

Masterarbeit

**Untersuchung von minimaler Resterkrankung beim
multiplen Myelom mittels Next Generation
Sequencing**

eingereicht von

Sara Senk

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (MSc)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt im

Universitätslehrgang Medizinische Genetik

unter der Anleitung von Betreuerin

Dr. rer. nat. Constance Bär

an der

MLL Münchner Leukämielabor GmbH

München, 21.08.2023

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

München, 21.08.2023

Sara Senk

Zusammenfassung - Abstract

Zusammenfassung

Das multiple Myelom (MM) ist die zweithäufigste hämatologische Krebsart in Europa und auch wenn sich die Heilungschancen in den letzten Jahrzehnten durch modernere Therapien verbessert haben, erleiden die meisten Patient*innen irgendwann ein Rezidiv. Es gibt immer größeren Konsens, dass die Überwachung von minimaler Resterkrankung zu den wichtigsten Prognosefaktoren zählt. Die minimale Resterkrankung könnte in der Zukunft die Therapieentscheidung beeinflussen und so ein wichtiger Faktor für die personalisierte Medizin beim multiplen Myelom sein. Daher wurde in dieser Arbeit eine neuere Methode zur Ermittlung der minimalen Resterkrankung, basierend auf der Sequenzierung klonaler *IGH*-Sequenzen des B-Zell-Rezeptors aberranter B-Zellen mittels Next Generation Sequencing (NGS), auf deren Durchführbarkeit in einem Routinelabor getestet. Diese Methode teilt sich in zwei Schritte: zunächst muss in einer Probe mit aktivem Krankheitsgeschehen die einzigartige klonale Sequenz ermittelt werden, bevor im Krankheitsverlauf nach der Therapie dann gezielt nach diesem Klonotyp gesucht werden kann. Daher spielt die Detektionsrate des Klonotyps für die Anwendbarkeit der Methode eine große Rolle. Es wurde eine Detektionsrate von 91,9 % für Proben von Patient*innen mit verschiedenen B-Zell-Neoplasien (MM, chronische lymphatische Leukämie und akute lymphatische Leukämie) festgestellt, während die Detektionsrate bei Proben von MM-Patient*innen alleine bei 85,7 % lag, so dass die Methode für die meisten Proben geeignet ist. Des Weiteren wurde die Untersuchung auf minimale Resterkrankung mit den bisherigen Methoden, wie der multiparametrischen Durchflusszytometrie, verglichen. Es zeigte sich eine gute Übereinstimmung von 83,3 % zwischen der multiparametrischen Durchflusszytometrie und der *IGH*-Sequenzierung durch NGS. Die durch die *IGH*-Sequenzierung durch NGS erreichte Sensitivität von 10^{-4} bei Proben von Patient*innen, bei denen die klonale Sequenz in der Verlaufsprobe nicht gefunden wurde, zeigt allerdings, dass weiterer Optimierungsbedarf nötig ist, um eine höhere Sensitivität zu erreichen.

Abstract

Multiple myeloma (MM) is the second most common hematologic cancer in Europe and even though the chances of cure have improved in recent decades due to more modern therapies, most patients eventually suffer a relapse. There is growing consensus that monitoring minimal residual disease is among the most important prognostic factors. Minimal residual disease may influence treatment decisions in the future, making it an important factor for personalized medicine in multiple myeloma. Therefore, in this thesis, a novel method for determining minimal residual disease, based on sequencing clonal *IGH* sequences of the B-cell receptor of aberrant B-cells by next generation sequencing (NGS), was tested for its feasibility in a routine laboratory. This method is divided into two steps: first, the unique clonal sequence must be determined in a sample with active disease, before a targeted search for this clonotype can be performed in the disease course after therapy. Therefore, the detection rate of the clonotype plays a major role in the applicability of the method. A detection rate of 91.9% was found for samples from patients with various B-cell neoplasms (MM, chronic lymphocytic leukaemia and acute lymphocytic leukaemia), while the detection rate for samples from MM patients alone was 85.7%, making the method suitable for most samples. Furthermore, the detection of minimal residual disease was compared with other methods, such as multiparametric flow cytometry. There was a good agreement of 83.3% between multiparametric flow cytometry and *IGH* sequencing by NGS. However, the sensitivity of 10^{-4} achieved by *IGH* sequencing by NGS in samples of patients in whom the clonal sequence was not found in the follow-up sample indicates that further optimization is needed to achieve higher sensitivity.

