

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

Hochdurchsatzsequenzierung zur Quantifizierung der minimalen Resterkrankung beim
Multiplen Myelom

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

vorgelegt von
Franziska Darzentas
aus Kiel

Kiel 2021

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Monika Brüggemann, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Valerius, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.08.2022

gez.: Prof. Dr. Monika Brüggemann

(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung	1
1.1 Multiples Myelom	1
1.1.1 Klinik	1
1.1.2 Diagnostik und Stadieneinteilung.....	1
1.2 B-Lymphopoese	2
1.2.1 VDJ-Rekombination und CDR3-Region.....	3
1.2.2 Somatische Hypermutation.....	5
1.3 Minimale Resterkrankung.....	5
1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	8
2 Material und Methoden	8
2.1. Patienten und klinische Proben	11
2.1.1 DNA Isolation	11
2.2 Markerscreening	12
2.2.1 Zwei-Schritt-PCR	13
2.2.2 Konzentrationsmessung und Poolen zu Subpools	16
2.2.3 Gelaufreinigung der Subpools	17
2.2.4 Konzentrationsmessung und Poolen zum Endpool	18
2.2.5 Denaturierung der Library	18
2.2.6 Next-Generation sequencing	18
2.2.7 Demultiplexing	19
2.2.8 ARResT/Interrogate	19
2.2.9 Rearrangement	20
2.2.10 Normalisierung der Rearrangement-Frequenzen durch <i>spike-ins</i>	20
2.3 Quantifizierung Minimaler Resterkrankung (MRD) in Verlaufsproben.....	21
2.3.1 NGS basierte MRD-Bestimmung	21
2.3.2 Durchflusszytometrische MRD-Bestimmung	22
2.3.3 ddPCR basierte MRD-Bestimmung	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Patientencharakteristika	24
3.2 Markerscreening	25
3.2.1 Nachweis eines Markers	25
3.2.2 Verteilung innerhalb der Zielgene	26
3.2.3 Länge der CDR3-Region	27
3.2.4 V-, D- und J-Gen Verwendung der IGH-Rearrangements	29
3.2.5 V- und J-Gen Verwendung der IGK-Rearrangements.....	31
3.2.6 Vergleich IGH-VDJ FR1, FR2 und FR3-Marker.....	32

3.3 Abundanz der Marker vor und nach Normalisierung	33
3.4 Vergleich des mittels NGS und MFC ermittelten Knochenmarkinfiltrationsgrads.....	35
3.5. Alternative Normalisierung der NGS-Markerabundanz über den durchflusszytometrisch ermittelten B-Zell-Anteil.....	36
3.6 Analyse der Minimalen Resterkrankung (MRD)	38
3.6.1 MRD Positivität	38
3.6.2 Vergleich mit durchflusszytometrischen Werten	39
3.6.3 Quantifizierung der NGS+/MFC- Proben mittels ddPCR	40
3.6.4 Sensitivitätsgrenzen der Durchflusszytometrie	40
3.6.5 Quantitative Korrelation der mittels NGS, MFC und ddPCR ermittelten MRD-Werte	41
3.6.6 Vergleich der Markerabundanzen aus der NGS-Sequenzierung bei Analyse von zwei klonalen Markern	42
3.7 Korrelation MRD und klinisches Ansprechen	43
3.7.1 Ansprechkategorien	43
3.7.2. Vergleich der Induktionstherapien RAD und VRD	45
4 Diskussion	46
5 Zusammenfassung.....	57
Literaturverzeichnis	58
Anhang	67
Danksagung	76
Veröffentlichungen	77

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
alloSCT	Allogeneic stem cell transplantation
APC	Antigen-presenting cell
ASCT	Autologous stem cell transplantation
ASO-RQ-PCR	Allele-specific oligonucleotide real-time quantitative PCR
BC	Buffy coat
bp	Base pair
CDR	Complementarity determining regions
cfDNA	Cell free DNA
CSR	Class switch recombination
CR	Complete response
D	Diversifying
ddPCR	Digital droplet PCR
DNA	Deoxyribonucleic acid
dsDNA	Double-stranded deoxyribonucleic acid
FLC	Free light chain
FR	Framework region
GITC	Guanidiniumthiocyanat
IG	Immunglobulin
IGH	Immunglobulin heavy chain
IGK	Immunglobulin kappa
IGL	Immunglobulin lambda
IMWG	International Myeloma Working Group
J	Joining
Kde	Kappa deleting element
KM	Knochenmark
MFC	Multiparameter Flow Cytometry
MM	Multiples Myelom
MRD	Minimal residual disease
NGF	Next-Generation Flow
NGS	Next-Generation Sequencing
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PR	Partial remission
RAD	Lenalidomid, Adriamycin, Dexamethason
RAG	Recombination activating gene
RCLB	Red cell lysis buffer
RSS	Recombination signal sequences
SBS	Sequence by synthesis
sCR	Stringent complete response
SCT	Stem cell transplantation
SD	Stable disease
SHA	mit Somatischer Hypermutation assoziierte Insertionen und Deletionen
SHM	Somatische Hypermutation
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TE	Tris EDTA
V	Variable
VGPR	Very good partial remission
VRD	Bortezomib, Lenalidomid und Dexamethason

1 Einleitung

1.1 Multiples Myelom

Das Multiple Myelom (MM) zählt zu den indolenten B-Zell-Non-Hodgkin Lymphomen und ist eine maligne Erkrankung der reifen antikörperproduzierenden Plasmazellen. Die Inzidenz liegt weltweit bei ca. 6-7/100.000 Neuerkrankungen pro Jahr. In Deutschland stellt das Multiple Myelom die dritthäufigste hämatologische Neoplasie dar. Bei Diagnosestellung liegt das mediane Alter der Frauen bei 74 Jahren, das der Männer bei 71 Jahren. Eine Manifestation vor dem 45. Lebensjahr ist mit unter 2% selten.[1] Die mediane Überlebensdauer lag in den 1960er Jahren, vor der Einführung von alkylierenden Substanzen wie Melphalan, bei unter einem Jahr. In den 1980er Jahren wurden mit der Etablierung von Hochdosis-Chemotherapien und anschließender autologer Stammzelltransplantation (ASCT) eine Verbesserung der Prognose gegenüber konventionellen Chemotherapien erzielt. Die Einführung von Thalidomid und dessen Analogon Lenalidomid bedeuteten eine wesentliche Errungenschaft in der Therapie des Multiplen Myeloms. Zusammen mit dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib und den monoklonalen Antikörpern Daratumumab und Elotuzumab steht heute eine erweiterte Auswahl von therapeutischen Möglichkeiten zur Verfügung.[2,3]

1.1.1 Klinik

Initial weisen 20% der Patienten mit einem Multiplen Myelom keine Symptome auf.[4] Die übrigen zeigen unspezifische Symptome wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust. Oft wird die Erkrankung durch Komplikationen wie Spontanfrakturierung osteolytischer Herde im Knochen symptomatisch. Im Verlauf können eine Vielzahl weiterer Komplikationen wie Panzytopenie, Amyloidose, Niereninsuffizienz oder Hyperkalzämie auftreten. Das MM manifestiert sich typischerweise durch die Produktion eines Paraproteins, welches als komplettes oder inkomplettes Immunglobulin vorliegen kann. Dieses lässt sich in aller Regel als M-Gradient im Blut nachweisen, seltener auch als freie Leichtketten im Urin (Bence-Jones-Proteinurie).[5]

1.1.2 Diagnostik und Stadieneinteilung

Das MM wird über die Kriterien der International Myeloma Working Group (IMWG) definiert.[6] Um die Diagnose eines MM stellen zu können, musste bis zum Jahr 2014 mindestens eines von den vier CRAB-Kriterien (C (*hypercalcemia*): Hyperkalzämie, R (*renal failure*): Niereninsuffizienz, A: (*anemia*): Anämie, B (*bone lesions*): Osteodestruktion, siehe Abbildung 1), entsprechend einer symptomatischen Erkrankung vorliegen. Die aktualisierten IMWG Kriterien erlauben eine Diagnosestellung bereits bei Nachweis einer Knochenmarkinfiltration von mehr als 60%, einer Ratio der freien Leichtketten > 100 oder dem

Nachweis mindestens einer fokalen Läsion im MRT, da der Nachweis einer dieser Biomarker mit einer 80%igen Progressionswahrscheinlichkeit zu einem symptomatischen Myelom innerhalb von zwei Jahren assoziiert ist.[6]

1. Histologischer Befund:

- Klonale Plasmazellen im Knochenmark > 10% oder ein durch Biopsie bestätigtes Plasmozytom des Knochens oder einer extramedullären Manifestation

Plus Nachweis eines oder mehrerer der folgenden CRAB-Kriterien:

2. CRAB-Kriterien

- Hypercalcämie: Serum-Calcium > 0,25 mmol/l oberhalb des oberen Referenzbereiches oder > 2,75 mmol/l (> 11 mg/dl)
- Niereninsuffizienz: Kreatinin-Clearance < 40 ml/min oder Serum-Kreatinin > 177 µmol/l
- Anämie: Hämoglobin > 20 g/l unterhalb des unteren Referenzbereiches oder < 100 g/l
- Knochenläsionen: ≥ 1 Läsion mittels Röntgenaufnahme, Computer- oder Positronenemmissionstomographie

Oder der Nachweis eines oder mehrerer der folgenden Biomarker:

3. Biomarker

- Klonale Plasmazellen im Knochenmark ≥ 60%
- Verhältnis involvierter/nicht involvierter freier Leichtketten (FLC-Ratio) ≥ 100 + involvierte FLC ≥ 100 mg/l
- > 1 fokale Läsion in der Bildgebung der Magnetresonanztomographie (MRT) > 5 mm

Abb. 1: Diagnosekriterien des Multiples Myeloms. 2014 aktualisierte Diagnosekriterien der IMWG.[6]

1.2 B-Lymphopoese

Plasmazellen entstehen als letztes Differenzierungsstadium in der Reifung der B-Zellen. Sie sind ein wichtiger Bestandteil der erworbenen Immunabwehr des Menschen und produzieren und sezernieren die in der Immunabwehr notwendigen Antikörper.

Die Reifung von B-Zellen verläuft in Stadien in unterschiedlichen Kompartimenten des Körpers. Sie beginnt im Knochenmark, wo unter anderem der elementare Schritt der B-Zellreifung, die VDJ-Rekombination stattfindet (siehe Kapitel 1.2.1). Anschließend verlässt die B-Zelle das Knochenmark und migriert in periphere sekundäre lymphatische Organe. Dort findet die antigenabhängige Reifung, die sog. somatische Hypermutation (SHM) und der anschließende Isotypenwechsel (*engl. class switch recombination, CSR*) statt. Während der Zirkulation im Blutkreislauf tritt die B-Zelle in Antigenkontakt und wird aktiviert. Daraufhin differenziert sie sich entweder zu einer Gedächtniszelle oder zu einer Plasmazelle und kehrt ins Knochenmark zurück.[7] (Abbildung 2)

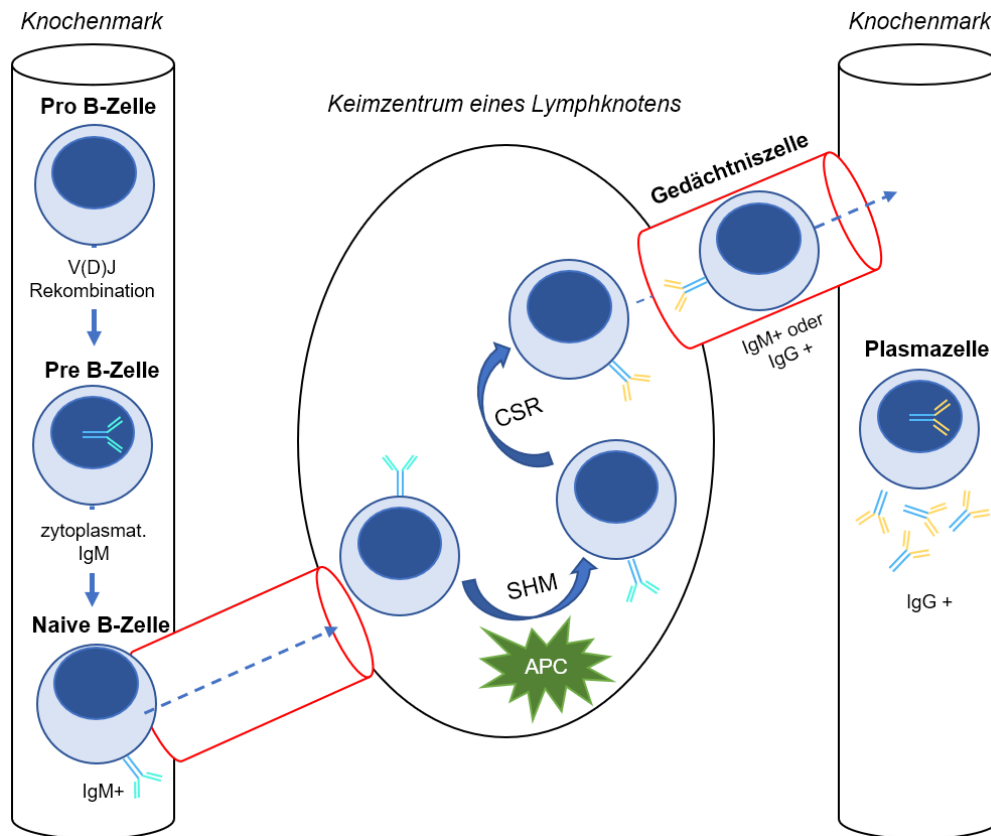


Abb. 2: B-Lymphopoese modifiziert nach González et al.[7] Stadien der B-Zellreifung im Knochenmark und sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten) bis hin zur reifen Plasmazelle. SHM = Somatische Hypermutation, APC = Antigenpräsentierende Zelle, CSR = *class-switch recombination* (Isotypenwechsel)

1.2.1 VDJ-Rekombination und CDR3-Region

Durch den Prozess der VDJ-Rekombination der Immunglobuline werden in den B-Zellen eine Vielzahl an strukturell unterschiedlichen B-Zell-Rezeptoren als Arsenal für die erworbene Immunantwort erzeugt. Der Genlocus des Immunglobulin-Schwerketten-Genlocus (*engl. immunoglobuline heavy chain, IGH*) befindet sich auf dem Chromosom 14q32.3. Zu den vier Hauptdomänen zählen die V-Domäne (V_H , *engl. variability*), die D-Domäne (D_H , *engl. diversity*), die J-Domäne (J_H , *engl. joining*) und die konstante Domäne (Abbildung 3A). Ohne den Selektionsdruck durch ein Antigen werden in der frühen B-lymphatischen Vorläuferzelle Segmente deletiert und anschließend eines der 27 D_H -Segmente an eines der 6 J_H -Segmente aneinandergelagert (Abb. 3B).[8]

Durch weitere Rekombination mit einem der mehr als 100 V_H -Segmente wird in der weiteren Reifung der pro-B-Zelle die inkomplette IGH-Rekombination (IGH-DJ) zu einer kompletten IGH-Rekombination (IGH-VDJ) erweitert (Abb. 3C). Die V(D)J-Rekombination wird durch die RAG (*recombination-activating genes*)-Enzyme reguliert, welche Doppelstrangbrüche zwischen den kodierenden Bereichen des Antigenrezeptors und den RSS (*recombination signal sequences*) induzieren. Diese Doppelstrangbrüche in den flankierenden Sequenzen des

D-Segments werden dann von der terminalen Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) mit zufällig ausgewählten N-Nukleotiden repariert (Abb. 3D).[8]

Nach erfolgter V(D)J-Rekombination des IGH-Gens erfolgt in der nun als Prä-B-Zelle bezeichneten Zelle eine Rekombination der V_k - und J_k -Segmente des Immunglobulin-Leichtketten-Genlokus Kappa (IGK) auf dem Chromosom 2p11.2. Entsteht durch diese Rekombination ein funktioneller B-Zell-Rezeptor, exprimiert die B-Zelle einen Antikörper vom Typ IgM κ . Bei unproduktiven Rekombinationen auf beiden IGK-Allelen kommt es durch die Rekombination des Kappa-deleting-element (Kde) mit dem V_k - oder dem Intron-RSS-Segments zur Eliminierung des gesamten IGK-Genlokus. In diesem Fall wird anschließend der Immunglobulin-Leichtketten-Genlokus Lambda (IGL) auf Chromosom 22 auf die gleiche Weise umgelagert und führt zur Expression von Antikörpern vom Typ IgM λ auf der Zelloberfläche.[8] Die V(D)J-Rekombination findet parallel auf beiden Chromosomen statt, bis eine produktive Rekombination entstanden ist. Zu diesem Zeitpunkt wird der Vorgang auf dem zweiten Chromosom gestoppt (*allelic exclusion*), so dass jede B-Zelle nur einen spezifischen Antikörper produziert.[9]

Neben der Anzahl der Rekombinationsmöglichkeiten während der VDJ-Rekombination, erhöht das unsaubere Aneinanderfügen der Segmente und die von der TdT eingefügte unterschiedliche Anzahl von beliebigen N-Nukleotiden die notwendige strukturelle Vielfalt der Antikörper für die Erkennung verschiedenster Antigene. Der auch als CDR3-Region bezeichnete Genabschnitt, der unter anderem die N-D-N-Sequenz beinhaltet, ist als Folge dieser Prozesse für jede B-Zelle so individuell, dass man ihn auch als genetischen Fingerabdruck in der Diagnostik einsetzen kann (Abbildung 4).[10]

In der vorliegenden Arbeit werden IGH- bzw. IGK-Rekombinationen fortan als ‚Rearrangement‘ (*engl.* für Rekombination) bezeichnet.

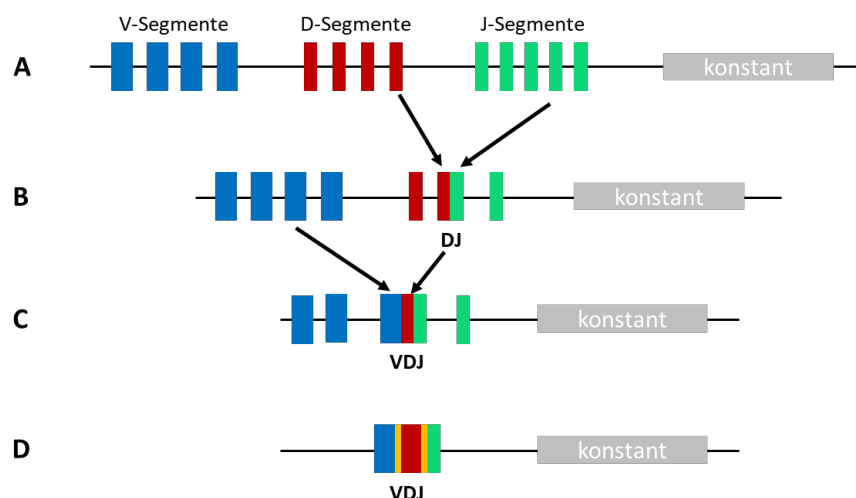


Abb. 3: Schematische Darstellung der VDJ-Rekombination einer B-Zelle. Rekombination eines der D-Segmente (rot) mit einem der J-Segmente (grün) und anschließend einem V-Segment (blau). Vollständiges VDJ-Rearrangement mit enzymatisch eingefügten N-Nukleotiden (gelb).

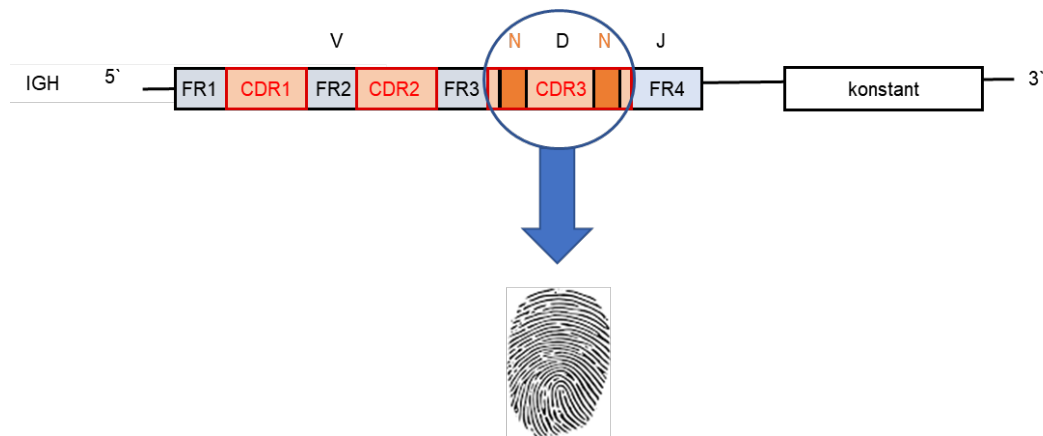


Abb. 4: Schematische Darstellung der CDR3-Region. Die klonspezifische CDR3-Region umfasst einen Teil des V-Segments, die eingefügten N-Nukleotide, das D-Segment, sowie einen Teil des J-Segments. Die CDR3-Region ist so einzigartig, dass sie als sog. genetischer Fingerabdruck der B-Zelle bezeichnet werden kann.

1.2.2 Somatische Hypermutation

Die reife B-Zelle verlässt das Knochenmark und wird über den Blutstrom in sekundäre lymphatische Organe getragen. Die dortige Entwicklung findet im Gegensatz zu der im Knochenmark antigenabhängig statt. Im Keimzentrum eines Lymphfollikels tritt die B-Zelle mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) und T-Zellen in Kontakt. Besonders in das V-Segment werden wiederum zufällige Punktmutationen eingefügt. Steigern diese Mutationen die Affinität des B-Zell-Rezeptors zum präsentierten Antigen, überlebt die B-Zelle, andernfalls geht sie in die Apoptose. Diesen Prozess nennt man somatische Hypermutation (SHM).[7,11]

1.3 Minimale Resterkrankung

Das klinische Ansprechen (*engl. response*) der Myelompatienten wird durch die Ansprech-Kriterien der IMWG kategorisiert. 2006 wurde neben der Kategorie des ‚complete response‘ (CR) auch der Begriff ‚stringent complete response‘ (sCR) und ‚very good partial remission‘ (VGPR) eingeführt. Der sCR beinhaltet zusätzlich zur klinischen Remission auch die fehlende Nachweisbarkeit maligner Zellen auf zellulärer Ebene mittels Immunhistochemie oder niedrig auflösender Durchflusszytometrie sowie eine normale Ratio der freien Leichtketten im Serum.[12] Trotz Erreichen eines CR oder sogar sCR, erleiden fast alle Patienten ein Rezidiv der Erkrankung.[13] Grund dafür ist das Verbleiben einer geringen Anzahl von Tumorzellen im Körper des Patienten, selbst wenn diese mit konventioneller Diagnostik nicht nachweisbar sind. Mit Hilfe der konventionellen Zytomorphologie (Knochenmarkausstrich) kann eine maximale Sensitivität von ca. 1×10^{-2} erreicht werden (Detektion einer malignen Zelle in 100 untersuchten Zellen).[14] Die residuelle Tumormasse unterhalb der zytomorphologischen Nachweisbarkeit wird als minimale Resterkrankung (*engl. minimal residual disease, MRD*) bezeichnet. Es hat sich gezeigt, dass das MRD-Niveau

ein wichtiger prognostischer Faktor für die progressionsfreie und gesamte Überlebensdauer ist.[15] Aus diesem Grund ist die Entwicklung sensitiver Verfahren zur MRD-Diagnostik von großer Bedeutung.

Die MRD-Messung basiert auf dem Nachweis des malignen Klons entweder mittels durchflusszytometrischer oder mittels molekularer Methoden. Während in der Durchflusszytometrie spezifische Antigenexpressionsmuster der Myelomzellen eine Unterscheidung von gesunden Plasmazellen erlauben (z. B. ein aberrantes Expressionsprofil von CD56, CD19, CD45, CD117, CD27, CD81), basieren die molekularbiologischen Methoden auf der Nachweisbarkeit klonaler Immungenumlagerungen.[16]

Die multiparametrische Durchflusszytometrie (MFC) erfolgte zunächst mittels 4-Farb-Panels mit einer im Vergleich zu molekularen Techniken geringeren Sensitivität. Die Weiterentwicklung zu 6- bis 10-Farben Durchflusszytometrie verbesserte die Sensitivität der Methode.[16] Im Jahr 2017 wurde durch das EuroFlow-Konsortium das sog. Next-Generation Flow (NGF) vorgestellt, bei welchem optimierte 2-Tube 8-Farb-Panels standardisiert gefärbt und ausgewertet wurden. Eine gegenüber bisher publizierten durchflusszytometrischen Methoden verbesserte Sensitivität auf bis zu 5×10^{-6} wurde durch die Analyse von mindestens 10^7 Zellen erreicht. Im Vergleich mit konventionellem MFC konnten in 25% der Fälle ohne nachweisbare MRD mit dem NGF doch MRD nachgewiesen werden.[17]

Parallel entwickelten sich molekulargenetische Verfahren zur MRD-Quantifizierung. Als Marker dienen IGH- bzw. IGK-Rearrangements, die an einer diagnostischen Probe mittels Konsensus-PCR und anschließender Sequenzierung der CDR3-Region charakterisiert werden. Bei der ASO-RQ-PCR (*engl. allele-specific oligonucleotide real-time quantitative-PCR*) wird zunächst eine diagnostische Knochenmarkprobe mittels Multiplex-PCR und Konsensus-Primern auf Klonalität des Immunglobulin (IG)-Gens untersucht. Daraufhin werden allelspezifische Oligonukleotide (ASO) gegen die CDR3-Region des klonalen Rearrangements entworfen, die dann zusammen mit Konsensus Primern/Sonden-Kombination in einer *real-time* quantitativen (RQ)-PCR eingesetzt werden, um MRD in Verlaufsproben zu quantifizieren.[18] Diese Methodik hat vor allem durch die Tätigkeit des multizentrischen EuroMRD-Konsortiums einen hohen Standardisierungsgrad erreicht und stellt bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) den molekularen Goldstandard zur MRD-Quantifizierung dar.[18] Allerdings ist die Etablierung patientenspezifischer Assays zeit- und kostenintensiv und erfordert ein hohes Maß an molekularer Expertise. Beim MM stellt der hohe Grad der SHM der IG-Gene eine weitere Limitierung der Methode dar. Diese beträgt im Durchschnitt 9%.[7] Dies führt dazu, dass Konsensus-Primer aufgrund zu vieler nicht übereinstimmender Basen (*engl. mismatch*) nicht binden können und es folglich nicht zu einer Amplifikation kommt.

Zudem ist beim MM, wie bei vielen anderen reifzelligen B-Zell-Lymphomen, der Infiltrationsgrad der diagnostischen Knochenmarkprobe geringer als bei der ALL, so dass die Identifikation des klonalen IG-Rearrangements erschwert ist. Verglichen mit der ALL zeigt das MM eine durchschnittliche Knochenmarkinfiltration von 30% (0 - 90%) wohingegen die ALL eine durchschnittliche Infiltration von 90% (45 - 100%) aufweist.[19,20]

Insgesamt konnten aufgrund dieser Beschränkungen Sarasquete *et al.* die Methode in 75% der untersuchten Myelompatienten anwenden, Puig *et al.* nur in 42%, während die Etablierung klonenspezifischer ASO-RQ-PCR-Assays bei der ALL in > 95% der Fälle gelingt. [21-23]

Ein Teil dieser Limitierungen kann durch ein neues molekulargenetisches Verfahren zur MRD-Diagnostik, das ampliconbasierte Next-Generation Sequencing (NGS) klonaler IG-Rearrangements, überwunden werden. Hierbei erfolgt im ersten Schritt, wie bei der ASO-RQ-PCR, die Identifikation klonaler IG-Rearrangements über IG-Multiplex-PCRs. Anders als bei der vorbeschriebenen Methode erfolgt die anschließende Sequenzierung der Amplicons mittels NGS und nicht über Sanger-Sequenzierung, was gerade bei niedrig infiltrierten diagnostischen Proben einen erheblichen Vorteil darstellt. Nach Identifikation der klonalen Marker-Sequenz erfolgt die MRD-Untersuchung über das gleiche Multiplex-PCR-System mit anschließender NGS-Analyse der Amplicons und bioinformatischer Re-Identifikation der Marker-Sequenz.

IG-Amplicon-NGS als moderne Alternative zu konventionellen molekulargenetischen Methoden zeigt einige Vorteile. Zunächst kann durch den sehr spezifischen *readout* (*engl.* für Auslese) der Methode eine sehr hohe theoretische Sensitivität von bis zu 1×10^{-6} erreicht werden, während die ASO-RQ-PCR typischerweise eine Sensitivität von nur 1×10^{-5} erreicht.[24–27] Des Weiteren werden keine patientenspezifischen Reagenzien benötigt. Darüber hinaus erlaubt NGS die Untersuchung der V-, D- und J-Gen-Verteilung der klonalen IG-Rearrangements sowie eine Analyse des polyklonalen Hintergrundes einer jeden Probe. Wie bei der ASO-RQ-PCR wird allerdings auch beim NGS die Anwendbarkeit durch SHM beeinträchtigt. Es zeigte sich jedoch, dass diese Limitierung weniger stark ausgeprägt ist. So lag die Markeridentifikationsrate im Mittel beim NGS (80-90%) höher als bei der ASO-RQ-PCR (42-75%).[21,22],[28,29]

IG-Amplicon-NGS wurde bisher allerdings hauptsächlich auf kommerziellen Plattformen durchgeführt. Deshalb formierte sich das internationale EuroClonality-NGS-Konsortium, um standardisierte Immungen-NGS-Methoden zu etablieren, im Kontext klinischer Studien multizentrisch zu validieren und auf die verschiedenen Bereiche der hämatologischen, immunologischen und hämatopathologischen Diagnostik anzuwenden. 2019 wurden die in diesem Konsortium etablierten EuroClonality-NGS-Assays inkl. der zugehörigen bioinformatischen Pipeline ARResT/Interrogate zunächst für diagnostische Fragestellungen (Markeridentifikation bei der ALL, Klonalitätsdiagnostik bei lymphoproliferativen

Erkrankungen) publiziert.[30–32] Ausstehend ist aber noch die Optimierung und Validierung für MRD-Untersuchungen bei verschiedenen lymphatischen Neoplasien.

1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollten Assays zur ampliconbasierten Hochdurchsatzsequenzierung klonaler IG-Rearrangements, die im Rahmen des Europäischen Konsortiums EuroClonality-NGS entwickelt worden waren, angepasst werden, um bei Patienten mit Multiplem Myelom hochsensitiv MRD im Therapieverlauf zu quantifizieren. Hierzu stand ein Kollektiv erwachsener Myelom-Patienten zur Verfügung, das im Rahmen der DSMM XIV-Studie behandelt worden war und von dem Material zur durchflusszytometrischen Referenz-MRD-Untersuchung in das Hämatologie Labor Kiel geschickt worden war. Zunächst sollten aus der umfangreichen Probensammlung Patienten identifiziert werden, bei denen ausreichend Restmaterial für eine NGS-basierte MRD-Untersuchung zur Verfügung stand. Von denen sollten im nächsten Schritt an der Screening-Probe, welche vor Therapiebeginn entnommen wurde, molekulare IG-MRD-Marker identifiziert und charakterisiert werden. Für die anschließende MRD-Analyse der zugehörigen Verlaufsmaterialien sollten die EuroClonality-NGS-Assays von der Zwei-Schritt-PCR zur Ein-Schritt-PCR modifiziert und für die MRD-Quantifizierung optimiert werden.[30] Ein wichtiger Aspekt war in diesem Zusammenhang der Einsatz von sogenannten zentralen *in-Tube*-Kontrollen (*spike-ins*) zur korrekten Kalkulation der im Ansatz vorhandenen Zielgenkopien. Schließlich sollten die so ermittelten NGS-basierten MRD-Werte verglichen werden mit denen der durchflusszytometrischen Referenzmessung, um die Eignung beider Methoden zur sensitiven MRD-Detektion zu eruieren.

2 Material und Methoden

Der Arbeitsablauf ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Zunächst wurde DNA aus asservierten Zellpellets isoliert (Abb. 5A). Diese wurde in der sog. ‚*library preparation*‘ (Abb. 5B) (*engl.* für: Erstellen einer Bibliothek) amplifiziert, wobei sich die Methoden unterschieden zwischen Screening-Proben, in denen klonale IG-Marker identifiziert werden sollten, und Verlaufspalten, in denen MRD detektiert werden sollte. Nach der Amplifikation erfolgte die eigentliche Sequenzierung mittels MiSeq (Illumina, San Diego, U.S.) (Abb. 5C). Im letzten Schritt wurden die Daten mittels der im Rahmen des EuroClonality-NGS-Konsortiums etablierten bioinformatischen Pipeline ARResT/Interrogate aufgearbeitet und analysiert (Abb. 5D).

