Erfassung der klonalen Evolution definierter Klonotypen und ihrer klonalen Verwandtschaft in verschiedenen Krankheitsphasen können relevante Erkenntnisse über das Ausbreitungsmuster, das Rezidivverhalten und die Biologie der Erkrankung gewonnen werden. Für die Chronische Lymphatische Leukämie und Mantelzell-Lymphome ist bereits gezeigt, dass der Mutationsstatus des IGH-Gens die Definition prognostisch relevanter molekularer Subgruppen erlaubt (Navarro et al. 2012; Sutton et al. 2016). Dies ist auch im hohen Maße für das bessere Verständnis Follikulärer Lymphome interessant.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine NGS-basierte MRD-Diagnostik eine vergleichbare Sensitivität zur ASO-RQ-PCR und eine hohe Spezifität der Analyse bietet. Daraus resultiert auch in einem niedrigen MRD-Bereich eine bessere Quantifizierbarkeit und die Vermeidung falsch positiver MRD-Werte. Dies ist insbesondere für klinische Studien, die auf eine Therapieescalation bei einem positiven MRD-Status abzielen, relevant. Des Weiteren ist NGS nicht auf patientenspezifische Verdünnungskurven oder Primer angewiesen, sodass diese Methode prinzipiell besser standardisierbar und weniger arbeitsaufwendig ist als die ASO-RQ-PCR. Allerdings muss eine komplexe und standardisierte bioinformatische Analyse zur Verfügung stehen, die der starken somatischen Hypermutation und der klonale Evolution der IGH-Rearrangements bei Follikulären Lymphomen Rechnung trägt.

4.3 Überlebenszeitanalyse

Der Stellenwert von MRD-Diagnostik für die Prognoseerfassung ist mittlerweile für B-Zellneoplasien anerkannt. So konnte die unabhängige prognostische Bedeutung von t(14;18)-RQ-PCR-basierter MRD-Diagnostik für das Follikuläre Lymphom in mehreren Studien belegt

werden (Ladetto et al. 2013; Rambaldi et al. 2002). Allerdings gibt es auch Studien, die keinen Einfluss auf das progressionsfreie Überleben beim Follikulären Lymphom nachweisen konnten (Mandigers et al. 2001; Van Oers et al. 2010; Paszkiewicz-Kozik et al. 2009; Schmitt, Grundt, et al. 2006).

Für die Verwendung von IGH als Zielgen für den Nachweis von MRD bei Follikulären Lymphomen gibt es in der Literatur nur spärliche Daten. Eine prospektive Analyse zur Bedeutung der ASO-RQ-PCR-basierten MRD-Diagnostik bei Follikulären Lymphomen im Rezidiv und bei Primärdiagnose wurde von unserer Arbeitsgruppe publiziert (Pott et al. 2018). Für die NGS-basierte MRD-Diagnostik bei Follikulären Lymphomen gibt bisher jedoch keine veröffentlichten Daten. Vor diesem Hintergrund ist es entscheidend, die klinische Relevanz von NGS-basierter MRD-Diagnostik anhand von klinischen Daten zu überprüfen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen hoch signifikanten Einfluss [$p = 0,0085$] des NGS-MRD-Status nach der Induktionstherapie und in einem Zeitraum von 6–8 Monaten auf das progressionsfreie Überleben der Patienten des GLSG Patientenkollektivs. Patienten, die eine klinische und molekulare Remission erzielen, zeigen ein deutlich verbessertes PFS von 11 Jahren im Vergleich zu Patienten ohne molekulare Ansprechen (PFS 2,2 Jahre).

Dies ist die bislang erste Untersuchung, die den Stellenwert einer NGS-basierten MRD-Diagnostik für die Prognose Follikulärer Lymphome belegt. Unabhängig vom direkten Vergleich der Messwerte zwischen RQ-PCR und NGS, der in den letzten Kapiteln angestellt wurde, zeigen diese klinischen Daten eindeutig, dass mittels NGS valide MRD-Daten mit klinischer Signifikanz generiert werden können.

Daten zur prognostischen Bedeutung einer NGS-basierten MRD Diagnostik wurden bislang hauptsächlich für die ALL publiziert (Michaela Kotrova et al. 2015; Pulsipher et al. 2015). Dabei zeigen die publizierten Daten neben der klinischen Relevanz einer NGS-basierter MRD-Diagnostik der ALL im Kindesalter auch eine höhere prognostische Bedeutung für NGS-MRD als für ASO-RQ-PCR-MRD durch die höhere Spezifität der Methode (M. Kotrova et al. 2017). Vergleichbar zu den Daten der ALL konnte auch in dieser Arbeit eine höhere Spezifität im Bereich niedrig positiver MRD-Werte im Graubereich der RQ-PCR gezeigt werden. Prospektive Studien bei Follikulären Lymphomen müssen zeigen, ob dadurch der NGS-basierten Diagnostik ebenfalls eine höhere prognostische Bedeutung zukommt als PCR-basierten Methoden.

4.4 Zusammenfassende Beurteilung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen des EuroClonality Netzwerks entwickelte IG-NGS-Methode zur MRD-Erfassung auch bei reifen B-Zell-Lymphomen wie dem Follikulären Lymphom einsetzbar ist und eine wichtige Ergänzung der aktuell verfügbaren Methoden zur MRD-Diagnostik darstellt. Das Verfahren generiert reproduzierbar zuverlässige Ergebnisse und war bei fast allen Patienten mit einem klonalen IGH-Rearrangement einsetzbar. Die Sensitivität der Methode war vergleichbar gut mit der RQ-PCR. Der methodische Vergleich der beiden Verfahren zeigte eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Methoden. Auch die Korrelation des MRD-Status mit den klinischen Daten zeigte in dieser Arbeit den hohen prognostischen Stellenwert der MRD-Diagnostik für das PFS.

Somit lässt sich die NGS-basierte MRD-Diagnostik sinnvoll als ergänzende Methode bei Follikulären Lymphomen einsetzen. Für zukünftige Studien ist daher das folgende Szenario denkbar: Liegt eine PCR-detektierbare $t(14;18)$ Translokation vor, stellt diese aufgrund ihrer guten Standardisierung und einfachen Durchführung weiterhin den Goldstandard für die MRD-Diagnostik dar. Da diese jedoch mit 40–50 % in vielen Fällen nicht anwendbar ist, kann die MRD-Erkennung mittels IG-NGS als entscheidende Ergänzung des diagnostischen Repertoires auch in prospektiven Studien eingesetzt werden.

Des Weiteren kann über Immungen-NGS eine Vielzahl an Daten zur klonalen Evolution von Lymphomen gewonnen werden, die zum Verständnis der Krankheitsbiologie und klonalen Evolution beitragen können.