Abkürzungsverzeichnis

AID	aktivierungsinduzierte Deaminase
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
AS	Aminosäuren
ASCT	autologe Stammzelltransplantation
ASO-qPCR	allele-specific oligonucleotide quantitative polymerase chain reaction; Allel-spezifische quantitative Polymerasekettenreaktion
BCR	B-cell receptor; B-Zell-Rezeptor
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CDR1-3	complementarity-determining regions 1-3; komplementaritätsbestimmende Regionen 1-3
C _H	konstante Region der schweren Kette
C _L	konstante Region der leichten Kette
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CR	complete response/ remission; komplette Remission
C-Region	konstante Region
CS	class switch; Klassenwechsel
CSR	class switch recombination; Klassenwechsel-Rekombination
C-Terminus	Carboxylterminus
CV	coefficient of variance; Variationskoeffizient
D	diversity-Gensegment der V-Region
DNA	deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
DZ	dunkle Zone des Keimzentrums
Fab-Region	antigen-binding fragment-Region; Antigenbindende Fragment-Region
Fc-Region	crystallisable fragment-Region
FDC	follicular dendritic cells; follikuläre dendritische Zellen
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FR1-3	Framework-Regionen 1-3
G	Guanin
GC	germinal centre; Keimzentrum
H-Kette	heavy; schwere Kette
HP-SZ	hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
IMWG	International Myeloma Working Group
IVD	in vitro diagnostic
J	joining-Gensegment der V-Region
KM	Knochenmark
L-Kette	leichte Kette

LZ	light zone; helle Zone des Keimzentrums
MFC	multiparametric/multicolour flow cytometry; multiparametrische/ vielfarbige Durchflusszytometrie
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MM	multiples Myelom
MRD	measureable/minimal residual disease; messbare/ minimale Resterkrankung
MRT	Magnetresonanztomographie
NGF	Next Generation Flow Cytometry
NGS	Next Generation Sequencing
NHEJ	non homologous end joining; nicht-homologe Endverknüpfung
NTC	non template control
N-Terminus	Aminoterminus
OS	overall survival; Gesamtüberleben
PB	peripheres Blut
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PFS	progression free survival; progressionsfreies Überleben
sCR	stringent complete response/ remission; strenge komplette Remission
SHM	somatische Hypermutation
SMM	schwelendes multiples Myelom
β-ME	2-Mercaptoethanol
Tfh-Zellen	T follicular helper cells; follikuläre T-Helferzellen
U	Uracil
V	variable-Gensegment der V-Region
V _H	variable Region der schweren Kette
V _L	variable Region der leichten Kette
V-Region	variable Region
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	II
Zusammenfassung - Abstract.....	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Der B-Zell-Rezeptor	2
1.2. Das multiple Myelom.....	10
1.3. Minimale Resterkrankung	15
2. Material und Methoden.....	24
2.1. Material	24
2.1.1. Plastikware	24
2.1.2. Reagenzien.....	25
2.1.3. Kits	26
2.1.4. Geräte und Software.....	26
2.2. Methoden.....	28
2.2.1. Patient*innen.....	29
2.2.2. MFC	31
2.2.3. Zell-Isolation.....	32
2.2.4. DNA-Isolation und Aufreinigung	34
2.2.5. <i>IGH</i> - und <i>IGK</i> -Fragmentanalyse.....	36
2.2.6. Verdünnungsreihen.....	37
2.2.7. ASO-qPCR.....	38
2.2.8. LymphoTrack® <i>IGH</i> Assays.....	44
2.2.9. KAPA-Library-Quantifizierung.....	47
2.2.10. TapeStation Quantifizierung	49
2.2.11. NGS	50
2.2.12. WGS	53

