

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

**Etablierung eines NGS-basierten Verfahrens zur Bestimmung
minimaler Resterkrankung bei B-Zell-Lymphomen anhand zellfreier
DNA**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von

Anna Helene Berkovic
aus Göttingen

Kiel 2022

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

2. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. Eva Maria Murga Penas, Institut für Humangenetik, Institut für Humangenetik - Campus Lübeck

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.11.2022

gez.: Priv.-Doz. Dr. Martin Neumann

(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung	1
1.1 Lymphatische Neoplasien	1
1.2 Minimale Resterkrankung	2
1.3 Klonale Immunglobulingenumlagerungen.....	4
1.4 Zellfreie DNA.....	5
1.5 Hochdurchsatzsequenzierung (Next Generation Sequencing).....	5
1.6 Zellfreie DNA in der MRD Diagnostik.....	6
1.7 Ziele und Fragestellung der Arbeit.....	8
2 Methoden	9
2.1 Arbeitsmaterialien	9
2.1.1 Material und Geräte.....	9
2.1.2 Reagenzien, Chemikalien	10
2.1.3 Software	12
2.2 Patientenproben.....	13
2.3 Probenvorbereitung.....	14
2.3.1 Plasmaasservierung.....	14
2.3.2 DNA Extraktion.....	15
2.3.3 Quantifizierung und Qualitätskontrolle zellfreier DNA	15
2.4 Probenanalyse	16
2.4.1 Markerscreening mittels Konsensus PCR.....	16
2.4.2 Markerscreening mittels IGHV-NGS	17
2.4.3 MRD Bestimmung mittels IGHV-NGS	21
2.4.4 MRD Bestimmung mittels RQ-PCR.....	22
2.4.5 MRD Bestimmung mittels ddPCR	24
2.4.6 Design neuer IGHV-FR3 Primer für ultrakurze DNA Fragmente.....	24
2.4.7 NGS-Datenanalyse	27
2.4.8 Statistische Auswertung	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Etablierung, Optimierung und Validierung der Extraktion zellfreier DNA.....	29
3.1.1 DNA Extraktion.....	29

3.1.2	Einfluss des Plasmaeinsatzvolumen	30
3.1.3	Quantifizierung der zellfreien DNA	31
3.1.4	Qualitätskontrolle der extrahierten zellfreien DNA	32
3.1.5	Ermittlung der Tumorlast über die Menge an zellfreier DNA im Plasma ..	36
3.2	Markerscreening mittels Konsensus PCR und NGS	38
3.2.1	Vergleich zwischen RQ-PCR und ddPCR zur MRD Detektion	43
3.2.2	Validierung der MRD Bestimmung mittels ddPCR in zellfreier DNA	44
3.2.3	IGHV-NGS zur MRD Detektion	45
3.2.4	„Proof of principle“ in zwei Fällen aus klinischen Studien	47
3.3	Etablierung eines optimierten IGHV-FR3 Primer-Sets.....	48
4	Diskussion.....	52
5	Zusammenfassung und Ausblick	62
6	Literaturverzeichnis	64
7	Anhang.....	72
	Danksagung.....	76
	Publikationen	77

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
ASO	Allelspezifisches Oligonukleotid; In dieser Arbeit ddPCR bzw. RQ-PCR-Primer oder -Sonde mit Komplementarität zu einer patientenspezifischen Sequenz
BLQ	Unterhalb des quantitativen Messbereiches (engl. below quantitative range)
B-NHL	B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom
BSA	Bovines Serumalbumin
C1D1	1. Tag des 1. Chemotherapiezyklus der Bo29563-Studie (engl., cycle 1 day 1)
CDR3-Region	Hypervariable Region der Immunglobuline (engl. complementarity determining region)
cfDNA	Zellfreie DNA
CTCs	Zirkulierende Tumorzellen (engl. circulating tumor cells)
ctDNA	Zirkulierende Tumor DNA (engl. circulating tumor DNA)
R	Klinische Remission
ddPCR	Digital droplet PCR
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
dNTP's	Desoxynukleotidtriphosphate
EOI	Zeitpunkt nach Abschluss der Induktionschemotherapie der Bo29563-Studie (engl. end of induction)
EuroClonality NGS	Division der ESLHO, europäisches Konsortium für IGH-NGS

EuroMRD-Guidelines	Leitlinien des Europäische Konsortiums zur MRD-Diagnostik, Division der ESLHO (früher European Study Group on MRD-Detection in ALL, ESG-MRD-ALL-Guidelines)
FL	Folikuläres Lymphom
FLIPI	Follicular Lymphoma Prognostic Index zur Einschätzung des Gesamtüberlebens basierend auf klinischen Informationen
FR1/ -2/ -3-Region	Konservierte Gerüstregionen der Immunglobulingene (engl. framework region)
gDNA/DNA	Zelluläre (genomische) DNA
HL	Hodgkin-Lymphom
IGH	Immunglobulinschwerkette (engl. immunoglobulin heavy chain) oder Immunglobulinschwerkettengen-Lokus
MCL	Mantelzelllymphom
MM	Multiples Myelom
MRD	Minimale Resterkrankung (engl. minimal residual disease)
NGS	Next Generation Sequencing
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
P	Klinischer Progress
PB	Peripheres Blut
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PFS	Progressionsfreies Überleben (engl. progression free survival)
PM	Primärmaterial
R-CHOP	Rituximab + Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, Prednisolon

RQ-PCR	Quantitative real-time PCR (engl. real-time quantitative PCR)
t(11;14)-Translokation	Reziproke t(11;14)(q13;q32)-Translokation mit Überexpression von Cyclin D1
t(14;18)-Translokation	Balancierte t(14;18)(q32;q21)-Translokation mit Bildung eines <i>BCL2/IGH</i> -Fusionsgen
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VM	Verlaufsmaterial
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Lymphatische Neoplasien

Lymphatische Neoplasien sind vorwiegend solide Tumore des Immunsystems mit steigender Inzidenz. Rund 10 % der lymphatische Neoplasien gehören zur Gruppe der Hodgkin-Lymphome (HL), während die Mehrheit klinisch als sogenannte Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) bezeichnet werden und meist im Alter von über 65 Jahren auftritt. Es handelt sich dabei um sehr heterogene Erkrankungen mit einem breiten klinischen Krankheitsbild, dem verschiedene histologische und genetische Merkmale zugrunde liegen. Das Ansprechen auf verschiedene Therapien ist sehr unterschiedlich und eine Diagnose oft schwierig (Armitage et al., 2017; Fuchs et al., 2017).

Es existieren verschiedene Klassifikationen der NHL, doch die der WHO ist die weitläufigste und hat eine beträchtliche Bedeutung für die Prognose und die Wahl der Therapie (Fischer et al., 2007; Swerdlow et al., 2018).

Danach werden lymphatische Neoplasien ihrem Ursprung zufolge in T-Lymphozytäre oder B-Lymphozytäre (85-90%) Neoplasien unterteilt (Armitage et al., 2017; Swerdlow et al., 2018).

Prognostisch wichtig ist auch die klinische Unterscheidung zwischen Lymphomen mit indolentem und aggressivem Verlauf (Fischer et al., 2007).

Die häufigsten Vertreter dieser reifen B-Zell Neoplasien sind das Follikuläre Lymphom (FL, 22% aller NHL) mit einem indolenten Verlauf und das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL, 35% aller NHL), welches zu den aggressiven NHL gehört (National Guideline Alliance (UK) 2016). Im nachfolgenden Text dieser Dissertation werden unter dem Begriff „NHL“ verschiedene Subgruppen reifer B-Zell Neoplasien zusammengefasst.

Ein genetisches Charakteristikum für das FL ist vor allem die Chromosomentranslokation $t(14;18)(q32;q21)$, infolgedessen das *BCL2*-Gen auf Chromosom 18 in die Nähe des Immunoglobulinschwerkettengen-Lokus auf Chromosom 14 transloziert wird und so durch eine konsekutive Überexpression des *BCL2*-Gens eine Dysregulation der Apoptose hervorruft (Correia et al., Blood;

Loeffler et al., 2015). In 30-40% der FL Fälle ist eine Transformation zum aggressiveren DLBCL zu beobachten (Pasqualucci et al., 2014).

Das Mantelzelllymphom (MCL, 5-7% aller NHL) zeigt klinisch ebenfalls einen aggressiven Verlauf und wird durch die Chromosomentranslokation t(11;14) (q13;q32) charakterisiert. Diese Translokation führt zur Überexpression von Cyclin D1 (*CCND1*), welches die Zellproliferation von malignen Zellen durch seine Beteiligung in der Zellzyklusregulation auslöst (Bea et al., 2013; Wu et al., 2016).

Die genannten Chromosomentranslokationen sind mit zytogenetischen, molekularzytogenetischen und molekulargenetischen Methoden mit unterschiedlicher Häufigkeit nachweisbar und sind für die Diagnostik spezifischer Lymphomsubgruppen relevant.

1.2 Minimale Resterkrankung

Unter dem Begriff minimale Resterkrankung (engl. minimal residual disease, oder MRD) versteht man die residuelle Erkrankung nach einer krankheitsspezifischen Therapie, ohne dass diese mit konventionellen Untersuchungsmethoden nachweisbar ist. Die Kontrolle und der Nachweis minimaler Resterkrankung in Lymphomen ist in vielerlei Hinsicht von großem Nutzen. Sie dient der Überwachung der Therapieeffektivität, sowie dem frühen Nachweis von Rezidiven und ermöglicht somit die Veränderung oder Intensivierung der Therapie. Außerdem gilt die Bestimmung der MRD als wichtiger Prognosefaktor für den Krankheitsverlauf bei verschiedenen Lymphom- und Leukämieentitäten (Campana, 2009; Pott et al., 2013 a).

Es existieren verschiedene Methoden zur Bestimmung von MRD, wie die Durchflusszytometrie, die quantitative Echtzeit-PCR und neuere Sequenzierungsverfahren der nächsten Generation (next generation sequencing oder NGS). Die allel-spezifische (ASO-)quantitative Echtzeit-PCR (RQ-PCR) zählt dabei zu den am besten standardisierten und validierten Quantifizierungsmethoden und gilt somit als goldener Standard für die MRD-Erfassung (Pott et al., 2013 a; van der Velden et al., 2003). Die Abhängigkeit von einer Standard-Kurve im Sinne einer indirekten Quantifizierung aus diagnostischem Material und die unzuverlässige Quantifizierung bei Proben mit geringer Tumorlast stellen jedoch die Hauptlimitationen dieser Methode dar.

Eine neuere Methode ist die digital droplet PCR (ddPCR). Diese gewährleistet eine absolute Quantifizierung der MRD, ohne den Gebrauch einer Standardkurve und unter Beibehalt der Reproduzierbarkeit und Sensitivität (Drandi et al., 2015). Durch Vereinzelung der DNA Moleküle in einer Wasser-Öl Emulsion und Amplifikation mit der DNA Polymerase in den vereinzelt DNA Molekülen kann aus dem Verhältnis positiver und negativer „droplets“ ein digitales Ergebnis ausgelesen werden. Der Anteil positiver Moleküle ist proportional zur eingesetzten DNA Menge der amplifizierten DNA Sequenz, so dass dies zur Mengenbestimmung verwendet werden kann. Die Möglichkeit der absoluten Quantifizierung ohne einen externen Kalibrator stellt den größten Vorteil der ddPCR im Verhältnis zur RQ-PCR dar.

Die Identifizierung eines klonalen Markers ist für alle PCR-basierten Methoden zur MRD Bestimmung Voraussetzung.

Im Falle des FL kann beispielsweise die tumor-spezifische Translokation t(14;18) herangezogen werden, welche jedoch nur in 50-65 % der Patienten anhand der PCR zu erfassen ist, während beim DLBCL eine krankheitsspezifische Translokation häufig fehlt. Für fast alle B-Zell Neoplasien kann die klonale Immunglobulinschwerkettengenumlagerung (IGH) PCR-basiert nachgewiesen und für die MRD Erfassung verwendet werden. Diese stellen den genetischen Fingerabdruck jedes Lymphozyten dar und können insbesondere für klonale B-Zell-Erkrankungen entitätenübergreifend als MRD Marker verwendet werden.

Zur sensitiven Erfassung dieser klonalen IGH-Genumlagerungen werden allelspezifische Primer generiert, die in der RQ-PCR oder ddPCR verwendet werden (Pott et al., 2013 a; Vega et al., 2003 Drandi). Eine Herausforderung stellt in diesem Zusammenhang die somatische Hypermutation des IGHV-Lokus in reifen B-Zellen dar, infolge derer durch Punktmutationen an den Primerbindungsstellen des IGHV-Gens die MRD Bestimmung, vor allem bei stärker mutierten reifen B-NHL keine reproduzierbare Sensitivität erreicht (Bahler et al., 1992).

Neue, NGS-basierte Verfahren könnten potentiell die Grenzen der PCR-basierten Verfahren überwinden. Pott et al. haben gezeigt, dass eine NGS-basierte MRD Diagnostik mittels Identifikation des dominanten IGHV Klonotyps und dessen Nachverfolgung im Krankheitsverlauf mittels NGS eine zuverlässige Alternative zur MRD Bestimmung in FL ist. Allerdings spielt die Tumordinfiltration in den diagnostischen Proben eine wichtige Rolle (Pott et al., 2013 b). Eine weitere Möglichkeit der MRD-Bestimmung mittels NGS ist die Identifikation tumorspezifischer

Mutationen und deren Nachverfolgung im Krankheitsverlauf. Die wichtigsten Vertreter dieser Mutationen sind vor allem solche, die als Treibermutationen relevant für die Tumorgenese sind (Newman et al., 2014; Scherer et al., 2016).

Diese Arbeit konzentriert sich auf die MRD Detektion anhand klonenspezifischer IGHV-Rekombinationen mit den Methoden RQ-PCR, ddPCR und IGHV-NGS.

1.3 Klonale Immunglobulingenumlagerungen

Während der frühen Entwicklung und Differenzierung von B Zellen werden die V (variable), D (diversity) und J (joining) Regionen der Gene für die Immunglobulinschwerketten (IGH, engl. IG-heavy chain) rekombiniert (Tonewaga et al., 1983). Dadurch entstehen für jeden Lymphozyten spezifische VDJ Rekombinationen, welche die variable IGHV-Domäne kodieren. Der IGH-Lokus beinhaltet 27 IGHD, 6 IGHI, sowie 38-46 funktionelle IGHV Gene (Matsuda et al., 1998). Eine zusätzliche Diversifizierung entsteht durch das willkürliche Schneiden und Zusammenfügen der Schnittstellen durch eine Exonuklease und die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT), sowie durch den Einbau zufälliger Nukleotide, welches zur Entstehung der N-diversity Regionen führt (Tonegawa et al., 1983). Zunächst wird ein D Gen mit einem J Gen kombiniert, gefolgt von der Addition eines V Gens (Abbildung 1.1). Die entstandene V-D-J Junktion kodiert dann für die complementary determining region 3 (CDR3), welche die Region der V Domäne mit der höchsten Diversität ist (Kabat et al., 1988).

Diese klonalen IGHV-Rekombinationen stellen den genetischen Fingerabdruck jeder B-Zelle und somit auch jeder B-Zell Neoplasie dar und können für die Erfassung von MRD als Zielsequenz verwendet werden.

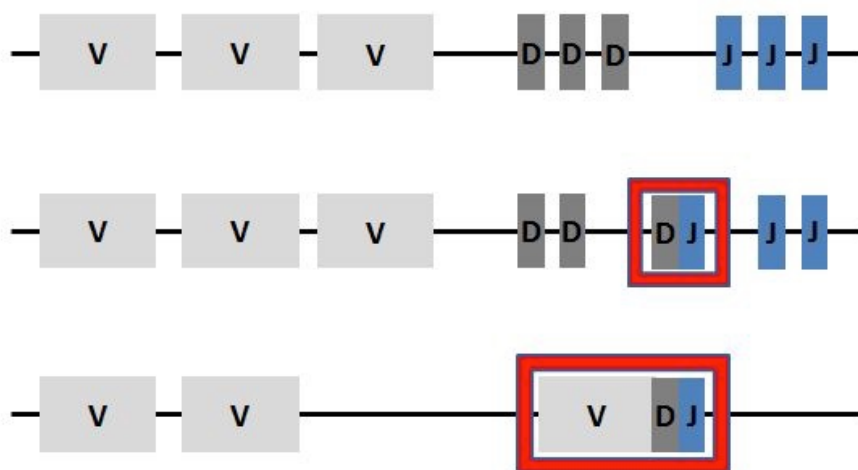


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung einer V-D-J Rekombination.

1.4 Zellfreie DNA

Zellfreie DNA (engl. cell-free DNA oder cfDNA) beschreibt kurze DNA Fragmente, die sowohl von gesunden als auch von Tumorzellen in den Blutstrom freigesetzt werden. Bestimmte Konditionen, wie Herzinfarkte, Schlaganfälle Autoimmunerkrankungen und Schwangerschaft sind ebenfalls mit einer Erhöhung der cfDNA Level assoziiert (Snyder et al., 2016). Neben der Isolation der cfDNA aus Plasma und Serum kann diese auch im Urin und Liquor gefunden werden (Casadio et al., 2013; Pan et al., 2015).

Eine Freisetzung der cfDNA geschieht durch drei Mechanismen: Apoptose, Nekrose und Sekretion. Die Durchschnittliche Länge der cfDNA Fragmente beträgt 160-180 Basenpaare (Buedts et al., 2016), wobei ein prominenter Peak bei ca 166 bp mit der DNA Länge in einem Chromosom (Nukleosom + linker Histon H1) korreliert (Lo et al., 2010). Größere cfDNA Fragmente entstehen durch Nekrose, da die nekrotische DNA unspezifisch und inkomplett abgebaut wird (Stroun et al., 2001).

Die Halbwertszeit der cfDNA im Blut beträgt zwischen 16 Minuten und 2,5 Stunden, womit die Gewinnung von Tumor-generierter cfDNA aus dem Blut, auch „Liquid Biopsy“ genannt, einen nichtinvasiven Schnappschuss des Tumors in Echtzeit gewährleistet (Buedts et al., 2016; Diehl et al., 2008; Yao et al., 2016).

In gesunden Individuen entsteht die Mehrzahl der cfDNA aus lymphoiden oder myeloiden apoptotischen Zellen (Snyder et al., 2016). Der Anteil der Tumor-generierten cfDNA im Blut von Patienten, oder auch zirkulierende Tumor DNA (ctDNA), variiert stark und wird durch verschiedene Faktoren, wie beispielsweise die Tumorart- und das Stadium beeinflusst (Bettegowda et al., 2014).

1.5 Hochdurchsatzsequenzierung (Next Generation Sequencing)

Die Hochdurchsatzsequenzierung, auch als „Next Generation Sequencing“ (NGS) bezeichnet, ist eine neue revolutionäre Methode, die es ermöglicht ein gesamtes menschliches Genom durch die parallele Produktion von Millionen von Sequenzen (Reads) in einem Sequenzierlauf innerhalb eines Tages zu sequenzieren, daher auch die Synonyme „high throughput sequencing“ oder „deep sequencing“ .

Im Gegensatz zu den etablierten Methoden RQ-PCR und ddPCR kann mittels NGS ein größeres Spektrum an Mutationen erfasst werden, ohne spezifisches Vorwissen über das gesuchte Gen bzw. den gesuchten Genlokus zu benötigen. Durch das

Wegfallen patientenspezifischer Primer, die speziell zur Detektion eines bestimmten Tumormarkers entworfen werden, sind NGS-basierte Untersuchungsverfahren auf eine große Population und, neben der Tumordiagnostik, für die Diagnostik vieler verschiedener Erkrankungen anwendbar.

Um die Sensitivität für die Detektion eines gesuchten Tumormarkers und die Bestimmung der teils nur ausgesprochen geringen residuellen Tumorlast zu erhöhen, wird die Sequenzierung ausgewählter Zielgene denen der Sequenzierung ganzer Genome oder Exome vorgezogen.

Für die MRD Bestimmung werden gezielte tumor-spezifische Regionen mit hoher Abdeckung sequenziert. Hierbei kann eine Sensitivität von einer Lymphomzelle in bis zu 10^6 Zellen erreicht werden, vorausgesetzt die eingesetzte Zellzahl zur Analyse beträgt mindestens 10^6 (Logan et al., 2014).

Gezielte Ansätze sind z.B. Amplikon-basierte oder sogenannte Hybrid-Capture Verfahren, die es ermöglichen eine bestimmte Genregion zu vervielfältigen (Scherer et al., 2017).

Diese Arbeit konzentriert sich auf das Amplikon-basierte NGS der IGHV-Region. Hierbei werden spezifische Primermixe verwendet, um die Region der Wahl, in diesem Fall die variable Region des IGH-Gen zu amplifizieren. Die dadurch entstehenden DNA Fragmente, oder Amplikons sind mit Adaptern für die spätere Vervielfältigung, sowie proben-spezifischen Barcodes zur späteren Identifikation versehen und bilden die sogenannte „Library“ für die Sequenzierung .

Die Adapter binden an eine sogenannte „flow cell“ des Sequenziergeräts und werden mittels „bridge amplification“, oder Brücken-PCR so vervielfältigt, dass Amplikoncluster entstehen. Das auch für diese Arbeit verwendete Illumina Sequenziergerät folgt dabei dem Prinzip des „Sequencing-by-Synthesis“. Hier wird ein fluoreszierendes Nukleotid nach dem anderen in den neu entstehenden, komplementären DNA Strang inkorporiert, wobei die emittierte Fluoreszenz detektiert und somit eine Sequenzierung in Echtzeit gewährleistet wird

1.6 Zellfreie DNA in der MRD Diagnostik

Die Nutzung der cfDNA für die MRD Detektion stellt eine schnelle, wenig invasive und präzise Alternative zu herkömmlichen Verfahren in vielen Tumorentitäten dar. Ein wichtiger Vorteil ist die Möglichkeit der nicht invasiven MRD Bestimmung auch

z.B. bei soliden Tumoren, welche sich nicht leukämisch verhalten (Chin et al., 2019). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die cfDNA, anders als gezielte Tumorbiopsien, die gesamte molekulare Tumorerheterogenität widerspiegeln kann.

Eine Hürde stellt die äußerst geringe Menge der cfDNA dar. Es wird eine hohe Sensitivität der molekularen Methoden zur MRD-Bestimmung verlangt, um diese geringen Mengen detektieren zu können. Durch die neusten Fortschritte in der PCR und in der Sequenzierung ist es jedoch möglich, die „liquid biopsy“ auf hämatologische Erkrankungen anzuwenden (Dogliotti et al., 2018).

Für die Anwendung der cfDNA muss wie bei genomischer DNA zunächst ein klonaler Marker für die Erkrankung identifiziert werden. Die Wahl eines Markers ist abhängig von der Tumorentität. In hämatologischen Erkrankungen der B-Zellen kommen hier vor allem die IGHV-Rekombination, spezifische Translokationen oder Punktmutationen in Frage. Zur Identifikation des klonalen Markers wird im Allgemeinen genomische DNA aus Tumorgewebe oder infiltriertem Blut und/oder Knochenmark verwendet. Mit einem NGS-basierten Markerscreening erfolgt für jeden Patienten eine Identifizierung des krankheitsspezifischen Klonotypen für jeden einzelnen Marker, der dann zur MRD Bestimmung mittels NGS oder auch PCR-basiert verwendet wird (Brüggemann et al., 2019; Rossi et al., 2017).

Der Goldstandard für die MRD Detektion in genomischer DNA stellt die quantitative PCR (RQ-PCR, qPCR) dar, mit der eine Sensitivität von $1.00 \times 10^{-4} / 1.00 \times 10^{-5}$ in einem polyklonalen Hintergrund erreicht werden kann, vorausgesetzt die eingesetzte Zellzahl ist entsprechend hoch. Da bei der Bestimmung der ctDNA als Anteil der insgesamt vorliegenden Menge an cfDNA der Bezug zu einer definierten eingesetzten Zellzahl nicht erfolgen kann, ist die Bestimmung der Sensitivität schwierig. Um eine Bezugsgröße herzustellen werden die Ergebnisse daher als ctDNA pro ml Plasma angegeben.

NGS-basierte oder PCR basierte Verfahren können gleichermaßen zum Nachweis von MRD aus cfDNA verwendet werden, die ddPCR stellt hier eine sensitive und gleichzeitig quantitative PCR basierte Methode dar. Camus et al. haben in ihrer proof-of-concept Studie die Reproduzierbarkeit und die einfache Umsetzbarkeit der ddPCR in der Detektion somatischer Mutationen in der zellfreien DNA von DLBCL Patienten demonstriert (Camus et al., 2016).

Kubiczkova-Besse et al. haben anhand von 13 Patienten mit Multiplem Myelom gezeigt, dass die ddPCR präziser die gesuchte IGHV-Rekombination aus der cfDNA

quantifiziert als die qPCR (Kubiczkova-Besse et al., 2014). Cavalli et al. bestätigen die höhere Sensitivität der ddPCR in der Detektion der *BCL2*-Rekombination aus zellfreier DNA in Patienten mit FL (Cavalli et al., 2017). Die ddPCR ist folglich ein schnelles, zuverlässiges und günstiges Verfahren zur MRD Detektion in cfDNA.

Auch über NGS kann ctDNA sensitiv und spezifisch nachgewiesen werden. Neben dem Nachweis residueller ctDNA anhand klonaler Immungenumlagerungen kann über die Analyse von Mutationspanels die gesamte Tumorerogenität und auch die genetische Tumorentwicklung erfasst werden. Roschewski et al. haben gezeigt, dass die NGS-basierte Analyse zellfreier DNA die Dynamik in der Tumorentwicklung von DLBCL Patienten erfassen, den Therapieerfolg evaluieren und eine präzisere Prognose des Krankheitsverlaufs erstellen kann (Roschewski et al., 2016).

Um die Nutzung der cfDNA mittels NGS in der Routine anzuwenden, fehlt bislang die Standardisierung der präanalytischen Handhabung zellfreier DNA, der Quantifizierung und des NGS-Workflows inklusive der bioinformatischen Analyse sowie größere Studienergebnisse zur prognostischen Bedeutung des MRD Nachweises in cfDNA.

1.7 Ziele und Fragestellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, zunächst präanalytische Konditionen der Handhabung von Blutproben für die cfDNA Extraktion zu definieren, die eine optimierte und reproduzierbar gute Extraktion von cfDNA erlauben.

Des Weiteren sollte die NGS-basierte MRD Diagnostik von cfDNA mittels Amplikonsequenzierung von Immunglobulingenen etabliert werden und ein optimierter Ansatz für die MRD Analyse mittels RQ-PCR, ddPCR und amplikon-basiertem NGS aus cfDNA definiert werden.

