

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Klinik für Stammzelltransplantation

Professor Dr. Nicolaus Kröger

Next Generation Sequencing zur Detektion der Minimal Residual Disease beim Multiplem Myelom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Joshua Alexander Steffani

aus Hamburg

Hamburg 2022

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.06.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Stefan Kindler

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Nicolaus Kröger

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Abkürzungsverzeichnis..... | 6 |
| 2. Arbeitshypothese und Fragestellungen..... | 8 |
| 3. Einleitung..... | 8 |
| 4. Multiples Myelom | 9 |
| 4.1 Definition | 9 |
| 4.2 Epidemiologie..... | 9 |
| 4.3 Pathogenese | 9 |
| 4.4 Symptomatik/Klinik | 10 |
| 4.5 Diagnostik | 11 |
| 4.6 Diagnostische Klassifikation und Stadien | 14 |
| 4.7 Therapie | 16 |
| 4.8 Remissionskriterien | 19 |
| 5. Minimal Residual Disease und dessen Detektion..... | 20 |
| 5.1 Definition | 20 |
| 5.2 Oberflächenmarker..... | 20 |
| 5.3 Multiparameter Flow Cytometry | 21 |
| 5.4 Molekulare Marker..... | 22 |
| 5.5 Allel-spezifische-Oligonukleotid-Primer | 22 |
| 5.6 Next Generation Sequencing..... | 22 |
| 6. Material und Methoden..... | 23 |
| 6.1 Versuchsablauf | 23 |
| 6.2 Patientenkollektiv..... | 23 |
| 6.3 Entnahmezzeitpunkte der Ausgangs- und Verlaufsproben der Patienten | 26 |
| 6.4 Material und Equipment..... | 28 |
| 6.5 Proben | 29 |
| 6.6 Aufbereitung | 29 |
| 6.7 DNA-Isolierung..... | 29 |
| 6.8 DNA-Aufkonzentrierung..... | 30 |
| 6.9 RNA-Isolierung..... | 30 |
| 6.10 cDNA | 30 |
| 6.11 Library Präparation und NGS | 30 |
| 6.12 Daten-Visualisierung und -Analyse | 34 |
| 6.13 Datenanalyse MRD | 37 |
| 6.14 Zelllinie für die NGS-Diagnostik | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 6.15 Daten der MFC-Diagnostik | 40 |
| 6.16 Statistische Auswertung | 42 |
| 7. Ergebnisse | 42 |
| 7.1 Ergebnisse der NGS-Diagnostik für die Ausgangsproben der Patienten | 42 |
| 7.2 MRD-Diagnostik der Verlaufspuben..... | 43 |
| 7.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse für die 22 Patienten mit monoklonaler Ausgangspube bezüglich des Outcomes | 45 |
| 7.4 Statistische Gegenüberstellung der NGS- und MFC-Ergebnisse..... | 49 |
| 7.5 Vergleich der NGS-MRD-Diagnostik für gesamtes KM und CD138-positiv selektierte Probenform | 49 |
| 7.6 Patienten mit polyklonalen Sequenzen in der Ausgangspube..... | 50 |
| 7.7 Ergebnis der NGS-Diagnostik für die Ausgangspube der Zelllinie | 50 |
| 7.8 MRD-Testung der U266-DNA und cDNA-Verdünnungsreihe | 52 |
| 8. Diskussion | 53 |
| 8.1 Bedeutung der MRD für die Prognose beim MM | 53 |
| 8.2 MRD als neues Remissionskriterium | 54 |
| 8.3 Vergleich NGS- und MFC-MRD Ergebnisse | 54 |
| 8.4 Voraussetzungen für die MRD-Diagnostik mittels NGS..... | 56 |
| 8.5 Vergleich gesamtes KM oder CD138-positiv selektierte Probe | 57 |
| 8.6 Sensitivität der NGS-MRD-Messung..... | 58 |
| 8.7 Vergleich von Kosten-, Zeit-, Material- und Arbeits-Aufwand für das NGS- und das MFC- Verfahren..... | 59 |
| 8.8 Limitation..... | 60 |
| 8.9 Ausblick | 60 |
| 10. Schlussfolgerung..... | 61 |
| 11. Zusammenfassung | 62 |
| 10.1 Abstract..... | 63 |
| 12. Literaturverzeichnis | 64 |
| 13. Tabellenverzeichnis..... | 75 |
| 14. Abbildungsverzeichnis..... | 75 |
| 15. Danksagung..... | 77 |
| 16. Lebenslauf..... | 78 |

17. Eidesstattliche Versicherung.....80

1. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| ALL | Akute Lymphatische Leukämie |
| ASO-Primer | Allel-spezifische-Oligonukleotid-Primer |
| BCMA | B-Cell-Maturation-Antigen |
| BSG | Blutsenkungsgeschwindigkeit |
| CA | Kalzium |
| CAR | Chimeric-Antigen-Receptor |
| CD | Cluster of Differentiation |
| cDNA | complementary DNA |
| CDR | Complementary Determining Region |
| cfDNA | cell free DNA |
| CR | Complete Response |
| CT | Computertomographie |
| ctDNA | circulating tumor DNA |
| D | Diversity |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| DLCO | Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität |
| dNTPs | Desoxyribonukleintriphosphate |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| ES | Enrichment System |
| FDG-PET | Fluor-desoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie |
| FR | Framework |
| gDNA | genomische DNA |
| GOT | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase |
| GPT | Gluamat-Pyruvat-Transaminase |
| GvHD | Graft-versus-Host-Disease |
| HB | Hämoglobin |
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| IFE | Immunfixations-Elektrophorese |
| Ig | Immunglobulin |
| IgH | Immunglobulin Heavy Chain |
| IMWG | International Myeloma Working Group |
| ISS | International Staging System |
| J | Joining |
| KM | Knochenmark |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| MACS | Magnetic Activated Cell Sorting |
| MALDI-TOF | Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight |
| MFC | Multiparameter Flow Cytometry |
| MGUS | Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz |
| MM | Multiple Myelom |
| MRD | Minimal Residual Disease |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| NGF | Next Generation Flow Cytometry |
| NGS | Next Generation Sequencing |
| OS | Overall Survival |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PD | Progressive Disease |

| | |
|------------|---|
| PFS | <i>Progression-Free Survival</i> |
| PGM | <i>Personal Genome Machine</i> |
| PR | <i>Partial Response</i> |
| RNA | <i>Ribonukleinsäure</i> |
| RQ | <i>Real Time Quantification</i> |
| SBS | <i>Sequencing by Synthesis</i> |
| sCR | <i>stringent Complete Response</i> |
| SD | <i>Stable Disease</i> |
| SPE | <i>Serumprotein-Elektrophorese</i> |
| SZT | <i>Stammzelltransplantation</i> |
| UKE | <i>Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf</i> |
| V | <i>Variable</i> |
| VGPR | <i>Very Good Partial Response</i> |

2. Arbeitshypothese und Fragestellungen

Für die Remissionsbeurteilung nach Stammzelltransplantation beim Multiplem Myelom gewinnt die Bestimmung der Minimal Residual Disease immer stärker an Bedeutung. Die beiden wichtigsten Verfahren hierfür sind die Multiparameter Flow Cytometry (MFC) und das neue Verfahren der NGS-Diagnostik. In unserer Untersuchung wollen wir die Minimal Residual Disease (MRD) mittels Next Generation Sequencing (NGS) bei Patienten, die im Vorfeld eine Tandem Transplantation erhielten, bestimmen. Besonderes Augenmerk lag bei unserer Fragestellung darauf, inwieweit sich das LymphoTrack Dx IGH (FR1/FR2/FR3) Assay – S5/PGM von Invivoscribe Technologies (Technologies, 2018) und das Ion Torrent System von Thermo Fisher Scientific (ThermoFisher, 2021b) für diese Diagnostik eignen. In diesem Zusammenhang wollen wir auch die Unterschiede bei Verwendung von gesamter Knochenmark (KM) Probe, CD138-positiv selektierter Probe und die Umschreibung von Ribonukleinsäure (RNA) in complementary DNA (cDNA) als Untersuchungsmaterial für die NGS-MRD-Methodik untersuchen und bewerten. Die so über das NGS-Verfahren gewonnenen MRD-Ergebnisse sollen anschließend mit denen, die über das MFC-Verfahren (Four-Colour-Flow) gewonnen wurden, verglichen und beide Verfahren im Hinblick auf Stärken und Schwächen analysiert werden. Ebenso wollen wir der Frage nachgehen, welche Bedeutung die MRD-Detektion für die Prognose des Patienten im Rahmen seiner Multiplem Myelom (MM) Erkrankung hat. Die für die NGS-Methodik angegebene hohe Sensitivität der MRD-Detektion soll anschließend anhand einer Myelom-Zelllinie in einer Verdünnungsreihe überprüft werden.

3. Einleitung

Das MM gehört zu den häufigsten malignen hämatologischen Neoplasien. Noch bis vor 20/30 Jahren überlebten Betroffene nur wenige Monate bis Jahre. Durch den medizinischen Fortschritt und die intensive Forschung im Hinblick auf das MM konnten vielversprechende Behandlungsstrategien entwickelt werden, mit einer dadurch deutlich verbesserten Prognose. Eine der wichtigsten Säulen in der Behandlung dieser Neoplasie ist die überwiegend autologe und die in selteneren Fällen zum Einsatz kommende allogene Stammzelltransplantation (SZT). Für eine möglichst lange Überlebenszeit ist es wichtig, eine besonders tiefe Remission zu erreichen. Neben den etablierten Response-Kriterien der International Myeloma Working Group (IMWG), die

das Ansprechen einer Therapie bewerten, spielt in den letzten Jahren immer mehr die Detektion der MRD eine entscheidende Rolle. In dieser Dissertation wird die MRD in ihren Einzelheiten dargestellt, ihre Bedeutung für das Myelom bewertet und vor allem die Rolle der verschiedenen Messmethoden mit Fokus auf die NGS und deren Anwendung analysiert.

4. Multiples Myelom

4.1 Definition

Das MM ist die maligne hämatologische Neoplasie der Plasmazellen. Ausgangspunkt der Erkrankung ist die monoklonale Proliferation einer malignen Plasmazelle, die in der Lage sein kann, monoklonale Antikörper oder auch nur Bruchstücke dieser zu sezernieren (Albagoush and Azevedo, 2020).

4.2 Epidemiologie

Weltweit gehört das MM zu den häufigsten hämatologischen Neoplasien. In den USA ist das MM die dritthäufigste maligne hämatopoetische Neoplasie. So gab es im Jahr 2016 in den USA 30.000 Neuerkrankungen und 12.650 durch das MM verstorbene Patienten (Bashir and Qazilbash, 2017). In Deutschland wurden im Jahr 2016 insgesamt 6910 Neuerkrankungen diagnostiziert. Diese verteilten sich mit 3000 Fällen auf Frauen und mit 3910 Fällen auf Männer. Das MM gehört zu den Neoplasien des höheren Alters. So liegt in Deutschland das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Diagnose bei über 70 Jahren. Nur ca. 2 % der Erkrankungen treten vor dem 45. Lebensjahr auf. Die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate wird mit ungefähr 50 % angegeben und die Zehn-Jahres-Überlebensrate mit ca. 30 % für beide Geschlechter (Krebsregisterdaten, 2016).

4.3 Pathogenese

Die genaue Pathogenese von der Plasmazelle zum MM ist bisher wissenschaftlich noch nicht vollständig verstanden. Ein Ansatz zur Erklärung ist unter anderem die Theorie, dass aktivierende Signale in der NF- κ B-Kaskade hoch- sowie hemmende Signale herunterreguliert werden. Ursache für diesen Kontrollverlust in der Zelle können unter anderem genetische Aberrationen sein. Resultate der überaktiven Signalkaskade sind unter anderem verstärkte Proliferation, Widerstandsfähigkeit und

Medikamentenresistenz der Myelomzellen. Darüber hinaus übt auch das Mikromilieu der Myelomzellen einen stimulierenden Einfluss auf die Signalkaskade aus (Roy et al., 2018). Aufgrund des starken Einflusses verschiedener genetischer Aberrationen kommen zytogenetischen Untersuchungen ein hoher Stellenwert in der Diagnostik zur Pathogenese des Myeloms zu. So werden unter anderem bei ca. 40 % der Myelom-Patienten Trisomien nachgewiesen, bei denen insbesondere die Chromosomen 3,7,9,11,15 oder 17 betroffen sind. Ebenfalls pathogenetisch relevant sind die sogenannten Immunglobulin-Heavy-Chain (IgH)- Translokationen. Diese IgH-Translokationen sowie die Trisomien stellen die primären genetischen Aberrationen dar. Diesen gegenüber stehen die sekundären genetischen Aberrationen, von denen Deletionen del(1p), del(13p), del(17p), RAS Mutationen oder auch Translokationen mit MYC-Beteiligung Einfluss auf das Myelom haben. Neben der pathogenetischen Relevanz haben die genetischen Aberrationen auch einen entscheidenden Einfluss auf die Symptomatik, den Therapieverlauf, das Therapieansprechen und insbesondere auf die Prognose des Patienten, was den hohen Stellenwert ihrer Untersuchung begründet (Mikulasova et al., 2017).

4.4 Symptomatik/Klinik

Die Symptomatik bzw. Klinik des Myeloms ist vielgestaltig und teilweise unspezifisch, was eine frühzeitige Diagnostik häufig erschwert (Rajkumar et al., 2014). Zu den Leitsymptomen des MM gehören Knochenschmerzen, Leistungsminderung, Gewichtsverlust, Infektionen und Symptome, die durch eine Hyperkalzämie bedingt sind. Mögliche Symptome bzw. klinische Zeichen aufgelistet nach ihrer Häufigkeit sind in Tabelle 1 wiedergegeben (Peest and Goldschmidt, 2012).

Tabelle 1 Häufige Symptome/Klinik des Multiplen Myeloms

| Symptome/Klinik | Häufigkeit (in %) |
|--------------------|-------------------|
| Knochenschmerzen | 40-70 |
| Leistungsminderung | 20-60 |
| Infektionen | 10-20 |

| | |
|--|-------|
| Hyperkalzämie | 10-20 |
| Gewichtsverlust | 10-15 |
| Tumorformation | 6 |
| Klinische Zeichen der Niereninsuffizienz | 3 |
| Blutungen | 2 |
| Hepatosplenomegalie | 2-4 |
| Lymphadenopathie | 1-4 |
| Symptomlos | 10-40 |

Wie der Tabelle zu entnehmen, nimmt die Knochenbeteiligung eine herausragende Stellung in der Symptomatik bzw. Klinik ein. Grund für die häufige Osteopathie ist eine unverhältnismäßige hohe Osteoklasten-Aktivität, die durch die pathologische Überstimulation durch die malignen Plasmazellen bedingt ist (Peest and Goldschmidt, 2012, (Giuliani et al., 2006)). Daraus folgend sind die häufigsten Formen der Osteopathie Osteolysen (66 %) und pathologische Frakturen (26 %) (Kyle et al., 2003) mit den resultierenden Knochenschmerzen. Eine weitere häufige und prognosebestimmende Komplikation ist die Schädigung der Niere mit Zeichen der Niereninsuffizienz. Dies zeigt sich darin, dass schon ca. ein Drittel der Patienten zum Diagnosezeitpunkt einen erhöhten Serumkreatininwert hat (Peest et al., 1993). Der Anteil an Patienten mit Nierenschädigung, die sich in unterschiedlichen Formen präsentiert, steigt im Verlauf des Krankheitsprozesses auf mehr als 50 % an (Haubitz and Peest, 2006). Die Cast-Nephropathie ist die dabei am häufigsten vorkommende Form. Ursächlich sind hier die monoklonalen Immunglobulin-Leichtketten, die unter anderem in Kombination mit dem Tamm-Horsfall-Protein zu einer Funktionsstörung und Schäden in der Niere führen (Peest and Goldschmidt, 2012, (Solomon et al., 1991)).

4.5 Diagnostik

Die spezifische Diagnostik des MM basiert insbesondere auf der Detektion der monoklonalen Immunglobuline oder ihrer Bestandteile. Die monoklonalen Immunglobuline sind, wie der Name schon suggeriert, strukturell einheitliche Immunglobuline und entstammen einer der fünf Immunglobulin-Klassen (IgA, IgE, IgD, IgG und IgM). Sie werden auch unter der Bezeichnung Paraproteine geführt. Weiterhin können zusätzlich oder auch ausschließlich die monoklonalen freien leichte-Ketten Kappa und Lambda vorliegen. Zu den wichtigsten diagnostischen Methoden für die Detektion bzw. das Screening nach monoklonalen Immunglobulinen gehört die

Serumprotein-Elektrophorese (SPE). Das Prinzip dieser Methodik basiert auf einer elektrophoretischen Auftrennung der Serumproteine über deren Ladung und Größe. Hierbei zeigt sich im Falle eines MM ein schmaler Peak in der Gamma-Fraktion, weshalb diese Konfiguration als monoklonale Gammopathie bezeichnet wird. In Zusammenschau mit dem kleineren Peak der Albumin-Fraktion erhält das Bild der Elektrophorese die Form des Buchstabens M, weshalb die monoklonalen Proteine auch als M-Proteine bezeichnet werden (Peest and Goldschmidt, 2012).

Eine etwa zehnfach sensitivere Methode als die SPE ist die Immunfixations-Elektrophorese (IFE). Das monoklonale Protein kann hier ab einer Menge von ca. 0,2 g/l im Serum und ab einer Menge von 0,04 g/l im Urin nachgewiesen werden (International Myeloma Working, 2003). Die IFE funktioniert, indem die Proteine im Serum und/oder im Urin ihrer Ladung nach zunächst isoelektrisch aufgetrennt und über die Zuführung von monovalenten Antiseren und deren Bindung an die konstanten Regionen der schwere und leichte Ketten identifiziert werden. Neben der höheren Sensitivität der IFE ist es mit dieser aufgrund der spezifischen Detektion möglich, das monoklonale Protein zu klassifizieren bzw. zu typisieren. Die IFE ist wegen ihrer hohen Sensitivität zur Bestätigung nach SPE wie auch zur Verlaufsuntersuchung beim MM geeignet und wird somit als Goldstandard angesehen (Peest and Goldschmidt, 2012). Neben den kompletten intakten Immunglobulinen im Serum können die monoklonalen Plasmazellen, die schon erwähnten freien leichte Ketten Kappa und Lambda produzieren. Diese freien leichte Ketten haben keine Kopplung oder Verbindung zu einer schwere Kette. Die freien leichte Ketten können aufgrund ihrer geringen Größe im Urin ausgeschieden werden, was als Bence-Jones-Proteinurie bezeichnet wird. Auch im Urin können diese Proteine sowohl mittels Protein-Elektrophorese, als auch durch Immunfixation detektiert werden (Peest and Goldschmidt, 2012). Als neueste Methodik und Alternative zur IFE steht seit neuestem auch die Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie zur Verfügung (Murray et al., 2021).

Robert A. Kyle. et. al. haben zwischen 1985 und 1998 an der Mayo Klinik in Rochester 1027 Myelom-Patienten untersucht und so eine ungefähre Verteilung der einzelnen Immunglobulin-Klassen und leichte Ketten für das MM aufgestellt:

34 % hatten ein IgG Kappa, 18 % IgG Lambda, 13 % IgA Kappa, 8 % IgA Lambda, 0,3 % IgM Kappa, 0,2 IgM Lambda, 1 % IgD Kappa, 1 % IgD Lambda, 9 % nur freie Kappa-

leichte Ketten, 7 % nur freie Lambda-leichte Ketten, 2 % biklonal und 7 % einen negativen Isotyp (Kyle et al., 2003).

Neben der spezifischen Diagnostik spielt auch die allgemeine Blutuntersuchung mit charakteristischer Laborkonstellation eine entscheidende Rolle, wobei neben allgemeinen hämatologischen Parametern das C-reaktive Protein und vor allem der Anstieg des β_2 -Mikroglobulins (kleinere lösliche Untereinheit des Haupthistokompatibilitätskomplexes) untersucht werden. Auch eine extrem hohe Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), auch als Sturzsenkung bezeichnet, ist charakteristisch für das Myelom (Peest and Goldschmidt, 2012).

Als weiterführende Diagnostik insbesondere bei bestehender klinischer Symptomatik dient die KM-Untersuchung. Hierbei werden die Proben als Aspiration und/oder Stanzbiopsie aus dem Beckenkamm entnommen, aufbereitet und anschließend zytologisch und histologisch untersucht. Je nach Material und Aufbereitung können Aussagen unter anderem über die Beschaffenheit der Plasmazellen, z.B. über deren Reifegrad, getroffen werden. Auch über die Anzahl oder das Plasmazell-Verteilungsmuster gibt die Untersuchung Auskunft. So enthält das KM beim Myelom > 10 % klonale Plasmazellen (Peest and Goldschmidt, 2012).

Für das Myelom gibt es drei Befalls-Muster von Knochen und KM: diffus, fokal und den Weichteilbefall. Der Weichteilbefall, bedingt durch Aussaat maligner Zellen, kann hierbei mit Kontakt zum Knochen oder rein extramedullär vorliegen und ist mit einer ungünstigen Prognose verbunden (Peest and Goldschmidt, 2012). Die verschiedenen Befalls-Muster lassen sich durch konventionelles Röntgen oder schon in früheren Stadien durch die Magnetresonanztomographie (MRT) detektieren. Die konventionelle Röntgen-Diagnostik, nach dem Pariser Schema, wurde abgelöst durch eine Low-Dose-Ganzkörper-Computertomographie (CT)-Diagnostik, wegen deren höherer Sensitivität und der Möglichkeit der Detektion von extraossären Manifestationen. Die sensitivsten Diagnostik-Verfahren in der Bildgebung für einen KM Befall und extraossäre Manifestationen sind aber die Ganzkörper-MRT-Aufnahme und die ^{18}F -Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) /CT-Diagnostik. Die Ergebnisse der Bildgebung dienen unter anderem zur Detektion bzw. zur Vorbeugung von Frakturen sowie zur Stadieneinteilung. Somit nimmt die Bildgebung einen hohen Stellenwert in der Diagnostik sowie in der Folge bei der Entscheidung für

das durchzuführende Therapieschema beim MM ein (Peest and Goldschmidt, 2012, Bannas et al., 2013, Regelink et al., 2016).

4.6 Diagnostische Klassifikation und Stadien

In den vergangenen Jahrzehnten wurde das MM diagnostisch vorwiegend nach der Klassifikation von Durie und Salmon in drei Stadien eingeteilt (Tab.2) (Durie and Salmon, 1975). Kriterien für die Klassifikation sind dabei die Hämoglobin (Hb)- und Kalzium (Ca)-Konzentrationen, die Konzentration der monoklonalen Antikörper im Serum, die Konzentration der ausgeschiedenen freien leichte Ketten im 24h-Urin und die Anzahl der Osteolysen. Therapieindikation bestand ab Stadium II und III (Peest and Goldschmidt, 2012). Seit 2003 wird nun aber vorwiegend die Klassifikation der IMWG verwendet (International Myeloma Working, 2003). Unterschieden werden in dieser Einteilung die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), das „Smoldering“ MM, das symptomatische MM, das solitäre Plasmozytom und die Plasmazell-Leukämie. Diese Erkrankungsstufen werden unterschieden nach der Menge des monoklonalen Proteins in Serum und Urin, der prozentualen Verteilung der monoklonalen Plasmazellen im KM sowie den Endorganschäden, die mit den sogenannten CRAB-Kriterien (Tab.3) bestimmt werden.

Therapieindikation besteht bei dieser Einteilung vor allem beim Erfüllen eines oder mehrerer CRAB-Kriterien, da diese eine besonders starke Korrelation mit dem Schweregrad und dem Progressionsrisiko des MM haben (Peest and Goldschmidt, 2012, International Myeloma Working, 2003). 2014 erweiterte die IMWG die CRAB-Kriterien um drei zusätzliche Marker: Anteil der monoklonalen Plasmazellen im KM bei 60 %, eine Ratio der involvierten freien leichte Ketten zu den nicht involvierten freien leichte Ketten größer oder gleich 100 sowie das Vorhandensein von einer mehr als 5 mm großen fokalen Läsion in Abwesenheit einer Osteolyse in der Ganzkörper-MRT Untersuchung. Abgekürzt werden diese zusätzlichen Marker als Slim-Kriterien, die die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Symptomen durch Organschäden prognostizieren (Rajkumar et al., 2014, Wennmann et al., 2020). Für eine Aussage zur Prognose des Patienten wird vor allem die Einteilung des International Staging Systems (ISS) genutzt (Tab.4). Zur Klassifikation dienen dabei die Werte bzw. die Kombination der Parameter β_2 -Mikroglobulin und Albumin (Greipp et al., 2005). Diese Klassifikation wurde 2016 von der IMWG überarbeitet und um den

Lactatdehydrogenase (LDH)-Wert sowie das zytogenetische Risikoprofil ergänzt. Sie werden als ISS-Revised Kriterien bezeichnet (Tab.5) (Palumbo et al., 2015).