5 Zusammenfassung

Die Bestimmung der minimalen Resterkrankung ist ein wichtiger unabhängiger prognostischer Faktor bei Patienten mit Follikulärem Lymphom. Allerdings können mit dem Goldstandard, der t(14;18)-RQ-PCR, aufgrund variierender Bruchpunktregionen nur 50% bis 65% der Patienten erfasst werden. Alternative Zielgene, wie die schwere Kette des Immunglobulins können aufgrund der somatischen Hypermutation ebenfalls nur eingeschränkt und mit großem Arbeitsaufwand eingesetzt werden. Der im Rahmen des EuroClonality Netzwerks entwickelte IGH-basierte NGS-Ansatz stellt eine potenzielle Alternative dar, welche in der Lage wäre die bisherigen Limitationen der MRD-Diagnostik bei folliculären Lymphomen zu überwinden.

Wir analysierten 237 Proben von 80 Patienten (88 diagnostische Proben, 149 Verlaufsproben) mittels IGH-basiertem NGS. Die Patienten wurden aus den Patientenkollektiven der „GLSG 2000“-Studie und der Gallium Studie „GA101 versus Rituximab bei fortgeschrittenem niedrig-malignen NHL“ nach dem Kriterium ausgewählt, dass ein klonales IGH-Signal mittels Konsensus-PCR nachweisbar war. Bei 95 Verlaufsproben standen die Ergebnisse einer RQ-PCR zur Validierung der gewonnenen MRD-Daten zur Verfügung (30 t(14;18)-RQ-PCR, 65 IGH-RQ-PCR).

Bei 71/80 Patienten konnte mittels des gewählten Vorgehens in der NGS-Analyse sicher ein Indexklon für die nachfolgende MRD-Analyse identifiziert werden. Eine Validierung über eine Sanger-Sequenzierung bestätigte die Spezifität in allen 18 untersuchten Fällen. Der Infiltrationsgrad der diagnostischen Probe erwies sich als kritischer Parameter

In 74/95 Verlaufsproben zeigte sich eine sehr gute Korrelation zwischen den MRD-Werten der beiden Methoden. Von diesen Verlaufsproben waren 39 MRD übereinstimmend positiv und 35 Proben negativ mit beiden Methoden. Diskrepante Ergebnisse zeigten sich vor allem in einem niedrigen MRD-Bereich unterhalb des quantitativen Messbereichs der RQ-PCR von 10^{-4} . Dieser Bereich ist ein Graubereich der RQ-PCR. Bei 15/21 Proben maß die RQ-PCR einen positiven, nicht quantifizierbaren MRD-Wert, welcher mittels NGS nicht bestätigt wurde. Hier ist davon auszugehen, dass es sich um falsch positive Proben handelt, da die Spezifität von IG-NGS verfahrensbedingt höher ist.

Insgesamt zeigte sich eine sehr gute Konkordanz der MRD-Werte zwischen IG-NGS und der RQ-PCR. Im Vergleich zur ASO-RQ-PCR ist IG-NGS weniger arbeitsaufwendig, besser

standardisierbar und durch verschiedene verwendbare Zielgene (IGH-*FR1-3*, IG-Kappa) weniger anfällig für die anhaltende somatische Hypermutation. Des Weiteren ist IG-NGS potenziell in der Lage den Graubereich der RQ-PCR unterhalb des quantitativen Messbereichs spezifischer mit einem größeren quantifizierbaren Bereich abzubilden.

Die klinische Relevanz NGS-basierter MRD-Diagnostik konnte eindrucksvoll in der Prognoseanalyse des MRD-Status belegt werden, es zeigte sich in der auswertbaren Kohorte ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben bei Erreichen eines negativem IG-NGS-MRD Status nach der Induktion ($p=0,0085$) mit einem mittleren progressionsfreien Überleben von 11 Jahren, im Vergleich zu lediglich 2,2 Jahren für Patienten mit einem positiven MRD Status.

In dieser Arbeit konnte der Stellenwert einer NGS-basierten MRD-Diagnostik für Follikuläre Lymphome klar belegt werden. Für zukünftige Studien kann neben dem Goldstandard der RQ-PCR für die bislang nicht erfassbaren Patienten eine NGS-basierte Diagnostik mit vergleichbarer Sensitivität und höherer Spezifität eingesetzt werden, so dass mehr als 80 % aller Patienten einer Studienkohorte hinsichtlich des MRD-Status untersucht werden können.

6 Literaturverzeichnis

- Apostolidis, John et al. 2000. "High-Dose Therapy with Autologous Bone Marrow Support as Consolidation of Remission in Follicular Lymphoma: Long-Term Clinical and Molecular Follow-Up." *Journal of Clinical Oncology* 18(3): 527–36.
- Armitage, James O. 1997. "A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma." *Blood* 89(11): 3909–18.
- Avet-Loiseau, Herve et al. 2015. "Evaluation of Minimal Residual Disease (MRD) By Next Generation Sequencing (NGS) Is Highly Predictive of Progression Free Survival in the IFM/DFCI 2009 Trial." *Blood* 126(23).
- Böttcher, Sebastian et al. 2012. "Minimal Residual Disease Quantification Is an Independent Predictor of Progression-Free and Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Multivariate Analysis from the Randomized GCLLSG CLL8 Trial." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30(9): 980–88.
- Brown, Jennifer R. et al. 2007. "Long-Term Survival after Autologous Bone Marrow Transplantation for Follicular Lymphoma in First Remission." *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 13(9): 1057–65.
- Bruggemann, M. et al. 2010. "Standardized MRD Quantification in European ALL Trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD Assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008." *Leukemia* 24(3): 521–35.
- Brüggemann, Monika et al. 2006. "Clinical Significance of Minimal Residual Disease Quantification in Adult Patients with Standard-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia." *Blood* 107(3): 1116–23.
- Brüggemann, Monika et al. 2019. "Standardized Next-Generation Sequencing of Immunoglobulin and T-Cell Receptor Gene Recombinations for MRD Marker Identification in Acute Lymphoblastic Leukaemia; a EuroClonality-NGS Validation Study." *Leukemia* 33(9): 2241–53.
- Buske, Christian et al. 2006. "The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) Separates High-Risk from Intermediate- or Low-Risk Patients with Advanced-Stage Follicular Lymphoma Treated Front-Line with Rituximab and the Combination of

- Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone (R-CHOP) with Respect to Treatment Outcome.” *Blood* 108(5): 1504–8.
- Bystry, Vojtech et al. 2016. “ARResT/Interrogate: An Interactive Immunoprofiler for IG/TR NGS Data.” *Bioinformatics* 3(V): btw634.
- Campana, Dario. 2010. “Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia.” *Hematology* 2010(1): 7–12.
- Campo, Elias et al. 2011. “The 2008 WHO Classification of Lymphoid Neoplasms and beyond: Evolving Concepts and Practical Applications.” *Blood* 117(19): 5019–32.
- Cleary, Michael L., Naomi Galili, and Jeffrey Sklar. 1986. “Detection of a Second t(14;18) Breakpoint Cluster Region in Human Follicular Lymphomas.” *Journal of Experimental Medicine* 164(1): 315–20.
- Cleary, Michael L., and Jeffrey Sklar. 1985. “Nucleotide Sequence of a t(14;18) Chromosomal Breakpoint in Follicular Lymphoma and Demonstration of a Breakpoint-Cluster Region near a Transcriptionally Active Locus on Chromosome 18.” *Medical Sciences* 82: 7439–43.
- van Dongen, J. J.M. et al. 2003. “Design and Standardization of PCR Primers and Protocols for Detection of Clonal Immunoglobulin and T-Cell Receptor Gene Recombinations in Suspect Lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936.” *Leukemia* 17(12): 2257–2317.
- Evans, P. A.S. et al. 2007. “Significantly Improved PCR-Based Clonality Testing in B-Cell Malignancies by Use of Multiple Immunoglobulin Gene Targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936.” *Leukemia* 21(2): 207–14.
- Faham, Malek et al. 2012. “Deep-Sequencing Approach for Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia.” *Blood* 120(26): 5173–80.
- Federico, Massimo et al. 2009. “Follicular Lymphoma International Prognostic Index 2: A New Prognostic Index for Follicular Lymphoma Developed by the International Follicular Lymphoma Prognostic Factor Project.” *Journal of Clinical Oncology* 27(27): 4555–62.
- Federico, Massimo et al. 2013. “R-CVP versus R-CHOP versus R-FM for the Initial

- Treatment of Patients with Advanced-Stage Follicular Lymphoma: Results of the FOLL05 Trial Conducted by the Fondazione Italiana Linfomi.” *Journal of Clinical Oncology* 31(12): 1506–13.
- Fronkova, E. et al. 2008. “B-Cell Reconstitution after Allogeneic SCT Impairs Minimal Residual Disease Monitoring in Children with ALL.” *Bone Marrow Transplantation* 42(3): 187–96.
- Galimberti, Sara et al. 2014. “Minimal Residual Disease after Conventional Treatment Significantly Impacts on Progression-Free Survival of Patients with Follicular Lymphoma: The FIL FOLL05 Trial.” In *Clinical Cancer Research*, , 6398–6405.
- Gawad, Charles et al. 2013. “Massive Evolution of the Immunoglobulin Heavy Chain Locus in Children with B Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Massive Evolution of the Immunoglobulin Heavy Chain Locus in Children with B Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia.” *Blood* 120(22): 4407–17.
- Ghielmini, Michele et al. 2004. “Prolonged Treatment with Rituximab in Patients with Follicular Lymphoma Significantly Increases Event-Free Survival and Response Duration Compared with the Standard Weekly x 4 Schedule.” *Blood* 103(12): 4416–23.
- Goff, Lindsey et al. 2009. “Quantitative PCR Analysis for Bcl-2/IgH in a Phase III Study of Yttrium-90 Ibrutinomab Tiuxetan as Consolidation of First Remission in Patients with Follicular Lymphoma.” *Journal of Clinical Oncology* 27(36): 6094–6100.
- Gritti, Giuseppe, Chiara Pavoni, and Alessandro Rambaldi. 2017. “Is There a Role for Minimal Residual Disease Monitoring in Follicular Lymphoma in the Chemo-Immunotherapy Era?” *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 9(1): e2017010.
- Halldórsdóttir, Anna Margrét, Barbara A. Zehnbauer, and W. Richard Burack. 2007. “Application of BIOMED-2 Clonality Assays to Formalin-Fixed Paraffin Embedded Follicular Lymphoma Specimens: Superior Performance of the IGK Assays Compared to IGH for Suboptimal Specimens.” *Leukemia and Lymphoma* 48(7): 1338–43.
- Herold, Michael et al. 2007. “Rituximab Added to First-Line Mitoxantrone, Chlorambucil, and Prednisolone Chemotherapy Followed by Interferon Maintenance Prolongs Survival in Patients with Advanced Follicular Lymphoma: An East German Study Group

- Hematology and Oncology Study.” *Journal of Clinical Oncology* 25(15): 1986–92.
- Hiddemann, W. et al. 2005. “Rituximab Maintenance Following a Rituximab Containing Chemotherapy Significantly Prolongs the Duration of Response in Patients with Relapsed Follicular and Mantle Cell Lymphomas: Results of a Prospective Randomized Trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG).” *Journal of Clinical Oncology* 23(16_suppl): 6527–6527.
- Hirt, Carsten et al. 2008. “Rapid and Sustained Clearance of Circulating Lymphoma Cells after Chemotherapy plus Rituximab: Clinical Significance of Quantitative t(14;18) PCR Monitoring in Advanced Stage Follicular Lymphoma Patients.” *British Journal of Haematology* 141(5): 631–40.
- Knecht, Henrik et al. 2019. “Quality Control and Quantification in IG/TR next-Generation Sequencing Marker Identification: Protocols and Bioinformatic Functionalities by EuroClonality-NGS.” *Leukemia* 33(9): 2254–65.
- Kotrova, M. et al. 2017. “Next-Generation Sequencing Indicates False-Positive MRD Results and Better Predicts Prognosis after SCT in Patients with Childhood ALL.” *Bone Marrow Transplantation* 52(7): 962–68.
- Kotrova, Michaela et al. 2015. “The Predictive Strength of Next-Generation Sequencing MRD Detection for Relapse Compared with Current Methods in Childhood ALL.” *Blood* 126(8): 1045–47.
- Ladetto, Marco et al. 2001. “A Validated Real-Time Quantitative PCR Approach Shows a Correlation between Tumor Burden and Successful Ex Vivo Purging in Follicular Lymphoma Patients.” *Experimental Hematology* 29(2): 183–93.
- Ladetto, Marco et al. 2006. “Prolonged Survival and Low Incidence of Late Toxic Sequelae in Advanced Follicular Lymphoma Treated with a TBI-Free Autografting Program: Updated Results of the Multicenter Consecutive GITMO Trial.” *Leukemia* 20(10): 1840–47.
- Ladetto, Marco et al. 2008. “Prospective, Multicenter Randomized GITMO/IIL Trial Comparing Intensive (R-HDS) versus Conventional (CHOP-R) Chemoimmunotherapy in High-Risk Follicular Lymphoma at Diagnosis: The Superior Disease Control of R-HDS Does Not Translate into an Overall Survival.” *Blood* 111(8): 4004–13.