Insbesondere stellte sich die Frage, ob die Analyse zellfreier DNA in ihrer Sensitivität und Präzision so verbessert werden kann, dass die Liquid Biopsy auch in nicht-leukämischen Erkrankungen, wie dem FL und DLBCL als Alternative zu invasiven Biopsien in der Tumordiagnostik und vor allem in der MRD-Bestimmung im Rahmen klinischer Studien eingesetzt werden kann.

2 Methoden

2.1 Arbeitsmaterialien

2.1.1 Material und Geräte

Bezeichnung	Name (Hersteller)
25, 10 ml Stabpipette	(Sarstedt)
3,5 ml Transferpipetten	(Sarstedt)
50, 15, 10 und 1,5 ml Röhrchen	(Eppendorf)
Abzüge	UV-Cabinet for PCR operations (Grant-bio) HERAsafe (Heraeus)
Agilent 2100 Bioanalyzer	(Agilent Technologies)
BIO-RAD QX 200TM Droplet Generator	(BIO-RAD)
BIO-RAD QX 200TM Droplet Reader	(BIO-RAD)
Blutkörperchenzählgerät	KX-21N (Sysmex)
Chip Priming Station	(Agilent Technologies)
Chip Vortexer	(IKA)
ddPCR-Abdeckfolie	Pierceable Foil Heat Seal (Bio-Rad)
EDTA Monovetten	(Sarstedt)
Elektrophorese-Gießrahmen	(Easycast Owl Separationsystems)
Elektrophorese-Kämme	(Easycast Owl Separationsystems)
Elektrophoresekammer	Model B1A (Easycast Owl Separationsystems)
Gel-Dokumentation	Cell Biosciences, Alphamanager HP (Biozym)
Genescan-Sequenziergerät	3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
Heißsieglers	PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)
Inkubator mit Schüttler	Thermoshake (Gerhardt)
LightCycler 480 II	(Roche)
NGS-Sequenziergerät	Illumina MiSeq (Illumina)
PCR-Abdeckfolie	Light Cycler 480 Sealing Foil (Roche)
PCR-Strip	(Sarstedt)

Pipetten, Pipettenspitzen	(Eppendorf)
QIASymphony DNA Extraktor	(Qiagen)
Qubit 3.0 Fluorometer	Invitrogen Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Spannungsgeber	Power Supply (Bio-Rad)
STRECK® Tubes	Fusion2 Cell-Free DNA Blood Collection Tube (Streck)
TaqMan	(Applied Biosystems)
Thermo-Cycler	Labcycler (Sensoquest)
Transparente 96-well Platten	(Eppendorf)
Vortexer	Vortex Genie (Scientific Industries)
Wasserbad	Haake F2 (Haake)
Weißer 96-well Platten	Multiwell Plate 96 (Roche)
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 (Kendro), MC 6 Centrifuge (Sarstedt) Centrifuge 5415 D (Eppendorf) IKA mini G (IKA)

2.1.2 Reagenzien, Chemikalien

Bezeichnung

Name (Hersteller)

50-Basenpaar Leiter	Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific)
5-fach Sequenzierpuffer	(Applied Biosystems)
Agar	(Sigma-Aldrich)
Agarose	PeqGold Universal Agarose (PEQLAB)
Agilent Reagenzien	High Sensitivity DNA Reagents (Agilent Technologies)
Aqua dest.	(Merck)
BigDye-Terminator v1.1	(Applied Biosystems)
Bovines Serum Albumin (BSA)	(Serva)

cfDNA Extraktionskits	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) QIAamp MinElute ccfDNA Mini Kit (Qiagen) QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (Qiagen)
ddPCR Puffer	ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) (BIO-RAD)
Desoxynukleotide	dNTP's (Roth)
DNA Extraktionskit	QIASymphony DNA Midi Kit (Qiagen).
DNA Längenstandard	FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas), GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)
Droplet Öl	ddPCR Droplet Generator Oil for Probes (BIO-RAD)
Ethanol (>99 %)	(Merck)
Gel-Extraktionskit	Gel Extraction MinElute Kit (Qiagen)
HIDI-Formamid	(Thermo Fisher Scientific)
Interkalator	GeRED™ (Biotium)
Isopropranolol	(Merck)
Ladepuffer	10 X TBE, Glycerol, Bromphenolblau (AppliChem)
LC480 Puffer	(Roche)
Magnesiumchlorid	MgCl ₂ (Applied Biosystems)
NEBNext dsDNA Fragmentase (M0348)	(NEB, England)
PBS-Puffer	(Merck)
PCR-Puffer	PCR Buffer II (Applied Biosystems)
POP 4	(Thermo Fisher Scientific)
Primer	BIOMED-2 Primer (van Dongen et al., 2003), EuroClonality NGS IGHV-FR1 und -FR3 Primer (Brüggemann et al., 2019) (Metabion, Sigma)

Qubit Reagenzien	Quant-iT™ Qubit™ dsDNA HS Assay Kit
Reagenzien für die 2. NGS PCR	FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack (Roche)
ROX	(Thermo Fisher Scientific)
RQ-PCR-Master Mix plus	(Eurogentec)
Sepharose	(GE Healthcare)
Sequenzierkits	MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina)
	MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina)
	MiSeq Reagent Kit v2 Nano (Illumina)
Taq-Polymerase	Eagle Taq (Roche)
TBE-Puffer	(Amplichem)
TE-Puffer	Tris-Ethylendiamintetraessigsäure (Sigma)
Tween 20	(Sigma)

2.1.3 Software

Bezeichnung	Name (Hersteller)
Agilent 2100 Expert Software	(Agilent Technologies)
Alignment-Software	BioEdit (Ibis Biosciences), IMG/TV-Quest (The international immunogenetics information system)
ARResT/Interrogate	Bioinformatics analysis team, Inhouse Pipeline (Knecht et al., 2019; Bystry et al., 2016)
GeneScan-Software™	(Applied Biosystems)
Light Cycler 480 Software	(Roche)
QuantaSoft Version 1.7.4.0917	(BIO-RAD)
Software	
Screenshots	Hover Snap, Screen Cap (Freeware)
Sequenzier-Software	Sequencing Analysis (Applied Biosystems)
Textverarbeitung, Darstellung, Statistik	Word & Excel 2007 (Microsoft), R (The R Foundation), R-Studio (R Studio)

2.2 Patientenproben

Zunächst wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen an Plasmen einer Testkohorte von 30 freiwilligen, gesunden Probanden aus dem Hämatologielabor Kiel durchgeführt um die Methodik der Extraktion zellfreier DNA zu etablieren. Des Weiteren wurden zur Methodvalidierung der Extraktionsverfahren 31 Proben von Patienten der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel mit verschiedenen Tumorentitäten (16 Proben von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom, sowie 15 Proben von Patienten mit Bronchialkarzinom (13), oder Pankreaskarzinom (2)) verwendet.

Für die Etablierung des Markerscreenings mittels NGS und die nachfolgende MRD Analyse stand des Weiteren Material von 2 Patientenkohorten zur Verfügung:

1. Kohorte, Kieler Patienten: 22 Patienten (11 x FL, 1 x DLBCL, 10 x MCL) aus der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel. Dabei waren von 21 der 22 Patienten diagnostische Proben aus peripherem Blut und/ oder Knochenmark verfügbar, 2 diagnostische Plasmaproben sowie 185 Verlaufsmaterialien verschiedener Zeitpunkte aus Blut (125) und teilweise parallel aus Plasma (60). Die Patientenproben waren im Rahmen von Routineuntersuchungen entnommen worden und standen als sogenannte „leftover samples“ zur Verfügung, die Patienten hatten zuvor im Rahmen des Behandlungsvertrages mit dem UKSH der Verwendung der Materialien für Forschungszwecke zugestimmt. Ein Ethikvotum für diese Analysen liegt vor.

2. Kohorte, Studienpatienten mit Follikulärem Lymphom: DNA Proben aus peripherem Blut und Plasma von 36 Patienten mit einem FL, die im Rahmen der klinischen Studien „Bo29563“-Studie der Firma Hoffman-La Roche behandelt wurden (FL-Studienpatienten) und von denen uns im Rahmen eines wissenschaftlichen Begleitprogramms Material für die zentrale Diagnostik zur Verfügung stand. Im Rahmen des Behandlungsprotokolls erhielten die Patienten Atezolizumab in Kombination mit Obinutuzumab und Bendamustin oder Obinutuzumab mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison (CHOP). Es standen 35 Proben peripheren Blutes und 36 Plasmaproben vor Therapiebeginn (C1D1, cycle 1 day 1), sowie 34 Blutproben und 35 Plasmaproben im Verlauf, nach Induktion zur Verfügung (EOI, end of induction). Im Rahmen des Studieneinschlusses in diese Studie hatten die Patienten der Analyse an zellulärer und zellfreier Tumor DNA zugestimmt.

Die gesamten experimentellen Arbeiten, von der Probenannahme bis zu Datenanalyse, fanden im Hämatologielabor Kiel der Klinik für Innere Medizin II des UKSH statt.

2.3 Probenvorbereitung

2.3.1 Plasmaasservierung

Die Verarbeitung von Blutproben zur Extraktion zellfreier DNA ist zeitkritisch, um eine hohe Qualität der cfDNA zu gewährleisten. Bei Proben, die erst unter Zeitverzug bearbeitet werden können besteht die Gefahr, dass durch zelluläre DNA (gDNA) von apoptotischen Blutzellen eine Kontamination der cfDNA erfolgt. Verschiedene Hersteller bieten Fixierungsröhrchen an, um die Zellfraktionen des peripheren Bluts während des Transports zu stabilisieren. Sogenannte STRECK® Röhrchen beinhalten neben dem Gerinnungshemmer K_3EDTA ein formaldehydfreies Präservativ, welches zur Stabilisierung der Blutzellen beiträgt und eine Kontamination durch zelluläre DNA verringert (Norton et al., 2013). Zum Vergleich mit gebräuchlichen EDTA Monovetten wurde parallel Blut von 8 Patienten des UKSH in EDTA Röhrchen und STRECK® Röhrchen asserviert und vergleichend untersucht.

Das Blut aus EDTA Monovetten, sowie aus STRECK® Röhrchen aller Kieler Probanden wurde innerhalb von 4 Stunden bzw. das der o.g. 8 Vergleichspatienten nach 4 und 30 Stunden nach folgendem Schema zweimalig abzentrifugiert, um das Plasma zu gewinnen:

10 Minuten bei 1900 x g (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments)

10 Minuten bei 16000 x g und jeweils 4°C (Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific).

Das Plasma wurde anschließend in 1-4 ml Aliquots bei -80°C für die spätere cfDNA Extraktion eingefroren.

Die Plasmaasservierung der Bo29563 FL-Studienkohorte erfolgte über ein internationales Zentrallabor (Covance) in folgender Weise: Pro Patient wurden 10 ml Blut in EDTA Röhrchen gesammelt. Diese wurden mit dem gleichen Volumen PBS (Sigma) verdünnt und anschließend in ein Lymphoprep Tube™ (Axis Shield) gegeben. Nachfolgend wurde bei 800 x g für 15 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde mit einer Transferpipette abgenommen und in 1ml Aliquots

überführt. Nach Ankunft im Hämatologielabor in Kiel wurden die Aliquots ebenfalls bei -80°C bis zur cfDNA Extraktion eingefroren.

2.3.2 DNA Extraktion

Die Extraktion der cfDNA erfolgte aus 1-4 ml Plasma nach Vergleich mehrerer Methoden (QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit und QIAamp MinElute ccfDNA Mini Kit) mittels des QIAamp Circulating Nucleic Acid Kits nach Anleitung der Hersteller. Eluiert wurde mit einem Volumen von 50 oder 60 µl AVE Puffer, um ein Endvolumen von ca. >45 oder >55 µl zu gewinnen. Die Extraktion zellulärer DNA aus PB oder KM erfolgte nach Standardprotokollen mittels automatisierter DNA Extraktion über den QIASymphony unter Verwendung des QIASymphony DNA Midi Kits (Qiagen).

2.3.3 Quantifizierung und Qualitätskontrolle zellfreier DNA

Anschließend an die Extraktion wurde die cfDNA zunächst durch den Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit bei einem Einsatz von 2 µl des Extraktionsvolumens (45 oder 55µl) quantifiziert. Die Konzentrationsangabe erfolgte in ng/µl. Für eine endgültige und genaue Quantifizierung und zur Amplifikationskontrolle wurde nach Devonshire et al. ein ddPCR Assay für die Quantifizierung der humanen Haushaltsgenen Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) und Albumin mit folgendem Cycler Protokoll durchgeführt:

10 min bei 95°C

40 Zyklen 94°C x 30 sec

60°C x 1 min,

10 min bei 98°C

Die Primersequenzen der Haushaltsgene sind in Tabelle 2.1 wiedergegeben.

Gen	Lokus	Primer-/Sondensequenz (5'-3')
TERT	5p15.33	F: CCTCACATAAATGCTACCAAACGA R: TTCCAAGAAGGAGGCCATAGTC S: AAGAAATGAACAGACCCATCCCCCAGG
GAPDH	12p13	F: AGGTTTACATGTTCCAATATGATTCCA R: ATGGGATTTCCATTGATGACAAG S: CCGTTCTCAGCCTTGACGGTGC
Albumin		F: CTGGAAGTCGATGAAACATACGTT

Tabelle 2.1 Verwendete Primersequenzen der Haushaltsgene. TERT= Telomerase Reverse Transcriptase, GAPDH= Glycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase.

Der Einsatz der cfDNA für die PCR betrug 1 µl des Extraktionsvolumens pro Haushaltsgen. Es wurde die durchschnittliche Kopienzahl/µl und die Kopienzahl/ml Plasma aus dem Mittelwert der drei Haushaltsgene ermittelt. Der Durchschnittswert wurde durch den Faktor 2 dividiert, da die Haushaltsgenkopien auf zwei Allelen, also mit zwei Kopien pro Zelle vertreten sind. Nur Ansätze mit einer Tröpfchenzahl > 10000 Tröpfchen/well in der ddPCR wurden dazu verwendet.

Anhand des Agilent High Sensitivity DNA Kits wurde die Reinheit und Qualität der cfDNA nach Anleitung der Hersteller überprüft.

Die Messung der DNA Konzentration und Reinheit der zellulären genomischen DNA (gDNA) aus PB oder KM erfolgte im Spektralphotometer (Nanodrop) und einer Albumin-PCR zur Amplifikationskontrolle (Pongers-Willemse et al., 1998).

2.4 Probenanalyse

2.4.1 Markerscreening mittels Konsensus PCR

Die Identifizierung eines tumorspezifischen Markers, entweder die Translokation (11;14)(q13;q32) mit Bruchpunkt im *BCL1*-Gen, die Translokation (14;18)(q32;q21) mit den Bruchpunkten in der mbr-, mcr-, oder 3'mbr-Region des *BCL2*-Gens, oder eine klonale IGHV-Rekombination des IGH-Genlokus auf dem Chromosom 14q32.3 erfolgte durch eine Konsensus PCR an gDNA aus Primärmaterial (PB oder KM) nach Standardprotokollen (Kneba et al., 1991; van Dongen et al., 2003). Der DNA Einsatz betrug dabei 500ng. Zur Detektion klonaler B-Zell IGHV-Rekombinationen wurden die BIOMED-2 Primer (van Dongen et al., 2003) in insgesamt 5 Multiplex-PCRs verwendet, um verschiedene IGH-Genumlagerungen zu amplifizieren. Als Positiv-Kontrolle diente gDNA aus der B-Zell-Lymphom-Zelllinie RAMOS, die Negativ-

Kontrolle stellt Aqua dar und Buffy Coat-DNA wurde als polyklonale Kontrolle verwendet.

Für den Nachweis der t(11;14) Translokation bei MCL wurden die *BCL1* Primer B und G verwendet (Pott et al., 1998). Als Positiv-Kontrolle diente die t(11;14) positive Zelllinie JVM-2 und als Negativ-Kontrollen Buffy Coat-DNA, sowie Aqua. Die t(14;18) Translokation bei FL und DLBCL wurde anhand folgender Primer bzw. Primer-Mixe festgestellt: p27 Primer für die mbr Region, 3'mbr-Mix Primer und 5'mcr-Mix Primer (Kneba et al., 1991; van Dongen et al., 2003). Hier wurden die Zelllinien K422, DOHH2, SC-1 und K231 als Positiv-Kontrollen verwendet, während Buffy Coat-DNA und Aqua abermals als Negativ-Kontrollen fungierten. Die Reaktionsbedingungen sind in den zitierten Publikationen aufgeführt.

Nach Durchführung der GeneScan-Analyse zur Klonalitätsüberprüfung im PCR-Produkt (Kneba et al., 1991) wurden klonale Signale der t(14;18) Translokation und der t(11;14) Translokation, sowie die klonalen IGHV Rekombinationen in den zellulären Primärmaterialien der Kieler Patienten mittels der konventionellen Sanger Methode sequenziert (Sanger et al., 1977).

2.4.2 Markerscreening mittels IGHV-NGS

Ziel des Markerscreenings ist die Identifizierung des krankheitsspezifischen Klonotyps, der im Erkrankungsverlauf dann für die MRD Diagnostik nachverfolgt wird. Für das Markerscreening wurde ein 2-Schritt-PCR Protokoll verwendet (Brüggemann et al., 2017; Brüggemann et al., 2019).

Im Rahmen der Mitgliedschaft des Hämatologie Labor Kiel im europäischen Konsortium „European Scientific foundation for Laboratory Hemato Oncology (ESLHO)“, speziell der „EuroClonality-NGS Working Group“, welche sich die IGHV-NGS Methodenstandardisierung und -validierung zur Aufgabe gemacht haben, standen dafür die EuroClonality (EC) IGHV-NGS Primer-Sets für die Framework Regionen IGHV-FR1, IGHV-FR2 -und IGHV-FR3 zur Verfügung (Brüggemann et al., 2019).

Zunächst wurde das Markerscreening zur Klonotypidentifizierung an den in der Konsensus PCR IGHV-positiven gDNA Primärmaterialien durchgeführt. Dazu wurden die EC-FR1 und EC-FR3 Primer-Sets verwendet. DNA Proben aus cfDNA wurden aufgrund der kurzen DNA Fragmentlänge der cfDNA ausschließlich mit EC-FR3

Primern sequenziert, die eine PCR-Fragmentgröße von maximal 150 Basenpaaren generieren.

Eine Übersicht über die eingesetzte DNA Menge und die Anzahl der Pipettieransätze zur Sequenzierung mittels des EC-FR3 Primer-Sets in den verschiedenen Materialien ist in Tabelle 2.2 dargestellt. Der DNA Einsatz für die Sequenzierung der gDNA mittels des EC-FR1 Primer-Sets betrug 100 ng.

Zeitpunkt	Material	Ansätze	Einsatz/Ansatz	Spike-in (µl)/ Ansatz	Kalkulierte Readzahl
PM	DNA	1	100 ng	2	150.000
	cfDNA	2	10 µl	2	150.000

Tabelle 2.2 Übersicht der DNA Menge je NGS Ansatz. PM=Primärmaterial; DNA=zelluläre DNA; cfDNA=zellfreie DNA.

Eine Zusammenfassung der 2-Schritt-PCR ist in Abbildung 2.1 veranschaulicht.

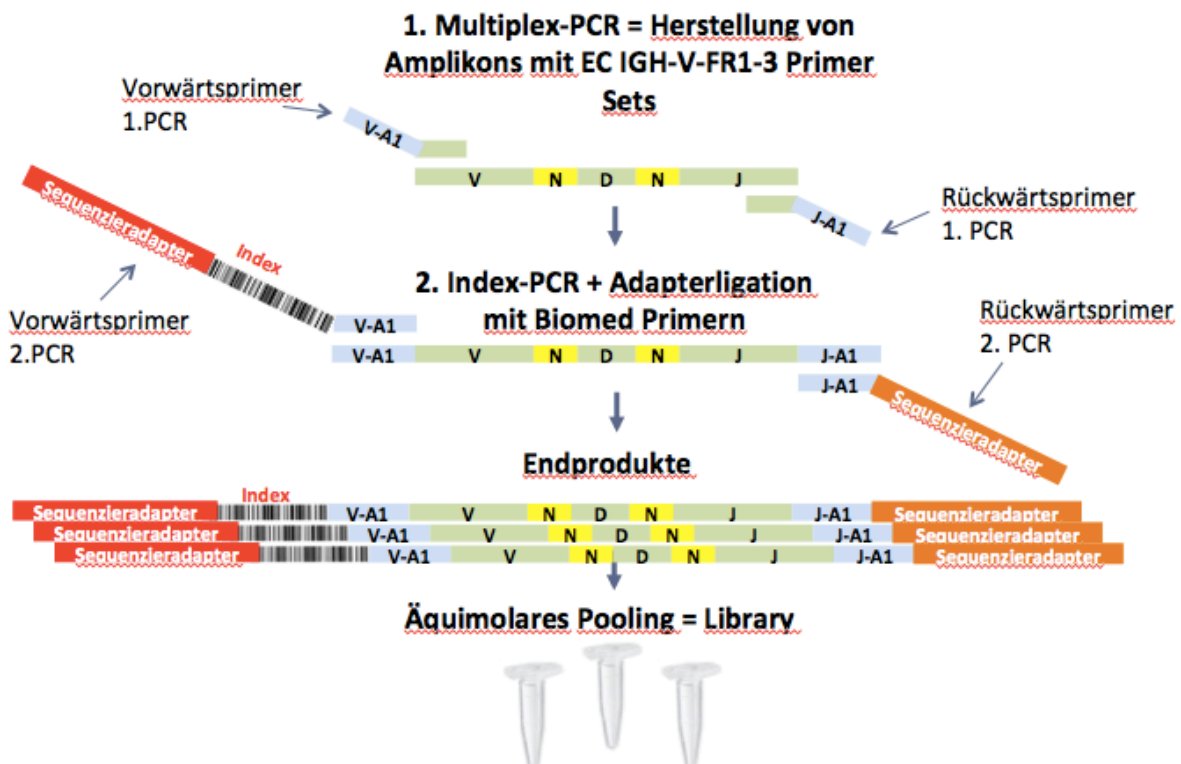


Abbildung 2.1 Libraryvorbereitung in der Amplicon-basierten 2-Schritt-PCR.

1. Die erste Multiplex-PCR dient der Herstellung von Amplifikaten mit einem durch die EC-IGHV-FR1 und -FR3 Primer definierten Größenbereich, welche die junktionale -NDN- Region zur Bestimmung der enthaltenen Rekombinationen überspannen. Die entsprechenden Primersequenzen sind in Tabelle 7.1 und 7.2 im Anhang aufgelistet. Das Thermocycler-Protokoll der ersten Multiplex-PCR ist in Tabelle 2.3 veranschaulicht.

1 Zyklus	Denaturierung	94°C	10 min
35 Zyklen	Denaturierung	94°C	1 min
	Annealing	63°C	1 min
	Elongation	72°C	30 sec
1 Zyklus	Finale Elongation	72°C	30 min
	Lagerung	4 °C	10 min

Tabelle 2.3 Thermocycler-Protokoll der ersten Multiplex IGHV-NGS PCR.

Zur Entfernung überschüssiger PCR Primer wurden PCR Amplifikate der 1. PCR über eine Agarosegel-Extraktion aufgereinigt. Die jeweiligen Bandenstärken im Vergleich zur Buffy Coat Positiv-Kontrolle reflektieren die Menge an Amplifikat und wurden mittels der Geldokumentation erfasst. Schwache Signale wurden unverdünnt in die 2. sogenannte Index-PCR eingesetzt, während bei mittleren bis starken Bandensignalen vorher eine Verdünnung mittels TE Puffer von 1:10 bzw. 1:100 erfolgte.

2. In der zweiten Index-PCR werden probenspezifische Indices vergeben, die wiederum an Sequenzieradaptern haften und mittels der High Fidelity Polymerase an die Amplifikate angehängt werden. Diese Indices dienen zur bioinformatischen Identifizierung der Proben nach dem anschließenden ‚Pooling‘, bei dem die Proben gemäß einer Qubit Assay Messung äquimolar zu der sogenannten ‚Library‘ zusammengegeben werden. Die Sequenzieradapter oder auch ‚Linker‘ sind Primer, die später an die Flow-cell des Illumina MiSeq Sequenziergerätes binden und eine Amplifikation durch Brückenbildung überhaupt erst ermöglichen. In dieser Arbeit wurden als Adapter 12 Metabion Reverse Primer (III-D701-712-RP) und 8 Metabion Forward Primer (III-D501-508-FP) verwendet, deren Sequenzen in Tabelle 7.3 im Anhang wiederzufinden sind.

Das Thermocycler-Protokoll der zweiten Index-PCR ist in Tabelle 2.4 aufgeführt.

1 Zyklus	Denaturierung	95°C	2 min
35 Zyklen	Denaturierung	94°C	30 sec
	Annealing	63°C	30 sec
	Elongation	72°C	30 sec
1 Zyklus	Finale Elongation	72°C	5 min
	Lagerung	4 °C	10 min

Tabelle 2.4 Thermocycler-Protokoll der zweiten Index-PCR.

Die Amplifikate der zweiten Index-PCR wurden dann mittels einer herkömmlichen Agarose-Gelelektrophorese überprüft und für das anschließende äquimolare Pooling über die Qubit Messung quantifiziert.

Als Positivkontrolle der PCR-Amplifikation diente stets Buffy Coat-DNA, während Aqua die Negativ-Kontrolle war.

3. Nach dem Pooling und einer Gelelektrophorese des gepoolten Produktes, werden die FR1 bzw. FR3-spezifischen Banden ausgeschnitten und es folgt eine Gelaufreinigung mithilfe des Gel Extraction MinElute Kits (Qiagen). Durch die Indexprimer beträgt die Länge der FR1-PCR-Fragmente etwa 570 Basenpaare und die der FR3-PCR-Fragmente etwa 310 Basenpaare. Die genaue Fragmentlänge wird über die Agilent-Fragmentanalyse bestimmt und es wird abermals eine Konzentrationsmessung mit Qubit für eine ggf. notwendige weitere Verdünnung durchgeführt. Nach Verdünnung des Produktes gemäß der Fragmentlänge und Konzentration auf 2 nM pro Ansatz und abermaliger Verdünnung auf 10 pM, ist die sogenannte „Sequenzierlibrary“ fertiggestellt. Bevor das Sequenziergerät beladen wird, wird die interne Qualitätskontrolle PhiX eingespiked, welche aus einem Referenzgenom mit gleicher Konzentration wie die Library besteht. Diese soll nach der Sequenzierung 10% der Gesamtreadzahl ausmachen, um anhand dessen zu überprüfen ob das Verhältnis der eingesetzten Probenkonzentration zu den erzielten Reads korrekt ist und der Sequenzierlauf unbehindert stattgefunden hat.