Tabelle 2 Stadien nach Salmon und Durie

| Parameter | Stadium I (alle Kriterien erfüllt) | Stadium III (mindestens ein Kriterium erfüllt) |
|---|---------------------------------------|---|
| Hämoglobin | > 10g /dl | < 8.5 g/dl |
| Serum-Ca | normal | > 3 mg/dl |
| Osteolysen | maximal eine | fortgeschritten |
| IgG | < 50 g/l | > 70 g/l |
| IgA | < 30 g/l | > 50 g/l |
| Leichtketten | < 4 g/24h | > 12 g/24h |
| Stadium II weder Stadium I, noch Stadium III A= normale Nierenfunktion (Kreatinin < 2.0 mg/dl) B= Nierenfunktionsstörung (Kreatinin > 2.0 mg/dl) | | |

Tabelle 3 CRAB-Kriterien

| | |
|----------|--|
| C | Kalziumkonzentration im Serum > 10,5 mg/dl |
| R | Niereninsuffizienz (Kreatinin > 2 mg/dl) |
| A | Anämie |
| B | Osteopathie |

Tabelle 4 Stadieneinteilung nach ISS

| Stadium | Kriterien | Medianes Überleben |
|------------|--|--------------------|
| I | β_2 -Mikroglobulin \leq 3,5 mg/l und Albumin \geq 3,5 g/dl | 62 Monate |
| II | Weder Stadium I noch III | 44 Monate |
| III | β_2 -Mikroglobulin \geq 5,5 mg/l | 29 Monate |

Tabelle 5 Stadieneinteilung nach ISS-Revised

| Stadium | Kriterien | 5-Jahres-Überlebensrate in % |
|--------------------|--|------------------------------|
| Stadium I | β_2 -Mikroglobulin \leq 3,5 mg/l und Albumin \geq 3,5 g/dl und Zytogenetik Standardrisiko und LDH \leq oberer Normwert | 82 |
| Stadium II | weder Stadium I noch Stadium III | 62 |
| Stadium III | β_2 -Mikroglobulin \geq 5,5 mg/l und Zytogenetik Hochrisiko oder LDH > oberer Normwert | 40 |

4.7 Therapie

In den Frühstadien des MM steht die Beobachtung und Kontrolle im Vordergrund. Mit Beginn von Symptomen wie z.B. einer zunehmenden Leistungsminderung oder dem Zutreffen der Slim-CRAB-Kriterien ist die Indikation für den Beginn einer Therapie gegeben. In erster Linie wird mit einer Chemotherapie begonnen. Mitte des 20ten Jahrhunderts wurden hierfür erste Therapieregime mit Alkylanzien, vorwiegend Melphalan und Kortison-Präparaten, entwickelt (Alexanian et al., 1969). Ziel dieser Chemotherapie ist die Verringerung der Symptomlast sowie die Senkung des monoklonalen Proteins bzw. der klonalen Plasmazellen im KM. Problematik an der Therapie ist, dass nur ca. 30 % eine CR erreichen und ein Großteil dieser Patienten im Verlauf ein Rezidiv erleidet (Peest and Goldschmidt, 2012). Ein weiteres schwerwiegendes Problem dieser Form der Chemotherapie sind die starken Nebenwirkungen, insbesondere die Agranulozytose mit den Folgen einer schweren Infektion. Um dem entgegenzuwirken, wurde das Verfahren der autologen Stammzelltransplantation (SZT) nach Hochdosistherapie beim MM entwickelt (Attal et al., 1996, Child et al., 2003, Moreau et al., 2011, Moreau and Touzeau, 2013), welche auch heute noch als einer der Standardtherapien bei fortgeschrittenem Myelom und transplantationsfähigem Zustand des Patienten zählt (Attal et al., 2017). Die Hochdosistherapie gliedert sich dabei in Induktion, Konditionierung mit folgender autologer SZT, Konsolidierung und gegebenenfalls Erhaltungstherapie. Aufgrund der stark hämatotoxischen Eigenschaft des Melphalans wurden andere Substanzklassen für die Verwendung im Rahmen des Induktionsregimes erprobt und eingesetzt, unter anderem Vincristin, Doxorubicin und das Kortikosteroid Dexamethason (Harousseau and Moreau, 2009). Im Laufe der Zeit wurden auch neue Substanzen für die Therapie des MM, wie das Thalidomid, entwickelt. Thalidomid hat eine antiangiogenetische Wirkung und ist somit potenziell wirksam gegen Tumore (D'Amato et al., 1994). Weitere neu entwickelte Substanzen für die Behandlung des MM sind Lenalidomid (Rajkumar et al., 2005), ein Thalidomid-Analogen mit immunmodulatorischen Eigenschaften, und Bortezomib (Richardson et al., 2003), ein Proteasom-Inhibitor. Diese neuen Substanzen zeigten eine deutliche Steigerung der Effektivität in der Therapie des MM (Kastritis et al., 2009). Folgend wurden Studien durchgeführt, die diese neuen Substanzen in der Induktionstherapie untersucht haben (Sonneveld et al., 2012), mit der Konsequenz, dass sich diese Substanzen in der Induktionstherapie etablierten. Die Kombinationen von Bortezomib, Cyclophosphamid und

Dexamethason, auch als VCD Schema bezeichnet, ist derzeit eine der Standardkombinationen für die Induktionstherapie (Breitkreutz et al., 2019). Durch die Einführung der schon oben erwähnten Medikamente konnten die einzelnen Schritte der Hochdosistherapie weiter optimiert werden (Peest and Goldschmidt, 2012, Mateos and San Miguel, 2017). So stellt die Kombination von Bortezomib, Lenalidomid und Dexamethason, das sogenannte VRD Schema, eine weitere Kombination für die Induktionstherapie dar (Roussel et al., 2014, Attal et al., 2017). Eine wichtige Errungenschaft in der Therapie des MM war auch die Einführung der Erhaltungstherapie nach autologer SZT unter anderem mit Thalidomid, Bortezomib und Lenalidomid, wodurch das Progression-Free Survival (PFS) und das Overall Survival (OS) deutlich verlängert wurden (Ludwig et al., 2012). Insbesondere Lenalidomid spielt derzeit eine wichtige Rolle in der Erhaltungstherapie (Ludwig et al., 2012, McCarthy et al., 2017). Obwohl sich durch die Hochdosistherapie und die Entwicklung neuer Medikamente die Therapie des MM massiv verbessert hat, ist dennoch nur in den wenigsten Fällen eine Heilung zu beobachten und ein Großteil der Patienten erleidet im Verlauf ein Rezidiv.

Die allogene SZT gewinnt zum einen als Therapieoption bei Rezidiv, zum anderen mit dem Gedanken der möglichen Heilung des MM, immer mehr an Aufmerksamkeit. So zeigten sich nach allogener SZT die höchsten Raten kompletter und molekularer Remissionen (Corradini et al., 1999, Martinelli et al., 2000). Einhergehend mit diesem Therapieansprechen kann durch die allogene SZT ein längeres PFS erreicht werden (Hunter et al., 2005, Kroger et al., 2003). Wie bei der autologen SZT soll durch die im Vorfeld durchgeführte Hochdosistherapie eine drastische Verringerung der Myelomzellen erreicht werden. Die anschließend infundierten allogenen Stammzellen sollen zusätzlich noch den Graft-versus-Myeloma-Effekt induzieren, um noch vorhandene Myelomzellen zu eliminieren. Diese allogenen Stammzellen können so eine effektive Therapieoption gegen die malignen Plasmazellen darstellen (Mehta and Singhal, 1998). Gleichzeitig birgt diese Form der Transplantation aber auch schwerwiegende Risiken, unter anderem die Graft-versus-Host-Disease (GvHD), was zu einer hohen therapiebedingten Mortalität führt. So sollten die Risiken und therapeutischen Möglichkeiten der allogenen SZT für jeden Patienten stets abgewogen werden. Das führt wiederum dazu, dass die allogene SZT erst in späten Stadien, bzw. bei Rezidiv des Myeloms oder für Patienten mit einem zytogenetischem Hochrisikoprofil, durchgeführt wird (Giaccone et al., 2011, Lokhorst et al., 2010).

Die SZT-Therapie kann auch in Form einer Tandem-Transplantation erfolgen. Hierbei werden zwei SZTs in kurzem zeitlichem Abstand von wenigen Monaten durchgeführt. Es gibt sowohl die Variante der autolog-autologen- als auch die der autolog-allogenen Tandem Transplantation. Gagelmann et al. zeigten in ihrer Studie, dass insbesondere die autolog-autologe Tandem Transplantation das PFS und OS bei Myelom Patienten mit zytogenetischem Hochrisikoprofil und extramedullärer Erkrankung verlängern kann (Gagelmann et al., 2019). Für die autolog-allogene Tandem Transplantation zeigten sich bisher noch keine deutlichen Vorteile im Hinblick auf eine Verlängerung des PFS und OS. Dennoch bestätigten diese Studien auch, dass dem GVM-Effekt der allogenen SZT ein weiterhin wichtiger Stellenwert für die Zukunft der Myelom-Therapie zukommt (Giralt et al., 2020, Kroger, 2005).

Neben dem Verfahren der SZT setzten sich in den letzten Jahren weitere medikamentöse Ansätze für die Myelom-Therapie durch. Hierzu gehört unter anderem der Einsatz von monoklonalen Antikörpern, die gegen das CD38 gerichtet sind: Daratumumab, Isatuximab und MOR202 (Larocca et al., 2017). Das Besondere an dem transmembranen Glykoprotein CD38 ist, dass es insbesondere auf Myelomzellen exprimiert wird. Der monoklonale Antikörper Daratumumab bindet spezifisch an dieses Glykoprotein und führt über zellulär und komplementär vermittelte Mechanismen zum Zelltod der Myelomzelle (de Weers et al., 2011). Insbesondere nachdem drei andere Therapieregime durchgeführt wurden oder wenn eine Resistenz gegen Proteasom-Inhibitoren und Immunmodulatoren vorliegt, wird Daratumumab als Therapie-Option eingesetzt (Larocca et al., 2017).

Ein weiterer sehr vielversprechender Ansatz in der Myelom-Therapie ist die Verwendung von Chimeric-Antigen-Receptor (CAR)-T-Zellen. Hierbei werden patienteneigene T-Zellen über einen Gentransfer mit diesem rekombinanten Rezeptor ausgestattet, der spezifisch Antigene binden soll, die vorwiegend auf den zu eliminierenden Zellen vorkommen. Hierfür wurde unter anderem das B-Cell-Maturation-Antigen (BCMA) als mögliches Target detektiert. Die derzeitigen Studien-Ergebnisse dieses Therapieverfahrens sind vielversprechend, es sind aber noch intensive Forschung und weitere Studien notwendig, um dieses Verfahren in der Myelom-Therapie zu etablieren (Carpenter et al., 2013, Sadelain et al., 2013, Brudno et al., 2018, Gagelmann et al., 2020b, Gagelmann et al., 2020a).

4.8 Remissionskriterien

Im Hinblick auf die Einschätzung des Therapieansprechens spielt die Remissionsbeurteilung, definiert durch die IMWG, eine entscheidende Rolle. Es wird unterschieden zwischen stringent Complete Response (sCR), Complete Response (CR), Very Good Partial Response (VGPR), Partial Response (PR), Stable Disease (SD) und Progressive Disease (PD). Kriterien hierfür sind die Ergebnisse aus der Elektrophorese und Immunfixation, die Anzahl der freien leichten Ketten bzw. der freie leichte Ketten-Quotient, der Nachweis von Weichteilmanifestationen sowie der prozentuale Anteil klonaler Plasmazellen im KM (Durie et al., 2006, Kumar et al., 2016):

sCR: Die stringent Complete Response erfüllt die Kriterien für die CR mit zusätzlich normalem freien leichten Ketten-Quotienten.

CR: Negative Immunfixation in Urin und Serum, kein Nachweis einer Weichteilmanifestation und weniger als 5 % Plasmazellen im KM-Aspirat.

VGPR: Nachweis eines monoklonalen Proteins in der Immunfixation von Serum und Urin, aber kein Nachweis in der Elektrophorese oder eine ≥ 90 % Reduktion des monoklonalen Serum-Proteins und zusätzlich weniger als 100 mg/24h des monoklonalen Proteins im Urin.

PR: ≥ 50 % Reduktion des monoklonalen Serum-Proteins und eine ≥ 90 % Reduktion des monoklonalen Proteins im 24h-Urin oder eine Menge von weniger als 200 mg im 24h-Urin. Ist das monoklonale Protein nicht bestimmbar, erfordert die PR eine ≥ 50 % Reduktion der Differenz des freien leichten Ketten-Quotienten. Falls auch der freie leichte Ketten-Quotient nicht bestimmbar ist, wird eine ≥ 50 % Reduktion der KM-Infiltration mit Plasmazellen gefordert, wenn der Ausgangswert vor Therapie bei über 30 % lag. Zusätzlich muss eine ≥ 50 % Reduktion bei Weichteilmanifestation erfolgen.

SD: Der Erkrankungszustand mit den vor der Therapie erfassten Werten bleibt stabil.

PD: ≥ 25 % Anstieg des monoklonalen Proteins im Serum oder ein absoluter Wert von $\geq 0,5$ g/dl und/oder ≥ 25 % Anstieg des monoklonalen Proteins im Urin oder ein absoluter Wert ≥ 200 mg/24h. Ist das monoklonale Protein nicht messbar, wird der freie leichte Ketten-Quotient bestimmt, der bei einem Anstieg der Differenz von ≥ 25 % oder einem Anstieg des absoluten Wertes von > 10 mg/dl für eine PD spricht. Das

Neu-Auftreten oder ein Wachstum einer Weichteilmanifestation sowie die Infiltration des KMs mit Plasmazellen bei einem absoluten Wert von ≥ 10 mg/dl sprechen ebenfalls für eine PD. Auch ein ≥ 50 % Anstieg der zirkulierenden Plasmazellen, bei einem Minimum 200 Zellen pro μL , deutet auf eine PD.

5. Minimal Residual Disease und dessen Detektion

5.1 Definition

Die MRD bezeichnet die verbliebenen malignen Zellen eines Patienten nach stattgehabter Therapie, die durch herkömmliche diagnostische Verfahren nicht erfassbar sind, aber deren hochsensitive Detektion entscheidendes Potenzial für die Bewertung des klinischen Managements hat. Im Zuge neuerer Verfahren lassen sich diese Zellen unter anderem in Blut- und KM-Proben nachweisen, wobei mehrere Verfahren zur Verfügung stehen, die sich über die vergangenen Jahre entwickelt haben und sich unter anderem in Anwendbarkeit, Handhabung und Sensitivität unterscheiden (Davies, 2017).

Die MRD-Diagnostik gewinnt seit Einführung immer mehr an Bedeutung im Rahmen der Nachsorge verschiedener hämatologischer Erkrankungen und wird insbesondere in der Remissionsbeurteilung des MM angewandt (Sanchez et al., 2019, Bruggemann and Kotrova, 2017).

5.2 Oberflächenmarker

Um die malignen Zellen im Rahmen der MRD-Diagnostik zu detektieren, gibt es verschiedene Erkennungsmöglichkeiten. Eine Möglichkeit stellt hierbei die Detektion von spezifischen Oberflächenmerkmalen bzw. Markern dar. Zu diesen Oberflächenmarkern gehören die sogenannten Cluster of Differentiation (CD). Hierbei spielen beim MM vor allem CD38 und CD138 eine entscheidende Rolle, da sie auf allen Plasmazellen exprimiert werden. Weitere Marker unterscheiden zwischen normalen und malignen bzw. Myelomzellen. Hierzu gehören vor allem CD19, CD56, CD27, CD81 und CD117. Dabei werden einige Marker gar nicht oder weniger (CD19/CD27) und andere verstärkt (CD56/CD117) auf aberranten Plasmazellen exprimiert. Gerade das Ergebnis der Kombination dieser verschiedenen Marker gibt

dabei den entscheidenden Hinweis, ob die Zelle maligne ist (Flores-Montero et al., 2016), Bai et al., 2018).

5.3 Multiparameter Flow Cytometry

Zur Detektion dieser Oberflächenmarker wird die MFC angewendet. Bei diesem Verfahren werden spezifische Antikörper-Fluorochrom-Komplexe der zu untersuchenden Probe hinzugegeben und können entsprechend an vorhandene Oberflächenmarker binden. Über einen Laser werden die Fluorochrome angeregt und das dabei emittierte Licht aufgefangen, worüber die Oberflächenmarker bestimmbar werden. Hierbei können verschieden viele Antikörper-Fluorochrom-Komplexe und entsprechend viele detektierbare Oberflächenmarker zum Einsatz kommen. Über die Jahre entwickelte sich dieses Verfahren von einem Four-Colour-Flow über einen Eight- bis Ten-Colour-Flow hin zur Next-Generation-Flow-Cytometry (NGF) weiter. Diese Steigerung der bestimmbaren Oberflächenmarker und die allgemeine Optimierung des Verfahrens spiegelt sich auch in der Sensitivität der Messungen wider. So erreicht die Four-Colour-Flow-Cytometry nur eine Sensitivität von 10^{-4} und die NGF eine Sensitivität von 10^{-6} (Bai et al., 2018, Flores-Montero et al., 2017, Paiva et al., 2008). Das auf dem EuroFlow basierte NGF-Verfahren besteht dabei durch die Optimierung der Zusammensetzung von Fluorochromen und Antikörpern sowie die Einführung von standardisierten Protokollen. Beim NGF-Verfahren der MRD-Messung beim MM werden bei der Eight-Colour-Panel-Version die acht Fluorochrome mit ihren jeweiligen zu detektierenden Oberflächenmarkern, wie in Tabelle 6 dargestellt, in zwei Tubes angesetzt (Flores-Montero et al., 2017).

Tabelle 6 Tabellarische Auflistung der Fluorochrome für die Eight-Colour-Panel-Version beim NGF

| Tube | PacB | PacO | FITC | PE | PerCPCy5.5 | PECy7 | APC | APCH7 |
|------|-------|------|------|------|------------|-------|-------|-------|
| 1 | CD138 | CD27 | CD38 | CD56 | CD45 | CD19 | CD117 | CD81 |
| 2 | CD138 | CD27 | CD38 | CD56 | CD45 | CD19 | CyIgκ | CyIgλ |

Auf Basis der so detektierten verschiedenen Oberflächenmarker der einzelnen Zellen kann dann in ihrer Zusammenschau hoch sensitiv zwischen gesunden und malignen Plasmazellen unterscheiden werden.

5.4 Molekulare Marker

Die molekularen Marker, die sich beim MM auf den Genen für die Immunglobuline (Ig) befinden, stehen den Oberflächenmarkern als Erkennungszeichen für maligne Zellen gegenüber. Die Ig-Gene umfassen das IgH und die Ig-leichte Ketten-Gene Kappa und Lambda. Das IgH-Gen wiederum umfasst Variable (V)-, Diversity (D)- und Joining (J)-Segmente, die leichte Ketten-Gene nur die V- und J-Segmente. Die individuellen Umlagerungen der V-, D- und J-Segmente während der Ontogenese sowie mögliche somatische Hypermutationen, die bei Antigenkontakt im sekundären lymphatischen Gewebe stattfinden, bilden die spezifischen molekularen Marker bei der MM-MRD-Diagnostik (Bai et al., 2018).

5.5 Allel-spezifische-Oligonukleotid-Primer

Für die Detektion Molekularer Marker gibt es verschiedene Verfahren unter anderem unter Anwendung von Allel-spezifischen-Oligonukleotid-Primern (ASO-Primer). Das verbreitetste Verfahren ist hierbei die Verwendung der ASO-Primer in Kombination mit einer Real Time Quantification (RQ)-Polymerase-Kettenreaktion (PCR), abgekürzt als ASO-RQ-PCR. Bei diesem Verfahren werden aus einer Ausgangsprobe mit hoher Tumorlast patientenspezifische Primer designt, die sich anschließend in den zu untersuchenden Verlaufsproben, wenn vorhanden, an die entsprechende Tumor-DNA binden können. Über eine RQ-PCR werden diese spezifischen DNA-Abschnitte amplifiziert und schließlich sicht- bzw. detektierbar. Die ASO-RQ-PCR erreicht dabei eine Sensitivität von ca. 10^{-5} (Bai et al., 2018, Mailankody et al., 2015, Puig et al., 2014).

5.6 Next Generation Sequencing

Das NGS-Verfahren ermöglicht die gleichzeitige Sequenzierung mehrerer DNA-Abschnitte in vergleichsweise kürzer Zeit zu der herkömmlichen Sequenzierung nach Sanger. Diese optimierte DNA-Sequenzierung lässt sich für sehr unterschiedliche Bereiche nutzen, so beispielsweise in der Mikrobiologie, Humangenetik oder der Onkologie (Behjati and Tarpey, 2013). Im Bereich der Onkologie hat sich das NGS-Verfahren in den vergangenen Jahren als vielversprechende Methodik für die Detektion Molekularer Marker und somit für die MRD-Diagnostik für verschiedene maligne hämatologische Erkrankungen wie der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) (Pulsipher et al., 2015) oder dem MM (Rustad et al., 2019) etabliert. Für das

NGS-Verfahren werden die zu untersuchenden Genabschnitte mittels PCR vervielfältigt und über die NGS-Methodik sequenziert. Die so sequenzierten DNA-Abschnitte werden für die MRD-Diagnostik mit der zuvor bestimmten individuellen aberranten IgH-Sequenz abgeglichen, um eine MRD festzustellen. Das NGS-Verfahren bietet hierbei eine sehr hohe Sequenzierungstiefe und ermöglicht eine Sensitivität von ca. 10^{-5} - 10^{-6} , wobei keine patientenspezifischen Primer benötigt werden (Takamatsu, 2017).

6. Material und Methoden

6.1 Versuchsablauf

Für die zu Beginn formulierten Fragestellungen haben wir MM-Patienten untersucht, deren KM-Proben der Klinik für Stammzelltransplantation am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) zur Verfügung standen. Die Patienten, die wir untersuchten, wurden in der unter 6.2 beschriebenen Studie eingeschlossen, was bedeutet, dass sie eine Tandem Transplantation in Form von zwei autologen oder einer autologen und einer allogenen SZT erhalten haben.

Mittels der NGS-Methodik führten wir nun anhand von KM-Proben eine MRD-Untersuchung durch. Als Untersuchungszeitraum wählten wir ungefähr ein halbes und ein Jahr nach der zweiten SZT.

6.2 Patientenkollektiv

Die Patienten in unserer Untersuchung werden im Rahmen der Auto-Allo-Tandem Transplantations-Studie, mit der Ethik Bearbeitungsnummer: PVN2956 und der EudraCT Nummer: 2007-004928-21, der Klinik für Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf behandelt. Von den 32 in der Studie insgesamt eingeschlossenen Patienten lag uns bei vier nur ungenügend Probenmaterial für unsere Untersuchung vor, weshalb wir diese Patienten aus unserer Untersuchung ausschließen mussten.

Einschlusskriterien der Auto-Allo-Studie waren:

- MM Stadium II oder III nach Salmon und Durie

- Ein Patientenalter zwischen 18 und 60 Jahren
- Information und Einwilligung des Patienten
- Beachtung des Thalidomid Schwangerschafts Präventions Plans
- Maximal acht stattgehabte Chemotherapie Zyklen vor Studienaufnahme

Und Ausschlusskriterien waren:

- Mehr als acht Chemotherapie Zyklen vor Studienaufnahme
- Schwere irreversible Nieren-, Leber-, Lungen- oder Herzerkrankung, definiert durch:
 - Gesamtbilirubin, Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) oder Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) > dreifach über dem Referenz-Wert
 - Linksventrikuläre Ejektionsfraktion < 30 %
 - Kreatininclearance < 30ml/min
 - Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität (DLCO) < 35 % und/oder dauerhafte Sauerstoff-Unterstützung
- Positive Serologie für das Humane Immundefizienz-Virus (HIV)
- Schwangere oder stillende Frauen
- Teilnahme an einer anderen Studie während der Registrierung
- Eine vorhergehende autologe SZT
- Alter \geq 61 Jahre

Im Median lag das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ihrer Myelom Erkrankung bei 48 Jahren. Der jüngste Patient war 27 Jahre und der älteste Patient 60 Jahre alt. Von den 28 Patienten sind 14 Frauen und 14 Männer. Alle Patienten leiden an einer Form des MM. Der Zeitraum der Erstdiagnose lag zwischen 2008 und 2013 mit Ausnahme von Patient 08, bei dem schon 2002 die Erstdiagnose gestellt wurde. Der Großteil der Patienten wurde vor SZT in der Induktionstherapie mit zwei bis vier

Zyklen des VCD-Schemas (Bortezomib, Cyclophosphamid und Dexamethason) und nach SZT mit Thalidomid 100 mg in der Erhaltungstherapie behandelt. Zusätzlich sah das Studienprotokoll für die allogenen transplantierten Patienten die mehrfache prophylaktische Gabe von Donor Lymphozyten Infusionen (DLI) vor. Die DLIs die im näheren Zeitraum unserer Untersuchung durchgeführt wurden, sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Die MM-Formen der Patienten verteilen sich wie in Tabelle 7 dargestellt auf: neun Patienten mit Typ IgG Lambda, sechs mit Typ IgG Kappa, fünf mit Typ IgA Kappa, drei mit Typ IgA Lambda, drei Patienten mit einem reinen leichten Ketten-Myelom vom Typ Lambda, ein Patient mit Plasmazell-Leukämie bei IgA Lambda Myelom und ein Patient mit asekretorischem MM.