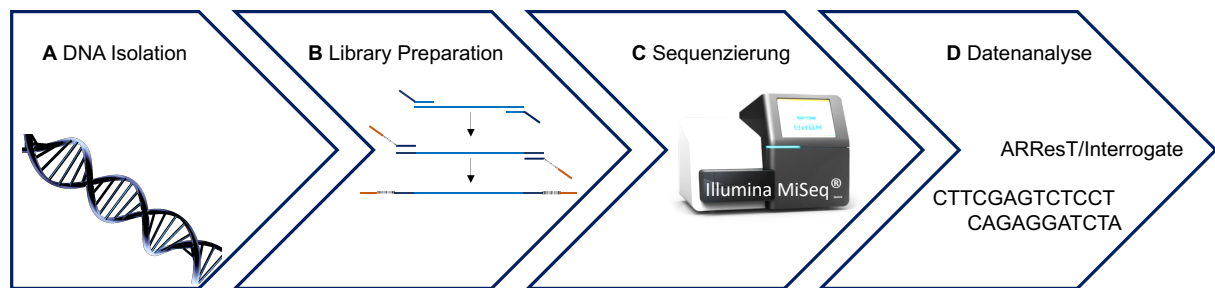


Abb. 5: NGS-Arbeitsablauf. Schematische Darstellung der Probenverarbeitung, Sequenzierung und Analyse.

Im Folgenden sind die für diese Arbeit verwendeten Geräte und Reagenzien tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Heraeus Pico 17 Microcentrifuge (Model 75002411)	Thermo Scientific
Digital Heat Block (Model 949036)	VWR
PerfectBlue™ Breitformat-GelsystemMidi ExW (Modell 40-2314)	Peqlab
PerfectBlue™ Mini S (Modell 40-0708)	Peqlab
Peqpower 300V (300V power supply)	Peqlab
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus
Eppendorf-Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf
Blockthermostat BT 1302	HLC
Eppendorf Pipetten, 10µL, 100 µL und 1000 µL	Eppendorf
50 mL Röhren	Sarstedt
2 mL Reaktionsgefäße	Eppendorf
1.5 mL Reaktionsgefäße	Eppendorf
Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt
0,3 ml 96 Well Multiply®PCR-Platte	Sarstedt
Reagiergef. 1,5ml DNA LowBind	Sarstedt
SafeSeal Gefäß 1,5ml	Sarstedt
UVT-S-AR PCR UV Cabinet	Grant bio
Transilluminator TC-312A 312nm UV	Spectroline
Light Cycler 480	Roche
Qubit® Fluorometer	ThermoFisher
MiSeq Next-Generation Sequencer	Illumina

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
FastStart High Fidelity Enzyme Blend, (5 U/μl) in storage buffer (FastStart™ High Fidelity PCR System, dNTPack)	Roche
FastStart High Fidelity Reaction Buffer, with 18mM MgCl ₂ (FastStart™ High Fidelity PCR System, dNTPack)	Roche
FastStart High Fidelity Reaction Buffer, without MgCl ₂ (FastStart™ High Fidelity PCR System, dNTPack)	Roche
MgCl ₂ Stock Solution, 25mM (FastStart™ High Fidelity PCR System, dNTPack)	Roche
PCR Nucleotide Mix (FastStart™ High Fidelity PCR System, dNTPack)	Roche
EagleTaq DNA Polymerase, 5 U/μL	Roche
Tris-EDTA buffer solution	Sigma-Aldrich
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen
Isopropanol	VWR
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	ThermoFisher
Fast Ruler low range	Fermentas
10x TBE-Puffer	Applichem
GelRed	Biotium
PeqGold Universal Agarose	PeqLab
Guanidinthiocyanat	Applichem
Silikat TLC	Sigma
TritonX-100	Merck
Ethanol absolut	Merck
2-Propanol	Merk
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth
1 M MgCl ₂	Roth
5 M NaCl	Merck
1 M Tris-HCl pH8	Eigene Herstellung
0,5 M EDTA	Roth
ATE-Puffer (Qiasymphony Kit)	Qiagen
Bromphenolblau	Sigma
GuanidinthiozyanatLösung	Applichem
2x250 bp v2 Kits	Illumina
Isopropanol	Merck
96% Ethanol	Merck
5 M NaCl	Merck

2.1. Patienten und klinische Proben

Die DSMM XIV-Studie ist eine multizentrische randomisierte Phase III Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit zweier unterschiedlicher Induktionstherapien (siehe Anhang, Abb. 1, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01685814). Zwischen 2012 und 2018 wurden insgesamt 406 Patienten zwischen 18 und 65 Jahren mit bisher unbehandeltem MM rekrutiert. Nach Studieneinschluss erfolgte eine Randomisierung in zwei Studienarme. Im Studienarm (A) erhielten die Patienten eine Kombination aus Lenalidomid, Adriamycin, Dexamethason (RAD) und Patienten des Studienarms (B) erhielten Bortezomib, Lenalidomid und Dexamethason (VRD) als Induktionstherapie. Nach der Induktionsphase erfolgte eine ASCT und eine *response*-adaptierte Konsolidierung (erneute ASCT oder bei suboptimalem Therapieansprechen auf die erste ASCT bei prinzipieller Eignung und Transplantatverfügbarkeit eine allogene Stammzelltransplantation (alloSCT)). Beide Studienarme enthielten eine Erhaltungstherapie mit Lenalidomid für 1 bzw. 3 Jahre. Zu fünf Zeitpunkten (Screening, post-Induktion, nach ASCT1, nach ASCT2 bzw. alloSCT und nach Erhaltungstherapie) wurden den Patienten Knochenmarkaspirate zur MRD-Diagnostik entnommen. Die MRD-Diagnostik im Rahmen der DSMM XIV-Studie wurde mittels 8-Farb-MFC nach EuroFlow-Protokoll durchgeführt.[17] Überschüssiges Restmaterial wurde in Form von Zellpellets (s.u.) bei -20 °C asserviert. Im Rahmen des Studienprotokolls gaben die Patienten ihre schriftliche Zustimmung zur Lagerung und Verwendung von überschüssigem Probenmaterial für wissenschaftliche Zwecke und zur Durchführung der MRD-Diagnostik. Ein Ethikvotum der zuständigen Ethikkommissionen Würzburg (Aktenzeichen 145/11_ff) und Kiel (Aktenzeichen B 272/11) für die Durchführung der im Rahmen der Dissertation durchgeführten Analysen liegt vor. In die im Rahmen der Promotion durchgeführten Analysen eingeschlossen wurden Patienten, von denen zumindest Screening- und Postinduktionsmaterial für eine DNA-Extraktion asserviert worden war, von denen erfolgreich eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt worden war und bei denen durchflusszytometrisch zum Screeningzeitpunkt eine MM-Infiltration des Knochenmarkaspirats von mindestens 0,1% nachgewiesen worden war.

2.1.1 DNA Isolation

Zur Asservierung des Restmaterials wurden die Erythrozyten in den Knochenmarksproben durch Zugabe von RCLB-Puffer lysiert und die intakten kernhaltigen Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 2700 U/min pelletiert. Die Zusammensetzung des RCLB-Puffers besteht aus 548 g Saccharose gelöst in 500 ml entsalztem H₂O, versetzt mit 60 ml 1M Tris-HCl, 40 ml 1 M MgCl₂ und 48 ml Triton-X100 aufgefüllt auf 1000 ml mit entsalztem H₂O. Die Lagerung der RCLB-Pellets bis zur Analyse erfolgte bei -20 °C. Die DNA wurde mit Hilfe von Guanidinthiocyanat (GITC) und Kieselgel extrahiert. GITC, ein chaotropes Agens, löst die DNA

von Kernproteinen. Durch elektrostatische Wechselwirkungen bindet die DNA dann an die Glasoberfläche des Kieselgels und wird anschließend in mehreren Waschschriften von dieser gelöst.[33,34]

Zu den Proben wurde hierzu eine an die Leukozytenzahl angepasste Menge Bind-Mix (4 g Silikat gelöst in 100 ml GITC-Gebrauchslösung) und weitere 3 ml GITC hinzugefügt. Die GITC-Gebrauchslösung setzt sich zusammen aus 1000 ml GuanidinthiozyanatLösung, 40 ml 0,5 M EDTA, 38 ml Triton X-100 und 10 g 1,4-Dithiothreitol (DTT). Die Proben wurden vorsichtig durchmischt/invertiert und für mind. drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation für 1 min bei 3000 U/min wurde das pelletierte Kieselgel drei bis fünf Mal mit 1,5 ml GITC-Gebrauchslösung gewaschen. Anschließend folgten mehrere Waschschriften mit Isopropanol, 65% Ethanol, 96% Ethanol, Ethanol-Wash 65%, Ethanol-Wash 100% und Ethanol absolut. Das Kieselgel wurde in den Reagiergefäßen (*engl. tubes*) für 12 min bei 45 °C inkubiert und dann die DNA mit ATE-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) über Nacht vom Kieselgel bei Raumtemperatur und anschließender Inkubation für 10 min bei 65 °C gelöst. Die Konzentration und Reinheit der DNA (Quotient der Absorptionen bei 260 nm für Nukleinsäuren und 280 nm für Proteine) wurde mit einem Spektralphotometer (Nano-Drop ND 1000) gemessen. DNA mit einer Reinheit von von 1,7 - 2,0 wurde für die Analyse verwendet. Die DNA wurde mit ATE-Puffer auf eine Konzentration von ca. 100 ng/µl eingestellt. Als weitere Qualitätskontrolle diente der Nachweis der Amplifizierbarkeit der DNA mit einer Kontrollgen-PCR für das Albumin-Gen wie bei Pongers-Willemse *et al.* beschrieben.[35] Die isolierte DNA wurde bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

2.2 Markerscreening

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines Myeloms ist das Knochenmark der Patienten in der Regel höhergradig durch Myelomzellen infiltriert, so dass ein Knochenmarkaspirat verwendet werden kann, um das Myelom molekular zu charakterisieren und myelomspezifische IG-Rearrangements als klonale MRD-Marker zu identifizieren. Im Folgenden wird die *library preparation* des Markerscreenings, wie sie im Rahmen des Europäischen Konsortiums EuroClonality-NGS entwickelt wurde, im Detail beschrieben.[30,31]

2.2.1 Zwei-Schritt-PCR

Zur Identifikation klonaler IGH- und IGK-Rearrangements musste zunächst eine Zwei-Schritt (*engl. two-step*) Multiplex-PCR durchgeführt werden (Abbildung 6). Ziel der PCR 1 (6A) war die Amplifikation des Ziel-Gens (*engl. target*). In der nachfolgenden PCR 2 (Abbildung 6B) erfolgte das Anfügen einer Index-Sequenz (sog. Barcode) und Sequenzieradaptern. Das Ziel-PCR-Produkt beinhaltet die in Abbildung 6C in rot markierte klonenspezifische N-D-N-Region.

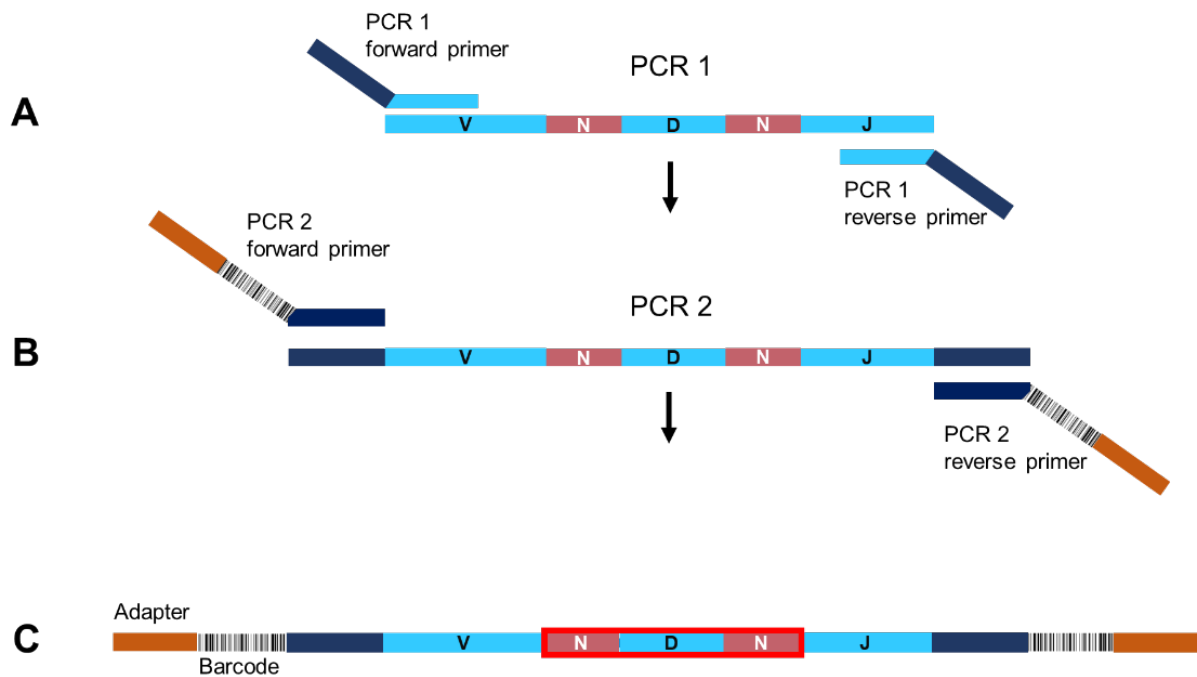


Abb 6: Schematische Darstellung der Zwei-Schritt-PCR. In der ersten PCR (PCR 1) erfolgt die Amplifikation des Ziel-Gens. Im zweiten Schritt (PCR 2) wurden zwei Barcodes und Adapter angefügt.

Für jede Probe wurden im ersten Schritt sechs PCRs in sechs unterschiedlichen Tubes durchgeführt. In den Tubes 1-3 wurden komplette IGH-Rearrangements (VDJ) separat für die *framework regions* (FR) FR1, FR2 und FR3 untersucht. Im vierten Tube erfolgte die Amplifikation der inkompletten IGH-Rearrangements (DJ). IGK-Rearrangements wurden in den Tubes 5 und 6 untersucht (Abbildung 7).

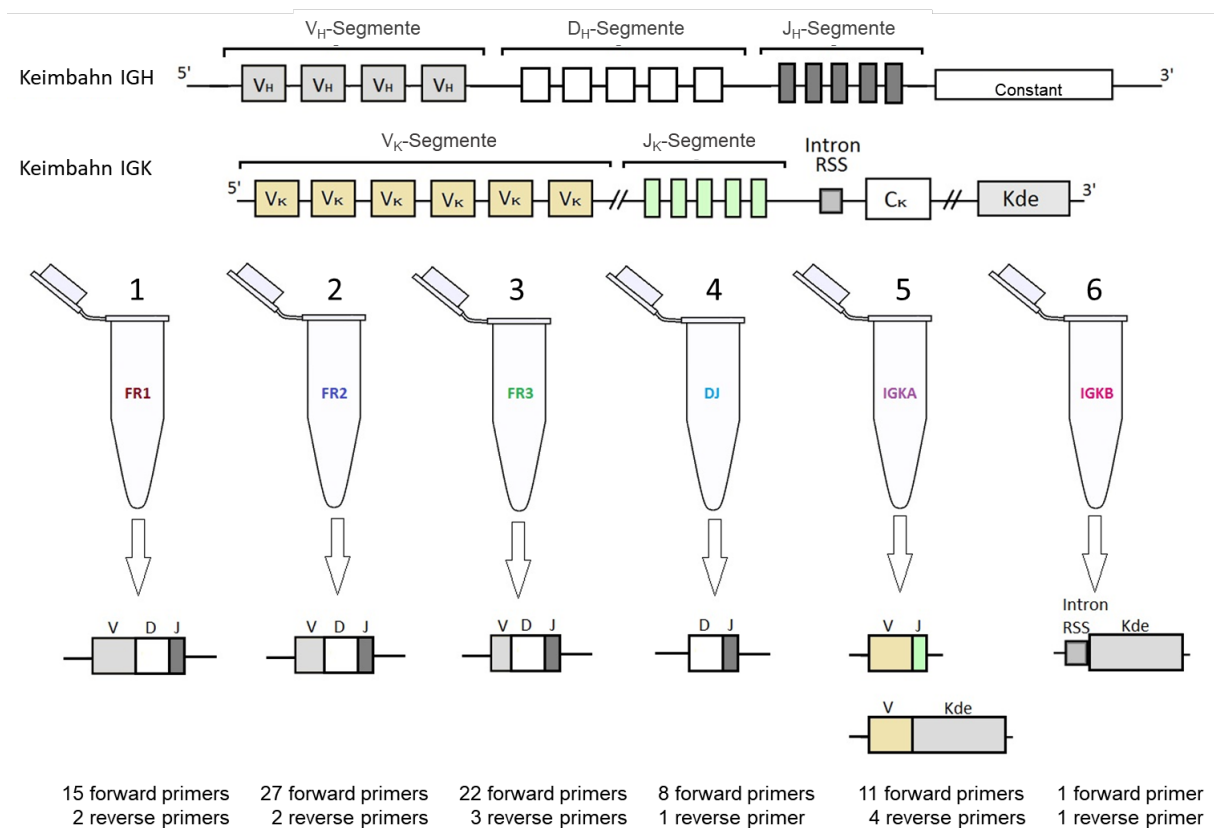


Abb. 7: Schematische Darstellung aller Markerscreening-Tubes. Im oberen Abschnitt sind die Keimbahnsequenzen des IGH-Gens und IGK-Gens dargestellt. Darunter sind die Markerscreening-Tubes 1-6 (FR1, FR2, FR3, DJ, IGK-A und IGK-B) und deren PCR-Produkte gezeigt. Im unteren Abschnitt ist die Anzahl der verwendeten vorwärts (*engl. forward*) und rückwärts (*engl. reverse*) Primer pro Tube aufgeführt.

2.2.1.1 Schritt 1: Target-Amplifikation

Für die Target-Amplifikation wurden patientenunspezifische Primer-Mixe verwendet (Primer-Liste PCR 1, Anhang Tab. 1). In diesem Mix sind eine Vielzahl von unterschiedlichen Primern enthalten, welche in ihrer Gesamtheit an den Großteil der potentiellen VJ- (bzw. DJ-) Rearrangements binden können. Die 15 *forward* Primer der IGH-FR1-PCR binden an der mutationsstabilen *framework region 1* (FR1) der V-Segmente. In seltenen Fällen kann eine Mutation der FR1-Region dazu führen, dass die FR1-Primer nicht binden können. Aus diesem Grund wurden zusätzlich FR2 und FR3-Primer-Sets verwendet. Die IGH-D-Primer binden an die D-Segmente, welche im Vergleich zu V-Segmenten einen geringeren Grad an SHM aufweisen.[36] So können auch hier patientenunspezifische Primer verwendet werden. Als *reverse* Primer wurden sowohl für VDJ- als auch DJ-Rearrangements universelle J_H-Primer verwendet (Abbildung 8).

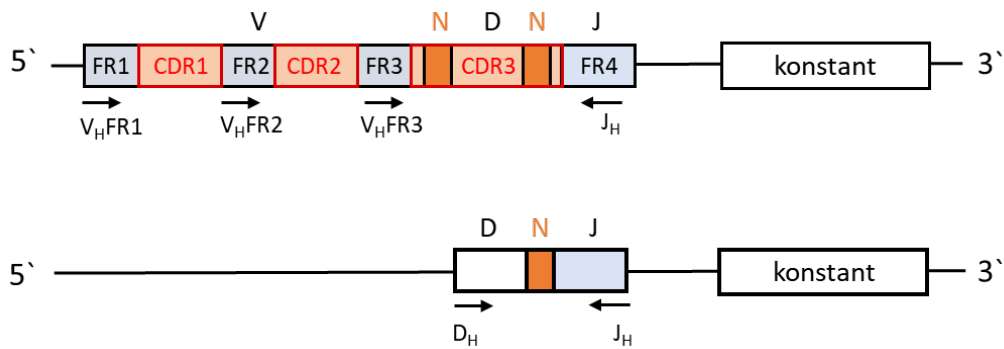


Abb. 8: Schematische Darstellung des Immunglobulin-Schwereketten-Genlokus (IGH). Dargestellt sind die verwendeten *forward* Primer V_H-FR1, V_H-FR2, V_H-FR3 und D_H, sowie der universelle J_H *reverse* Primer.

Die Rekombination des IGK-Genlokus und dessen potentielle Rekombinationsmöglichkeiten sind in Abbildung 9 schematisch dargestellt. Die Amplifikation der IGK-Rearrangements wurde in zwei separaten Tubes durchgeführt. Komplette V_k-J_k⁻, sowie inaktivierende V_k-Kde-Rearrangements wurden in Tube A amplifiziert. In Tube B erfolgte die Amplifikation von inaktivierenden Intron-Kde-Rearrangements.

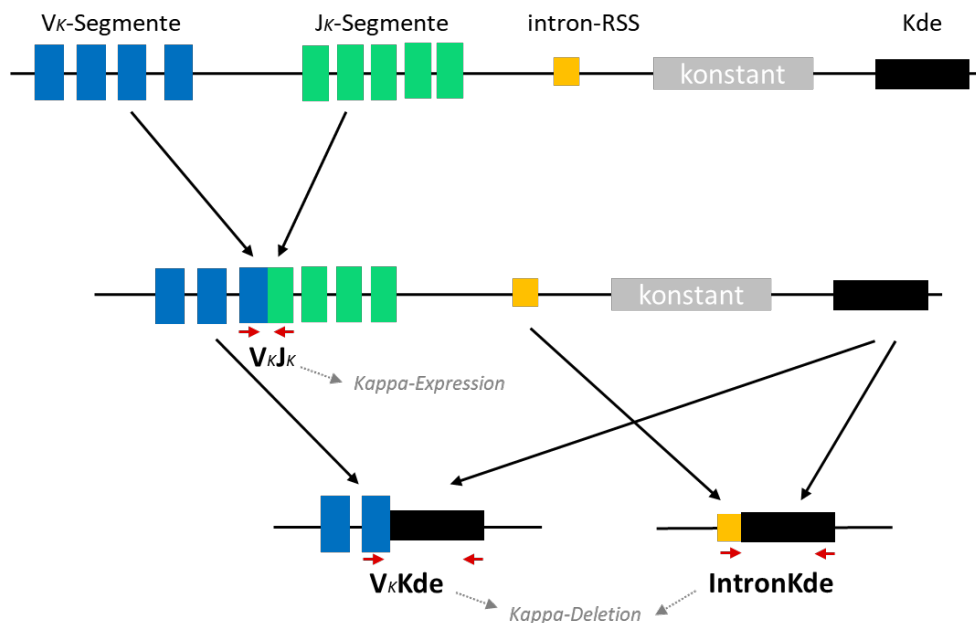


Abb. 9: Schematische Darstellung des Immunglobulin-Leichtketten-Genlokus (IGK). Entstehen während der IGK-Rekombination komplette V_k-J_k-Rearrangements führt dies zur Expression von Kappa-Leichtketten. Bei Kombination mit dem Kde entstehen inaktivierende V_k-Kde- und Intron-Kde-Rearrangements, welche zur Deletion des IGK-Genlokus führen. In der Abbildung sind die verwendeten Primer (rote Pfeile) dargestellt.

In die erste PCR wurden jeweils 100 ng DNA eingesetzt. Dies entspricht ca. 15.000 Zellkorrelaten. Zusätzlich wurden 10 ng polyklonale DNA aus gepoolten *buffy coats* (Leukozytenkonzentrat gesunder Blutspender, BC) und 2 µl (je 40 Kopien) *spike-in* DNA

(Erläuterungen siehe 2.2.10) zu jedem PCR-Ansatz hinzugefügt (PCR 1 Protokolle, Anhang Tab. 2). In einer PCR-Platte wurden parallel 14 Patientenproben untersucht. Zusätzlich wurde für jedes der sechs Targets eine B-Zell-haltige Positiv-Kontrolle (BC) und eine Negativ-Kontrolle (Aqua) verwendet.

Zur Überprüfung der Amplifikation wurden 7 µl des PCR-Produktes mit 3 µl Gelloading Puffer gemischt und in einem 2%igen Agarosegel für ca. 45 min bei 140 V aufgetrennt. In Abhängigkeit der Intensität der Bande im Agarosegel wurden die PCR-Produkte mit TE-Puffer auf 1:10 bzw. 1:100 verdünnt, um eine optimale Ausgangskonzentration für die erneute PCR zu erhalten.

2.2.1.2 Schritt 2: Anfügen des Barcodes und Sequenzieradapters

Im zweiten PCR-Schritt wurden die bereits amplifizierten Target-Rearrangements mit einem jeder Probe zugeordneten Barcode und Adaptersequenzen versehen (PCR 2 Protokolle, Anhang Tab. 3). Dazu wurden DX-Primer (Primer-Liste, Anhang Tab. 4) verwendet, welche sowohl die Barcode-sequenz, als auch die Adaptersequenz beinhalten. Die Barcodes sind erforderlich, um in der Datenauswertung die generierten Sequenzen dem jeweiligen Patienten zuordnen zu können. Ein Barcode besteht aus acht Nukleotiden und schließt direkt an die Target-Sequenz an. Um die Sequenzen sicher zuordnen zu können, wurde sowohl am 3'-Ende als auch am 5'-Ende ein Barcode angefügt. Zur Verfügung standen 8 *forward* Index-Primer und 12 *reverse* Index-Primer. Dies ermöglichte eine Vielfalt von 96 unterschiedlichen Barcodekombinationen und somit das gleichzeitige Sequenzieren von 96 unterschiedlichen Proben.

Zusätzlich mussten zwei Adaptersequenzen, P5 und P7, jeweils an ein Ende des DNA-Stranges angefügt werden, über welche dieser dann an die *flow cell* (*flow cell*: Träger, auf dem der Sequenzierprozess stattfindet) binden konnte. Auf der *flow cell* des Illumina MiSeq befinden sich zwei unterschiedliche Oligonukleotide, welche zu jeweils einer der Adaptersequenzen komplementär sind.

2.2.2 Konzentrationsmessung und Poolen zu Subpools

Zur Kontrolle der korrekten Amplifikation wurden die PCR-Produkte ebenfalls mittels Gelelektrophorese überprüft. Die erwartete Sequenzlänge in Basenpaaren (bp) betrug für FR1: ca. 580 bp, FR2: ca. 450 bp, FR3: ca. 330 bp, DJ: ca. 290 bp, IGK-A und IGK-B: ca. 340 bp. (Abbildung 10). Ein Subpool eines jeden Targets (IGH-FR1, IGH-FR2, IGH-FR3, IGH-DJ, IGK-A, IGK-B) wurde generiert, indem von jedem Patienten (inkl. Positiv- und Negativkontrolle) ein Teil des PCR-Produktes in ein gemeinsames Tube überführt wurde (sog. *poolen*). Das Poolen wurde äquimolar durchgeführt. Dies bedeutet, dass das in den Subpool überführte Volumen einer jeden Probe an die Konzentration angepasst wurde. Um

das einzusetzende Volumen zu berechnen, erfolgte zuvor die photometrische Quantifizierung der Doppelstrang-DNA (dsDNA) Konzentration mit dem PicoGreen® dsDNA Quantifizierungsassay. Nach der Verdünnung der Proben mit Tris-EDTA-Puffer auf 1:100, wurde zu 1 µl einer jeden Probe gemäß der Herstellerangaben 100 µl PicoGreen-Puffer-Gemisch beigefügt. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe mit Referenz-DNA angesetzt, welche als Standardkurve diente. Die photometrische Konzentrationsmessung erfolgte mittels Light Cycler 480 (Roche).

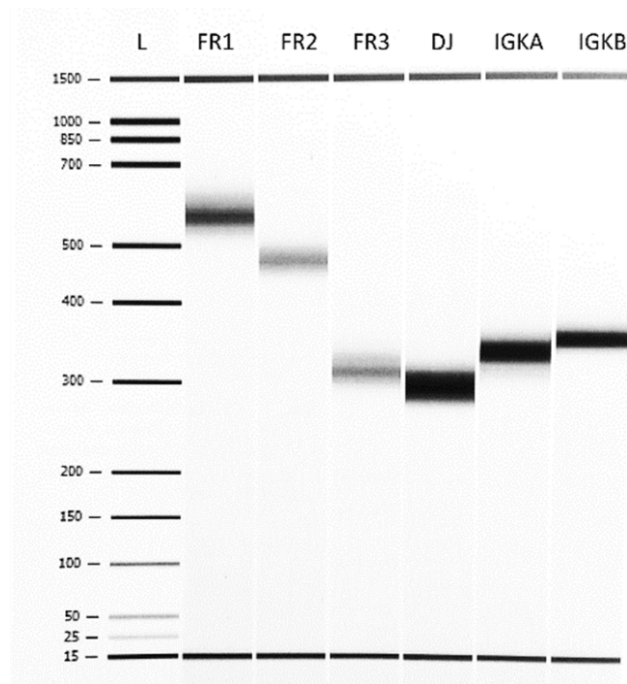


Abb. 10: Elektrophorese der Subpools. Übersicht der mittels Elektrophorese über den Agilent 2100 Bioanalyzer ermittelten Fragmentlängen der Subpools (IGH-FR1, IGH-FR2, IGH-FR3, IGH-DJ, IGK-A, IGK-B). Dargestellt sind die Fragmentlängen (in bp) gemessen an einer Leiter (L).

2.2.3 Gelaufreinigung der Subpools

Jeder der 6 Subpools (IGH-FR1, IGH-FR2, IGH-FR3, IGH-DJ, IGK-A, IGK-B) wurde anschließend mit einer Agarosegel-Extraktion aufgereinigt. Dazu wurde eine von der Konzentration abhängige Menge des Subpools zusammen mit einer entsprechenden Menge an Gelloading-Puffer (Verhältnis 7:3) in eine Geltasche überführt und bei 130 V für 45-55 min aufgetrennt. Die mittels UV-Licht sichtbar gemachte Bande wurde dann mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem MinElute Gel Extraktionskit gemäß der Herstellerangaben (Qiagen, Hilden, Deutschland) von Nukleotiden, Enzymen, Agarose und anderen Bestandteilen der Gelelektrophorese befreit. Hierbei wurde die DNA bei hoher Salzkonzentration an eine Silica Membran gebunden und anschließend durch mehrere Waschschrte bei niedriger Salzkonzentration eluiert. So wurde eine hochkonzentrierte DNA-Lösung für die Erstellung eines Endpools erzeugt.

2.2.4 Konzentrationsmessung und Poolen zum Endpool

Für die Herstellung der Endpools wurde die Konzentrationen der Subpools mit dem Qubit-Assay gemessen. Das Assay beinhaltet einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher an dsDNA bindet. Zur Quantifizierung wurden 2 µl des Pools mit 198 µl des Farbstofflösung versetzt und mit dem Qubit® Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, U.S.) bei 260 nm gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand zweier Verdünnungen einer Standard-DNA.

Anhand der bestimmten DNA-Konzentrationen wurde das Volumen der einzelnen Pools berechnet, um einen äquimolaren Endpool aller sechs Targets herzustellen. Entsprechend ihrer Konzentration und Fragmentlänge wurden dazu alle Subpools mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 4 nM verdünnt und dann zu gleichen Teilen in den Endpool überführt. Der Endpool setzte sich aus den Amplifikaten aller sechs Targets der 14 Probanden und der jeweiligen Positiv- und Negativkontrolle zu gleichen Teilen zusammen.

2.2.5 Denaturierung der Library

Nach der alkalischen Denaturierung der DNA-Doppelstränge mit 5 µl 0,2 M NaOH wurden 60 µl der PhiX-Sequenzierkontrolle (Illumina, San Diego, U.S.) zum Endpool gegeben. Die auf 14 pM verdünnte Library wurde mit dem Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, U.S.) sequenziert. Die PhiX-Kontrolle ist eine hochkonzentrierte *library* eines bekannten Bakteriophagen-genoms (PhiX) und dient der laufenden Qualitäts- und Kalibrierungskontrolle.[37]

2.2.6 Next-Generation sequencing

Die Sequenzierung erfolgte im Illumina MiSeq-Gerät unter Verwendung des 2x250 bp v2 Kits (Illumina, San Diego, U.S.). Pro Sequenzierlauf wurden durchschnittlich ca. 2 GB Daten erzeugt.