Um die Kontamination zwischen Proben eines Patienten zu vermeiden, wurden die diagnostischen Materialien und die Verlaufsmaterialien in jeweils unterschiedlichen Läufen sequenziert, möglichst getrennt auf den beiden verfügbaren Illumina Sequenziergeräten. Außerdem wurde strikt auf die Barcodeverteilung geachtet, sodass diese sich in den Läufen auf demselben Gerät nicht überlappten. Im

Anschluss folgte die Sequenzierung über das MiSeq System (Illumina) und das Auslesen über die frei verfügbare ARResT/Interrogate Plattform (Bystry et al., 2016; Knecht et al., 2019). Eine detaillierte Beschreibung der Datenauswertung ist unter dem Abschnitt 2.4.7 NGS-Datenanalyse nachzulesen.

2.4.3 MRD Bestimmung mittels IGHV-NGS

Eine zuverlässige Bestimmung der MRD mit z.T. nur geringer residueller Tumorlast kann insbesondere durch die Sequenzierung ausgewählter Zielgene mittels NGS bei einer theoretisch zu erreichbaren Sensitivität von 10^{-6} erzielt werden (Logan et al., 2014). Gerade bei der Nutzung der geringen Mengen an ctDNA zur MRD Detektion ist eine ausreichend hohe Sensitivität der Methode eine Voraussetzung.

Um die kurzen cfDNA Fragmente zu erfassen wurde ausschließlich die Framework Region 3 (FR3) des IGHV Schwerekettengens zur MRD Bestimmung in cfDNA herangezogen, da diese mit einer durchschnittlichen Fragmentlänge von 150 bp die kürzesten Fragmente generiert. Hierfür wurde zunächst das EuroClonality IGHV-FR3 Primer-Set in einer 2-Schritt-PCR verwendet (Scheijen et al., 2019). Nach der Etablierung eines neuen, für die cfDNA optimierten Primer-Sets, wurde später für die MRD Detektion in Verlaufsmaterialien eine 1-Schritt-PCR verwendet, bei der die Adapter und Indexsequenzen in nur einer PCR an die Primersequenzen gehängt werden, um potentielle Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Näheres dazu ist im Abschnitt 2.4.6 Design neuer IGHV-FR3 Primer für ultrakurze DNA Fragmente nachzulesen.

Für die MRD Quantifizierung mittels NGS ist das Mitführen eines Referenz-DNA Standards erforderlich, der zur Normalisierung der erhaltenen immungenspezifischen „Reads“ herangezogen wird und eine Voraussetzung zur Quantifizierung von MRD mittels NGS darstellt.

Dieser Referenz-Standard, im Folgenden „spike-in“ Kontrolle genannt, besteht aus insgesamt 7 Zelllinien mit einer definierten Anzahl bekannter DNA Kopien (Tabelle 7.4 im Anhang). In der Referenz „spike-in“ Kontrolle des Euro-NGS Netzwerkes, die für diese Arbeit verwendet wurde, wurden jeweils 40 DNA Kopien der jeweiligen Zelllinie gepoolt (insgesamt somit 280 Kopien) und in definierter Konzentration jedem Reaktionsansatz zugefügt (Knecht et al., 2019). Der spike-in Mix fungiert als

qualitativer und quantitativer Standard, der den gleichen Verarbeitungskonditionen wie die eigentlichen Proben unterliegt.

Die MRD Berechnung erfolgt für jede Probe dann unter Berücksichtigung der spike-ins als Korrekturfaktor und wurde wie im Folgenden beschrieben durchgeführt:

1. Spike-in Reads/280 = Kalkulation der sog. „coverage by spikes“
2. Spezifische Markerreads/coverage by spikes = korrigierte Reads pro Zelle
3. Korrigierte Reads pro Zelle/Anzahl an eingesetzten Zelläquivalenten (500 ng = 75000 Zellen) bzw. im Falle der cfDNA /Kopien pro ml Plasma ergibt den korrigierten MRD Wert.

Die Kalkulation des MRD Wertes erfolgt für die zelluläre DNA als Angabe der lymphomspezifischen Genomäquivalente pro analysierter mononukleärer Zelläquivalente. Da zur Berechnung eines MRD Niveaus in cfDNA keine Korrektur über die Zellzahl erfolgt, wird nach Normalisierung der Reads über die spike-ins die Angabe eines MRD Wertes als lymphomspezifische Genomäquivalente pro ml Plasma angegeben.

Als MRD positiv galten hierbei alle Proben, in denen mindestens zwei Reads mit der gleichen, krankheitsspezifischen Immungenrekombination detektiert wurden. Alle anderen Proben wurden als MRD negativ erachtet.

2.4.4 MRD Bestimmung mittels RQ-PCR

Für die Verwendung der RQ-PCR zur Quantifizierung von MRD wird bei lymphatischen Neoplasien eine allelspezifische PCR (ASO-Primer, engl. allele-specific oligonucleotide primer) durchgeführt, wobei in der Regel ein allelspezifischer Vorwärtsprimer in der VH-N-DH-N-JH-Region platziert wird und für die quantitative Erfassung klonaler B-Zellen ein JH-familienspezifischer Rückwärtsprimer und eine Konsensus-JH-Sonde eingesetzt wird. Somit kann eine klonspezifische RQ-PCR mit hoher Sensitivität und Spezifität durchgeführt werden. Bedingt durch die relative Kürze des spezifischen junktionalen Bereichs bestehen nur wenig Möglichkeiten in der Variation des allelspezifischen Primers.

Es wurden hier die Verlaufsproben von diagnostischen Patientenproben mit einer klonalen IGHV-Rekombination in der Konsensus PCR untersucht (Brüggemann et al., 2000).

Bei einem gDNA Einsatz von je 500 ng wurde das MRD Niveau jeder Probe in einer ASO-RQ-PCR mit einem dreifach-Ansatz bestimmt und an einer Standardverdünnungsreihe aus diagnostischem Material quantifiziert.

Für die MRD-Bestimmung in cfDNA wurden 5 µl in einem Zweifachansatz pipettiert. Die RQ-PCR Analyse erfolgte auf dem LightCycler® 480 II der Firma Roche und lief je nach Testung des ASO-Forward Primers bei 62°C oder 64°C.

Das Thermocycler Protokoll wurde mit folgenden Bedingungen durchgeführt:

10 min Vorinkubation bei 95°C,

50 Zyklen Amplifikation einschließlich 15 sek bei 95°C,

30 sek bei 62°C oder 64°C

1 sek bei 72°C.

Das Auslesen der Daten erfolgte mit der Light Cycler 480 Software von Roche.

Für die Proben mit nachgewiesenen Translokationen wurden Primersysteme für die jeweilig identifizierten Bruchpunkte der MBR-, MCR-, oder 3'mbr-Regionen verwendet und mittels des Taqman ABI 7900 (Applied Biosystems) nach folgendem Cycler Protokoll vervielfältigt:

10 min Vorinkubation bei 95°C,

45 Zyklen Amplifikation mit je 15 sek bei 95°C

und 1 min bei 59°C pro Zyklus.

Nach einem standardisierten Auswerteverfahren (EuroMRD-Kriterien; van der Velden et al., 2007) betrug die Sensitivität des Assays 10^{-5} (1 Zelle in 100000).

Als positiv im quantitativen Messbereich wurden Messergebnisse mit drei positiven Ansätzen und einer Abweichung von $\leq 1,5$ Ct in den Triplikaten bewertet.

Positiv unterhalb des quantitativen Messbereichs (BLQ, engl. below quantitative range) wurden Messergebnisse mit einer entsprechend größeren Abweichung als 1,5 Ct oder divergierenden Ergebnissen in den Triplikaten bezeichnet,

Proben wurden als RQ-PCR negativ, bezeichnet wenn alle drei Replikate kein spezifisches Signal lieferten, oder wenn die Ct's mehr als 20 Ct's vom Ct des Primärmaterials abwichen. Für weitere Details der Untersuchungen siehe van der Velden et al., 2007. Für die Anwendung der ASO-RQ-PCR in cfDNA wurden diese Kriterien entsprechend verwendet.

Zur MRD Berechnung wurde die folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{mittlere Kopienzahl spezifischer Kopien der drei Ansätze/ 500 ng}}{\text{Albuminkopien/500 ng}}$$

2.4.5 MRD Bestimmung mittels ddPCR

In dieser Arbeit wurde die ddPCR mit den gleichen Primer-Sondensystemen, welche bereits in der ASO-RQ-PCR verwendet wurden durchgeführt.

Das folgende Protokoll wurde verwendet: Es wurden 5 µl der cfDNA und 500 ng der gDNA eingesetzt und das MRD Niveau mit einem zweifach- (cfDNA) bzw. dreifach-Ansatz (zelluläre DNA) bestimmt. Die zu erreichende Sensitivität betrug dabei 10^{-5} für die gDNA und in Abhängigkeit der eingesetzten Zellkopienzahl je nach Tumorlast und Materialverfügbarkeit 10^{-2} bis 10^{-4} für die cfDNA. Der Vormastermix wurde mithilfe des ddPCR Supermix angesetzt. Der QX200 Droplet Generator erzeugte die Tröpfchen aus je 20µl PCR-Probe pro Well und 70µl Droplet Generation Oil. Das Thermocycler Protokoll war wie folgt: Enzym Aktivierung bei 95°C für 10 min, 40 Zyklen Denaturierung/Annealing/Extension einschließlich 94°C x 30 sec (Denaturierung) und 1 min bei 60°C (Annealing/Extension) und zum Schluss 10 min bei 98°C. Das Auslesen der Tröpfchen erfolgte anhand des QX200 Droplet Readers und der QuantaLife v1.7 Software. Nur Replikate ≥ 10000 Tröpfchen wurden aus Qualitätsgründen berücksichtigt. Als MRD positiv galten Proben mit 3 positiven Replikaten und einer Summe der positiven Tröpfchen ≥ 3 . Als positiv unterhalb des quantitativen Messbereichs bzw. positiv nicht quantifizierbar (PNQ, engl. positive not quantifiable) galten Proben, mit weniger als 3 positiven Replikaten und einer Summe aller positiven Droplets > 2 . Als negativ wurden Proben mit 3 negativen Replikaten oder einer Summe aller positiven Droplets ≤ 2 gewertet.

Anhand des Anteils der positiven Tröpfchen konnte mithilfe der Poisson-Verteilung die Anzahl der Ziel-Moleküle, die im Reaktionsansatz vorhanden waren berechnet und der MRD-Wert nach o.a. Formel bestimmt werden.

2.4.6 Design neuer IGHV-FR3 Primer für ultrakurze DNA Fragmente

Um eine möglichst präzise quantitative Erfassung von ctDNA im Plasma zu gewährleisten wurde unter Berücksichtigung der kurzen Fragmentlängen zellfreier DNA ein neuer Ansatz für die Amplikon-basierte NGS Quantifizierung etabliert. Dabei wurde für die IGHV-FR3 Region ein Ansatz mit familienspezifischen Primern gewählt, die alle sieben VH-Familien (IGHV1-7) mit den 46-52 funktionellen IGHV-Segmenten amplifizieren. Durch die Platzierung der Primer dicht an der CDR3-Region der junktionalen Region wurden möglichst kurze PCR-Fragmente generiert.

Da reife B-Zell Neoplasien häufig stark mutierte IGHV-Regionen besitzen, wurden außerdem sogenannte „Wobbles“ oder auch „degenerate nucleotide primer“ eingesetzt, die zwischen 2-3 Basen erkennen können (Tabelle 2.5). Zur vollständigen Abdeckung der VH3-Familie wurden insgesamt 3 verschiedenen Primer entworfen. Toleriert wurden 1-2 mismatches innerhalb der Primerbindungsstelle, solange diese nicht in den letzten 3-4 Basen am Ende der Sequenz auftraten. Die Bestimmung der Primer-Schmelztemperatur erfolgte bioinformatisch und die Basenpaarlängen wurden dementsprechend angepasst. Für das Markerscreening in genomischer zellulärer DNA wurde ein 2-Schritt-PCR NGS-Protokoll verwendet, um verschiedenen Rekombinationen der Sequenzieradapter zu erlauben und die Anzahl der benötigten Barcodes zu limitieren. Für die MRD Detektion in Verlaufsmaterialien wurde das neu entwickelte Primer-Set als 1-Schritt-PCR verwendet, bei dem die Adapter und Indexsequenzen in nur einer PCR an die Primersequenzen gehängt werden, um potentielle Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Diese entstehen beispielsweise durch die Verschleppung von Amplikons von der ersten in die zweite PCR-Runde und können zu einer groben Fehlinterpretation bzw. Verfälschung der Resultate führen.

Nukleotidname	Base
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T (oder U)	Thymin (oder Uracil)
R	A oder G
Y	C oder T
S	G oder C
W	A oder T
K	G oder T
M	A oder C
B	C oder G oder T
D	A oder G oder T
H	A oder C oder T
V	A oder C oder G
N	Jede Base

Tabelle 2.5 Legende der verwendeten Basen und „Wobbles“.

Tabelle 2.6 listet die Sequenzen der neu generierten FR3 Vorwärtsprimer. Die Primer VH1cf-VH7cf wurden als Multiplex Primer-Set verwendet. Es wurde ein zusätzlicher

universeller Primer sehr nah an die funktionale Region gelegt, um möglichst alle Rekombinationen zu erfassen. Als Rückwärtsprimer diente ein universeller JH-Primer (BIOMED, van Dongen et al., 2003).

VH1cf	TGAGGAGCCTGAGATCTGAVGACW
VH2cf	TGACCAACATGGACMYTGTGGACA
VH3cf_a	TGAACAGYCTGAGAGCYGAGGACA
VH3cf_b	TGAACAGCCTGARARCCGAGGACA
VH3cf_c	TGAACAGHCTGAGAGCHGAGGRCA
VH4cf	TGAGCTCTGTGACYGCCGCRGACA
VH5cf	AGCAGCCTGAAGGCYTCGGACR
VH6cf	TGAACTCTGTGACTCCCGAGGACA
VH7cf	TCWGCAGCCTAAAGGCTGAGGACA
VHcf	GHGGACACNGCYGTGTATTAC

Tabelle 2.6 Primersequenzen des neuen FR3 Primer-Sets. Die rot markierten Basen repräsentieren die „Wobbles“. Die unterste Sequenz (VHcf) stellt den universellen Vorwärtsprimer dar.

In Kooperation mit den Mitgliedern des EuroClonality Netzwerkes wurden für die weitere Forschung 50 CLL klonierte Plasmide aus Paris Necker mit je 200 Kopien/Plasmid und insgesamt somit 10000 Kopien zur Abdeckung der 64 wichtigsten klonierten Rekombinationen zur Verfügung gestellt. In 3 äquimolar gepoolten Plasmidansätzen wurden der cfDNA Universalprimer, der cfDNA Primermix und das EC-FR3 Primer-Set separat voneinander getestet, um die bestmöglichen Primerkonditionen herauszufinden. Die einzelnen Primerendkonzentrationen des neuen und im Folgenden als FR3-cfDNAB bezeichneten Primermix für die zellfreie DNA sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

Primernamen	Hersteller	Ausgangskonz. Primer	Endkonz. Primer
VH1cf_D501	Sigma	100 µM	0.5
VH2cf_D501	Sigma	100 µM	0.2
VH3cf_a_D501	Sigma	100 µM	0.1
VH3cf_b_D501	Sigma	100 µM	0.1
VH3cf_c_D501	Sigma	100 µM	0.1
VH4cf_D501	Sigma	100 µM	0.1
VH5cf_D501	Sigma	100 µM	0.1
VH6cf_D501	Sigma	100 µM	1.0
VH7cf_D501	Sigma	100 µM	1.0
VHcf_D501	Sigma	100 µM	0.1

Tabelle 2.7 Endkonzentrationen der neuen Primer im FR3-cfDNAB Primermix.

2.4.7 NGS-Datenanalyse

Nach der Sequenzierung und der geräteeigenen Qualitätskontrolle seitens der Hersteller (Illumina) mit dem Illumina MiSeq System, lagen die Rohdaten als .fastq Dateien vor und es erfolgte eine weitere bioinformatische Qualitätskontrolle und Verarbeitung bzw. Filterung der Sequenzen über die Analysesoftware ARResT/Interrogate über den frei verfügbaren Zugang <https://station2.arrest.tools/interrogate/> (Bystry et al., 2016; Knecht et al., 2019).

Tabelle 2.8 zeigt beispielhaft, wie das Samplesheet für das Einlesen in die ARResT/Interrogate Plattform und die Datenanalyse dieser Arbeit aufgebaut war.

Vor allem für die spätere Filterung der Ergebnisse, ist die genaue Beschreibung im Samplesheet wichtig.

Patient	DNA Nr.	Probedatum	Material	Zeitpunkt	Replikate	DNA		Spike-in	Zellen	Zielsen	Rekombination	Primer
						Konzentration	(µl)					
1	18-xxxx	01.01.2018	cfDNA	VM1	1/2			2	1195	FR3	IGH	EC-NGS::IGH-VJ- FR3.set+Faham.IGH-VJ.set
1	18-xxxx	01.01.2018	gDNA	VM1	1/3	500		2	75000	FR3	IGH	EC-NGS::IGH-VJ- FR3.set+Faham.IGH-VJ.set
1	18-xxxx	01.01.2018	gDNA	VM1	2/3	500		2	75000	FR3	IGH	EC-NGS::IGH-VJ- FR3.set+Faham.IGH-VJ.set
1	18-xxxx	01.01.2018	gDNA	VM1	3/3	500		2	75000	FR3	IGH	EC-NGS::IGH-VJ- FR3.set+Faham.IGH-VJ.set
1	18-xxxx	01.01.2018	cfDNA	VM1	2/2			2	1195	FR3	IGH	EC-NGS::IGH-VJ- FR3.set+Faham.IGH-VJ.set
1	18-xxxx	01.01.2018	gDNA	PM	1/1	100		0	15000	FR1	IGH	EC-NGS::IGH- VJ-FR1.set
1	18-xxxx	01.01.2018	gDNA	PM	1/1	100		2	15000	FR3	IGH	EC-NGS::IGH-VJ- FR3.set+Faham.IGH-VJ.set
1	18-xxxx	01.01.2018	cfDNA	PM	1/2			2	3855	FR3	IGH	EC-NGS::IGH-VJ- FR3.set+Faham.IGH-VJ.set
1	18-xxxx	01.01.2018	cfDNA	PM	2/2			2	3855	FR3	IGH	EC-NGS::IGH-VJ- FR3.set+Faham.IGH-VJ.set

Tabelle 2.8 Samplesheet Formatbeispiel.

ARResT/Interrogate ist ein Analyseprogramm des ARResT Teams, welches für die amplikonbasierte IGHV/TCR Analyse konzipiert wurde und der „EuroClonality Working Group“ zur Verfügung steht. Bereitgestellt wird die Plattform vom MetaCentrum - Virtual Organization [<http://metavo.metacentrum.cz/en/>] des CESNET [<http://www.cesnet.cz/?lang=en>] in Tschechien.

Diese browser-basierte bioinformatische Plattform unterstützt ein weitreichendes Immunoprofilung, durch die Identifizierung vieler verschiedener junktionaler Rekombinationen aller IG und TR Loci. Die Annotation der IGHV Sequenzen in ARResT/Interrogate erfolgt über IMGT (Lefranc et al., 2005).

Die Resultate wurden als Gesamtanzahl der gelesenen Sequenzen (Reads) und in prozentualen Anteilen dargestellt (IGH-Reads/totale Reads). Zur Hauptklonidentifizierung im Primärmaterial und zur Verfolgung dieser Klone in den Verlaufsmaterialien wurde die Aminosäuresequenz der junktionalen Region herangezogen, um eventuelle VDJ Annotationsfehler zu vermeiden. Die Ergebnisse wurden nach Proben geordnet und nach Klonfrequenz sortiert. Angegeben wurde die Klonfrequenz in Reads in prozentualen Anteilen der abundanten Reads/Anzahl der Gesamtreads. Aufgrund der Detektion von unspezifischen Klonenfrequenzen mit geringer Frequenz, die u.A. durch Kontaminierung entstehen, wurde in allen Proben nach einer Abundanz von $\geq 1\%$ gefiltert. Eine weitere Spalte beinhaltet die durch die spike-in Kontrollen errechneten MRD-Level.

Die Ergebnisse konnten im Anschluss aus der ARResT/Interrogate Software in Form einer Excel Tabelle extrahiert, oder als Grafiken durch die verbundene R Software heruntergeladen werden.

2.4.8 Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse in dieser Arbeit wurde mittels der kommerziellen Microsoft Excel 2010 bzw. Microsoft Powerpoint 2010 und der „Open-Source-“ R Software durchgeführt (R Core Team 2013).

Gängige statistische Parameter, wie Minima, Maxima, Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen kamen dabei zur Anwendung. Um lineare Sachverhalte und Korrelationen zweier Variablen nachzuweisen, wurden Regressionsgeraden erstellt und der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet. Durch den Wilcoxon-Test kalkulierte p-Werte wurden als signifikant erachtet, wenn der Wert $< 0,05$ lag. Sämtliche MRD-Werte wurden vor der weiteren statistischen Auswertung zur Basis 10 logarithmiert.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung, Optimierung und Validierung der Extraktion zellfreier DNA

3.1.1 DNA Extraktion

Zellfreie DNA liegt im Allgemein nur in geringer Menge im Plasma vor. Um eine möglichst hohe Ausbeute an zellfreier DNA zu erreichen wurden für diese Arbeit zunächst verschiedene DNA Extraktionsverfahren hinsichtlich ihrer Extraktionseffizienz und Qualität der cfDNA untersucht.

Es ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen der cfDNA Ausbeute verschiedener gängiger Extraktionskits anhand der Proben von 5 gesunden Labormitarbeitern. Die größte Ausbeute erzielte das manuelle QIAamp CNA Kit von Qiagen mit einer durchschnittlichen cfDNA Ausbeute von 6,98 ng/ml Plasma bei einem Plasmaeinsatz von 4ml. Die zweitbeste Ausbeute, mit einem Durschnitt von 3,8075 ng/ml Plasma wurde mit dem QIASymphony Extraktionsroboter erzielt, während der QIAamp MinElute Kit die geringste cfDNA Menge ergab (durchschnittlich 0,7675 ng/ml Plasma).

Eine Validierung des manuellen QIAamp CNA Kit und des automatisierten Verfahrens mit dem QIASymphony wurde an einer größeren Kohorte von 10 gesunden Labormitarbeitern mit dem Einsatz von 2 ml Plasma durchgeführt und ergab gut reproduzierbare Ergebnisse von durchschnittlich 6,3025 ng/ml Plasma (Median 6,5 ng/ml Plasma) mit dem CNA Kit bzw. 4,809375 ng/ml Plasma (Median 4,5 ng/ml Plasma) mit dem QIASymphony (Abbildung 3.1).

Da das CNA Kit insgesamt die höchste cfDNA Ausbeute, sowie eine einfache Bedienung für eine variable Probenanzahl gewährleistete wurde für die weitere Untersuchungen an cfDNA stets das QIAamp CNA Kit zur cfDNA Extraktion verwendet.

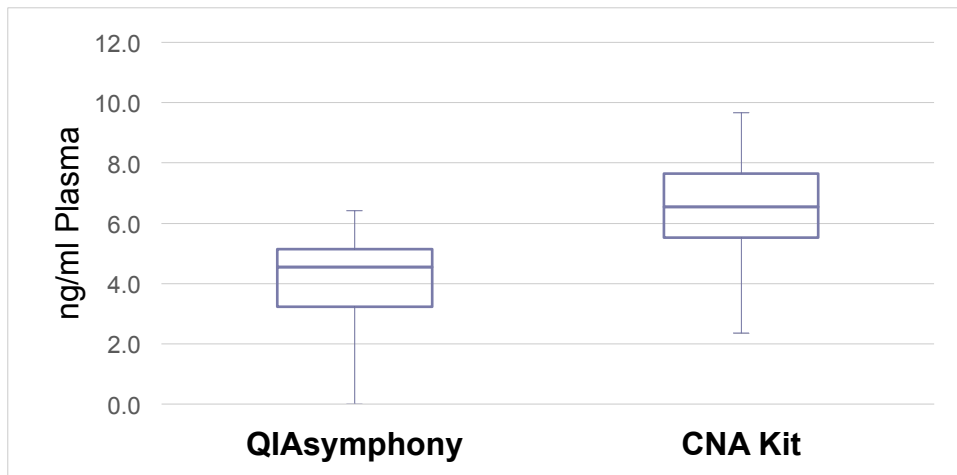


Abbildung 3.1 Quantifizierung der cfDNA Ausbeute (ng/ml Plasma) von 10 gesunden Probanden nach Extraktion aus 2ml Plasma mittels des QIASymphony Roboters und des QIAamp CNA Kits.

3.1.2 Einfluss des Plasmaeinsatzvolumen

Da bei Patientenproben teilweise nur sehr geringe Mengen an Plasma zur Verfügung stehen wurde als nächstes geprüft, ob die extrahierte cfDNA Menge durch das eingesetzte Plasmavolumen beeinflusst wird. Aus 2 ml und 4 ml Plasmas von zehn gesunden Probanden wurde cfDNA mit dem QIAamp CNA Kit extrahiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die cfDNA Ausbeute linear zum eingesetzten Plasmavolumen ist (Steigungskoeffizient=1,97; $R^2=0,8453$) (Abbildung 3.2). Somit wurde für diese Arbeit cfDNA aus dem jeweils zur Verfügung stehenden Plasmavolumen extrahiert und für die MRD Diagnostik eingesetzt

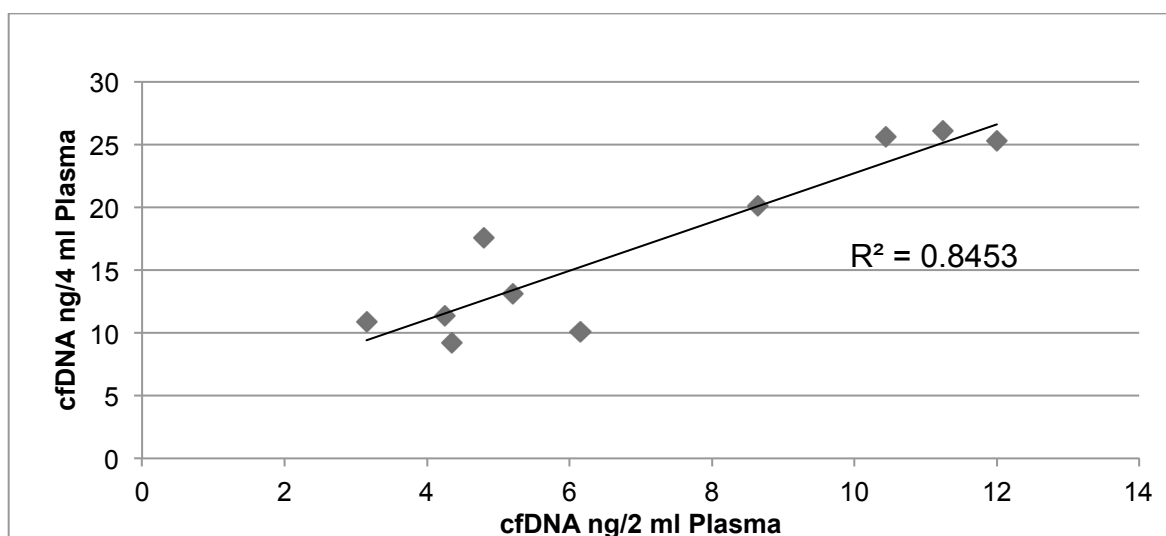


Abbildung 3.2 Vergleich der cfDNA Konzentration 10 gesunder Probanden extrahiert aus 2 bzw. 4 ml Plasma.