- Ladetto, Marco et al. 2013. "Persistence of Minimal Residual Disease in Bone Marrow Predicts Outcome in Follicular Lymphomas Treated with a Rituximab-Intensive Program." *Blood* 122(23): 3759–66.
- Ladetto, Marco et al. 2014. "Next-Generation Sequencing and Real-Time Quantitative PCR for Minimal Residual Disease Detection in B-Cell Disorders." *Leukemia* 28(6): 1299–1307.
- Leich, Ellen et al. 2011. "MicroRNA Profiles of t(14;18)-Negative Follicular Lymphoma Support a Late Germinal Center B-Cell Phenotype." *Blood* 118(20): 5550–58.
- Logan, Aaron. C. et al. 2013. "Minimal Residual Disease Quantification Using Consensus Primers and High-Throughput IGH Sequencing Predicts Post-Transplant Relapse in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Leukemia* 27(8): 1659–65.
- Logan, Aaron C. et al. 2014. "Immunoglobulin and t Cell Receptor Gene High-Throughput Sequencing Quantifies Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia and Predicts Post-Transplantation Relapse and Survival." *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 20(9): 1307–13.
- Logan, Aaron C et al. 2011. "High-Throughput VDJ Sequencing for Quantification of Minimal Residual Disease in Chronic Lymphocytic Leukemia and Immune Reconstitution Assessment." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(52): 21194–99.
- Lowry, Lisa et al. 2011. "Reduced Dose Radiotherapy for Local Control in Non-Hodgkin Lymphoma: A Randomised Phase III Trial." *Radiotherapy and Oncology* 100(1): 86–92.
- Mandigers, C M et al. 2001. "Lack of Correlation between Numbers of Circulating t(14;18)-Positive Cells and Response to First-Line Treatment in Follicular Lymphoma." *Blood* 98(4): 940–44.
- Marcus, Robert et al. 2005. "CVPchemotherapy plus Rituximab Compared with CVPas First-Line Treatment for Advanced Follicular Lymphoma." *Blood* 105(3): 1417–23.
- McClure, R F et al. 2006. "Validation of Immunoglobulin Gene Rearrangement Detection by PCR Using Commercially Available BIOMED-2 Primers." *Leukemia* 20(1): 176–79.
- Munshi, Nikhil C, and Kenneth C Anderson. 2013. "Minimal Residual Disease in Multiple

- Myeloma.” *Journal of Clinical Oncology* 31(20): 2523–26.
- Navarro, Alba et al. 2012. “Molecular Subsets of Mantle Cell Lymphoma Defined by the IGHV Mutational Status and SOX11 Expression Have Distinct Biologic and Clinical Features.” *Cancer Research* 72(20): 5307–16.
- Van Oers, Marinus H J et al. 2010. “BCL-2/IgH Polymerase Chain Reaction Status at the End of Induction Treatment Is Not Predictive for Progression-Free Survival in Relapsed/Resistant Follicular Lymphoma: Results of a Prospective Randomized EORTC 20981 Phase III Intergroup Study.” *Journal of Clinical Oncology* 28(13): 2246–52.
- Paszkiewicz-Kozik, E. et al. 2009. “Presence of t(14;18) Positive Cells in Blood and Bone Marrow Does Not Predict Outcome in Follicular Lymphoma.” *Medical Oncology* 26(1): 16–21.
- Pongers-Willemse, Mj et al. 1998. “BTS Leukemia Real - Time QuantitativePCR for the Detection of Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia Using Junctional Region Specific TaqMan Probes.” *Leukemia* 12.
- Pott, Christiane et al. 2010. “Molecular Remission Is an Independent Predictor of Clinical Outcome in Patients with Mantle Cell Lymphoma after Combined Immunotherapy: A European MCL Intergroup Study.” *Blood* 115(16).
- Pott, Christiane. 2011. “Minimal Residual Disease Detection in Mantle Cell Lymphoma: Technical Aspects and Clinical Relevance.” *Seminars in Hematology* 48(3): 172–84.
- Pott, Christiane, Luigia Monitillo, et al. 2013. “A Comparative Analysis Of Next-Generation Sequencing and Real-Time Quantitative PCR For Minimal Residual Disease Detection In Follicular Lymphomas.” *Blood* 122(21): 4293.
- Pott, Christiane, Monika Brüggemann, et al. 2013. “MRD Detection in B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas Using Ig Gene Rearrangements and Chromosomal Translocations as Targets for Real-Time Quantitative PCR.” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 971: 175–200.
- Pott, Christiane et al. 2018. “Minimal Residual Disease Response at End of Induction and during Maintenance Correlates with Updated Outcome in the Phase III GALLIUM Study of Obinutuzumab- or Rituximab-Based Immunotherapy in Previously Untreated

- Follicular Lymphoma Patients.” *Blood* 132(Supplement 1): 396–396.
- Press, Oliver W et al. 2013. “Phase III Randomized Intergroup Trial of CHOP plus Rituximab Compared with CHOP Chemotherapy plus 131Iodine-Tositumomab for Previously Untreated Follicular Non-Hodgkin Lymphoma: SWOG S0016.” *Journal of Clinical Oncology* 31(3): 314–20.
- Pulsipher, Michael a et al. 2015. “IgH-V (D) J NGS-MRD Measurement Pre- and Early Post-Allotransplant de Fi Nes Very Low- and Very High-Risk ALL Patients.” *Blood* 125(22): 3501–9.
- Rajewsky, Klaus. 1996. “Clonal Selection and Learning in the Antibody System.” *Nature* 381(6585): 751–58.
- Rambaldi, Alessandro et al. 2002. “Monitoring of Minimal Residual Disease after CHOP and Rituximab in Previously Untreated Patients with Follicular Lymphoma.” *Blood* 99(3): 856–62.
- Rambaldi, Alessandro et al. 2005. “Quantitative PCR of Bone Marrow BCL2/IgH+ Cells at Diagnosis Predicts Treatment Response and Long-Term Outcome in Follicular Non-Hodgkin Lymphoma.” *Blood* 105(9): 3428–33.
- Rummel, Mathias J et al. 2013. “Bendamustine plus Rituximab versus CHOP plus Rituximab as Fi Rst-Line Treatment for Patients with Indolent and Mantle-Cell Lymphomas: An Open-Label, Multicentre, Randomised, Phase 3 Non-Inferiority Trial.” *The Lancet* 381: 1203–10.
- Salles, Gilles et al. 2011. “Rituximab Maintenance for 2 Years in Patients with High Tumour Burden Follicular Lymphoma Responding to Rituximab plus Chemotherapy (PRIMA): A Phase 3, Randomised Controlled Trial.” *The Lancet* 377(9759): 42–51.
- Salles, Gilles A. 2007. “Clinical Features, Prognosis and Treatment of Follicular Lymphoma.” *Hematology, ASH Education Program* 2007(1): 216–25.
- Scheijen, Blanca et al. 2019. “Next-Generation Sequencing of Immunoglobulin Gene Rearrangements for Clonality Assessment: A Technical Feasibility Study by EuroClonality-NGS.” *Leukemia* 33(9): 2227–40.
- Schmitt, Christina, Alexander Grundt, et al. 2006. “One Single Dose of Rituximab Added to a