Alle Patienten aus der Studie wurden mittels SZT behandelt - und zwar im Rahmen einer Tandem Transplantation. Von den 28 Patienten aus der Studie, deren Proben wir im Rahmen unserer Untersuchung verwendeten, erhielten 22 Patienten eine autolog/allogene und sechs Patienten eine autolog/autologe Tandem Transplantation.

Tabelle 7 Personen, Myelom und Transplantations-Daten der Patienten

| Patienten ID | Alter | Geschlecht | MM Typ | Stadium nach Salmon/Durie | Stadium nach ISS | Erste autologe SZT | Zweite autologe SZT | Erste allogene SZT |
|--------------|-------|------------|----------------|---------------------------|------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| 01 | 47 | M | IgG Kappa | IIIA | unkown | PR | | VGPR |
| 02 | 41 | W | IgA Lambda | IIIA | I | PR | | VGPR |
| 03 | 48 | W | IgA Kappa | I | unkown | VGPR | | CR |
| 04 | 47 | M | IgG Lambda | III | I | unkown | | Nie in CR |
| 05 | 42 | W | IgA Lambda | IIA | unkown | CR | | CR |
| 06 | 53 | M | IgG Lambda | IIA | I | CR | | CR |
| 07 | 50 | M | IgG Lambda | IIA | II | VGPR | | CR |
| 08 | 49 | M | IgG Lambda | II | II | PR | | PR |
| 09 | 41 | W | IgG Kappa | IIIB | III | VGPR | | CR |
| 10 | 43 | M | IgG Kappa | IIA | II | VGPR | | CR |
| 11 | 57 | M | IgG Kappa | III | I | VGPR | VGPR | |
| 12 | 58 | M | IgG Lambda | III | unknown | unknown | CR | |
| 14 | 58 | W | asekretorisch | IIIA | III | CR | | CR |
| 15 | 57 | M | IgA Kappa | IIIA | II | Nie in CR | Nie in CR | |
| 17 | 55 | W | IgA Kappa | IIIB | III | PR | | CR |
| 18 | 56 | W | Leicht. Lambda | IIIA | unknown | CR | CR | |
| 19 | 27 | W | IgG Lambda | unknown | II | CR | | CR |

| | | | | | | | | |
|----|----|---|---------------------------------------|---------|---------|-----------|----|----|
| 20 | 56 | W | IgA Lambda | unknown | III | CR | | CR |
| 21 | 58 | W | IgG Lambda | IIIA | II | Nie in CR | | CR |
| 23 | 44 | W | IgG Kappa | III | II | PR | PR | |
| 24 | 47 | M | Leicht. Lambda | IIIA | III | PR | | CR |
| 25 | 43 | W | IgG Lambda | IIIA | II | CR | | CR |
| 26 | 48 | M | IgA Kappa | II | I | VGPR | CR | |
| 27 | 60 | M | Plasmazell Leukämie, IgA Lambda | III | III | VGPR | | CR |
| 28 | 56 | W | IgG Lambda | III | I | VGPR | | CR |
| 30 | 39 | M | IgA Kappa | III | I | VGPR | | CR |
| 31 | 48 | M | IgG Kappa | IIIB | III | PR | | PR |
| 32 | 36 | W | Leicht. Lambda | IIIB | unknown | PR | | CR |

Tabellarische Auflistung von Patienten ID, Alter in Jahren, Geschlecht (M steht für männlich, W steht für weiblich), Myelom-Typ, Auflistung des Stadiums nach Salmon und Durie, Stadium nach ISS, durchgeführter SZTs und jeweils erreichtem Remissionsstatus für jeden Patienten. CR steht für Complete Response, VGPR steht für Very Good Partial Response, PR steht für Partial Response.

6.3 Entnahmezeitpunkte der Ausgangs- und Verlaufspuren der Patienten

Für die Untersuchung der MRD wählten wir KM-Proben, die ungefähr ein halbes und ein Jahr nach der zweiten autologen oder der ersten allogenen Transplantation entnommen wurden. Die Zeiträume variieren teilweise um einige Wochen/Monate, da bei den Patienten nicht immer in gleichen Abständen KM-Proben entnommen wurden. Bei einigen Patienten stand uns zu den gewünschten Zeiträumen allerdings kein Probenmaterial zur Verfügung, da z.B. keine Probe entnommen wurde oder der Patient schon verstorben war. Für die MRD-Diagnostik mittels NGS-Methodik benötigt man als Ausgangsmaterial eine Probe, in der eine möglichst hohe Anzahl maligner monoklonaler Plasmazellen vorhanden ist, idealerweise eine Probe vor jeglicher therapeutischen Intervention. Um dieser Anforderung gerecht zu werden, haben wir versucht, KM-Proben zu erhalten, die in möglichst großem zeitlichem Abstand zu der zweiten autologen SZT oder der allogenen SZT entnommen wurden. Im Idealfall stand uns auch eine Probe vor der ersten autologen SZT zur Verfügung. Die Entnahmezeitpunkte für die in unserer Untersuchung verwendeten Proben sowie der zeitliche Zusammenhang zu den jeweiligen Transplantationen sind in Tabelle 8 aufgeführt. Zusätzlich ist der zum Zeitpunkt der Probenentnahme vorhandene Plasmazellchimärismus angegeben.

Tabelle 8 Entnahmezeitpunkte der Proben

| Patient ID | Ausg. M/W vor 2 auto/1 allo SZT | Erste auto SZT | Zweite auto SZT | Erste allo SZT | DLI | 1.Probe | % P.-Chimär. | 2.Probe | % P.-Chimär |
|------------|---------------------------------|----------------|-----------------|----------------|---|---------|--------------|---------|-------------|
| 01 | 4 M | 11.08 | | 02.09 | 12.11 05.12 08.12 01.13 | X | X | 11 M | 99,9 |
| 02 | 5 M | 04.09 | | 07.09 | | 6 M | X | 14 M | X |
| 03 | 4 M | 04.09 | | 07.09 | | 4 M | X | 13 M | X |
| 04 | 4 M | 08.09 | | 10.09 | | 3 M | 97,7 | X | X |
| 05 | 2 M | 07.09 | | 10.09 | | X | X | 10 M | 99,8 |
| 06 | 4 M | 10.09 | | 02.10 | 09.11 01.12 | 6 M | 99,6 | 13 M | 99,7 |
| 07 | 6 M | 11.09 | | 02.10 | | 6 M | 93,3 | 17 M | 96,0 |
| 08 | 1 W | 01.10 | | 04.10 | 02.13 | 3 M | 93,3 | 12 M | X |
| 09 | 4 M | 12.09 | | 03.10 | | 5 M | X | 12 M | 99,4 |
| 10 | 6 M | 01.10 | | 04.10 | 11.11 | 3 M | X | 11 M | 99,5 |
| 11 | 4 M | 05.10 | 08.10 | | | X | X | 18 M | X |
| 12 | 4 M | 06.10 | 08.10 | | | 3 M | X | 12 M | X |
| 14 | 6 M | 08.10 | | 10.10 | 07.11 10.11 01.12 | 5 M | 98,9 | 11 M | 98,8 |
| 15 | 3 M | 07.11 | 05.11 | | | 5 M | X | 11 M | X |
| 17 | 4 M | 07.11 | | 09.11 | 07.12 01.13 05.13 05.13 10.13 | 3 M | 96,3 | 16 M | 87,1 |
| 18 | 4 M | 08.11 | 11.11 | | | 3 M | X | X | X |
| 19 | 1 M | 04.12 | | 07.12 | 02.13 | 6 M | 96,5 | 16 M | 99,2 |
| 20 | 3 M | 06.12 | | 09.12 | 01.14 05.14 | 4 M | 94,8 | 11 M | 90,9 |
| 21 | 3 M | 06.12 | | 08.12 | 03.13 | 5 M | 97,5 | 17 M | 99,8 |
| 23 | 2 M | 09.12 | 11.12 | | | 4 M | X | 12 M | X |
| 24 | 2 M | 09.12 | | 11.12 | | 3 M | X | 17 M | X |
| 25 | 7 M | 12.12 | | 03.13 | 05.14 08.14 01.15 | 5 M | 99,9 | 12 M | X |
| 26 | 4 M | 02.13 | 05.13 | | | 6 M | X | 11 M | X |
| 27 | 2 W | 02.13 | | 04.13 | 12.13 | 5 M | 72,1 | 9 M | X |
| 28 | 4 M | 04.13 | | 07.13 | 02.14 11.14 01.16 | 6 M | 34,8 | 12 M | 99,2 |
| 30 | 4 M | 08.13 | | 10.13 | 06.14 09.14 | 6 M | 57,7 | 12 M | X |
| 31 | 3 M | 07.13 | | 09.13 | | 6 M | X | 17 M | X |
| 32 | 4 M | 08.13 | | 10.13 | 10.14 01.15 | 5 M | X | 12 M | X |

Angabe des Datums der einzelnen Transplantationen und der jeweils durchgeführten DLIs sowie die Entnahmezeitpunkte für die Ausgangsprobe und 1 und 2 Verlaufsprobe in Monaten (M) oder Wochen (W) zu der zweiten autologen (auto) oder ersten allogenen (allo) Transplantation mit dem jeweils zu dem Zeitpunkt vorliegenden Plasmazellchimärismus in %. Die Zeitpunkte für die Ausgangsproben sind vor und für die Verlaufsproben nach der Transplantation angegeben. X steht für Wert oder Probe nicht vorhanden.

Im Median lag die erste Verlaufsprobe fünf und die zweite Verlaufsprobe zwölf Monate nach der zweiten SZT. Der Tabelle zu entnehmen ist, dass für Patient 01, 04, 05, 11 und 18 jeweils nur eine Verlaufsprobe zur Verfügung stand bzw. untersucht wurde.

Hinsichtlich der Ausgangsproben haben wir einen Teil der Proben sowohl in gesamter KM-Proben (gDNA) und nach CD138-positiver Selektion (cDNA) sequenziert und analysiert, um die beiden Varianten zu vergleichen.

Bei den Verlaufsproben haben wir einen Teil der Proben in gesamter KM-Probenform und nach CD138-positiver Selektion untersucht (beides gDNA).

6.4 Material und Equipment

Tabelle 9 Geräte, Materialien und Kits

| Geräte | Firma/Hersteller |
|---|---|
| Tisch-Zentrifuge 5424 | Eppendorf |
| Diverse Pipetten | Eppendorf |
| Thermocycler Gradient | Biometra |
| Nano Drop 1000 Spectrophotometer | PeQLab |
| Qubit 2.0 Fluorometer | Thermo Fisher Scientific |
| autoMACS Pro Separator | Miltenyi Biotec |
| OneTouch 2 Instrument | Thermo Fisher Scientific |
| Ion OneTouch Enrichment System | Thermo Fisher Scientific |
| Ion Personal Genome Machine System | Thermo Fisher Scientific |
| Ion Chef System | Thermo Fisher Scientific |
| Ion GeneStudio S5 Plus System | Thermo Fisher Scientific |
| Chip Zentrifuge | VWR International |
| LightCycler 480 Instrument II | Roche Diagnostics |
| Materialien | Firma/Hersteller |
| Biosphere Filter Tips | Sarstedt AG & CO |
| LowBinding Tubes | Eppendorf |
| MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate | Applied Biosystems by Life technologies |
| Adhesive seal sheets for PCR technologies | Applied Biosystem by Life technologies |
| DynaMag-2 Magnet | Thermo Fisher Scientific |
| Qubit assay tubes | Thermo Fisher Scientific |
| Kits | Firma/Hersteller |
| CD138 MicroBeads, human | Miltenyi Biotec |
| QIAamp DNA Blood Mini Kit | Qiagen |
| QIAamp DNA Micro Kit | Qiagen |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen |
| iScript cDNA Synthesis Kit | Bio-Rad |

| | |
|---|----------------------------|
| LymphoTrack Dx IGH (FR1/FR2/FR3) Assays – PGM | Invivoscribe Technologies |
| AMPure XP-Kit | Beckmann Coulter |
| Ion Library TaqMan Quantitation Kit | Thermo Fisher Scientific |
| Ion 316 Chip Kit v2 | Thermo Fisher Scientific |
| Ion 318 Chip Kit v2 | ThermoFisher Scientific |
| Ion 530 Chip Kit | ThermoFisher Scientific |
| Ion 520 & Ion 530 ExT Kit-Chef | ThermoFisher Scientific |
| Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit | Thermo Fisher Scientific |
| Ion PGM Wash 2 Bottle Kit | Thermo Fisher Scientific |
| Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit | Thermo Fisher Scientific |
| Ficoll-Paque Plus | GE Healthcare Life Science |

Auflistung der verschiedenen Geräte, Materialien und Kits mit ihrem jeweiligen Hersteller, die wir während unserer Untersuchung verwendeten.

6.5 Proben

Im Rahmen der Studie wurden die KM-Proben, die den Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen wurden, im Labor der SZT des UKEs aufbereitet und tiefgefroren. Gelagert wurden die Proben bei -20 °C. Die Proben, die uns zur Verfügung standen, wurden zwischen 2008 und 2016 entnommen.

6.6 Aufbereitung

Für unsere Untersuchung haben wir die KM-Proben in zwei Fraktionen aufgeteilt. Die eine Fraktion bestand aus 200 µl der entnommenen KM-Probe, die alle Zellen des KM enthielt und die wir als gesamte KM-Probe bezeichneten. Die andere Fraktion entstand, indem wir aus einem Anteil der entnommenen KM-Probe, wobei mindestens 2 ml und höchstens 5 ml verwendet wurden, durch das Verfahren der Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) mittels des autoMACS Pro Separator von Miltenyi Biotec, die CD138 tragenden Zellen - sprich die Plasmazellen - herausfilterten. Diese Fraktion, die dementsprechend nur die Plasmazellen enthielt, bezeichneten wir als CD138-positive-Fraktion.

6.7 DNA-Isolierung

Für die Sequenzierung haben wir die DNA, aus als genomische DNA (gDNA) bezeichnet, aus den KM-Proben isolieren. Hierfür verwendeten wir bei der gesamten KM-Probe das QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen und für die CD138-positive-

Fraktion das QIAamp DNA Micro Kit von Qiagen. Die nach Isolierung vorhandene DNA-Menge wurde über die Nano Drop Bestimmung von PeQLab quantifiziert.

6.8 DNA-Aufkonzentrierung

Für eine spätere aussagekräftige Messung der MRD wird eine DNA-Menge von mindestens 500 ng benötigt. Konnte durch die oben beschriebene DNA-Isolierung nicht genügend DNA gewonnen werden, wurden diese durch das QIAamp DNA Micro Kit aufkonzentriert. Anschließend haben wir erneut die DNA-Menge mittels Nano Drop Verfahren gemessen.

6.9 RNA-Isolierung

Um auch cDNA als Untersuchungsmaterial zu generieren, haben wir aus einigen CD138-positiven-selektierten Ausgangsproben RNA isoliert. Hierfür verwendeten wir das RNeasy Mini Kit von Qiagen.

6.10 cDNA

Die isolierte RNA aus der CD138-positiven-Fraktion haben wir im nächsten Schritt in die stabilere cDNA umgeschrieben. Hierfür verwendeten wir das iScript cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad.

6.11 Library Präparation und NGS

Für die Aufbereitung der DNA zur NGS-Methodik durch die Ion Personal Genome Machine (PGM) wurde das LymphoTrack Dx IGH (FR1/FR2/FR3) Assays – PGM von Invivoscribe Technologies verwendet (Technologies, 2018). Das Protokoll für die Aufbereitung der DNA gliedert sich hierbei in folgende Schritte, an deren Ende eine DNA-Library für die Sequenzierung zur Verfügung steht:

1.Schritt

Präparation der Library und Amplifikation:

Hierfür wird der im Kit enthaltende Master-Mix benötigt. Dieser enthält einen der IgH-Framework (FR)-Primer. Zur Verfügung stehen dabei die drei Framework Primer FR1, FR2 und FR3. FR bezeichnet die relativ stabilen Regionen, die zwischen den

sogenannten sehr variablen Complementary Determining Regions (CDR) liegen. Zusammen bildet dieser Bereich die Antigenerkennungsdomäne.

Für den Großteil unserer Proben, insbesondere bei den Ausgangsproben, haben wir alle drei IgH-FR-Primer verwendet und die entsprechenden DNA-Abschnitte untersucht.

An die einzelnen IgH-FR-Primer sind Barcodes gekoppelt, die eine bestimmte Abfolge an Basen darstellen und es so später ermöglichen, die einzelnen sequenzierten Proben zu identifizieren. Unserem Protokoll zufolge ist ein Lauf auf zwölf Proben ausgelegt. Der Master-Mix wird zusammen mit einer DNA-Polymerase und der zu untersuchenden DNA-Probe gemischt. Die einzelnen DNA-Abschnitte, die über ihre jeweiligen Barcodes identifizierbar sind, werden anschließend über eine PCR amplifiziert.

2.Schritt

Reinigung:

Nach der PCR müssen die amplifizierten DNA-Abschnitte gereinigt werden. Hierfür verwendeten wir das AMPure XP PCR Purification Kit von Beckmann Coulter. Die zu untersuchenden doppelsträngigen PCR-Produkte werden dabei an kleine Eisenpartikel gebunden und über einen Magneten aus dem restlichen Gemisch getrennt.

3.Schritt

Quantifizierung:

Für die spätere Template verwendeten wir eine PCR-Produkt Konzentration von ca. 100 pM. Hierfür musste die zunächst vorliegende PCR-Produktmenge bestimmt werden. In unserer Untersuchung verwendeten wir hierfür die Methode der Real-Time-PCR mit Hilfe des Ion Library TaqMan Quantitation Kits von Thermo Fisher Scientific und dem LightCycler 480 Instrument II mit der zugehörigen Software von Roche Diagnostics. Aus der so bestimmten Konzentration wird der Verdünnungsfaktor berechnet, um die Library auf 100 pM zu verdünnen.

Findet die Durchführung der Template Präparation nicht am selben Tag statt, wird die fertige Library bei -20 °C gelagert.

4.Schritt

Template Präparation:

Die Template Präparation bildet die Grundlage für die Sequenzierung über die PGM. Die Proben werden in diesem Schritt, je nach der in der Quantifizierung bestimmten Menge, verdünnt und anschließend in gleicher Menge in einem Röhrchen zusammengegeben. Im Ion OneTouch 2 Instrument (Abb.1) wird die Library an sogenannte Nanospheren gebunden und über eine Emulsions-PCR vervielfältigt. Hierfür verwendeten wir das Ion PGM Template OT2 400 Kit.

Während dieses Vorganges werden nicht alle Nanospheren mit DNA-Fragmenten besetzt. Um nur die besetzten Nanospheren zu erhalten, werden diese mit Hilfe des Ion OneTouch Enrichment Systems (ES) (Abb.1) angereichert.



Abbildung 1 Ion OneTouch Instrument (rechts) und Ion OneTouch Enrichment System (links) (ThermoFisher, 2021a).

5.Schritt

Sequenzierung:

Das Kernstück der NGS ist die Sequenzierung an sich. Diese wurde in unserer Untersuchung durch die PGM von Thermo Fisher Scientific durchgeführt (Abb.2). Nach dem Vervielfältigen der DNA-Fragmente und der Bindung dieser an die Nanospheren, gaben wir die Sequenzierungs-Prime hinzu, die mittels Thermo Cycler an die einzelnen DNA-Fragmente binden. Anschließend wurde die für die Sequenzierungsreaktion

notwendige Polymerase hinzugegeben. Die nun für die Sequenzierung vorbereitete Library wird mittels Pipette auf den entsprechenden Träger-Chip geladen, wobei wir den 316 v2 Chip mit einer Read-Anzahl von 2-3 Millionen oder den 318 v2 Chip mit einer Anzahl von 4-5,5 Millionen-Reads, beide von Thermo Fisher Scientific, verwendeten. Pro Sequenzierungsdurchlauf konnten wir eine Library mit jeweils zwölf Proben sequenzieren, die jeweils auch eine Negativ- und eine Positiv-Kontrolle enthielt. Bevor das PGM Gerät die Sequenzierung durchführen kann, muss es nach dem entsprechenden Protokoll initialisiert werden. Während dieser Initialisierung werden dem PGM-Gerät mittels des Ion PGM Hi-View Sequencing Kit von Thermo Fisher Scientific die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs): Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP) zur Verfügung gestellt.

Die NGS-Methodik mittels des Ion Torrent-Systems basiert auf dem Sequencing by Synthesis (SBS) Prinzip. Die Funktionsweise ist wie folgt: Die mit den DNA-Fragmenten beladenen Sequenzierungs-Chips enthalten je nach Größe 0,5-1 Million Reaktionskammern. In diesen Reaktionskammern findet nach schrittweiser Zugabe der dNTPs die Synthesereaktion des jeweils komplementären Stranges zu den jeweiligen DNA-Fragmenten statt. Bei passendem Nukleotid verändert sich der pH-Wert der Reaktionskammer durch Abgabe eines Wasserstoff-Ions während der Synthesereaktion. Diese pH-Veränderung führt zu einer Spannungsänderung. Diese deutliche Spannungsänderung wird nun vom PGM-Instrument detektiert. Anschließend kann nach Auswertung über eine Analyse-Software die Basenabfolge des zu untersuchenden DNA-Fragmentes bestimmt werden.

Gegen Ende unserer Untersuchung stand uns auch das modernere Ion Chef Instrument, welches Library und Template Präparation sowie die Chip-Beladung automatisiert durchführt, sowie das Ion GeneStudio S5 Plus System von Thermo Fisher Scientific für die Sequenzierung zur Verfügung.



Abbildung 2 Ion PGM System (Institute, 2016).

6.12 Daten-Visualisierung und -Analyse

Die Daten Analyse und Visualisierung wurde vorwiegend mit der LymphoTrack Software – PGM - Version 2.0.1 (Technologies, 2016) durchgeführt. Diese Visualization Software arbeitet mit dem Programm Microsoft Excel zusammen. Mittels dieser Visualization-Software werden die Daten in acht Optionen dargestellt:

- *Read Summary*: Überblick über die bis 200 am meisten gemessenen Sequenzen, die sich in ihrer Basenabfolge deutlich voneinander unterscheiden. Dargestellt werden unter anderem die Sequenz an sich, die absolute Basenanzahl, auf welcher V bis J-Region diese liegt sowie die absolute Anzahl, wie häufig die Sequenz gelesen wurde und auch die Anzahl der Total Reads in Prozent.
- *Merged Read Summary*: Darstellung der zehn am meisten gelesenen Frequenzen, nachdem diese mit den Top 500 Frequenzen zusammengeführt wurden, wenn diese sich in nur ein oder zwei Basenabfolgen unterschieden (Abb.3).
- *VJ Sequence Frequency Graph*: Histogramm der Top 200 Sequenzen von jeder V Familie – J Familie (für IGH/IGK) oder V-Gen – J Gen (für TRG) Rekombination (Abb.4 und 6).
- *VJ Usage: Rohzählung und Frequenz der Top 200 V Familie – J Familie (für IGH/IGK) oder V Gen – J Gen (für TRG) Rekombination.*

- *VJ Usage Percent Graph*: Visualisierung der Sequenzen in einem 3D-Säulendiagramm der Top 200 Sequenzen von jeder V Familie – J Familie (für IGH/IGK) oder V Gen – J Gen (für TRG) Rekombination (Abb.5 und 7).
- *VJ Usage Raw Graph*: Visualisierung der Sequenzen in einem 3D-Säulendiagramm der Top 200 Rohzählungen von jeder V Familie – J Familie (für IGH/IGK) oder V Gen – J Gen (für TRG) Rekombination.
- *VJ Sequence Frequency*: Eine Liste möglicher V Familie – J Familie (für IGH/IGK) oder V Gen – J Gen (für TRG) Rekombinationen, jede mit einer sortierten Liste der Top 200 Reads (vom höchsten zum niedrigsten %).
- *Unique Reads*: Ein FASTA File der einzigartigen Frequenzen, sortiert nach der Anzahl.

In unserer Untersuchung werteten wir für die Ausgangsprobe eine Sequenz als monoklonal, wenn diese in der Merged Read Summary-Darstellung unter Total Reads dreimal häufiger vorkam als die Frequenz, die sich auf Rank 3 befand. Eine solche Merged Read Summary mit monoklonaler Sequenz ist in Abbildung 3 dargestellt.

| Rank | Sequence | Length | Merge count | V-gene | J-gene | % total reads |
|------|----------------|--------|-------------|-------------|----------|---------------|
| 1 | GCCTCTGGATTCA | 270 | 14329 | IGHV3-11_01 | IGHJ5_02 | 47.66 |
| 2 | GGCCTCTGGATT C | 271 | 2397 | IGHV3-11_01 | IGHJ5_02 | 7.97 |
| 3 | GCCTCTGGATTCA | 270 | 115 | IGHV3-11_01 | IGHJ5_02 | 0.38 |
| 4 | CCTCTGGTTACAC | 262 | 52 | IGHV1-18_01 | IGHJ4_02 | 0.17 |
| 5 | GGCTGGAGTGGG | 223 | 39 | IGHV3-33_01 | IGHJ4_02 | 0.13 |
| 6 | CATCTGGATACA G | 271 | 31 | IGHV1-8_01 | IGHJ4_02 | 0.10 |
| 7 | GGCTCTGGAGTCA | 266 | 28 | IGHV3-74_03 | IGHJ4_02 | 0.09 |
| 8 | CAGTGTCTCTGG T | 276 | 25 | IGHV4-59_07 | IGHJ4_02 | 0.08 |
| 9 | CACTGTCTCTGGT | 279 | 25 | IGHV4-59_01 | IGHJ2_01 | 0.08 |
| 10 | CGCTGTCTCTGG T | 291 | 25 | IGHV4-34_12 | IGHJ6_03 | 0.08 |

Abbildung 3 Darstellung der Top 10 Merged Read Summary mit einer monoklonalen Sequenz auf Rank 1.