3.1.3 Quantifizierung der zellfreien DNA

Prinzipiell wird die extrahierte Menge an cfDNA über eine Messung mit dem Qubit Assay bestimmt. Um jedoch die Qualität und Amplifizierbarkeit der cfDNA möglichst exakt abzubilden, wurde eine präzise Quantifizierung der cfDNA über die Quantifizierung von drei Haushaltsgenen, GAPDH, TERT und Albumin mittels ddPCR etabliert (Devonshire et al., 2014). Die Menge an cfDNA/ml Plasma wurden für diese Arbeit ausschließlich über die Haushaltsgene (HG) quantifiziert.

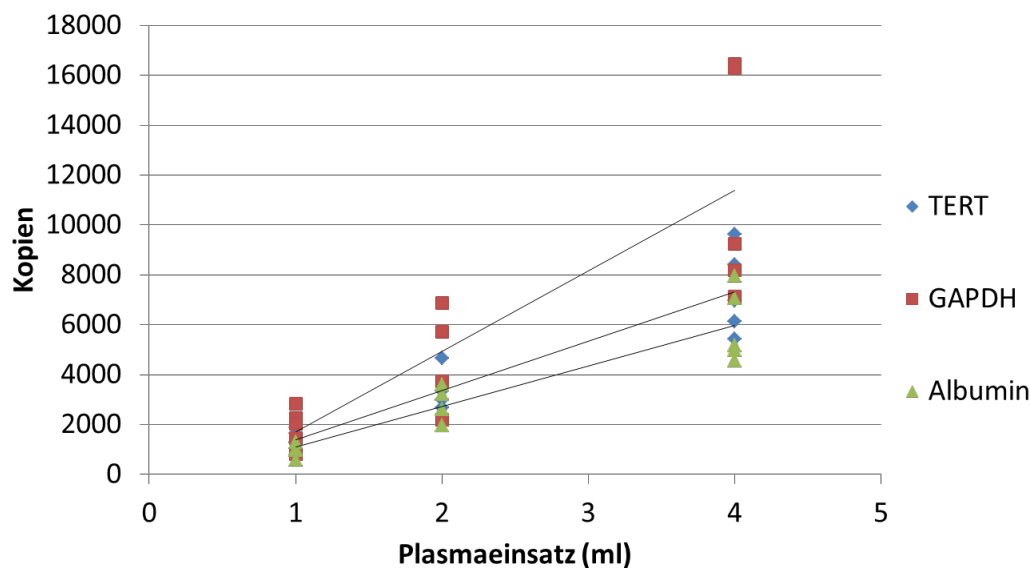


Abbildung 3.3 ddPCR Messung der Haushaltsgenkopien GAPDH, TERT und Albumin (y-Achse) in cfDNA aus 1, 2 und 4 ml Plasma (x-Achse) aus dem Plasma von je 6 Probanden.

Abbildung 3.3 veranschaulicht die Linearität der einzelnen verwendeten Haushaltsgene (GAPDH $R^2=0,71$; TERT $R^2=0,86$; Albumin $R^2=0,85$) im Hinblick auf verschiedene Plasmaeinsatzvolumina (1 ml, 2 ml und 4 ml Plasma) in je 6 Probanden (3 Gesunde, 3 Patienten mit soliden Tumoren). Die Ergebnisse zeigen eine gute Reproduzierbarkeit bei variablen Plasmaeinsatzvolumina. Dies ist insbesondere bei z.T. nur geringen Mengen verfügbaren Plasmas von Bedeutung.

Die drei verwendeten Haushaltsgene zeigten untereinander eine deutliche Variabilität in den jeweiligen Kopienzahlen, Die relative Differenz der drei Haushaltsgene war dabei in einer Serie von 20 cfDNA Proben von Patienten mit der Initialdiagnose eines FL jeweils konstant.

Im Vergleich zu TERT ($M=20697,7$; $SD=13765,1$) und Albumin ($M=18625,1$; $SD=12042,6$) zeigte das Haushaltsgen GAPDH jeweils die höchsten Kopienzahlen ($M=31392,8$; $SD=22219,8$). Für die exakte Quantifizierung der cfDNA wurden daher die Mittelwerte der drei Haushaltsgene herangezogen.

Der Mittelwert der Haushaltsgene betrug 41862,6 ($Median=13461$) Kopien/ml Plasma in den diagnostischen Plasmaproben und 9735,9 ($Median=5061$) Kopien/ml in den 89 cfDNA Verlaufspuben, wie in Abbildung 3.4 aufgezeigt.

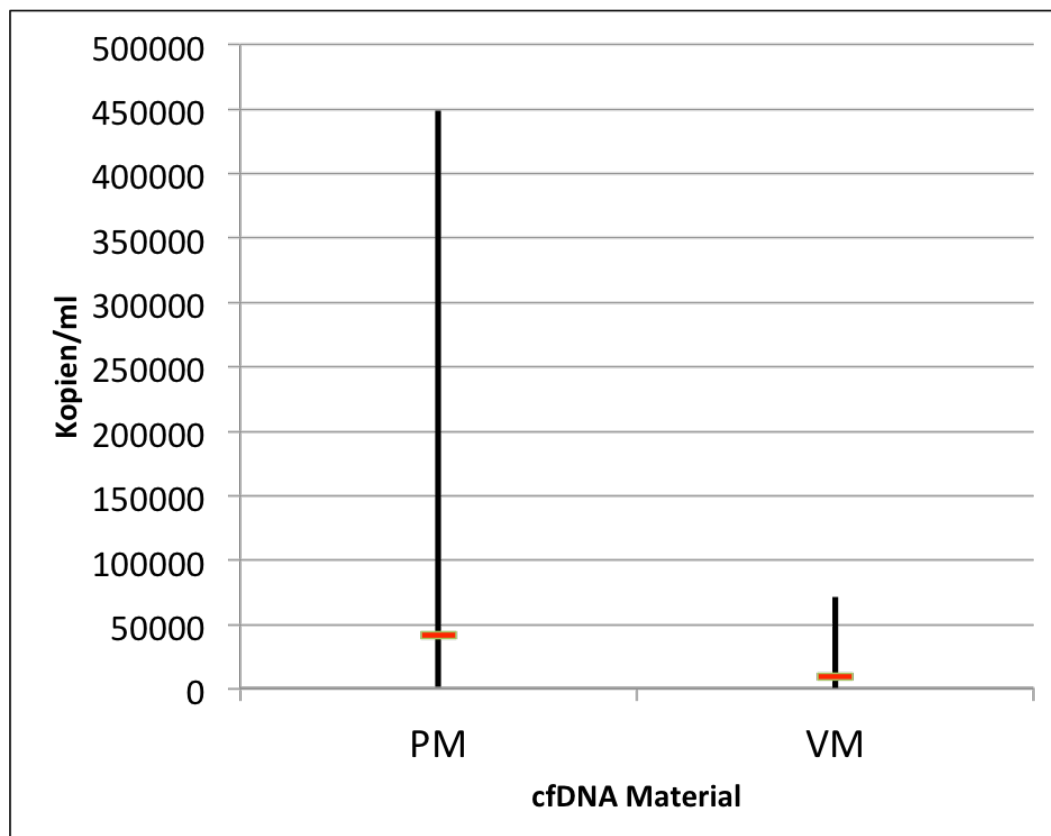


Abbildung 3.4 Mittelwerte (in rot markiert) der über die Haushaltsgene GAPDH, TERT und Albumin quantifizierten Menge an cfDNA in 38 diagnostischen Plasmaproben (PM = Primärmaterial) von FL-Patienten und 89 Plasmaverlaufspuben (VM=Verlaufsmaterial).

3.1.4 Qualitätskontrolle der extrahierten zellfreien DNA

Im nächsten Schritt sollte die Qualität der isolierten cfDNA überprüft werden.

Abbildung 3.5 zeigt exemplarisch die Qualitätskontrolle der mittels CNA Kit extrahierten cfDNA (oben) und der mittels QIASymphony extrahierten cfDNA (unten) eines gesunden Probanden durch den Agilent High Sensitivity Assay.

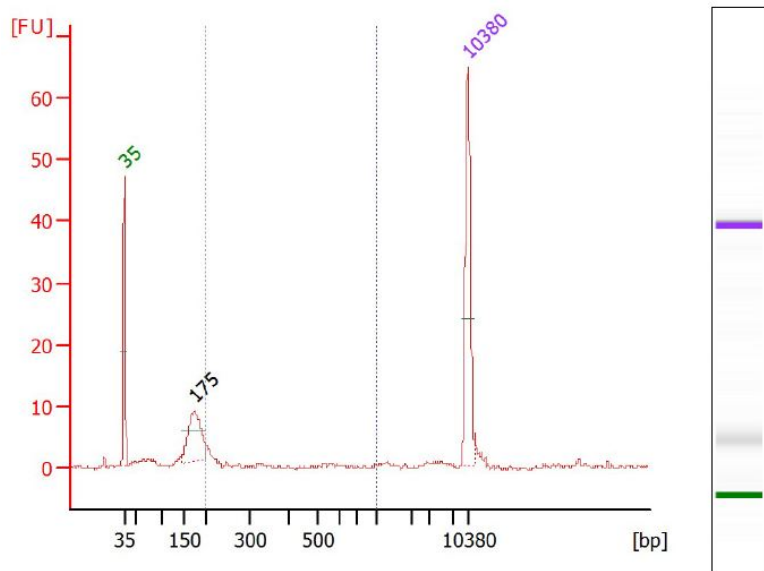
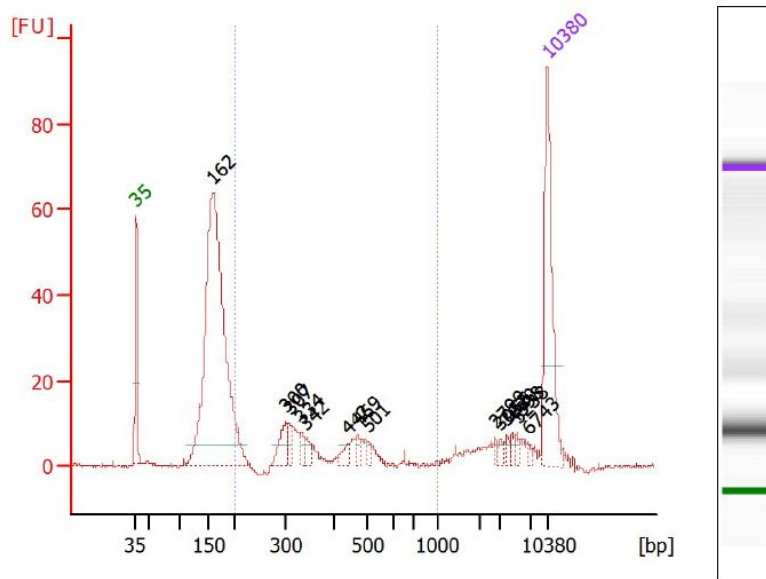


Abbildung 3.5 Elektropherogramm und Bandendarstellung der gemessenen cfDNA aus 4ml Plasma eines gesunden Probanden. Extrahiert wurde mit dem CNA Kit (oben) und dem QIASymphony (unten). bp=Basenpaare (engl. basepairs), FU=Probenintensität (engl. sample intensity/ fluorescence). Die prominenten Peaks bei 35 und 10380 bp Fragmentlänge stellen interne Kontrollen des Agilent High Sensitivity Kits dar.

Im Elektropherogramm nachweisbare Peaks bei ungefähr 162 bp (Abbildung 3.6 oben) und 175 bp (Abbildung 3.6 unten) repräsentieren die durch Apoptose entstandene cfDNA, während Peaks um die 300-400 bp Länge durch Nekrose entstandene Fragmente widerspiegeln. Fragmentlängen über 1000 bp Länge sind der Kontamination durch gDNA zuzuschreiben. Wie exemplarisch in Abbildung 3.5

anhand eines gesunden Probanden veranschaulicht, zeigte sich in der Elektrophorese der insgesamt 10 getesteten gesunden Probanden, dass in der automatisierten Extraktion mit dem QIASymphony zwar eine kleinere Ausbeute an cfDNA erreicht wird, die cfDNA jedoch eine geringere Kontamination mit gDNA aufweist. Dies ist vermutlich der händischen Bearbeitung der cfDNA während der Extraktion mit dem CNA Kit zuzuschreiben. Umso wichtiger war es die präanalytische Handhabung der cfDNA zu optimieren und diese mit einer entsprechenden Standardarbeitsanweisung zu gewährleisten.

Um die gleichmäßige Extraktion von DNA mittels des CNA Kits über den gesamten Größenbereich zu überprüfen und eine vermeintliche Überschätzung der cfDNA auszuschließen, wurde im nächsten Schritt eine 50 bp Leiter vor Extraktion mit dem QIAamp CNA Kit in 4 ml Plasma eines gesunden Probanden gegeben.

Abbildung 3.6 veranschaulicht den charakteristischen Peak der extrahierten cfDNA bei 166 bp und die erfolgreiche, gleichmäßige Wiedergewinnung der 50 bp Leiter auch nach dem Extraktionsprozess. Folglich gewährleistet das Extraktionskit eine Extraktion aller Fragmentlängen und nicht präferenziell der kürzeren cfDNA Fragmente.

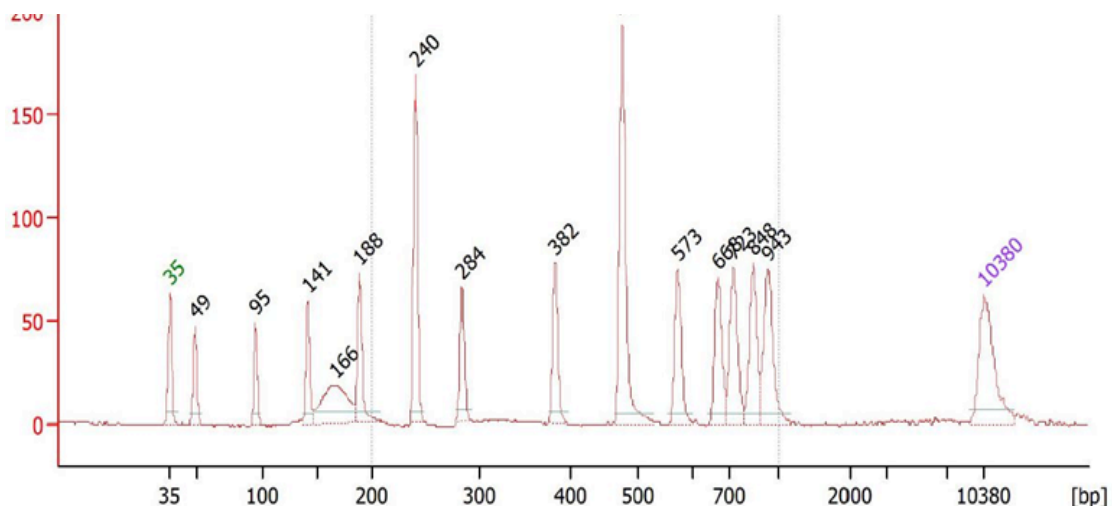


Abbildung 3.6 Agilent Elektropherogramme der 50 bp Leiter mit vorheriger Extraktion. bp=Basenpaare (engl. basepairs), FU=Probenintensität (engl. sample intensity/ fluorescence)

Des Weiteren konnte in einer systematischen Untersuchung in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Lagerungszeit der Blutproben bis zur Asservierung des Plasmas eine entscheidende Rolle für die Qualität der cfDNA spielt. In Abbildung 3.7 ist die

Probenqualität nach verlängerter Transportzeit von mehr als 4 Stunden in zellstabilisierenden STRECK® Röhren (links) im Vergleich zu Standard- EDTA Röhren (rechts) nach einer verzögerten Plasmaasservierung nach einem Tag (~30 Std.) abgebildet.

Es besteht ein relevanter Unterschied in der Menge an kontaminierender genomischer DNA. Während die DNA aus dem STRECK® Röhren kaum zelluläre DNA aufweist, kommt es in einem EDTA Röhren zur Apoptose der kernhaltigen Zellen und damit zu einem deutlichen Anstieg der Menge an gDNA, was sich im Elektropherogramm in einem Anstieg der Fragmente ab 1000 bp Länge dokumentiert.

Demnach empfiehlt es sich bei verzögerter Probenbearbeitung oder Probenversand STRECK® Röhren für die Blutabnahme einzusetzen.

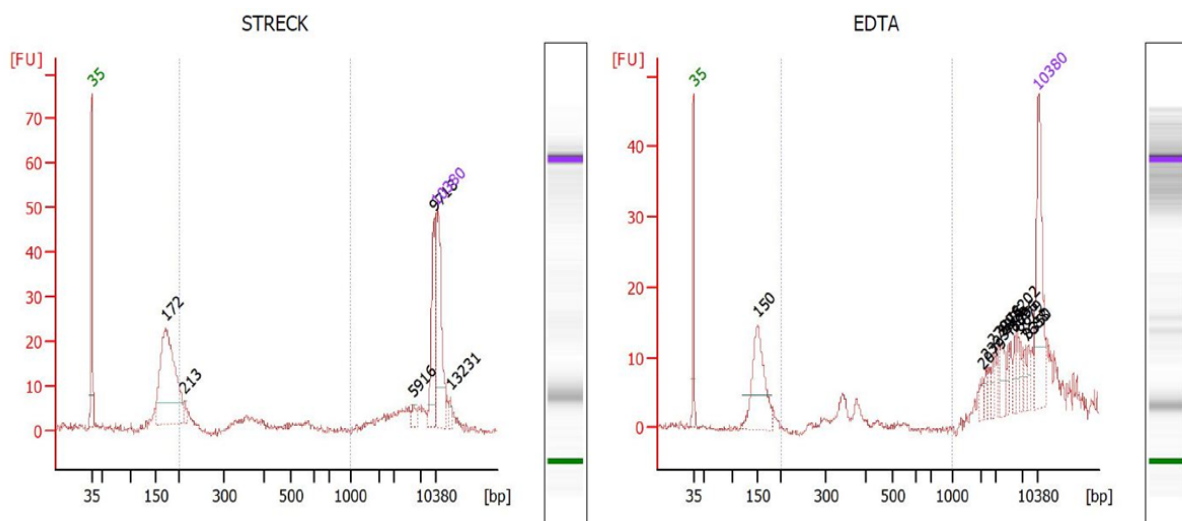


Abbildung 3.7 Agilent Elektropherogramm der cfDNA desselben gesunden Probanden aus einem STRECK® Röhren (links) und einem EDTA Röhren (rechts) nach verzögerter Plasmaasservierung (30 Std.).

Die Proben der Kieler Patientenkohorte der Medizinischen Klinik II wiesen insgesamt eine geringe Kontamination durch gDNA auf, da diese innerhalb des Zeitfensters von 4 Stunden zentrifugiert werden konnten. Im Gegensatz dazu waren die Proben der FL-Studienkohorte Bo29563 stark durch gDNA verunreinigt, die Probensammlung für die MRD Diagnostik hatte hier keine Stabilisierung der nukleären Zellen vorgesehen. Abbildung 3.8 zeigt den Vergleich zwischen der Qualität der cfDNA eines Kieler Patienten und eines FL-Studienpatienten. Insgesamt wiesen 30/43 getesteten

Materialien der Studienkohorte, ähnlich wie in Abbildung 3.8 eine enorme Kontamination durch gDNA auf.

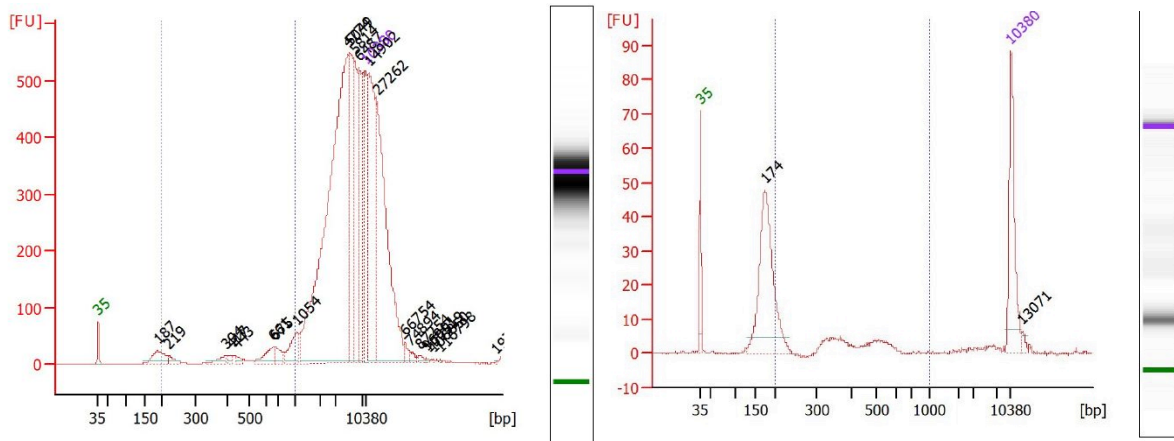


Abbildung 3.8 Vergleich der cfDNA Qualität zwischen einem FL-Studienpatienten (links) und einem Kieler Patienten (rechts). Die cfDNA liegt bei einer Fragmentlänge von 187 bp (links) und 174 bp (rechts).

3.1.5 Ermittlung der Tumorlast über die Menge an zellfreier DNA im Plasma

Im nächsten Schritt wurden die nachweisbaren Mengen an cfDNA von 15 freiwilligen gesunden Probanden aus dem Labor und 28 Tumorpatienten unter Therapie (19 NHL, sowie 8 solide Tumoren) verglichen. Dabei wiesen Tumorpatienten mit durchschnittlich 9,59 ng/ml Plasma cfDNA (Min.= 2,9 ng/ml Plasma; Max.= 19,1 ng/ml Plasma) eine signifikant ($p=0,0472$) höhere Menge an cfDNA auf, als die gesunden Probanden mit durchschnittlich 7,834 ng/ml Plasma. Außerdem bestand bei der cfDNA Menge in Tumorpatienten eine große Variabilität (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10).

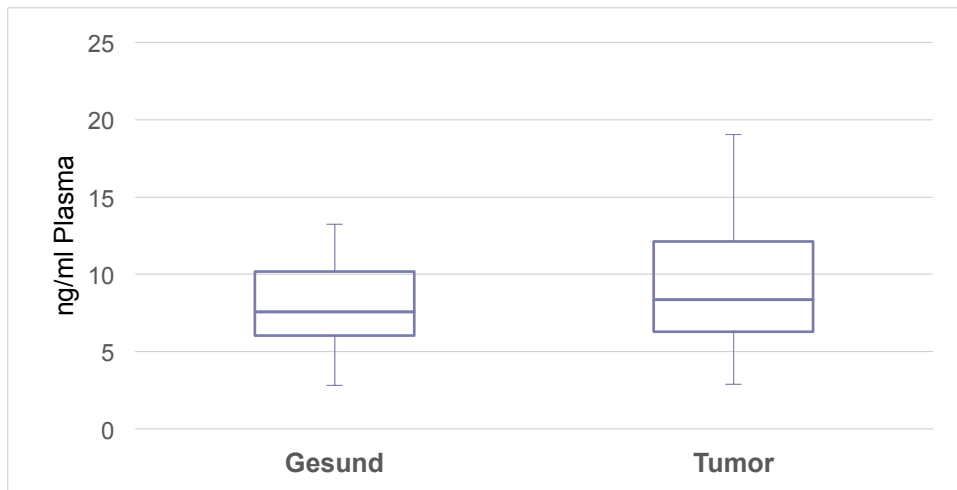


Abbildung 3.9 cfDNA Konzentration (ng/ml Plasma) in gesunden Probanden (Gesund; n=15) und Tumorpatienten (Tumor; n=28). Median Gesund=7,6 ng/ml Plasma; Median Tumor=8,3 ng/ml Plasma.

Im Folgenden ist exemplarisch der Vergleich der über die Haushaltsgene quantifizierten cfDNA Mengen in 20/36 Primärmaterialien (C1D1) der FL-Studienpatienten dargestellt. Es werden große Unterschiede der Menge an cfDNA bei Erstdiagnose zwischen den Patienten deutlich, die Menge an cfDNA variierte von minimal 4600 zu maximal 48675,4 Kopien/ml Plasma vor Therapiebeginn (Abbildung 3.10). Im Mittel lag die Menge an cfDNA bei 23571,85 in dieser Gruppe unbehandelter Follikulärer Lymphome.

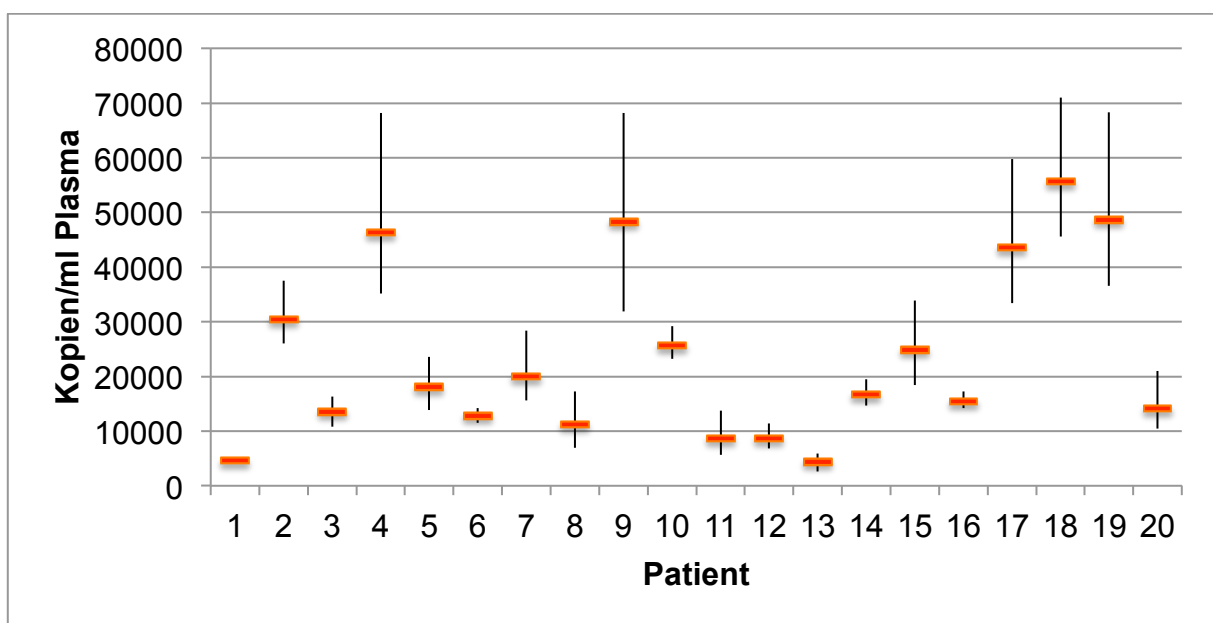


Abbildung 3.10 Vergleich der cfDNA Mengen in 20 FL-Patientenprimärmaterialien. Quantifizierung mittels der Haushaltsgene GAPDH, TERT und Albumin, die Mittelwerte in Kopien/ml Plasma sind in Rot abgebildet. Quantifiziert wurde mittels ddPCR.