- Standard Regimen of CHOP in Primary Treatment of Follicular Lymphoma Appears to Result in a High Clearance Rate from Circulating Bcl-2/IgH Positive Cells: Is the End of Molecular Monitoring Near?" *Leukemia Research* 30(12): 1563–68.
- Schmitt, Christina, Brigitta Balogh, et al. 2006. "The Bcl-2/IgH Rearrangement in a Population of 204 Healthy Individuals: Occurrence, Age and Gender Distribution, Breakpoints, and Detection Method Validity." *Leukemia Research* 30: 745–50.
- Schüler, Frank, Carsten Hirt, and Gottfried Dölken. 2003. "Chromosomal Translocation t(14;18) in Healthy Individuals." *Seminars in Cancer Biology* 13: 203–9.
- Solal-Célyny, Philippe et al. 2004. "Follicular Lymphoma International Prognostic Index." *Blood* 104(5): 1258–65.
- Stamatopoulos, Kostas et al. 2000. "Molecular Insights into the Immunopathogenesis of Follicular Lymphoma." *Immunology Today* 21(6): 298–305.
- Sutton, Lesley Ann et al. 2016. "Different Spectra of Recurrent Gene Mutations in Subsets of Chronic Lymphocytic Leukemia Harboring Stereotyped B-Cell Receptors." *Haematologica* 101(8): 959–67.
- The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. 1993. "A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma." *New England Journal of Medicine* 329(14): 987–94.
- Tonegawa, Susumu. 1983. "Somatic Generation of Antibody Diversity." *Nature* 302(5909): 575–81.
- Van Der Velden, VHJ et al. 2007. "Analysis of Minimal Residual Disease by Ig/TCR Gene Rearrangements: Guidelines for Interpretation of Real-Time Quantitative PCR Data." *Leukemia* 21: 604–11.
- Yang, Elizabeth, and Stanley J. Korsmeyer. 1996. "Molecular Thanatopsis: A Discourse on the BCL2 Family and Cell Death." *Blood* 88(2): 386–401.

7 Anhang

7.1 Arbeitsmaterialien und Geräte

Bezeichnung	Hersteller und Modell
UV-Tisch	AlphaImager HP System, ProteinSimple
Automatischer DNA Extraktor	DNA Extraktor QuickGene 610-L, Kurabo Biomedical
Automatischer DNA Extraktor	QIAsymphony SP, Qiagen
Elektrophoresekammer Agarose-Gel	Gelsystem Mini ExW Cat#40-2314, Peqlab
Elektrophoresekammer für HD Gel	PerfectBlue™ Doppel-Gelsystem Twin L, Peqlab
Hämatologie Analysegerät	Hämatologieanalysator KX-21, Sysmex
Heizblock	Digital Heatblock, VWR
Heizblock mit Schüttelfunktion	Thermo-Shaker TS-100, Peqlab
Kapillarsequenzierer	Kapillarsequencer ABI 3500, Applied Biosystems
Kapillarsequenzierer	Kapillarsequencer ABI 3130, Applied Biosystems
Lightcycler	Lightcycler 480 II, Roche
Magnetic Particle Collector (MPC)	DynaMag™-2 Magnet, Thermo Fisher
Pipetten 0,5 -10µl	Reference Pipetten 0,5 -10µl, Eppendorf
Miseq	MiSeq™-System, Illumina
Pipetten 10 -100µl	Reference Pipetten 10 -100µl, Eppendorf
Pipetten 100 -1000µl	Reference Pipetten 100 -1000µl, Eppendorf
Pipettierhelfer	Accu Jet Pro, Brand
PCR-Platten Zentrifuge	Perfect Spin P Zentrifuge, PeqLab
Kühl-Rack	PCR Cooler for 96 well plates, Eppendorf
Kühl-Rack	CoolRack M30, Biocision
Rotations-Mischer	Vortex Genie 2, Scientific Industries
Spannungsgeber Agarose-Gel	peqPower 300; 55-E300-230V, Peqlab
Spannungsgenerator für HD-Gel	Biometra Stand. P25 PEQ Power 300V, Peqlab
Spektralphotometer	Nano-Drop ND 1000, Thermo Fisher Scientific
Sterilisator	Varioklav 135S, VWR
TaqMan	7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700, ED000651

Unterdruck-Absaugvorrichtung	MultiScreen HTS	Vakuum-Filtrationssystem, Millipore
Vakuumgerät	Vac-Man Vacuum Manifold, Promega	
Vakuumpumpe	Membran Vakuumpumpe MD 4C, vacuubrand	
Vakuumzentrifuge	Concentrator 5301, Eppendorf	
Wärmeschrank mit Schüttler	Thermoshake, Gerhardt	
Wasserbad	3042 Wasserbad, Köttermann	
Zentrifuge für 0,5ml Tubes	Tube-Strip Picofuge, Stratagene	
Zentrifuge für 1,5-2ml Tubes	Heraeus Pico 17	
Zentrifuge für 2 ml Röhrchen	Zentrifuge 5415D, Eppendorf	
Zentrifuge für 50 ml Röhrchen	Heraeus Megafuge 1.0	

7.2 Reagenzien, Chemikalien, Bakterienzellen

Bezeichnung	Hersteller und Artikelnummer
1,4-Dithiothreitol (DTT)	6908.2 Roth
15% Ficoll 400	F9378 Sigma
6M Guanidinthiozyanatlösung (GITC)	A0703.1000 Applichem
Acrylamid	10680.01 Serva
Agar	A7002 Sigma
Agarose Peq-Gold	PeqLab
Ammoniumperoxodisulfat	9592 Roth
Ampicillin-Na-salz	A0839 Applichem
Anodenpuffer; 4393927	4393927 Thermo Fisher
AquaMerck Water for chromatography	Merk
BigDye Terminatorv1.1 & 5xSeq.Buffer	4336699 Life Technologies
Bind Silane	28739.01 Serva
Bromphenolblau	B 6131 Sigma
BSA	11945 Serva
DNA Purification System	A7500 Promega
dNTP-Mix	Roth