Ähnlich der Sangersequenzierung wird gemäß der sog. *sequence by synthesis* Methode pro Zyklus eine Base in einen komplementären DNA-Strang synthetisiert und so die Abfolge der Basen bestimmt.[38,39] Im Gegensatz zur Sangersequenzierung führt dies jedoch nicht zu einem Kettenabbruch, sondern zu einer basenspezifischen Lichtemission, welche von einer im MiSeq enthaltenen Kamera detektiert werden kann. Die Sequenzierung erfolgt zunächst in vorwärts- und anschließend in Rückwärtsrichtung und damit zur Generierung des sog. *forward* bzw. *reverse reads*.[40] Als *read* bezeichnet man die durch Sequenzierung generierte und zum Zielgen komplementäre Sequenz.

2.2.7 Demultiplexing

Nach der Sequenzierung wurden die Daten für die Analysesoftware ARResT/Interrogate mit einem Demultiplexing genannten Schritt bioinformatisch aufgearbeitet.

Bei diesem Schritt wurden die Sequenzen nach ihrem Barcode sortiert und zu einer Datei im fastq-Format zusammengefasst. Ausschließlich wurden solche Sequenzen, welche passende, fehlerfreie Barcodes enthielten, der entsprechenden Probe zugeordnet. Pro Patient wurden so jeweils 12 fastq-Dateien (jeweils *forward* und *reverse reads* der sechs Sequenzier-Targets) erstellt.

2.2.8 ARResT/Interrogate

ARResT/Interrogate ist eine interaktive Online-Plattform zur Auswertung der immunogenetischen Daten aus der Hochdurchsatzsequenzierung. Sie wurde im Rahmen des Europäischen Konsortiums EuroClonality-NGS entwickelt.[41] Zunächst fügt das Programm den *forward read* und den *reverse read* anhand der überlappenden Enden zusammen (sog. *mergen*, engl. für Zusammenfügen). Anschließend erfolgt die sog. Annotation der V-, D- und J-Segmente. Hierbei wird die Basenabfolge des entsprechenden Segmentes mit der unmutierten Keimbahnsequenz aus der IMGT Datenbank verglichen.[42] Anhand der prozentualen Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz werden die Segmente entsprechend zugeordnet. In der graphischen Benutzeroberfläche werden die annotierten Rearrangements in Tabellenform ausgegeben und können dort mit verschiedenen Visualisierungs- und Filtermöglichkeiten z.B. hinsichtlich der Infiltration eines einzelnen Rearrangements prozentual an der Gesamtzahl aller generierten *reads* oder der absoluten Anzahl der *reads* eines jeden Rearrangements weiter bewertet werden. Alle Analysen bezüglich der Infiltration eines Rearrangements bezogen sich hierbei ausschließlich auf die Gesamtheit aller generierten *reads*, welche auch eine CDR3-Region aufwiesen.

2.2.9 Rearrangement

Um ein Rearrangement beschreiben zu können, wird im Folgenden der Begriff 'Klonotyp' eingeführt, welcher anhand eines Beispiels in Abbildung 11 erklärt werden soll.

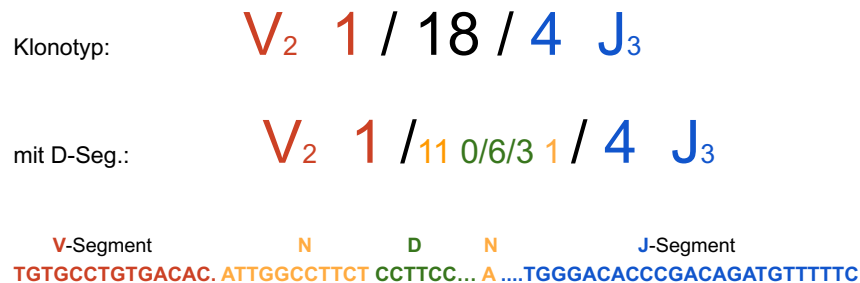


Abb. 11: Darstellung der Definition eines Klonotyps anhand der vorliegenden Sequenz. Rot dargestellt das V-Segment, in Gelb die N-Segmente, in Grün das D-Segment und in Blau das J-Segment. Jede Deletion ist als Punkt in der Sequenz (unten) dargestellt.

Die Übersetzung von Sequenz in Klonotyp geschieht wie folgt: Der Klonotyp beginnt mit der Definition des V-Segmentes. In diesem Fall liegt ein V_2 -Segment mit einer Deletion vor (1, rot). Anschließend wird innerhalb der Schrägstriche die Gesamtanzahl der Nukleotide der N-D-N-Region angegeben (18, schwarz). Im letzten Teil wird das J-Segment definiert. Hier gezeigt ist ein J_3 -Segment mit 4 Deletionen (4, blau). Die N-D-N-Region lässt sich genauer beschreiben: In Gelb dargestellt sind die eingefügten N-Nukleotide (11 Nukleotide vor und 1 Nukleotid hinter dem D-Segment). Das D-Segment (grün) wird in gleicher Weise definiert, wie das V- und J-Segment. In diesem Beispiel liegt ein D_2 -Segment mit 0 Deletionen am 5-Ende und 3 Deletionen am 3'-Ende vor.

2.2.10 Normalisierung der Rearrangement-Frequenzen durch *spike-ins*

Ein wichtiger Einflussfaktor der IG-basierten Quantifizierung ist der B-Zell-Anteil in der zu untersuchenden Probe, der sich bei unterschiedlichen Patienten und auch in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt stark unterscheiden kann. So wird bei der DNA-Extraktion die DNA aller kernhaltigen Zellen der zu untersuchenden Probe gewonnen, mittels IG-PCR wird aber nur DNA derjenigen Zellen amplifiziert, die ein IG-Rearrangement enthalten. IG-Rearrangements sind physiologischerweise nur in B-Zellen nachweisbar (siehe Abbildung 2, Lymphopoese). DNA von Zellen, die nicht der B-lymphatischen Linie angehören, wird mit der IG-Multiplex-PCR nicht amplifiziert. Die Anzahl der in der *library* vorhandenen IG-Rearrangement spezifischen *reads* darf daher nicht auf die Gesamtzahl der in der Probe enthaltenen Zellen, sondern nur auf die in der Probe vorhandenen B-Zellen zurückgerechnet werden. Um diesen Störfaktor zu korrigieren, wurde eine sog. Normalisierung durchgeführt. Dies beinhaltet die Hinzugabe von sog. *spike-in* DNA zu jeder Probe. Die *spike-in* Kontrolle

(oder auch zentrale *in-Tube* Kontrolle) ist eine Mischung aus DNA von neun lymphatischen Zelllinien, welche unterschiedliche IG- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements aufweisen (Zelllinien und *spike-in* Rearrangements, Anhang Tab. 5).[32] Zu jeder Patientenprobe wurden in der ersten PCR je 40 Kopien dieser individuellen *spike-in* DNA hinzugefügt, so dass anhand des Anteils der amplifizierten *Spike-in reads* an der gesamten *library* die Rückkalkulation der tatsächlichen DNA-Kopienzahl patienten-spezifischer IG-Rearrangements möglich ist.

Im Rahmen der durchgeführten Promotion wurde ein Verfahren zur manuellen Normalisierung mittels *spike-in reads* etabliert und angewendet. Hierzu wurden nur die *reads* der drei meist amplifizierten *spike-in* Sequenzen zur Normalisierung verwendet. Die Kalkulation der normalisierten Abundanz des jeweiligen Klonotyps erfolgte über folgende Formel[27]:

$$\text{normalised cln abundance (\%)} = \frac{\text{Cln rds} \cdot \frac{(3 * 40)}{\text{spike rds}}}{\text{sample copies}} \cdot 100$$

Hierbei bezeichnet ‚*cln rds*‘ die Anzahl der zum Klon gehörigen *reads*, ‚*spike rds*‘ die Summe der zur Normalisierung verwendeten *spike-in reads* und ‚*sample copies*‘ die Anzahl der in die Reaktion eingesetzten Gesamt-DNA-Kopien, wobei 100 ng in etwa 15.000 DNA Kopien entspricht.

2.3 Quantifizierung Minimaler Resterkrankung (MRD) in Verlaufsproben

2.3.1 NGS basierte MRD-Bestimmung

Sofern im Markerscreening ein als MRD-Marker geeignetes klonales Rearrangement detektiert werden konnte, wurden die zugehörigen Verlaufsproben des Patienten ebenfalls mittels NGS untersucht. Die Sequenzierung der Proben erfolgte dabei auf die gleiche Art wie die der Markerscreeningproben mit dem Unterschied, dass die PCR von einem Zwei-Schritt-Protokoll auf ein Ein-Schritt-Protokoll umgestellt wurde (Ein-Schritt-PCR Protokolle, Anhang Tab. 6). Dabei werden die Barcodes und die Adapter nicht in einer zweiten PCR, sondern bereits im Rahmen der ersten Target-spezifischen Amplifikation angefügt (Abbildung 12). Die dafür erforderlichen Primer enthalten neben der Target-spezifischen Sequenz bereits Barcode- und Adaptersequenz. Insgesamt wurden jeweils 21 Barcode-Kombinationen, bestehend aus drei *forward* und sieben *reverse* Primer-Sets, für die Targets IGH-FR1, IGH-DJ, IGK-A und IGK-B verwendet (Primer-Liste Ein-Schritt, Anhang Tab. 7).

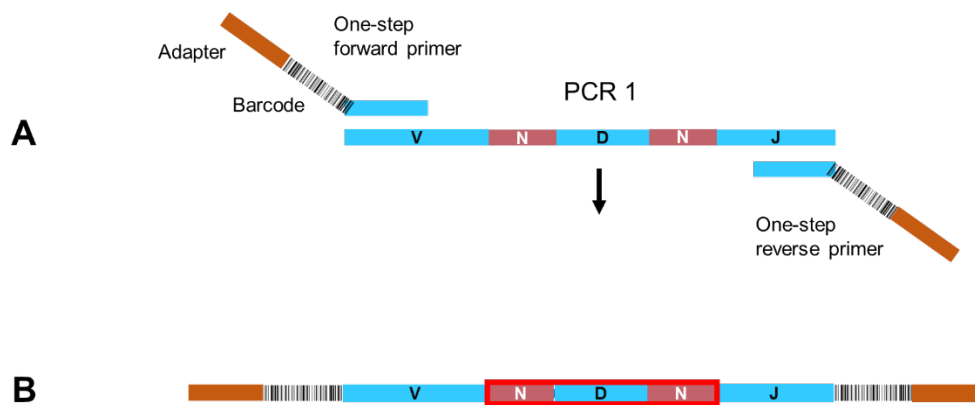


Abb. 12: Schematische Darstellung der *one-step* PCR zur MRD-Analyse. A :Amplifikation des Zielgens mit *one-step* Primern, welche neben der Target-spezifischen Sequenz bereits die Adapter- und Barcode-Sequenz enthalten. **B**: PCR-Produkt der Ein-Schritt-PCR mit N-D-N-Region (rot)

Das weitere Vorgehen zur Herstellung der Sequenzierbibliotheken unterschied sich nicht von dem des Markerscreenings.

Für die MRD-Diagnostik wurden 500 ng DNA pro Probe in die PCR eingesetzt. Das entspricht ca. 75.000 Zell-Korrelaten. Die Sequenzierbibliotheken wurden so zusammengefasst, dass die Gesamtzahl der generierten *reads* (*engl. coverage*) pro Probe etwa 100.000 *reads* betragen sollte. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit ARResT/Interrogate. Dazu wurden die Daten aller Verlaufsproben gemeinsam mit der Screening-Probe in die bioinformatische Pipeline geladen, um die Rearrangements in den korrespondierenden Proben direkt vergleichen zu können. Dadurch wurde auch sichergestellt, dass die durch die Software in den Proben zugeordneten Rearrangements identisch waren.

Für die Auswertung war es daher essentiell, dass in der Probenvorbereitung darauf geachtet wurde, dass sowohl der *forward Primer* als auch der *reverse Primer* mit unterschiedlichen Barcodes im Vergleich zur Screeningprobe versehen waren. Die Sequenzierung der Primärproben und für die MRD-Analyse erfolgten zusätzlich auf getrennten Sequenziergeräten, um einen möglichen Übertrag von Sequenzen in die jeweils andere Probe zu vermeiden.

2.3.2 Durchflusszytometrische MRD-Bestimmung

Im Rahmen der Referenzdiagnostik der DSMM XIV-Studie und außerhalb des Umfangs der vorgelegten Arbeit erfolgte eine MRD-Analyse der DSMM-Verlaufsproben mittels eines durch das EuroFlow-Konsortium publizierten 8-Farb-durchflusszytometrischen Assays (Tabelle 3).[17] Plasmazellen wurden mit Hilfe ihrer spezifischen Streulichteigenschaften und des Immunphänotypes CD138+CD38++ detektiert.

Die malignen Plasmazellen wurden durch die aberrant hohe Expression von CD56+, CD117+ oder den Verlust bzw. die verminderte Expression von CD19, CD81, CD45, CD27 oder CD38 erkannt. Zusätzlich wurde in einem zweiten Röhrchen eine intrazytoplasmatische Färbung der Immunglobulin-Leichtketten vorgenommen (Cylgk und Cylgλ). Für die Initial-Diagnostik wurden 2.500.000 Zellen pro Röhrchen eingesetzt. Im Verlauf wurden für die MRD Diagnostik 10.000.000 Zellen pro Röhrchen eingesetzt.[17] Der in der Durchflusszytometrie bestimmte MRD-Wert berechnet sich aus dem Anteil aller malignen B-Zellen an allen kernhaltigen Zellen.

Tabelle 3: 8-Farb-Durchflusszytometrie Antikörper-Panel entwickelt durch das EuroFlow-Konsortium.[17]
Dargestellt sind die Antikörper und Farbstoff-Kombinationen in Tube 1 und Tube 2.

Tube	<i>PacB</i>	<i>PacO</i>	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>PerCPCy5.5</i>	<i>PECy7</i>	<i>APC</i>	<i>APCH7</i>
1	CD138	CD27	CD38 (ME)	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81
2	CD138	CD27	CD38 (ME)	CD56	CD45	CD19	Cylgk	Cylgλ

2.3.3 ddPCR basierte MRD-Bestimmung

Alle Proben, die mittels NGS als MRD positiv und mittels Durchflusszytometrie als MRD negativ (NGS+/MFC-) bewertet wurden, wurden zusätzlich mittels klonspezifischer ddPCR untersucht. Die hierfür verwendeten Primer wurden für jeden Patienten individuell anhand der DNA-Sequenz der im Markerscreening detektierten Rearrangements abgeleitet und zusammen mit farbstoffmarkierten Konsensus-Sonden und *reversen* Primern in die ddPCR eingesetzt.

Hierzu wurden in getrennten Ansätzen 100 ng der diagnostischen DNA und dreifach-Ansätze von je 500 ng der DNA der Verlaufsprobe in einem Reaktionsansatz eingesetzt (ddPCR Protokoll, Anhang Tab. 8). Eine Probe wurde als positiv bewertet, wenn in der Analyse mindestens drei positive *droplets* detektiert wurden. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der MRD als Mittelwert der im dreifach-Ansatz ermittelten Anteile von positiven *droplets* an allen detektierten *droplets*.[43]

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Im Rahmen dieser Arbeit wurden prätherapeutische Knochenmarkproben von 103 Patienten der DSMM XIV-Studie untersucht. Zum Zeitpunkt der Diagnose waren die Patienten im Median 56 (40-66) Jahre alt. Für 47 dieser Patienten wurde auch eine Knochenmarkprobe nach Induktion analysiert, für drei dieser Patienten noch jeweils eine weitere Verlaufsprobe zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt (SCT1, SCT2 bzw. Erhaltungstherapie). Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Patientencharakteristika der untersuchten Kohorte zum Screeningzeitpunkt (Tabelle 2A), zur MRD-Diagnostik nach Induktion (Tabelle 2B) bzw. zu späteren Zeitpunkten (Tabelle 2C). CR = *complete response*, PR = *partial remission*, RAD = Lenalidomid, Adriamycin, Dexamethason, SCR = *stringent complete response*, SCT = Stammzelltransplantation, SD = *stable disease*, VGPR = *very good partial remission*, VRD = Bortezomib, Lenalidomid und Dexamethason.

<u>A: Markerscreening</u>	
n	103
Alter	56 (40 - 66)
40-49J.	20
50-59J.	49
60-69J.	34
<u>B: MRD nach Induktion</u>	
n	47
Behandlungsarm	
A: RAD	21
B: VRD	26
Klin. Ansprechen	
sCR	2
CR	6
VGPR	18
PR	16
SD	5
MRD-Status NGS	
positiv	43 (91,5%)
negativ	4 (8,5%)
<u>C: MRD zu späteren Zeitpunkten</u>	
n	6
Zeitpunkt	
SCT1	3
SCT2	2
Erhaltung	1
MRD-Status NGS	
positiv	5
negativ	1

3.2 Markerscreening

3.2.1 Nachweis eines Markers

Bei insgesamt 98 der 103 primärdiagnostischen Proben (95,1%) wurde mindestens ein als Verlaufsmarker geeignetes Rearrangement aus den 6 Target-Gen-PCRs identifiziert. In fünf Proben wurden lediglich polyklonale IG-Rearrangements nachgewiesen.

Die Markeridentifikation erfolgte in dieser Arbeit primär nicht über einen definierten Algorithmus, sondern über die Interpretation des gesamten IG-Rearrangement-Profiles mit vergleichender Beurteilung der Abundanzen der Marker zwischen verschiedenen Tubes und durch Vergleich der Abundanzen einzelner Klonotypen innerhalb eines Tubes. Im Verlauf der Auswertung erwies sich der Vergleich der Abundanzen der Klonotypen mit denen der *spike-in reads* als hilfreich. Als Marker wurden solche Rearrangements gewertet, die mit mehr Sequenz-*reads* als das höchst-abundante *spike-in* nachweisbar waren und damit folglich mindestens 40 Kopien in der Probe entsprachen. Rearrangements, die mit ähnlicher Abundanz auch in anderen Proben nachweisbar waren, wurden als unspezifisch ausgeschlossen. Unter Anwendung dieser Kriterien lag die Mindest-Abundanz eines jeden Markers bei 1,8% der verwertbaren Sequenzierreads der Probe.

Pro Patient wurden insgesamt bis zu sieben IG-Marker detektiert. Die Mehrzahl der Patienten wiesen zwei klonale Marker auf. Bei Vorhandensein eines Markers lag die durchschnittliche Anzahl von Markern lag bei 2,7 Markern pro Patient (Abbildung 13).

In einer zwischenzeitlich publizierten Studie des EuroClonality-NGS-Konsortiums, die zum Zeitpunkt der primären Auswertung der NGS-Daten dieser Promotion noch nicht vorlag, wurde für die Entität der ALL ein klonales Rearrangement zum Screening-Zeitpunkt dann als MRD-Marker definiert, wenn die normalisierte Abundanz bei über 5% lag.[30] Ein solches Vorgehen ist beim Multiplen Myelom nicht praktikabel, da der Infiltrationsgrad im Knochenmark oft deutlich niedriger ist als bei der ALL. Im Folgenden wurden die Daten dennoch mit einer festgesetzten 5%-Grenze für normalisierte Abundanz reanalysiert.

Im Vergleich mit der ursprünglich erhobenen Markerstatistik verringerte sich die Markerdetektionsrate bei Verwendung eines 5%-Grenzwertes von 95% (98/103) auf 78,6% (81/103). Insgesamt wurden mit dieser Strategie bei Vorhandensein eines Markers durchschnittlich 2,0 Marker pro Patient nachgewiesen. Die Mehrzahl der Patienten wies anschließend nur noch einen Marker auf (Abbildung 14).

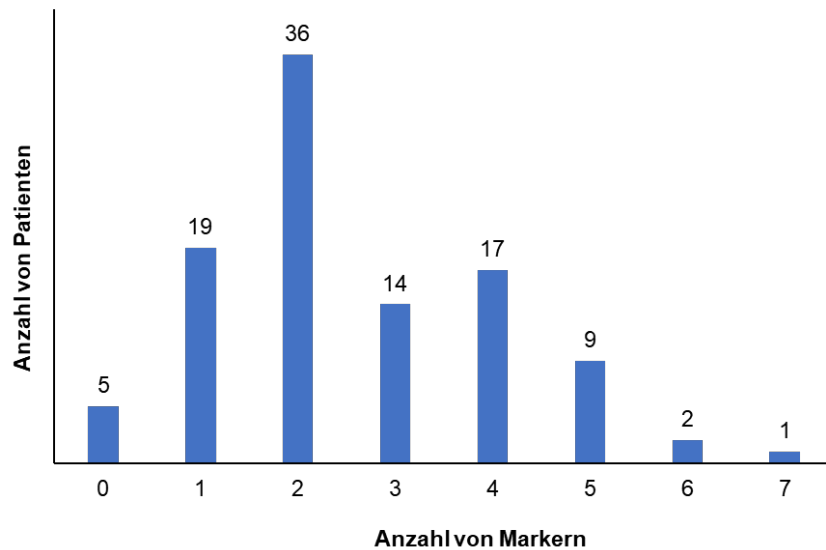


Abb. 13: Anzahl der pro Patient nachweisbaren klonalen IG-Marker. Markerstatistik unter Anwendung einer individuellen Auswertung des IG-Rearrangement-Profiles zur Markeridentifikation.

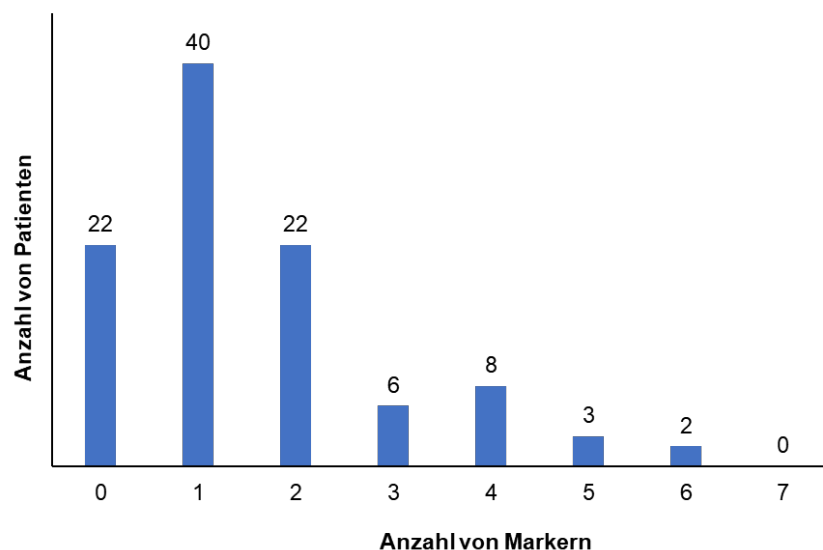


Abb. 14: Anzahl der pro Patient nachweisbaren klonalen IG-Marker. Markerstatistik unter Anwendung eines festen 5%-Grenzwertes für normalisierte NGS Werte zur Markeridentifikation.

3.2.2 Verteilung innerhalb der Zielgene

Insgesamt wurden für die verschiedenen IG-Gene 265 Marker nach den oben beschriebenen Kriterien identifiziert, davon waren 87 IGH-VDJ- und 62 IGH-DJ-Rearrangements. Von den 116 IGK-Rearrangements waren 61 V_k - J_k -, 19 V_k -Kde- und 36 intron-Kde-Rearrangements. 79,6% der Patienten (82/103) wiesen mindestens ein komplettes IGH-Rearrangement auf, während inkomplette IGH-Rearrangements bei 53,3% (55/103) und IGK-Rearrangements bei 59,2% (61/103) der Patienten nachgewiesen wurden (Abbildung 15).

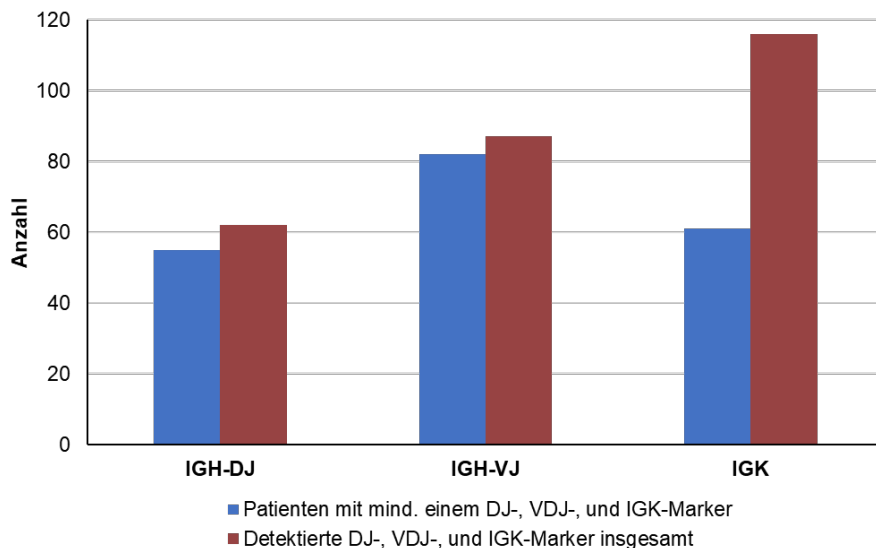
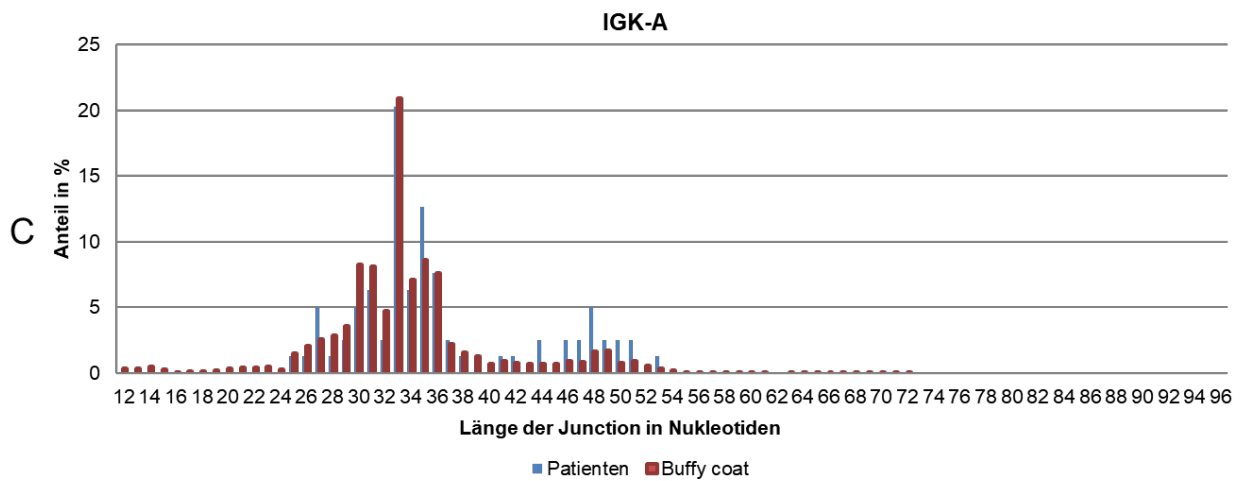
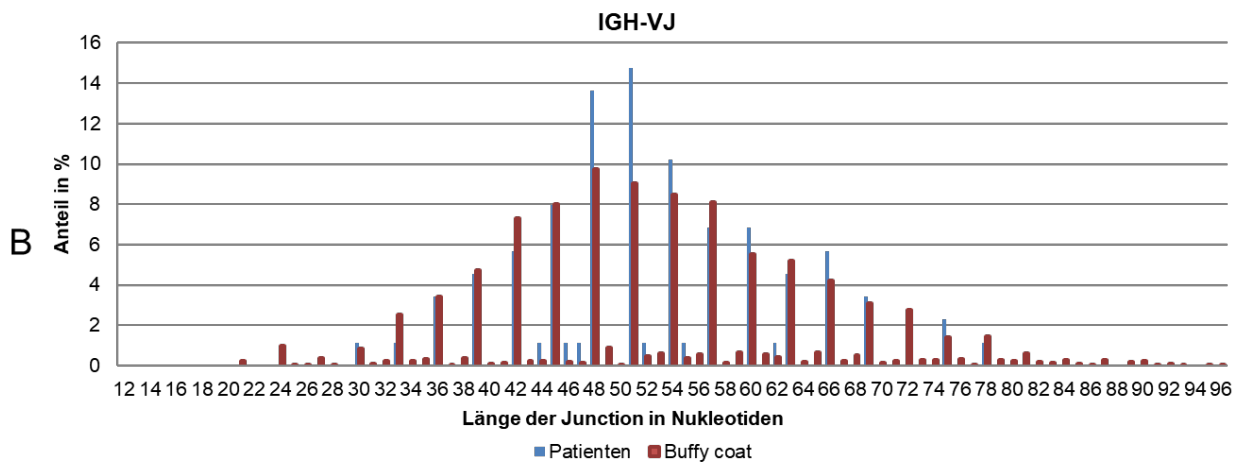
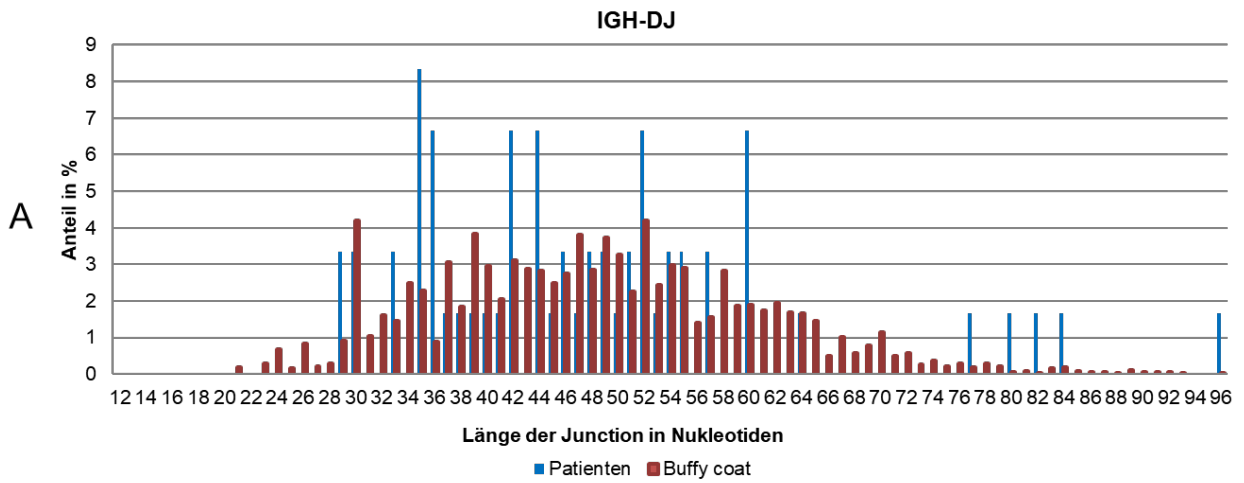


Abb. 15: Verteilung der Marker innerhalb der Zielgene. Anzahl der Patienten, die mindestens einen IGH-DJ-, IGH-VJ- und/ oder IGK-Marker aufweisen (blau), und Gesamtzahl der Marker pro Target (rot).

3.2.3 Länge der CDR3-Region

Um die detektierten Rearrangements näher zu charakterisieren, wurde neben der Verwendung der einzelnen Gensegmente der IG-Gene auch die Sequenzlänge der CDR3-Region, welche auch *junction*-Region genannt wird (engl. für Verbindungsstelle), untersucht. Unterschiedliche Längen der *junction*-Region entstehen durch die Baseninsertionen oder -deletionen während der Rekombination der einzelnen Genabschnitte und tragen zur Erhöhung der Diversität der Immunglobuline bei. Anschließend wurde die Verteilung der Marker-*junction*-Längen mit denen gesunder B-Zellen (*buffy coat*) verglichen (siehe Abbildung 16A-D). Durchschnittlich wiesen die DJ-Marker eine junktionale Region von 48 nt auf, im Vergleich zu 48 nt in der polyklonalen Kontrolle. Auch die mittlere Länge der VDJ-*junctions* (52 nt) unterschied sich kaum von der der BC-Kontrolle (53 nt). Die VDJ-*junction*-Längen spiegelten das Leseraster für die Basentriplets in der Proteinsynthese wider, was dafürspricht, dass ein Großteil der detektierten Sequenzen funktional sein könnte. Tatsächlich waren 95% der IGH-VDJ-Rearrangements produktiv. Auffällig war weiterhin, dass die Verteilung der Länge der *junction*-Region einer Normalverteilung folgte. Die *junctions* der V-J_k- und V-Kde-Segmente (zusammengefasst unter IGK-A) waren im Mittel kürzer (36 nt), wobei ca. 20% der IGK-A Marker eine Sequenzlänge von 33 nt aufwiesen. In der polyklonalen Kontrolle ließ sich das Gleiche beobachten: die mittlere Länge war 34 nt. Die Intron-Kde Marker-*junctions* wiesen eine sehr geringe Varianz auf (61-75 nt, Durchschnitt: 68 nt). Auch hier war kaum ein Unterschied zum BC zu beobachten, bei dem die mittlere *junction*-Länge bei 67 nt war. Insgesamt wich die Länge der CDR3- bzw. *junction*-Region der IG-Rearrangements bei MM-Zellen nicht signifikant von denen gesunder B-Zellen ab.