Die Menge an cfDNA im peripheren Blut nimmt im Therapieverlauf bei Follikulären Lymphomen deutlich ab, im Mittel um den Faktor 4,2. Dies zeigt der Vergleich der Menge an cfDNA bei Diagnose von 38 diagnostischen Plasmaproben (36 FL-Studienpatienten und 2 Kieler Patienten mit FL) und insgesamt 89 cfDNA Verlaufsmaterialien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapiebeginn.

3.2 Markerscreening mittels Konsensus PCR und NGS

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben von insgesamt 58 Patienten aus zwei Kohorten zur Identifikation eines MRD Markers im diagnostischen PB untersucht (davon 36/58 FL-Studienpatienten und 22/58 Kieler Patienten).

Zunächst wurde in allen diagnostischen Primärmaterialien ein Markerscreening mittels Konsensus PCR durchgeführt. In allen diagnostischen Proben der Kieler Patientenkohorte konnte ein klonaler Marker identifiziert werden (IGHV n=13, t(14;18) n=7, t(11;14) n=2). Im Falle der Studienpatienten war in 23/36 Primärmaterialien ein Marker im peripheren Blut zu finden (IGHV n=14, t(14;18) n=9). Eine Übersicht der Kohorten und der identifizierten Marker ist in Tabelle 3.1 zu sehen.

Marker	Studienpatienten 36 x FL	Kieler Patienten (22) 11 x FL, 1 x DLBCL, 10 x MCL
kein Marker	13	/
IGHV-Rekombination	14	13
t(14;18) Translokation	9	7
t(11;14) Translokation		2

Tabelle 3.1 Ergebnisse der Klonalitätsanalyse mit Konsensus PCR.

Die 24 diagnostischen Patientenproben mit einer klonalen IGHV-Rekombination in der Konsensus PCR (14 FL-Studienpatienten und 10 Kieler Patienten) wurden im Anschluss mit IG-NGS (FR1 und/oder FR3) untersucht um einen Indexklon zu identifizieren. In 23/24 diagnostischen gDNA Proben konnte mit beiden EC-IGHV-

NGS Assays (FR1 und FR3) der lymphomspezifische Klonotyp (Indexklon) als MRD-Marker identifiziert werden.

Parallel dazu konnte die Anwendbarkeit des IG-NGS Ansatzes zur Markeridentifikation in 16 diagnostischen cfDNA Proben getestet werden. In insgesamt 15/16 dieser cfDNA Proben konnte der Indexklon übereinstimmend mit dem IGHV-FR3 Primer-Set nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Tabelle 3.2. dargestellt.

Kohorte	Material	Zeitpunkt	EC-FR1	EC-FR3
FL-Studienpatienten	gDNA	PM	13/14	13/14
	cfDNA	PM		13/14
	gDNA	VM		0/13
	cfDNA	VM		0/13
Kieler Kohorte	gDNA	PM	10 /10	10/10
	cfDNA	PM		2/2
	gDNA	VM		0/15
	cfDNA	VM		2/14

Tabelle 3.2 Materialübersicht der zwei Kohorten und der verwendeten NGS Assays (FR1 und/oder FR3). gDNA=zelluläre/genomische DNA, cfDNA=zellfreie DNA, PM=Primärmaterial, VM=Verlaufsmaterial.

In Spalte EC-FR1 und EC-FR3 sind die Proben mit zu identifizierendem Indexklon als Anteil der Gesamtanzahl der getesteten Proben aufgeführt.

In Abhängigkeit des verwendeten EC-FR1 oder -FR3 Primersets (Tabelle 3.3) war die Indexklonfrequenz als der prozentuale Anteil der krankheitsspezifischen Markerreads an der Gesamtanzahl der IGHV-Reads sehr unterschiedlich. Betrug die Indexklonfrequenz in den EC-FR1 sequenzierten diagnostischen Proben im Mittel 57,57%, so lag die Indexklonfrequenz in denselben Proben mit dem IGHV-FR3 Primerset nur bei durchschnittlich 24,05%. In den mit dem EC-FR3 Primerset

untersuchten cfDNA Proben lag die durchschnittliche Abundanz des Indexklons bei 14,20%.

Lediglich in 7/14 EC-FR3 sequenzierten zellulären und in 4/14 parallelen cfDNA Primärmaterialien konnte der Indexklon als der dominante Klon wiedergefunden werden. In den restlichen EC-FR3 sequenzierten Proben mit identifiziertem Marker (6/14 zellulären und 9/14 cfDNA Proben) konnte der Indexklon nur unter Kenntnis des EC-FR1 identifizierten Markers als solcher erkannt werden.

Der Vergleich der großen Unterschiede der Indexklon Abundanzen zwischen den EC-FR1 und EC-FR3 generierten Ergebnissen, sowie die Problematik, dass der Indexklon lediglich bei Kenntnis der FR1 Sequenz in den FR3 Sequenzen wiedergefunden kann, indizierten eine ineffiziente Amplifikation durch das EC-IGHV-FR3 Primer-Set.

Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht über die NGS-Ergebnisse mit EC-IGHV-NGS der FR1 und FR3 Region von 14 diagnostischen Proben (gDNA und parallel cfDNA) der FL-Studienkohorte. Aufgeführt sind die Häufigkeiten der Indexreads in % der Gesamtanzahl der IGHV-Reads in der jeweiligen Probe.

Patient	EC-FR1 zelluläre DNA	EC-FR3 zelluläre DNA	EC-FR3 cfDNA
1	34,62%	0,70%	0,20%
2	45,10%	0,10%	0,10%
3	74,60%	87,00%	1,40%
4	9,00%	1,50%	31,00%
5	25,20%	11,00%	3,00%
6	98,36%	96,99%	85,34%
7	93,90%	45,00%	30,00%
8	77,40%	10,00%	2,00%
9	77,30%	23,00%	0,80%
10	62,90%	26,00%	5,00%
11	10,00%	1,51%	1,70%
12	83,80%	7,50%	19,80%
13	Kein Marker	-	-
14	56,20%	2,30%	4,30%

Tabelle 3.3 Häufigkeiten des identifizierten Hauptklons in PM (Markerreads in % der Gesamtzahl der IGHV-Reads in der jeweiligen Probe) von 14 Patienten mit FL in EC-FR1 und EC-FR3 generierten Sequenzen. Die Farbskala verdeutlicht die Abundanz des Klons.

Aufgrund der geringeren Abundanz der Indexklone die mittels IGHV-FR3 amplifiziert wurden, wurden die junktionalen Regionen der dominanten Klonotypen hinsichtlich des Vorliegens somatischer Mutationen in der FR3 Region weiter untersucht. Hier zeigen sich in 9/14 Indexklonsequenzen somatische Hypermutationen im Bereich der Primerbindungsstellen des FR-3 Primersets, dies führt zu einer schlechteren Amplifikation und somit zu einer geringeren Abundanz des Indexklons.

Abbildung 3.11 zeigt exemplarisch den Sequenzabgleich des FL-Studienpatienten Nummer 2 mit 3 isolierten FR3 Mutationen. Die entsprechenden Abundanzen des Indexklons in den EC-FR3 generierten Sequenzen sind sowohl in der zellulären als auch in der cfDNA deutlich geringer als in der FR1 PCR. Das Beispiel zeigt, dass hier die Mutationen in der Primerbindungsstelle der ausschlaggebende Faktor für die Amplifikationseffizienz darstellen und nicht die kurzen DNA Bruchstücke der cfDNA, die bei größeren PCR-Fragmenten möglicherweise unzureichend erfasst werden.

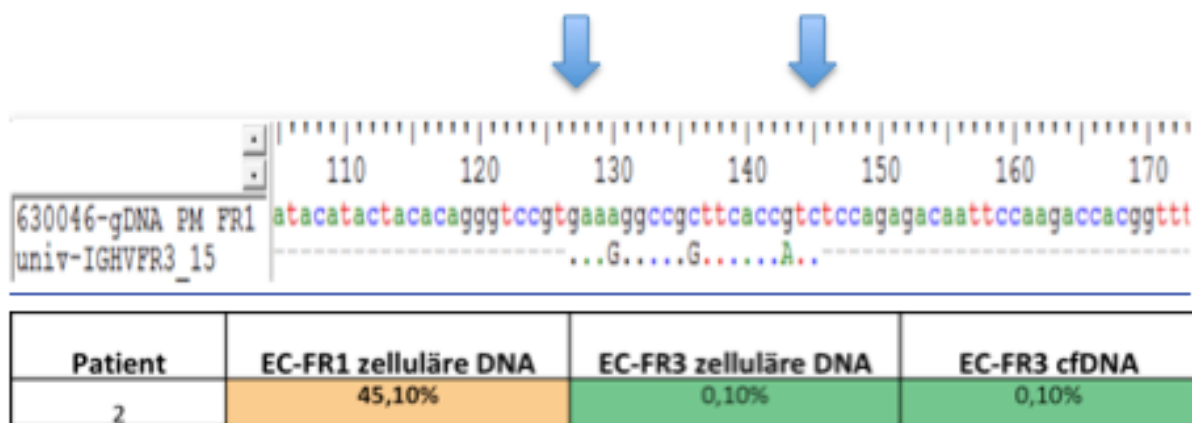


Abbildung 3.11 Vergleich der FR3 Sequenz des FL-Studienpatienten Nummer 2 bzw. hier als 630046 bezeichnet (obere Sequenz) und der EC-FR3 Primersequenz (untere Sequenz). Die Pfeile Markieren die Primerbindungsstelle. Dargestellt sind 3 Mutationen in der Primerbindungsstelle (Großbuchstaben). Die dazugehörigen Häufigkeiten des identifizierten Hauptklons aus Tabelle 3.3 sind unten zu sehen.

Hinsichtlich der grundsätzlichen Eignung des IGHV-FR3 Primer-Sets für die Klonotypidentifikation und MRD Analyse in zellfreier DNA haben wir in einem weiteren Schritt die Amplifikationseigenschaften in gDNA und parallel im cfDNA Material von 10 gesunden Probandenproben untersucht.

Abbildung 3.12 zeigt die junktionalen Nukleotidlängen in FR3-Sequenzen der gDNA 10 gesunder Probanden in einer typischen GAUSS-Verteilung. Die am häufigsten amplifizierten Segmente liegen in der gDNA in einem Größenbereich von 42, 45, 48 und 51 Nukleotiden.

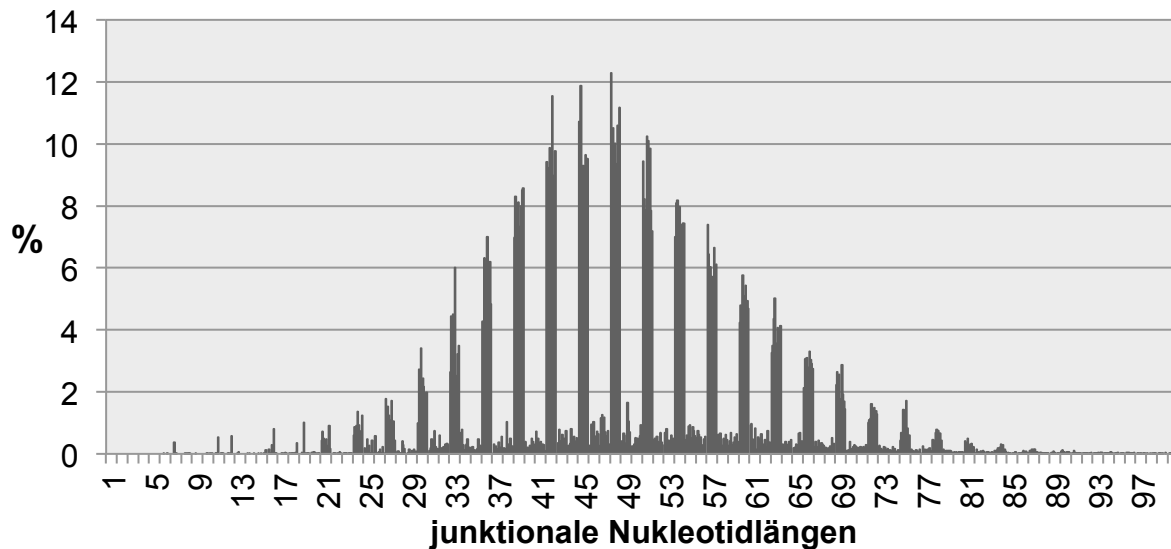


Abbildung 3.12 Prozentuale Verteilung der FR3-Amplifikate nach Nukleotidlängen der zellulären DNA 10 gesunder Probanden. nt=Nukleotid (engl. nucleotide)

In der cfDNA, die aus überwiegend sehr kleinen DNA Fragmenten von <100 bp besteht, zeigt sich eine Verschiebung der amplifizierten junktionalen Nukleotidlängen hin zu kürzeren DNA Fragmenten. Es kommt zu einer Linksverschiebung der junktionalen Nukleotidlängen mit einem Peak bei 39 bp. Dies reflektiert eine präferentielle Amplifikation kürzerer DNA Fragmente in cfDNA. Aus der Untersuchung ergibt sich, dass mit dem IGHV-FR3 Primer-Set klonale IGHV-Rekombinationen mit einer längeren junktionalen Region möglicherweise nicht ausreichend gut quantitativ erfasst werden. Dies, und die oben beschriebenen Mutationen in IGHV-FR3 veranlassten die Entwicklung eines FR3 Primersets für sehr kurze Fragmente. (siehe Abschnitt 3.3)

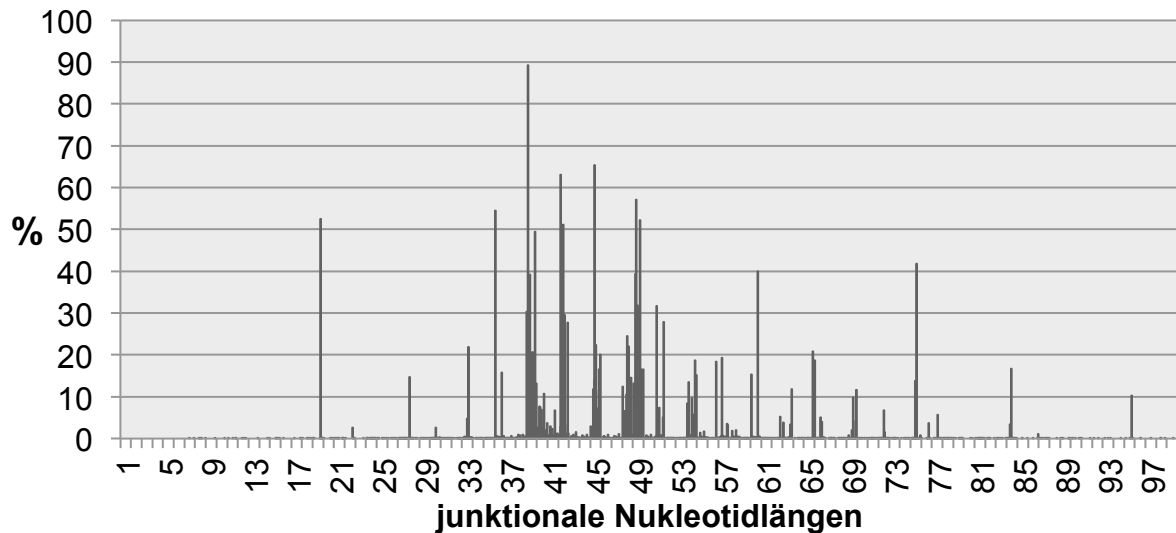


Abbildung 3.13 Prozentuale Verteilung der EC-FR3 Amplifikate nach junktionalen Nukleotidlängen in der cfDNA 10 gesunder Probanden.

3.2.1 Vergleich zwischen RQ-PCR und ddPCR zur MRD Detektion

Für die MRD Bestimmung in genomischer zellulärer DNA dient die RQ-PCR als Gold-Standard und somit als Vergleichsgrundlage zu anderen Methoden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Vergleichbarkeit von ddPCR und RQ-PCR zur MRD Quantifizierung in gDNA aus PB geprüft.

In 116 Proben zellulärer DNA (31 PM und 85 VM) der FL-Studienkohorte und der Kieler Patientenkohorte wurde vergleichend mittels RQ-PCR und ddPCR der MRD Status erhoben. Es wurden dieselben allel-spezifischen Primer- und Probensets verwendet.

In 42/116 Proben konnte übereinstimmend ein positiver MRD Wert nachgewiesen werden. In weiteren 67/116 Proben zeigten beide Methoden ein eindeutig negatives MRD Ergebnis (Abbildung 3.14). Die Korrelation der quantitativen Messwerte, die mit beiden Methoden ermittelt wurden war sehr hoch ($R^2=0,98$).

Insgesamt konnte anhand dieser Ergebnisse die MRD Quantifizierung mittels ddPCR als gleichwertig mit der RQ-PCR erachtet und in dieser Arbeit für die MRD Bestimmung in cfDNA angewendet werden.

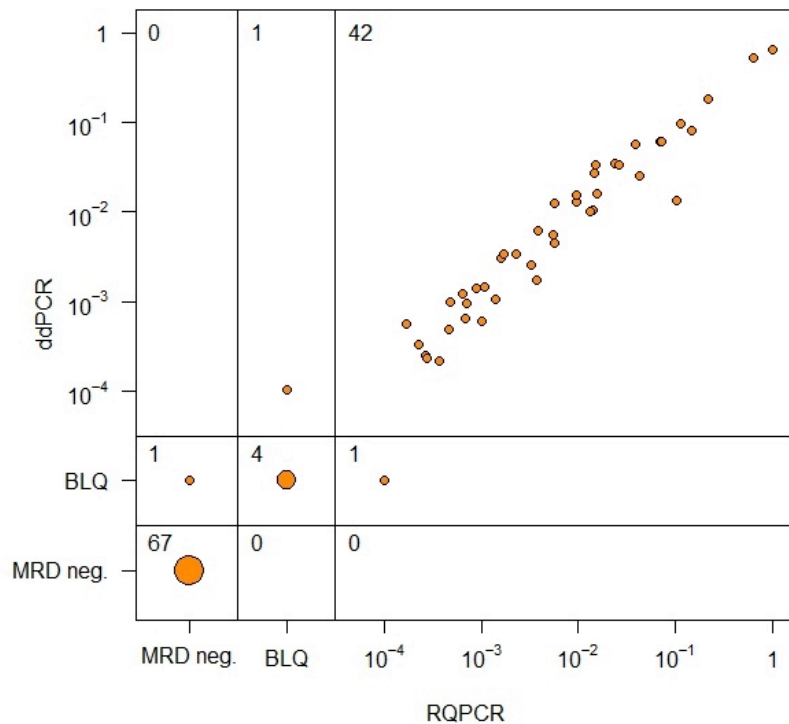


Abbildung 3.14 Vergleich zwischen RQ-PCR- und ddPCR-generierten MRD Werten in zellulärer DNA aus 116 Patientenmaterialien. BLQ=below quantitative range, MRD neg= kein spezifisches PCR Signal.

3.2.2 Validierung der MRD Bestimmung mittels ddPCR in zellfreier DNA

Zur MRD Bestimmung in cfDNA können prinzipiell PCR- und NGS-basierte Methoden verwendet werden. Da die ddPCR den Vorteil einer direkten Quantifizierung bietet, wurde für die MRD Quantifizierung in cfDNA in dieser Arbeit zunächst ein ddPCR Ansatz verwendet um die Möglichkeit der MRD Erfassung in cfDNA zu überprüfen.

Es wurden zunächst 41 gepaarte Proben von 21 Patienten der Kieler Patientenkohorte mit verfügbarer cfDNA und gDNA desselben Therapiezeitpunktes mittels ddPCR unter Verwendung der patientenspezifischen ASO-PCR Primer vergleichend analysiert. Für diese Patienten lag die Sequenzinformation für die Generierung allelspezifischer Primer aus der Konsensus PCR der diagnostischen Materialien vor.

29/41 Proben wiesen in der gDNA und cfDNA übereinstimmend keine messbaren Kopien des jeweils identifizierten Markers auf und waren somit, bei einer zu erreichenden Sensitivität von 10^{-5} für die gDNA und einer individuellen Sensitivität für

die cfDNA von 10^{-3} bis 10^{-5} MRD negativ. In 5/41 Proben konnte sowohl in der gDNA als auch in der cfDNA ein positiver MRD Befund mit dem Nachweis spezifischer Kopien erhoben werden. Interessanterweise lag in einer Probe dabei der MRD Wert in der cfDNA im quantitativen Messbereich (93 spezifische Kopien in der cfDNA bei insgesamt 2228 gemessenen Haushaltsgenkopien), während der MRD-Wert in der gDNA unterhalb des quantifizierbaren Messbereichs der ddPCR in der gDNA lag.

Bei insgesamt 7/41 Proben gab es eine Diskrepanz zwischen gDNA und cfDNA Proben: In 4 gDNA Proben konnte ein MRD-positiver Wert gemessen werden ($1,04 \times 10^{-4}$ bis $6,11 \times 10^{-3}$), während in den zugehörigen cfDNA Proben bei einem Einsatz von 2 ml Plasma mit einer Kopienzahl von 123,25 bis 341,75 Kopien/ml Plasma in zwei Ansätzen keine spezifischen Kopien/ml Plasma gemessen werden konnten.

Drei gDNA Proben waren bei einer Sensitivität von 10^{-5} MRD-negativ, während sich in den gepaarten cfDNA Proben bei einer individuellen Sensitivität von 10^{-3} bis 10^{-4} 26,46, 68,76 und 200,7 spezifische IGHV-Kopien/ ml Plasma messen ließen. Eine Übersicht ist in Tabelle 3.4 zu finden.

ddPCR Ergebnis	gDNA & cfDNA übereinstimmend		gDNA & cfDNA diskrepant	
	positiv	negativ	gDNA positiv cfDNA negativ	cfDNA positiv gDNA negativ
Anzahl	5/41	29/41	4/41	3/41

Tabelle 3.4 Vergleichsübersicht zwischen den ddPCR Ergebnissen in 41 Proben zellulärer und gepaarter cfDNA von insgesamt 21 Kieler Patienten.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass ein sensitiver MRD Nachweis bei Follikulären Lymphomen in zellfreier DNA mittels ddPCR unter Verwendung allelspezifischer Primer möglich ist und dass eine parallele Untersuchung von zellulärer und zellfreier DNA zu einem definierten Zeitpunkt den MRD Status präzise erheben kann.

3.2.3 IGHV-NGS zur MRD Detektion

Um die Eignung einer IG-NGS-basierten MRD Bestimmung für den sensitiven MRD Nachweis zu untersuchen, wurden 28 Verlaufsproben (gDNA) von 24 Patienten mit einem IGHV-Indexklon (14 aus der FL-Studienkohorte und 10 aus der Kiel Patientenkohorte), sowie 27 gepaarte cfDNA Proben mit dem EC-FR3 Primer-Set

sequenziert. In allen 28 gDNA Verlaufsmaterialien und in 25 der 27 cfDNA Proben der 23/ 24 getesteten Patienten (siehe dazu Materialübersicht in Tabelle 3.2) konnte der Indexklon nicht mehr nachgewiesen werden.

In einem Patienten der Kieler Patientenkohorte mit hoher Tumorlast konnte der Indexklon in zwei aufeinanderfolgenden cfDNA Verlaufsmaterialien mit einer 82%igen bzw. 79%igen Abundanz wiedergefunden werden, während der MRD Nachweis in der gepaarten gDNA negativ ausfiel.

Je nach Materialverfügbarkeit wurden die NGS-Ergebnisse mit der RQ-PCR und/oder ddPCR überprüft (19/24 gDNA Primärmaterialien, 23/28 gDNA Verlaufsmaterialien, sowie 2/16 cfDNA Primärmaterialien und 14/27 cfDNA Verlaufsmaterialien). Insbesondere im Falle der cfDNA konnten aufgrund des mangelnden Materials nur ausgewählte Proben vergleichend untersucht werden.

In der ddPCR konnten in den positiven Verlaufsmaterialien des Kieler Patienten krankheitsspezifische Kopien jeweils auf einem MRD Niveau von $1,2E-03$ bzw. $1,4E-02$ werden. Im cfDNA Primärmaterial eines weiteren Patienten der Kieler Patientenkohorte wurden in der ddPCR keine krankheitsspezifischen Kopien gemessen, während IG-NGS den Indexklon auch weiterhin nachweisen konnte. In den übrigen mittels der RQ-PCR bzw. ddPCR überprüften Proben (19 gDNA PM und 23 gDNA VM) waren die Ergebnisse übereinstimmend: In allen 19/24 getesteten PM konnten ebenfalls krankheitsspezifische Kopien festgestellt werden, während in allen 23/28 VM keine krankheitsspezifischen Kopien zu finden waren.

Tabelle 3.5 gibt eine Übersicht über den Vergleich der mittels RQ- bzw. ddPCR und parallel der mittels NGS untersuchten Proben.

Ergebnis	Übereinstimmend		Diskordant	
	RQ/ddPCR, NGS positiv	RQ/ddPCR, NGS negativ	RQ/ddPCR positiv, NGS negativ	NGS positiv, RQ/ddPCR negativ
gDNA PM	19/19			
gDNA VM		23/23		
cfDNA PM	1/2			1/2
cfDNA VM	2/14	12/14		

Tabelle 3.5 Vergleich zwischen den NGS und den RQ- bzw. ddPCR generierten Ergebnissen.

3.2.4 „Proof of principle“ in zwei Fällen aus klinischen Studien

Zur Anwendung in der klinischen Routine wurden die Krankheitsverläufe zweier Patienten anhand der gDNA und parallel der cfDNA verglichen. Die MRD Bestimmung erfolgte hierbei anhand der RQ-PCR und der ddPCR.

Die resultierenden Verlaufskurven der Patienten in Abbildung 3.15 a) und 3.15 b) veranschaulichen den Stellenwert der MRD-Bestimmung in cfDNA Proben im Krankheitsverlauf.