Eagle Taq Polymerase	Roche
EDTA Titterplex	1.08418 Merck
Ethanol abs.	Applichem
FastStart High Fidelity	Roche
Gel Red	41005-1 VWR
Genetic Analyzer Buffer 10x	402824 Thermo Fisher
Glycerol	1.04092 Merck
HiDi Formamid;	4311320 Thermo Fisher
Isopropanol	9866.5 Roth
Kathodenpuffer; 4408256	4408256 Thermo Fisher
LB Broth, Miller	L3152 Sigma
LightCycler 480 Probes Master	Roche
Low Mass Ladder	10068-013 Thermo Fisher
MgCl ₂ hexahydrate	2189.1 Roth
MgCl ₂	Applied Biosystems
MiSeq Reagent Kit V2	MS-102-2003 Illumina
NaCl	1.06404 Merck
NaOH-Pellets	106498 Merck
PBS Tablette	Thermo Fisher 18912014
PCR Puffer II	Applied Biosystems
PicoGreen® dsDNA Assay Kit	Thermo Fisher
POP 7	4393708 Thermo Fisher
Puffer mit MgCl ₂	
QIAasympo DSP DNA Midi Kit	937255 Qiagen
QIAasympo DSP DNA Mini Kit	937236 Qiagen
Quickgene DNA Whole Blood Kit	Kurabo
Repel Silane ES	17-1332-01 Amersham Biosciences
ROX 500;	401734 Thermo Fisher
RQPCR Master Mix Plus (Eurogentec)	Eurogentec
Saccharose	9097.2 Roth
Salzsäure 37%	1.00317 Merck
Sepharose	17004201 Amersham-Biosciences

Silikat TLC	288519 Sigma
Temed	Roth 2367.3
TOPO-TA-Cloning-Kit	K4575-40 Thermo Fisher
TRIS	108382 Merck
Triton-X100	3051.2 Roth
Xylencynalol	2650-17-1 Sigma

7.3 Puffer und Stammlösungen

TE-Puffer

4,0 ml 1M Tris HCl pH8.0

0,8 ml 0,5 M EDTA

auf 400 ml mit Aqua dest. auffüllen, autoklavieren; Lagerung bei Raumtemperatur

10x TBE-Puffer

108 g TRIS

55 g Borsäure

8,3 g EDTA

auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen, autoklavieren; Lagerung bei Raumtemperatur

5x RCLB-Puffer

548g Saccharose

500ml Aqua dest.

60ml 1M Tris-HCl

40ml 1M MgCl₂

48ml Triton-X100

Saccharose in Aqua dest. auflösen, den Rest dazu geben und mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen; bei 4°C 6 Monate haltbar.

1M Tris-HCL pH8

121,1 g Tris

in 800 ml mit Aqua dest. lösen

42 ml HCl

auf 1000ml mit Aqua dest. auffüllen; Lagerung bei Raumtemperatur

Agarosegel

8g Agarose

400ml TE Puffer

zusammen kochen, bis die Agarose vollständig gelöst ist, bei 65°C lagern

1M MgCl₂

20,3 g MgCl₂ hexahydrate

auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen

autoklavieren; Lagerung bei Raumtemperatur

5M NaCl

292,2 g NaCl

auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen, autoklavieren; Lagerung bei Raumtemperatur

0,5M EDTA

186,1g EDTA

in 800ml Aqua dest. lösen; mit NaOH-Pellets den pH-Wert auf 8,0 einstellen; auf 1000ml mit Aqua dest. auffüllen; Lagerung bei Raumtemperatur

Guanidin-Lösung

1000 ml 6 M Guanidinthiozyanatlösung

40 ml 0,5 M EDTA

38 ml Triton X-100

10 g DTT

zusammengeben und unter Rühren lösen; Lagerung bei Raumtemperatur

Bind-Mix

4 g Silikat

100 ml Guanidinthiozyanatlösung

vor Gebrauch immer rühren; Lagerung bei Raumtemperatur

APS 10

10 g Ammoniumperoxodisulfat

mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen; Lagerung bei -20°C

Propanol-Wash

250,0 ml Isopropanol,
250,0 ml Ethanol 99%
20,0 ml 5 M NaCl
10,0 ml Tris-HCl (pH 8.0)

mischen und mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen; Lagerung bei Raumtemperatur

Ethanol-Wash 65%

2,0 ml 5 M NaCl
10,0 ml 1 M Tris-HCl (pH8.0)
700,0 ml Ethanol 99%

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen; Lagerung bei Raumtemperatur

Ethanol-Wash 100%

2,0 ml 5 M NaCl,
10,0 ml 1 M Tris-HCl (pH8.0)
997,0 ml ETHANOL 99%
mischen; Lagerung bei Raumtemperatur

HD-Gel Loading-Puffer

15g Ficoll 400 15%
0,25g Xylencynalol
schrittweise auf 100ml mit Aqua dest. auffüllen lösen des Ficoll

Agarose-Gel Loading-Puffer

5 ml Glycerol
1 ml 10x TBE
Bromphenolblau (Spatelspitze)
auf 10ml mit Aqua dest. auffüllen

Ampicillin 100 mg/ml

1 g Ampicillin
In 10ml Aqua dest. auflösen; Lagerung bei -20°C

7.4 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller und Artikelnummer
0,2ml-96-well Platte	72.1979.202 Sarstedt
1.5ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel	72.692.405 Sarstedt
1.5ml Reaktionsgefäß mit Spitzboden	72.690.001 Sarstedt
2ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit Rundboden	72.695 Sarstedt
2ml Reaktionsgefäß mit Stehrand	72.664 Sarstedt
3500 Capillary Array;	4404685 Thermo Fisher
50ml Röhrchen	62.547.254 Sarstedt
8-Magnetstab-Schutzhülsen	997004 Qiagen
AMPure Beads	Beckman Coulter A63880
Filtertips 1500µl	997024 Qiagen
Filtertips 200µl	990332 Qiagen
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	04729692001 Roche
Low Binding Tubes	72.706.700 Sarstedt
Membranfilter OE 66	10 404 114 Whatman
PCR Folie für 96 well Platten	95.1993 Sarstedt
PCR-Aufreinigungsplatte MinElute	1019567 Qiagen
96 UF Plate	
Pipettenspitzen 0,5-10µl	70.1114.210 Sarstedt
Pipettenspitzen 100-1000µl	70.762.211 Sarstedt
Pipettenspitzen 10-100µl	70.760.212 Sarstedt
Probenverarbeitungs-Einsätze	997002 Qiagen
Reaktionsgefäß 0,5ml	72.699.00-1/2/3/4/5 Sarstedt
Serologische Pipetten 10,0ml	86.1254.025 Sarstedt
Serologische Pipetten 5,0ml	86.1253.001 Sarstedt
TaqMan 96 well Platten	ABI

7.5 Tabellen

Barcode der Primer	Sequenz 5' nach 3'	Barcode der Primer	Sequenz 5' nach 3'
D501-VP	TATAGCCT	D701-RP	CGAGTAAT
D502-VP	ATAGAGGC	D702-RP	TCTCCGGA
D503-VP	CCTATCCT	D703-RP	AATGAGCG
D504-VP	GGCTCTGA	D704-RP	GGAATCTC
D505-VP	AGGCGAAG	D705-RP	TTCTGAAT
D506-VP	TAATCTTA	D706-RP	ACGAATTC
D507-VP	CAGGACGT	D707-RP	AGCTTCAG
D508-VP	GTACTGAC	D708-RP	GCGCATTAA
		D709-RP	CATAGCCG
		D710-RP	TTCGCGGA
		D711-RP	GCGCGAGA
		D712-RP	CTATCGCT

Tabelle 6 verwendete Barcode-Sequenzen, die Vorwärtsprimern tragen jeweils die Abkürzung „VP“ im Namen und die Rückwärtsprimer „RP“. Die Barcodes wurden sowohl für die 1-Schritt-PCR, als auch für den zweiten Schritt der 2-Schritt-PCR verwendet.