2.2.13. Statistische Auswertung	53
3. Ergebnisse	56
3.1. Ermittlung der Klonalität der Indexproben.....	56
3.2. Vergleich mit anderen Methoden (Indexproben).....	63
3.3. Bestimmung der MRD.....	68
3.4. Verfolgung klonaler Evolution	70
3.5. Vergleich mit anderen Methoden (MRD).....	71
3.6. Verdünnungsreihen	75
3.7. Optimierung der FlowCell Beladung	78
3.8. Präzision	78
3.9. Limit of Blank	80
4. Diskussion	81
4.1. Ermittlung der Klonalität der Indexproben.....	81
4.2. Bestimmung der MRD.....	86
4.3. Verdünnungsreihen	90
4.4. Präzision	91
4.5. Ausblick	92
Literaturverzeichnis	93
Anhang	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Antikörpers	3
Abbildung 2: Struktur der V _H des BCR.....	4
Abbildung 3: B-Zell-Entwicklung im Knochenmark	5
Abbildung 4: Rekombination der schweren Kette von Immunoglobinen/Antikörpern des B-Zellrezeptors (BCR)	7
Abbildung 5: B-Zell-Aktivierung, Affinitätsreifung und Differenzierung zu Gedächtniszellen und Plasmazellen.....	8
Abbildung 6: CRAB-Kriterien beim MM	12
Abbildung 7: Übersicht der Diagnosekriterien von MGUS, SMM und MM inklusive der SLiM-CRAB-Kriterien.	13
Abbildung 8: Übersicht der Schritte des Workflows zur Isolation der Zellen.....	33
Abbildung 9: Kriterien zur Bestimmung der Klonalität einer Indexprobe.....	51
Abbildung 10: Darstellung der Ergebnisse bei der Ermittlung der Indexklonalität durch die LymphoTrack Software.....	52
Abbildung 11: Group Usage der klonalen Sequenz aller Patient*innen (n=41)	58
Abbildung 12: Group Usage der klonalen Sequenz der Proben von MM- Patient*innen (n=20).....	59
Abbildung 13: Vergleich der zusätzlichen FR3-Sequenz bei Proben sieben Patient*innen	62
Abbildung 14: Vergleich der Sequenzen der Sanger-Sequenzierung (MLL_13367) mit NGS der Proben MLL_13367 und MLL_255034	64
Abbildung 15: Vergleich der Sequenzen der Sanger-Sequenzierung (ED - Erstdiagnose) mit NGS der Proben MLL_246852 und MLL_255035	64
Abbildung 16: Vergleich der klonalen Sequenzen der drei Assays von MLL_255035	65
Abbildung 17: Vergleich der klonalen Sequenzen der fünf WGS-Proben.....	67
Abbildung 18: Verfolgung der klonalen Evolution der Patientin mit CLL die ein MM entwickelte.....	70
Abbildung 19: Passing-Bablok-Regression und Bland-Altman-Analyse der in beiden Methoden MRD-positiven Proben von CLL- und MM-Patient*innen (n=18)	73
Abbildung 20: Verdünnungsreihe 1	76
Abbildung 21: Verdünnungsreihe 2	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Methoden zur Untersuchung von MRD beim MM modifiziert nach (Kumar et al., 2016, pp. e334) und (Bai et al., 2018, pp. 15).....	22
Tabelle 2: Verwendete Plastikware	24
Tabelle 3: Verwendete Reagenzien	25
Tabelle 4: Verwendete Kits.....	26
Tabelle 5: Verwendete Geräte und Software.....	26
Tabelle 6: Zusammenfassung der untersuchten Proben	30
Tabelle 7: Verwendete Antikörper für den MFC MRD-Ansatz	31
Tabelle 8: Zusammensetzung des Ansatzes der <i>IGH</i> - und <i>IGK</i> -Fragmentanalyse	36
Tabelle 9: Thermocyclerprotokoll der <i>IGH</i> - und <i>IGK</i> -Fragmentanalyse.....	36
Tabelle 10: Primersequenzen der <i>IGHV</i> -Fragmentanalyse.....	38
Tabelle 11: Zusammensetzung des Ansatzes der <i>IGHV</i> -Fragmentanalyse	38
Tabelle 12: Thermocyclerprotokoll der <i>IGHV</i> -Fragmentanalyse.....	39
Tabelle 13: Primersequenzen der spezifischen PCR	40
Tabelle 14: Zusammensetzung des Ansatzes der spezifischen PCR	40
Tabelle 15: Thermocyclerprotokoll der spezifischen PCR bei Einsatz von DNA ...	40
Tabelle 16: Thermocyclerprotokoll der Exo-SAP IT Aufreinigung.....	41
Tabelle 17: Zusammensetzung des Ansatzes der Sequenzierungs-PCR	41
Tabelle 18: Thermocyclerprotokoll der Sequenzierungs-PCR.....	41
Tabelle 19: Primer- und Sondensequenzen der JH-Genfamilien nach (Brüggemann et al., 2000) und (Verhagen et al., 2000).	43
Tabelle 20: Primer- und Sondensequenzen des Referenzgens Albumin nach (Pongers-Willemse et al., 1998).	43
Tabelle 21: Zusammensetzung des Ansatzes der ASO-qPCR	44
Tabelle 22: Cyclerprotokoll der ASO-qPCR	44
Tabelle 23: Zusammensetzung des Ansatzes der Indexproben.....	45
Tabelle 24: Zusammensetzung des Ansatzes der MRD-Proben.....	45
Tabelle 25: Thermocyclerprotokoll LymphoTrack <i>IGH</i> Assays	46
Tabelle 26: Zusammensetzung des Ansatzes für die KAPA-Library-Quantifizierung	47
Tabelle 27: Cyclerprotokoll des LightCycler® 480 System zur KAPA-Library Quantifizierung	48
Tabelle 28: Ermittlungsraten der Klonalität der Indexproben in den drei Assays ..	56
Tabelle 29: Vergleich der Ergebnisse von unterschiedlichen Materialien (KM und CD138+-MACS-Zellen) von zwei MM-Patient*innen; 1: Übereinstimmung der Sequenz aus dem FR2-Assay beträgt mit MAFFT 100 %.....	57