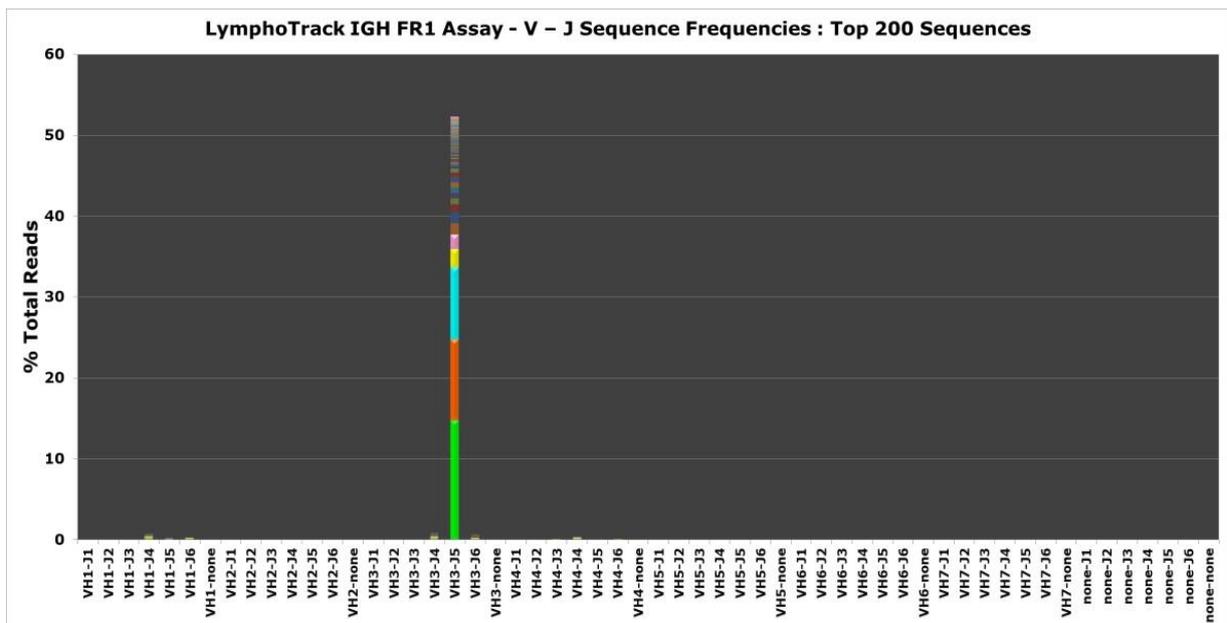


Abbildung 4 Darstellung der VJ Sequence Frequency in einem Histogramm mit einem deutlich monoklonalen Muster.

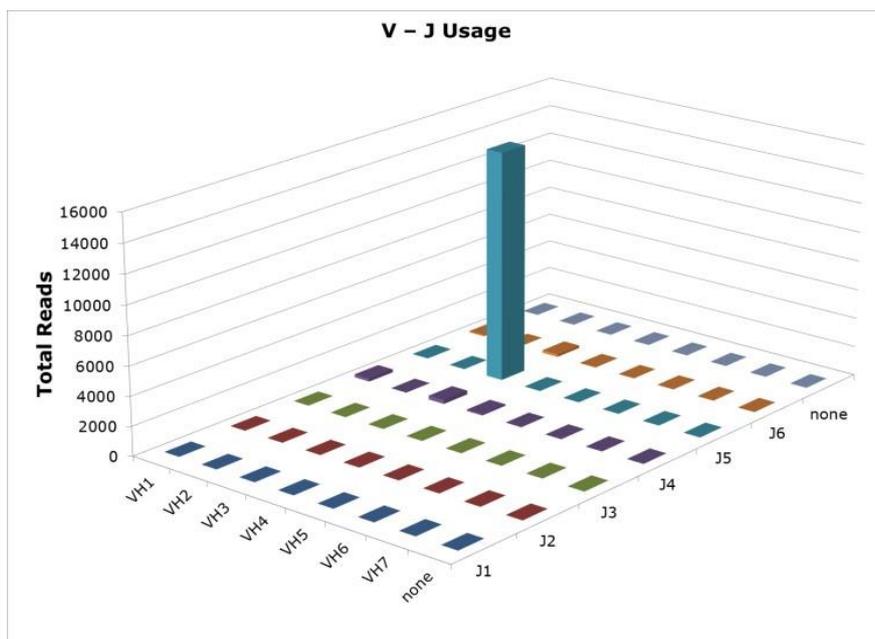


Abbildung 5 Darstellung der VJ Usage in einem 3D-Säulendiagramm mit einem deutlich monoklonalen Muster.

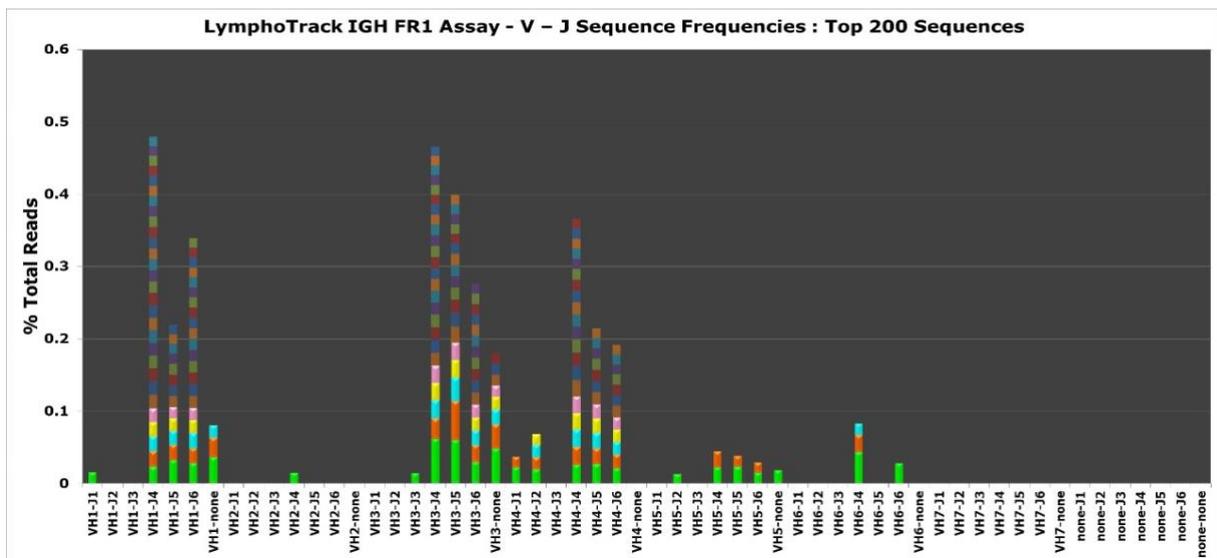


Abbildung 6 Darstellung der VJ Sequence Frequency in einem Histogramm mit einem polyklonalen Muster.

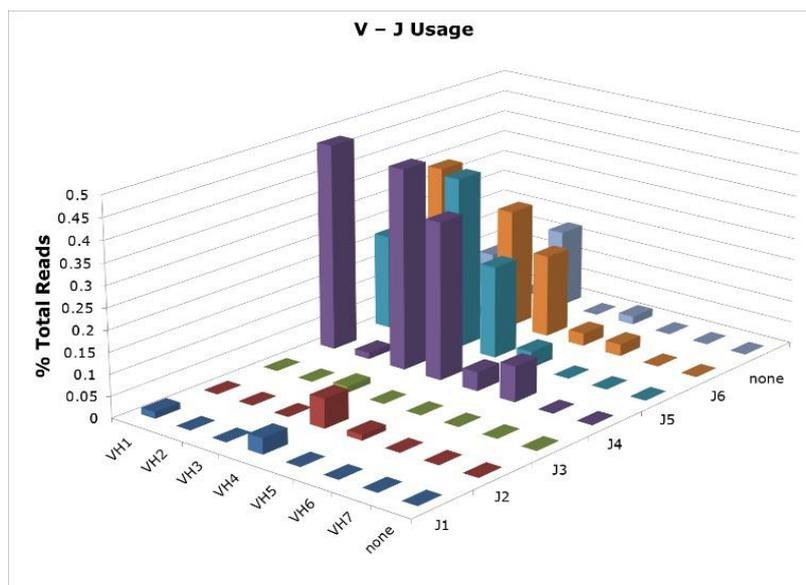


Abbildung 7 Darstellung der VJ Usage in einem 3D-Säulendiagramm mit einem polyklonalen Muster.

6.13 Datenanalyse MRD

Eine MRD in unseren Verlaufsproben wurde über die LymphoTrack MRD Software v1.2.0 von Invivoscribe Technologies detektiert (Technologies, 2017). Mit dieser Software kann die Präsenz der monoklonalen Sequenz in den Verlaufsproben und somit eine MRD detektiert werden. Hierfür wird die über das PGM-Verfahren erfasste monoklonale Ausgangssequenz mit den sequenzierten DNA-Abschnitten der zugehörigen Verlaufsproben abgeglichen. Wenn die Software die monoklonale

Sequenz in den Verlaufsproben erkennt, wird die Menge an Reads mit der exakt übereinstimmenden Sequenz, der Sequenz mit einem Mismatch in der DNA-Abfolge und der mit zwei Mismatches und die jeweils dazugehörige Cumulative Read Frequency angegeben. (siehe Abb.8).

In unserer Untersuchung werteten wir eine Probe als MRD-positiv, wenn die monoklonale Ausgangssequenz in einer der drei Fälle (Exact Match, 1 Mismatch, 2 Mismatch) detektiert werden konnte, unabhängig von der Menge der Reads.

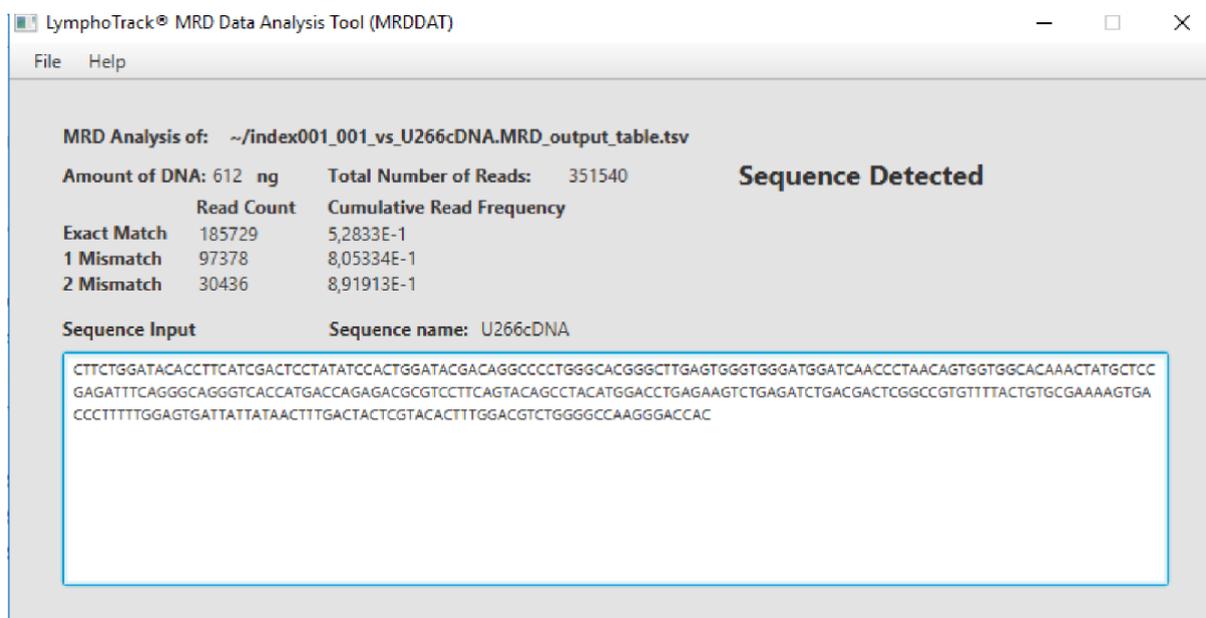


Abbildung 8 LymphoTrack-Programm: MRD-Auswertung bei MRD-Nachweis.

6.14 Zelllinie für die NGS-Diagnostik

Gegenstand unserer Untersuchung ist es, die Sensitivität der NGS-Methodik mittels des PGM-Verfahrens von Thermo Fisher Scientific unabhängig von der Qualität der Patientenproben darzustellen und weiterhin die Sensitivität von DNA und cDNA als Varianten zu vergleichen. Das Ausgangsmaterial unserer Probe war die U-266 Zelllinie mit der DSMZ Nummer ACC 9, welche 1968 aus einer peripheren Blutprobe eines 53-jährigen Patienten mit IgE-Lambda produzierenden Myelomzellen gewonnen wurde (DSMZ, 2021). Um wie bei unseren Patienten ein Äquivalent zur gesamten KM-Probe zu erhalten, also einer Probe, die nicht nur Myelomzellen enthält, gaben wir zu einem Teil unserer U-266-Probe einen Buffy Coat hinzu. Diesen von der Transfusionsmedizin des UKE zur Verfügung gestellten Buffy Coat verdünnten wir 1:2 mit PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung) und führten anschließend eine Separation mittels

Ficoll-Paque Plus von GE Healthcare Life Science durch. Sowohl die U-266 Probe als auch der Buffy Coat enthielten jeweils $4,5 \times 10^6$ Zellen pro 900 μl . Um die Sensitivität der PGM-NGS-Methodik zu überprüfen, führten wir folgende Verdünnungsreihe durch: Die erste Stufe enthielt 1000 μl U-266 Probe. Von diesen 1000 μl nahmen wir 100 μl ab und mischten diese mit 900 μl Buffy Coat. Anschließend nahmen wir für die nächste Verdünnungsstufe wieder 100 μl von der vorherigen Stufe ab und mischten diese wieder mit 900 μl Buffy Coat. Diese Verdünnung führten wir insgesamt sieben Mal durch und erhielten so den in Tabelle 10 angegebenen prozentualen Anteil an Myelomzellen in den verdünnten Proben. Entsprechend enthielt die letzte Verdünnungsstufe eine Myelomzelle unter 10.000.000 Zellen.

Tabelle 10 Verdünnungsreihe der Myelom-Zelllinie

| Probe (P) | U266-Probe | Buffy Coat | Subtrahierte Menge nach Mischung | Gesamtmenge | % Anteil der Myelomzellen |
|-----------|----------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|---------------------------|
| P1 | 1000 μl | 0 μl | -100 μl | 900 μl | 100 % |
| P2 | 100 μl P1 | 900 μl | -100 μl | 900 μl | 10 % |
| P3 | 100 μl P2 | 900 μl | -100 μl | 900 μl | 1 % |
| P4 | 100 μl P3 | 900 μl | -100 μl | 900 μl | 0,1 % |
| P5 | 100 μl P4 | 900 μl | -100 μl | 900 μl | 0,01 % |
| P6 | 100 μl P5 | 900 μl | -100 μl | 900 μl | 0,001 % |
| P7 | 100 μl P6 | 900 μl | -100 μl | 900 μl | 0,0001 % |
| P8 | 100 μl P7 | 900 μl | -100 μl | 900 μl | 0,00001 % |

Tabellarische Darstellung der Durchführung der Verdünnungsreihe der Myelom-Zelllinie.

Nach Durchführung der Verdünnungsreihe isolierten wir die DNA und RNA für jede Probe nach demselben Verfahren, welches wir auch bei unseren Patienten-Proben angewendet haben. Die RNA wurde anschließend wieder mittels des iScript cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad in cDNA umgeschrieben. Um die Sensitivität möglichst optimal zu testen, haben wir bei den DNA-Proben ca. 1000 ng und bei den RNA Proben ca. 500 ng für die Sequenzierung verwendet.

Template Präparation, Sequenzierung und Daten-Analyse folgten ebenfalls den Protokollen und Software-Programmen, die wir auch für die Patienten-Proben verwendet haben.

6.15 Daten der MFC-Diagnostik

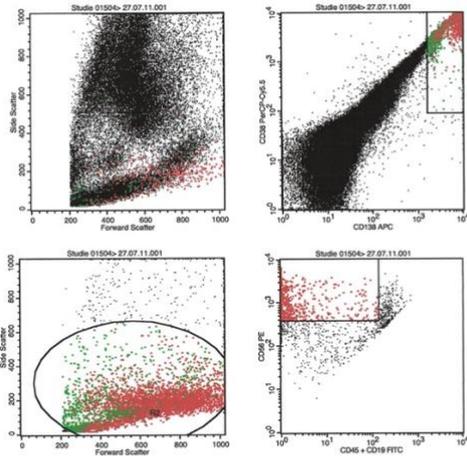
Ein weiteres wichtiges Ziel unserer Untersuchung war der Vergleich der NGS-Diagnostik mittels des von uns genutzten Ion Torrent Systems mit solcher über die MFC-Diagnostik, die schon als etabliertes Verfahren gilt (Vgl. Abschnitt 5.3). Hierfür haben wir die jeweils gewonnenen Ergebnisse miteinander verglichen, um Rückschlüsse auf Stärken und Schwächen beider Verfahren ziehen zu können.

Die MFC-Diagnostik der Patienten-Proben wurde ebenfalls an der Klinik für Stammzelltransplantation des UKEs durchgeführt. Hierfür wurde eine MFC mit einem Four-Colour-Panel verwendet. Es wurde Probenmaterial aus derselben KM-Punktion, von der auch das Material für die NGS-Diagnostik stammt, verwendet. Dieses Probenmaterial wurde für die Messung nach einem festen Protokoll aufbereitet und die anschließende Four-Colour-Flow Cytometry über ein FACSCanto Instrument des Herstellers BD durchgeführt. Die vier verwendeten Fluorochrome mit ihren jeweiligen zu detektierenden Oberflächen-Markern wurden, wie in Tabelle 11 dargestellt, in drei Tubes angesetzt. Für jede Probe wurde ein Minimum von ca. 500.000 Events gemessen. Ab 50 Events galt die MRD Bestimmung als positiv. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse aus einer MFC-Messung mit Detektion von Myelomzellen.

Tabelle 11 Verwendete Fluorochrome (Four-Colour-Flow)

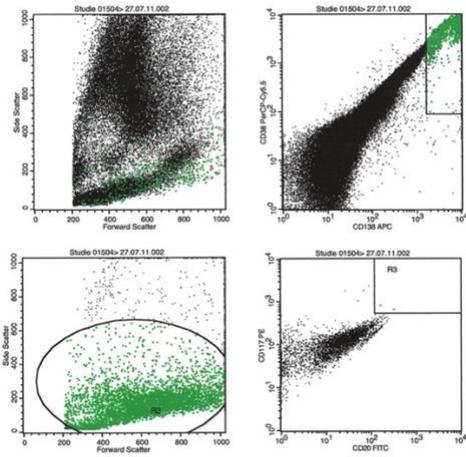
| Tube | FiTC | APC | PerCPCy5.5 | PE |
|-------------|-------------|------------|-------------------|-----------|
| 1 | CD45/CD19 | CD138 | CD38 | CD56 |
| 2 | CD20 | CD138 | CD38 | CD117 |
| 3 | CD27 | CD138 | CD38 | CD28 |

Dargestellt sind die drei angesetzten Tubes mit den vier verwendeten Fluorochromen und den jeweils zu detektierenden Oberflächenmarkern.



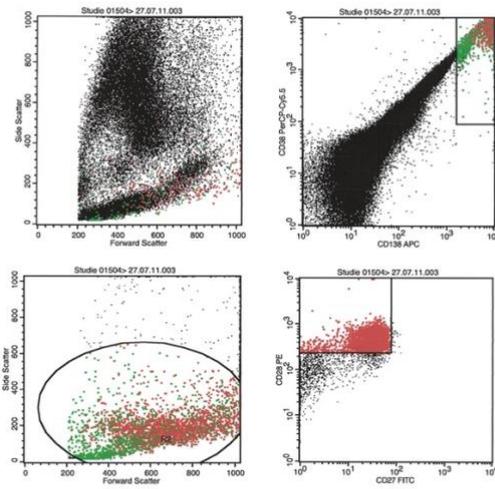
File: [REDACTED]
 Patient ID: [REDACTED]
 Acquisition Date: [REDACTED]
 Total Events: 500000

| Gate | Events | % Gated | % Total |
|------|--------|---------|---------|
| mPC | 3468 | 76.30 | 0.69 |
| PC | 4545 | 100.00 | 0.91 |



File: [REDACTED]
 Patient ID: [REDACTED]
 Acquisition Date: [REDACTED]
 Total Events: 500000

| Gate | Events | % Gated | % Total |
|------|--------|---------|---------|
| mPC | 2 | 0.04 | 0.00 |
| PC | 4485 | 100.00 | 0.90 |



File: [REDACTED]
 Patient ID: [REDACTED]
 Acquisition Date: [REDACTED]
 Total Events: 440040

| Gate | Events | % Gated | % Total |
|------|--------|---------|---------|
| mPC | 2121 | 61.66 | 0.48 |
| PC | 3440 | 100.00 | 0.78 |

Abbildung 9 Darstellung der Ergebnisse nach MFC (Four-colour-Flow)-Messung einer KM Probe mit Detektion von Myelomzellen.

6.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte über das Programm IBM SPSS Statistics, Version 27.

7. Ergebnisse

7.1 Ergebnisse der NGS-Diagnostik für die Ausgangsproben der Patienten

Ob in der jeweiligen Probenform (gDNA aus der gesamten KM-Probe oder cDNA aus der CD138-positiv-selektierten Probe) eine monoklonale Sequenz erfasst werden konnte, ist in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12 Ergebnisse der Sequenzierung der Ausgangsproben

| Patienten ID | CD138-positiv (cDNA) | Gesamtes KM (gDNA) |
|--------------|----------------------|--------------------|
| 01 | monoklonal | X |
| 03 | monoklonal | X |
| 04 | monoklonal | monoklonal |
| 05 | monoklonal | monoklonal |
| 06 | monoklonal | monoklonal |
| 07 | monoklonal | polyklonal |
| 08 | monoklonal | polyklonal |
| 09 | X | monoklonal |
| 10 | monoklonal | monoklonal |
| 14 | monoklonal | monoklonal |
| 15 | X | monoklonal |
| 17 | monoklonal | X |
| 18 | X | monoklonal |
| 19 | X | monoklonal |
| 20 | X | monoklonal |
| 21 | monoklonal | X |
| 23 | monoklonal | X |
| 25 | X | monoklonal |
| 28 | X | monoklonal |
| 30 | X | monoklonal |
| 31 | X | monoklonal |
| 32 | monoklonal | X |

X steht für Probe nicht vorhanden bzw. nicht sequenziert.

Wie der Tabelle 12 zu entnehmen ist, konnte insgesamt bei 22 Patienten in deren Ausgangsproben eine monoklonale Sequenz detektiert werden. In sieben Fällen konnten wir sowohl die cDNA aus der CD138-positiven Selektion als auch die gDNA aus der gesamten KM-Probe für denselben Patienten als Ausgangsprobe in der NGS-Diagnostik sequenzieren. Im Vergleich zeigte sich in zwei Fällen, dass die CD138-selektierte Probe im Gegensatz zur gesamten KM-Probe einen Monoklonalitätsnachweis erbringen konnte. Bei den anderen fünf Patienten zeigte sich in beiden Varianten eine übereinstimmend monoklonale Sequenz.

Für Patient 01, 03, 17, 21, 23 und 32 haben wir nur eine cDNA-Probe als Ausgangsprobe sequenziert, die in allen Fällen einen Monoklonalitätsnachweis erbrachte. Für Patient 09, 15, 18, 19, 20 und 25 sequenzierten wir nur die gDNA aus der gesamten KM-Probe mit Monoklonalitätsnachweis in der Ausgangsprobe.

Bei den restlichen sechs Patienten (Patient 02, 11, 12, 24, 26, 27), die uns im Rahmen unserer Untersuchung zur Verfügung standen, konnten wir in der Ausgangsprobe keine Monoklonalität nachweisen. Diese Proben waren, wenn vorhanden, in der jeweiligen gesamten KM-, CD138-positiven-selektierten Form polyklonal. Für diese Patienten konnten wir dementsprechend keine adäquate MRD-Diagnostik durchführen.