		In NGS cohort			Not in NGS cohort			p-value
		count	%	N	count	%	N	
Sex	male	31	47	66	777	49	1601	0.90
Age	>=60 years	15	23	66	538	34	1601	0.082
Stage	I	0	0		14	1		
	II	1	2	66	28	2		
	III	9	14		464	30	1561	0.022
	IV	56	85		1055	68		
B-Symptoms	present	23	35	66	614	40	1548	0.52
BM	involved	54	83	65	965	63	1527	0.0008
LNregions	> 4	44	80	55	939	64	1463	0.015
	0	33	51		513	34		
	1	29	45		884	58		
	2	3	5	65	110	7	1514	0.089
	3	0	0		6	0		
	4	0	0		1	0		
LDH	elevated	23	37	63	468	30	1537	0.33
Hb	<12 g/dl	18	29	63	296	19	1524	0.077
FLIPI	Low	5	10		212	15		
	Intermediate	18	35	51	582	41	1417	0.29
	High	28	55		623	44		
Induction	MCP	0	0		154	10		
	CHOP	10	15	66	685	44	1555	<0.0001
	CHOP+ACD20	56	85		716	46		
Response	CR+PR	60	97	62	1384	91	1519	0.16
Postremission t IFN		20	33	60	775	56	1372	0.0005
Postremission t ASCT		23	38	60	340	25	1384	0.022

Tabelle 7 Patientencharakteristika, dargestellt sind die Charakteristika der mittels NGS analysierten Patienten und zum Vergleich die übrigen Patienten der GSLG Studienkohorte. Die p-Werte geben an, ob ein statistisch signifikanter Unterschied besteht. Signifikante p-Werte sind **fett** gedruckt.

	Primerbezeichnung	Primerbindestelle	1Step	2Step
Primermix_FR1	univIGHVFR1_2	cggggctggggtaagaag	0.2µM	0.1µM
	univIGHVFR1_4	gcaggctggcggcggggaaa	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR1_10	tcaacctggaggctgtttc	0.2µM	0.1µM
	univIGHVFR1_11	agggtcggcggggggatc	0.2µM	0.1µM
	univIGHVFR1_12	gagggtcggcggggggatc	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR1_18	ccaggactggtaagccctc	0.2µM	0.1µM
	univIGHVFR1_19	caglggggcggcggacttt	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR1_20	ccaggactggtaagccctc	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR1_21	gtacaggctggcggacttt	0.2µM	0.1µM
	univIGHVFR1_23	gtctggcaacttgggttcg	0.1µM	0.1µM
	Fah1(47)-IGHV3_1	cctcgtggaaagggtttccgtcaagg	0.1µM	0.1µM
	Fah1(45)-IGHV2_2	aaaccacacggggccctcggc	0.1µM	0.1µM
	Fah1(58)-IGHV4_3	ctgggggttccctggacttcc	0.1µM	0.1µM
	Fah1(62)-IGHV6	cttcacacccctgtttccctac	0.1µM	0.1µM
	Fah1(42)-IGHV1_3	tgcagaccccttcactac	0.1µM	0.1µM
Primermix_FR2	univIGHVFR2_5	cgggtggcggccct	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_10	caggcttcggaaaagggttgc	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_11	ccccggacaaaggcttgc	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_12	ccggggaaaggcgttgc	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_13	cgacaggctgtggacac	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_18	cgtcggcccccggggaaagg	0.2µM	0.1µM
	univIGHVFR2_19	ccggcaggctccggggaa	0.2µM	0.1µM
	univIGHVFR2_20	atgcactgggttgcggc	0.2µM	0.1µM
	univIGHVFR2_21	ccaggctccggaaagggg	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_22	ggccaggctccggggaaagg	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_23	caggctccggggaaagggg	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_27	atgcactgggttgcggc	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_28	gcactgggttgcggc	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_32	ccaggctccggggaaagggg	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_33	atgcactgggttgcggc	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_36	ggcagccccggggaaagg	0.2µM	0.1µM
	univIGHVFR2_38	ggcagccccggggaaagg	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_39	cagccaccaggggaaaggcc	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_41	aactgggttgcggc	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_42	ctgggttgcggc	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_43	gaactgggttgcggc	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_44	ggtagatgttgcggc	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR2_45	atgcactgggttgcggc	0.2µM	0.1µM
Primermix_FR3	Fah2(93)-IGHV3_11	ctgggttgcggc	0.1µM	0.1µM
	Fah2(83)-IGHV3_1	ggccggccgggttccggggaa	0.1µM	0.1µM
	Fah2(88)-IGHV3_6	ggccggccgggttccggggaa	0.1µM	0.1µM
	Fah2(75)-IGHV4_1	tccgcagccccccggggaa	0.1µM	0.1µM
	univIGHVFR3_3	aagtccaggcggcggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_4	gttccatcggcggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_5	gacatgttccggcggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_7	tctccaggcggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_8	caggctcggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_9	ccatctctggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_11	tgaaggccggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_12	aggcggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_13	agccggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_14	ccaaaggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_15	gaaggccggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_16	acctccggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_20	caggaaaggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_22	gaaggccggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_25	ctccgttggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_26	gtgttttggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_28	ccgttccgttggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_29	cggttccgttggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_30	gttcggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_32	caatggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_33	caatggatc	0.1µM	
	univIGHVFR3_34	ggcttccgttggatc	0.1µM	
	Fah3(102)-IGHV1_3	acatggatc	0.1µM	
	Fah3(125)-IGHV3_11	caatggatc	0.1µM	
	Fah3(100)-IGHV1_1	acatggatc	0.1µM	
	Fah3(121)-IGHV3_7	caatggatc	0.1µM	
	Fah3(104)-IGHV4_1	gagcttggatc	0.1µM	
Primermix_T7JH	T7-JH consensus	cttacctgggggggggggg	0.1µM	0.1µM
	T7-IGHJ_136(faham)	cttacctgggggggggggg	0.1µM	0.1µM
	T7-IGHJ_137(faham)	cttacctgggggggggggg	0.1µM	0.1µM
	T7-IGHJ_138(faham)	cttacctgggggggggggg	0.1µM	0.1µM

Tabelle 8 Sequenzen der Primerbindestellen, die erste Spalte enthält die Bezeichnung der verwendeten Primermixe; die zweite Spalte die Namen der Primer; Spalte drei enthält die Nukleotidsequenzen der Primerbindestellen; in Spalte vier und fünf ist angegeben, wie die Zielkonzentration des Primers im PCR-Reaktionsgemisch ist.