Abbildung 3.15 a) zeigt den Verlauf eines MCL Patienten mit dem Ann-Arbor Stadium VI und 8% leukämischer Ausschwemmung im peripheren Blut. Als MRD Marker diente die t(11;14) Translokation. Während im peripheren Blut nach Therapie mit R-Bendamustin und Ibrutinib keine residuellen Zellen in der RQ PCR und nur eine geringe Kopienzahl in der ddPCR nachweisbar waren, wurden in der cfDNA mit beiden Methoden hohe krankheitsspezifische Kopien gemessen, was sich auch im klinischen Verlauf mit einem Lymphknotenprogress (P) widerspiegelte.

Die zweite Abbildung zeigt den Verlauf eines FL Patienten mit Ann-Arbor Stadium IVB. Es wurden hier sowohl eine t(14;18) Translokation als auch eine IGH Rekombination als Marker identifiziert. Während die gDNA nach Induktionstherapie mit Obinutuzumab und Ibrutinib in beiden Messmethoden MRD negativ war, wies die cfDNA hohe krankheitsspezifische Kopienanzahlen auf. Dies stimmte auch hier mit einem deutlichen klinischen Progress der Krankheit überein. Im weiteren Verlauf wurde dann auch die gDNA in der RQ-PCR wieder positiv.

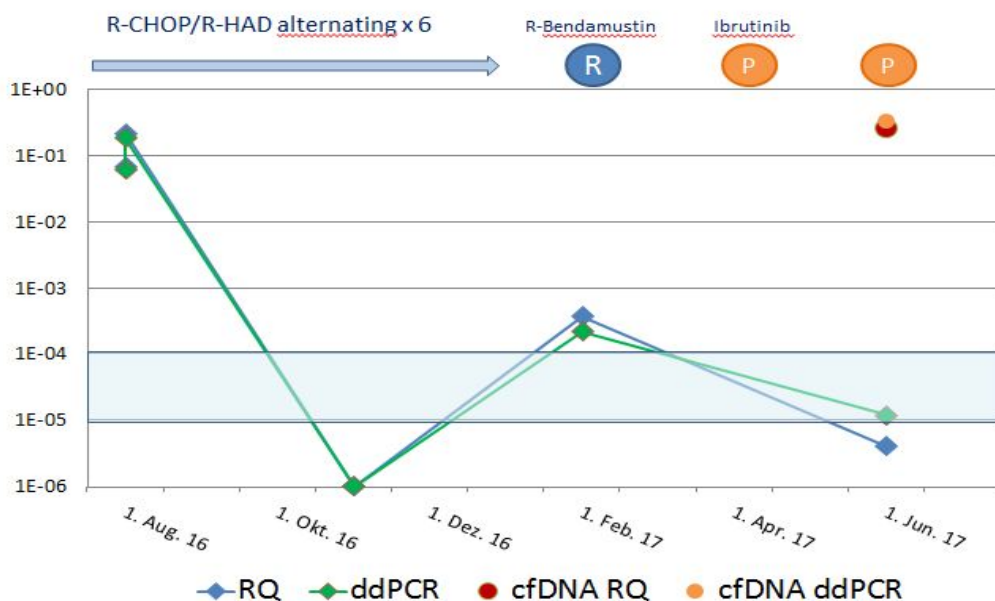


Abbildung 3.15 a) Krankheitsverlauf eines MCL Patienten mit dem Marker t(11;14). Dargestellt sind ddPCR und RQ-PCR erhobene MRD Werte im peripheren Blut (gDNA), sowie der prozentuale Anteil krankheitsspezifischer Kopien in cfDNA aus 1ml Plasma. Der farbige Bereich zwischen 1E-04 und 1E-05 veranschaulicht die MRD Positivität unterhalb des quantitativen Messbereiches. Aufgeführt sind auch die Therapien zu allen Zeitpunkten. R=klinische Remission, P=klinischer Progress

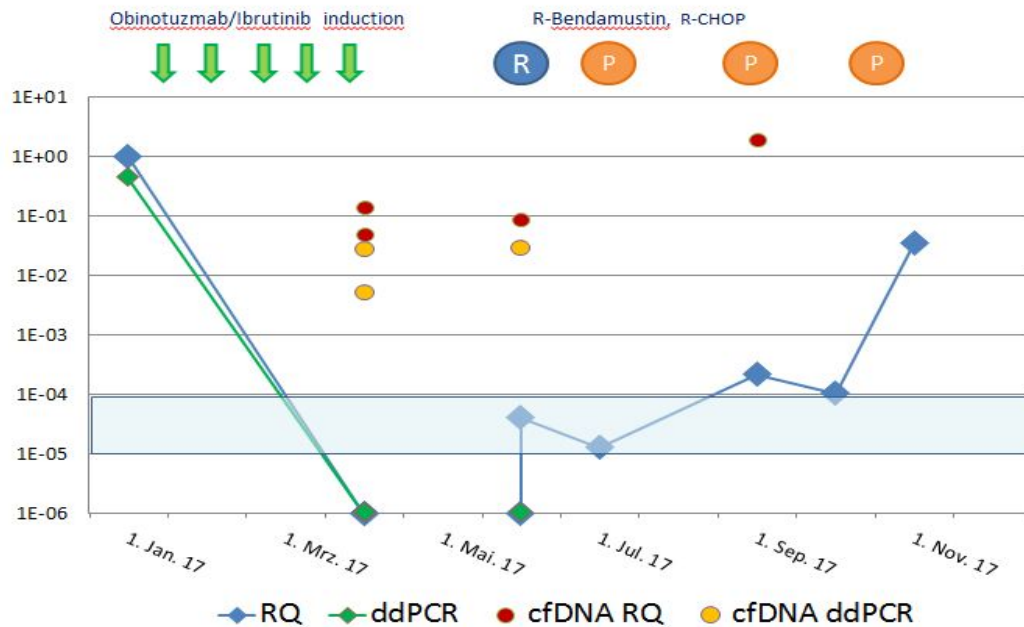


Abbildung 3.15 b) Krankheitsverlauf eines FL Patienten mit den Markern t(14;18) und IGHV. Dargestellt sind ddPCR und RQ-PCR erhobene MRD Werte in gDNA, sowie der prozentuale Anteil Krankheitsspezifischer Kopien in cfDNA aus 1ml Plasma. Der farbige Bereich zwischen 1E-04 und 1E-05 veranschaulicht die MRD Positivität unterhalb des quantitativen Messbereiches. Aufgeführt sind auch die Therapien zu allen Zeitpunkten. R=klinische Remission, P=klinischer Progress

3.3 Etablierung eines optimierten IGHV-FR3 Primer-Sets

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen mit dem EC-FR3 Primer-Set ergab sich wie bereits unter Abbildung 3.13 dargestellt eine unbefriedigende Amplifikation von IGHV-Rekombinationen mit junktionalen Regionen größer als 39 bp.

Um den Amplifikationsbias größerer Rekombinationen in den kurzen Fragmenten der cfDNA zu reduzieren wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues IGHV-FR3 Primer-Set konzipiert, dass den Anforderungen für die Amplifikation kurzer DNA Fragmente und somit cfDNA gerecht wird. Dieses Primer-Set, im Folgenden als FR3-cfDNAB bezeichnet, wurde im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität analysiert. Die Etablierung erfolgte in 50 Plasmiden mit klonierten IGHV Rekombinationen, die das Spektrum von 50 der bekannten 52 funktionalen IGHV Gensegmente abdecken. Es

erfolgte eine Optimierung der PCR-Bedingungen im Hinblick auf die Sensitivität, Spezifität und die Primerperformance.

Zunächst wurden die Primer an unverdaulichem und mittels der NEBNext dsDNA Fragmentase (NEB, England) in kleine DNA Fragmente verdauten Buffy Coat, jeweils mit und ohne spike-in Kontrollen getestet (Abbildung 3.16). Die verdauten Buffy Coat-Proben sollten die kurzen cfDNA Fragmente imitieren und hatten eine Länge zwischen 140-230bp.

Diese Buffy Coat-Proben wurden zum direkten Vergleich ebenso mit den IGHV-FR1 und IGHV-FR3 EuroClonality Primer-Sets sequenziert. Alle spike-in Kontrollen, bis auf die Zelllinie „Raji“ konnten in jeder Probe mit dem neuen Primer-Set nachgewiesen werden. Die Analyse der IGHV-Sequenz der Zelllinie „Raji“ ergab eine Mutation im Bereich der Primerbindungsstellen, sodass eine Amplifikation dieser Rekombination nicht gelang.

	BC				BC-verdaut				BC-Spike-in				BC-verdaut-Spike-in			
	FR1ECMix-Fah	FR3consneu	FR3ECMix-Fah	FR3Mixneu	FR1ECMix-Fah	FR3consneu	FR3ECMix-Fah	FR3Mixneu	FR1ECMix-Fah	FR3consneu	FR3ECMix-Fah	FR3Mixneu	FR1ECMix-Fah	FR3consneu	FR3ECMix-Fah	FR3Mixneu
anno-tracer (spike-in)																
spike_in:A05_IGH-VJ_TMM=40	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8316	0,001	0,0048	0	6,9297	0,0015	0,0043	0,0098
spike_in:A06_IGH-VJ_TOM-1=40	0	0	0	0	0	0	0	0	2,0413	6,2632	13,451	5,9	13,852	7,9495	18,4649	8,2936
spike_in:B03_IGH-VJ_REH=40	0	0	0	0	0	0	0	0	6,3841	4,2232	0,1961	4,1	23,574	4,0686	0,5204	6,7802
spike_in:B01_IGH-VJ_ALL-MIK=40	0	0	0	0	0	0	0	0	8,1794	1,3702	0,6186	0,3	28,994	2,0115	0,6942	0,3281
spike_in:A02_IGH-VJ_ALL-MIK=40	0	0	0	0	0	0	0	0	4,61	0,0005	0,0655	0,7	10,509	0	0,265	1,3576
spike_in:B07_IGH-VJ_WSU-NHL=40	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2681	0,0053	0,3698	0,6	0,0785	0,0039	0,7236	0,606

Abbildung 3.16 Spike-in Detektion in allen verdauten und unverdaulichem Buffy Coat Proben mittels des neuen FR3-cfDNAB Primer-Sets (hier als FR3Mixneu bezeichnet). Die linke Spalte (anno-tracer) listet die verwendeten spike-in Kontrollen (Tabelle 7.4 im Anhang) bis auf die Zelllinie „Raji“. FR1ECMix+Fah=EC-FR1 Primer-Set; FR3consneu= neu entwickelter cfDNA Universalprimer; FR3ECMix-Fah=EC-FR3 Primer-Set; FR3Mixneu=FR3-cfDNAB Primer-Set.

Zur Optimierung der Primerbedingungen wurden die Temperaturprofile und die MgCl₂ Konzentrationen umfangreich getestet. Die besten Ergebnisse für alle Primerkombinationen konnten bei 50 C° mit einem Einsatz von 3 mmol MgCl₂ erreicht werden. Die vergleichende Analyse des FR3-cfDNAB Primer-Sets mit dem cfDNA Universalprimer, und dem EC-FR3 Primer-Set in 3 äquimolar gepoolten Plasmidansätzen ergab unter optimierten Bedingungen eine gut reproduzierbare Detektion von 49 der 50 möglichen IGHV Rekombinationen.

Die Rekombination IGHV3-43 konnte mit keinem der Primer amplifiziert werden. Beim direkten Sequenzabgleich der getesteten Primer mit der IGHV3-43 Rekombination konnten hier Mutationen in allen Primern nachgewiesen werden.

Unterschiede in der Amplifikationseffizienz verschiedener Rekombinationen ließen sich in den meisten Fällen durch Mutationen in den Primerbindungsstellen erklären. Dabei traten Mutationen gehäuft an bestimmten Primerpositionen auf, die Problempositionen waren u.A. die Base Guanin an den Positionen 3, 15 und 17 in verschiedenen Primern. Insbesondere problematisch war die Position 22:G, da diese häufig mutiert war und nahe am 3'-Ende lag, womit die Primerbindung eingeschränkt und die erfolgreiche Amplifikation der Rekombination verhindert wurde. Auch durch den Einsatz der variablen Nukleotidpositionen („wobbles“) konnte jedoch keine weitere Verbesserung erzielt werden.

Nach Optimierung der Primer und der Reaktionsbedingungen wurde das FR3-cfDNAB Primer-Set in einer multinationalen Qualitätskontrolle in 6 molekulargenetischen Laboren des Euroclonality NGS Netzwerkes validiert.

Dazu waren peripheres Blut (gDNA) und cfDNA vom gleichen Zeitpunkt von 4 Patienten (im Folgenden als Patienten 2-5 bezeichnet) ausgewählt worden, sowie Buffy Coat und gepoolte cfDNA von 5 gesunden Labormitarbeitern als Negativkontrollen. Die Materialien von Patienten waren sog. „leftover samples“ und wurden zentral aus dem Kieler Labor mit einer Standardarbeitsanweisung zur Verfügung gestellt.

Wie in Abbildung 3.17 veranschaulicht, konnten die MRD Niveaus der verschiedenen Proben im peripheren Blut mit einer sehr guten Korrelation zwischen den Laboren quantifiziert werden. Es ergaben sich lediglich größere Abweichungen in Probe cfDNA3 durch ein Labor (Abbildung 3.18).

Der Buffy Coat und die gepoolte cfDNA der gesunden Probanden waren jeweils wie gefordert negativ.

Insgesamt ergab sich im Rahmen des europäischen Ringversuchs zur Validierung des neu etablierten FR3-cfDNAB Primer-Sets eine sehr gute Intra- und Interlaborreproduzierbarkeit der teilnehmenden Labore. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte NGS-basierte Methodik kann somit zur Anwendung in klinischen Studien herangezogen werden.

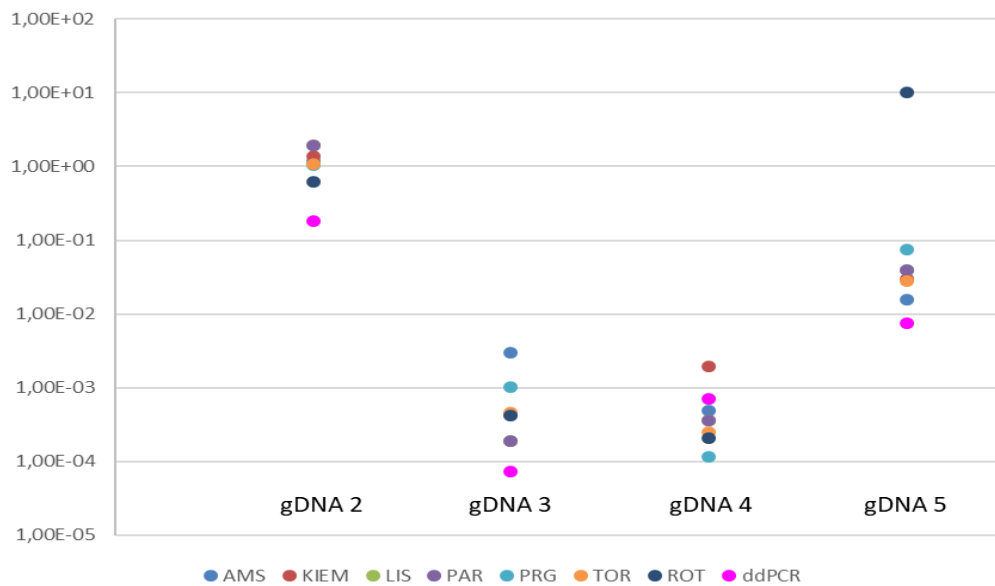


Abbildung 3.17 MRD-Level (y-Achse) in der gDNA von 4 Patienten nach Analyse durch 6 verschiedene EC-Labore (x-Achse).

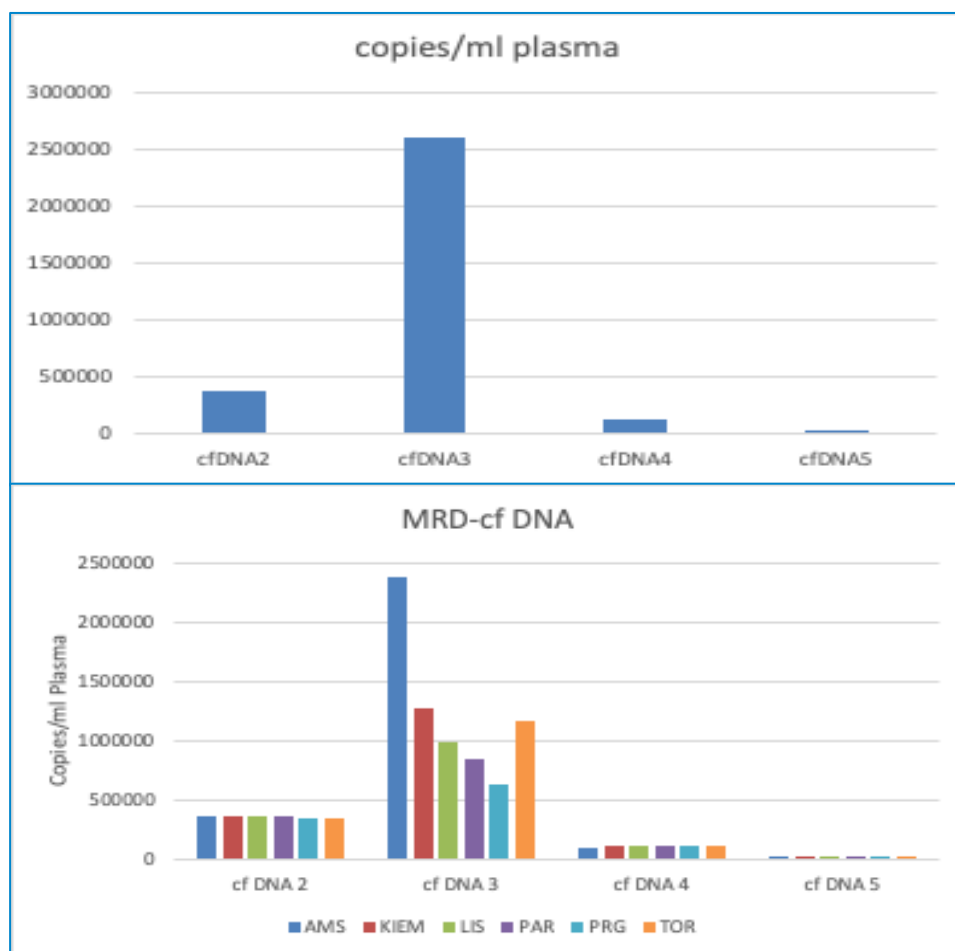


Abbildung 3.18 Menge an zellfreier DNA in den 4 verschiedenen Patienten als durchschnittliche Menge krankheitsspezifischer Kopien/ml Plasma (oben). Ergebnisse der Messwerte in Kopien/ml Plasma aus den beteiligten 6 EC-Laboren (unten).

4 Diskussion

Die Detektion von cfDNA ist bereits in verschiedenen Tumorentitäten solider Tumore eine vielversprechende, nichtinvasive Methode zur Krankheitsevaluation (Diaz et al., 2014). Neben ihrer prognostischen Relevanz ist die Menge an cfDNA repräsentativ für die Tumorlast eines Patienten und spiegelt die gesamte genetische Heterogenität des Primärtumors, sowie auch der Metastasen wider (Bettegowda et al., 2014; Buedts et al., 2016). Roschewski et al. haben gezeigt, dass cfDNA als Marker der Tumorlast eine erfolgsversprechende Rolle in der Verlaufskontrolle aggressiver B-Zell-Lymphome spielen könnten. Auch für die frühzeitige Erkennung eines Rezidivs vor ersichtlichen klinischen Anzeichen, kann die cfDNA herangezogen werden (Roschewski et al., 2016). Zudem stellt die cfDNA möglicherweise eine spezifischere Methode zur Verlaufskontrolle maligner Lymphome als die herkömmliche PET/CT dar (Kurtz et al., 2015). Das Vorgehen bei der Präanalytik und die Durchführung der Untersuchung zellfreier DNA ist bislang jedoch nicht standardisiert und zur Rolle der Analyse zellfreier DNA bei Follikulären Lymphomen liegen bislang keine publizierten Daten vor.

Diese Arbeit fokussiert sich daher auf:

- 1) Die Etablierung eines optimierten Vorgehens für die Präanalytik des verwendeten Untersuchungsmaterials und insbesondere auf eine optimierte Extraktion der zellfreien DNA
- 2) Die Anwendbarkeit verschiedener Verfahren zur Quantifizierung minimaler Resterkrankung mit dem Fokus auf zellfreie DNA
- 3) Zellfreie DNA als alternative Quelle für die Bestimmung minimaler Resterkrankung.

Um eine zuverlässige und reproduzierbare Analyse zellfreier DNA zu gewährleisten, muss zunächst auf Qualität und Quantität der zellfreien DNA geachtet werden, die stark von der Präanalytik abhängt. In dieser Arbeit wurden daher zunächst umfangreiche Untersuchungen zur Präanalytik und DNA Extraktion von cfDNA durchgeführt. Der erste Schritt in der Präanalytik besteht in der Wahl des Materials, aus dem die cfDNA extrahiert werden soll. Mehrere Studien belegen, dass Plasma eine bessere Quelle für tumorgenerierte cfDNA (ctDNA) darstellt als Serum (El

Messaoudi et al., 2013; Meddeb et al., 2019). Dies begründet sich unter anderem darin, dass bei der Verwendung von Serum durch die Gerinnungsaktivierung zelluläre DNA freigesetzt wird, die zu einer Kontamination der zellfreien DNA führen kann.

Bei Verwendung von Standard-EDTA Röhrcchen zur Blutabnahme kann die Qualität der cfDNA und die Kontamination durch zelluläre DNA durch eine unverzügliche Plasmaasservierung nach der Blutabnahme in einem Zeitfenster von 4-6 Stunden sichergestellt werden (Meddeb et al., 2019).

Die Verwendung spezialisierter Stabilisationsröhrcchen (STRECK®) ermöglicht eine längere Transportdauer bis zur Asservierung des Plasmas ohne Qualitätsverlust (Norton et al., 2013, Meddeb et al., 2019). Dabei ist neben der Verarbeitungszeit auch die Raumtemperatur, die zwischen 10°C und 40°C liegen sollte, ein wichtiger Faktor (Diaz et al., 2016). In STRECK®-Röhrcchen asserviertes Plasma erlaubt bei Raumtemperatur eine Präservation der cfDNA bis zu 14 Tage (El Messaoudi et al., 2013). Plasma, welches erst nach Zeitverzug weiterbearbeitet werden kann, sollte in Aliquots von bis zu 4 ml bei -80°C eingefroren werden und hält sich in diesem Zustand bis zu 9 Monate (El Messaoudi et al., 2013). Dabei ist es wichtig zu beachten, dass das Plasma lediglich 2 Mal eingefroren und wieder aufgetaut werden darf um eine gute Qualität zu gewährleisten (Meddeb et al., 2019). Die Plasmaasservierung und Aliquotierung sollte von geschultem Personal ausgeführt werden, um eine Kontaminierung durch den Buffy Coat zu verhindern.

Im Rahmen der Blutverarbeitung ist des Weiteren eine zweifache Zentrifugierung von Bedeutung, um die Kontamination durch zelluläre DNA zu vermeiden. Dabei sollte die zweite Zentrifugierung mit einer höheren Geschwindigkeit erfolgen (präferenziell bei 16000g für 10 Min.). Ein dritter Zentrifugationsschritt hat sich hinsichtlich der Plasmaqualität nicht bewährt (El Messaoudi et al., 2013).

Die Resultate dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Transportdauer der cfDNA in Bezug auf die zu erreichende Qualität eine kritische Rolle spielt. In der Qualitätskontrolle mittels eines Agilent Elektropherogramms wiesen Plasmaproben aus der FL-Studienkohorte ohne die Verwendung spezieller Transportröhrcchen im Vergleich zu den im empfohlenen Zeitfenster verarbeiteten Proben aus dem eigenen Patientenkollektiv eine hohe Kontamination mit zellulärer DNA durch verzögerte Verarbeitung und den Transport auf.

Eine Kontamination mit zellulärer DNA kann die Sensitivität des MRD Nachweises in cfDNA einschränken, da genomische DNA aus apoptotischen Blutzellen einen Verdünnungseffekt der ctDNA herbeiführt (Meddeb et al., 2019) und dadurch zu falsch negativen MRD Ergebnissen führen kann.

Dies ist durchaus auch für das Markerscreening bei reifen B-Zell-Lymphomen zu berücksichtigen, da es sich hier im Vergleich zu akuten und chronischen Leukämien häufig um relativ gering infiltrierte Proben handelt.

Für die Analyse zellfreier DNA im Rahmen klinischer Studien ist folglich eine strukturierte Probensammlung mit einer definierten Präanalytik für die Gewinnung von zellfreier DNA aus Plasma notwendig, um qualitativ einheitliches Material für die Untersuchungen zur Verfügung zu haben und zuverlässige Aussagen zur prognostischen Bedeutung genomischer Aberrationen oder auch der Bedeutung minimaler Resterkrankung vornehmen zu können.

In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des QIAamp CNA Kit für die cfDNA Extraktion die beste Methode für die DNA Extraktion mit einer hohen Ausbeute, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der cfDNA darstellt. Dies konnte auch in anderen publizierten Untersuchungen gezeigt werden (Mauger et al., 2015). Die Limitation dieser Methode besteht darin, dass eine spezielle Vakuumpumpe benötigt wird, die ggf. nicht jedem Labor zugänglich ist. Zudem ist eine Extraktion im Hochdurchsatz nicht möglich, da die Probenkapazität bei maximal 24 Proben pro Extraktionsansatz liegt und mit einem großen Pipettieraufwand verbunden ist. Für die Extraktion im Hochdurchsatz ist das automatisierte Verfahren mit dem QIASymphony mit guten Ergebnissen durchführbar, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Der Nachweis minimaler Resterkrankung bei akuten und chronischen Leukämien und malignen Lymphomen beruht im Wesentlichen auf der Erfassung zirkulierender Lymphomzellen. Zur MRD-Erfassung werden überwiegend PCR-basierte Methoden verwendet, die Markeridentifizierung erfolgt dabei aus dem peripheren Blut und Knochenmark. Bei überwiegend nodalen B-Zell-Lymphomen wie beispielsweise dem diffus großzelligen B-NHL oder dem M. Hodgkin, besteht nur selten eine Ausschwemmung von Lymphomzellen in das periphere Blut, sodass es wenig publizierte Daten zur Bedeutung minimaler Resterkrankung dieser Lymphomentitäten

gibt. Die Präsenz von Lymphomzellen im peripheren Blut wird für diese Erkrankungen mit einer extensiven Tumorlast und schlechter Krankheitskontrolle assoziiert (Hiorns et al., 1994). Für diese Lymphomentitäten bietet die Analyse zellfreier DNA eine neue Möglichkeit für die biologische Charakterisierung des Mutationsspektrums der Erkrankung sowie den Nachweis von MRD. Einige publizierte Daten liegen hierzu für aggressive B-NHL von Roscheswki et al., 2015 und 2016, sowie Rossi et al., 2017 vor. Auch für Hodgkin Lymphome wurde der Stellenwert der Untersuchung von cfDNA für das Therapiemonitoring gezeigt (Spina et al., 2018).