7.2 MRD-Diagnostik der Verlaufsprouben

Nach Sequenzierung von Ausgangsprobe und Verlaufsprouben der Patienten wurden die Verlaufsprouben mittels der LymphoTrack MRD Software v1.2.0 auf eine MRD untersucht. Wie schon im Abschnitt Methodik erwähnt, ist für eine optimale MRD-Detektion eine Mindestmenge von 500 ng DNA/RNA erforderlich. Auch nach Aufkonzentrierung konnten wir diese Menge für viele Verlaufsprouben nicht erreichen. Auch in diesen Fällen führten wir die MRD-Detektion trotz geringer DNA/RNA-Menge durch. Den MRD-Ergebnissen stellen wir in Tabelle 13 gegenüber, welcher Remissionsstatus nach der zweiten SZT erreicht wurde und welches Ergebnis in der MFC-Diagnostik generiert wurde. Zusätzlich sind die Ergebnisse aus der Immunfixation, die in engem zeitlichem Kontakt zu der jeweiligen Verlaufsproube durchgeführt wurde, aufgelistet. Auch das Auftreten eines klinischen Rezidivs im posttransplantationären Verlauf ist dargestellt. Ein klinisches Rezidiv des Myeloms ist dabei von uns definiert als das mehrmalige Auftreten einer monoklonalen Bande in der

Serum-Immundefixation und die Notwendigkeit einer therapeutischen Intervention. Ebenfalls aufgelistet ist, ob die Patienten im weiteren Verlauf bis zu ihrer jeweiligen letzten Datenerhebung verstorben sind. Die Daten sind in Abbildung 10 zusätzlich für die ersten 68 Monate nach der zweiten SZT graphisch veranschaulicht.

Tabelle 13 Ergebnisse aus der MRD-Testung bzw. Immundefixation und Angabe über Rezidiv/Tod und PFS/OS der Patienten.

| Pat ID | Alter | GS | R. | 5 M nach 2 SZT NGS | 12 M nach 2 SZT NGS | 5 M nach 2 SZT MFC | 12 M nach 2 SZT MFC | 5 M nach 2 SZT Imm. | 12 M nach 2 SZT Imm. | Rez. /Pro. | Tod | PFS | OS |
|--------|-------|----|--------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|------------|------|-----|-----|
| 1 | 47 | M | VG PR | X | + | X | X | + | + | Ja | Nein | 137 | 139 |
| 3 | 41 | W | CR | + | + | - | + | - | + | Ja | Ja | 15 | 28 |
| 4 | 48 | M | Nie CR | + | X | - | X | + | X | Ja | Ja | 0 | 3 |
| 5 | 42 | W | CR | X | - | X | + | + | - | Nein | Nein | 117 | 117 |
| 6 | 53 | M | CR | - | - | X | X | - | - | Nein | Ja | 26 | 26 |
| 7 | 50 | M | CR | - | - | - | - | + | - | Nein | Nein | 127 | 135 |
| 8 | 49 | M | PR | - | - | X | + | + | + | Ja | Ja | 12 | 28 |
| 9 | 41 | W | CR | - | - | - | - | - | - | Nein | Nein | 130 | 132 |
| 10 | 43 | M | CR | - | - | - | - | - | - | Nein | Nein | 131 | 131 |
| 14 | 58 | W | CR | - | - | - | - | - | + | Nein | Nein | 2 | 125 |
| 15 | 57 | M | Nie CR | + | + | + | X | + | + | Ja | Ja | 2 | 7 |
| 17 | 55 | W | CR | + | + | X | + | - | - | Ja | Nein | 7 | 69 |
| 18 | 56 | W | CR | + | X | + | X | + | X | Ja | Ja | 0 | 2 |
| 19 | 27 | W | CR | + | + | + | X | + | + | Nein | Nein | 99 | 99 |
| 20 | 56 | W | CR | + | + | + | + | - | + | Ja | Ja | 7 | 34 |
| 21 | 58 | W | CR | + | + | + | - | - | - | Ja | Nein | 36 | 100 |
| 23 | 44 | W | PR | + | + | X | + | + | + | Ja | Ja | 55 | 78 |
| 25 | 43 | W | CR | - | - | + | + | + | - | Nein | Nein | 72 | 93 |
| 28 | 56 | W | CR | - | - | - | + | - | - | Ja | Nein | 7 | 88 |
| 30 | 39 | M | CR | - | - | - | - | + | - | Ja | Nein | 22 | 85 |
| 31 | 48 | M | PR | - | - | - | - | - | - | Nein | Nein | 88 | 91 |
| 32 | 36 | W | CR | + | + | + | + | + | - | ja | ja | 9 | 26 |

Tabellarische Auflistung der Ergebnisse für die Verlaufsprüfung 5 Monate (M) und 12 Monate nach zweiter SZT aus der MRD-Testung (NGS- und MFC-Diagnostik) bzw. Immundefixation (Imm.) für die 22 Patienten (Pat ID) mit Monoklonalität in der Ausgangsprüfung. GS steht für Geschlecht. + steht für positive MRD-Testung, - steht für negative MRD-Testung, X steht für Probe nicht vorhanden. Für den nach zweiter SZT erreichten Remissionsstatus (R.) steht CR für Complete Response, VGPR für Very Good Partial Response und PR für Partial Response. Ebenfalls angegeben ist, ob die Patienten im Krankheitsverlauf ein Rezidiv (Rez.) /Progression (Pro.) erlitten haben

oder verstorben sind. Angegeben ist diesbezüglich auch das PFS bzw. das OS in Monaten nach der ersten MRD Testung.

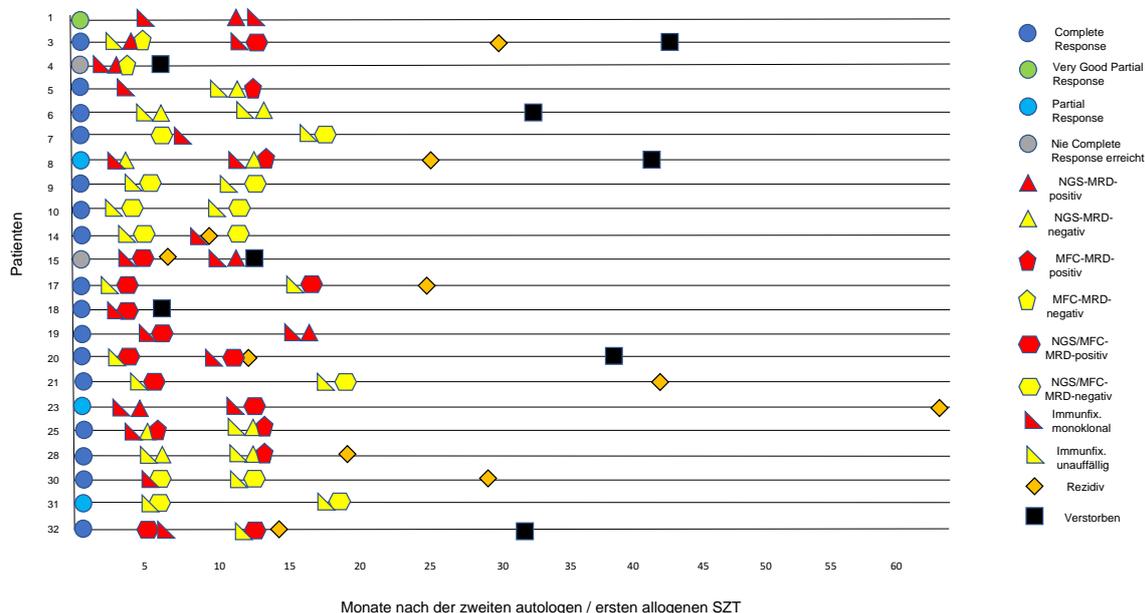


Abbildung 10 Graphische Darstellung der Daten für die MRD-positive oder -negative Testung, monoklonale oder unauffällige Immunfixation, Rezidiv des MM und Tod der Patienten mit monoklonaler Ausgangsprobe bis 68 Monate nach der zweiten SZT.

7.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse für die 22 Patienten mit monoklonaler Ausgangsprobe bezüglich des Outcomes

Tabelle 14 Charakteristika aus der Tabelle 13

| |
|--|
| <p>Alter</p> <p>Median: 48 Jahre</p> <p>Minimum: 27 Jahre</p> <p>Maximum: 58 Jahre</p> |
| <p>Geschlecht:</p> <p>Weiblich: 13 (59,1 %)</p> <p>Männlich: 9 (40,9 %)</p> |
| <p>Zweite Transplantation</p> <p>Autolog: 3 (13,6 %)</p> <p>Allogen: 19 (86,4 %)</p> |
| <p>Remissionsstatus nach Zweiter SZT</p> <p>Keine CR: 6 (27,3 %)</p> <p>CR: 16 (72,7 %)</p> |
| <p>Rezidiv/Progression nach zweiter SZT</p> <p>Nein: 9 (40,9 %)</p> <p>Ja: 13 (59,1 %)</p> |
| <p>Verstorben</p> <p>Nein: 13 (59,1 %)</p> <p>Ja: 9 (40,9 %)</p> |

Verteilung von Alter, Geschlecht, Art der zweiten SZT, Remissionsstatus nach der zweiten SZT, Rezidiv/Progression nach der zweiten SZT und/oder verstorben, für die 22 Patienten mit monoklonaler Ausgangsprobe.

In den folgenden Tabellen (15 und 16) sind jeweils die Ergebnisse aus der NGS- und MFC-MRD-Diagnostik, hinsichtlich des Auftretens eines klinischen Rezidivs im Verlauf nach der zweiten SZT, für die Patienten mit monoklonaler Ausgangsprobe dargestellt. Die Ergebnisse aus den beiden Verlaufsproben wurden zusammengefasst, was bedeutet, dass auch der Nachweis einer MRD in nur einer Probe ausreicht. Für den Vergleich der MRD-Ergebnisse aus der MFC-Diagnostik mit Bezug zum Auftreten eines klinischen Rezidivs konnten wir aufgrund fehlender Daten nur Ergebnisse von 20 Patienten auswerten.

Tabelle 15 Ergebnisse der NGS-MRD-Diagnostik in Bezug zum Auftreten eines Rezidivs/Progression

| MRD: NGS | Rezidiv/Progression | |
|----------|---------------------|------------|
| | Ja | Nein |
| Negativ | 3 (23,1 %) | 8 (88,9 %) |
| Positiv | 10 (76,9 %) | 1 (11,1 %) |

Zehn der dreizehn Patienten mit klinischem Rezidiv hatten eine oder zwei MRD-positive Verlaufsproben. Bei acht der neun Patienten mit einem negativen MRD-Nachweis in den Verlaufsproben trat im Verlauf auch kein klinisches Rezidiv auf. Somit lag die Sensitivität der NGS-MRD-Diagnostik für das Auftreten eines klinischen Rezidivs bei 76,9 % und die Spezifität bei 88,9 %.

Tabelle 16 Ergebnisse der MFC-MRD-Diagnostik in Bezug zum Auftreten eines Rezidivs/Progression

| MRD: MFC | Rezidiv/Progression | |
|----------|---------------------|------------|
| | Ja | Nein |
| Negativ | 2 (16,7 %) | 5 (62,5 %) |
| Positiv | 10 (83,3 %) | 3 (37,5 %) |

Bei zehn von zwölf Patienten mit klinischem Rezidiv konnte unter Nutzung der MFC-Methodik eine MRD nachgewiesen werden. Bei fünf von acht Patienten ohne klinisches Rezidiv war auch das MRD-Ergebnis negativ. Die Sensitivität des MFC-

MRD-Verfahrens für das Auftreten eines klinischen Rezidivs lag somit bei 83,3 % und die Spezifität bei 62,5 %.

In den folgenden Abbildungen sind die Kaplan-Meier-Kurve für das PFS (Abb.11) und OS (Abb.12) für die Patienten mit negativer oder positiver MRD mittels NGS-Diagnostik dargestellt. Als Ausgangszeitpunkt für die Bestimmung wählten wir den Zeitpunkt der ersten MRD-Untersuchung bzw. Knochenmarkentnahme, im Median 5 Monate nach der zweiten SZT. Für Patient 1 und 5 stand uns keine Probe ca. ein halbes Jahr nach zweiter SZT zur Verfügung, sodass wir das Ergebnis aus der Probe ein Jahr nach SZT hierfür verwendeten bzw. voraussetzten.

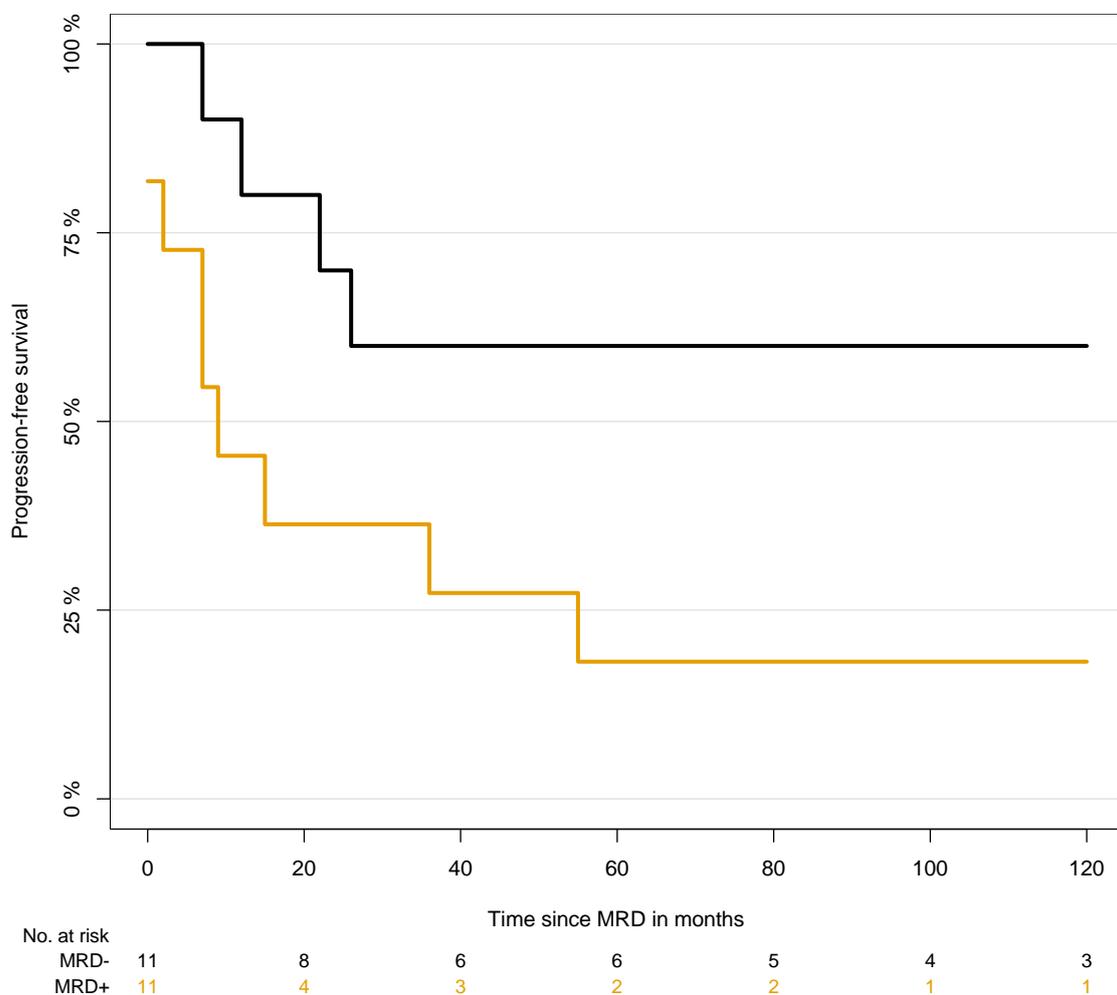


Abbildung 11 PFS-Kaplan-Meier-Kurve

Aus der Kaplan-Meier-Kurve geht hervor, dass das PFS für die über die NGS-Methodik MRD-positiv getesteten Patienten signifikant (P-Wert 0,016) geringer war als für die

MRD-negativ getesteten Patienten. Für die MRD negativen Patienten lag das Zehn-Jahres progressionsfreie/ rezidiv freie Überleben bei 70 %, für die MRD-positiven Patienten nur bei 18,2 %. Auf der X-Achse ist die No. at risk im zeitlichen Verlauf angegeben.

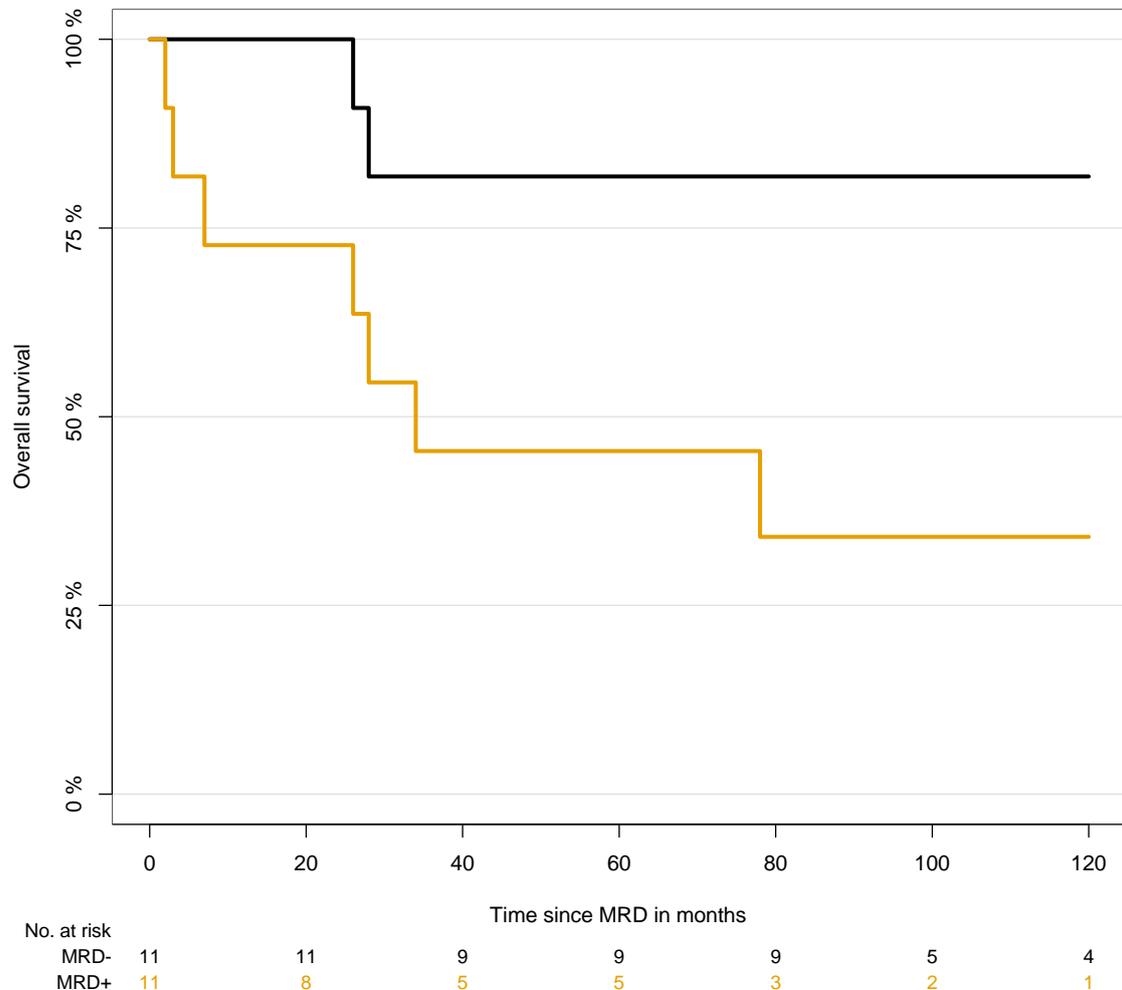


Abbildung 12 OS-Kaplan-Meier-Kurve

In der Kaplan-Meier-Kurve bezüglich der MRD-Testung mittels NGS in Bezug zum OS zeigt sich, dass die MRD-positiven Patienten eine signifikant (P-Wert bei 0,28) höhere Mortalität aufweisen. Für die MRD-negativen Patienten lag das Zehn-Jahres-Überleben bei 81,8 %, für die MRD positiven Patienten nur bei 34,1 %. Auf der X-Achse ist die No. at risk im zeitlichen Verlauf angegeben.

7.4 Statistische Gegenüberstellung der NGS- und MFC-Ergebnisse

Für einen Großteil der Patienten stand uns für die gleiche Probe, die wir mit der NGS-Diagnostik untersuchten, auch das Ergebnis mittels des MFC-Verfahrens zur Verfügung, das an unserer Klinik durchgeführt wurde. Die MFC-Daten wurden wie unter Abschnitt 6.15 beschrieben erhoben. In Tabelle 17 sind die MRD-Ergebnisse aus MFC- und NGS-Verfahren gegenübergestellt.

Tabelle 17 NGS- und MFC-Ergebnisse

| MRD: NGS | MRD: MFC | |
|----------|-------------|-------------|
| | Negativ | Positiv |
| Negativ | 13 (40,6 %) | 5 (15,6 %) |
| Positiv | 3 (9,4 %) | 11 (34,3 %) |

Für 32 Proben standen uns die MRD-Ergebnisse, welche über die MFC-Diagnostik ermittelt wurden, zur Verfügung, um diese mit unseren Ergebnissen mittels NGS-Diagnostik zu vergleichen. Von diesen 32 Proben waren 24 übereinstimmend in ihrem MRD-Ergebnis, was einem Anteil von 75 % entspricht. 13 Proben zeigten hierbei einen übereinstimmend negativen MRD-Nachweis und elf einen übereinstimmend positiven. Im Fall der acht, entsprechend 25 %, nicht übereinstimmenden MRD-Ergebnisse waren fünf Proben im MFC-Verfahren MRD-positiv und im NGS-Verfahren negativ und drei im NGS-Verfahren positiv und im MFC-Verfahren negativ.

7.5 Vergleich der NGS-MRD-Diagnostik für gesamtes KM und CD138-positiv selektierte Probenform

Da wir in der Untersuchung der Verlaufsproben neben dem gesamten KM für einige Patienten auch die CD138-positiv selektierte Fraktion verwendeten, gibt Tabelle 18 Aufschluss darüber, inwieweit die NGS-MRD-Ergebnisse miteinander übereinstimmten.

Tabelle 18 Gegenüberstellung der NGS-MRD-Ergebnisse für die gesamte KM- und CD138-positiv selektierten Proben

| Gesamtes KM | CD138-positiv selektierte Fraktion | |
|-------------|------------------------------------|------------|
| | Negativ | Positiv |
| Negativ | 10 (76,9 %) | 3 (23,1 %) |
| Positiv | 1 (12,5 %) | 7 (87,5 %) |

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass wir für 21 Verlaufsproben jeweils eine gesamte KM und eine CD138-positive Probe sequenziert haben. Von diesen 21 Verlaufsproben zeigten 17, entsprechend 81%, ein übereinstimmendes Ergebnis in der MRD-Testung. Sieben waren übereinstimmend MRD-positiv und zehn übereinstimmend MRD-negativ. Von den übrigen vier Proben (19 %) waren drei in der CD138-positiven Probe MRD-positiv und in der gesamten KM-Probe dagegen MRD-negativ. Nur in einer Verlaufsprobe zeigte die gesamte KM-Probe ein positives MRD-Testergebnis im Vergleich zu einem negativen MRD-Test in der CD138-positiven Probe.

7.6 Patienten mit polyklonalen Sequenzen in der Ausgangsprobe

Für die sechs Patienten, bei denen wir in der Ausgangsprobe keine Monoklonalität nachweisen konnten, haben wir dennoch die Verlaufsproben sequenziert. Bei diesen Proben wollten wir überprüfen, ob wir in den Verlaufsproben monoklonale Sequenzen detektieren, die wir dann rückwirkend mit der Ausgangsprobe bzw. den anderen Proben des jeweiligen Patienten vergleichen konnten. Hierbei konnten wir für Patient 11 und 27 in jeweils einer Verlaufsprobe eine monoklonale Sequenz detektieren, die mittels der MRD-Software auch in der Ausgangsprobe identifiziert wurde. Beide Verlaufsproben wurden im näheren zeitlichen Zusammenhang bei Rezidiv des Myeloms entnommen. Für Patient 02 und 26 konnten monoklonale Sequenzen in den Verlaufsproben bestätigt werden, welche aber in den für diese Patienten zur Verfügung stehenden Ausgangsproben nicht nachgewiesen werden konnten. Für Patient 12 und 24 waren die Ausgangsproben sowie alle sequenzierten Verlaufsproben polyklonal, sodass hier keine adäquate MRD-Untersuchung durchgeführt werden konnte.

7.7 Ergebnis der NGS-Diagnostik für die Ausgangsprobe der Zelllinie

Nach der Sequenzierung der unverdünnten U266-DNA-Probe und der U266-cDNA-Probe konnte jeweils dieselbe Sequenz in der VH1-J6 Region mit monoklonalem

Muster (in Abb.11 für die DNA und in Abb.12 für die cDNA dargestellt) detektiert werden, die wir anschließend für die MRD-Testung in der Verdünnungsreihe verwendeten.