Tabelle 30: Eigenschaften und Ergebnisse der Proben für die keine klonale Sequenz im NGS gefunden wurde	60
Tabelle 31: Vergleich zwischen NGS LymphoTrack und Sanger-Sequenzierung/qPCR bei der Ermittlung des Klonotyps	63
Tabelle 32: Vergleich zwischen NGS LymphoTrack und WGS bei der Ermittlung der Index-Klonalität	66
Tabelle 33: Kreuztabelle des Nachweis von MRD mit NGS der 27 untersuchten Proben.....	68
Tabelle 34: Charakteristika und Ergebnisse der 27 untersuchten Proben der MRD-Untersuchung.....	69
Tabelle 35: Charakteristika und Ergebnisse für acht klonale Sequenzen, die in den Proben der MRD-Untersuchung nicht detektierbar waren.....	69
Tabelle 36: Vergleich der Index- und der MRD-Probe der Patientin mit CLL, die ein MM entwickelte.....	71
Tabelle 37: Kreuztabelle des Vergleichs des MRD-Status von MFC und NGS.....	72
Tabelle 38: Proben mit abweichendem MRD-Status im NGS und MFC.....	72
Tabelle 39: Ergebnis des Shapiro-Wilk-Test zur Untersuchung auf Normalverteilung	73
Tabelle 40: Bland-Altman-Tabelle (n=18) zu Abbildung 19	74
Tabelle 41: Vergleich des MRD-Status von ASO-qPCR und NGS.....	75
Tabelle 42: Verdünnungsreihe 1 aus MLL_62421.....	75
Tabelle 43: Verdünnungsreihe 2 aus MLL_246857.....	76
Tabelle 44: Ergebnis der Resequenzierung der Verdünnungsreihen.....	77
Tabelle 45: Vergleich der Anzahl der total Reads pro Replikat und Cluster Densities der Läufe der Verdünnungsreihen 1 und 2. Daten siehe Tabelle 54 und Tabelle 55.....	78
Tabelle 46: Analyse der in jedem Lauf und jedem Assay mitgeführten Positivkontrolle der Sequenzierung zur Ermittlung der Indexklonalität (n=6).....	79
Tabelle 47: Analyse der in jedem Lauf und jedem Assay mitgeführten low Positivkontrolle der MRD-Analyse	79
Tabelle 48: Zusammenfassung der Ermittlung der Klonalität der Indexproben aller Entitäten	108
Tabelle 49: Vergleich der Ergebnisse der Ermittlung der Indexklonalität mit WGS	110
Tabelle 50: Zusammenfassung der Ergebnisse der MRD-Untersuchung mit NGS für Proben von 27 Patient*innen.....	111
Tabelle 51: Proben für die die klonale Sequenz in der MRD-Untersuchung mit NGS nicht detektiert wurde.....	112