Die Analyse von cfDNA für die MRD Detektion bietet eine schnelle und wenig invasive Alternative zu herkömmlichen Verfahren. Die cfDNA wird direkt vom nodulären Tumor selber abgegeben und ist als ctDNA mit verschiedenen Methoden nachweisbar, unabhängig von zirkulierenden Tumorzellen (engl. circulating tumor cells, CTCs). Die Bestimmung von ctDNA kann auch bei leukämischen Lymphomen wie Follikulären Lymphomen und Mantelzelllymphomen eine Alternative für den MRD Nachweis darstellen. Eine Immunchemotherapie unter Verwendung eines Anti-CD20 Antikörpers führt zu einer Depletion aller CD20 positiven Zellen im Blut und damit möglicherweise zu einem falsch negativen MRD-Ergebnis, hier könnte die MRD-Bestimmung an cfDNA eine zusätzliche Alternative darstellen.

Verschiedene Publikationen haben gezeigt, dass die Menge an cfDNA bei Diagnosestellung in verschiedenen soliden Tumorentitäten prognostisch wichtig ist (Bettegowa et al., 2014). Auch für maligne Lymphome liegen Daten zur prognostischen Bedeutung von ctDNA bei aggressiven Lymphomen vor, Roscheswki et al. haben gezeigt, dass die Analyse der ctDNA im Verlauf effektiv den Krankheitsstatus auf dem molekularen Level in Patienten mit DLBCL überwachen kann. Durch die Beobachtung der ctDNA Mengen ist es mit einer höheren Sensitivität als mit der CT-Untersuchung möglich, bei diesen Patienten das Risiko eines Rezidivs vor klinischen Symptomen zu identifizieren. Außerdem haben Roschewski et al. gezeigt, dass die ctDNA ein hohes Potenzial als Biomarker für die Therapieeffektivität bzw. ein Therapieversagen hat und somit ggf. ein besseres Outcome bei frühzeitiger Umstellung der Therapie erzielt werden kann (Roschewski et al., 2016).

Zur Bedeutung cfDNA bei Follikulären Lymphomen liegen insgesamt lediglich zwei Daten aus publizierten Arbeiten vor.

In ihrer Arbeit über den prognostischen Wert der IGH-VDJ Quantifizierung im Plasma bei Diagnosestellung von FL-Patienten haben Sarkozy et al. 2017 gezeigt, dass die Präsenz oder Abwesenheit von ctDNA im Blut bei FL mit einer Knochenmarkbeteiligung assoziiert ist, jedoch nicht mit dem FLIPI score, LDH im Serum, Anämie und der Präsenz von zirkulierenden Tumorzellen. Jedoch korrelieren hohe Mengen an ctDNA zum Zeitpunkt der Diagnose mit einem signifikant kürzeren progressionsfreiem Überleben (engl. progression free survival, PFS) (Sarkozy et al., 2017). Delfau-Larue et al. haben ebenfalls den prognostischen Wert der cfDNA in FL Patienten untersucht. Dabei zeigten bei Diagnose sowohl die CTCs als auch die cfDNA eine Korrelation mit dem Tumolvolumen (engl. total metabolic tumor volume, TMTV). Patienten mit einem verkürzten PFS wiesen hohe Mengen cfDNA und ein hohes TMTV zum Zeitpunkt der Diagnose auf (Delfau-Larue et al., 2018). Die Daten der beiden Arbeiten indizieren, dass die Quantifizierung der cfDNA in FL vor Therapiebeginn zur Prognoseabschätzung und zur Erfassung des Tumolvolumens verwendet werden kann und prätherapeutisch ggf. eine risikoadaptierte, individualisierte Therapie erlaubt.

Die in dieser Arbeit gemessenen cfDNA Mengen in FL wiesen mit 780 - 449160 Kopien/ ml Plasma eine große Heterogenität auf. Um eine Aussage über die prognostische Bedeutung von cfDNA in der untersuchten Studienkohorte Follikulärer Lymphome treffen zu können fehlen in dieser Arbeit leider die entsprechenden klinischen Daten.

In dieser Arbeit wurden die Grundlagen für eine zuverlässige Quantifizierung von cfDNA gelegt, die eine Quantifizierung auch in größeren klinischen Studien erlaubt.

Für die Bestimmung von MRD gilt die RQ-PCR als Goldstandard. Als gleichwertig sensitive Methode zur MRD-Detektion stellt die ddPCR eine mögliche Alternative zur RQ-PCR dar. Sie bietet außerdem den Vorteil, dass eine aufwändige konzentrationsabhängige Verdünnungsreihe zur Generierung einer Standardkurve nicht benötigt wird und direkt quantifiziert werden kann.

Die in dieser Arbeit mit beiden PCR-basierten Methoden vergleichend untersuchten Proben aus peripherem Blut Follikulärer Lymphome zeigten eine hohe Übereinstimmung hinsichtlich der MRD Ergebnisse, sodass die MRD Quantifizierung mittels ddPCR als gleichwertig mit der RQ-PCR für Follikuläre Lymphome angesehen werden kann. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit publizierten

Daten bei Patienten mit Multiplem Myelom, Mantelzelllymphomen und Follikulären Lymphomen (Drandi et al., 2015 und 2020). Hier konnte in einer vergleichenden Untersuchung gezeigt werden dass die ddPCR in der Detektion von klonalen IGHV-Rekombinationen eine vergleichbare Sensitivität von bis zu 10^{-5} erreicht und eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit hat. Außerdem erlaubt die ddPCR eine genaue Quantifizierung auch von Proben mit einem MRD-Wert unterhalb des quantifizierbaren Messbereiches der RQ-PCR (Drandi et al., 2015 und 2020). Die stellt einen großen Vorteil dar, da die ddPCR ca. 40% aller Proben mit einem MRD Niveau in der RQ-PCR zwischen $1E-4$ und $1E-5$ absolut quantifizieren kann und damit den Graubereich der RQ-PCR signifikant reduziert (Drandi et al., 2020).

Für die MRD-Bestimmung in cfDNA werden sensitive Methoden und bestenfalls größere Mengen Plasma für die Analyse benötigt (Forsheew et al., 2012).

Durch eine potenziell höhere Sensitivität, die Fähigkeit das gesamte Spektrum genetischer Veränderung zu erfassen und die Limitationen herkömmlicher PCR-basierter Verfahren hinter sich zu lassen, eignen sich insbesondere NGS-basierte Verfahren zum MRD Nachweis. Neben der Analyse von somatischen Mutationen in krankheitsrelevanten Genen kommt der immungenbasierten Hochdurchsatzsequenzierung klonaler Immungenumlagerungen eine besondere Bedeutung zur MRD-Bestimmung bei hämatologischen Neoplasien zu, da die klonale Immungenumlagerung als genetischer Fingerabdruck der Lymphom- oder Leukämiezelle erfasst werden kann. Daher wurde in dieser Arbeit ein Immungen-basierter MRD Assay für die Erfassung von MRD in der cfDNA gewählt.

Da in dieser Arbeit beide PCR-basierten Methoden in zellulärer DNA vergleichbar gute MRD-Ergebnisse lieferten, wurde die ddPCR auch als Goldstandard für die MRD Bestimmung in cfDNA verwendet und um die Eignung von IG-NGS basierten Verfahren für die MRD-Bestimmung zu untersuchen.

Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen an der vergleichenden Analyse mittels RQ- und ddPCR an 19 Patienten, dass IG-NGS mit dem Fokus auf die klonale Immunglobulinschwerkettengenumlagerung für die zuverlässige Detektion minimaler Resterkrankung bei Follikulären Lymphomen erfolgreich angewendet werden kann. Der IG-NGS Assay zeigte eine reproduzierbare Sensitivität und hohe Spezifität in

genomischer DNA. Für FL liegen bislang keine publizierten Daten zur vergleichenden Analyse von PCR- und NGS-basierter Methoden zur MRD Bestimmung vor. Aus unserer eigenen Gruppe zeigt eine Untersuchung an 80 Patienten mit Follikulärem Lymphom eine sehr gute Korrelation von IG-NGS basierten erhobenen MRD Werten mit RQ-PCR Ergebnissen. Diese Daten wurden im Rahmen der Dissertationsschrift von Arved Herzog in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. C. Pott erhoben. Bei anderen B-NHL Entitäten liegen bereits publizierte Daten vor, beim Multiplen Myelom stellt Takamatsu eine hohe Korrelation zwischen NGS- und ddPCR-generierten MRD Resultaten fest und kann eine höhere Sensitivität von bis zu 10^{-6} für NGS darlegen (Takamatsu, 2017). Auch bei der CLL zeigt eine vergleichende Untersuchung von Rawstron et al. von 6-Farben Durchflusszytometrie und Immungen NGS eine gute Übereinstimmung beider Methoden hinsichtlich der MRD Ergebnisse bis zu einem Sensitivitätsniveau von $10E-04$ und eine gute Linearität von IG-NGS bis zu einer nachweisgrenze von $10E-06$ (Rawstron et al., 2016).

In dieser Arbeit ließen sich im Hinblick auf die Klonalitätsanalyse und der quantitativen MRD Bestimmung Unterschiede zwischen NGS und PCR-basierten Methoden feststellen.

Dies mag auf den technischen Unterschieden der Verfahren beruhen. In der ddPCR werden patientenspezifische Primer verwendet, die mit hoher Genauigkeit die spezifische Rekombination vervielfältigen. Im Gegensatz dazu verwendet das IG-NGS Verfahren eine Multiplex PCR zur Generierung des Amplikons für die anschließende Sequenzierung. Hier können Mutationen der IGHV-Region an den Primerbindungsstellen die Amplifikationseffizienz der Zielgenamplifikation stark beeinflussen und zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Diese Unterschiede zeigten sich zum einen in der Frequenz der Indexklonidentifizierung im Vergleich zu Konsensus-PCR basierten Verfahren, als auch in der Amplifikationseffizienz von IG-NGS Ansätzen der verschiedenen IGH-Framework Regionen.

Bei Verwendung des EC-FR1 NGS Ansatzes ließen sich in 15 von 16 diagnostischen Proben ein dominanter Klonotyp zuverlässig detektieren, eine Probe blieb negativ trotz ausreichend guter DNA Qualität. Damit ist die Detektion eines dominanten Klonotyps aus dem diagnostischen peripheren Blut Follikulärer Lymphome in dieser

Arbeit deutlich höher als in einer publizierten Untersuchung von Sarkozy et al. an primärem Tumorgewebe einer Kohorte von 34 Follikulären Lymphomen der französischen PRIMA Studie (Sarkozy et al., 2017). Sarkozy et al. konnten nur in 23/34 (68%) eine klonale IGHV Rekombination in formalinfixierten diagnostischen Tumorproben (FFPE) nachweisen. Ursächlich hierfür kann u.a. die Materialqualität von FFPE Proben mit einem hohen Anteil an degradierter DNA sein.

In der vergleichenden IG-NGS Analyse mit den Framework Regionen IGH-FR1 und IGH-FR3 zeigte sich in dieser Arbeit in der IG-NGS FR3 Analyse eine 58% niedrigere Abundanz des dominanten Klonotyps im Vergleich zur IGH-NGS FR1 Analyse. Dies ist am ehesten auf somatische Hypermutation des Immunglobulinschwerkettengens (SHM) zurückzuführen. Die dahingehende Überprüfung der Klonotypsequenzen zeigte in 9/14 überprüften IGH-FR3 Sequenzen Mutationen an den Primerbindungsstellen der IGHV-FR3 Region. Die IGH-CDR3 Region und die benachbarte IGH-FR3 Region weisen bekanntermaßen die höchste Mutationsfrequenz im IGHV Gen auf (van Dongen et al., 2003).

Mutationen in den Primerbindungsstellen können auch im Krankheitsverlauf als Mechanismus der klonalen Evolution eines Follikulären Lymphoms entstehen (Loeffler et al., 2017) und über die geringere Amplifikationseffizienz zu einer ungenauen Erfassung des MRD-Status oder auch falsch negativen MRD Ergebnissen führen. Eine Lösung dafür könnte die Verwendung von mehr als einem MRD Marker darstellen, beispielsweise sind inkomplette IGH-DH-JH Rekombinationen, ebenso wie klonale Rekombinationen der Immunglobulinleichtkette kappa (Ig κ) deutlich weniger häufig mutiert (van Dongen et al., 2003; Hebeda et al., 2009) und auch prinzipiell als MRD Marker mit NGS geeignet (Brüggemann et al., 2019).

Im Hinblick auf die Nutzung zellfreier DNA in der MRD Diagnostik wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Optimierung des FR3 Primer-Sets in Bezug auf die kurzen cfDNA Fragmente durchgeführt. Es wurden Primer für alle V-Gene designt die möglichst nahe an der CDR3 Region liegen, ohne von 3' Deletionen des V Gens betroffen zu sein. Außerdem wurden die Primerbindungsstellen möglichst an der gleichen Position angesetzt, um Amplikons gleicher Länge zu generieren und somit den Amplifikationsbias durch präferenzielle Amplifizierung kürzerer Fragmente zu umgehen. Das IGHV FR3 Primer-Set und die erforderlichen Reaktionsbedingungen

wurden erfolgreich in fragmentiertem Buffy Coat und in 50 Plasmiden mit klonierten CLL Rekombinationen im Hinblick auf eine höchstmögliche Sensitivität und Spezifität optimiert und im Rahmen eines Ringversuchs validiert. Hier wurden reproduzierbare qualitative und quantitative Ergebnisse in zellulärer und zellfreier DNA erzielt. Somit konnten in dieser Arbeit die methodischen Grundlagen für eine prospektive Untersuchung von Plasmaproben im Rahmen klinischer Studien gelegt werden, die aktuell im Hämatologie Labor in Kiel durchgeführt werden.

Zur Standardisierung der bioinformatischen Auswertung im Hinblick auf die kurzen DNA Fragmente in zellfreier DNA wurden im Rahmen dieser Arbeit der Auswertungsalgorithmus der verwendeten ARRest/Interrogate Plattform angepasst. Bis dato existieren keine standardisierten Parameter für die bioinformatische Auswertung und Berichterstattung der Ergebnisse von NGS-basierter Diagnostik (Petrackova et al., 2019), was die Vergleichbarkeit erhobener Daten erschwert. Durch die Verwendung öffentlich zugänglicher bioinformatischer Pipelines wie in dieser Arbeit, wird eine standardisierte Auswertung verbessert.

Zur Bedeutung des Nachweises von cfDNA bei Follikulären Lymphomen bei Diagnose und im Therapieverlauf als MRD Marker liegen bislang sehr wenig publizierte Daten vor. Lediglich Daten der Arbeit von Sarkozy et al. zeigen, dass die Präsenz oder Absenz von ctDNA im Blut bei FL mit einer Knochenmarkbeteiligung assoziiert ist, jedoch nicht mit dem FLIPI score, der LDH im Serum, einer Anämie und der Präsenz von CTCs.

Daher bedarf es zur Bewertung des Stellenwertes von cfDNA bei Follikulären Lymphomen einer standardisierten Analyse im Rahmen klinischer Studien.

Ein möglicher limitierender Faktor der Verwendung von cfDNA als Untersuchungsmaterial für die MRD Diagnostik stellt die geringe Menge an cfDNA nach einer Therapie dar. Auch bei Verwendung sensitiver Methoden wie IG-NGS bestimmt die Menge an amplifizierbaren Zelläquivalenten die Sensitivität der Untersuchung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Menge an cfDNA unter der Therapie signifikant abnimmt. Der Mittelwert diploider Genome betrug vor der Therapie 41862,6 Kopien/ml Plasma und reduzierte sich unter einer Therapie auf 9735,9 Kopien/ml, entsprechend 4867 Zelläquivalenten pro ml Plasma, dies

entspricht einer möglichen Sensitivität im Plasma von $2,05 \times 10^{-4}$. Die eingesetzte Menge diploider Genome ist hier, mehr als die verwendete Methode, der limitierende Faktor für die Sensitivität der Untersuchung und erfordert ggf. große Mengen Plasmas, wenn eine Sensitivität im Bereich von 10^{-5} oder 10^{-6} angestrebt wird.

Trotz der leichten Zugänglichkeit über eine Blutabnahme kann dies in der Praxis schwierig sein. Hinzu kommt die große Variabilität in der Menge der ctDNA in verschiedenen Patienten. Für eine Anwendbarkeit in der klinischen Routine bedeutet das, dass eine MRD Diagnostik an zellfreier DNA nur erfolgen kann, wenn eine ausreichende, konzentrationsabhängige Sensitivität erreicht werden kann. Dies ist für die Planung in klinischen Studien zu berücksichtigen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der im Rahmen des EuroClonality Netzwerkes entwickelte IG-NGS Assay und PCR basierte Verfahren erfolgreich und sensitiv zur MRD Detektion in cfDNA verwendet werden können. Die Weiterentwicklung des IGHV-FR3 Assays für ultrakurze DNA Fragmente leistet hierzu einen wesentlichen Beitrag. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge kann in der Mehrheit der Patienten mit Follikulären Lymphomen die Identifikation des Indexklons aus diagnostischem peripheren Blut erfolgen. Für nodale Lymphome bleibt eine diagnostische Biopsie notwendig. Aufgrund der guten Übereinstimmung der ddPCR Ergebnisse mit IG-NGS in cfDNA im Therapieverlauf kann davon ausgegangen werden, dass die cfDNA eine zuverlässige alternative Quelle zur MRD-Detektion darstellt. Zur Beurteilung der prognostischen Relevanz sind jedoch weiterführende Untersuchungen im Rahmen klinischer Studien mit standardisierten Methoden notwendig.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Bei Follikulären Lymphomen ist die Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) im Therapieverlauf ein wesentlicher prognostischer Faktor. Allerdings sind der bisher angewandten Standardmethode der RQ-PCR zum Nachweis einer tumorspezifischen Rekombination des Immunglobulinschwerkettengens Limitationen gesetzt. Neben der arbeitsaufwändigen Etablierung patientenspezifischer Assays bleibt die RQ-PCR eine relative Quantifizierungsmethode mit einer begrenzten Sensitivität.

Zellfreie DNA beschreibt kurze DNA Fragmente von 160-180 Basenpaaren, die von gesunden Zellen und von Tumorzellen in den Blutstrom freigesetzt und aus Plasma isoliert werden können. Sie stellt eine potenzielle alternative Quelle für die Bestimmung von molekularen Veränderungen des Tumors und minimaler Resterkrankung dar. Bislang bestehen nur unzureichend definierte Standards für die Präanalytik und optimierte Extraktionsverfahren. Diese sind allerdings für die Qualität der nachfolgenden Untersuchungen von essenzieller Bedeutung.

Aufgrund der geringen Mengen zellfreier DNA im Plasma bedarf es einer hochsensitiven Methode zur MRD-Erfassung. NGS-basierte Verfahren erscheinen hierzu besonders geeignet und können mögliche Einschränkungen PCR-basierter Verfahren überwinden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NGS-basierte Verfahren für die Anwendung zur MRD-Bestimmung im Plasma hervorragend geeignet sind.

Dazu wurde nach Optimierung und Anpassung der im Rahmen des EuroClonality Netzwerks entwickelten immungenbasierten NGS-Verfahren zunächst an Proben 30 gesunder Probanden und 31 Proben von Tumorpatienten methodische Standards entwickelt, die eine möglichst effiziente und qualitativ hochwertige Extraktion und nachfolgende Quantifizierung der gewonnen zellfreien DNA ermöglichen. Die besten Extraktionsergebnisse konnten mit dem QIAamp CNA Kit erzielt werden. Eine zuverlässige Quantifizierung der zellfreien DNA wurde mittels ddPCR durch drei Haushaltsgene etabliert.

Analysiert wurden im Anschluss insgesamt 348 Proben (56 diagnostische Proben aus peripherem Blut, 38 diagnostische Proben aus Plasma, 159 Verlaufsmaterialien aus peripherem Blut und 95 Verlaufsmaterialien aus Plasma) von 58 Patienten (36

Studienpatienten aus der klinischen „Bo29563“-Studie der Firma Hoffman-La Roche und 22 Patienten aus der Medizinischen Klinik II des UKSH).

In allen Patienten mit einer PCR identifizierbaren IGHV-Rekombination (24/58) konnte der Hauptklon mit dem EuroClonality-NGS-FR1 Primer-Set in zellulären Primärmaterialien identifiziert werden. Aufgrund der Generierung kürzerer Fragmente und der damit verbundenen Anwendbarkeit auf zellfreie DNA wurden die zellulären und gepaarten zellfreien DNA Proben außerdem über das EuroClonality-FR3 Primer-Set sequenziert. In 23/24 zellulären, sowie in 15/16 zellfreien DNA Primärmaterialien konnte der Hauptklon mit dem EuroClonality-FR3 Primer-Set erfolgreich wiedergefunden werden. Es konnte im Vergleich mit patientenspezifischen RQ- und ddPCR MRD-Ergebnissen gezeigt werden, dass das EuroClonality IGHV-FR3 Assay eine zuverlässige Detektion krankheitsspezifischer Klonotypen in der zellfreien DNA in Primär- und Verlaufsmaterialien gewährleistet.

Die Amplifikationseffizienz der zellfreien DNA konnte über die Entwicklung eines neuen FR3 Primer-Sets mit Generierung kürzerer Amplikons und dem Einsatz sog. „Wobbles“ erheblich verbessert werden. Eine Validierung erfolgte im Rahmen eines europäischen Ringversuchs mit 5 beteiligten Laboren.

In dieser Arbeit wurden standardisierte Verfahrensweisen zur Handhabung der zellfreien DNA für die MRD Diagnostik etabliert, die als Grundlage für eine prospektive MRD-Bestimmung im Plasma im Rahmen zukünftiger Studien dienen können.

Der hohe Stellenwert einer NGS-basierten MRD-Diagnostik für die Analyse von zellfreier DNA in Follikulären Lymphomen konnte in dieser Arbeit belegt und die Anwendbarkeit durch ein standardisiertes Vorgehen verbessert werden.

Neben der RQ-PCR und der hier als gleichwertig belegten ddPCR kann die zellfreie DNA zuverlässig und hochsensitiv mit NGS-basierten Assays untersucht werden. Dies bietet die Möglichkeit, die MRD Diagnostik im Plasma in zukünftigen Studien auch prospektiv in größeren Patientenkollektiven anzuwenden und darüber neue Erkenntnisse über die Tumorkinetik und mögliche Rezidivdynamik in unterschiedlichen Kompartimenten des lymphatischen Systems zu gewinnen.

6 Literaturverzeichnis

Armitage, JO; Gascoyne, RD; Lunning, MA; Cavalli, F (2017): Non-Hodgkin lymphoma. In: *Lancet* 390 (10091), S. 298-310.

Bahler, DW; Levy, R (1992): Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. In: *PNAS* 89 (15), S. 6770-6774.

Bettegowda, C; Sausen, M; Leary, RJ; Kinde, I; Wang, Y; Agrawal, N et al. (2014): Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* 6 (224), S. 224ra24.

Brueggemann, M; Knecht, H; Kotrova, M; Bartram, J; Bystry, V; Darzentas, N et al. (2017): Multi-center validation of standardized NGS assay for rearranged IG/TR marker detection in acute lymphoblastic leukemia- a report of the EuroClonality-NGS consortium. In: *Haematologica* 102, S. 328-328.

Brüggemann, M; Kotrova, M; Knecht, H; Bartram, J; Boudjogrha, M; Bystry, V et al. (2019): Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study . In: *Leukemia*. 2019 Jun 26 Published online 2019 Jun 26. doi: 10.1038/s41375-019-0496-7.

Brüggemann, M; Droese, J; Bolz, I; Lüth, P; Pott, C; von Neuhoff, N et al. (2000): Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. In: *Leukemia* 14 (8), S. 1419-1425.

Buedts, L; Vandenberghe, P (2016): Circulating cell-free DNA in hematological malignancies. In: *Haematologica* 101, S.997-999.

Bystry, V; Reigl, T; Krejci, A; Demko, M; Hanakova, B; Grioni, A et al. (2016): ARResT/Interrogate: an interactive immunoprofiler for IG/TR NGS data. In: *Bioinformatics* 33 (3), S. 435-7. URL <http://bat.infospire.org/arrest/interrogate/>

Camus, V; Sarafan-Vasseur, N; Bohers, E; Dubois, S; Mareschal, S; Bertrand, P et al. (2016):

Digital PCR for quantification of recurrent and potentially actionable somatic mutations in circulating free DNA from patients with diffuse large B-cell lymphoma. In: *Leuk Lymphoma* 57 (9), S. 2171-9.

Campana, D. (2009): Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. In: *Semin Hematol.* 46(1), S. 100-106.

Casadio, V; Calistri, D; Tebaldi, M; Bravaccini, S; Gunelli, R; Martorana, G et al. (2013): Urine cell-free DNA integrity as a marker for early bladder cancer diagnosis: preliminary data. In: *Urol. Oncol.* 31 (8), S. 1744-50.

Cavalli, M; De Novi, LA; Della Starza, I; Cappelli, LV; Nunes, V; Pulsoni, A et al. (2017): Comparative analysis between RQ-PCR and digital droplet PCR of *BCL2* gene rearrangement in the peripheral blood and bone marrow of early stage follicular lymphoma. In: *Br J Haematol.* 177 (4), S. 588-596.

Chin, RI; Chen, K; Usmani, A; Chua, C; Harris, PK; Binkley, MS et al. (2019): Detection of Solid Tumor Molecular Residual Disease (MRD) Using Circulating Tumor DNA (ctDNA). In: *Mol Diagn Ther.* 23 (3), S. 311-331.

Correia, C; Schneider, PA; Dai, H; Dogan, A; Maurer, MJ; Church, AK et al. (2015): *BCL2* mutations are associated with increased risk of transformation and shortened survival in follicular lymphoma. In: *Blood* 125 (4), S. 658-67.

Dawson, SJ; Tsui, DW; Murtaza, M; Biggs, H; Rueda, OM; Chin, SF et al. (2013): Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. In: *N. Engl. J. Med.* 368 (13), S. 1199-209.

Delfau-Larue, MH; van der Gucht, A; Dupuis, J; Jais, JP; Nel, I; Beldi-Ferchiou, A et al. (2018): Total metabolic tumor volume, circulating tumor cells, cell-free DNA: distinct prognostic value in follicular lymphoma. In: *Blood Adv.* 2 (7), S. 807-816.

Devonshire, AS; Whale, AS; Gutteridge, A; Jones, G; Cowen, S; Foy, CA et al. (2014): Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. In: *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (26), S. 6499-512.

Diaz, LA Jr; Bardelli, A (2014): Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. In: *J. Clin. Oncol.* 32 (6), S. 579-86.