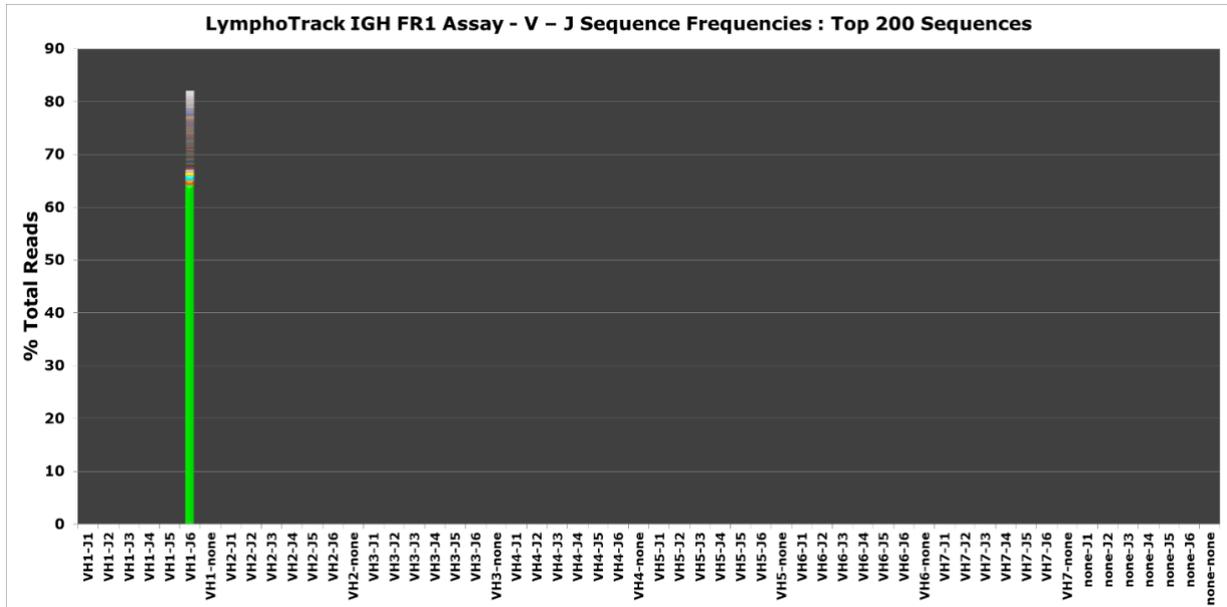


Abbildung 13 Graphische Darstellung der VJ-Sequence Frequency der unverdünnten U266-DNA-Probe mit monoklonalem Muster.

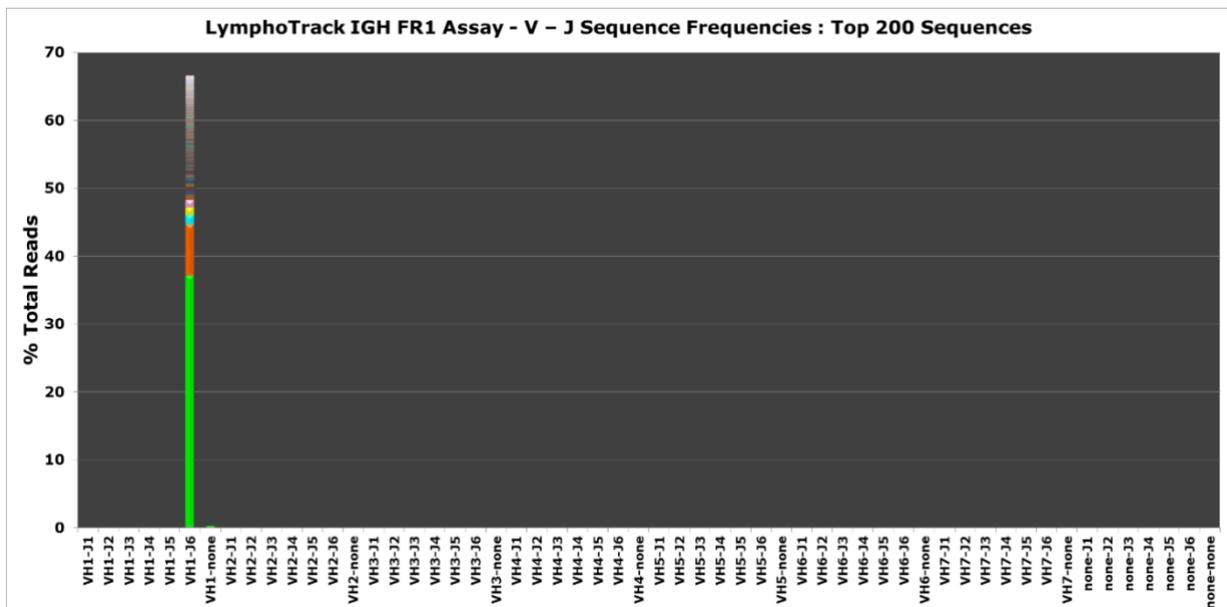


Abbildung 14 Graphische Darstellung der VJ Sequence Frequency der unverdünnten U266-cDNA-Probe mit monoklonalem Muster.

7.8 MRD-Testung der U266-DNA und cDNA-Verdünnungsreihe

Tabelle 19 Ergebnisse der MRD-Testung in der DNA-Verdünnungsreihe

| Prozentualer Anteil der Myelomzell-DNA in der Probe | Exact Match | Ein Mismatch | Zwei Mismatches |
|---|-------------|--------------|-----------------|
| 10 % | 116155 | 45927 | 12937 |
| 1 % | 37231 | 14805 | 4074 |
| 0,1 % | 4286 | 1825 | 470 |
| 0,01 % | 534 | 247 | 69 |
| 0,001 % | 33 | 15 | 4 |
| 0,0001 % | 27 | 22 | 8 |
| 0,00001 % | 26 | 16 | 8 |

Tabellarische Auflistung der Ergebnisse der MRD-Testung in der DNA-Verdünnungsreihe. Angegeben ist die Anzahl der Exact Matches, sowie die der ein und zwei Mismatches.

Tabelle 20 Ergebnisse der MRD-Testung in der cDNA-Verdünnungsreihe

| Prozentualer Anteil der Myelomzell-cDNA in der Probe | Exact Match | Ein Mismatch | Zwei Mismatches |
|--|-------------|--------------|-----------------|
| 10 % | 185729 | 97378 | 30436 |
| 1 % | 3700 | 1917 | 612 |
| 0,1 % | 22800 | 10864 | 3270 |
| 0,01 % | 3679 | 1653 | 528 |
| 0,001 % | 275 | 141 | 40 |
| 0,0001 % | 1 | 0 | 0 |
| 0,00001 % | 3 | 1 | 0 |

Tabellarische Auflistung der Ergebnisse der MRD-Testung in der cDNA-Verdünnungsreihe. Angegeben ist die Anzahl der Exact Matches sowie die der ein und zwei Mismatches.

Der Tabellen 19 und 20 ist zu entnehmen, dass wir in jeder Verdünnungsstufe sowohl für die DNA- als auch für die cDNA-Proben, eine MRD nachweisen konnten. Der Nachweis einer MRD in der Verdünnungsstufe, die einen Anteil von 0,0001 % Myelomzell-DNA/cDNA enthält, bedeutet, dass eine Myelomzelle unter 1.000.000 Zellen detektiert werden konnte, entsprechend einer Sensitivität von 10^{-6} . Die darauffolgende Stufe mit 0,00001 % Anteil Myelomzell-DNA/cDNA bedeutet, dass eine Myelomzelle unter 10.000.000 Zellen detektiert wurde was einer Sensitivität von 10^{-7} entspricht.

8. Diskussion

Die MRD-Untersuchung spielt eine zunehmend wichtige Bedeutung in der Remissionsbeurteilung beim MM. Dies liegt unter anderem an den immer effektiver werdenden Therapieoptionen, zu denen neue medikamentöse Strategien, aber auch optimierte SZTs gehören. Nach Einsatz solcher Therapien ist die Bestimmung der CR allein nicht mehr aussagekräftig genug, da ein Großteil der Patienten mit CR dennoch vereinzelt Myelomzellen im Körper hat, die zu einem Rezidiv der Erkrankung führen können. Somit hat die CR in der Remissionsbeurteilung keine ausreichende Sensitivität mehr (Paiva et al., 2015).

8.1 Bedeutung der MRD für die Prognose beim MM

Dass ein hoher Remissionsstatus nach Therapie und die Überlebenszeiten der Patienten miteinander korrelieren, ist nahezu bei jeder hämatologischen Erkrankung zu beobachten. So hat der Status einer CR im Vergleich zu einem geringeren Status eine längere Überlebenswahrscheinlichkeit (Paiva et al., 2015).

Welche Bedeutung hat nun die MRD für das Myelom bzw. welche Aussage kann sie treffen? Dieser Fragestellung wurde schon in einigen Studien nachgegangen.

Bereits Martinelli et al. untersuchten 2000 den prognostischen Unterschied zwischen der kompletten klinischen Remission und der molekularen klinischen Remission beim Myelom. Hierbei konnten sie zeigen, dass Patienten mit molekularer klinischer Remission eine signifikant geringere Rezidiv-Rate und auch ein längeres rezidiv-freies Überleben erlangten (Martinelli et al., 2000).

Die Studie von Paiva et al. untersuchte den prognostischen Einfluss bei der MRD-Bestimmung mittels MFC nach autologer SZT für das MM. Auch hier zeigte sich bei den MRD-negativen Patienten ein deutlich längeres PFS und OS (Paiva et al., 2008).

In unserer Untersuchung konnten wir ebenfalls Rückschlüsse für die Prognose-Bedeutung der NGS-MRD-Ergebnisse ziehen. So zeigten wir, dass eine positive MRD-Testung sowohl über die NGS- als auch über das MFC-Verfahren mit einer hohen Wahrscheinlichkeit einhergeht, ein klinisches Rezidiv im Krankheitsverlauf zu entwickeln (NGS: Sensitivität 76,9 %, Spezifität: 88,9 %, MFC: Sensitivität: 83,3 %, Spezifität: 62,5 %). Im Zehn-Jahres-Follow-Up des progressionsfreien bzw. rezidiv-

freien Überlebens zeigte sich ein deutlicher Vorteil für die MRD-negativ getesteten Patienten (70 % vs. 18,2 %). Auch im OS waren die MRD-negativ Patienten signifikant überlegen (Zehn-Jahres-Follow-Up: 81,8 % vs. 34,1 %). Wichtig ist anzumerken, dass die Aussage bzw. die Validität aufgrund der kleinen Patienten-Kohorte (22 Patienten) eingeschränkt ist.

Dennoch werden unsere Ergebnisse auch durch die Studie von Martines-Lopez et al. unterstützt. Sie untersuchten auf ähnliche Weise die MM-Patienten-Proben im Hinblick auf eine MRD mit der Erkenntnis, dass eine negative MRD-Bestimmung mit einem längerem rezidiv-freien Überleben einhergeht. Untersucht wurden hier unter anderem 62 Patienten mit CR-Status. 36 Patienten waren davon MRD-positiv in der Sequenzierung. Das PFS lag für die MRD-negativen Patienten im Median bei 131 Monaten und für die MRD-positiven Patienten bei 35 Monaten, der P-Wert wurde mit 0,0009 angegeben (Martinez-Lopez et al., 2014).

8.2 MRD als neues Remissionskriterium

Aufgrund unserer deutlichen Ergebnisse (immer in Rücksichtnahme der geringen Patientenzahl), die zeigen, dass die MRD eine hohe prognostische Aussagekraft für den Verlauf der Myelom-Erkrankung hat, stellt sich die Frage, ob die MRD-Diagnostik zum Standard in der Remissionsbeurteilung und somit zu einem neuen Remissionskriterium werden sollte. Von den 16 Patienten mit CR entwickelten acht ein Myelom-Rezidiv. Sechs von ihnen hatten in der NGS- und sieben in der MFC-Methodik in einer oder beiden Verlaufsproben eine positive MRD. So finden wir, wie auch Paiva et al., dass die bis dato gängigen Remissionskriterien nicht mehr ausreichend sind (Paiva et al., 2015). Auch Munshi et al. kommen in ihrer Meta-Analyse zu dem Schluss, dass die MRD-Bestimmung eine entscheidende Bedeutung für die Prognose der Patienten besitzt und auch gegenüber dem CR-Remissionstaus überlegen ist (Munshi et al., 2017). In Zusammenschau dieser und unserer Ergebnisse wird deutlich, dass der MRD-Diagnostik in Zukunft eine wesentliche Bedeutung in der Remissionsbeurteilung beim MM zukommen muss und wird.

8.3 Vergleich NGS- und MFC-MRD Ergebnisse

Im Vergleich NGS-MRD und MFC-MRD lag die Übereinstimmung bei 75 %. Bei den acht (25 %) nicht übereinstimmenden Proben waren fünf nur im MFC-Verfahren MRD-

positiv und drei nur im NGS-Verfahren. Somit konnten wir keine deutliche Überlegenheit eines der beiden Verfahren feststellen. Für eine höhere Validität dieser Aussage müsste man aber noch deutlich mehr Proben miteinander vergleichen.

Martinez-Lopez et al. verglichen in ihrer Studie ebenfalls MRD-Ergebnisse, die mittels NGS- und MFC- (Four-Colour-Flow) Verfahrens bei Myelom-Patienten gewonnen wurden. Hierbei konnten sie für 99 Patienten jeweils MRD-Daten über das NGS- und MFC-Verfahren generieren. 60 der untersuchten Patienten hatten in beiden Verfahren ein positives MRD-Ergebnis und 22 ein negatives. Somit zeigten beide Verfahren für 83 % der Patienten ein gleiches Ergebnis. Bei den restlichen 17 Patienten waren zwölf Patienten MRD-positiv in der NGS-Methodik, aber nicht in der MFC-Untersuchung und für die übrigen fünf Patienten zeigte sich das umgekehrte Bild (Martinez-Lopez et al., 2014).

Hinsichtlich der Sensitivität im Hinblick auf das Auftreten eines klinischen Rezidivs des Myeloms zeigte sich in unserer Untersuchung kein großer Unterschied zwischen beiden Verfahren (NGS: 76,9 %, MFC: 83,3 %). Ein deutlicher Unterschied zeigte sich jedoch in der Spezifität, die für die NGS-Diagnostik bei 88,9 % und für die MFC-Diagnostik nur bei 62,5 % lag. Auch hier ist insbesondere die kleine Patientenkohorte einschränkend für eine valide Aussage. So gab es insgesamt nur bei vier Patienten Unterschiede in der Gesamtbetrachtung bezüglich der MRD-Ergebnisse aus MFC- und NGS-Diagnostik und dem Auftreten eines klinischen Rezidivs. Patient 19, für welchen sowohl in der NGS- und MFC-Diagnostik positive MRD-Ergebnisse detektiert wurden, sich aber kein klinisches Rezidiv seiner Erkrankung im Verlauf zeigte, ist in diesem Zusammenhang auch kritisch zu betrachten. So wurde im kurzen Zeitabstand nach Entnahme der Verlaufsproben eine erneute allogene SZT aufgrund einer anderen klinischen Komplikation durchgeführt. Entsprechend lässt sich im Nachhinein nicht rückschließen, ob es ohne die zweite allogene SZT nicht doch zu einem Rezidiv der Erkrankung gekommen wäre.

Eine weitere Auffälligkeit zwischen den NGS- und MFC-Ergebnissen zeigte sich im Vergleich beider Verlaufsproben. So waren in der NGS-Diagnostik beide Verlaufsproben in allen Fällen gleich in ihrem MRD-Ergebnis, ob positiv oder negativ. Dem gegenüber waren die MFC-Ergebnisse für beide Verlaufsproben nicht immer konkordant. So waren bei den Patienten 3 und 28 die erste Verlaufsprobe negativ und

erst die zweite positiv und für Patient 21 konnte das umgekehrte Ergebnis beobachtet werden.

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigt sich in unserer Untersuchung eine leichte Überlegenheit in der MRD-Diagnostik über das NGS-Verfahren. Diese ist aber insbesondere durch das kleine Patientenkollektiv kritisch zu betrachten.

8.4 Voraussetzungen für die MRD-Diagnostik mittels NGS

Grundvoraussetzung für die Durchführung der MRD-Diagnostik mittels NGS-Verfahren ist die Detektion einer DNA-Sequenz mit einem IGH-Rearrangement, die von der Myelomzelle stammt und wie ein unverwechselbares Erkennungsmerkmal für diese fungiert. Diese DNA-Sequenz präsentiert sich bei einer KM-Probe mit hoher Myelomzellzahl durch eine deutliche Monoklonalität und wird so für uns als Untersucher erkennbar. Die Detektion der Ausgangssequenz stellte sich in unserer Untersuchung in einigen Fällen als große Herausforderung dar. Die Patienten aus der Auto-/Allo-Studie erhielten vor der SZT häufig therapeutische Interventionen. Problematisch hieran war, dass das Probenmaterial, das wir für die Ausgangsprobe zur Verfügung hatten, häufig in einem engen zeitlichen Zusammenhang zu solchen Interventionen entnommen wurde. In solchen Fällen ist die Zahl der Myelomzellen und somit auch die der entsprechenden DNA-Menge drastisch reduziert. Nach Sequenzierung der aus der Probe isolierten DNA zeigte sich so häufig ein polyklonales Muster, was es unmöglich machte, die spezifische Myelom-DNA zu bestimmen. Dies war in unserer Untersuchung bei sechs unserer Patienten der Fall. Dass in den Ausgangsproben in einem solchen Fall dennoch die Tumor-DNA vorhanden sein kann, konnten wir zeigen, indem wir bei den Patienten 11 und 27 eine monoklonale Sequenz in den Verlaufspalten fanden, die sich rückwirkend auch in deren jeweiligen polyklonalen Ausgangsproben präsentierte. Diese Beobachtung zeigt, dass es notwendig ist, eine Ausgangsprobe für die Untersuchung zu verwenden, die von einer hohen Tumorlast geprägt ist. So ist eine KM-Entnahme in zeitlicher Nähe zur Erstdiagnose sinnvoll für eine spätere adäquate MRD-Diagnostik mittels NGS-Verfahren.

Neben der Tumorlast in der Probe an sich spielt vor allem auch die Menge an isolierter DNA aus der Patientenprobe eine entscheidende Rolle für die Frage, ob eine monoklonale Sequenz mit hohem Sensitivitätsniveau detektiert werden kann. So war

nach unserem Protokoll eine Mindestmenge von 500 ng DNA bzw. RNA für eine hinreichend sensitive MRD-Diagnostik notwendig, die wir aber auch nach Aufkonzentrierung nicht für alle Ausgangs-Patientenproben erreichen konnten. Die DNA-Menge ist daneben auch bei den Verlaufsproben von entscheidender Bedeutung, um mit ausreichender Sensitivität die MRD-Testung durchführen zu können. So sollte bei der Probenentnahme darauf geachtet werden, eine möglichst zellreiche Probe zu gewinnen.

Für einen möglichst sicheren Nachweis der Monoklonalität besagt das Protokoll des von uns verwendeten LymphoTrack DX IGH (FR1/FR2/FR3) Assays-S5/PGM, dass möglichst alle drei FR-Regionen sequenziert werden sollten, da es zu somatischen Hypermutationen an den Primer-Bindungsstellen kommen kann, die eine DNA-Amplifizierung verhindern können (Technologies, 2018). Mit jedem verwendeten FR-Primer steigen aber auch der finanzielle sowie der Arbeitsaufwand deutlich an, was die routinemäßige Anwendung zusätzlich erschwert.

8.5 Vergleich gesamtes KM oder CD138-positiv selektierte Probe

In unserer Untersuchung sind wir weiter auch der Frage nachgegangen, inwiefern die CD138-positive Selektion und anschließende DNA-Isolierung als Material einen Vorteil gegenüber der Verwendung der gesamten KM-Proben-DNA für die NGS-Diagnostik bietet. Puig et al. sind dieser Fragestellung ebenfalls nachgegangen (Puig et al., 2013). Sie untersuchten 25 Patienten, für die sie jeweils eine CD138-positiv selektierte KM-Probe und eine nicht selektierte Probe im Hinblick auf die Detektion der monoklonalen Ausgangssequenz mittels PCR und Sequenzierung verglichen. In den CD138-positiv selektierten Proben konnte nach der Sequenzierung für 24 (96 %) Patienten eine Zielsequenz für die MRD-Untersuchung detektiert werden, in den nicht selektierten Proben hingegen nur bei 15 Proben (60 %). Damit kamen Puig et al. zu dem Schluss, dass die CD138-positive Selektierung die Anwendbarkeit der MRD-Untersuchung über Sequenzierung mittels PCR erhöht. In unserer Untersuchung haben wir bei einem Großteil der CD138-positiv selektierten KM-Proben die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Im Vergleich der gDNA aus der gesamten KM-Probe und der gDNA bzw. cDNA aus der CD138-positiv selektierten Proben konnten wir zehn Ausgangsproben vergleichen. Bei acht von diesen konnten wir sowohl in der gesamten KM-Probe als auch in der CD138-positiv selektierten Probe eine monoklonale Sequenz

detektieren. Für zwei Proben konnten wir hingegen nur eine monoklonale Sequenz in der cDNA-Variante aus der CD138-positiven Probe belegen. Somit zeigte sich ein leichter Vorteil für die CD138-positiv Selektion in Hinblick auf die Detektionsfähigkeit der monoklonalen Ausgangssequenz.

Von den Verlaufsproben konnten wir 21 Proben hinsichtlich der MRD-Detektion in der gesamten KM und CD138-positiv selektierten Variante vergleichen. Hierbei stimmten 17 (81 %) Verlaufsproben in beiden Varianten überein bezüglich der MRD-Detektion. Bei drei Proben konnten wir aber eine MRD nur in der CD138-positiv selektierten Probe nachweisen und in einem Fall nur in einer gesamten KM-Probe. Auch für die Detektion der MRD in den Verlaufsproben konnten wir somit einen leichten Vorteil für die CD138-positiv selektierte Probe feststellen. Für eine aussagekräftigere Beurteilung müsste man aber noch wesentlich mehr Proben miteinander vergleichen. Wichtig zu erwähnen ist zudem, dass durch die CD138-Selektion und/oder die Verwendung von cDNA der materielle, finanzielle und zeitliche Aufwand ansteigt. Hieraus ergibt sich die Frage, ob dieser Mehraufwand in einem sinnvollen Verhältnis bezüglich der leicht erhöhten MRD-Detektionswahrscheinlichkeit steht. In unserer Arbeit konnten wir somit keinen signifikanten Vorteil für die CD138-positiv Selektion feststellen, die insbesondere den Mehraufwand rechtfertigen würde. Auch diese Aussage ist aber aufgrund der geringen Probenmenge kritisch zu bewerten.

8.6 Sensitivität der NGS-MRD-Messung

Das NGS-Verfahren stellt den neusten Ansatz für die MRD-Bestimmung dar und hat den Anspruch, eine sehr hohe Sensitivität in der Bestimmung der MRD zu erzielen. Yao et al. konnten in ihrer Studie, (in der sie ebenfalls das LymphoTrack Dx IGH (FR1/FR2/FR3) Kit von Invivoscribe Technologies verwendeten) für das NGS-Verfahren (Sequenzierung mittels MiSeq Instrument von Illumina) eine Sensitivität von 10^{-5} in der MRD-Detektion erreichen (Yao et al., 2019). Diese bemerkenswert hohe Sensitivität der NGS-Diagnostik von 10^{-5} bis zu 10^{-6} wird durch die meisten Studien für die MRD-Diagnostik beim MM bestätigt (Kumar et al., 2016). Auch wir können die hohe Sensitivität der NGS-Diagnostik bestätigen, indem wir die MRD-Diagnostik mittels des NGS-Verfahrens an einer MM-Zelllinie durchführten. Uns gelang die Detektion der MRD in der Probe mit 0,00001 % Myelomzellen, was einer Sensitivität von 10^{-7} entsprechen würde. Man muss hier jedoch beachten, dass die Bestimmung der

Myelom-DNA/cDNA in dieser starken Verdünnung auch auf dem Zufallsprinzip beruht und somit nicht unbedingt reproduzierbar wäre. Effektiv und mit hoher Reproduzierbarkeit liegt die Sensitivität somit bei 10^{-5} bis 10^{-6} .

8.7 Vergleich von Kosten-, Zeit-, Material- und Arbeits-Aufwand für das NGS- und das MFC-Verfahren

Derzeit werden MRD-Untersuchungen häufig nur an größeren Kliniken im Rahmen von Studien durchgeführt. Entsprechend wird nur ein ausgewähltes Patientenkollektiv auf eine MRD hin untersucht. Grund hierfür ist vor allem, dass die MRD-Diagnostik technisch hoch aufwendig ist und eine ausreichende Expertise in der MRD-Diagnostik voraussetzt. Insbesondere das NGS-Verfahren ist neben dem technischen Aufwand auch mit einem hohen Zeitaufwand verbunden. Für die Herstellung einer Library, der Template Präparation, der Sequenzierung und anschließenden Daten-Analyse benötigen wir in unserer Untersuchung mindestens drei Tage, wobei die Tatsache, dass ein Großteil dieser Arbeitsschritte in unserer Untersuchung manuell ausgeführt werden musste, erschwerend hinzukommt. Es gibt aber schon neuere Systeme wie das Ion Chef und das Ion GeneStudio S5 System, beide von Thermo Fisher Scientific, die manuelle Schritte, wie die Template Präparation, automatisieren und so eine deutliche Einsparung der Arbeitszeit erzielen.