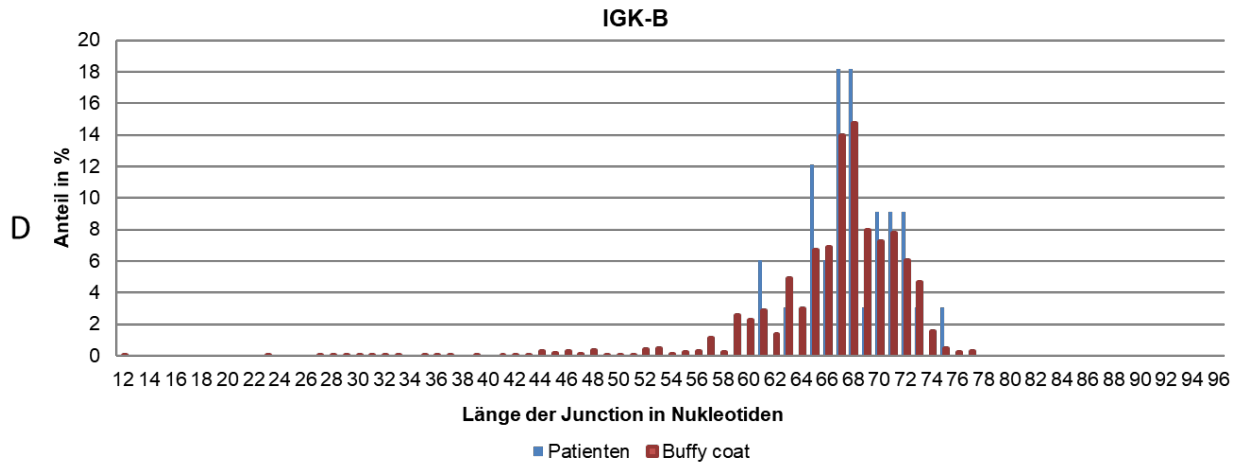


Abb. 16: Sequenzlängen der *junction*-Region der IG-Rearrangements. A: IGH-DJ, B: IGH-VJ, C: IGK-A und D: IGK-B. Blau: Patienten, rot: gesunde Kontrolle (*buffy coat*)

3.2.4 V-, D- und J-Gen Verwendung der IGH-Rearrangements

Analysiert wurde die Häufigkeit der verwendeten V-, D- und J-Gene der detektierten Marker. Anschließend wurde dies verglichen mit der Häufigkeit der V-, D- und J-Gene der polyklonalen Kontrolle. (Abbildung 17)

Im Vergleich mit der polyklonalen Kontrolle kamen das IGHV1-18 und das IGHV1-69 Segment in MM-Zellen deutlich seltener vor. Dahingegen waren die Segmente IGHV2-5, IGHV3-9 und IGHV5-51 in MM-Zellen deutlich häufiger rearrangiert.

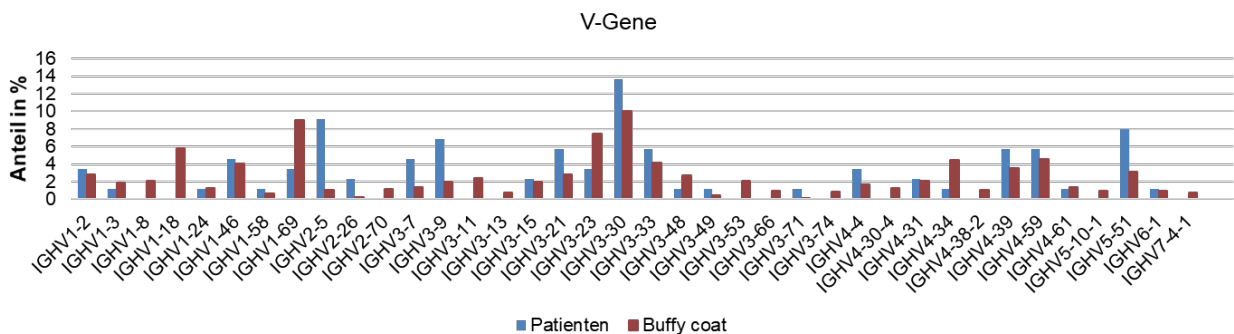


Abb. 17: Prozentuales Vorkommen der IGHV-Gene. Vergleich der V-Gen Verwendung in MM-Zellen (Marker, blaue Balken) und in der polyklonalen Kontrolle (BC, rote Balken).

Die Verteilung der V-Gen-Familien stelle sich wie folgt dar: V_{H1} : 14,9%, V_{H2} : 11,4%, V_{H3} : 45,5%, V_{H4} : 19,3%, V_{H5} : 8,0% und V_{H6} : 1,1%. V_{H7} -Segmente konnten in dieser Kohorte nicht nachgewiesen werden.

Die Verwendung der unterschiedlichen IGHD-Segmente in den untersuchten MM Proben und der polyklonalen Kontrolle ist in Abbildung 18 aufgetragen. Sowohl im untersuchten Patientenkollektiv, als auch in der polyklonalen Kontrolle wurden D-Segmente der D3-Familie

am häufigsten nachgewiesen. Im Vergleich zum BC waren die D-Segmente D4-D6 bei den MM-Proben jedoch häufiger rearrangiert, während D1-D3 seltener als in der polyklonalen Kontrolle vorkamen. Das im Rahmen der Promotion verwendete IGHD-Primer-Set beinhaltet keinen Primer für IGHD7, da dieser zu einer Amplifikation der IGHD7-IGHJ1 Keimbahnsequenz führt. Somit sind Aussagen zur biologischen Häufigkeit der Verwendung von IGHD7 mittels dieses Assays nicht möglich.[30]

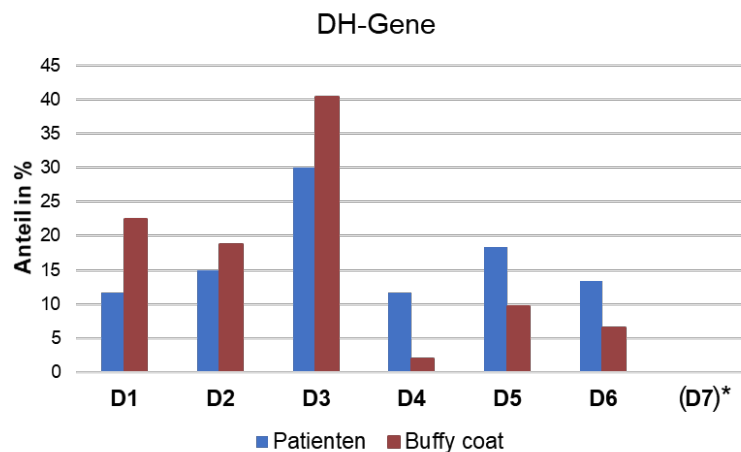


Abb. 18: Prozentuales Vorkommen der IGHD-Gene. Vergleich der D-Gen Verwendung in MM-Zellen (Marker, blaue Balken) und in der polyklonalen Kontrolle (BC, rote Balken). *Zu IGHD7 kann in dieser Arbeit keine Aussage gemacht werden.

Das am häufigsten rearrangierte J-Gen war sowohl in den MM-Proben als auch in der polyklonalen Kontrolle das IGHJ4-Gen. Für die J-Gen Verwendung sind die prozentualen Anteile der Marker und der polyklonalen Kontrollen in Abbildung 19 gezeigt. Gegenüber der gesunden Kontrolle konnten neben den am häufigsten vorkommenden J4 insbesondere J3- oder J5-Segmente überproportional detektiert werden.

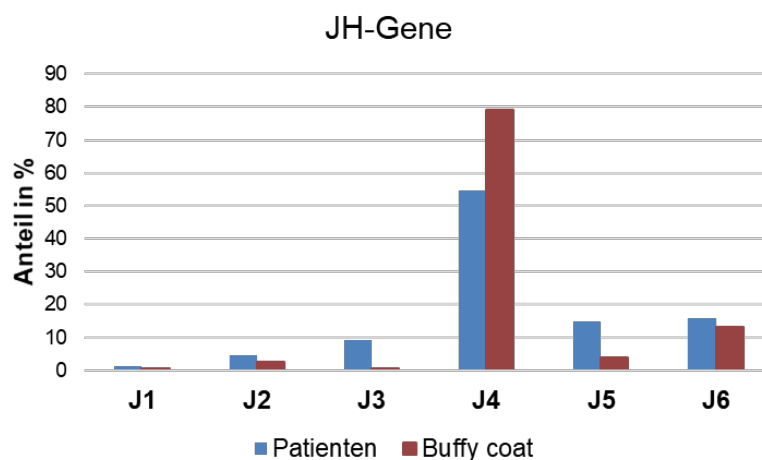


Abb. 19: Prozentuales Vorkommen der IGHJ-Gene. Vergleich der J-Gen Verwendung in MM-Zellen (Marker, blaue Balken) und in der gesunden Population (BC, rote Balken).

3.2.5 V- und J-Gen Verwendung der IGK-Rearrangements.

Die IGKV-Segment Verteilung (Abbildung 20) zeigte eine Unterrepräsentation von IGKV1-37 in den Myelomproben im Vergleich zur polyklonalen Kontrolle. Im Gegensatz dazu lag eine deutliche Überrepräsentation in IGKV2-30 und IGKV3-20 vor.

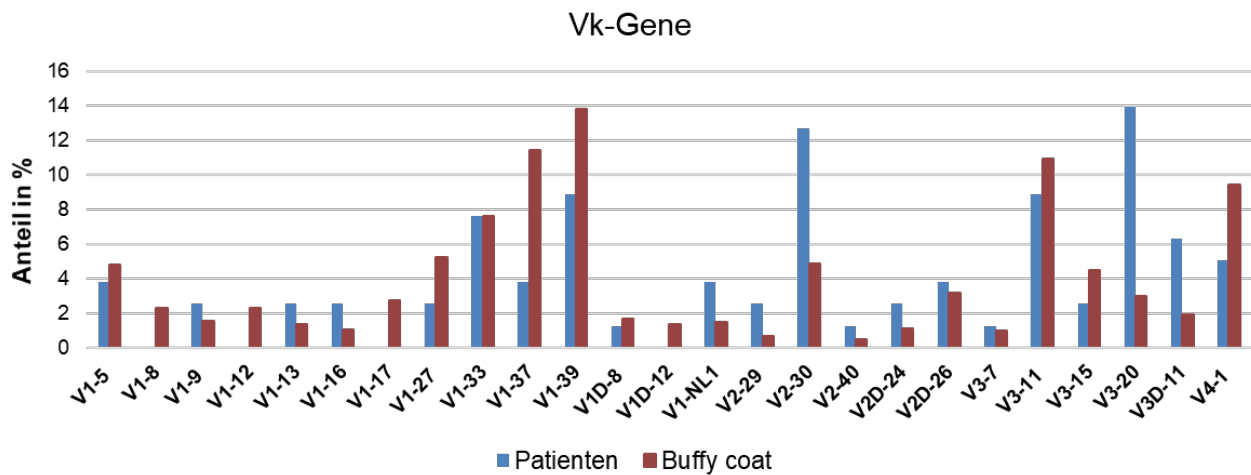


Abb. 20: Prozentuales Vorkommen der IGKV-Gene. Vergleich der V-Gen Verwendung beim MM (Marker, blaue Balken) und in der polyklonalen Kontrolle (BC, rote Balken).

Für die J-Segmente des IGK-Genlokus wurde eine Verschiebung von J4 zugunsten der anderen J-Segmente in den Myelomproben im Vergleich zur polyklonalen Kontrolle beobachtet. (Abbildung 21). Das Verteilungsmuster der IGKJ-Segmente in den Myelomproben und der polyklonalen Kontrolle ähnelte dem der J-Segmente für die IG-Schwereketten.

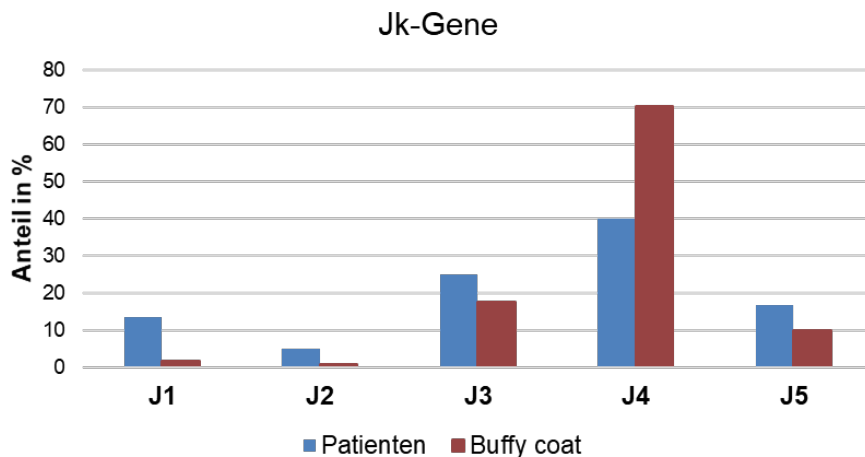


Abb. 21: Prozentuales Vorkommen der IGKJ-Gene. Vergleich der J-Gen Verwendung in MM-Zellen (Marker, blaue Balken) und in der gesunden Population (BC, rote Balken).

3.2.6 Vergleich IGH-VDJ FR1, FR2 und FR3-Marker

Die Primer der IGH-VDJ FR1-, FR2- und FR3-PCR binden zwar jeweils an unterschiedliche *framework regions* der V_H -Gene, amplifizieren prinzipiell aber die gleichen kompletten IGH-VJ-Rearrangements. Durch kombinierte Anwendung aller drei Primer-Sets ist es oftmals möglich, definierte VDJ-Rearrangements trotz somatischer Hypermutation mit *mismatches* an einzelnen Primer-Bindungsstellen nachzuweisen. Bei einem Vergleich der mit den drei Primer-Sets identifizierten VDJ-Klonotypen waren die detektierten klonalen IGH-VJ-Rearrangements nur in 23% (20/87) der Fälle mit allen drei Primer-Sets nachweisbar (Abbildung 22). 54,0% (47/87) der Marker ließen sich sowohl in FR1 und FR2, jedoch nicht in FR3 detektieren. Bei alleiniger Verwendung des FR1-Primer-Sets konnten acht weitere Marker exklusiv nachgewiesen werden. Das FR2-Primer-Set amplifizierte weitere neun Marker. Im Gegensatz dazu gab es keinen Marker, welcher ausschließlich mit dem FR3-Primer-Set nachweisbar war.

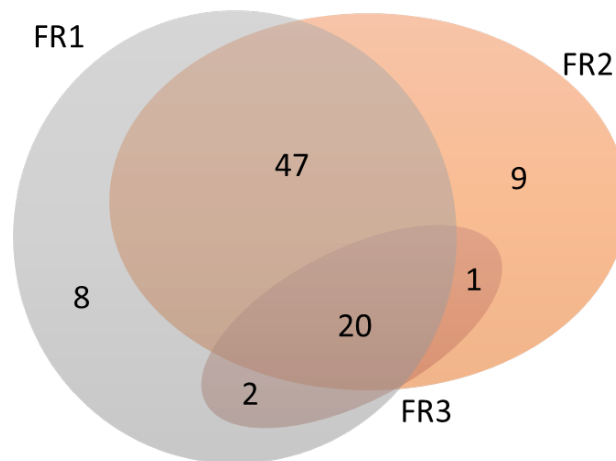


Abb. 22: Venn-Diagramm FR1-, FR2 und FR3-Primer-Set. Anzahl der pro Primer-Set detektierten klonalen IGH-VJ-Rearrangements.

Für die Marker, die mit allen drei Primer-Sets nachgewiesen wurden, wurde die Varianz der detektierten nicht-normalisierten Abundanzen näher untersucht, um Hinweise auf etwaige Über- oder Unteramplifikationen bestimmter Primer-Sets zu erhalten. Abbildung 23 zeigt die prozentuale Abweichung der einzelnen Primer-Sets gegenüber dem Mittelwert aller drei Primer-Sets für die einzelnen Marker.

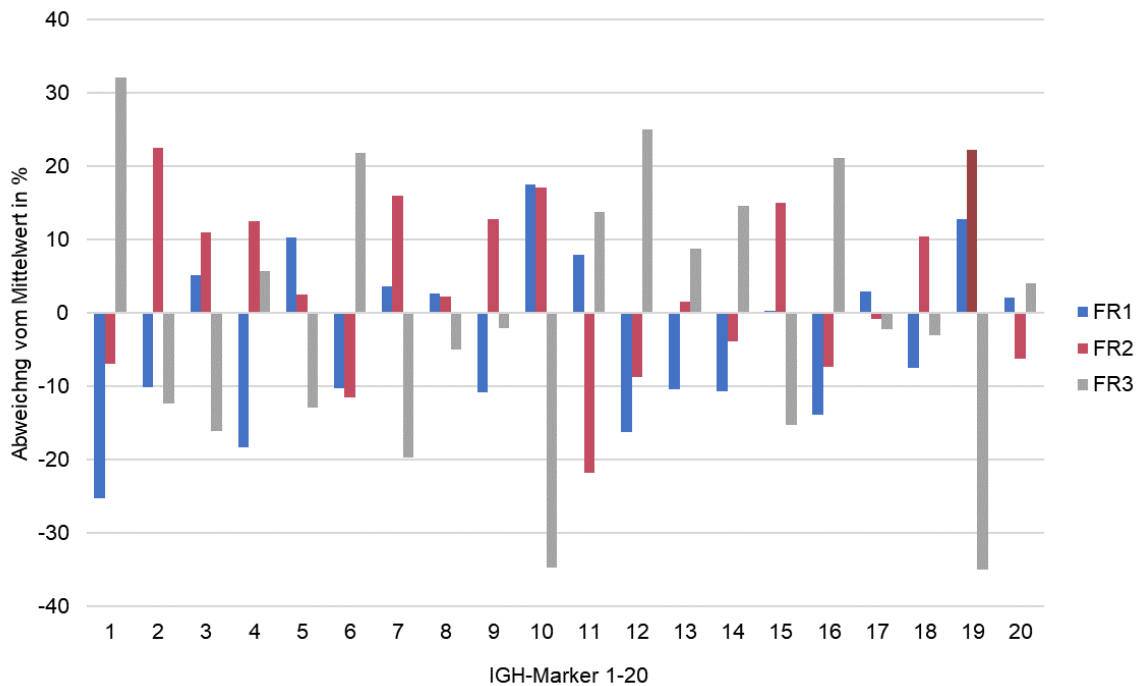


Abb. 23: Vergleich der Abundanzen aller klonalen IGH-VJ-Marker, welche mit allen drei Assays (FR1, FR2 und FR3) nachgewiesen wurden. Pro Marker (1-20) sind die Abweichungen der Primer-Sets (FR1 blau, FR2 rot, FR3 grau) vom gemeinsamen Mittelwert aufgetragen.

Die kleinste Abweichung vom jeweiligen Mittelwert zeigte das FR1-Primer-Set (im Mittel 10%), gefolgt vom FR2-Primer-Set (im Mittel 10,7%). Die stärkste Abweichung zeigte sich beim FR3-Primer-Set (im Mittel 15,3%). Diese starke Abweichung trat sowohl in positiver Richtung (Patient 1, 6, 12, 16) als auch in negativer (Patient 10 und 19) auf. Aufgrund der beobachteten Variabilität in beide Richtungen konnte somit nicht von einer generellen Über-, oder Unteramplifikation durch das FR3-Primer-Set ausgegangen werden.

3.3 Abundanz der Marker vor und nach Normalisierung

Die in der PCR mitgeführten internen Kontrollen (*spike-in*) werden insbesondere zur Normalisierung der nachgewiesenen Klonotypen genutzt. Die durch die Normalisierung vorgenommene Umrechnung der Sequenzier-*reads* zu Zelläquivalenten (siehe Material und Methoden) kann aufgrund der Probenzusammensetzung (B-Zellen, Klonotypen) und weiterer Probenbestandteile (Inhibitoren aus der DNA-Extraktion, Medikation) zu einer Über- oder Unterschätzung der Zelläquivalente eines Markers führen. Ebenso kann ein hoher Anteil maligner Zellen in der PCR die Amplifikation der *spike-ins* unterdrücken bzw. bei der Auswertung der Sequenzierung zu Clusterbildung führen.

Vor Normalisierung betrug der Anteil der Marker an allen sequenzierten *reads* zwischen 2,2% und 90,9%. Im Durchschnitt lag die Markerabundanz bei 39,3%. Nach der Normalisierung sank der durchschnittliche Anteil eines Markers auf 15,7% (0,44% - 317,5%). Bei Proben mit einem

hoch abundanten Klonotyp ($> 80\%$ unnormalisierter Abundanz) und bei Intron-Kde-Rearrangements führte in einem Teil der Proben die Normalisierung z. T. zu einer Überrepräsentanz des entsprechenden Klons auf Werte über 100% der getesteten Zellen. Ein Grund dafür könnte sein, dass durch den hohen Anteil klonaler Zellen in der Probe die Amplifikation der *spike-ins* unterdrückt wurde. Verstärkt wird dies durch einen ähnlichen Effekt bei der Sequenzierung, da die Clusterbildung auf dem Prinzip der Amplifikation beruht. Der aus den *spike-ins* berechnete Normalisierungsquotient lag in diesen Fällen über eins. Dies hat zur Folge, dass die Markerabundanz nach Normalisierung anstieg, obwohl dies biologisch nicht möglich ist. Ein Beispiel für die Überkorrektur ist in Abbildung 24 zu erkennen. Patient 25 wies vor Normalisierung einen IGH-DJ-Marker mit einer Abundanz von 88% auf, welche nach der Normalisierung auf 99% anstieg. Für die weiteren Auswertungen wurde die normalisierte Abundanz auf maximal 100% gesetzt.

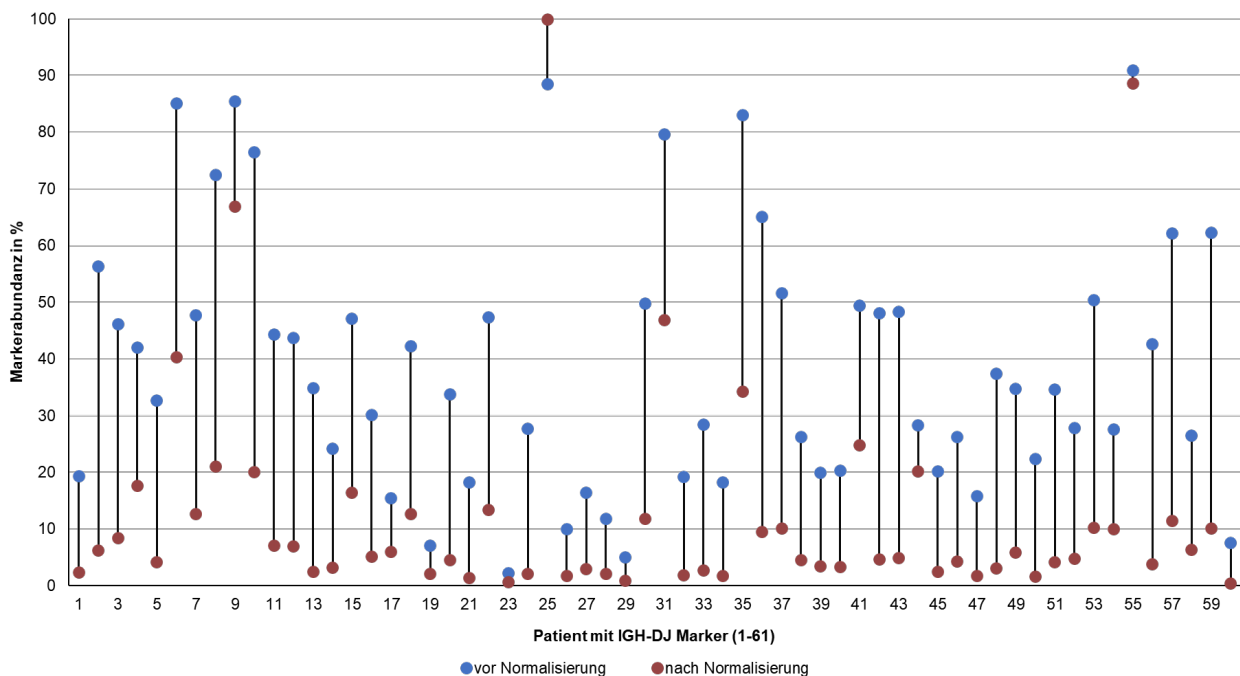


Abbildung 24: Abundanzen aller IGH-DJ-Marker vor und nach der Normalisierung. Auf der x-Achse aufgetragen sind alle Patienten, welche einen IGH-DJ-Marker besitzen (Patient 1-61). Für jeden Patienten ist auf der y-Achse ein Punkt für die Markerabundanz (in %) vor der Normalisierung (blau) und nach der Normalisierung (rot) aufgetragen. Die Differenz zwischen der unnormalisierten und normalisierten Abundanz ist als schwarzer Strich dargestellt.

3.4 Vergleich des mittels NGS und MFC ermittelten Knochenmarkinfiltrationsgrads

Zunächst wurde der mittels NGS ermittelte Infiltrationsgrad der diagnostischen Probe durch die klonale Myelom-Population mit den Werten der Durchflusszytometrie verglichen. Wie zu erwarten, zeigten die unnormalisierten NGS-Abundanzen im Vergleich mit denen der Durchflusszytometrie höhere Werte. Bei niedrigerem durchflusszytometrischen Infiltrationsgrad ergaben sich steigende Diskrepanzen (Abbildung 25, $R^2 = 0,2172$). Nach der Normalisierung der NGS-Abundanzen über die *spike-in* Kontrollen näherten sich die Werte aneinander an, bei jedoch weiterhin ausgeprägter Streuung (Abbildung 26, $R^2 = 0,2132$).

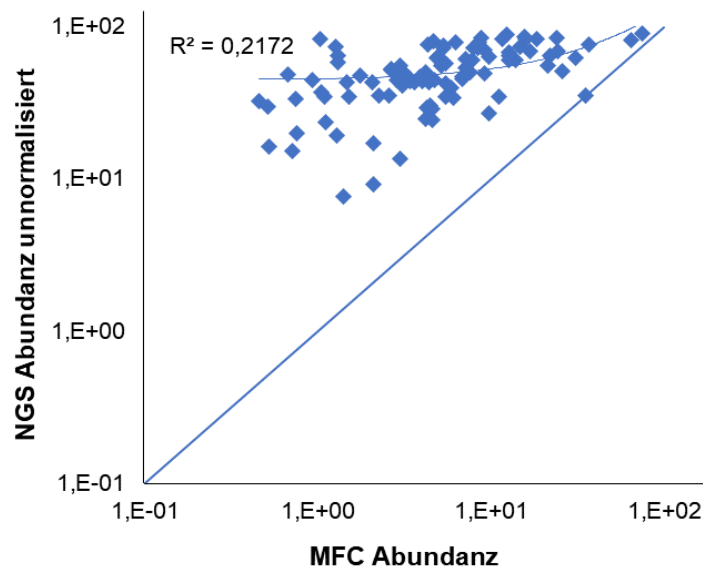


Abb. 25: Korrelation der unnormalisierten NGS-Abundanzen (y-Achse) mit den mittels MFC bestimmten Abundanzen zum Screeningzeitpunkt (x-Achse). Dargestellt sind nur Proben, in denen eine Myelompopulation mit beiden Methoden nachgewiesen wurde.

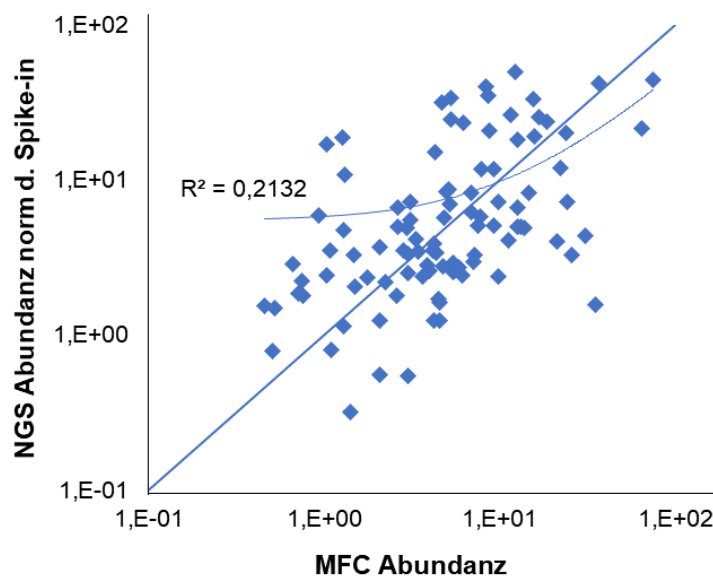


Abb. 26: Korrelation der mittels *spike-in* normalisierten NGS-Abundanzen (y-Achse) mit den mittels MFC bestimmten Abundanzen zum Screeningzeitpunkt (x-Achse). Dargestellt sind nur Proben, in denen eine Myelompopulation mit beiden Methoden nachgewiesen wurde.

3.5. Alternative Normalisierung der NGS-Markerabundanz über den durchflusszytometrisch ermittelten B-Zell-Anteil

Die Korrektur der NGS Markerabundanz über die *spike-in* Kontrolle dient dazu, die relative Markerabundanz nicht auf die Gesamtzahl analysierter B-Zellen, sondern auf die Gesamtzahl der in der Probe untersuchten kernhaltigen Zellen zu beziehen. Da aber über die parallel durchgeführte Durchflusszytometrie nebenbefundlich der B-Zell-Anteil in jeder Probe bekannt war, war eine Korrektur auch über diesen B-Zell-Anteil möglich. Zur Erläuterung dient das Beispiel in Abbildung 27, bei dem eine von 100 kernhaltigen Zellen den malignen Phänotyp aufweist (MFC-MRD = 1%). Bei einem B-Zellgehalt von 5% ist somit jede fünfte B-Zelle eine Myelomzelle, die B-Zell-bezogene MRD, wie sie in einer unnormalisierten *IG-library* messbar ist, liegt bei 20%.

Multipliziert man diese Zahl mit dem B-Zell-Anteil von 5%, ergibt dies eine tatsächliche MRD von 1%.