Tabelle 52: Ergebnisse der MRD-Untersuchung der Proben von CLL- und MM-Patient*innen (n=24).....	113
Tabelle 53: Für Bland-Altman-Analyse und Passing-Bablok-Regression verwendete MRD-Daten der in beiden Methoden MRD-positiven Proben von CLL- und MM-Patient*innen	115
Tabelle 54: Anzahl der Total Reads der Verdünnungsreihe 1 mit dem FR1-Assay nach KAPA-Library-Quantifizierung.....	116
Tabelle 55: Anzahl der Total Reads der Verdünnungsreihe 2 mit dem FR2-Assay nach TapeStation-Quantifizierung	117

1. Einleitung

Das multiple Myelom (MM) macht etwa 1 % aller Krebsarten und 10 % aller hämatologischen Krebsarten aus und ist damit die zweithäufigste hämatologische Krebsart in Europa (Dimopoulos et al., 2021, pp. 309) (Rajkumar, 2022, pp. 1086). Auch wenn sich die Heilungschancen in den letzten Jahrzehnten verbessert haben, hängt das Gesamtüberleben von der Tumorlast, der Tumorbiologie und dem Ansprechen auf die Therapie ab und beträgt ca. 10-15 % (Rajkumar, 2022, pp. 1089) (Dimopoulos et al., 2021, pp. 309). Trotz der Verbesserungen bei der Behandlung erleiden die meisten Patient*innen irgendwann ein Rezidiv (Rodriguez-Otero et al., 2021, pp. 1).

Es gibt immer größeren Konsens, dass die Überwachung von minimaler Resterkrankung (MRD) zu den wichtigsten Prognosefaktoren zählt. Studien haben gezeigt, dass MRD-Negativität mit verbessertem progressionsfreiem Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) assoziiert ist (Paiva et al., 2008, pp. 4020) (Rawstron et al., 2013, pp. 2542) (Puig et al., 2013, pp. 396) (Martinez-Lopez et al., 2014, pp. 3075) (Landgren et al., 2016, pp. 1567) (Munshi et al., 2020, pp. 5989–5990). MRD könnte in der Zukunft die Therapieentscheidung beeinflussen und so ein wichtiger Faktor für die personalisierte Medizin beim MM sein, die eine Unter- oder Überbehandlung vermeiden könnte (Rodriguez-Otero et al., 2021, pp. 6).

Modernere Methoden zur Untersuchung von MRD beim MM sind Klonalitätsanalysen des B-Zell-Rezeptors (BCR) durch Next Generation Sequencing (NGS) und die Analyse von exprimierten Oberflächenmarkern bei der multiparametrischen Durchflusszytometrie (MFC) bzw. bei Next Generation Flow (NGF) zur Unterscheidung von normalen und neoplastischen Plasmazellen.

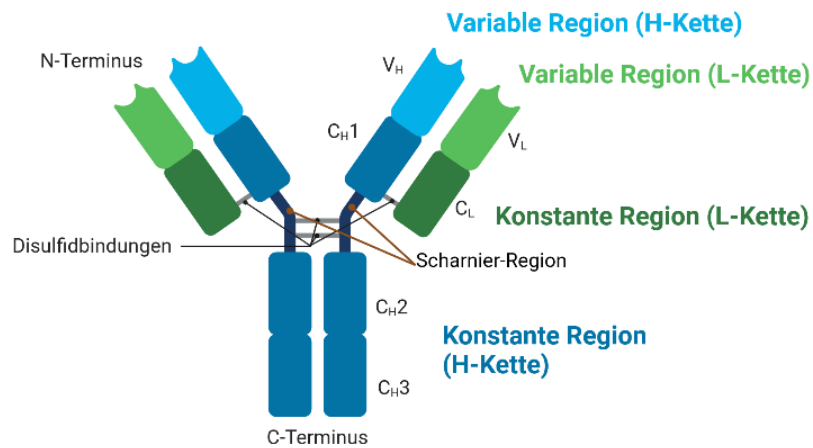
Da die MRD-Analyse mittels NGS noch nicht so weit verbreitet ist wie MFC/NGF, soll in dieser Arbeit die Durchführbarkeit in einem Routinelabor getestet werden, auch mit der Frage welche Sensitivität damit erreicht werden kann. Des Weiteren soll die Vergleichbarkeit mit anderen Methoden ermittelt werden.