Das MFC-Verfahren besticht im Vergleich zum NGS-Verfahren durch deutlich weniger arbeitsaufwendige und zeitlich kürzere Arbeitsschritte. Dadurch lässt sich die Aufbereitung einer Patientenprobe und die anschließende MFC-Untersuchung problemlos an einem Arbeitstag durchführen.

Eine weitere Herausforderung in der NGS-Diagnostik ist der hohe finanzielle Aufwand. Da das NGS-Verfahren noch relativ neu ist, gibt es bisher wenige Anbieter der Materialien, wodurch diese vergleichsweise teuer sind und die MRD-Untersuchung insgesamt somit im Vergleich zum MFC-Verfahren deutlich kostenintensiver ist. So hat die Sequenzierung einer Probe mithilfe des NGS-Verfahrens und die anschließende MRD-Untersuchung in unserem Labor ca. 350 Euro gekostet. Dieser Preis kann nur erreicht werden, wenn man mindestens zehn Proben gleichzeitig sequenziert. Im Vergleich dazu kostete die Aufbereitung und MRD-Untersuchung über das MFC-Verfahren in unserem Labor nur ca. 100-150 Euro pro Probe. Zudem müssen hier nicht mehrere Proben gleichzeitig untersucht werden, um Kosten zu reduzieren.

8.8 Limitation

Sowohl für das NGS- als auch das MFC-Verfahren verwenden wir für die MRD-Diagnostik KM-Proben. Dies setzt aber zwingend voraus, dass sich das Myelom auch nur auf das KM begrenzt. So besteht die Gefahr, dass zwar eine negative MRD vorliegt, aber ein Rezidiv des Myeloms außerhalb des KM nicht erfasst wird. Somit ist für ein adäquates Screening eine zusätzliche Diagnostik notwendig, die ein solitäres Myelom oder einen Weichteilbefall ausschließen kann. Das PET/CT kann diese Lücke schließen und erreicht dabei eine Sensitivität von ca. 80-100% (Matteucci et al., 2020).

Eine weitere Limitation der MRD Diagnostik mittels MFC und NGS Verfahren ist die Probengewinnung. Zum einen ist die Knochenmarkpunktion für den Patienten eine invasive und schmerzhafteste Prozedur, zum anderen verläuft die Aspiration häufig frustriert bzw. die Probe enthält nicht genug KM-Zellen für eine adäquate Untersuchung. Dies schränkt die routinemäßige Durchführung der MRD Diagnostik im klinischen Alltag häufig ein, was sich auch in unserer Untersuchung gezeigt hat.

8.9 Ausblick

Neben den DNA-basierten Verfahren hat sich auch die MFC-Methodik bedeutsam weiterentwickelt. So hat die EuroFlow (EuroFlow, 2021) ein standardisiertes Protokoll für die MM-MRD-Detektion unter Verwendung des NGF-Verfahrens eingeführt. Das NGF-Verfahren arbeitet mit einem Eight-Colour-Panel und erreicht eine Sensitivität von 10^{-6} und ist damit dem NGS-Verfahren ebenbürtig geworden (Flores-Montero et al., 2017, Paiva et al., 2020). In der Zukunft wird es nun von Interesse sein, dieses optimierte MFC-Verfahren mit dem NGS-Verfahren zu vergleichen.

In der MRD-Diagnostik wird nicht nur die reine Bestimmung, ob sich in der Verlaufsprobe eine MRD nachweisen lässt, so wie wir es in unserer Untersuchung durchführten, eine Rolle spielen, sondern vor allem in welcher Konzentrationshöhe dies der Fall ist. So zeigten auch schon Martinez-Lopez et al., dass die Höhe der gemessenen MRD-Konzentration mit dem PFS und OS korreliert (Martinez-Lopez et al., 2014).

Eine weitere Innovation in der Detektion der MRD beim Myelom könnte die Verwendung von Zell-freier DNA (cfDNA) sein. Diese cfDNA kann aus dem peripheren

Blut isoliert werden, wodurch die invasive KM-Entnahme und seine beschriebenen Probleme entfallen würden. Derzeit bestehen noch deutliche Hürden, wie z.B. der nur geringe Ertrag an cfDNA als auch insbesondere der frei zirkulierenden Tumor DNA (ctDNA) aus dem peripheren Blut. In Zukunft wird dieser Bereich aber noch von großem Interesse sein (Thakral et al., 2020, Lampignano et al., 2020).

Eine weitere Diagnostik für die MRD Bestimmung beim Myelom könnte zukünftig auch das Verfahren der Massenspektrometrie sein. Insbesondere die MALDI-TOF Massenspektrometrie Methodik erzielt vielversprechende Ergebnisse. So kann dieses Verfahren derzeit schon als Ersatz für die IFE verwendet werden (Murray et al., 2021). Ob die Massenspektrometrie auch für die MRD-Diagnostik eingesetzt werden kann, muss noch in ausgedehnteren Studien untersucht werden. So verglichen aber z.B. schon Eveillard et al. das Serum basierte MALDI-TOF Massenspektrometrie Verfahren mit der MFC (Ten-Colour-Flow)-Methodik für die MRD Diagnostik beim MM und kamen zu dem Schluss, dass dieses Verfahren hohes Potential bietet und eine wichtige Ergänzung zu den KM basierten MRD-Verfahren ist (Eveillard et al., 2020).

10. Schlussfolgerung

In unserer Untersuchung, deren Aussage aber aufgrund des kleinen Patientenkollektivs eingeschränkt ist, sowie im Vergleich mit anderen Studien, wird deutlich, dass die MRD-Erfassung die Möglichkeit gibt, die Erfolgschancen und Prognose nach erfolgter Therapie so früh wie möglich abzuschätzen und gegebenenfalls die entscheidenden Maßnahmen einzuleiten. Für die NGS-Diagnostik zeigte sich insbesondere die Erfassung der Myelom-Ausgangssequenz sowie eine hinreichend große DNA-Menge in den aufbereiteten Knochenmarkproben als Schwierigkeit. Beides ist notwendig, um eine adäquate und hochsensitive MRD-Bestimmung durchzuführen. Im Vergleich zwischen dem NGS- und MFC-Verfahren konnten wir hinsichtlich der MRD-Bestimmung keine deutliche Überlegenheit feststellen. Das MFC-Verfahren zeigt sich aber als deutlich kostensparender bei einem verhältnismäßig geringeren zeitlichen Aufwand, was einen deutlichen Vorteil für die Routine-Diagnostik bietet. Hinzu kommt, dass das Four-Colour-Panel, worüber unsere MFC-Daten generiert wurden, veraltet ist. Neuere Verfahren, wie die NGF, ermöglichen eine schon deutlich höhere Sensitivität in der MRD-Bestimmung. In den nächsten Jahren wird sich aber auch das NGS-Verfahren weiterentwickeln. So gibt es

derzeit schon System-Innovationen, die den Arbeitsablauf wesentlich kürzer gestalten, weil sie beispielsweise manuelle Schritte automatisieren.

Eine negative MRD-Testung nach SZT beim Myelom wird in Zukunft das anzustrebende Ziel sein, da sie mit einer deutlich besseren Prognose vergesellschaftet ist. Umgekehrt kann eine positive MRD-Testung dazu beitragen, dass möglichst früh therapeutisch interveniert werden kann und sich so auch die Prognose dieser Erkrankung weiter verbessert. Abschließend lässt sich sagen, dass die MRD-Bestimmung zum Standard in der Nachsorge-Diagnostik bzw. zur Remissionsbeurteilung, insbesondere nach SZT-Therapie, beim MM werden sollte.

11. Zusammenfassung

Das Multiple Myelom gehört zu den häufigsten hämatologischen Neoplasien, für die eine relative Fünf-Jahres-Überlebensrate von 50% angegeben wird. Zu den wichtigsten therapeutischen Interventionen zählt die Gabe verschiedener chemotherapeutischer Medikamente in Kombination mit einer autologen und/oder allogenen Stammzelltransplantation (SZT). Für die Bewertung des therapeutischen Erfolgs nach einer solchen Therapie stehen mehrere Remissionskriterien zur Verfügung. Durch den zunehmenden Erfolg der therapeutischen Intervention steigt der Anspruch an eine möglichst tiefe Remissionsbeurteilung. In diesem Zusammenhang hat sich die Bestimmung der Minimal Residual Disease (MRD) als mögliches Remissionskriterium hervorgetan. Für dessen Bestimmung wurden in den letzten vergangenen Jahren verschiedenste Techniken entwickelt, wobei das Multiparameter Flow Cytometry (MFC)- und das Next Generation Sequencing (NGS)-Verfahren sich am stärksten durchgesetzt haben. Beide Verfahren bestechen durch eine sehr hohe Sensitivität in der Bestimmung der MRD. In unserer Untersuchung bewerteten wir das Verfahren der NGS-Diagnostik mittels des Lymphotrack Kits von Invivoscribe Technologies und der Sequenzierung über das Ion Torrent System von Thermo Fisher Scientific anhand von Patienten, die eine Tandem Transplantation in Form von zwei autologen oder einer autologen und einer allogenen SZT erhalten haben. Hierbei zeigte sich, dass wir nur bei 22 der 28 untersuchten Patienten eine monoklonale Ausgangssequenz für die spätere MRD-Diagnostik der Verlaufspuren feststellen konnten. Wir kamen zu dem Schluss, dass für die Ausgangsprobe eine Probe mit hoher Tumorlast gewählt bzw. entnommen werden sollte. Die hohe Sensitivität der

NGS-Methodik konnten wir anhand einer MRD-Diagnostik an einer Myelom-Zelllinie in einer Verdünnungsreihe bestätigen. Weiterhin konnten wir die NGS-MRD-Ergebnisse anschließend teilweise auch mit denen vergleichen, die über die MFC-Methodik erfasst wurden. 75% der Ergebnisse waren im Hinblick auf die MRD-Diagnostik übereinstimmend, wobei sich in den unterschiedlichen Ergebnissen keine deutliche Überlegenheit für eines der beiden Verfahren zeigte. Derzeit ist das MFC-Verfahren anwenderfreundlicher und kosteneffizienter, während das neuere NGF mit einer hohen Sensitivität überzeugt. Im Vergleich dazu muss das NGS-Verfahren in Zukunft deutlich kostensparender und zeitlich effizienter gestaltet werden. Auch wir konnten in unserer Untersuchung bestätigen, dass eine MRD entscheidenden Einfluss auf das PFS und OS der Patienten hat und somit hohe Relevanz in der MM-Nachsorge Diagnostik erhalten wird.

10.1 Abstract

Multiple myeloma is one of the most common haematological neoplasms for which a relative five-year survival rate of 50% is given. One of the most important therapeutic interventions is the administration of various chemotherapeutic drugs in combination with an autologous and/or allogeneic stem cell transplant (SCT). Several remission criteria are available for evaluating the therapeutic success after such a therapy. Due to the rising success of the therapeutic intervention, the demand for the deepest possible remission assessment is increasing. In this context, the determination of minimal residual disease (MRD) has developed as a potential remission criterion. A wide variety of techniques has been developed in recent years to determine this, with the multiparameter flow cytometry (MFC)- and next generation sequencing (NGS)-methods being the most advanced. Both methods impress with their high sensitivity in determining the MRD. In our study, we evaluated the NGS diagnostic method using the Lymphotrack Kit from Invivoscribe Technologies and sequencing using the Ion Torrent System from Thermo Fisher Scientific on the basis of patients who received a tandem transplant in the form of two autologous SCTs or one autologous and one allogeneic SCT. It was shown that we were able to detect a monoclonal starting sequence for the subsequent MRD-diagnosis of the progressive samples from 22 of the 28 examined patients, concluding that a sample with a high tumor burden should be selected or taken for the starting sample. We were then able to partially compare the NGS-MRD results with those recorded using the MFC-method. 75% of the results

were in agreement with regard to the result in the MRD-diagnostics. The results did not show any clear superiority of one of the two methods. We were also able to show that a positive MRD is associated with a poorer prognosis/PFS for the course of the disease. It follows from this that the detection of the MRD will become increasingly important in the future. The MFC is currently more user-friendly and cost-efficient and the newer NGF also impresses with its high sensitivity. In comparison to this, the NGS-process should be made more cost-saving and time-efficient in the future. We were able to confirm the high sensitivity of the NGS-method using MRD-diagnostics on a myeloma-cell line in a dilution series. We were also able to confirm in our investigation that an MRD has a decisive influence on the PFS and OS of the patients and is thus of great relevance in MM follow-up diagnostics.

12. Literaturverzeichnis

ALBAGOUSH, S. A. & AZEVEDO, A. M. 2020. Multiple Myeloma. *StatPearls*. Treasure Island (FL).

ALEXANIAN, R., HAUT, A., KHAN, A. U., LANE, M., MCKELVEY, E. M., MIGLIORE, P. J., STUCKEY, W. J., JR. & WILSON, H. E. 1969. Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA*, 208, 1680-5.

ATTAL, M., HAROUSSEAU, J. L., STOPPA, A. M., SOTTO, J. J., FUZIBET, J. G., ROSSI, J. F., CASASSUS, P., MAISONNEUVE, H., FACON, T., IFRAH, N., PAYEN, C. & BATAILLE, R. 1996. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med*, 335, 91-7.

ATTAL, M., LAUWERS-CANCES, V., HULIN, C., LELEU, X., CAILLOT, D., ESCOFFRE, M., ARNULF, B., MACRO, M., BELHADJ, K., GARDERET, L., ROUSSEL, M., PAYEN, C., MATHIOT, C., FERMAND, J. P., MEULEMAN, N., ROLLET, S., MAGLIO, M. E., ZEYTOONJIAN, A. A., WELLER, E. A., MUNSHI, N., ANDERSON, K. C., RICHARDSON, P. G., FACON, T., AVET-LOISEAU, H., HAROUSSEAU, J. L., MOREAU, P. & STUDY, I. F. M. 2017. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med*, 376, 1311-1320.

BAI, Y., ORFAO, A. & CHIM, C. S. 2018. Molecular detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 181, 11-26.

BANNAS, P., KROGER, N., ADAM, G. & DERLIN, T. 2013. [Modern imaging techniques in patients with multiple myeloma]. *Rofo*, 185, 26-33.

- BASHIR, Q. & QAZILBASH, M. H. 2017. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Myeloma: When and in Whom Does It Work. *Curr Hematol Malig Rep*, 12, 126-135.
- BEHJATI, S. & TARPEY, P. S. 2013. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 98, 236-8.
- BREITKREUTZ, I., RAAB, M. & GOLDSCHMIDT, H. 2019. [First-line treatment of multiple myeloma]. *Internist (Berl)*, 60, 23-33.
- BRUDNO, J. N., MARIC, I., HARTMAN, S. D., ROSE, J. J., WANG, M., LAM, N., STETLER-STEVENSON, M., SALEM, D., YUAN, C., PAVLETIC, S., KANAKRY, J. A., ALI, S. A., MIKKILINENI, L., FELDMAN, S. A., STRONCEK, D. F., HANSEN, B. G., LAWRENCE, J., PATEL, R., HAKIM, F., GRESS, R. E. & KOCHENDERFER, J. N. 2018. T Cells Genetically Modified to Express an Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor Cause Remissions of Poor-Prognosis Relapsed Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*, JCO2018778084.
- BRUGGEMANN, M. & KOTROVA, M. 2017. Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2017, 13-21.
- CARPENTER, R. O., EVBUOMWAN, M. O., PITTALUGA, S., ROSE, J. J., RAFFELD, M., YANG, S., GRESS, R. E., HAKIM, F. T. & KOCHENDERFER, J. N. 2013. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 19, 2048-60.
- CHILD, J. A., MORGAN, G. J., DAVIES, F. E., OWEN, R. G., BELL, S. E., HAWKINS, K., BROWN, J., DRAYSON, M. T., SELBY, P. J. & MEDICAL RESEARCH COUNCIL ADULT LEUKAEMIA WORKING, P. 2003. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med*, 348, 1875-83.
- CORRADINI, P., VOENA, C., TARELLA, C., ASTOLFI, M., LADETTO, M., PALUMBO, A., VAN LINT, M. T., BACIGALUPO, A., SANTORO, A., MUSSO, M., MAJOLINO, I., BOCCADORO, M. & PILERI, A. 1999. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J Clin Oncol*, 17, 208-15.
- D'AMATO, R. J., LOUGHNAN, M. S., FLYNN, E. & FOLKMAN, J. 1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 4082-5.
- DAVIES, F. E. 2017. Is molecular remission the goal of multiple myeloma therapy? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2017, 205-211.
- DE WEERS, M., TAI, Y. T., VAN DER VEER, M. S., BAKKER, J. M., VINK, T., JACOBS, D. C., OOMEN, L. A., PEIPP, M., VALERIUS, T., SLOOTSTRA, J. W., MUTIS, T., BLEEKER, W. K., ANDERSON, K. C., LOKHORST, H. M.,

VAN DE WINKEL, J. G. & PARREN, P. W. 2011. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol*, 186, 1840-8.

DSMZ. 2021. U-266 [Online]. Available:

<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-9> [Accessed 22.03.2021 2021].

DURIE, B. G., HAROUSSEAU, J. L., MIGUEL, J. S., BLADE, J., BARLOGIE, B., ANDERSON, K., GERTZ, M., DIMOPOULOS, M., WESTIN, J., SONNEVELD, P., LUDWIG, H., GAHRTON, G., BEKSAC, M., CROWLEY, J., BELCH, A., BOCCADARO, M., CAVO, M., TURESSON, I., JOSHUA, D., VESOLE, D., KYLE, R., ALEXANIAN, R., TRICOT, G., ATTAL, M., MERLINI, G., POWLES, R., RICHARDSON, P., SHIMIZU, K., TOSI, P., MORGAN, G., RAJKUMAR, S. V. & INTERNATIONAL MYELOMA WORKING, G. 2006. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 20, 1467-73.

DURIE, B. G. & SALMON, S. E. 1975. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*, 36, 842-54.

EUROFLOW. 2021. *The EuroFlow Next Generation Flow Multiple Myeloma Minimal Residual Disease (MM MRD)-QA program* [Online]. Available: <https://www.euroflow.org/qa/> [Accessed 16.08.2021 2021].

EVEILLARD, M., RUSTAD, E., ROSHAL, M., ZHANG, Y., CIARDIELLO, A., KORDE, N., HULTCRANTZ, M., LU, S., SHAH, U., HASSOUN, H., SMITH, E., LESOKHIN, A., MAILANKODY, S., LANDGREN, O. & THOREN, K. 2020. Comparison of MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peripheral blood and bone marrow-based flow cytometry for tracking measurable residual disease in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*, 189, 904-907.

FLORES-MONTERO, J., DE TUTE, R., PAIVA, B., PEREZ, J. J., BOTTCHER, S., WIND, H., SANOJA, L., PUIG, N., LECREVISSE, Q., VIDRIALES, M. B., VAN DONGEN, J. J. & ORFAO, A. 2016. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*, 90, 61-72.

FLORES-MONTERO, J., SANOJA-FLORES, L., PAIVA, B., PUIG, N., GARCIA-SANCHEZ, O., BOTTCHER, S., VAN DER VELDEN, V. H. J., PEREZ-MORAN, J. J., VIDRIALES, M. B., GARCIA-SANZ, R., JIMENEZ, C., GONZALEZ, M., MARTINEZ-LOPEZ, J., CORRAL-MATEOS, A., GRIGORE, G. E., FLUXA, R., PONTES, R., CAETANO, J., SEDEK, L., DEL CANIZO, M. C., BLADE, J., LAHUERTA, J. J., AGUILAR, C., BAREZ, A., GARCIA-MATEO, A., LABRADOR, J., LEOZ, P., AGUILERA-SANZ, C., SAN-MIGUEL, J., MATEOS, M. V., DURIE, B., VAN DONGEN, J. J. M. & ORFAO, A. 2017. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*, 31, 2094-2103.

GAGELMANN, N., AYUK, F., ATANACKOVIC, D. & KROGER, N. 2020a. B cell maturation antigen-specific chimeric antigen receptor T cells for relapsed or refractory multiple myeloma: A meta-analysis. *Eur J Haematol*, 104, 318-327.

GAGELMANN, N., EIKEMA, D. J., KOSTER, L., CAILLOT, D., PIOLTELLI, P., LLEONART, J. B., REMENYI, P., BLAISE, D., SCHAAP, N., TRNENY, M., PASSWEG, J., PORRAS, R. P., CAHN, J. Y., MUSSO, M., POIRE, X., FENK, R., ITALA-REMES, M., PAVONE, V., FOUILLARD, L., MAERTENS, J., BRON, D., POULI, A., SCHROYENS, W., SCHONLAND, S., GARDERET, L., YAKOUB-AGHA, I. & KROGER, N. 2019. Tandem Autologous Stem Cell Transplantation Improves Outcomes in Newly Diagnosed Multiple Myeloma with Extramedullary Disease and High-Risk Cytogenetics: A Study from the Chronic Malignancies Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 25, 2134-2142.

GAGELMANN, N., RIECKEN, K., WOLSCHKE, C., BERGER, C., AYUK, F. A., FEHSE, B. & KROGER, N. 2020b. Development of CAR-T cell therapies for multiple myeloma. *Leukemia*, 34, 2317-2332.

GIACCONE, L., STORER, B., PATRIARCA, F., ROTTA, M., SORASIO, R., ALLIONE, B., CARNEVALE-SCHIANCA, F., FESTUCCIA, M., BRUNELLO, L., OMEDE, P., BRINGHEN, S., AGLIETTA, M., LEVIS, A., MORDINI, N., GALLAMINI, A., FANIN, R., MASSAIA, M., PALUMBO, A., CICCONE, G., STORB, R., GOOLEY, T. A., BOCCADORO, M. & BRUNO, B. 2011. Long-term follow-up of a comparison of nonmyeloablative allografting with autografting for newly diagnosed myeloma. *Blood*, 117, 6721-7.

GIRALT, S., COSTA, L. J., MALONEY, D., KRISHNAN, A., FEI, M., ANTIN, J. H., BRUNSTEIN, C., GELLER, N., GOODMAN, S., HARI, P., LOGAN, B., LOWSKY, R., QAZILBASH, M. H., SAHEBI, F., SOMLO, G., ROWLEY, S., VOGL, D. T., VESOLE, D. H., PASQUINI, M. & STADTMAUER, E. 2020. Tandem Autologous-Autologous versus Autologous-Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant for Patients with Multiple Myeloma: Long-Term Follow-Up Results from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network 0102 Trial. *Biol Blood Marrow Transplant*, 26, 798-804.

GIULIANI, N., RIZZOLI, V. & ROODMAN, G. D. 2006. Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood*, 108, 3992-6.

GREIPP, P. R., SAN MIGUEL, J., DURIE, B. G., CROWLEY, J. J., BARLOGIE, B., BLADE, J., BOCCADORO, M., CHILD, J. A., AVET-LOISEAU, H., KYLE, R. A., LAHUERTA, J. J., LUDWIG, H., MORGAN, G., POWLES, R., SHIMIZU, K., SHUSTIK, C., SONNEVELD, P., TOSI, P., TURESSON, I. & WESTIN, J. 2005. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 23, 3412-20.

HAROUSSEAU, J. L. & MOREAU, P. 2009. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*, 360, 2645-54.