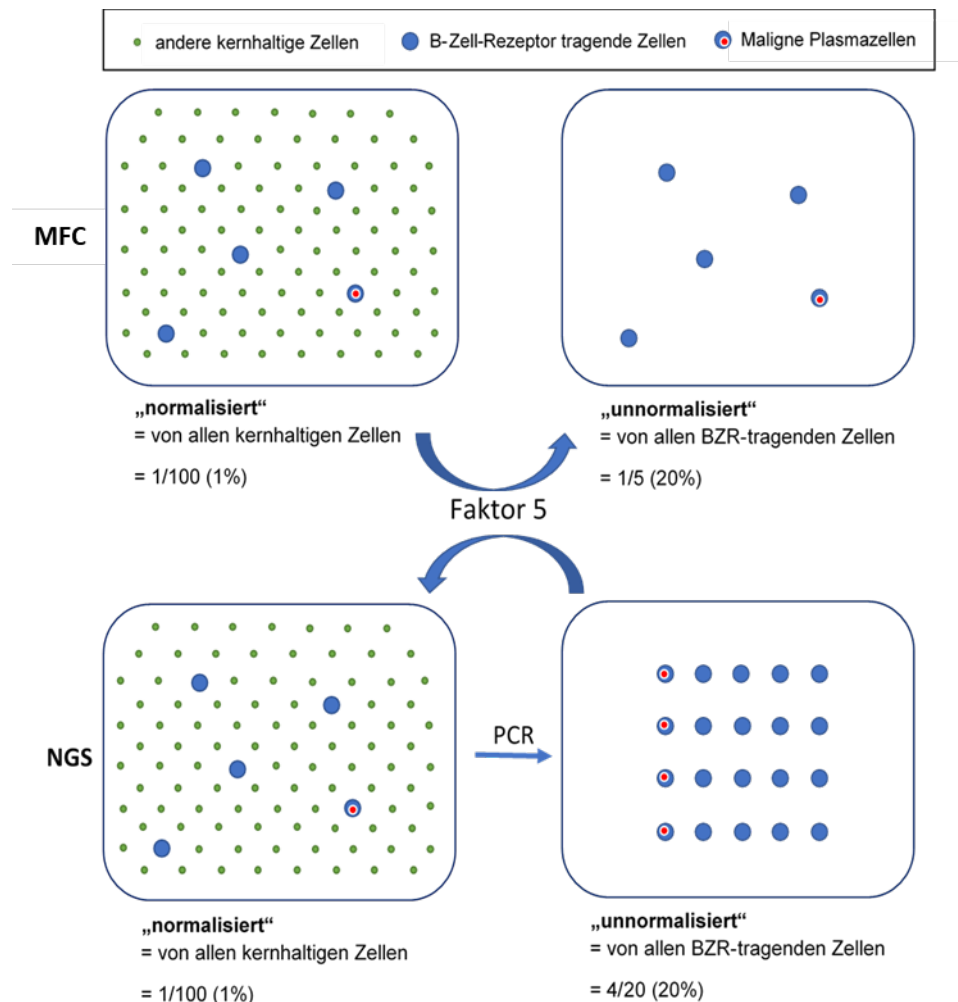


Abb. 27: Schematische Darstellung der Normalisierung mittels B-Zellanteil. Oben: MFC-MRD bezogen auf alle kernhaltigen Zellen („normalisiert“) und bezogen auf ausschließlich Zellen mit B-Zell-Rezeptor (BZR) („unnormalisiert“). Unten: NGS-MRD bezogen auf alle kernhaltigen Zellen („normalisiert“) und bezogen auf ausschließlich Zellen mit BZR („unnormalisiert“).

Da es sich bei den untersuchten Proben um prätherapeutische Screeningproben handelte, machten die malignen Plasmazellen meist den größten Anteil der B-Zellen aus. Die unnormalisierte Infiltration mittels NGS lag im Mittel bei 51,8% (7,6% - 90,9%), mittels MFC machten die malignen Plasmazellen 69,7% (8,9% - 100%) aller B-Zellen aus.

Es erfolgte zusätzlich ein Vergleich von unnormalisierten NGS-Abundanzen mit MFC-Infiltrationswerten, welche sich ausschließlich auf den B-Zellanteil und nicht auf alle kernhaltigen Zellen bezogen (Abbildung 28). Des Weiteren wurden die unnormalisierten NGS-Abundanzen mit dem mittels MFC ermittelten B-Zell-Anteil multipliziert und diese dann mit den durchflusszytometrisch gemessenen Infiltrationswerten verglichen, um den Einfluss der Normalisierung auf den Vergleich der Verfahren zu minimieren (Abbildung 29). Mit dieser Methode zeigte sich die beste Korrelation des über NGS bzw. MFC ermittelten MM-Infiltrationsgrads der Screening-Proben ($R^2 = 0,89$).

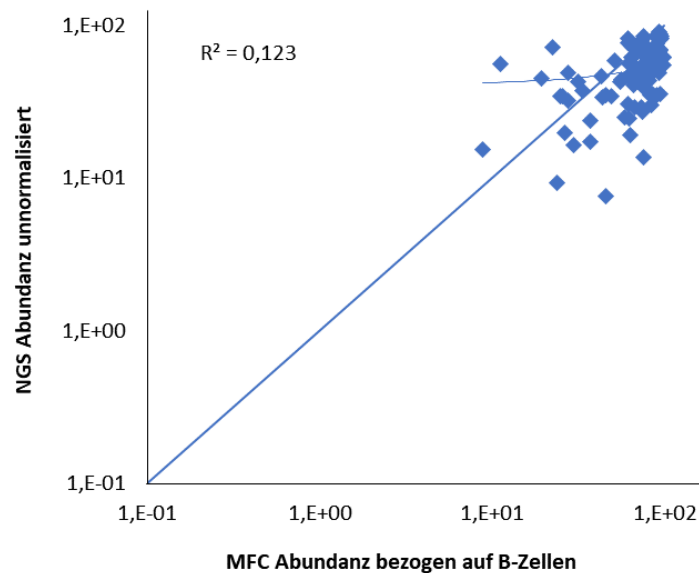


Abb. 28: Korrelation der unnormalisierten NGS-Abundanz (y-Achse) mit der MFC-Abundanz bezogen auf B-Zellen (x-Achse). Dargestellt sind nur Proben, in denen eine Myelompopulation mit beiden Methoden nachgewiesen wurde.

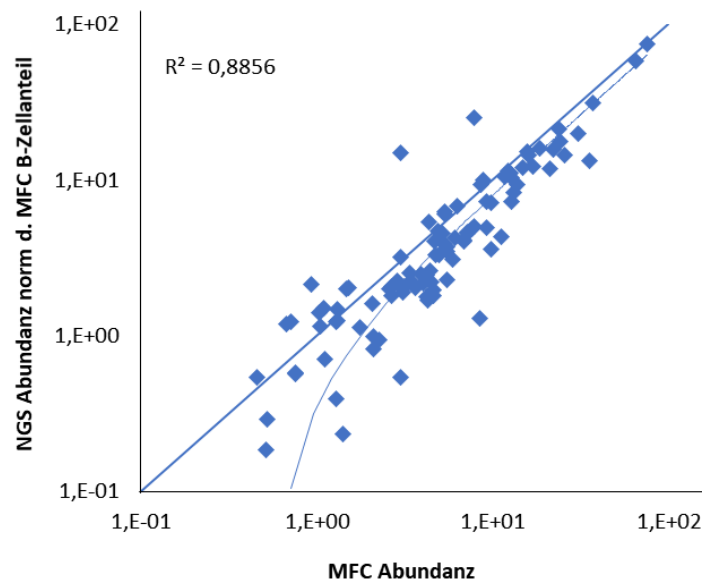


Abb. 29: Korrelation der über die durchflusszytometrische Bestimmung des B-Zell-Anteils normalisierten NGS-Abundanz (y-Achse) mit der MFC-Abundanz (x-Achse). Dargestellt sind nur Proben, in denen eine Myelompopulation mit beiden Methoden nachgewiesen wurde.

3.6 Analyse der Minimalen Resterkrankung (MRD)

3.6.1 MRD Positivität

Analysiert wurden 53 Verlaufsproben von 47 Patienten der Screening-Kohorte (von drei Patienten wurde mehr als eine Verlaufsprobe analysiert). Für die MRD-Analyse wurde jeweils mindestens ein Marker mit hoher Abundanz und möglichst diverser CDR3-Region gewählt. Zusammenfassend wurde bei 16 Patienten ein IGH-VJ-Target, bei 17 Patienten ein IGH-DJ-Target, bei 18 Patienten ein IGK-A- und bei zweien ein IGK-B-Target zur Verlaufsdiagnostik verwendet. In 13 Fällen war in dem für die MRD-Analyse verwendeten PCR-Ansatz mehr als ein klonaler MRD-Marker nachweisbar (siehe Tabelle 5). In diesen Fällen wurde analog zum Vorgehen bei der allelspezifischen RQ-PCR nach EuroMRD-Kriterien der jeweils höhere ermittelte MRD-Wert verwendet.[18]

Insgesamt war bei 48 der 53 (90,6%) analysierten Verlaufsproben MRD mittels NGS nachweisbar.

Tabelle 5: Übersicht der Verwendeten Targets und Anzahl der Marker zur MRD Quantifizierung.

	Anzahl Patienten
Gesamt (n)	47
Targets	
IGH-DJ	17
IGH-FR1	16
IGK-A	18
IGK-B	2
zwei Targets pro Patient	3
weitere Follow-ups (spät. Zeitpunkt)	3
mehrere Marker pro Target	13
zwei Marker	11
drei Marker	2

3.6.2 Vergleich mit durchflusszytometrischen Werten

Die NGS basierten MRD Werte wurden im Folgenden mit den durchflusszytometrischen MRD-Resultaten verglichen. Die Einteilung ist in Tabelle 6 gezeigt. 44 der 53 Proben (83%) wiesen ein qualitativ konkordantes Ergebnis beider Verfahren auf. In neun Proben wurden qualitative Diskrepanzen festgestellt. Zu beachten ist, dass alle diese Fälle NGS-MRD positiv (NGS+) waren, während durchflusszytometrisch keine MRD nachweisbar war (MFC-).

Tabelle 6: Kontingenztafel für die Bestimmung der Konkordanz von NGS-MRD mit MFC-MRD.

	NGS +	NGS -	Gesamt
MFC +	38	0	38
MFC -	9	6	15
Gesamt	47	6	

In einem nächsten Schritt wurde ein zehnfach bzw. fünf- oder zweifach NGS-Ansatz mit 5000 ng (bzw. 2500 ng oder 1000 ng) DNA, entsprechend 750.000 (325.000; 150.000) Zellkorrelaten durchgeführt, um die Sensitivität der Methode zu erhöhen. Eine der sechs der zuvor mit einem Replikat (500 ng DNA) gemessenen NGS-negativen Proben wies im Zehnfachansatz nachweisbare minimale Resterkrankung auf. Damit erhöhte sich die Anzahl der NGS+/MFC- diskrepanten Fälle auf 10. (Tabelle 7)

Tabelle 7: Kontingenztafel zur Bestimmung der Konkordanz zwischen NGS und Durchflusszytometrie nach molekularer Re-Analyse NGS-negativer/MFC-negativer Proben mit erhöhter DNA-Menge.

	NGS +	NGS -	Gesamt
MFC +	38	0	38
MFC -	10	5	15
Gesamt	48	5	

Die unnormalisierte MRD dieser Probe lag bei $0,7 \times 10^{-4}$ (entsprechend 33/486062 reads). Nach Normalisierung betrug die MRD $0,6 \times 10^{-6}$.

3.6.3 Quantifizierung der NGS+/MFC- Proben mittels ddPCR

Um zu überprüfen, welches qualitative Ergebnis bei diskordanten Fällen korrekt war, erfolgte eine Re-Analyse dieser Proben mit einer dritten unabhängigen MRD-Quantifizierungsmethode für lymphatische Neoplasien, der IG-klonspezifischen ddPCR. Sechs der 10 überprüften Proben waren auch mittels ddPCR positiv. In einem Fall wurde mittels ddPCR kein spezifisches Amplifikat nachgewiesen. Für die übrigen drei Proben konnte kein spezifisches ddPCR Assay etabliert werden. Somit wurde in 6/7 auswertbaren Fällen das NGS Ergebnis über ddPCR bestätigt. Im siebten Fall, der in der ddPCR keine MRD zeigte, lag das mittels NGS bestimmte MRD-Niveau bei $0,3 \times 10^{-5}$.

3.6.4 Sensitivitätsgrenzen der Durchflusszytometrie

Um das theoretische Sensitivitätslimit der Durchflusszytometrie in den diskrepanten (NGS+/MFC-) Fällen abschätzen zu können, wurde die Gesamtzahl der durchflusszytometrisch gemessenen Events pro Probe betrachtet. Diese lag zwischen $6,9 \times 10^5$ und $1,4 \times 10^7$ (im Mittel $6,3 \times 10^6$). Da entsprechend der EuroFlow-Vorgaben die Nachweisgrenze auf 20 und die Quantifizierungsgrenze auf 50 atypische Plasmazellen festgelegt ist, entspricht das einer mittleren Nachweisgrenze von $0,8 \times 10^{-5}$ ($0,4 \times 10^{-5}$ - $0,7 \times 10^{-4}$) und einer Grenze der Linearität von $0,3 \times 10^{-5}$ ($0,1 \times 10^{-5}$ - $0,3 \times 10^{-4}$). Tabelle 8 zeigt den Vergleich der normalisierten NGS-MRD im Vergleich mit der theoretischen Sensitivität der MFC, basierend auf den gemessenen Gesamtevents einer jeden Probe. Es zeigte sich, dass ausschließlich eine Probe (01-4291) das theoretische Sensitivitätslimit des MFC unterschritten hat. Bei dieser Probe handelte es sich um die ausschließlich im NGS-Zehnfachansatz MRD positive Probe (vgl. Abschnitt 3.6.2).

Tabelle 8: Normalisierte NGS-MRD und theoretische Sensitivitätsgrenze mittels MFC (basierend auf der Anzahl der gemessenen Gesamtevents).

Patient	Sensitivitätslimit	
	MFC	MRD NGS
01-4035	0,9E-05	0,1E-03
01-4035	0,4E-05	0,6E-04
01-4063	0,3E-05	0,3E-05
01-4179	0,5E-05	0,2E-02
01-4291	0,6E-05	0,6E-06
01-4383	0,2E-04	0,9E-03
06-4234	0,1E-05	0,7E-04
09-4074	0,5E-05	0,2E-02
09-4294	0,1E-05	0,8E-04
11-4288	0,1E-05	0,1E-04

3.6.5 Quantitative Korrelation der mittels NGS, MFC und ddPCR ermittelten MRD-Werte

Mittels NGS lag der normalisierte MRD-Wert der MRD-positiven Proben bei $0,5 \times 10^{-1}$ ($0,6 \times 10^{-6}$ - 0,4). Bei drei der insgesamt 47 analysierten Patienten war die MRD nach Induktionstherapie höher als die mittels NGS gemessene Infiltration zum Zeitpunkt der Diagnose. Mittels FCM wurde im Mittel ein MRD-Niveau von $0,3 \times 10^{-1}$ ($0,2 \times 10^{-4}$ - 0,35) gemessen.

Der Vergleich von NGS und MFC zeigte ebenso wie zum Screeningzeitpunkt bei Verwendung der unnormalisierten NGS-Abundanz systematisch höhere Werte im NGS als im MFC (Abbildung 30A). Die Streuung der Werte nahm aber, anders als zum Screeningzeitpunkt, durch die *spike-in* Normalisierung ab und ergab somit eine bessere Korrelation der Ergebnisse (unnormalisiert: $R^2 = 0,46$, normalisiert: $R^2 = 0,67$). (Abbildung 30B). Zusätzlich sind in Abbildung 30B die Ergebnisse der ddPCR eingetragen, welche bei den qualitativ diskrepanten Fällen durchgeführt wurde. In sechs von sieben untersuchten Proben bestätigte die ddPCR das Ergebnis des NGS.

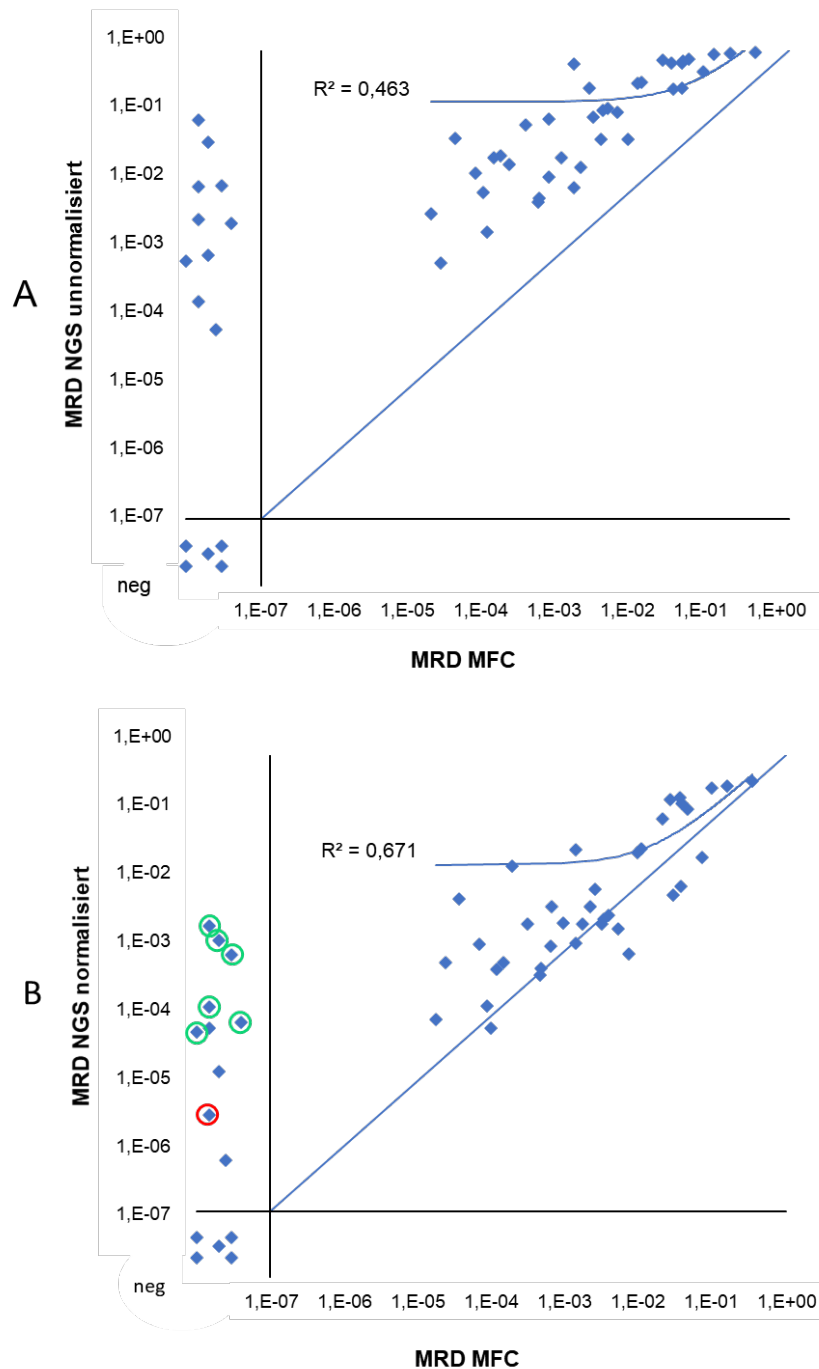


Abb. 30: Korrelation des MRD-Niveaus zwischen MFC und NGS. A: Korrelation von MFC und unnormalisierten NGS-MRD Werten. **B:** Korrelation von MFC und normalisierten NGS-MRD Werten, sowie Darstellung der Ergebnisse der ddPCR (Kreise). Das Vorliegen eines ddPCR positiven Ergebnisses ist durch einen grünen Kreis gekennzeichnet, während ein roter Kreis ein ddPCR negatives Ergebnis anzeigt. Die Proben, bei denen kein ddPCR Assay etabliert werden konnte, sind nicht eingekreist.

3.6.6 Vergleich der Markerabundanz aus der NGS-Sequenzierung bei Analyse von zwei klonalen Markern

Bei 13 Patienten war in dem PCR-Ansatz, der für die MRD-Quantifizierung verwendet wurde, mehr als ein klonaler IG-Marker nachweisbar (siehe Tabelle 5). In diesen Fällen konnten die

mit beiden Markern ermittelten MRD-Niveaus verglichen werden. In 11/13 Fällen war jeweils mit beiden Markern MRD nachweisbar. In einem Fall war mit beiden Markern keine MRD nachweisbar. In einem Fall (Patient 09-4074), führte die Analyse zweier IGH-DJ-Marker (D1-26 3/4/2 J4 und D4-17 /12/9 J6) zu qualitativ unterschiedlichen MRD-Ergebnissen: Während zum Screeningzeitpunkt beide Marker mit hoher normalisierter Abundanz von 17,4% (D1-26 3/4/2 J4) bzw. 12,6% (D4-17 /12/9 J6) nachweisbar waren, war in der untersuchten Verlaufsprobe der D4-17 /12/9 J6 Marker negativ, während der zweite Marker (D1-26 3/4/2 J4) deutlich positiv blieb (9,42% normalisierte Abundanz). Mittels MFC war in der entsprechenden Verlaufsprobe keine MRD nachweisbar. Am ehesten ist in diesem Fall von einer biklonalen Erkrankung mit unterschiedlicher Kinetik beider Klone unter Therapie auszugehen. Passend dazu waren zum Screeningzeitpunkt insgesamt drei klonale IGH-Rearrangements (zwei IGH-DJ- und ein IGH-VDJ) nachweisbar. Durchflusszytoemtrisch konnte die Biklonalität jedoch nicht bewiesen werden. Möglicherweise waren nicht zwei Myelom-Klone nachweisbar, sondern zusätzlich zum Myelom-Klon ein weiterer B-Zell-Klon ohne immunphänotypische Charakteristika maligner Plasmazellen. Solche monoklonalen B-Lymphozyten sind mit dem verwendeten Panel nicht sensitiv zu erfassen.

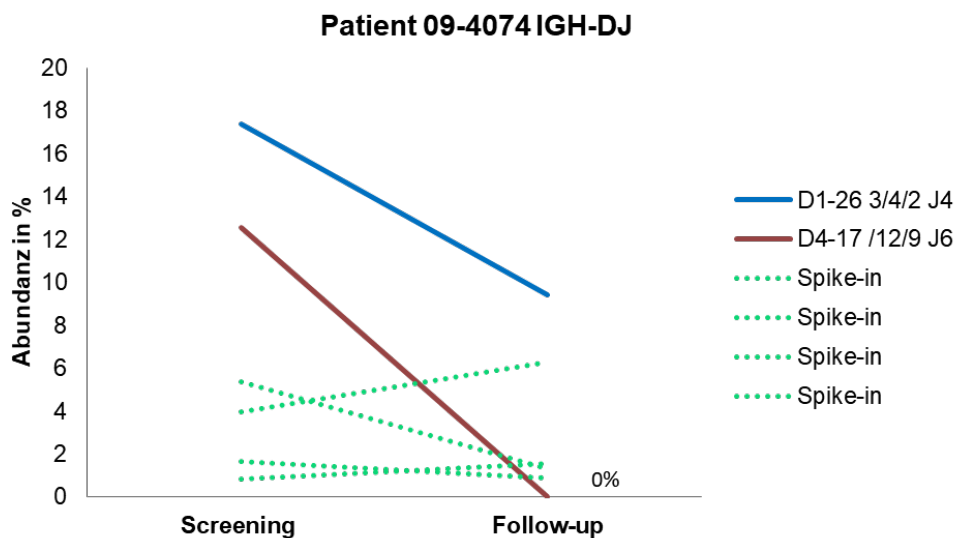


Abb. 31: Patientenbeispiel für diskrepante Markerkinetik innerhalb eines PCR-Ansatzes. Möglicherweise lag in diesem Fall eine biklonale Erkrankung mit unterschiedlicher MRD-Kinetik beider Subklone vor.

3.7 Korrelation MRD und klinisches Ansprechen

3.7.1 Ansprechkategorien

Nach Induktionstherapie wurde das Therapieansprechen entsprechend der *International Myeloma Working Group uniform response criteria for multiple myeloma* beurteilt, welche folgende Kategorien nach absteigender Ansprechtiefe unterscheiden (Kriterien siehe Anhang, Tab. 9):[12]

- sCR (*stringent complete response*, deutsch: strenges komplettes Ansprechen)
- CR (*complete response*, deutsch: komplettes Ansprechen)
- VGPR (*very good partial remission*, deutsch: sehr gute partielle Remission)
- PR (*partial remission*, deutsch: partielles Ansprechen)
- SD (*stable disease*, deutsch: stabile Erkrankung)

Um eine Aussage über den Zusammenhang von MRD und Therapieansprechen treffen zu können, wurden die MRD Werte nach Induktionstherapie innerhalb der Ansprechkategorien verglichen. Insgesamt erreichten nur zwei der 47 Patienten einen sCR, sechs einen CR, 18 eine VGPR, 16 eine PR und fünf eine SD.

Die medianen MRD-Werte lagen bei sCR $0,5 \times 10^{-5}$ ($0 - 0,3 \times 10^{-5}$), CR $0,4 \times 10^{-3}$ ($0 - 0,4 \times 10^{-2}$), VGPR $0,5 \times 10^{-3}$ ($0 - 0,2 \times 10^{-1}$), PR $0,6 \times 10^{-2}$ ($0,5 \times 10^{-4} - 0,22$), SD $0,15$ ($0,5 \times 10^{-2} - 0,34$) (Abb. 32). Auffällig ist, dass auch 2/18 Patienten mit einem schlechteren klinischen Ansprechen (VGPR) MRD-negativ waren. Insgesamt zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen klinischem Ansprechen auf die Therapie und gemessenem MRD-Level.

Die diskrepannten NGS+/MFC- Fälle zum Zeitpunkt nach Induktion (8/47) wurden in der Abbildung entsprechend ihrer Ansprechkategorie als farbige Punkte hinzugefügt. Der diskrepannte Fall in der sCR Kategorie weist ein niedriges MRD-Level mittels NGS auf (3×10^{-4}). Zwei der diskrepannten Fälle wurden klinisch als PR kategorisiert.

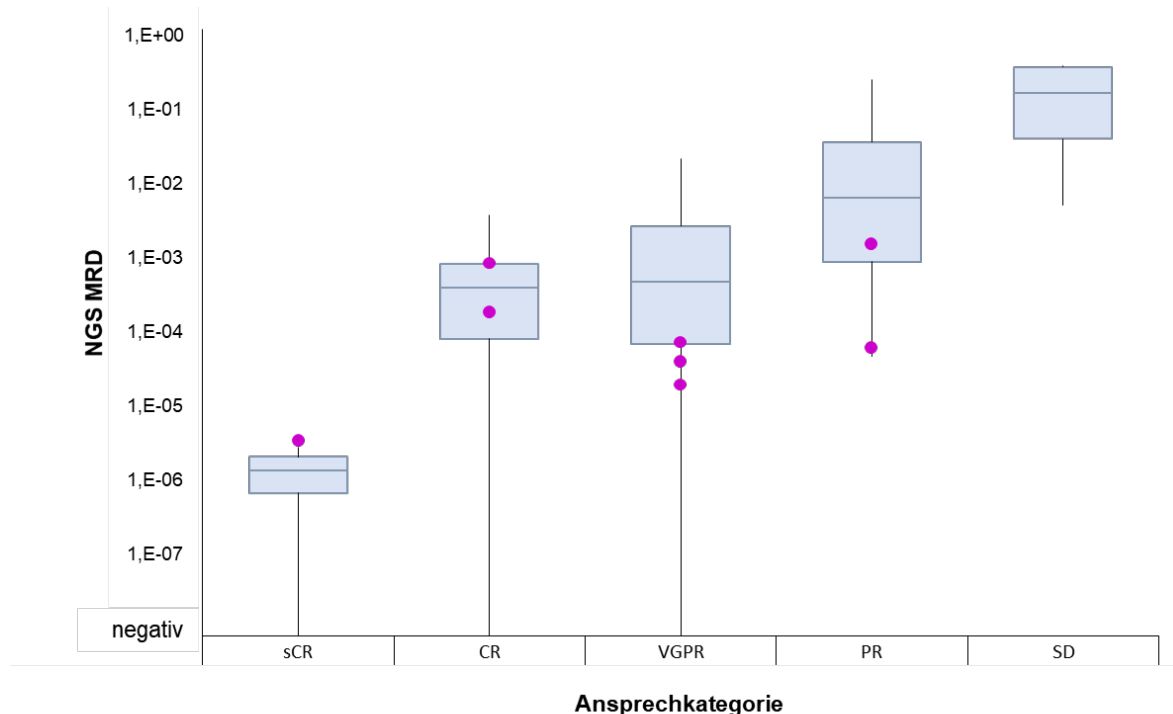


Abb. 32 Korrelation zwischen klinischem Ansprechen und NGS-ermitteltem MRD-Niveau. Gezeigt werden die MRD-Ergebnisse logarithmisch aufgetragen entsprechend der jeweiligen Ansprechkategorie. Die diskrepannten NGS+/MFC- Proben sind als Punkte aufgetragen. Im dargestellten Boxplot-Diagramm visualisiert die Box das erste Quantil, den Median und das dritte Quantil. Die Whiskers (vertikale Linien) reichen bis zum Minimum und Maximum der Werte.

3.7.2. Vergleich der Induktionstherapien RAD und VRD

Von den 47 untersuchten Probanden erhielten 21 das RAD Therapieprotokoll (A). Die anderen 26 erhielten das VRD Protokoll (B). In Abbildung 33 dargestellt sind die MRD-Werte nach Induktionstherapie der beiden Studienarme im Vergleich. Der Median lag in Gruppe A bei $0,3 \times 10^{-2}$ (Mittelwert: $3,4 \times 10^{-2}$). Es wurden MRD-Werte zwischen $0,5 \times 10^{-4}$ und $3,4 \times 10^{-1}$ festgestellt. In Gruppe B lag der Median der MRD bei $0,73 \times 10^{-3}$ (Mittelwert: $3,3 \times 10^{-2}$). Die niedrigste MRD betrug null, die höchste $3,2 \times 10^{-1}$.

Mit dem t-Test wurde kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt ($t = 0,012$; $p = 0,99$). Jedoch fällt auf, dass die vier MRD-negativen Proben ausschließlich in der VRD-Gruppe vorkamen (RAD 0/21, VRD: 4/26 MRD-negative Proben).

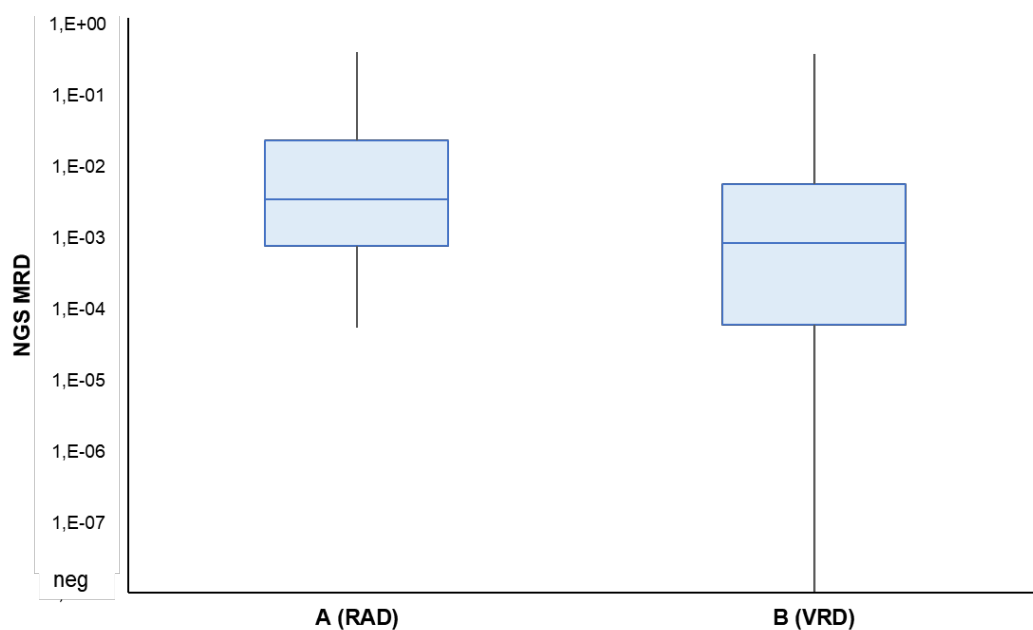


Abb. 33: MRD-Werte der beiden Induktions-Arm RAD (A) und VRD (B) im Vergleich. Im dargestellten Boxplot-Diagramm visualisiert die Box das erste Quantil, den Median und das dritte Quantil. Die Whiskers (vertikale Linien) reichen bis zum Minimum und Maximum der Werte

4 Diskussion

Die Analyse minimaler Resterkrankung gewinnt aufgrund der Verfügbarkeit effektiverer Therapien beim Multiplen Myelom zunehmend an Bedeutung. Neben der Vielfarben-Durchflusszytometrie und der ASO-RQ-PCR, die bereits seit vielen Jahren beim MM zur MRD-Quantifizierung eingesetzt werden, kommt zunehmend auch die ampliconbasierte Hochdurchsatzsequenzierung von Immungenumlagerungen zum Einsatz. Allerdings fehlten bislang multizentrisch validierte IG-NGS-Assays mit frei verfügbaren bioinformatischen Auswertetools. Deshalb formierte sich das EuroClonality-NGS-Netzwerk aus Experten der Bereiche Molekulargenetik, Hämatologie, Immunologie, Hämatopathologie und Bioinformatik, um standardisierte Assays im akademischen Setting zu etablieren und zu validieren. 2019 wurden die ersten ampliconsbasierten IG/TR-NGS-Assays zusammen mit der Auswertesoftware ARResT/Interrogate zunächst für die Anwendung zum Markerscreening bei der ALL und zur Klonalitätsdiagnostik bei lymphoproliferativen Neoplasien publiziert.[30–32] Ziel der vorgelegten Promotion war, die Anwendbarkeit dieser Assays für die Markerdetektion beim MM zu überprüfen und die Assays für eine Analyse minimaler Resterkrankung bei dieser Entität zu optimieren.