1.1. Der B-Zell-Rezeptor

B-Zellen spielen bei der Reaktion des Immunsystems auf Viren und Bakterien eine zentrale Rolle. Als Teil der humoralen Immunantwort schützen sie durch Antigenerkennung in sekundären lymphatischen Organen den Körper vor mikrobiellen Toxinen, verhindern das Eindringen und die Verbreitung von Pathogenen und sorgen für die Aktivierung weiterer Mechanismen, die zur Eliminierung von Mikroben beitragen (Pieper et al., 2013, pp. 959) (Abbas et al., 2017, pp. 251) (Abbas et al., 2017, pp. 97) (Alberts et al., 2011, pp. 1778).

Struktur des B-Zell-Rezeptors

Diese Funktionen werden ermöglicht durch Immunglobuline (Ig), die ausschließlich von B-Zellen gebildet werden (Alberts et al., 2011, pp. 1778). Immunglobuline werden auch Antikörper (AK) genannt und können membrangebunden vorliegen, oder von B-Zellen sezerniert werden (Abbas et al., 2017, pp. 97–98). Der B-Zell-Rezeptor (BCR) besteht neben einem AK aus dem für die Signaltransduktion verantwortlichen Heterodimer $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ (Surova und Jumaa, 2014, pp. 102). Beide Komponenten des BCR sind in der Plasmamembran lokalisiert (Abbas et al., 2017, pp. 109). Der Mensch kann fünf AK-Klassen bilden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, welche sich durch ihre jeweilige schwere Kette (H-Kette; heavy) definieren (α , δ , ϵ , γ und μ) (Alberts et al., 2011, pp. 1778).



Created in BioRender.com bio

Abbildung 1: Aufbau eines Antikörpers

Ein Antikörper besteht aus je zwei identischen schweren und leichten Ketten, welche sich in konstante und variable Regionen unterteilen lassen. Die beiden Ketten werden durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die V-Regionen bilden die Antigen-Bindungsstelle und stellen zusammen mit C_L und C_{H1} die Fab-Region dar. C_{H2} und C_{H3} bilden die Fc-Region und definieren die AK-Klasse.

Abbildung modifiziert nach (Iwasaki, 2021)

Immunglobuline bestehen aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten (L-Ketten), welche einen Heterotetramer in Y-Form bilden, siehe Abbildung 1. Es gibt zwei verschiedene Typen von L-Ketten, κ und λ , die jeweils mit jeder Antikörperklasse assoziieren kann (Alberts et al., 2011, pp. 1789).

Die H-Kette besteht aus ca. 440 Aminosäuren (AS), während die L-Kette aus ca. 220 AS besteht (Alberts et al., 2011, pp. 1779) (Surova und Jumaa, 2014, pp. 102). Die beiden Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden und teilen sich in variable (V-Region, bzw. V_L / V_H) und konstante Regionen (C-Region, bzw. C_L / C_H) auf (Abbas et al., 2017, pp. 100) (Alberts et al., 2011, pp. 1786–1787). Die V-Regionen liegen am Aminoterminus (A-Terminus) und haben ihren Namen aufgrund der außergewöhnlich variierenden Sequenz erhalten. Sowohl V_L als auch V_H sind 110 AS lang und bilden zusammen die Antigen-Bindungsstelle. Die ungewöhnliche Variabilität der V-Regionen geht auf je drei ca. zehn AS-lange hypervariable Regionen zurück, die restlichen, weniger variablen Regionen der V-

Region werden Framework-Regionen genannt (FR1-3) (Alberts et al., 2011, pp. 1786). Da diese hypervariablen Regionen die komplementäre Antigen-Bindung bestimmen, werden sie auch complementarity-determining regions eins bis drei (CDR1-3) genannt, siehe Abbildung 2 (Abbas et al., 2017, pp. 101).