7.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (14;18)(q32;q21) Translokation	4
Abbildung 2 IGH VDJ-Genumlagerung	6
Abbildung 3 Genescan Darstellung einer IGH-Konsensus-PCR	12
Abbildung 4 Übersicht des IG-NGS Arbeitsablaufes	14
Abbildung 5 Prinzip der 2-Schritt und 1-Schritt-PCR	16
Abbildung 6 Infiltrationsgrade und MRD-Werte in Abhängigkeit der verwendeten Polymerase	25
Abbildung 7 NGS-basierte Indexklonidentifizierung	26
Abbildung 8 Genescan-Ergebnis des diagnostischen Materials eines Patienten in FR1 im Doppelansatz	28
Abbildung 9 Genescan-Ergebnis des diagnostischen Materials eines Patienten in FR2 und 3.	28
Abbildung 10 im NGS ermittelte Frequenz aller identifizierten Indexklone	29
Abbildung 11 Infiltration der Indexklone in Blut und Knochenmark	30
Abbildung 12 IGHV-Genverwendung	32
Abbildung 13 MRD-Verlauf von 10 zufälligen Patienten	33
Abbildung 14 Streudiagramm der MRD-Werte gemessen mit RQ-PCR und NGS	34
Abbildung 15 Darstellung aller diskrepanten Verlaufsproben	36
Abbildung 16 MRD-Verlauf Patient 15	37
Abbildung 17 MRD-Verlauf Patient 14 und 51	38
Abbildung 18 MRD-Verlauf Patient 60	39
Abbildung 19 Bland-Altman Plot der Spike-in-basierten MRD-Werte und der Klonfrequenz	40
Abbildung 20 MRD-Verlauf Patient 1	41
Abbildung 21 Bland-Altman-Plot der MRD-Werte gemessen in RQ-PCR und NGS	42
Abbildung 22 Überlebenszeitanalyse von allen 43 Patienten aus der GLSG Kohorte, bei denen die notwendigen klinischen Daten zur Verfügung standen	43

Abbildung 23 Überlebenszeitanalyse getrennt nach dem Kriterium, ob Knochenmarksproben (23) oder Blutproben (39) untersucht wurden.....	44
--	----

7.7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Aufbau der Primer	17
Tabelle 2 Pipettieransatz der IGH-PCR	18
Tabelle 3 Thermocyclerprofil der IGH-PCR	18
Tabelle 4 Indexklonidentifizierung NGS im Vergleich zu Genescan-Ergebnissen	29
Tabelle 5 MRD-Werte im NGS im Vergleich zur RQ-PCR	35
Tabelle 6 verwendete Barcode-Sequenzen	71
Tabelle 7 Patientencharakteristika	71
Tabelle 8 Sequenzen der Primerbindestellen	72

Danksagung

Mein großer Dank richtet sich zuerst an Prof. Dr. Christiane Pott und Dr. Henrik Knecht für die hervorragende, gewissenhafte und immer sehr angenehme Betreuung über alle Schritte dieser Arbeit hinweg.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Claudia Baldus, als Direktorin der Klinik für Innere Medizin II des UKSH, Campus Kiel, und bei Prof. Dr. Monika Brüggemann, als Leiterin des Hämatologie Labor Kiel für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit zur Durchführung dieser Promotionsarbeit bedanken.

Außerdem möchte ich dem ganzen Team des Hämatologie Labor Kiel danken. Ohne das Einarbeiten in die grundlegenden experimentellen Techniken, die fortwährende Unterstützung bei aufkommenden Problemen und das immer geduldige Beantworten meiner zahllosen Fragen, wäre das Erstellen dieser Arbeit für mich nicht möglich gewesen. Dazu möchte ich mich ganz besonders bei Dietrich Herrmann, Petra Chall, Birgit Fricke, Ariane Stuhr und Anne-Wiebke Kruse bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir in viele Momenten der Frustration geholfen haben diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Herzog
Vorname: Arved
Adresse: Westring 275
24116 Kiel
Geburtsdatum: 29.03.1992

Ausbildung und Abschlüsse

08/2000– 07/2010 Allgemeine Hochschulreife, Bischöfliche Marienschule
Mönchengladbach

10/2011 – 08/2018 Studium der Medizin, Christian-Albrechts-Universität Kiel

Berufliche Tätigkeit und Promotion

05/2015 - heute Promotionsarbeit mit dem Thema „Immungen-basierte Hochdurchsatzsequenzierung zur Bestimmung minimaler Resterkrankung beim Follikulären Lymphom“, Hämatologie Labor Kiel, Klinik für Innere Medizin II, Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum S-H, Campus Kiel, Direktion Prof. Dr. Claudia Baldus, Betreuung Prof. Dr. Pott.

10/2018 – 08/2020 Assistenzarzt in Weiterbildung im Bereich Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Klinik für Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Universitätsklinikum S-H, Campus Kiel, Direktion Prof. Dr. Ambrosch

Publikationen

Abstract und Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie (DGHO), Leipzig, Oktober 2016

„MRD Nachweis mittels IgH-basierter Hochdurchsatzsequenzierung bei Follikulären Lymphomen“

Autoren: Herzog, Arved, Knecht H., Herrmann D., Unterhalt M., Hiddemann W., Kneba M., Brüggemann M., Hoster E., Pott C. (Kiel; München, D)

Abstract, Blood 130(Supplement 1): 1491-1491, 2017

„Standardized IGH-Based Next-Generation Sequencing for MRD Detection in Follicular Lymphoma“

Autoren Christiane Pott, Henrik Knecht, Arved Herzog, Elisa Genuardi, Michael Unterhalt, Barbara Mantoan, Irene Dogliotti, Wolfgang Hiddemann, Mario Boccadoro, Dietrich Herrmann, Michael Kneba, Anton W Langerak, Nikos Darzentas, Patricia Groenen, Monika Brüggemann, Eva Hoster, Marco Ladetto, Simone Ferrero

Article, Leukemia 24(3): 521-35, 2020

„MRD response in relapsed/refractory FL after obinutuzumab plus bendamustine or bendamustine alone in the GADOLIN trial“

Autoren Christiane Pott, Laurie H. Sehn, David Belada, John Gribben, Eva Hoster, Brad Kahl, Britta Kehden, Emmanuelle Nicolas-Virelizier, Nathalie Spielewoy, Guenter Fingerle-Rowson, Chris Harbron, Kirsten Mundt, Elisabeth Wassner-Fritsch, Bruce D. Cheson