Prinzipiell sind bereits Studien zur IG-NGS-basierten MRD-Quantifizierung beim MM publiziert, die sich jedoch weitgehend auf ein Assay beschränken, das zentral kommerziell durchgeführt wird und ursprünglich als *LymphoSIGHT*® Assay der Firma Sequentia, Inc., (San Francisco, CA) und nach dessen Übernahme durch die Firma Adaptive Biotechnologies (Seattle, WA) modifiziert als *clonoSEQ*® Assay angeboten wird. Dezentrale und multizentrische Analysen sind allerdings bisher nicht möglich. Auch die bioinformatische Pipeline ist nicht frei verfügbar, die zugrunde liegenden Algorithmen nicht publiziert.

Die *LymphoSIGHT*® / *clonoSEQ*® Assays nutzen, wie die in der vorgelegten Promotion verwendete Methode, eine Zwei-Schritt-PCR mit Multiplex-Primer-Sets für IGH-VDJ, IGH-DJ und IGK. Mit Hilfe der *LymphoSIGHT*® Plattform konnten Ladetto *et al.* 2013 in acht von 10 (80%) MM-Proben einen klonalen IG-Marker zur MRD-Bestimmung detektieren.[28] Martinez-Lopez und Kollegen wiesen mit der *LymphoSIGHT*® Plattform in 121 von 133 (91%) Patienten einen geeigneten Marker nach.[44] Ebenfalls unter der Verwendung der *LymphoSIGHT*® Plattform, lag die Marker-Detektionsrate bei Korde *et al.* bei 91% (n = 34).[45] Takamatsu *et al.* konnten mit Hilfe der *clonoSEQ*® Plattform in 113 von 125 (90%) MM-Fällen einen Marker zur MRD-Diagnostik identifizieren.[29]

Die in dieser Arbeit erzielte Markeridentifikationsrate von 95% lag etwas höher als die der zuvor aufgeführten Arbeiten. Als potentielle Einflussgröße ist die Vorauswahl der Proben zu beachten, da ausschließlich Knochenmarkaspirate mit einem durchflusszytometrisch bestimmten Tumordinfiltrationsgrad von mindestens 0,1% eingeschlossen wurden. Eine

Anreicherung des diagnostischen Materials mittels CD138+ wurde im Gegensatz zu Korde *et al.* in dieser Arbeit nicht durchgeführt.[45]

Übereinstimmend mit Martinez-Lopez *et al.* wiesen mit dem EuroClonality-NGS-Assay die meisten Patienten ein klonales IGH-VDJ-Rearrangement auf (Martinez-Lopez: 69% (84/121), EuroClonality-NGS: 79,6% (82/103)), seltener ein klonales IGK-Rearrangement (Martinez-Lopez: 55% (66/121), EuroClonality-NGS: 59,2% (61/103)) und der geringste Anteil von Patienten ein klonales IGH-DJ-Rearrangement auf (Martinez-Lopez: 48% (58/121), EuroClonality NGS: 53,3% (55/103)).[44]

In der DSMM-Kohorte waren bei Vorliegen einer IGK-Klonalität durchschnittlich mehr Marker pro Patient nachweisbar als bei IGH-Klonalität (1,6 IGH versus 1,9 IGK). Die hier verwendete IGK-Multiplex-PCR amplifiziert neben V_k - J_k -Rearrangements auch Kde-Rearrangements. Diese können in Form von V_k -Kde-, oder als intron-RSS-Kde-Rearrangement vorliegen, welche zwischen den J_k - und C_k -Segmenten liegen (siehe auch Abbildung 9). Bei gleichzeitigem Vorhandensein von V_k - J_k - und Kde-Rearrangements können somit in der gleichen Zelle bis zu vier unterschiedliche Rearrangements detektiert werden. Im Gegensatz dazu können bei IGH-VJ nur maximal zwei Rearrangements pro Zelle auftreten.[46]

Zusätzlich ist der IGK-Genloкус weniger häufig von somatischer Hypermutation betroffen und wird deshalb bei reifen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen besser mittels Multiplex-PCR Assays amplifiziert.[47]

Die Verteilung der V-, D- und J-Segmente beim MM zeigte in dieser Kohorte eine ähnliche Verteilung wie bei vergleichbaren Studien.

Die Verteilung der V_H - und V_K -Gen-Familien beim MM zeigte im Vergleich mit González *et al.* und Hadzidimitriou *et al.* eine gute Übereinstimmung.[7,48] Auch ein Vergleich der Verteilung von D_H - und J_H -Segmenten mit Ferrero *et al.* zeigten sich vergleichbare Ergebnisse.[49]

Dies ist ein guter Indikator für die Repräsentativität der in dieser Arbeit erhobenen Daten.

Ein elementarer Faktor der Markeridentifikation ist der Grenzwert (Mindestabundanz der Klonotypen), welcher der Marker-Definition zugrunde liegt. In Studien zur Markeridentifikation bei der ALL wurde meist ein Grenzwert von 5% angewandt, welche ein Rearrangement ausweisen musste, um als klonaler Marker zu gelten.[30,50,51] Vergleichbare Studien beim MM wählten ebenfalls einen 5%-Grenzwert.[44,52] In anderen Arbeiten wurde zusätzlich der Abstand zu den nächst kleineren Klonen genutzt, um einen Marker eindeutig vom Hintergrund zu separieren. Dabei wurde als Gütekriterium mindestens eine um den Faktor 2.7 höhere Abundanz vorausgesetzt.[53]

Die Frage nach einem geeigneten Grenzwert, ab welchem ein Rearrangement als Marker zählt, ist nicht abschließend beantwortet. Besonders bei Proben mit niedriger Infiltration (< 5%) kann ein zu hoher Grenzwert (z.B. von > 5%) zur mangelhaften Markeridentifikation führen. Die durchflusszytometrisch gemessene Infiltrationsrate lag in dieser Kohorte bei durchschnittlich 8,9 % bei Primärdiagnose. Mehr als die Hälfte der Proben (51%) wies eine Infiltration von unter 5%, 75,5% eine Infiltration von unter 10% auf. Die Auswertung unter Anwendung eines Grenzwerts von 5% normalisierter NGS-Abundanz zeigte eine Markeridentifikationsrate von nur 78,6% gegenüber dem für die finalen Auswertungen verwendeten Algorithmus des Vergleichs mit den *spike-in* Abundanzen, mit dem in 95% der Fälle mindestens ein klonaler Marker identifiziert werden konnte. Insgesamt wurden mit einem 5%-Grenzwert statt 265 nur noch 161 Marker detektiert. Dies zeigt, dass ein fester 5%-Grenzwert für Patienten mit einem MM nicht zur Markeridentifikation geeignet ist, da die Infiltration der diagnostischen Proben dafür im Durchschnitt zu niedrig ist.

Dieses Problem könnte durch eine CD138+ Anreicherung des diagnostischen Materials reduziert werden. Die Expression von CD138 nimmt mit der Reifung der B-Zelle hin zur Plasmazelle zu. Aus diesem Grund dient CD138 als hochsensitiver- und spezifischer Marker für gesunde und neoplastische Plasmazellen.[54] Antikörperbasierte Verfahren, v.a. magnetische Zellseparationen führen zu einer signifikanten Anreicherung der Plasmazellen im Ausgangsmaterial. Durch Anwendung dieser Methode zeigte sich in einer Studie einen Anstieg der Markeridentifikationsrate von 60% auf 96%.[55] In der vorgelegten Arbeit war eine solche Anreicherung jedoch nicht mehr möglich, da als Ausgangsmaterial Zellpellets und keine vitalen Zellen zur Verfügung standen.

Auf der anderen Seite kann ein zu niedriger Grenzwert (z.B. $\geq 1\%$ unnormalisierter Abundanz) dazu führen, dass unspezifische, nicht Malignom-repräsentierende Klonotypen, die begleitenden B-Zell-Klonen entsprechen, zur MRD-Diagnostik verwendet werden und zu falschen MRD-Resultaten führen. Insbesondere im höheren Lebensalter werden solche B-Zell-Klone undeterminierter Signifikanz als sogenannte monoklonale B-Zell-Lymphozytose beobachtet. Die monoklonale B-Zell-Lymphozytose ist definiert durch eine über drei Monate nachweisbare, klonale B-Zellpopulation im peripheren Blut, welche weniger als 5×10^9 Zellen pro Liter beträgt. Es liegt der durchflusszytometrische Phänotyp einer chronisch lymphatischen Leukämie vor, ohne dass jedoch eine extramedulläre Lymphom-Manifestation vorliegt.[56] Die Prävalenz ist abhängig von der Sensitivität der MFC-Methode und beträgt bei gesunden, über 40 Jahre alten Patienten zwischen 3,5 und 12%, bei über 80jährigen kann die Prävalenz über 50% betragen.[57] Bei diesen Patienten kann ein zu niedriger Grenzwert ebenfalls zur Fehlzuordnung eines MRD-Markers führen.

Die *spike-in* Methode zur Markeridentifikation, wie sie in dieser Arbeit angewandt wurde, ist kritisch zu hinterfragen, da niedrig abundante Klone damit übersehen werden können.

Allerdings zeigte die gute Korrelation der NGS-MRD-Werte mit den durchflusszytometrischen MRD-Messungen die gute Spezifität dieser Methode. Allerdings scheint eine integrierte Beurteilung unter Berücksichtigung zusätzlicher Faktoren sinnvoll. Hier ist die Kenntnis des Infiltrationsgrads der diagnostischen Probe zu nennen, aber auch der Vergleich der Markerabundanzen in unterschiedlichen Tubes bzw. der Abstand der Abundanzen der verschiedenen Klonotypen innerhalb eines Tubes. Derzeit werden im Rahmen des EuroClonality-NGS-Konsortiums Algorithmen entwickelt, um eine solche integrierte Beurteilung der IG-NGS-Ergebnisse zu ermöglichen.

Ein weiterer Einflussfaktor der Markeridentifikation ist die somatische Hypermutation. Wie bereits beschrieben, hat die SHM einen signifikanten Einfluss auf die Anwendbarkeit der ASO-RQ-PCR. Doch auch beim IG-Amplicon-NGS können Mutationen in den Primer-Bindungsstellen dazu führen, dass das entsprechende Rearrangement nicht amplifiziert wird. Im Falle des MM liegt die Homologie zur Keimbahnsequenz, einem Maß für SHM, im Mittel bei 92,2% (IGH) und 93,9% (IGK).[48] Dahingegen zeigte sich, dass IGH-DJ-Rearrangements zum Teil keine oder nur eine geringgradige SHM aufweisen. Die Homologie zur Keimbahnsequenz beträgt im Mittel 98%.[36] Jedoch ist zu beachten, dass der Prozess der SHM besonders in den hypervariablen Bereichen der Gensegmente auftritt und weniger in den konservierten *framework regions*, in welchen die Primer binden.[58] Um die Rate erfolgreicher Markeridentifikationen kompletter IGH-Rearrangements zu erhöhen, wurden in der vorgelegten Arbeit Assays für die FR1-, FR2- und auch FR3-Regionen verwendet, die prinzipiell identische Rearrangements amplifizieren (siehe Abbildung 8), sodass trotz SHM die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass zumindest einer der Primer-Sets in einem unmutierten Bereich bindet.

In Kapitel 3.2.6 wurde die Übereinstimmung der mittels der FR1-, FR2- und FR3-Primer-Sets detektierten Klonotypen miteinander verglichen. Die größte Abweichung zeigte das FR3-Primer-Set. Als potentielle Ursachen kommen sowohl eine mangelnde Performance des Primer-Sets, als auch eine erhöhte Frequenz an SHM in der FR3-Region infrage. Der von Arcila *et al.* durchgeführte Vergleich der *LymphoTrack*® FR1-, FR2- und FR3-Primer-Sets (Invivoscribe Inc., San Diego, CA) mit einer Klonalitätsdiagnostik mittels Fluoreszenz-Multiplex-IG-PCR unter Verwendung der BIOMED-2 Primer und anschließender Fragmentlängenanalyse zeigte für das FR3-Primer-Set die geringste Übereinstimmung (Konkordanz FR1 97% (91/94), FR2 94% (29/31), FR3 90% (28/31)).[59] Eine weitere Studie, welche ebenfalls mit den *LymphoTrack*® FR1-, FR2- und FR3-Primer-Sets durchgeführt wurde, zeigte eine ähnliche Verteilung, bei allerdings insgesamt geringerer Übereinstimmung: FR1 (83.2%), FR2 (79.2%) und FR3 (62.4%).[60]

Ein ähnliches Phänomen wie die SHM sind die mit somatischer Hypermutation assoziierten Insertionen und Deletionen (SHA). Im Gegensatz zur SHM, welche durch Punktmutation einzelne Basen verändert, werden bei der SHA größere Fragmente entfernt (Deletion) oder eingefügt (Insertion). Diese sind zwar relativ selten (1,3 - 6,5% gesunder zirkulierender B-Zellen), doch zeigte sich eine erhöhte Frequenz in B-Zell Malignomen. In einer Untersuchung an B-Zellen gesunder Probanden fand sich eine Anhäufung von SHA in der FR3.[61] Dieses könnte ähnlich der SHM das Binden der Primer beeinflussen und einen Grund für die Unteramplifikation des FR3-Primer-Sets darstellen.

Neben der SHM und SHA könnte ein weiterer Grund die unterschiedlichen Längen der Fragmente sein, welche bei der Amplifikation mit den unterschiedlichen Tube-Sets entstehen. Die FR3-Sequenzen, genauer deren V-Genabschnitt, sind am kürzesten. Dies kann dazu führen, dass die Annotation des V-Segments nicht zuverlässig durchgeführt werden kann. Da in dieser Arbeit aber nur die N-D-N-Region untersucht wurde, sollte die unterschiedliche Annotation und ggf. Segmentation des Klonotyps kein Problem darstellen. Abschließend betrachtet hätte das Nichtverwenden des FR3-Primer-Sets nicht zu einer Verschlechterung der Markeridentifikationsrate geführt.

MRD-Quantifizierung mittels Amplicon-NGS

Im Vergleich zur Durchflusszytometrie zeigt das NGS in dieser Arbeit eine höhere Positivrate und damit potentiell höhere Sensitivität. Ebenso wie bei anderen Verfahren ist die Sensitivität der Methode limitiert durch die Anzahl der analysierten Zellkorrelate. Um die in der Literatur angegebene potenzielle Sensitivität des NGS von 1×10^{-6} erreichen zu können, wird eine Analyse von mindestens 1.000.000 Zellen vorausgesetzt.[24,26,27] Die Verfügbarkeit der hierzu benötigten DNA-Menge von über 6500 ng einer jeden Probe stellt eine potentielle Limitation der Methode dar. In dieser Arbeit wurden je nach Verfügbarkeit des Materials maximal 750.000 Zellen untersucht, die damit erzielte maximale Sensitivität lag damit unter der theoretischen Sensitivität von 1×10^{-6} .

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Sensitivität einer Methode ist der Grenzwert, welcher MRD-Positivität definiert. Um als MRD-positiv zu gelten, müssen beim NGF gemäß der EuroFlow-Empfehlungen mindestens 20 Events mit aberrantem Immunphänotyp, für eine MRD-Quantifizierung mindestens 50 Events in einer Probe nachgewiesen werden.[17] Im Falle der RQ-PCR liegt die Grenze der Quantifizierbarkeit in der Regel bei 1×10^{-4} . Proben mit einer nachweisbaren MRD unterhalb dieses Grenzwerts werden als positiv unterhalb des quantitativen Messbereichs definiert.[18] Beim NGS gibt es zurzeit noch keinen klaren Konsensus zur Definition der MRD-Positivität bzw. der Quantifizierbarkeit einer Probe. *LymphoSIGHT*® und *LymphoTrack*® Assays wenden einen Grenzwert von zwei bzw. fünf identischen *reads* für die Definition der MRD-Positivität an.[52] Es ist jedoch zu beachten, dass

die Anzahl positiver *reads* stark abhängig ist von der Sequenziertiefe und dem B-Zell-Anteil einer Probe. Aus diesem Grund kann als Grenzwert das Vorliegen einer Zellkopie (nach Normalisierung) in der untersuchten Probe diskutiert werden. Hierbei sollte jedoch das Verhalten von *spike-ins* in unterschiedlich infiltrierten Proben und die daraus resultierende Einschränkung der absoluten Quantifizierung mit betrachtet werden.

In einer der analysierten MRD Proben zeigte sich bei Verfolgung mehrerer Marker nicht nur ein Unterschied des quantitativen MRD-Niveaus, sondern auch der MRD-Nachweisbarkeit. Möglicherweise repräsentierten in diesem Fall beide Marker unterschiedliche Klone, da im Falle eines biallelischen IGH-Rearrangements beim Myelom eines der beiden IGH-Rearrangements einem kompletten IGH-VJ entsprechen muss, welches auch in diesem Fall in der Screening-Probe zusätzlich zu den beiden IGH-DJ-Rearrangements nachweisbar war, so dass der Nachweis zweier inkompletter IGH-Rearrangements ein deutlicher Indikator einer Biklonalität ist. Ca. 2% aller Myelome sind biklonal.[7] Dieses Beispiel zeigt, dass bei deren Auswahl der Marker auch das Rearrangement-Profil berücksichtigt werden sollte und bei Hinweisen auf eine Biklonalität der Erkrankung mehrere klonale Marker untersucht werden sollten.

Spike-in: Normalisierung und zentrale *in-Tube*-Kontrollen

Trotz der vielen Vorteile, welche das NGS gegenüber der ASO-RQ-PCR aufweist, gibt es Herausforderungen, welche noch nicht abschließend gelöst sind. So stellt die Notwendigkeit einer post-PCR Quantifizierung einen Rückschritt gegenüber RQ-PCR basierten Verfahren dar. Das im Rahmen der Promotion verwendete Verfahren der *spike-in* Normalisierung wird in Kapitel 2.2.10 beschrieben. Es zeigte besonders bei der Quantifizierung der diagnostischen Proben relativ schlechte Ergebnisse (vgl. Kapitel 3.4). Auch andere vergleichende Untersuchungen bei anderen Entitäten zeigten trotz Verwendung von *spike-in* Korrekturen z.T. nur mäßige Korrelationen der Ergebnisse. So zeigte der Vergleich der MRD-Niveaus zwischen *ImmunoSEQ*® NGS und 6-Farbendurchflusszytometrie bei der ALL im Kindesalter nur eine mäßige quantitative Korrelation der Methoden ($R^2 = 0,53$).[62]

Ein Grund dafür könnte das Verhalten der *spike-ins* in der PCR sein. Bei einem hohen Anteil an monoklonalen Zellen können diese die Amplifikation der *spike-ins* supprimieren (sog. Amplifikations-Bias). Auf der anderen Seite kann im Falle einer sehr niedrigen Infiltration, wie bei manchen MRD Verlaufspuben, das gegenteilige Phänomen eintreten. Eine Überamplifikation der *spike-ins* durch Mangel an amplifizierbaren Rearrangements in der Probe kann zu falsch niedrigen normalisierten Werten führen. Daraus resultiert die wichtige Frage der richtigen Anzahl von eingesetzten *spike-in* Kopien, um ein optimales Verhalten in der PCR zu erzeugen. In einer Studie von Medina *et al.* wurden unter Verwendung des

LymphoTrack® Assays 1000 Kopien einer *spike-in* DNA verwendet.[63] Yao *et al.* zeigten, dass die Anzahl der *spike-in* Kopien jedoch auch nicht zu niedrig sein dürfen. Untersucht wurden Konzentrationen von 5×10^{-5} und 1×10^{-4} entsprechend 10 und 20 Kopien eines Plasmids in einem Dreifachansatz. Im Vergleich zeigte die Verwendung von 20 Kopien eine geringere Varianz innerhalb der Mehrfachansätze.[52] Die in dieser Arbeit verwendete Anzahl von 40 *spike-in* Kopien zeigte im MRD-Ansatz bessere Ergebnisse als bei primärdiagnostischen Proben und illustriert damit die Schwierigkeit, eine optimalen *spike-in* Menge über mehrere MRD log-Stufen zu definieren.

Weiterhin wurde die *spike-in* Normalisierung in dieser Arbeit anders als in der zwischenzeitlich publizierten Studie des EuroClonality-NGS-Konsortiums durchgeführt, die zum Zeitpunkt der Durchführung der Promotionsarbeit noch nicht vorlag.[32] Zum einen wurden ausschließlich die drei am besten performenden *spike-ins* zur Normalisierung verwendet. Zum anderen erfolgte die Quantifizierung der *spike-in reads* manuell. Mittlerweile bietet Arrest/Interrogate eine automatisierte Quantifizierung über die *spike-in reads*.

Alternativ zu der *spike-in* Normalisierung gibt es weitere, vielversprechende Quantifizierungstools, wie die sog. *unique molecular identifiers* (UMI), auch *molecular barcodes* (MBC) genannt. Dabei handelt es sich um kurze DNA-Fragmente, welche an die Patienten-Sequenzen angefügt werden. Die Sequenz des UMI-Fragmentes ist so einzigartig, dass sie theoretisch in der *library* nur einmal vorkommt. Im Anschluss an die nachfolgenden PCR Schritte und die Sequenzierung kann somit unterschieden werden, ob die Kopien einer Sequenz durch Amplifikation in der PCR entstanden sind (gleiches UMI), oder bereits als biologische Klonalität in der Probe vorlagen (unterschiedliche UMIs). Mit der Anzahl der unterschiedlichen UMIs an dem gleichen Rearrangement kann eine Quantifizierung durchgeführt werden.[64] Bisher gibt es für die Analyse von IG-/TR-Rearrangements allerdings noch keine publizierten Assays.

Eine weiteres potentiell zukünftiges Quantifizierungstool ist die Kombination von Mikrofluidik und NGS, an der derzeit im Rahmen eines europäischen Konsortialprojekts gearbeitet wird. Hierbei wird die zu analysierende Probe in bis zu Millionen von Kompartimenten, den *droplets*, separiert. In diesen finden dann die weiteren Amplifikationsschritte statt. Die Verteilung der Sequenzen in die *droplets* wird durch die Poisson-Verteilung beschrieben, sodass eine absolute Quantifizierung ermöglicht wird.[65]

NGS und durchflusszytometrische MRD-Diagnostik

Die Gesamtübereinstimmung der Methoden NGS und MFC lag in der vorgelegten Arbeit bei 81,3% (95%-KI: 68,7 - 89,4%). Die positive Übereinstimmung lag bei 100% (95%-KI: 90,8 - 100%), während die Negativübereinstimmung nur 33,3% (95%-KI: 15,2 - 58,3%) betrug. Ein möglicher Grund für die höhere Sensitivität des NGS könnte

sein, dass, wie oben beschrieben, MFC ein Cluster von positiven Events benötigt, um MRD-Positivität zu definieren, während im NGS eine einzelne spezifische Sequenz als Indikator einer MRD-Positivität gewertet werden kann. Des Weiteren wird für das NGS die DNA aller kernhaltigen Zellen, also auch avitaler, analysiert. Beim MFC hingegen wird Debris von der Analyse ausgeschlossen, da bei avitalen Zellen bzw. Zellfragmenten oftmals eine unspezifische Antikörperbindung erfolgt und somit eine korrekte Zuordnung der Events in definierte Zellpopulationen nicht mehr möglich ist. Die Tatsache, dass MFC-Analysen frische Proben (Transportzeit maximal 48 Stunden) benötigen, stellt einen erheblichen Nachteil der MFC gegenüber NGS-Analysen dar.[25]

Weiterhin muss erwähnt werden, dass auf die in dieser Arbeit zurückgegriffenen durchflusszytometrischen Werte nicht vollständig den aktuellen Standards des EuroFlow-NGF entsprachen.[17] Da es sich bei der Auswertung um prospektive Messungen in der Etablierungsphase der EuroFlow-NGF Standards handelte, war die in der EuroFlow-Publikation geforderte Anzahl von $> 1 \times 10^7$ zu analysierenden Events nicht immer gegeben (vgl. Kapitel 3.6.4). Somit ist ein vollständiger Vergleich zwischen NGS und EuroFlow-NGF im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Eine durchflusszytometrische retrospektive Re-Analyse der diskrepanten NGS+/MFC- Fälle konnte in 7/10 Fällen doch ein sehr geringes Level an MRD nachweisen. Diese betrug im Mittel $1,6 \times 10^{-5}$ ($0 - 6,1 \times 10^{-5}$). In drei Fällen zeigte sich auch trotz Reanalyse ein diskrepantes Ergebnis (NGS+/MFC-).

Im Vergleich mit NGS weist MFC jedoch auch Vorteile auf. So ist der Zeitaufwand der Untersuchung deutlich geringer. Während NGS MRD-Diagnostik ca. eine Woche benötigt, stehen durchflusszytometrische Ergebnisse innerhalb weniger Stunden zur Verfügung. Zudem ist die Anwendbarkeit der MFC mit 95-99% der des NGS überlegen.[66,67] Ein weiterer Vorteil ist, dass das Vorliegen einer diagnostischen Probe für die Durchflusszytometrie zum Vergleich des Phänotyps günstig, aber nicht wie beim NGS zwingend erforderlich ist. Auch bietet die MFC gegenüber dem NGS Zusatzinformationen. So kann (IGH/IGK-)NGS ausschließlich Informationen über B-Zell-Rezeptortragende Zellen geben, während MFC die Zusammensetzung einer Probe unter Berücksichtigung aller Zellreihen analysiert.

Klinische Relevanz

Der Vergleich des molekularen Ansprechens mittels NGS zwischen den beiden Studienarmen (RAD und VRD) zeigte, dass die mittlere MRD im Studienarm VRD etwas niedriger lag. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht festgestellt werden. Es fiel jedoch auf, dass MRD-Negativität ausschließlich in der VRD-Gruppe nachgewiesen wurde. Besonders da die Rate an MRD-Negativität generell nur sehr gering ist (9,4%), kann dies ein Hinweis auf ein besseres Ansprechen auf diese Therapie sein. Generell ist zu beachten, dass die hier

untersuchte Stichprobe sehr klein war (n = 47). Auch ist es möglich, dass signifikante Unterschiede zwischen den Studienarmen erst zu späteren Therapiezeitpunkten auftreten.

Die vergleichende Analyse des klinischen und des molekularen Ansprechens zeigte eine gute Korrelation. Zwei Fälle waren NGS negativ, obwohl zum Untersuchungszeitpunkt klinisch keine vollständige Remission vorlag.

Die mittels MFC gemessene MRD dieser beiden Proben war ebenfalls negativ, sodass davon auszugehen ist, dass in der Knochenmarkprobe tatsächlich keine messbare MRD oberhalb der Nachweisgrenze der Methoden vorhanden war.

Deshalb kommt als Ursache für die Diskrepanz zwischen molekularem und klinischem Ansprechen eher die Heterogenität der Erkrankung in Frage. Das MM weist eine lokale und zeitliche Heterogenität auf, die dazu führt, dass sich klonale Subfraktionen mit unterschiedlichen genetischen Aberrationen in verschiedenen Bereichen des Körpers entwickeln. Diese können innerhalb, aber auch außerhalb des KM liegen.[67] Extramedulläre Manifestationen sind durch das hier verwendete Verfahren nicht erreichbar. Zudem stellt das MM eine sog. *patchy disease* (engl. für: fleckförmige Erkrankung) dar.[68] Dies bedeutet, dass auch bei intramedullärer Manifestation das Risiko besteht, dass die Knochenmarkaspiration aus einem Bereich entnommen wird, in dem keine Tumorzellen vorhanden sind.

Eine weitere Ursache für falsch negative KM Proben stellt die Hämodilution, die Verdünnung der KM Probe durch während der Aspiration ins Knochenmark einlaufendes Blut dar. Diese kann zu falsch niedrigen MRD-Werten führen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist die Evaluation der Hämodilution einer Probe durch Untersuchung von Zellfraktionen, die im KM, aber nicht im Blut vorkommen, möglich. So wird nach EuroFlow-Standard eine KM-Probe mit einem Mastzellanteil unter 0,01% als Blut-verdünnt betrachtet.[69] Beim NGS gibt es keine Möglichkeit, eine Aussage zur Hämodilution zu treffen.

Eine Möglichkeit, extramedulläre Erkrankung zu evaluieren, sind bildgebende Verfahren. Die neuen Diagnosekriterien der IMWG berücksichtigen unter anderem die Magnetresonanztomographie und Computertomographie (CT) als bildgebende Verfahren zur Detektion fokaler Erkrankung. Ein entscheidender Vorteil gegenüber der reinen KM-Diagnostik liegt darin, dass die Ganzkörperbildgebung beim Nachweis fokaler intra- als auch extramedullärer Ausbreitung repräsentativer ist.[70]

Insbesondere in Kombination mit dem ¹⁸F Fluorodeoxyglukose (FDG)-PET, einem Marker für die metabolische Aktivität des Tumors, weist das CT eine verbesserte Sensitivität auf.[70,71] In einem Vergleich von (8-Farben)-MFC und PET-CT zur MRD-Diagnostik zeigte sich eine gute Korrelation, 94% der Fälle waren übereinstimmend (80% doppelt positiv, 14% doppelt negativ), während jedoch 6% PET-CT-negativ und MFC-positiv waren.[72]

Eine andere Möglichkeit der Evaluation extramedullärer Erkrankungen ist die MRD Diagnostik an zellfreier DNA. Zellfreie DNA (cfDNA) sind kurze, ca. 166 Basenpaar-lange Fragmente, welche durch apoptotische Tumorzellen in den Blutkreislauf abgegeben werden.[68] Im Vergleich mit anderen Tumorerkrankungen zeigte sich beim MM eine besonders hohe Konzentration von cfDNA im Blut, sodass diese sich besonders zur MRD Bestimmung eignet.[73] Oberle *et al.* konnten bei 23 von 27 (85%) Patienten einen geeigneten Marker detektieren (BIOMED2-FR1/-FR3 (IGH), (IGK) oder (IGL) Primer-Sets). Anschließend erfolgte die Untersuchung des peripheren Blutes, indem sowohl genomische DNA aus dem zellulären Kompartiment (zirkulierende Tumorzellen), als auch cfDNA aus dem Plasma isoliert wurden. Es zeigte sich, dass Positivität von zirkulierenden Tumorzellen zwar mit dem Vorhandensein zellfreier DNA assoziiert war ($p = 0,042$), jedoch in 30% der Fälle kein übereinstimmendes Ergebnis vorgestellt werden konnte. Dies wurde als Hinweis darauf gewertet, dass cfDNA nicht nur durch zirkulierende Tumorzellen gebildet wird, sondern die Gesamttumormasse widerspiegelt.[74] In einer Pilotstudie von Biancon *et al.* gelang eine Markeridentifikation in 22 von 25 Patienten (88%) aus KM-Proben. Verlaufsproben, gewonnen aus peripherem Blut aller 22 Patienten, wurden anschließend auf cfDNA der spezifischen Rearrangements untersucht. In 22/22 (100%) konnte MRD detektiert werden. Anschließend wurden die Proben ebenfalls mit MFC auf MRD untersucht. Dort zeigten sich 6/22 (27%) der Proben MRD-negativ (Korrelation: $r = 0.5831$, $R^2 = 0,34$). Alle sechs MFC-negativen Proben zeigten in der cfDNA eine sehr geringe MRD ($< 10^{-5}$). Weiterhin wurde die Gesamtheit aller Rearrangement im KM und in der cfDNA miteinander verglichen. Es konnten nur 11% der Rearrangements im KM und cfDNA nachgewiesen werden. 62,6% davon waren nur in der cfDNA und 26,3% nur im KM nachweisbar.[75] Dies zeigt, dass ein großer Anteil der zirkulierenden Tumor-DNA bei einer Knochenmarkaspiration nicht erfasst wird.