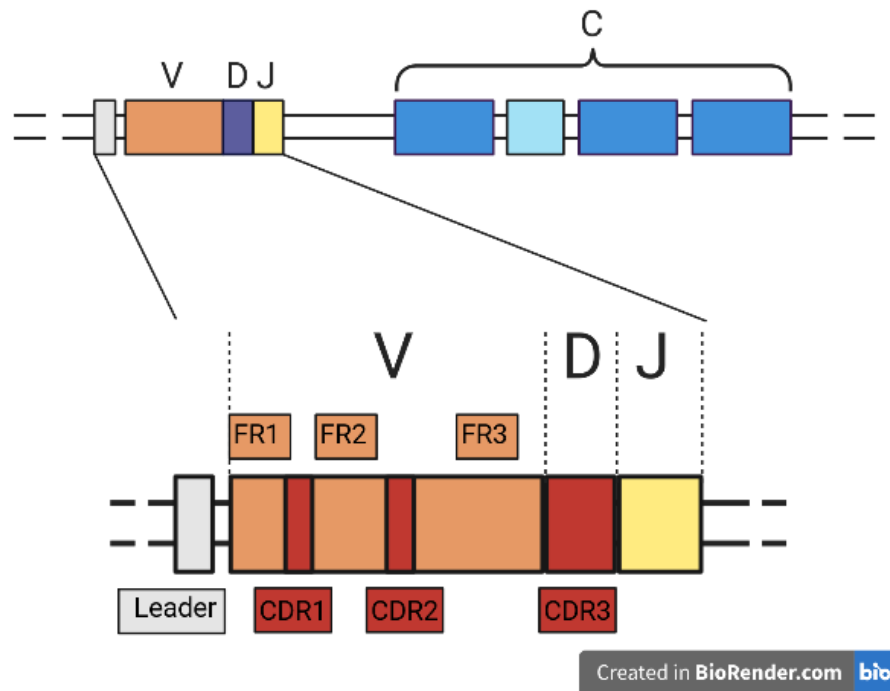


Abbildung 2: Struktur der V_H des BCR

Die FR1-3 liegen innerhalb des V-Gensegments der V-Region der H-Kette, ebenso wie CDR1 und 2. CDR3 beinhaltet das D-Gensegment der V-Region der H-Kette.

Abbildung modifiziert nach (Iwasaki, 2020) und (Georgiou et al., 2014, pp. 159)

Am Carboxylterminus (C-Terminus) liegen die C-Regionen der beiden Ketten. C_L ist, identisch mit V_L, 110 AS lang, die Länge von C_H hingegen variiert und bestimmt die Klasse des AK. C_H kann zwischen 330 und 440 AS lang sein und besteht meist aus drei Domänen (C_H1-3; nur IgM und IgE haben vier C_H). C_H2 und C_H3 wird auch Fc-Region (crystallisable fragment) genannt, die L-Kette zusammen mit V_H und C_H1 Fab-Region (antigen-binding fragment) (Alberts et al., 2011, pp. 1786–1787) (Abbas et al., 2017, pp. 100). Verbunden werden die Fab-Regionen mit der Fc-Region durch eine Scharnierregion, siehe Abbildung 2. Diese erlaubt eine hohe Flexibilität des AK, wodurch erreicht wird, dass zwei Antigene in variabler Distanz zueinander von den beiden Antigenbindungsstellen gleichzeitig

gebunden werden kann. Die Länge der Scharnierregion variiert je nach Klasse des AK zwischen zehn und mehr als 60 AS (Abbas et al., 2017, pp. 104–105).

Reifung der B-Zellen

Damit eine funktionelle B-Zelle entsteht, welche intakte AK produzieren kann, muss sie eine Reihe von Entwicklungsstufen durchlaufen. Der B-Zelle geht die hämatopoetische Stammzelle (HP-SZ) voraus und die Entwicklung startet im adulten Menschen im Knochenmark (KM) (Pieper et al., 2013, pp. 960), siehe Abbildung 3.