Diehl, F; Schmidt, S; Choti, MA; Romans, K; Goodman, S; Li, M et al. (2008): Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. In: *Nature Med.* 14, S. 985-990.

Dogliotti, I; Drandi, D; Genuardi, E; Ferrero, S (2018): New Molecular Technologies for Minimal Residual Disease Evaluation in B-Cell Lymphoid Malignancies. In: *J. Clin. Med.* 7 (9), S. 288.

Drandi, D; Kubiczkova-Besse, L; Ferrero, S; Dani, N; Passera, R; Mantoan, R et al. (2015): Minimal residual disease detection by droplet digital PCR in multiple

myeloma, mantle cell lymphoma, and follicular lymphoma: a comparison with real-time PCR. In: *J. Mol. Diagn.* 17 (6), S. 652-60.

Drandi, D; Alcantara, M; Benmaad, I; Söhlbrandt, A; Lhermitte, L; Zaccaria, G et al. (2020): Droplet Digital PCR Quantification of Mantle Cell Lymphoma Follow-up Samples From Four Prospective Trials of the European MCL Network. In: *Hemasphere* 4(2).

El Messaoudi, S; Rolet, F; Mouliere, F; Thierry, AR (2013): Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. In: *Clin Chim Acta.* 23 (424), S. 222-30.

Faham, M; Willis, T (2011): Monitoring health and disease status using clonotype profiles. U.S. Patent Application No. 2011/0207134A1.

Faham, M; Zheng, J; Moorhead, M; Carlton, VEH; Stow, P; Coustan-Smith, E et al. (2012): Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. In: *Blood* 120 (26), S. 5173-5180.

Fischer, T; Theobald, M; Heimpel, H; Huber, C (2007): Neoplasien der Hämatopoese. In: Gerok, W; Huber, C; Thomas, M; Zeidler, H (Hrsg.) *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*, Aufl. 11, S. 35-53, Schattauer, Stuttgart

Forshew, T; Murtaza, M; Parkinson, C; Gale, D; Tsui, DW; Kaper, F et al. (2012): Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci. Transl. Med.* 4 (136), S. 136ra68.

Fuchs, R; Staib, P; Brümmendorf, T; Bako, S; Guggenberger, D; zur Hausen, K et al. (2017): Non-Hodkin-Lymphome. In: Fuchs, R; Staib, P; Brümmendorf, T (Hrsg.) *Manual Hämatologie*, Aufl. 27, S. 546-555, Nola-Verlag, Stolberg

Hebeda, KM; Van Altena, MC; Rombout, P; Van Krieken, JHJM; Groenen, PJTA (2009): PCR clonality detection in Hodgkin lymphoma. In: *J Hematopathol* 2, S. 34–41.

Heitzer, E; Auer, M; Hoffmann, EM; Pichler, M; Gasch, C; Ulz, P et al. (2013): Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. In: *Int. J. Cancer* 133 (2), S. 346-56.

Hiorns, LR; Nicholls, J; Sloane, JP; Horwich, A; Ashley, S, Brada, M (1994): Peripheral blood involvement in non-Hodgkin's lymphoma detected by clonal gene rearrangement as a biological prognostic marker. In: *Br. J. Cancer* 69 (2), S. 347-351.

Kabat EA (1988): Antibody complementarity and antibody structure. In: *J. Immunol.* 141 (7), S. 25-36.

Kneba, M; Eick, S; Herbst, H; Willigeroth, S; Pott, C; Bolz, I et al. (1991): Frequency and structure of t(14;18) major breakpoint regions in non-Hodgkin's lymphomas typed according to the Kiel classification: analysis by direct DNA sequencing. In: *Cancer Research* 51, S. 3243-3250.

Knecht, H; Reigl, T; Kotrová, M; Appelt, F; Stewart, P; Bystry, V et al. (2019): Quality control and quantification in IG/TR next-generation sequencing marker identification: protocols and bioinformatic functionalities by EuroClonality-NGS. In: *Leukemia* 33 (9), S. 2254-2265.

Kubiczkova-Besse, L; Drandi, D; Sedlarikova, L; Oliva, S; Gambella, M, Omedè, P et al. (2014): Cell-Free DNA for Minimal Residual Disease Monitoring in Multiple Myeloma Patients. In: *Blood* 124 (21), S. 3423.

Kurtz, DM; Green, MR; Bratman, SV; Scherer, F; Liu, CL; Kunder, CA et al. (2015): Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. In: *Blood* 125 (24), S. 3679-87.

Lefranc, MP; Giudicelli, V; Kaas, Q; Duprat, E; Jabado-Michalout, J; Scaviner, D et al. (2005): IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. In: *Nucleic Acids Res.* 33 (Database issue). URL <http://imgt.cines.fr>

Lo, YM; Chan, KC; Sun, H; Chen, EZ; Jiang, P; Lun, FM et al. (2010): Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. In: *Sci. Transl. Med.* 2 (61), S. 61ra91.

Loeffler, M; Horn, M; Kreuz, M; Siebert, R; Pott, C; Trautmann, H et al. (2017): A single-cell based model explains patterns of clonal evolution in primary and relapsed follicular lymphoma. In: *Hematological Oncology* 35 (S2), S. 103-104.

Logan, AC; Vashi, N; Faham, M; Carlton, V; Kong, K; Buno, I et al. (2014): Immunoglobulin and T-cell receptor gene high-throughput sequencing quantifies minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia and predicts post-transplant relapse and survival. In: *Biol. Blood Marrow Transplant* 20(9), S. 1307-1313.

Martinez-Lopez, J; Lahuerta, JJ; Pepin, F; González, M; Barrio, S; Ayala, R et al. (2014): Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. In: *Blood* 123, S. 3073–3079.

Matsuda, F; Ishii, K; Bourvagnet, P; Kuma, Ki; Hayashida, H; Miyata, T et al. (1998): The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. In: *J. Exp. Med.* 188 (11), S. 2151-62.

Mauger, F; Dulary, C; Daviaud, C; Deleuze, JF; Tost, J (2015): Comprehensive evaluation of methods to isolate, quantify, and characterize circulating cell-free DNA from small volumes of plasma. In: *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (22), S. 6873-8.

Meddeb, R; Pisareva, E; Thierry, AR (2019): Guidelines for the Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. In: *Clin Chem.* 65 (5), S. 623-633.

Medina Diaz, I; Nocon, A; Mehnert, DH; Fredebohm, J; Diehl, F; Holtrup, F (2016): Performance of Streck cfDNA blood collection tubes for liquid biopsy testing. In: *PLoS One* 11 (11), S. e0166354.

National Guideline Alliance (UK) (2016): Non-Hodgkin's lymphoma: diagnosis and management (NICE guideline no. 52). National Institute for Health Care Excellence, London

Newman, AM; Bratman, SV; To, J; Wynne, JF; Eclov, NC; Modlin, LA et al. (2014): An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. In: *Nature Med.* 20, S. 548-554.

Norton, SE; Lechner, JM; Williams, T; Fernando, MR (2013): A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during blood sample storage and shipping as determined by digital PCR. In: *Clin. Biochem.* 46 (15), S. 1561-5.

Pan, W; Gu, W; Nagpal, S; Gephart, MH; Quake, SR (2015): Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid. In: *Clin. Chem.* 61 (3), S. 514-22.

Pasqualucci, L; Khiabani, H; Frangazio, M; Vasishtha, M; Messina, M; Holmes, AB et al. (2014): Genetics of follicular lymphoma transformation. In: *Cell Rep.* 6 (1), S. 130-140.

Petrackova, A; Vasinek, M; Sedlarikova, L; Dyskova, T; Schneiderova, P; Novosad, T et al. (2019): Standardization of Sequencing Coverage Depth in NGS: Recommendation for Detection of Clonal and Subclonal Mutations in Cancer Diagnostics. In: *Frontiers in oncology* 9, S. 851.

Pongers-Willemse, MJ; Verhagen, OJ; Tibbe, GJ; Wijkhuijs, AJ; de Haas, V; Roovers, E et al. (1998): Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. In: *Leukemia* 12 (12), S. 2006-14.

Pott, C; Tiemann, M; Linke, B; Ott, M; von Hofen, M; Bolz, I et al. (1998): Structure of *Bcl-1* and IgH-CDR3 rearrangements as clonal markers in mantle cell lymphomas. In: *Leukemia* 12, S. 1630-1637.

Pott, C; Brüggemann, M; Ritgen, M; van der Velden, VH; van Dongen, JJ; Kneba, M et al. (2013) a: MRD detection in B-cell non-Hodgkin lymphomas using Ig gene rearrangements and chromosomal translocations as targets for real-time quantitative PCR. In: *Methods Mol. Biol.* 971, S. 175-200.

Pott, C; Monitillo, L; Genuardi, E; Mantoan, B; Trautmann, H; Kneba, M et al. (2013) b: A comparative analysis of next-generation sequencing and real-time quantitative PCR For minimal residual disease detection in follicular lymphomas. In: *Blood* 122, S. 4293.

Rawstron, AC; Fazi, C; Agathangelidis, A; Villamor, N; Letestu, R; Nomdedeu, J et al. (2016): A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. In: *Leukemia* 30 (4), S. 929-36.

R Core Team (2013): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

Roschewski, M; Dunleavy, K; Pittaluga, S; Moorhead, M, Pepin, F; Kong, K et al. (2015): Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. In: *Lancet Oncol.* 16 (5), S. 541-549.

Roschewski, M; Staudt, LM; Wilson, WH (2016): Dynamic monitoring of circulating tumor DNA in non-Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 127, S. 3127-3132.

Rossi, D; Diop, F; Spaccarotella, E; Monti, S; Zanni, M; Rasi, S et al. (2017): Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood* 129 (14), S. 1947-1957.

Sanger, F; Nicklen, S; Coulson, AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (12), S. 5463-5467.

Sarkozy, C; Huet, S; Carlton, VE; Fabiani, B, Delmer, A; Jardin, F et al. (2017): The prognostic value of clonal heterogeneity and quantitative assessment of plasma circulating clonal IG-VDJ sequences at diagnosis in patients with follicular lymphoma. In: *Oncotarget* 8 (5), S. 8765-8774.

Scheijen, B; Meijers, RWJ; Rijntjes, J; van der Klift, MY; Möbs, M; Steinhilber, J et al. (2019): Next-generation sequencing of immunoglobulin gene rearrangements for clonality assessment: a technical feasibility study by EuroClonality-NGS. In: *Leukemia*. 2019 Jun 13. doi: 10.1038/s41375-019-0508-7.

Scherer, F; Kurtz, D; Newman, AM; Esfahani, MS; Craig, A; Stehr, H et al. (2016): Development and Validation of Biopsy-Free Genotyping for Molecular Subtyping of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. In: *Blood* 128, S. 1089.

Scherer, F; Kurtz, D; Diehn, M; Alizadeh, AA (2017): High-throughput sequencing for noninvasive disease detection in hematologic malignancies. In: *Blood* 130 (4), S.440-452.

Schwarzenbach, H; Alix-Panabières, C; Müller, I; Letang, N; Vendrell, JP; Rebillard, X et al. (2009): Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. In: *Clin. Cancer Res.* 15 (3), S. 1032-8.

Snyder, MW; Kircher, M; Hill, AJ; Daza, RM; Shendure, J (2016): Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. In: *Cell* 164 (1-2), S. 57-68.

Spina, V; Brusca, A; Cuccaro, A; Martini, M; Di Trani, M; Forestieri, G et al. (2018): Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 131 (22), S. 2413-2425.

Stroun, M; Lyautey, J; Lederrey, C; Olson-Sand, A; Anker, P (2001): About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. In: *Clin. Chim. Acta.* 313 (1-2), S. 139-42.

Swerdlow, H; Campo, E; Pileri, SA; Harris, NL; Stein, H; Siebert, R et al. (2016): The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. In: *Blood* 127, S. 2375-2390.

Takamatsu, H (2017): Comparison of Minimal Residual Disease Detection by Multiparameter Flow Cytometry, ASO-qPCR, Droplet Digital PCR, and Deep Sequencing in Patients with Multiple Myeloma Who Underwent Autologous Stem Cell Transplantation. In: *Journal of clinical medicine* 6(10), S. 91.

Tonegawa, S (1983): Somatic generation of antibody diversity. In: *Nature* 302, S. 575-581.

van der Velden, VHJ; Hochhaus, A; Cazzaniga, G; Szczepanski, T; Gabert, J; van Dongen, JJM (2003): Detection of minimal residual disease in hematologic

malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. In: *Leukemia* 17 (6), S. 1013–1034.

van Dongen, JJM; Langerak, AW; Brüggemann, M; Evans, PA; Hummel, M; Lavender, FL et al. (2003): Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. In: *Leukemia* 17 (12), S. 2257–2317.

Vega, F; Medeiros, LJ (2003): Chromosomal translocations involved in non-Hodgkin lymphomas. In: *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127 (9), S. 1148-60.

Wu, C; de Miranda, NF; Chen, L; Wasik, AM; Mansouri, L; Jurczak, W et al. (2016): Genetic heterogeneity in primary and relapsed mantle cell lymphomas: Impact of recurrent CARD11 mutations. In: *Oncotarget* 7 (25), S. 38180-38190.

Yao, Wan; Mei, C; Nan, X; Hui, L et al. (2016): Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. In: *Gene* 590 (1), S. 142-8.

7 Anhang

Name	Linker + spezifischer Primer
IGH-V-FR1_A_1	GTAAACGACGGCCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG
IGH-V-FR1_B_1	GTAAACGACGGCCAGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAA
IGH-V-FR1_C_1	GTAAACGACGGCCAGTTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCC
IGH-V-FR1_D_1	GTAAACGACGGCCAGTAGGTGCAGCTGGTGGAGTC
IGH-V-FR1_E_1	GTAAACGACGGCCAGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGTC
IGH-V-FR1_F_1	GTAAACGACGGCCAGTCCAGGACTGGTGAAGCCTTC
IGH-V-FR1_G_1	GTAAACGACGGCCAGTCAGTGGGGCGCAGGACTGTT
IGH-V-FR1_H_1	GTAAACGACGGCCAGTCCAGGACTGGTGAAGCCTCC
IGH-V-FR1_I_1	GTAAACGACGGCCAGTGTACAGCTGCAGCAGTCAGG
IGH-V-FR1_J_1	GTAAACGACGGCCAGTGCTGGTGCAATCTGGGTCTG
IGH-V-FR1_K_1	GTAAACGACGGCCAGTCCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGG
IGH-V-FR1_L_1	GTAAACGACGGCCAGTAAACCCACAGAGACCCTCACGCTGAC
IGH-V-FR1_M_1	GTAAACGACGGCCAGTCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
IGH-V-FR1_N_1	GTAAACGACGGCCAGTCTTACAGACCCTGTCCTCACCTG
IGH-V-FR1_O_1	GTAAACGACGGCCAGTTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG
IGH-J—A-1	TAATACGACTCACTATAGGGCTTACCTGAGGAGACGGTGACC
IGH-J—B-1	TAATACGACTCACTATAGGGCTCACCTGAGGAGACAGTGACC

Tabelle 7.1 EuroClonality IGHV-FR1-NGS Primer Sequenzen. Die ersten 15 Sequenzen sind FP, während die letzten beiden Sequenzen RP darstellen. Rot=Universeller Adapter/Linker; Schwarz=Sequenzspezifischer Primer.

Primer-Name	Primersequenz
univ-IGHVFR3_3	GTA AACGACGGCCAGTAAGTTCAGGGCAGAGTCAC
univ-IGHVFR3_4	GTA AACGACGGCCAGTGTCCATCAGCACAGCCTACA
univ-IGHVFR3_5	GTA AACGACGGCCAGTGACATGTCCACAAGCACAGC
univ-IGHVFR3_7	GTA AACGACGGCCAGTTCTCCAAGGACCTCCAAGA
univ-IGHVFR3_8	GTA AACGACGGCCAGTCAGGCTCACCATCTCCAAGG
univ-IGHVFR3_9	GTA AACGACGGCCAGTCCATCTCTGAAGAGCAGGCT
univ-IGHVFR3_11	GTA AACGACGGCCAGTTGAAGGGCCGATTACCATC
univ-IGHVFR3_12	GTA AACGACGGCCAGTAGGCAGATTCACCATCTCAAGA
univ-IGHVFR3_13	GTA AACGACGGCCAGTAGCGCCGATTTCATCATCTCC
univ-IGHVFR3_14	GTA AACGACGGCCAGTCCAAAAGCATCACCTATCTGCA
univ-IGHVFR3_15	GTA AACGACGGCCAGTGAAGGGCCGTTACCATC
univ-IGHVFR3_16	GTA AACGACGGCCAGTACCTCCAGAGATAACGCCAAG
univ-IGHVFR3_20	GTA AACGACGGCCAGTCAGGAAGGGCAGATTCACCA
univ-IGHVFR3_22	GTA AACGACGGCCAGTGAAGGGCCGATTGACCATCTC
univ-IGHVFR3_25	GTA AACGACGGCCAGTCTCCGTGAAGGGCAGATTCA
univ-IGHVFR3_26	GTA AACGACGGCCAGTGATGATTCAAAGAACACGGCGT
univ-IGHVFR3_28	GTA AACGACGGCCAGTCCGTCCCTCAAGAGTCGAGT
univ-IGHVFR3_29	GTA AACGACGGCCAGTCCGTCCCTCAAGAGTCGAAT
univ-IGHVFR3_30	GTA AACGACGGCCAGTGTACCATCTCAGCCGACAA
univ-IGHVFR3_32	GTA AACGACGGCCAGTCAAGTCCATCAGCACTGCCT
univ-IGHVFR3_33	GTA AACGACGGCCAGTCAGTTCTCCCTGCAGCTGAA
univ-IGHVFR3_34	GTA AACGACGGCCAGTGGCTTCACAGGACGGTTTGT
univ-Fah3(134)-IGHV*	GTA AACGACGGCCAGTGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTG
univ-Fah3(97)-IGHV6*	GTA AACGACGGCCAGTCTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCT
univ-Fah3(100)-IGHV1_1*	GTA AACGACGGCCAGTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC
univ-Fah3(102)-IGHV1_3*	GTA AACGACGGCCAGTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATC
univ-Fah3(104)-IGHV4_1*	GTA AACGACGGCCAGTGAGCTCTGTGACCGCCGGGAC
univ-Fah3(120)-IGHV3_6*	GTA AACGACGGCCAGTCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACA
univ-Fah3(121)-IGHV3_7*	GTA AACGACGGCCAGTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA
univ-Fah3(125)-IGHV3_11*	GTA AACGACGGCCAGTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGGGGA
T7-JH consensus	TAATACGACTCACTATAGGGCTTACCTGAGGAGACGGTGACC
T7-IGJH_136(faham)*	TAATACGACTCACTATAGGGCTCACCTGAGGAGACGGTGACC
T7-IGJH_137(faham)*	TAATACGACTCACTATAGGGCTCACCTGAGGAGACAGTGACC
T7-IGJH_138(faham)*	TAATACGACTCACTATAGGGCTTACCTGAAGAGACGGTGACC

*aus dem Patent von Faham (Faham et al., 2011)

Tabelle 7.2 EuroClonality IGHV-FR3-NGS Primersequenzen. FR3=Framework Region 3.

Primername	Sequenz 5' → 3'	Primerlänge
III-D501-F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT TATAGCCT ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgtaaacgacggccagt	87
III-D502-F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT ATAGAGG CACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgtaaacgacggccagt	87
III-D503-F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT CCTATCCT ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgtaaacgacggccagt	87
III-D504-F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT GGCTCTG AACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgtaaacgacggccagt	87
III-D505-F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT AGGCGAAG ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgtaaacgacggccagt	87
III-D506-F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT TAATCTTA ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgtaaacgacggccagt	87
III-D507-F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT CAGGACGT ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgtaaacgacggccagt	87
III-D508-F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT GTACTIONAC ACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgtaaacgacggccagt	87
III-D701-R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGA TCGAGTAAT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtaatacgactcactataggg	86
III-D702-R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGA TTCTCCGGA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtaatacgactcactataggg	86
III-D703-R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGA TAATGAGCG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtaatacgactcactataggg	86
III-D704-R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGA TGGAATCTC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtaatacgactcactataggg	86
III-D705-R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGA TTCTGAAT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtaatacgactcactataggg	86
III-D706-R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGA TACGAATT CGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtaatacgactcactataggg	86
III-D707-R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGA TAGCTTCA GGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtaatacgactcactataggg	86
III-D708-R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGA TGCGCATT AAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtaatacgactcactataggg	86
III-D709-R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGA TCATAGCCG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtaatacgactcactataggg	86
III-D710-R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGA TTTCGCGGA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtaatacgactcactataggg	86
III-D711-R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGA TGCGCGAG AGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtaatacgactcactataggg	86
III-D712-R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGA TCATCGCT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtaatacgactcactataggg	86

Tabelle 7.3 Metabion Primersequenzen. F=Forward primer, R=Reverse primer; Fett Schwarz=Vorwärts- bzw. Rückwärtssequenzieradapter; Rot=Index/Barcode; Schwarz=Universeller Adapter.

Primer-Set	Zelllinie	Klonotyp	NGS Amplikon Sequenz
IGH-VJ-FR1	Mik-ALL	VJ:Vh-(Dh)-Jh V3-72 16/24/ J4 SPCPPRKN#YFDYW	tgcagcctctggattcactctcagtgaccactacatggactgggtccgccaggctccagggaaagggctggagtggttggcctactagaa acaagctaacagttacaccacagaatacggcgtctgtgaaagcagattcaccatctcaagagatgattcaagaactcactgtatctg caaatgaacagcctgaaaaccaggagacacggcgtgtCCCCGTGCCCCCGGAAAGAACTACTTTGACTACTGGgg ccagggaaccct cttctggatacacttactagctatgctatgaattgggtgcgacagccctggacaaggcttgagtgatgggatggatcaacaccaaca ctgggaaccaacgtatgccagggtttcacaggacggttcttctctggacacctctgtcagcagcgatctcagatcagcagcct
IGH-VJ-FR1	Mik-ALL	VJ:Vh-(Dh)-Jh V7-4-1 11/40/27 J4 TPYYDSSGY*VP	aaaggctgaggacactgccgtgtattacACCCCTTATTACTATGATAGTAGTGGTATTAAAGTACCCcct ggtcacctctctcagtaag
IGH-VJ-FR1	Raji	VJ:Vh-(Dh)-Jh V3-11=V3-21=V3-48 2/40/3 J4 CARQRNDFSDNNSYSNFDW	tgaagttctgggttcgactcagttatctattacatgagttgggtccgccaggctccagggaaagggctggagtggttcatatattaaccctc gtggaagtcaatcatatgacgctcagtgacggccgattcaccgtctccagagacaaccaataattcactaatctcaaatgaaca gcctgagagtcaggacacggcgtgtattacTGTGCGAGACAGGGAATGATTCTCTGATAATAATAGTATTACTC TAACCTTGACTTCTGGggccaggagcct
IGH-VJ-FR1	REH	VJ:Vh-(Dh)-Jh V3-15 1/21/5 J6 CTTGMVRGVI#YYYYGMDVW	tgcagcctctggattcactttcagtaacgcctgagtgagctgggtccgccaggctccagggaaagggctggagtggttggcctattaaag caaaactgatggtgggacaacagactactgaccctgaaagcagattcaccatcaagagatgattcaaaaacacgctgtatctc aaatgaacagcctgaaaaccaggacacagcgtgtattacGTACCACAGGGATGTTTCGGGGGATTATTACTACTA CTACGGTATGGACGTCTGGggccaaggaccac
IGH-VJ-FR1	TMM	VJ:Vh-(Dh)-Jh V1-24 /28/8 J5 CATDQAISGVVKSFDW	tttccgatacagcctcactgaaatccatctactgctgcgacagctcctggaaaagggcttgagtgatggagattttgatcctgaga atggtgaaacactctacgcacagaattccagggcagactcaacatgaccgggacacacacagacactgtctacatggagctgagcag cctgaggctgacgactcggcgtgtattacTGTGCAACGGATCAGGCGATTCTGGAGTGGTAAAATCATTGACCCC TGGggccagggaaccct
IGH-VJ-FR1	TOM-1	VJ:Vh-(Dh)-Jh V4-55 1/17/10 J6 CARWAGTTG#YYGMDVW	ggagaccctgtccctcatctcgtctctgactccatcagcagtggttaactggtaactgggtccgccagccccagggaagggct ggagtgattgggaaatccatcatagtgaggacactactacaaccgtccctcaagagtcgaatcaccatgcttagacacgtccaaga accagttactgaagctgagctctgtgaccgccggacacggcgtgtattacTGTGCGAGATGGGTGGAACAACCGGTC TACTACGGTATGGACGTCTGGggccaaggaccac
IGH-VJ-FR1	WSU-NHL	VJ:Vh-(Dh)-Jh V6-1 1/22/19 J6 CARGTYAAKASMDVW pro	ccatctccgggacagtgctctagcaacagtgctcttggaaactggatcagcagtcctccatcgagagccttgagtgctgggaaggaca tactacaggtccaagtgtataatgattatgcatgctgtgaaaagtcgaataacatcaaccagacacatccaagaaccagttctcctg cagctgaactctgactcccaggacacggcgtgtattacTGTGCAAGAGGTACGTATGCAGTAAGGCTTCCATGGAC GTCTGGggcaaggaccac

Tabelle 7.4 Sequenzen der Spike-In Kontrollen Mik-ALL, Mik-ALL, Raji, REH, TMM, TOM-1 und WSU-NHL.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Christiane Pott für die freundliche Aufnahme im Labor, die mir gewährte Unterstützung und die Betreuung meiner Doktorarbeit. Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Michaela Kotrova und Anne-Wiebke Kruse für die fortwährenden Hilfestellungen und die geduldige Beantwortung zahlreicher Fragen. Auch dem Team des Hämatologie Labors der Klinik für Innere Medizin II des UKSH unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Kneba und Prof. Dr. Claudia Baldus möchte ich für die tolle Zusammenarbeit und die schöne Zeit im Labor danken.

Publikationen

Article, Hypertens Pregnancy 36(1): 16-20, 2017

„Expression of EGF, EGFR, and proliferation in placentas from pregnancies complicated with preeclampsia”

Autoren: Kosovic, I; Prusac, IK; Berkovic, A; Marusic, J; Mimica, M; Tomas, SZ

Abstract und Poster auf der Jahrestagung der European Scientific foundation for Laboratory Hemato Oncology (ESLHO), Kiel, November 2018

„MRD assessment in cell-free DNA of mature B-cell lymphoma employing the EuroClonality-NGS assays”

Autoren: Berkovic, A; Kotrova, M; Darzentas, N; Brüggemann, M; Kruse, A; Pott, C

Article, Pregnancy Hypertens 21: 176-178, 2020

„HIF-1 α immunohistochemical expression in decidual cells, villous and extravillous trophoblast in placentas from pregnancies complicated with preeclampsia”

Autoren: Kosovic, I; Prusac, IK; Mestrovic, Z; Berkovic, A; Marusic, J; Tomas, SZ