- HAUBITZ, M. & PEEST, D. 2006. Myeloma--new approaches to combined nephrological-haematological management. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 582-90.
- HUNTER, H. M., PEGGS, K., POWLES, R., RAHEMTULLA, A., MAHENDRA, P., CAVENAGH, J., LITTLEWOOD, T., POTTER, M., HUNTER, A., PAGLIUCA, A., WILLIAMS, C. D., COOK, G., TOWLSON, K., MARKS DAVID, I., RUSSELL, N. H., CLINICAL TRIALS COMMITTEE OF THE BRITISH SOCIETY OF, B. & MARROW, T. 2005. Analysis of outcome following allogeneic haemopoietic stem cell transplantation for myeloma using myeloablative conditioning--evidence for a superior outcome using melphalan combined with total body irradiation. *Br J Haematol*, 128, 496-502.
- INSTITUTE, P. R. 2016. *Ion PGM™ System for Next-Generation Sequencing* [Online]. PrimeBio Research Institute. Available: <https://www.primbioresearch.com/ion-pgmtrade-sequencer.html> [Accessed 12.08.2021 2021].
- INTERNATIONAL MYELOMA WORKING, G. 2003. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*, 121, 749-57.
- KASTRITIS, E., ZERVAS, K., SYMEONIDIS, A., TERPOS, E., DELIMBASSI, S., ANAGNOSTOPOULOS, N., MICHALI, E., ZOMAS, A., KATODRITOU, E., GIKA, D., POULI, A., CHRISTOULAS, D., ROUSSOU, M., KARTASIS, Z., ECONOMOPOULOS, T. & DIMOPOULOS, M. A. 2009. Improved survival of patients with multiple myeloma after the introduction of novel agents and the applicability of the International Staging System (ISS): an analysis of the Greek Myeloma Study Group (GMSG). *Leukemia*, 23, 1152-7.
- KREBSREGISTERDATEN, Z. F. 2016. *Multiples Myelom* [Online]. Robert Koch-Institut. Available: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Multiples%20Myelom/multiples_myelom_node.html [Accessed 16.01.2021 2021].
- KROGER, N. 2005. Autologous-allogeneic tandem stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*, 46, 813-21.
- KROGER, N., EINSELE, H., WOLFF, D., CASPER, J., FREUND, M., DERIGS, G., WANDT, H., SCHAFFER-ECKART, K., WITTKOWSKY, G., SCHMITZ, N., KRUGER, W., ZABELINA, T., RENGES, H., AYUK, F., KRULL, A., ZANDER, A. & GERMAN STUDY-GROUP MULTIPLE, M. 2003. Myeloablative intensified conditioning regimen with in vivo T-cell depletion (ATG) followed by allografting in patients with advanced multiple myeloma. A phase I/II study of the German Study-group Multiple Myeloma (DSMM). *Bone Marrow Transplant*, 31, 973-9.
- KUMAR, S., PAIVA, B., ANDERSON, K. C., DURIE, B., LANDGREN, O., MOREAU, P., MUNSHI, N., LONIAL, S., BLADE, J., MATEOS, M. V., DIMOPOULOS, M.,

- KASTRITIS, E., BOCCADORO, M., ORLOWSKI, R., GOLDSCHMIDT, H., SPENCER, A., HOU, J., CHNG, W. J., USMANI, S. Z., ZAMAGNI, E., SHIMIZU, K., JAGANNATH, S., JOHNSEN, H. E., TERPOS, E., REIMAN, A., KYLE, R. A., SONNEVELD, P., RICHARDSON, P. G., MCCARTHY, P., LUDWIG, H., CHEN, W., CAVO, M., HAROUSSEAU, J. L., LENTZSCH, S., HILLEGASS, J., PALUMBO, A., ORFAO, A., RAJKUMAR, S. V., MIGUEL, J. S. & AVET-LOISEAU, H. 2016. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 17, e328-e346.
- KYLE, R. A., GERTZ, M. A., WITZIG, T. E., LUST, J. A., LACY, M. Q., DISPENZIERI, A., FONSECA, R., RAJKUMAR, S. V., OFFORD, J. R., LARSON, D. R., PLEVAK, M. E., THERNEAU, T. M. & GREIPP, P. R. 2003. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*, 78, 21-33.
- LAMPIGNANO, R., NEUMANN, M. H. D., WEBER, S., KLOTEN, V., HERDEAN, A., VOSS, T., GROELZ, D., BABAYAN, A., TIBBESMA, M., SCHLUMPBERGER, M., CHEMI, F., ROTHWELL, D. G., WIKMAN, H., GALIZZI, J. P., RIISE BERGHEIM, I., RUSSNES, H., MUSSOLIN, B., BONIN, S., VOIGT, C., MUSA, H., PINZANI, P., LIANIDOU, E., BRADY, G., SPEICHER, M. R., PANTEL, K., BETSOU, F., SCHUURING, E., KUBISTA, M., AMMERLAAN, W., SPRENGER-HAUSSELS, M., SCHLANGE, T. & HEITZER, E. 2020. Multicenter Evaluation of Circulating Cell-Free DNA Extraction and Downstream Analyses for the Development of Standardized (Pre)analytical Work Flows. *Clin Chem*, 66, 149-160.
- LAROCCA, A., MINA, R., GAY, F., BRINGHEN, S. & BOCCADORO, M. 2017. Emerging drugs and combinations to treat multiple myeloma. *Oncotarget*, 8, 60656-60672.
- LOKHORST, H., EINSELE, H., VESOLE, D., BRUNO, B., SAN MIGUEL, J., PEREZ-SIMON, J. A., KROGER, N., MOREAU, P., GAHRTON, G., GASPARETTO, C., GIRALT, S., BENSINGER, W. & INTERNATIONAL MYELOMA WORKING, G. 2010. International Myeloma Working Group consensus statement regarding the current status of allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 28, 4521-30.
- LUDWIG, H., DURIE, B. G., MCCARTHY, P., PALUMBO, A., SAN MIGUEL, J., BARLOGIE, B., MORGAN, G., SONNEVELD, P., SPENCER, A., ANDERSEN, K. C., FACON, T., STEWART, K. A., EINSELE, H., MATEOS, M. V., WIJERMANS, P., WAAGE, A., BEKSAC, M., RICHARDSON, P. G., HULIN, C., NIESVIZKY, R., LOKHORST, H., LANDGREN, O., BERGSAGEL, P. L., ORLOWSKI, R., HINKE, A., CAVO, M., ATTAL, M. & INTERNATIONAL MYELOMA WORKING, G. 2012. IMWG consensus on maintenance therapy in multiple myeloma. *Blood*, 119, 3003-15.
- MAILANKODY, S., KORDE, N., LESOKHIN, A. M., LENDVAI, N., HASSOUN, H., STETLER-STEVENSON, M. & LANDGREN, O. 2015. Minimal residual

- disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside. *Nat Rev Clin Oncol*, 12, 286-95.
- MARTINELLI, G., TERRAGNA, C., ZAMAGNI, E., RONCONI, S., TOSI, P., LEMOLI, R. M., BANDINI, G., MOTTA, M. R., TESTONI, N., AMABILE, M., OTTAVIANI, E., VIANELLI, N., DE VIVO, A., GOZZETTI, A., TURA, S. & CAVO, M. 2000. Molecular remission after allogeneic or autologous transplantation of hematopoietic stem cells for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 18, 2273-81.
- MARTINEZ-LOPEZ, J., LAHUERTA, J. J., PEPIN, F., GONZALEZ, M., BARRIO, S., AYALA, R., PUIG, N., MONTALBAN, M. A., PAIVA, B., WENG, L., JIMENEZ, C., SOPENA, M., MOORHEAD, M., CEDENA, T., RAPADO, I., MATEOS, M. V., ROSINOL, L., ORIOL, A., BLANCHARD, M. J., MARTINEZ, R., BLADE, J., SAN MIGUEL, J., FAHAM, M. & GARCIA-SANZ, R. 2014. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*, 123, 3073-9.
- MATEOS, M. V. & SAN MIGUEL, J. F. 2017. Management of multiple myeloma in the newly diagnosed patient. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2017, 498-507.
- MATTEUCCI, F., PAGANELLI, G., MARTINELLI, G. & CERCHIONE, C. 2020. PET/CT in Multiple Myeloma: Beyond FDG. *Front Oncol*, 10, 622501.
- MCCARTHY, P. L., HOLSTEIN, S. A., PETRUCCI, M. T., RICHARDSON, P. G., HULIN, C., TOSI, P., BRINGHEN, S., MUSTO, P., ANDERSON, K. C., CAILLOT, D., GAY, F., MOREAU, P., MARIT, G., JUNG, S. H., YU, Z., WINOGRAD, B., KNIGHT, R. D., PALUMBO, A. & ATTAL, M. 2017. Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol*, 35, 3279-3289.
- MEHTA, J. & SINGHAL, S. 1998. Graft-versus-myeloma. *Bone Marrow Transplant*, 22, 835-43.
- MIKULASOVA, A., WARDELL, C. P., MURISON, A., BOYLE, E. M., JACKSON, G. H., SMETANA, J., KUFOVA, Z., POUR, L., SANDECKA, V., ALMASI, M., VSIANSKA, P., GREGORA, E., KUGLIK, P., HAJEK, R., DAVIES, F. E., MORGAN, G. J. & WALKER, B. A. 2017. The spectrum of somatic mutations in monoclonal gammopathy of undetermined significance indicates a less complex genomic landscape than that in multiple myeloma. *Haematologica*, 102, 1617-1625.
- MOREAU, P., AVET-LOISEAU, H., HAROUSSEAU, J. L. & ATTAL, M. 2011. Current trends in autologous stem-cell transplantation for myeloma in the era of novel therapies. *J Clin Oncol*, 29, 1898-906.

- MOREAU, P. & TOUZEAU, C. 2013. Optimizing outcomes for patients with newly diagnosed multiple myeloma eligible for transplantation. *Leuk Suppl*, 2, S15-20.
- MUNSHI, N. C., AVET-LOISEAU, H., RAWSTRON, A. C., OWEN, R. G., CHILD, J. A., THAKURTA, A., SHERRINGTON, P., SAMUR, M. K., GEORGIEVA, A., ANDERSON, K. C. & GREGORY, W. M. 2017. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. *JAMA Oncol*, 3, 28-35.
- MURRAY, D. L., PUIG, N., KRISTINSSON, S., USMANI, S. Z., DISPENZIERI, A., BIANCHI, G., KUMAR, S., CHNG, W. J., HAJEK, R., PAIVA, B., WAAGE, A., RAJKUMAR, S. V. & DURIE, B. 2021. Mass spectrometry for the evaluation of monoclonal proteins in multiple myeloma and related disorders: an International Myeloma Working Group Mass Spectrometry Committee Report. *Blood Cancer J*, 11, 24.
- PAIVA, B., PUIG, N., CEDENA, M. T., ROSINOL, L., CORDON, L., VIDRIALES, M. B., BURGOS, L., FLORES-MONTERO, J., SANOJA-FLORES, L., LOPEZ-ANGLADA, L., MALDONADO, R., DE LA CRUZ, J., GUTIERREZ, N. C., CALASANZ, M. J., MARTIN-RAMOS, M. L., GARCIA-SANZ, R., MARTINEZ-LOPEZ, J., ORIOL, A., BLANCHARD, M. J., RIOS, R., MARTIN, J., MARTINEZ-MARTINEZ, R., SUREDA, A., HERNANDEZ, M. T., DE LA RUBIA, J., KRSNIK, I., MORALEDA, J. M., PALOMERA, L., BARGAY, J., VAN DONGEN, J. J. M., ORFAO, A., MATEOS, M. V., BLADE, J., SANMIGUEL, J. F., LAHUERTA, J. J. & GROUP, G. P. C. S. 2020. Measurable Residual Disease by Next-Generation Flow Cytometry in Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*, 38, 784-792.
- PAIVA, B., VAN DONGEN, J. J. & ORFAO, A. 2015. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood*, 125, 3059-68.
- PAIVA, B., VIDRIALES, M. B., CERVERO, J., MATEO, G., PEREZ, J. J., MONTALBAN, M. A., SUREDA, A., MONTEJANO, L., GUTIERREZ, N. C., GARCIA DE COCA, A., DE LAS HERAS, N., MATEOS, M. V., LOPEZ-BERGES, M. C., GARCIA-BOYERO, R., GALENDE, J., HERNANDEZ, J., PALOMERA, L., CARRERA, D., MARTINEZ, R., DE LA RUBIA, J., MARTIN, A., BLADE, J., LAHUERTA, J. J., ORFAO, A., SAN MIGUEL, J. F. & GROUPS, G. P. C. S. 2008. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*, 112, 4017-23.
- PALUMBO, A., AVET-LOISEAU, H., OLIVA, S., LOKHORST, H. M., GOLDSCHMIDT, H., ROSINOL, L., RICHARDSON, P., CALTAGIRONE, S., LAHUERTA, J. J., FACON, T., BRINGHEN, S., GAY, F., ATTAL, M., PASSERA, R., SPENCER, A., OFFIDANI, M., KUMAR, S., MUSTO, P., LONIAL, S., PETRUCCI, M. T., ORLOWSKI, R. Z., ZAMAGNI, E., MORGAN, G., DIMOPOULOS, M. A., DURIE, B. G., ANDERSON, K. C., SONNEVELD, P., SAN MIGUEL, J., CAVO, M., RAJKUMAR, S. V. & MOREAU, P. 2015.

Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*, 33, 2863-9.

PEEST, D., COLDEWEY, R., DEICHER, H., SAILER, M., VYKOUPILOV, C., LEO, R., GEORGII, A., KAROW, J., HOEPPNER, E., DIEHL, V. & ET AL. 1993. Prognostic value of clinical, laboratory, and histological characteristics in multiple myeloma: improved definition of risk groups. *Eur J Cancer*, 29A, 978-83.

PEEST, D. & GOLDSCHMIDT, H. 2012. *Multiple Myelom*, Deutscher Ärzte-Verlag GmbH.

PUIG, N., SARASQUETE, M. E., ALCOCEBA, M., BALANZATEGUI, A., CHILLON, M. C., SEBASTIAN, E., MARIN, L. A., DIAZ, M. G., SAN MIGUEL, J. F. & SANZ, R. G. 2013. The use of CD138 positively selected marrow samples increases the applicability of minimal residual disease assessment by PCR in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol*, 92, 97-100.

PUIG, N., SARASQUETE, M. E., BALANZATEGUI, A., MARTINEZ, J., PAIVA, B., GARCIA, H., FUMERO, S., JIMENEZ, C., ALCOCEBA, M., CHILLON, M. C., SEBASTIAN, E., MARIN, L., MONTALBAN, M. A., MATEOS, M. V., ORIOL, A., PALOMERA, L., DE LA RUBIA, J., VIDRIALES, M. B., BLADE, J., LAHUERTA, J. J., GONZALEZ, M., MIGUEL, J. F. & GARCIA-SANZ, R. 2014. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia*, 28, 391-7.

PULSIPHER, M. A., CARLSON, C., LANGHOLZ, B., WALL, D. A., SCHULTZ, K. R., BUNIN, N., KIRSCH, I., GASTIER-FOSTER, J. M., BOROWITZ, M., DESMARAIS, C., WILLIAMSON, D., KALOS, M. & GRUPP, S. A. 2015. IgH-V(D)J NGS-MRD measurement pre- and early post-allotransplant defines very low- and very high-risk ALL patients. *Blood*, 125, 3501-8.

RAJKUMAR, S. V., DIMOPOULOS, M. A., PALUMBO, A., BLADE, J., MERLINI, G., MATEOS, M. V., KUMAR, S., HILLENGASS, J., KASTRITIS, E., RICHARDSON, P., LANDGREN, O., PAIVA, B., DISPENZIERI, A., WEISS, B., LELEU, X., ZWEEGMAN, S., LONIAL, S., ROSINOL, L., ZAMAGNI, E., JAGANNATH, S., SEZER, O., KRISTINSSON, S. Y., CAERS, J., USMANI, S. Z., LAHUERTA, J. J., JOHNSEN, H. E., BEKSAC, M., CAVO, M., GOLDSCHMIDT, H., TERPOS, E., KYLE, R. A., ANDERSON, K. C., DURIE, B. G. & MIGUEL, J. F. 2014. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 15, e538-48.

RAJKUMAR, S. V., HAYMAN, S. R., LACY, M. Q., DISPENZIERI, A., GEYER, S. M., KABAT, B., ZELDENRUST, S. R., KUMAR, S., GREIPP, P. R., FONSECA, R., LUST, J. A., RUSSELL, S. J., KYLE, R. A., WITZIG, T. E. & GERTZ, M. A. 2005. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood*, 106, 4050-3.

- REGELINK, J. C., RAIJMAKERS, P. G., BRAVENBOER, N., MILEK, R., HOETJES, N. J., DE KREUK, A. M., VAN DUIN, M., WONDERGEM, M. J., LIPS, P., SONNEVELD, P., ZIJLSTRA, J. M. & ZWEEGMAN, S. 2016. (18)F-fluoride-PET for dynamic in vivo monitoring of bone formation in multiple myeloma. *EJNMMI Res*, 6, 46.
- RICHARDSON, P. G., BARLOGIE, B., BERENSON, J., SINGHAL, S., JAGANNATH, S., IRWIN, D., RAJKUMAR, S. V., SRKALOVIC, G., ALSINA, M., ALEXANIAN, R., SIEGEL, D., ORLOWSKI, R. Z., KUTER, D., LIMENTANI, S. A., LEE, S., HIDESHIMA, T., ESSELTINE, D. L., KAUFFMAN, M., ADAMS, J., SCHENKEIN, D. P. & ANDERSON, K. C. 2003. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med*, 348, 2609-17.
- ROUSSEL, M., LAUWERS-CANCES, V., ROBILLARD, N., HULIN, C., LELEU, X., BENBOUBKER, L., MARIT, G., MOREAU, P., PEGOURIE, B., CAILLOT, D., FRUCHART, C., STOPPA, A. M., GENTIL, C., WUILLEME, S., HUYNH, A., HEBRAUD, B., CORRE, J., CHRETIEN, M. L., FACON, T., AVET-LOISEAU, H. & ATTAL, M. 2014. Front-line transplantation program with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination as induction and consolidation followed by lenalidomide maintenance in patients with multiple myeloma: a phase II study by the Intergroupe Francophone du Myelome. *J Clin Oncol*, 32, 2712-7.
- ROY, P., SARKAR, U. A. & BASAK, S. 2018. The NF-kappaB Activating Pathways in Multiple Myeloma. *Biomedicines*, 6.
- RUSTAD, E. H., HULTCRANTZ, M., YELLAPANTULA, V. D., AKHLAGHI, T., HO, C., ARCILA, M. E., ROSHAL, M., PATEL, A., CHEN, D., DEVLIN, S. M., JACOBSEN, A., HUANG, Y., MILLER, J. E., PAPAEMMANUIL, E. & LANDGREN, O. 2019. Baseline identification of clonal V(D)J sequences for DNA-based minimal residual disease detection in multiple myeloma. *PLoS One*, 14, e0211600.
- SADELAIN, M., BRENTJENS, R. & RIVIERE, I. 2013. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov*, 3, 388-98.
- SANCHEZ, R., AYALA, R. & MARTINEZ-LOPEZ, J. 2019. Minimal Residual Disease Monitoring with Next-Generation Sequencing Methodologies in Hematological Malignancies. *Int J Mol Sci*, 20.
- SOLOMON, A., WEISS, D. T. & KATTINE, A. A. 1991. Nephrotoxic potential of Bence Jones proteins. *N Engl J Med*, 324, 1845-51.
- SONNEVELD, P., SCHMIDT-WOLF, I. G., VAN DER HOLT, B., EL JARARI, L., BERTSCH, U., SALWENDER, H., ZWEEGMAN, S., VELLENGA, E., BROYL, A., BLAU, I. W., WEISEL, K. C., WITTEBOL, S., BOS, G. M., STEVENS-KROEF, M., SCHEID, C., PFREUNDSCHUH, M., HOSE, D., JAUCH, A., VAN DER VELDE, H., RAYMAKERS, R., SCHAAFSMA, M. R., KERSTEN, M. J., VAN MARWIJK-KOOY, M., DUEHRSEN, U., LINDEMANN, W., WIJERMANS,

- P. W., LOKHORST, H. M. & GOLDSCHMIDT, H. M. 2012. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol*, 30, 2946-55.
- 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. *J Clin Med*, 6.
- TECHNOLOGIES, I. 2016. *LymphoTrack Software - PGM - Version 2.0.1* [Online]. Available: <https://invivoscribe.com/uploads/products/informationalDownloads/Instructions-for-Use-LymphoTrack-PGM-Software-2.0.1.pdf> [Accessed 16.05.2022 2022].
- TECHNOLOGIES, I. 2017. *LymphoTrack MRD Software v1.2.0* [Online]. Available: <https://invivoscribe.com/uploads/products/informationalDownloads/Instructions-for-Use-LymphoTrack-MRD-Software-1.2.0.pdf> [Accessed 16.05.2022 2022].
- TECHNOLOGIES, I. 2018. *LymphoTrack Dx IGH (FR1/FR2/FR3) Assays-S5/PGM* [Online]. Available: <https://invivoscribe.com/uploads/products/instructionsForUse/280388.pdf> [Accessed 16.05.2022 2022].
- THAKRAL, D., DAS, N., BASNAL, A. & GUPTA, R. 2020. Cell-free DNA for genomic profiling and minimal residual disease monitoring in Myeloma- are we there yet? *Am J Blood Res*, 10, 26-45.
- THERMOFISHER. 2021a. *Ion OneTouch 2 System* [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4474779#/4474779> [Accessed 24.03.2021 2021].
- THERMOFISHER. 2021b. *Ion Torrent* [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/ion-torrent.html> [Accessed 22.03.2021 2021].
- WENNMANN, M., HIELSCHER, T., KINTZELE, L., MENZE, B. H., LANGS, G., MERZ, M., SAUER, S., KAUCZOR, H. U., SCHLEMMER, H. P., DELORME, S., GOLDSCHMIDT, H., WEINHOLD, N., HILLEGASS, J. & WEBER, M. A. 2020. Spatial Distribution of Focal Lesions in Whole-Body MRI and Influence of MRI Protocol on Staging in Patients with Smoldering Multiple Myeloma According to the New SLiM-CRAB-Criteria. *Cancers (Basel)*, 12.
- YAO, Q., BAI, Y., ORFAO, A. & CHIM, C. S. 2019. Standardized Minimal Residual Disease Detection by Next-Generation Sequencing in Multiple Myeloma. *Front Oncol*, 9, 449.

13. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1 Häufige Symptome/Klinik des Multiplen Myeloms..... | 10 |
| Tabelle 2 Stadien nach Salmon und Durie | 15 |
| Tabelle 3 CRAB-Kriterien | 15 |
| Tabelle 4 Stadieneinteilung nach ISS | 15 |
| Tabelle 5 Stadieneinteilung nach ISS-Revised..... | 15 |
| Tabelle 6 Tabellarische Auflistung der Fluorochrome für die Eight-Colour-Panel-Version beim NGF | 21 |
| Tabelle 7 Personen, Myelom und Transplantations-Daten der Patienten | 25 |
| Tabelle 8 Entnahmezeitpunkte der Proben..... | 27 |
| Tabelle 9 Geräte, Materialien und Kits..... | 28 |
| Tabelle 10 Verdünnungsreihe der Myelom-Zelllinie | 39 |
| Tabelle 11 Verwendete Fluorochrome (Four-Colour-Flow)..... | 40 |
| Tabelle 12 Ergebnisse der Sequenzierung der Ausgangsproben | 42 |
| Tabelle 13 Ergebnisse aus der MRD-Testung bzw. Immunfixation und Angabe über Rezidiv/Tod und PFS/OS der Patienten. | 44 |
| Tabelle 14 Charakteristika aus der Tabelle 13 | 45 |
| Tabelle 15 Ergebnisse der NGS-MRD-Diagnostik in Bezug zum Auftreten eines Rezidivs/Progression..... | 46 |
| Tabelle 16 Ergebnisse der MFC-MRD-Diagnostik in Bezug zum Auftreten eines Rezidivs/Progression..... | 46 |
| Tabelle 17 NGS- und MFC-Ergebnisse | 49 |
| Tabelle 18 Gegenüberstellung der NGS-MRD-Ergebnisse für die gesamte KM- und CD138-positiv selektierten Proben..... | 50 |
| Tabelle 19 Ergebnisse der MRD-Testung in der DNA-Verdünnungsreihe | 52 |
| Tabelle 20 Ergebnisse der MRD-Testung in der cDNA-Verdünnungsreihe | 52 |

14. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1 Ion OneTouch Instrument (rechts) und Ion OneTouch Enrichment System (links) (ThermoFisher, 2021a)..... | 32 |
| Abbildung 2 Ion PGM System (Institute, 2016)..... | 34 |
| Abbildung 3 Darstellung der Top 10 Merged Read Summary mit einer monoklonalen Sequenz auf Rank 1..... | 35 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 4 Darstellung der VJ Sequence Frequency in einem Histogramm mit einem deutlich monoklonalen Muster. | 36 |
| Abbildung 5 Darstellung der VJ Usage in einem 3D-Säulendiagramm mit einem deutlich monoklonalen Muster. | 36 |
| Abbildung 6 Darstellung der VJ Sequence Frequency in einem Histogramm mit einem polyklonalen Muster..... | 37 |
| Abbildung 7 Darstellung der VJ Usage in einem 3D-Säulendiagramm mit einem polyklonalen Muster..... | 37 |
| Abbildung 8 LymphoTrack-Programm: MRD-Auswertung bei MRD-Nachweis..... | 38 |
| Abbildung 9 Darstellung der Ergebnisse nach MFC (Four-colour-Flow)-Messung einer KM Probe mit Detektion von Myelomzellen. | 41 |
| Abbildung 10 Graphische Darstellung der Daten für die MRD-positive oder -negative Testung, monoklonale oder unauffällige Immunfixation, Rezidiv des MM und Tod der Patienten mit monoklonaler Ausgangsprobe bis 68 Monate nach der zweiten SZT... | 45 |
| Abbildung 11 PFS-Kaplan-Meier-Kurve..... | 47 |
| Abbildung 12 OS-Kaplan-Meier-Kurve..... | 48 |
| Abbildung 13 Graphische Darstellung der VJ-Sequence Frequency der unverdünnten U266-DNA-Probe mit monoklonalem Muster. | 51 |
| Abbildung 14 Graphische Darstellung der VJ Sequence Frequency der unverdünnten U266-cDNA-Probe mit monoklonalem Muster. | 51 |

15. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich dabei unterstützt haben, dass ich die Forschung und Anfertigung dieser Promotionsarbeit durchführen konnte.

Ich bedanke mich sehr bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Nicolaus Kröger für die Möglichkeit dieser Arbeit.

Besonders hervorheben möchte ich meine Betreuerin Frau Anita Badbaran, die mir stets zur Seite stand und ohne sie diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Meine Familie und Freunde waren ebenso stets motivierend und haben mich jederzeit unterstützt diese Arbeit abschließen zu können.

Gewidmet ist diese Arbeit meinem geliebten Vater, Alexander Johannes Steffani.

16. Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten

17. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

Joshua Steffani