Weiterhin kann es bei Knochenmarkpunktionen bei hoher Zellularität zu einer Punctio sicca (sog. trockener Punktion) kommen, bei der nicht genug Material zur Untersuchung gewonnen werden kann.[73] Zuletzt stellt die Probengewinnung, welche weitaus weniger invasiv und schmerzhaft ist (Blutabnahme gegenüber Knochenmarkpunktion), einen großen Vorteil der cfDNA-MRD Methode dar.

Die verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Resttumorlast unter und nach Therapie unterliegen einer stetigen Weiterentwicklung, um die gestiegenen Ansprüche an Sensitivität, Spezifität und auch Standardisierung zu erfüllen. Sie weisen Vor- und Nachteile auf und bringen einen unterschiedlichen Informationsgewinn, weshalb das gleichzeitige Anwenden der Methoden sicherlich wünschenswert, aber in jedem Fall gegen die klinische Signifikanz bzw. auch gesundheitsökonomisch abzuwägen ist. Insgesamt stellt die im Rahmen dieser Arbeit

optimierte ampliconbasierte IG-NGS Analyse beim MM eine erhebliche Bereicherung der MRD-Diagnostik dar.

5 Zusammenfassung

Die Analyse minimaler Resterkrankung (MRD) gewinnt aufgrund der Verfügbarkeit effektiverer Therapien beim Multiplen Myelom zunehmend an Bedeutung. Eine innovative Alternative zu etablierten MRD-Messmethoden stellt die ampliconbasierte Hochdurchsatzsequenzierung (NGS) von Immunglobulin (IG)-Genumlagerungen (Rearrangements) dar, für die im Rahmen des Europäischen Kooperationsprojektes *EuroClonality-NGS* multizentrisch validierte IG-NGS-Assays mit zugehörigen bioinformatischen Auswertetools entwickelt wurden. In der vorgelegten Dissertation wurde die Anwendbarkeit dieser Assays für die IG-Markerdetektion beim Multiplen Myelom überprüft und die Assays für eine Analyse minimaler Resterkrankung bei dieser Entität optimiert. Hierzu wurden Proben von 103 Patienten der randomisierten Therapieoptimierungsstudie DSMM XIV untersucht, für die im Rahmen der Referenzdiagnostik MRD durchflusszytometrisch mittels Next-Generation Flow (NGF) untersucht worden war.

Im ersten Schritt wurden 103 prätherapeutische Screening-Proben mittels Zwei-Schritt-PCR und anschließend Amplicon-NGS untersucht, um klonale IG-Marker zu identifizieren. Es erfolgte die Amplifikation von IG-Schwerketten (IGH-VJ FR1, FR2 und FR3 sowie IGH-DJ) und IG-Leichtketten (IGK-VJ und IGK-Kde). Nach Identifikation klonaler IG-Marker wurden anschließend Verlaufspalten nach Induktionstherapie von 47 dieser Patienten mittels Ein-Schritt-PCR-Verfahren auf MRD untersucht. Die Quantifizierung erfolgte über eine Normalisierung mit definierten Kopienzahlen mitgeführter Zell-Linien-DNAs, den sogenannten *spike-in* Kontrollen. Im Rahmen der Dissertation wurden Grenzwerte für eine spezifische IG-Markerdetektion definiert, die Ein-Schritt-PCR optimiert und verschiedene Auswerteverfahren zur verbesserten Quantifizierung getestet.

Bei 98 von 103 Patienten (95%) wurde in einer prätherapeutischen Knochenmarkprobe mindestens ein geeigneter klonaler MRD-Marker identifiziert. Durchschnittlich wurden 1,9 Marker (0-7) pro Patient gefunden. Die meisten Patienten wiesen ein komplettes IGH-Rearrangement auf (82/103). Ein inkomplettes IGH-Rearrangement wurde bei 55 und mindestens ein IGK-Rearrangement bei 61 Patienten nachgewiesen. Von den insgesamt 53 analysierten Verlaufspalten waren 48 (90,6%) MRD-positiv. Das niedrigste gemessene MRD-Level lag bei $0,6 \times 10^{-6}$. Verglichen mit durchflusszytometrischen Werten wiesen 43 der 53 Proben (81%) ein qualitativ übereinstimmendes Ergebnis auf, davon 38 konkordant MRD-positiv und 5 konkordant MRD-negativ. Der Vergleich der MRD-Niveaus der konkordant MRD-positiven Proben zeigte eine Korrelation von $R^2 = 0,67$. In zehn Fällen war die Probe NGS MRD-positiv, während durchflusszytometrisch keine MRD nachgewiesen wurde. Zur Klärung dieser Diskrepanz wurde in sieben dieser 10 Fälle eine dritte Methode zur MRD-Quantifizierung, die ddPCR, etabliert und bestätigte in 6/7 Fällen das NGS-Ergebnis. Insgesamt liefert diese Arbeit die Grundlage für den zukünftigen Einsatz der EuroClonality-NGS Assays zur MRD-Quantifizierung beim Multiplen Myelom.

Literaturverzeichnis

1. Gerecke C., Fuhrmann S., Striffler S., Schmidt-Hieber M., Einsele H., Knop S. (2016): Diagnostik und Therapie des Multiplen Myeloms. *Dtsch Arztebl Int*, 113(27–28):470–6.
2. Turesson I., Velez R., Kristinsson S.Y., Landgren O. (2010): Patterns of improved survival in patients with multiple myeloma in the twenty-first century: A population-based study. *J Clin Oncol*, 28(5):830–4.
3. Kumar S.K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A., Lacy M.Q., Hayman S.R., Buadi F.K., Zeldenrust S.R., Dingli D., Russell S.J., Lust J.A., Greipp P.R., Kyle R.A., Gertz M.A. (2008): Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*, 111(5):2516–20.
4. Weber D.M., Dimopoulos M.A., Mouloupoulos L.A., Delasalle K.B., Smith T., Alexanian R. (1997): Prognostic features of asymptomatic multiple myeloma. *Br J Haematol*, 97(4):810–4.
5. Herold G. (2018): Innere Medizin. Gerd Herold, Köln.
6. Rajkumar S.V., Dimopoulos M.A., Palumbo A., Blade J., Merlini G., Mateos M.V., Kumar S., Hillengass J., Kastritis E., Richardson P., Landgren O., Paiva B., Dispenzieri A., Weiss B., LeLeu X., Zweegman S., Lonial S., Rosinol L., Zamagni E., Jagannath S., Sezer O., Kristinsson S.Y., Caers J., Usmani S.Z., Lahuerta J.J., Johnsen H.E., Beksac M., Cavo M., Goldschmidt H., Terpos E., Kyle R.A., Anderson K.C., Durie B.G.M., Miguel J.F.S. (2014): International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 15(12):e538–48.
7. González D., Van Der Burg M., García-Sanz R., Fenton J.A., Langerak A.W., González M., Van Dongen J.J.M., San Miguel J.F., Morgan G.J. (2007): Immunoglobulin gene Rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*, 110(9):3112–21.
8. Corre J., Munshi N., Avet-Loiseau H. (2015): Genetics of multiple myeloma: Another heterogeneity level? *Blood*, 125(12):1870–6.
9. Vettermann C., Schlissel M.S. (2010): Allelic exclusion of immunoglobulin genes: Models and mechanisms. *Immunol Rev*, 237(1):22–42.
10. Bendandi M., Tonelli R., Maffei R., Botti S., Turi C., Sartini R., Inogés S., Rodríguez Calvillo M., Zinzani P.L., Pession A., Pileri S.A., Paolucci G. (2001): Identification of the B-cell tumor-specific molecular fingerprint using non-radiolabelled PCR consensus Primers. *Ann Oncol*, 12(10):1479–84.
11. Briney B.S., Crowe J.E. (2013): Secondary mechanisms of diversification in the human antibody repertoire. *Front Immunol*, 4(MAR):42.
12. Durie B.G.M., Harousseau J.L., Miguel J.S., Bladé J., Barlogie B., Anderson K., Gertz M., Dimopoulos M., Westin J., Sonneveld P., Ludwig H., Gahrton G., Beksac M.,

- Crowley J., Belch A., Boccadaro M., Cavo M., Turesson I., Joshua D., Vesole D., Kyle R., Tricot G., Alexanian R., Attal M., Merlini G., Powles R., Richardson P., Shimizu K., Tosi P., Rajkumar S. V, Morgan G. (2006): International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 20(9):1467–73.
13. Ho C., Arcila M.E. (2018): Minimal residual disease detection of myeloma using sequencing of immunoglobulin heavy chain gene VDJ regions. *Semin Hematol*, 55(1):13–8.
 14. Van Dongen J.J.M., Van Der Velden V.H.J., Brüggemann M., Orfao A. (2015): Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: Need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*, 125(26):3996–4009.
 15. Munshi N.C., Avet-Loiseau H., Rawstron A.C., Owen R.G., Child J.A., Thakurta A., Sherrington P., Samur M.K., Georgieva A., Anderson K.C., Gregory W.M. (2017): Association of minimal residual disease with superior survival outcomes in patients with multiple myeloma: A meta-analysis. *JAMA Oncol*, 3(1):28–35.
 16. Silvennoinen R., Lundan T., Kairisto V., Pelliniemi T.-T., Putkonen M., Anttila P., Huotari V., Mäntymaa P., Siitonen S., Uotila L., Penttilä T.-L., Juvonen V., Selander T., Remes K. (2014): Comparative analysis of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry and enhanced ASO RQ-PCR in multiple myeloma. *Blood Cancer J*, 4(10):e250–e250.
 17. Flores-Montero J., Sanoja-Flores L., Paiva B., Puig N., García-Sánchez O., Böttcher S., Van Der Velden V.H.J., Pérez-Morán J.J., Vidriales M.B., García-Sanz R., Jimenez C., González M., Martínez-López J., Corral-Mateos A., Grigore G.E., Fluxá R., Pontes R., Caetano J., Sedek L., Del Cañizo M.C., Bladé J., Lahuerta J.J., Aguilar C., Báez A., García-Mateo A., Labrador J., Leoz P., Aguilera-Sanz C., San-Miguel J., Mateos M. V., Durie B., Van Dongen J.J.M., Orfao A. (2017): Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*, 31(10):2094–103.
 18. van der Velden V.H.J., Cazzaniga G., Schrauder A., Hancock J., Bader P., Panzer-Grumayer E.R., Flohr T., Sutton R., Cave H., Madsen H.O., Cayuela J.M., Trka J., Eckert C., Foroni L., zur Stadt U., Beldjord K., Raff T., van der Schoot C.E., van Dongen J.J.M. (2007): Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene Rearrangements: Guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*, 21(4):604–11.
 19. Hillengass J., Ellert E., Spira D., Hemmer S., Wagner B., Andrulis M., Sauer S. (2016): Comparison of plasma cell infiltration in random samples of the bone marrow and osteolyses acquired by CT-guided biopsy in patients with symptomatic multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 34(15_suppl):8040–8040.

20. Thomas X., Le Q.H., Danaïla C., Lhéritier V., Ffrench M. (2002): Bone marrow biopsy in adult acute lymphoblastic leukemia: Morphological characteristics and contribution to the study of prognostic factors. *Leuk Res*, 26(10):909–18.
21. Puig N., Sarasquete M.E., Balanzategui A., Martínez J., Paiva B., García H., Fumero S., Jiménez C., Alcoceba M., Chillón M.C., Sebastián E., Marín L., Montalbán M.A., Mateos M. V., Oriol A., Palomera L., De La Rubia J., Vidriales M.B., Bladé J., Lahuerta J.J., González M., Miguel J.F.S., García-Sanz R. (2014): Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia*, 28(2):391–7.
22. Sarasquete M.E., García-Sanz R., González D., Martínez J., Mateo G., Martínez P., Ribera J.M., Hernández J.M., Lahuerta J.J., Orfão A., González M., San Miguel J.F. (2005): Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*, 90(10):1365–72.
23. Flohr T., Schrauder A., Cazzaniga G., Panzer-Grümayer R., van der Velden V., Fischer S., Stanulla M., Basso G., Niggli F.K., Schäfer B.W., Sutton R., Koehler R., Zimmermann M., Valsecchi M.G., Gadner H., Masera G., Schrappe M., van Dongen J.J.M., Biondi A., Bartram C.R. (2008): Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene Rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 22(4):771–82.
24. Moreau P., Zamagni E. (2017): MRD in multiple myeloma: More questions than answers? *Blood Cancer J*, 7(12):639.
25. Bai Y., Orfao A., Chim C.S. (2018): Molecular detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 181(1):11–26.
26. Logan A.C., Zhang B., Narasimhan B., Carlton V., Zheng J., Moorhead M., Krampf M.R., Jones C.D., Waqar A.N., Faham M., Zehnder J.L., Miklos D.B. (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.
27. Faham M., Zheng J., Moorhead M., Carlton V.E.H., Stow P., Coustan-Smith E., Pui C.H., Campana D. (2012): Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 120(26):5173–80.
28. Ladetto M., Brüggemann M., Monitillo L., Ferrero S., Pepin F., Drandi D., Barbero D., Palumbo A., Passera R., Boccadoro M., Ritgen M., Gökbuget N., Zheng J., Carlton V., Trautmann H., Faham M., Pott C. (2014): Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*,

- 28(6):1299–307.
29. Takamatsu H., Takezako N., Zheng J., Moorhead M., Carlton V.E.H., Kong K.A., Murata R., Ito S., Miyamoto T., Yokoyama K., Matsue K., Sato T., Kurokawa T., Yagi H., Terasaki Y., Ohata K., Matsumoto M., Yoshida T., Faham M., Nakao S. (2017): Prognostic value of sequencing-based minimal residual disease detection in patients with multiple myeloma who underwent autologous stem-cell transplantation. *Ann Oncol*, 28(10):2503–10.
 30. Brüggemann M., Kotrová M., Knecht H., Bartram J., Boudjogrha M., Bystry V., Fazio G., Froňková E., Giraud M., Grioni A., Hancock J., Herrmann D., Jiménez C., Krejci A., Moppett J., Reigl T., Salson M., Scheijen B., Schwarz M., Songia S., Svaton M., van Dongen J.J.M., Villarese P., Wakeman S., Wright G., Cazzaniga G., Davi F., García-Sanz R., Gonzalez D., Groenen P.J.T.A., Hummel M., Macintyre E.A., Stamatopoulos K., Pott C., Trka J., Darzentas N., Langerak A.W. (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.
 31. Scheijen B., Meijers R.W.J., Rijntjes J., van der Klift M.Y., Möbs M., Steinhilber J., Reigl T., van den Brand M., Kotrová M., Ritter J.M., Catherwood M.A., Stamatopoulos K., Brüggemann M., Davi F., Darzentas N., Pott C., Fend F., Hummel M., Langerak A.W., Groenen P.J.T.A. (2019): Next-generation sequencing of immunoglobulin gene Rearrangements for clonality assessment: a technical feasibility study by EuroClonality-NGS. *Leukemia*, 33(9):2227–40.
 32. Knecht H., Reigl T., Kotrová M., Appelt F., Stewart P., Bystry V., Krejci A., Grioni A., Pal K., Stranska K., Plevova K., Rijntjes J., Songia S., Svatoň M., Froňková E., Bartram J., Scheijen B., Herrmann D., García-Sanz R., Hancock J., Moppett J., van Dongen J.J.M., Cazzaniga G., Davi F., Groenen P.J.T.A., Hummel M., Macintyre E.A., Stamatopoulos K., Trka J., Langerak A.W., Gonzalez D., Pott C., Brüggemann M., Darzentas N. (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.
 33. Myakishev M. V., Kapanadze G.I., Shaikhayev G.O., Georgiev G.P., Beritashvili D.R. (1995): Extraction of DNA from the whole blood by silica gel. http://www.protocol-online.org/cgi-bin/prot/view_cache.cgi?ID=1161. Abgerufen am 23.08.2019
 34. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
 35. Pongers-Willems M.J., Verhagen O.J.H.M., Tibbe G.J.M., Wijkhuijs A.J.M., De Haas

- V., Roovers E., Van Der Schoot C.E., Van Dongen J.J.M. (1998): Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*, 12(12):2006–14.
36. González D., Balanzategui A., García-Sanz R., Gutiérrez N., Seabra C., van Dongen J.J.M., González M., San Miguel J.F. (2003): Incomplete DJH Rearrangements of the IgH gene are frequent in multiple myeloma patients: Immunobiological characteristics and clinical implications. *Leukemia*, 17(7):1398–403.
37. Illumina. Illumina PhiX Control v3. <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/cluster-gen-sequencing-reagents/phix-control-v3.h>. Abgerufen am 13.10.2018
38. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–7.
39. Buermans H.P.J., den Dunnen J.T. (2014): Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1842(10):1932–41.
40. Illumina. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf. Abgerufen am 13.10.2018
41. Bystry V., Reigl T., Krejci A., Demko M., Hanakova B., Grioni A., Knecht H., Schlitt M., Dreger P., Sellner L., Herrmann D., Pingeon M., Boudjoghra M., Rijntjes J., Pott C., Langerak A.W., Groenen P.J.T.A., Davi F., Brüggemann M., Darzentas N. (2017): ARResT/Interrogate: An interactive immunoprofiler for IG/TR NGS data. *Bioinformatics*, 33(3):435–7.
42. Brochet X., Lefranc M.P., Giudicelli V. (2008): IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res*, 36:W503–8.
43. Drandi D., Kubiczkova-Besse L., Ferrero S., Dani N., Passera R., Mantoan B., Gambella M., Monitillo L., Saraci E., Ghione P., Genuardi E., Barbero D., Omedè P., Barberio D., Hajek R., Vitolo U., Palumbo A., Cortelazzo S., Boccadoro M., Inghirami G., Ladetto M. (2015): Minimal Residual Disease Detection by Droplet Digital PCR in Multiple Myeloma, Mantle Cell Lymphoma, and Follicular Lymphoma: A Comparison with Real-Time PCR. *J Mol Diagnostics*, 17(6):652–60.
44. Martinez-Lopez J., Lahuerta J.J., Pepin F., González M., Barrio S., Ayala R., Puig N., Montalban M.A., Paiva B., Weng L., Jiménez C., Sopena M., Moorhead M., Cedena T., Rapado I., Victoria Mateos M., Rosiñol L., Oriol A., Blanchard M.J., Martínez R., Bladé J., Miguel J.S., Feham M., García-Sanz R. (2014): Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*, 123(20):3073–9.

45. Korde N., Mailankody S., Roschewski M., Faham M., Kotwaliwale C., Moorhead M., Kwok M.L., Manasanch E.E., Bhutani M., Tageja N., Kazandjian D., Costello R., Zhang Y., Zingone A., Burton D., Mulquin M., Carpenter A., Zuchlinski D., Lamping E., Carter G., Morrison C., Kurdziel K., Lindenberg M., Kurlander R., Maric I., Calvo K.R., Braylan R.C., Yuan C., Stetler-Stevenson M., Arthur D.C., Steinberg S.M., Figg W.D., Choyke P., Landgren O. (2014): Minimal Residual Disease (MRD) Testing in Newly Diagnosed Multiple myeloma (MM) Patients: A Prospective Head-to-Head Assessment of Cell-Based, Molecular, and Molecular-Imaging Modalities. *Blood*, 124(21):2105–2105.
46. Gameiro P., Sebastião M., Spetalen S., da Silva M.G., Cabeçadas J. (2012): The added value of immunoglobulin Kappa light chain gene (IGK) Rearrangement analysis in suspected B-cell lymphomas: Three illustrative cases. *J Hematop*, 5(1–2):45–56.
47. Mannu C., Gazzola A., Bacci F., Sabattini E., Sagramoso C., Roncolato F., Rossi M., Laginestra M.A., Sapienza M.R., Agostinelli C., De Leo A., Piccioli M., Righi S., Artioli P., Chilli L., Da Pozzo G., De Biase G., Sandri F., Pileri S.A., Piccaluga P.P. (2011): Use of IGK gene Rearrangement analysis for clonality assessment of lymphoid malignancies: a single center experience. *Am J Blood Res*, 1(2):167–74.
48. Hadzidimitriou A., Stamatopoulos K., Belessi C., Lalayianni C., Stavroyianni N., Smilevska T., Hatzi K., Laoutaris N., Anagnostopoulos A., Kollia P., Fassas A. (2006): Immunoglobulin genes in multiple myeloma: Expressed and non-expressed repertoires, heavy and light chain pairings and somatic mutation patterns in a series of 101 cases. *Haematologica*, 91(6):781–7.
49. Ferrero S., Capello D., Svaldi M., Boi M., Gatti D., Drandi D., Rossi D., Barbiero S., Mantoan B., Mantella E., Zanni M., Ghione P., Larocca A., Passera R., Bertoni F., Gattei V., Forconi F., Laurenti L., del Poeta G., Marasca R., Cortelazzo S., Gaidano G., Palumbo A., Boccadoro M., Ladetto M. (2012): Multiple myeloma shows no intra-disease clustering of immunoglobulin heavy chain genes. *Haematologica*, 97(6):849–53.
50. Shin S., Hwang I.S., Kim J., Lee K.A., Lee S.T., Choi J.R. (2017): Detection of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Clonality by Next-Generation Sequencing for Minimal Residual Disease Monitoring in B-Lymphoblastic Leukemia. *Ann Lab Med*, 37(4):331–5.
51. Theunissen P.M.J., de Bie M., van Zessen D., de Haas V., Stubbs A.P., van der Velden V.H.J. (2019): Next-generation antigen receptor sequencing of paired diagnosis and relapse samples of B-cell acute lymphoblastic leukemia: Clonal evolution and implications for minimal residual disease Target selection. *Leuk Res*, 76:98–104.

52. Yao Q., Bai Y., Orfao A., Chim C.S. (2019): Disease detection by next-generation sequencing in multiple myeloma. *Front Oncol*, 9(JUN):449.
53. Carlson C.S., Garfall A.L., Meng W., Daber R., Zhang B., Hershberg U., Cohen A.D., Vogl D.T., Brennan W., Carroll M., Stadtmauer E.A., Luning Prak E. (2014): Detection of the Malignant B Cell Clone in Multiple Myeloma Via High Throughput Sequencing Is Robust to Significant Levels of Somatic Hypermutation. *Blood*, 124(21):3413–3413.
54. Chilosi M., Adami F., Lestani M., Montagna L., Cimarosto L., Semenzato G., Pizzolo G., Menestrina F. (1999): CD138/syndecan-1: A useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Mod Pathol*, 12(12):1101–6.
55. Puig N., Sarasquete M.E., Alcoceba M., Balanzategui A., Chillón M.C., Sebastián E., Marín L.A., Díaz M.G., San Miguel J.F., Sanz R.G. (2013): The use of CD138 positively selected marrow samples increases the applicability of minimal residual disease assessment by PCR in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol*, 92(1):97–100.
56. Marti G.E., Rawstron A.C., Ghia P., Hillmen P., Houlston R.S., Kay N., Schleinitz T.A., Caporaso N. (2005): Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*, 130(3):325–32.
57. Strati P., Shanafelt T.D. (2015): Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: Diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood*, 126(4):454–62.
58. Kosmas C., Stamatopoulos K., Papadaki T., Belessi C., Yataganas X., Anagnostou D., Loukopoulos D. (1998): Somatic hypermutation of immunoglobulin variable region genes: Focus on follicular lymphoma and multiple myeloma. *Immunol Rev*, 162(1):281–92.
59. Arcila M.E., Yu W., Syed M., Kim H., Maciag L., Yao J.J., Ho C., Petrova K., Mounq C., Salazar P., Rijo I., Baldi T., Zehir A., Landgren O., Park J., Roshal M., Dogan A., Nafa K. (2019): Establishment of Immunoglobulin Heavy (IGH) Chain Clonality Testing by Next-Generation Sequencing for Routine Characterization of B-Cell and Plasma Cell Neoplasms. *J Mol Diagnostics*, 21(2):330–42.
60. Medina A., Jiménez C., Puig N., Flores-Montero J., Paiva B., Sarasquete M.E., Prieto-Conde I., Garcia-Alvarez M., Chillon C., Alcoceba M., Gonzalez-Calle V., Gutierrez N.C., de Arriba F., Hernandez M.T., Blade J., Martinez-Lopez J., Calasanz M.-J., Lahuerta J.-J., Mateos M.-V., San-Miguel J., Gonzalez M., Garcia-Sanz R. (2019): Prognostic implications of MRD assessment in multiple myeloma patients: comparison of Next-Generation Sequencing and Next-Generation Flow. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 19(10):e47.

61. Briney B.S., Willis J.R., Crowe J.E. (2012): Location and length distribution of somatic hypermutation-associated DNA insertions and deletions reveals regions of antibody structural plasticity. *Genes Immun*, 13(7):523–9.
62. Wood B., Wu D., Crossley B., Dai Y., Williamson D., Gawad C., Borowitz M.J., Devidas M., Maloney K.W., Larsen E., Winick N., Raetz E., Carroll W.L., Hunger S.P., Loh M.L., Robins H., Kirsch I. (2018): Measurable residual disease detection by high-throughput sequencing improves risk stratification for pediatric B-ALL. *Blood*, 131(12):1350–9.
63. Medina A., Jiménez C., Puig N., Sanchez-Vega B., Flores-Montero J., González M., Calasanz M.J., Ayala R.M., Sarasquete M.E., Paiva B., Cedena M.T., Fernández-Mercado M., Rapado I., Rosinol L., Ocio E.M., Oriol A., Alcoceba M., Hernández M.T., Martínez Martínez R., Mateos M.-V., Lahuerta J.-J., Bladé J., Orfao A., San Miguel J.F., Martínez-López J., García-Sanz R. (2017): New Alternatives for the Evaluation of Minimal Residual Disease (MRD) Detection By Next Generation Sequencing in Multiple Myeloma. *Blood*, 130(Supplement 1):1783–1783.
64. Roloff G., Lai C., Hourigan C., Dillon L. (2017): Technical Advances in the Measurement of Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*, 6(9):87.
65. Gutiérrez-Aguirre I., Rački N., Dreo T., Ravnikar M. (2015): Droplet digital PCR for absolute quantification of pathogens. *Methods Mol Biol*, 1302:331–47.
66. Paiva B., Puig N., Cedena M.T., Rosiñol L., Cordon L., Vidriales M.B., Burgos L., Flores-Montero J., Sanoja-Flores L., Lopez-Anglada L., Maldonado R., de la Cruz J., Gutierrez N.C., Calasanz M.J., Martin-Ramos M.L., Garcia-Sanz R., Martinez-Lopez J., Oriol A., Blanchard M.J., Rios R., Martin J., Martinez-Martinez R., Sureda A., Hernandez M.T., de la Rubia J., Krsnik I., Moraleda J.M., Palomera L., Bargay J., van Dongen J.J.M., Orfao A., Mateos M.V., Blade J., San-Miguel J.F., Lahuerta J.J. (2020): Measurable residual disease by next-generation flow cytometry in multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 38(8):784–92.
67. Romano A., Palumbo G.A., Parrinello N.L., Conticello C., Martello M., Terragna C. (2019): Minimal Residual Disease Assessment Within the Bone Marrow of Multiple Myeloma: A Review of Caveats, Clinical Significance and Future Perspectives. *Front Oncol*, 9:699.
68. Pugh T.J. (2018): Circulating Tumour DNA for Detecting Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma. *Semin Hematol*, 55(1):38–40.
69. Paiva B., Puig N., Cedena M.T., Cordon L., Vidriales M.-B., Burgos L., Flores-Montero J., Lopez-Anglada L., Gutierrez N., Calasanz M.J., Martin-Ramos M.L., Garcia-Sanz R., Martinez-Lopez J., Oriol A., Blanchard M.J., Rios R., Martín J., Martínez R., Sarra J., Hernández M.T., de la Rubia J., Krsnik I., Moraleda J.M., Palomera L., Bargay J.,

- Orfao A., Rosinol L., Mateos M.-V., Lahuerta J.-J., Bladé J., San Miguel J.F. (2017): Impact of Next-Generation Flow (NGF) Minimal Residual Disease (MRD) Monitoring in Multiple Myeloma (MM): Results from the Pethema/GEM2012 Trial. *Blood*, 130(Supplement 1):905–905.
70. Susanibar S., Carlton V., Thanendrarajan S., Mohan M., Mathur P., Hoque S., Radhakrishnan M., van Rhee F., Zangari M., Davies F.E., Kong K.A., Morgan G.J., Alapat D. V., Schinke C. (2016): Comparison of MRD Detection By MFC, NGS and PET-CT in Patients at Different Treatment Stages for Multiple Myeloma. *Blood*, 128(22):377–377.
71. Messiou C., Kaiser M. (2018): Whole-Body Imaging in Multiple Myeloma. *Magn Reson Imaging Clin N Am*, 26(4):509–25.
72. Zamagni E., Nanni C., Gay F., Dozza L., Rota Scalabrini D., Omedé P., Ribolla R., Galli M., Racca M., Zambello R., Gamberi B., Albano D., Versari A., Grasso M., Troia R., Spadano T., Patriarca F., Ruggeri M., Rensi M., Pascarella A., Zucchetta P., Tacchetti P., Fanti S., Boccadoro M., Cavo M., Oliva S. (2019): MRD Evaluation By PET/CT According to Deauville Criteria Combined with Multiparameter Flow Cytometry in Newly Diagnosed Transplant Eligible Multiple Myeloma (MM) Patients Enrolled in the Phase II Randomized Forte Trial. *Blood*, 134(Supplement_1):4321–4321.
73. Kis O., Kaedbey R., Chow S., Danesh A., Dowar M., Li T., Li Z., Liu J., Mansour M., Masih-Khan E., Zhang T., Bratman S. V., Oza A.M., Kamel-Reid S., Trudel S., Pugh T.J. (2017): Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone marrow aspirates. *Nat Commun*, 8(15086).
74. Oberle A., Brandt A., Voigtlaender M., Thiele B., Radloff J., Schulenkorf A., Alawi M., Akyüz N., März M., Ford C.T., Krohn-Grimberghe A., Binder M. (2017): Monitoring multiple myeloma by next-generation sequencing of V(D)J Rearrangements from circulating myeloma cells and cell-free myeloma DNA. *Haematologica*, 102(6):1105–11.
75. Biancon G., Gimondi S., Vendramin A., Carniti C., Corradini P. (2018): Noninvasive Molecular Monitoring in Multiple Myeloma Patients Using Cell-Free Tumor DNA: A Pilot Study. *J Mol Diagnostics*, 20(6):859–70.

Anhang

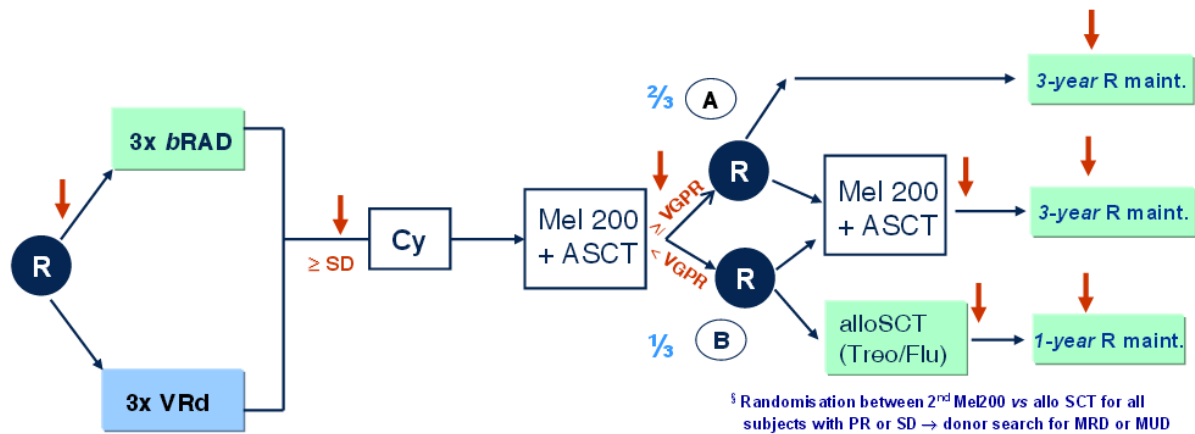


Abbildung 1: Studienprotokoll DSMM XIV. Initial Randomisierung (R) der Patienten in zwei Studienarme mit unterschiedlicher Induktionstherapie, bRAD (Lenalidomid, Adriamycin, Dexamethason) und VRd (Bortezomib, Lenalidomid und Dexamethason). Anschließend erfolgte eine autologe Stammzelltransplantation (ASCT) und eine *response*-adaptierte Konsolidierung (direkter Beginn der Erhaltungstherapie, erneute ASCT oder eine allogene Stammzelltransplantation (alloSCT)). Beide Studienarme enthielten eine Erhaltungstherapie mit Lenalidomid für ein bzw. drei Jahre.

Tabelle 1: Primer-Liste Zwei-Schritt-PCR (PCR 1). Zusammensetzung der Primer-Mixe für die Targets IGH-DJ, IGH-VJ, IGK-A und IGK-B.

Target	Primername	μM in PCR	Richtung	Primersequenz mit M13 Adapter (forward/reverse) 5' zu 3'
IGH-DJ	IGH-D-A-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGATTCYGAACAGCCCCGAGTCA
	IGH-D-B-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGATTTTGTGGGGYTCGTGTC
	IGH-D-C-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGTTTGRRGTGAGGTCTGTGTCA
	IGH-D-D-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGTTTRGRRTGAGGTCTGTGTCACT
	IGH-D-E-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTCTTTTTGTGAAGGSCCCTCCTR
	IGH-D-F-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGTTATTGTCAGGSGRTGTCAGAC
	IGH-D-G-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGTTATTGTCAGGGGTGYCAGRC
	IGH-D-H-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGTTTCTGAAGSTGTCTGTRTCAC
	IGH-J-A-1	0.4 μM	3'	TAATACGACTCACTATAGGGCTTACCTGAGGAGACGGTGACC
IGH-VJ	IGH-V-FR1-B-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA
	IGH-V-FR1-E-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGTC
	IGH-V-FR1-G-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTCAGTGGGGCGCAGGACTGTT
	IGH-V-FR1-H-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTCCAGGACTGGTGAAGCCTCC
	IGH-V-FR1-K-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTCTCAGTGAAGTTTTCTGCAAGG
	IGH-V-FR1-L-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGAC
	IGH-V-FR1-M-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
	IGH-V-FR1-N-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTG
	IGH-V-FR1-O-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTTCGAGACCCTCTCACTCACCTGTG
	IGH-J-A-1	0.1 μM	3'	TAATACGACTCACTATAGGGCTTACCTGAGGAGACGGTGACC
	IGH-J-B-1	0.1 μM	3'	TAATACGACTCACTATAGGGCTCACCTGAGGAGACGGTGACC
	IGH-V-FR1-A-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG
	IGH-V-FR1-C-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCC
	IGH-V-FR1-D-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTAGGTGCAGCTGGTGGAGTC
	IGH-V-FR1-F-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTCCAGGACTGGTGAAGCCTTC
	IGH-V-FR1-I-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGTACAGCTGCAGCAGTCAGG
IGH-V-FR1-J-1	0.2 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGCTGGTGAATCTGGGTCTG	
IGK-A	IGK-V-A-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCCAG
	IGK-V-B-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTAGTCCCATCTCGGTTCCAGTGGCAG
	IGK-V-C-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCC
	IGK-V-D-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTG
	IGK-V-E-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTCTGGAGTGCCAGATAGGTTCCAGTG
	IGK-V-F-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTCCCTGGAGTCCCAGACAGGTTCCAG
	IGK-V-G-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGCATCCCAGCCAGGTTCCAGTG
	IGK-V-H-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGTCCCTGACCGATTCCAGTGGCA
	IGK-V-I-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTAATCCCACCTCGATTCCAGTGGC
	IGK-V-J-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTCTCAGGGTCCCCTCCAGGTT
	IGK-V-K-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTAGACACTGGGGTCCCAGCCA
	IGK-DE-A-1	0.1 μM	3'	TAATACGACTCACTATAGGGGCAGCTGCAGACTCATGAGGAG
	IGK-J-A-1	0.1 μM	3'	TAATACGACTCACTATAGGGACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC
IGK-J-B-1	0.1 μM	3'	TAATACGACTCACTATAGGGACGTTTGATATCCACTTTGGTCCC	
IGK-J-C-1	0.1 μM	3'	TAATACGACTCACTATAGGGACGTTTAACTCCAGTCTGTCCC	
IGK-B	IGK-INTR-A-1	0.1 μM	5'	GTAAAACGACGGCCAGTGAGTGGCTTTGGTGGCCATGC
	IGK-DE-A-1	0.1 μM	3'	TAATACGACTCACTATAGGGGCAGCTGCAGACTCATGAGGAG

Tabelle 2: PCR-Protokolle Zwei-Schritt-PCR (PCR 1). A-F: Mastermixe der Targets IGH-DJ, IGH-VJ-FR1, IGH-VJ-FR2, IGH-VJ-FR3, IGK-A und IGK-B. G: PCR Ansatz, BC = *buffy coat* (positive Kontrolle), NTC = negative Kontrolle, H: Cycler Programm (Thermocycler) mit Anzahl, Temperatur und Länge der PCR-Zyklen.

A: IGH-DJ Two-Step-PCR

Mastermix	Stammkonz.	Endkonz.	µl/Ansatz
PCR Puffer II	10x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	3 mM	6
dNTP-Mix	10 mM	0,4 mM	2
H ₂ O			31,6
forward Primer-Mix	100 µM	0,2 µM	0,9
reverse Primer-Mix	100 µM	0,4 µM	0,2
EagleTaq	5 U/µl	1,5 U/Ansatz	0,3

B: IGH-FR1 Two-Step-PCR

Mastermix	Stammkonz.	Endkonz.	µl/Ansatz
PCR Puffer II	10x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	5
dNTP-Mix	10 mM	0,2 mM	1
H ₂ O			33,65
forward Primer-Mix	100 µM	variabel	1,05
reverse Primer-Mix	100 µM	0,1 µM	0,1
EagleTaq	5 U/µl	1U/Ansatz	0,2

C: IGH-FR2 Two-Step-PCR

Mastermix	Stammkonz.	Endkonz.	µl/Ansatz
PCR Puffer II	10x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	3 mM	6
dNTP-Mix	10 mM	0.2 mM	1
H ₂ O			32,25
forward Primer-Mix	100 µM	0,1 µM each	1,35
reverse Primer-Mix	100 µM	0,1 µM each	0,2
EagleTaq	5 U/µl	1U/Ansatz	0,2

D: IGH-FR3 Two-Step-PCR

Mastermix	Stammkonz.	Endkonz.	µl/Ansatz
PCR Puffer II	10x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3
dNTP-Mix	10 mM	0.2 mM	1
H ₂ O			35,05
forward Primer-Mix	100 µM	0,1 µM each	1,55
reverse Primer-Mix	100 µM	0,1 µM each	0,2
EagleTaq	5 U/µl	1U/Ansatz	0,2

E: IGK-A Two-Step-PCR

Mastermix	Stammkonz.	Endkonz.	µl/Ansatz
PCR Puffer II	10x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3
dNTP-Mix	10 mM	0.2 mM	1
H ₂ O			36,05
forward Primer-Mix	100 µM	0,1 µM each	0,55
reverse Primer-Mix	100 µM	0,1 µM each	0,2
EagleTaq	5 U/µl	1U/Ansatz	0,2

F: IGK-B Two-Step-PCR

Mastermix	Stammkonz.	Endkonz.	µl/Ansatz
PCR Puffer II	10x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3
dNTP-Mix	10 mM	0.2 mM	1
H ₂ O			36,7
forward Primer-Mix	100 µM	0,1 µM	0,05
reverse Primer-Mix	100 µM	0,1 µM	0,05
EagleTaq	5 U/µl	1U/Ansatz	0,2

G: PCR-Ansatz

Tube	Master		Spike-in	
	mix	DNA	Mix	BC
1 -x	46µl	D-XX (100ng)	2µl	10ng
BC	46µl	BC (100ng)	0µl	0ng
NTC	46µl	Aqua	0µl	0ng

H: PCR Cycler Programm

Thermocycler			
1 cycles	initial denaturation	94° C	10 min
35 cycles	denature	94°C	1 min
	anneal	63°C	1 min
	extend	72° C	30 sec
1 cycles	final extension	72° C	30 min
		12° C	10 min

Tabelle 3: Primer-Liste Zwei-Schritt-PCR (PCR 2)

	Primername	µM in PCR	Richtung	Barcode und Primersequenz mit M13 Adapter (forward/reverse) 5' zu 3'
forward	III-D501-F	0.2µM	5'	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTAAAACGACGGCCAGT
	III-D502-F	0.2µM	5'	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGAGGCACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTAAAACGACGGCCAGT
	III-D503-F	0.2µM	5'	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCTATCCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTAAAACGACGGCCAGT
	III-D504-F	0.2µM	5'	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGCTCTGAACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTAAAACGACGGCCAGT
	III-D505-F	0.2µM	5'	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGCGAAGACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTAAAACGACGGCCAGT
	III-D506-F	0.2µM	5'	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAATCTTAACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTAAAACGACGGCCAGT
	III-D507-F	0.2µM	5'	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAGGACGTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTAAAACGACGGCCAGT
	III-D508-F	0.2µM	5'	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTAAGTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTAAAACGACGGCCAGT
reverse	III-D701-R	0.2µM	3'	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAGTAATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAATACGACTCACTATAGGG
	III-D702-R	0.2µM	3'	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCCGGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAATACGACTCACTATAGGG
	III-D703-R	0.2µM	3'	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAATGAGCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAATACGACTCACTATAGGG
	III-D704-R	0.2µM	3'	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAATCTCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAATACGACTCACTATAGGG
	III-D705-R	0.2µM	3'	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCTGAATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAATACGACTCACTATAGGG
	III-D706-R	0.2µM	3'	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGAATTCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAATACGACTCACTATAGGG
	III-D707-R	0.2µM	3'	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTTCAGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAATACGACTCACTATAGGG
	III-D708-R	0.2µM	3'	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCATTAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAATACGACTCACTATAGGG
	III-D709-R	0.2µM	3'	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATAGCCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAATACGACTCACTATAGGG
	III-D710-R	0.2µM	3'	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTGCGGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAATACGACTCACTATAGGG
	III-D711-R	0.2µM	3'	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCGAGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAATACGACTCACTATAGGG
	III-D712-R	0.2µM	3'	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTATCGCTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAATACGACTCACTATAGGG

Tabelle 4: PCR-Protokolle Zwei-Schritt-PCR (PCR 2). A: PCR Ansatz, BC = *buffy coat* (positive Kontrolle), Aqua = negative Kontrolle, FP = *forward* Primer, RP = *reverse* Primer, **B:** Mastermix PCR 2, **C:** Cyclor Programm (Thermocycler) mit Anzahl, Temperatur und Länge der PCR-Zyklen

A: PCR-Ansatz

Tube	Name	DNA-Nummer	DNA-Menge	Mastermix	FP	RP	Target
1-8	Pat 1-8	DXX (1-8)	1 µl	49 µl	III-D501-FP - III-D508-FP	III-D701-RP	
9-14	Pat 9-14	DXX (9-14)	1 µl	49 µl	III-D501-FP - III-D506-FP	III-D702-RP	IGH-FR1
15	BC 100 ng		1 µl	49 µl	III-D507-FP	III-D702-RP	
16	Aqua			49 µl	III-D508-FP	III-D702-RP	
17-24	Pat 1-8	DXX (1-8)	1 µl	49 µl	III-D501-FP - III-D508-FP	III-D703-RP	
25-30	Pat 9-14	DXX (9-14)	1 µl	49 µl	III-D501-FP - III-D506-FP	III-D704-RP	IGH-FR2
31	BC 100 ng		1 µl	49 µl	III-D507-FP	III-D704-RP	
32	Aqua			49 µl	III-D508-FP	III-D704-RP	
33-40	Pat 1-8	DXX (1-8)	1 µl	49 µl	III-D501-FP - III-D508-FP	III-D705-RP	
41-46	Pat 9-14	DXX (9-14)	1 µl	49 µl	III-D501-FP - III-D506-FP	III-D706-RP	IGH-FR3
47	BC 100 ng		1 µl	49 µl	III-D507-FP	III-D706-RP	
48	Aqua			49 µl	III-D508-FP	III-D706-RP	
49-57	Pat 1-8	DXX (1-8)	1 µl	49 µl	III-D501-FP - III-D508-FP	III-D707-RP	
58-62	Pat 9-14	DXX (9-14)	1 µl	49 µl	III-D501-FP - III-D506-FP	III-D708-RP	IGH-DJ
63	BC 100 ng		1 µl	49 µl	III-D507-FP	III-D708-RP	
64	Aqua			49 µl	III-D508-FP	III-D708-RP	
65-72	Pat 1-8	DXX (1-8)	1 µl	49 µl	III-D501-FP - III-D508-FP	III-D709-RP	
73-78	Pat 9-14	DXX (9-14)	1 µl	49 µl	III-D501-FP - III-D506-FP	III-D710-RP	IGK-A
79	BC 100 ng		1 µl	49 µl	III-D507-FP	III-D710-RP	
80	Aqua			49 µl	III-D508-FP	III-D710-RP	
81-88	Pat 1-8	DXX (1-8)	1 µl	49 µl	III-D501-FP - III-D508-FP	III-D711-RP	
89-94	Pat 9-14	DXX (9-14)	1 µl	49 µl	III-D501-FP - III-D506-FP	III-D712-RP	IGK-B
95	BC 100 ng		1 µl	49 µl	III-D507-FP	III-D712-RP	
96	Aqua			49 µl	III-D508-FP	III-D712-RP	

B: Index-PCR Two-Step-PCR

Mastermix	Stammkonz.	Endkonz.	µl/ Ansatz
Reaction Buffer with MgCl ₂	18 mM	1,8 mM	5
dNTPs	10 mM each	0,2 mM each	1
H ₂ O			40,5
III-Dxxx-FP	10 µM	0,2 µM	1,0
III-Dxxx-RP	10 µM	0,2 µM	1,0
Fast Start High Fidelity	5 U/µl	2.5 U/Ansatz	0,5

C: PCR Cyclor Programm

Thermocycler			
1 cycle	initial denaturation	95°C	2min
20 cycles	denature	95°C	30 sec
	anneal	63°C	30 sec
	extend	72°C	30 sec
1 cycle	final extension	72°C	5min
	cooling	4°C	10min

Tabelle 5: Zelllinien und *slope-in* Rearrangements. Auflistung aller im *slope-in* Mix enthaltenen Zelllinien und deren T-Zell-Rezeptor- und IG-Rearrangements.

Primer set	Cell line	Clonotype
TRB-VJ	JB6	VJ:Vb-(Db)-Jb V12-3=V12-4 6/14/4 J2-3 CASRLAGGPDYQYF pro
TRB-DJ	JB6	DJ:Db-Jb D1 7/6/4 J2-2 VGTEITGELFF pop
TRG	JB6	VJ:Vg-Jg V10 7/12/12 J1=J2 CAAWS*GW#KLF unq
TRG	JB6	VJ:Vg-Jg V2 5/13/ J1=J2 CATWGSIVNYYKCLF unq
TRB-VJ	Karpas299	VJ:Vb-(Db)-Jb V20-1 1/22/6 J2-7 CSARAQIGSSPLEQYF pro
TRB-DJ	Karpas299	DJ:Db-Jb D1 /2/6 J1-6 VGTGGLNSPLHF pop
TRG	Karpas299	VJ:Vg-Jg V2 /13/4 JP2 CATWDGG*VP#SDWIKTF unq
TRG	Karpas299	VJ:Vg-Jg V8 /2/5 J1=J2 CATWDR##YKCLF unq
IGH-VJ-FR1	ALL/MIK	VJ:Vh-(Dh)-Jh V3-72 16/24/ J4 SPCPPRKN#YFDYW unq
IGH-VJ-FR1	ALL/MIK	VJ:Vh-(Dh)-Jh V7-4-1 11/40/27 J4 TPIYYDSSGY*VP unq
IGK-VJ-Kde	ALL/MIK	Vk-Kde V2-24=V2D-24 26/6/20 Kde LGGR unk
IGK-VJ-Kde	ALL/MIK	VJ:Vk-Jk V1-39=V1D-39 6/7/5 J3 CQSYSTGA#F unq
intron-Kde	ALL/MIK	intron-Kde intron 4/2/ Kde PCVCPIDAAVASFP##SPSGSPGR unk
Intron-Kde	ALL/MIK	intron-Kde intron 4/6/1 Kde PCVCPIDAAVASFSL#SPSGSPGR unk
TRD	ALL/MIK	VJ:Vd-(Dd)-Ja V2 5/21/4 J29 CACAQGGPRS#SGNTPLVF unq
TRG	ALL/MIK	VJ:Vg-Jg V2 /5/8 JP1 CATWDGP#GWFKIF unq
TRG	ALL/MIK	VJ:Vg-Jg V5 2/3/ JP1 CATWDTYTTGWFKIF pro
TRB-VJ	MOLT-13	VJ:Vb-(Db)-Jb V10-1 6/18/1 J1-1 CASRRVRRDRNTEAFF unq
TRB-DJ	MOLT-13	DJ:Db-Jb D1 //6 J1-5 VGTGG#QPQHF pop
TRB-DJ	MOLT-13	DJ:Db-Jb D2 /4/3 J2-3 VGTSGRA#TDTQYF pop
TRD	MOLT-13	VJ:Vd-(Dd)-Jd V1 1/9/ J1 CALGEPGGYTDKCLF pro
TRG	MOLT-13	VJ:Vg-Jg V3 /8/9 J1=J2 CATWDRPRLKCLF pro
TRG	MOLT-13	VJ:Vg-Jg V8 3//3 JP1 CATWD#TGWFKIF unq
IGH-VJ-FR1	Raji	VJ:Vh-(Dh)-Jh V3-11=V3-21=V3-48 2/40/3 J4 CARQRNDFSDNNSYNSNDFFW pro
IGH-DJ	Raji	DJ:Dh-Jh D6-13 8/12/6 J1 VGYSSIPPP#YFQHW pop
IGK-VJ-Kde	Raji	Vk-Kde V1-8 2/2/4 Kde CQQYYSYVPSGSPGR unk
IGH-VJ-FR1	REH	VJ:Vh-(Dh)-Jh V3-15 1/21/5 J6 CTTGMVRGV#YYYYGMDVW unq
IGK-VJ-Kde	REH	VJ:Vk-Jk V2-29 5/4/ J4 *MQGIHLS#LTF unq
IGK-VJ-Kde	REH	Vk-Kde V3-20=V3D-20 4/1/ Kde CQQYGSS##SPSGSPGR unk
Intron-Kde	REH	intron-Kde intron 5// Kde PCVCPINAASFP##SPSGSPGR unk
TRB-VJ	REH	VJ:Vb-(Db)-Jb V20-1 1/2/26 J2-7 CSARG unq
TRD	REH	VD:Vd-Dd3 V2 7/3/ D3 CACLLGDTH unk
TRD	REH	VJ:Vd-(Dd)-Ja V2 3/22/5 J29 CACDPYGGGSP#SGNTPLVF unq
TRG	REH	VJ:Vg-Jg V9 1/2/3 J1=J2 CALWEV#YYKCLF unq
TRG	REH	VJ:Vg-Jg V4 10/14/3 J1=J2 CATLF*R#YYKCLF unq
IGH-VJ-FR1	TMM	VJ:Vh-(Dh)-Jh V1-24 /28/8 J5 CATDQAISGVVKSFDPW pro
IGH-DJ	TMM	DJ:Dh-Jh D2-2 3/13/ J3 VRIL**YQLLLNSANDAFDIW pop
IGK-VJ-Kde	TMM	Vk-Kde V2-30=V2D-30 /7/3 Kde CMQGTHTWRPGR#PSGSPGR unk
IGH-VJ-FR1	TOM-1	VJ:Vh-(Dh)-Jh V4-55 1/17/10 J6 CARWAGTTG#YYGMDVW unq
TRD	TOM-1	VD:Vd-Dd3 V2 3/3/2 D3 CACDL#GDTH unk
TRD	TOM-1	VD:Vd-Dd3 V2 8/4/ D3 CAFLLGDTH unk
TRG	TOM-1	VJ:Vg-Jg V5 8//18 J1=J2 CAT#F unq
IGH-VJ-FR1	WSU-NHL	VJ:Vh-(Dh)-Jh V6-1 1/22/19 J6 CARGTYAAKASMDVW pro
IGH-DJ	WSU-NHL	DJ:Dh-Jh D2-2 1/1/8 J4 VRIL**YQLLY#DYW pop
IGK-VJ-Kde	WSU-NHL	VJ:Vk-Jk V1-17=V1D-17 1//4 J4 CLQHNSYP#TF unq
Intron-Kde	WSU-NHL	intron-Kde intron 2//3 Kde PCVCPIDAAVASFP##PSGSPGR unk

Tabelle 6: PCR-Protokolle Ein-Schritt-PCR. A-D: Mastermixe der Targets IGH-DJ, IGH-VJ, IGK-A und IGK-B.
E: PCR Ansatz, BC = *buffy coat* (positive Kontrolle), NTC = negative Kontrolle, **F:** Cycler Programm (Thermocycler) mit Anzahl, Temperatur und Länge der PCR-Zyklen.

A: IGH-DJ One-Step-PCR

Mastermix	Stammkonz.	Endkonz.	µl/Ansatz
PCR Puffer II	10x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	3 mM	6
dNTP-Mix	10 mM	0.4 mM	2
H ₂ O			20,7
Primer-Mix forward primer	100 µM	0,2 µM je Primer	0,8
Primer-Mix reverse primer	10 µM	0,4 µM	2,0
Roche High Fidelity	5 U/µl	1,5 U / Ansatz	0,3

B: IGH-FR1 One-Step-PCR

Mastermix	Stammkonz.	Endkonz.	µl/Ansatz
PCR Puffer II	10x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	5
dNTP-Mix	10 mM	0.2 mM	1
H ₂ O			26,8
Primer-Mix forward primer	100 µM	variabel	1,1
Primer-Mix reverse primer	10 µM	0,1 µM	1,0
Roche High Fidelity	5 U/µl	1 U / Ansatz	0,2

C: IGK-A One-Step-PCR

Mastermix	Stammkonz.	Endkonz.	µl/Ansatz
PCR Puffer II	10x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	5
dNTP-Mix	10 mM	0.2 mM	1
H ₂ O			22,8
Primer-Mix forward primer	100 µM	0,1 µM je Primer	0,6
Primer-Mix reverse primer	10 µM	0,1 µM je Primer	2,0
Roche High Fidelity	5 U/µl	1 U / Ansatz	0,2

D: IGK-B One-Step-PCR

Mastermix	Stammkonz.	Endkonz.	µl/Ansatz
PCR Puffer II	10x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3
dNTP-Mix	10 mM	0.2 mM	1
H ₂ O			28,8
Primer-Mix forward primer	100 µM	0,1 µM je Primer	0,6
Primer-Mix reverse primer	10 µM	0,1 µM je Primer	2,0
Roche High Fidelity	5 U/µl	1 U / Ansatz	0,2

E: PCR Ansatz

Tube	DNA	DNA-	D50X	D70X	spike-in	BC
1 -x	D-XX	500ng	0,8µl	2µl	2µl	50ng
BC	BC (100ng)	100ng	0,8µl	2µl	0µl	0ng
NTC	Aqua	0,00	0,8µl	2µl	0µl	0ng

F: PCR Cycler Programm

Thermocycler			
1 cycles	initial denaturation	94° C	5 min
35 cycles	denature	94° C	45 sec
	anneal	60° C	45 sec
	extend	72° C	1 min
1 cycles	final extension	72° C	10 min
		4° C	10 min

Tabelle 7: Primer-Liste Ein-Schritt-PCR. Index-Sequenzen (D501-508 und D701-712) entsprechen Tab. 3: Primer-Liste Zwei-Schritt-PCR (PCR 2).

Tube	Primernamen	Richtung	Index	Index-sequenz	vollständige Primersequenz
IGH-DJ	IGH-D-A-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGATTCTGAAACAGCCCGAGTCA
	IGH-D-B-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGATTTGTGGGGYTCGTGTC
	IGH-D-C-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTTGRRRTGAGGTCTGTGTCA
	IGH-D-D-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTTTRRRRTGAGGTCTGTGTCA
	IGH-D-E-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTTTTGTGAAGGSCCCTCCTR
	IGH-D-F-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTTATTGTCAGGSRGTGTCAGAC
	IGH-D-G-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTTATTGTCAGGGGTGTCAGRC
	IGH-D-H-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTTTCTGAAGSTGTCTRTCAC
	IGH-J-FR1-A-1_DXXX	3'	DXXX	XXXXXXXX	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCTGAGGAGACGGTGACC
IGH-VJ	IGH-V-FR1-B-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAA
	IGH-V-FR1-E-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGAGGTGCAGCTGTTGGAGTC
	IGH-V-FR1-G-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCAGTGGGGCGCAGGACTGTT
	IGH-V-FR1-H-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCAGGACTGGTGAAGCCTCC
	IGH-V-FR1-K-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGG
	IGH-V-FR1-L-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAAACCCACAGAGACCCCTACGCTGAC
	IGH-V-FR1-M-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTGGGGGCTCCGTGAGACTCCTGT
	IGH-V-FR1-N-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTCAGACCCCTGTCCCTCACCTG
	IGH-V-FR1-O-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTCCGACACCCCTCACTCACCTGTG
	IGH-J-FR1-A-1_DXXX	3'	DXXX	XXXXXXXX	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCTGAGGAGACGGTGACC
	IGH-V-FR1-B-1_DXXX	3'	DXXX	XXXXXXXX	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTCACCCTGAGGAGACGGTGACC
	IGH-V-FR1-A-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG
	IGH-V-FR1-C-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCC
	IGH-V-FR1-D-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGGTGCAGCTGGTGGAGTC
	IGH-V-FR1-F-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCAGGACTGGTGAAGCCTTC
	IGH-V-FR1-I-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTACAGCTGCAGCAGTCAAG
	IGH-V-FR1-J-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGCTGGTGCATCTGGGGTCTG
	IGK-A	IGK-V-A-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX
IGK-V-B-1_DXXX		5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGTCCCATCTCGGTTCAAGTGGCAG
IGK-V-C-1_DXXX		5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGAAACAGGGTCCCATCAAGGTTCC
IGK-V-D-1_DXXX		5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTCCCAGACAGATTCAAGTGGCAGTG
IGK-V-E-1_DXXX		5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTGGAGTCCAGATAGGTTCAAGT
IGK-V-F-1_DXXX		5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCTCGAGTCCCAGACAGGTTCCAG
IGK-V-G-1_DXXX		5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGCATCCCAGCCAGGTTCAAGT
IGK-V-H-1_DXXX		5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCA
IGK-V-I-1_DXXX		5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAATCCCACCTCGATTCAAGTGGC
IGK-V-J-1_DXXX		5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTCAGGGTCCCCTGAGGTTCC
IGK-V-K-1_DXXX		5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGACACTGGGGTCCCAGGCCA
IGK-DE-A-1_DXXX		3'	DXXX	XXXXXXXX	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGCTGCAGACTCATGAGGAG
IGK-B	IGK-J-A-1_DXXX	3'	DXXX	XXXXXXXX	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGTTTATCTCCACCTTGGTCCC
	IGK-J-B-1_DXXX	3'	DXXX	XXXXXXXX	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGTTTATCTCCACCTTGGTCCC
	IGK-J-C-1_DXXX	3'	DXXX	XXXXXXXX	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGTTTATCTCCACCTTGGTCCC
	IGK-INTR-A-1_DXXX	5'	DXXX	XXXXXXXX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGAGTGGCTTGGTGGCCATGC
	IGK-DE-A-1_DXXX	3'	DXXX	XXXXXXXX	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGCTGCAGACTCATGAGGAG

Indexsequenzen D501-508 und D701-712 siehe Tabelle 3 (Primerliste Two-Step PCR (PCR 2))

Tabelle 8: PCR-Protokolle ddPCR: A: Zusammensetzung Primer-Mix, B: PCR-Protokoll ddPCR, C: Pipettierschema ddPCR, D: Cyclyer Programm (Thermocycler) mit Anzahl, Temperatur und Länge der PCR-Zyklen.

A: Primer-Mix ddPCR

Primer-Mix	Stammkonz.	Endkonz.	µl / Ansatz
H ₂ O			19
forward primer	100 µM	10 µM	2,5
reverse primer	100 µM	10 µM	2,5
RQ-Sonde	100 µM	4 µM	1

B: PCR Protokoll ddPCR

PCR-Mastermix	Stammkonz.	Endkonz.	µl / Ansatz
2x ddPCR Supermix	5x	1x	10
H ₂ O			3
Primer-Mix	20x	1x	1,0
HINFI	5U/µl	5U	1

C: PCR-Ansatz ddPCR

Tube	DNA	DNA-Menge (je 1µl)	PCR-Mastermix
1 -x (je 2 fach Ansatz)	D-XX	500ng	15 µl
pos. Kontrolle (2 fach Ansatz)	BC (100ng)	100ng	15 µl
neg. Kontrolle (2 fach Ansatz)	Aqua	0,00	15 µl

C: PCR-Ansatz ddPCR

Thermocycler			
1 cycles	initial denatu	95° C	10 min
40 cycles	denature	94° C	30 sec
	anneal	60° C	1 min
1 cycles	final extensio	98° C	10 min

Tabelle 9: Kriterien der Ansprechkategorien. Kriterien gemäß der durch die IMWG formulierten *International uniform response criteria for multiple myeloma* (12)

Ansprech-kategorie	Kriterien
CR	negative Immunfixation aus Blut und Urin und Fehlender Nachweis eines Weichteilplasmozytom und ≤ 5% Plasmazellen im Knochenmark
sCR	CR wie oben definiert plus normale FLC-Ratio und Kein Nachweis von klonalen Zellen im KM durch Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz
VGPR	Nachweisbarer M-Gradient im Blut und Urin mittels Immunfixation aber nicht durch Elektrophorese oder Reduktion des M-Proteins im Blut um ≥ 90% plus < 100 mg/24h M-Protein im Urin
PR	Reduktion des M-Proteins im Blut um ≥ 50% und im Urin ≥ 90% Urin oder auf < 200 mg/24h Reduktion der Differenz zwischen involvierten und uninvolierten FLC-Leveln um ≥ 50%, bei fehlendem Nachweis von M-Protein im Blut und Urin als Ersatz für die M-Protein Kriterien Bei Vorliegen von initial ≥ 30% Plasmazellen eine Reduktion um ≥ 50%, bei fehlendem Nachweis von M-Protein und freien Leichtketten im Blut Zusätzlich der oben genannten Kriterien eine Reduktion des Weichteilplasmozytoms um ≥ 50% nötig sofern initial vorhanden
SD	Nicht Zutreffen der Kriterien für CR, VGPR, PR oder progressive disease

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Monika Brüggemann für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung in allen Phasen der Dissertation. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Auch danke ich Dr. Michaela Biehl-Kotrová für die Betreuung meiner Dissertation, die wertvollen Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei dem Team des Hämatologie Labor Kiels für die nette Arbeitsatmosphäre bedanken. Insbesondere danke ich Birgit Fricke und Petra Chall für die Laboreinarbeitung, die Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche und ihre unermüdliche Geduld bei der Beantwortung aller meiner Fragen.

Meinen Eltern, Katinka und Michael, danke ich für ihre Geduld und die uneingeschränkte, liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums und dieser Arbeit. Ohne die stetigen Anregungen und Ermunterungen wäre diese Arbeit sicher nicht zustande gekommen.

Des Weiteren danke ich meinen Freunden Puya und Pascal, sowohl für ihre emotionale Unterstützung, als auch die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Last but not least I want to thank Dr. Nikos Darzentas for the help with my data analysis and all the profound discussions we had. He has been a welcome side effect of this work and has made my life better ever since.

Veröffentlichungen

Appelt F, Kotrová M, Wangemann J, et al.

Amplicon next-generation sequencing (NGS) of rearranged immunoglobulin (IG) loci is advantageous for clonal marker identification and minimal residual disease (MRD) detection in multiple myeloma (MM).

EHA Conf. 2018.

Stübig T, Langer C, Engelhardt M, et al.

Lenalidomide, Adriamycin and Dexamethasone (RAD) Versus Bortezomib, Lenalidomide and Dexamethasone (VRD) in Newly Diagnosed Multiple Myeloma (MM) - Post-Induction Response and MRD Results By Flow Cytometry and NGS from a Phase 3 Randomized Controlled Clinical Trial (RCT).

Blood. 2018;132(Supplement 1):1979–1979.

Chitadze G, Stengel A, John-Klaua C, et al.

TP53 Somatic Mutations as pre-leukemic events in Acute Lymphoblastic Leukemia.

HemaSphere. 2019;3(S1):16–17.

Knecht H, Reigl T, Kotrová M, et al.

Quality control and quantification in IG/TR next-generation sequencing marker identification: protocols and bioinformatic functionalities by EuroClonality-NGS.

Leukemia. 2019;33(9):2254–2265.