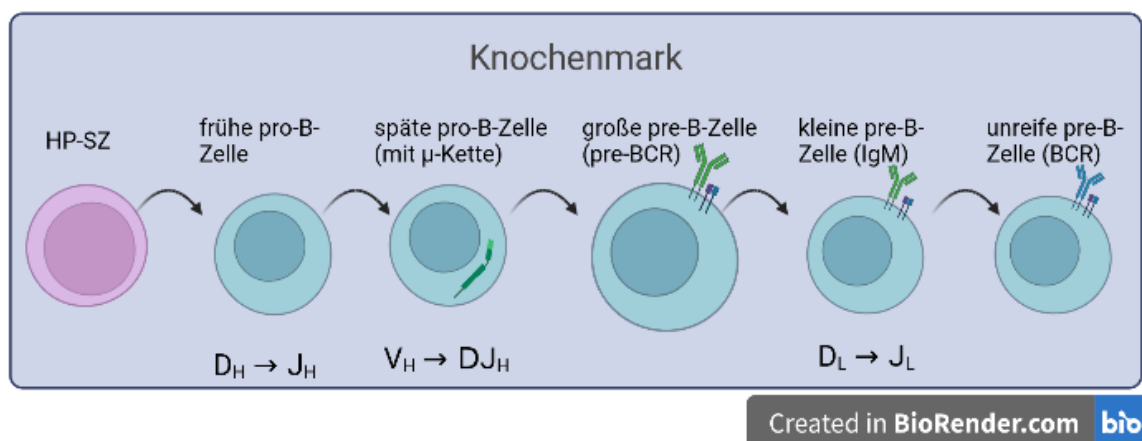


Abbildung 3: B-Zell-Entwicklung im Knochenmark

Im KM reicht die Entwicklung der B-Zellen von der HP-SZ bis zu unreifen pre-B-Zelle. Charakterisiert sind die Hauptstadien der Entwicklung der pro-B-Zellen und der pre-B-Zellen durch das Rearrangement der Gensegmente der H- und L-Kette und der Expression von Oberflächenmarkern.

Abbildung modifiziert nach (Chi et al., 2020, pp. 235)

Die Entwicklungsstadien im KM reichen von der pro-B-Zelle über die pre-B-Zelle und werden gekennzeichnet durch das sequenzielle Rearrangement der Gensegmente der H- und L-Kette (Eibel et al., 2014, pp. 1). Kodiert wird die H-Kette vom *IGH*-Lokus, welcher sich auf Chromosom 14 im Menschen befindet (Chi et al., 2020, pp. 233). V_H gliedert sich in drei Gensegmente auf: ein V-Gensegment (variable), ein D-Gensegment (diversity) und ein J-Gensegment (joining). Beim Menschen existieren auf dem *IGH*-Lokus 40 V-Gensegmente, 25 D-Gensegmente und sechs J-Gensegmente, wodurch eine kombinatorische Möglichkeit für 6.000

V_H gegeben ist. Die V-Regionen der L-Kette besteht nur aus V- und J-Gensegmenten und kann für κ 200 und für λ 120 unterschiedliche Kombinationen bilden. Dadurch entsteht insgesamt die Möglichkeit für $1,9 \times 10^6$ verschiedene Antigen-Bindungsstellen (Alberts et al., 2011, pp. 17890–17892).

Auch der Vorgang der V(D)J-Rekombination selbst trägt weiter zur Vielfalt der AK bei. Bei der Verknüpfung der Gensegmente wird durch den Enzymkomplex V(D)J-Rekombinase, der aus RAG1 (Recombination-activating gene) und RAG2 besteht, an konservierten Rekombinations-Signalsequenzen ein Doppelstrangbruch (DSB) erzeugt. Die Signalsequenzen stellen sicher, dass die Gensegmente in der richtigen Reihenfolge und auch jeweils nur eines der drei VDJ-Gensegmente miteinander verknüpft werden. Neben der V(D)J-Rekombinase, die nur in frühen B-Zellen vorkommt, sind auch weitere Enzyme beteiligt, welche bei der Reparatur der DNA durch non homologous end joining (NHEJ) eine Rolle spielen. Wie beim NHEJ bei der Reparatur von DSB in anderen Zellen auch, können bei der V(D)J-Rekombination Nukleotide verloren gehen oder hinzugefügt werden. Dadurch wird die Variabilität der Sequenz weiter erhöht. Allerdings kann dieser Vorgang auch dazu führen, dass sich das Leseraster verschiebt und kein funktionsfähiger AK entstehen kann. In diesem Fall stirbt die Zelle im KM durch Apoptose (Chi et al., 2020, pp. 234) (Alberts et al., 2011, pp. 1792–1793).

Eine weitere Besonderheit von B-Zellen ist, dass sie nur ein Allel der V_L und V_H exprimieren. Theoretisch liegen sechs Antikörper-Loci in der diploiden Zelle vor: zwei V_H , zwei $V_L \kappa$ und zwei $V_L \lambda$, welche zu acht unterschiedlichen Antigen-Bindungsstellen führen könnten. Die Monospezifität erreichen B-Zellen, indem sie Allel-Ausschluss durchführen. Durch eine negative Rückkopplung werden bei den V(D)J-Rekombinationen nach der Verknüpfung der Gensegmente weitere Umlagerungen unterdrückt (Alberts et al., 2011, pp. 1793–1794) (Abbas et al., 2017, pp. 195).

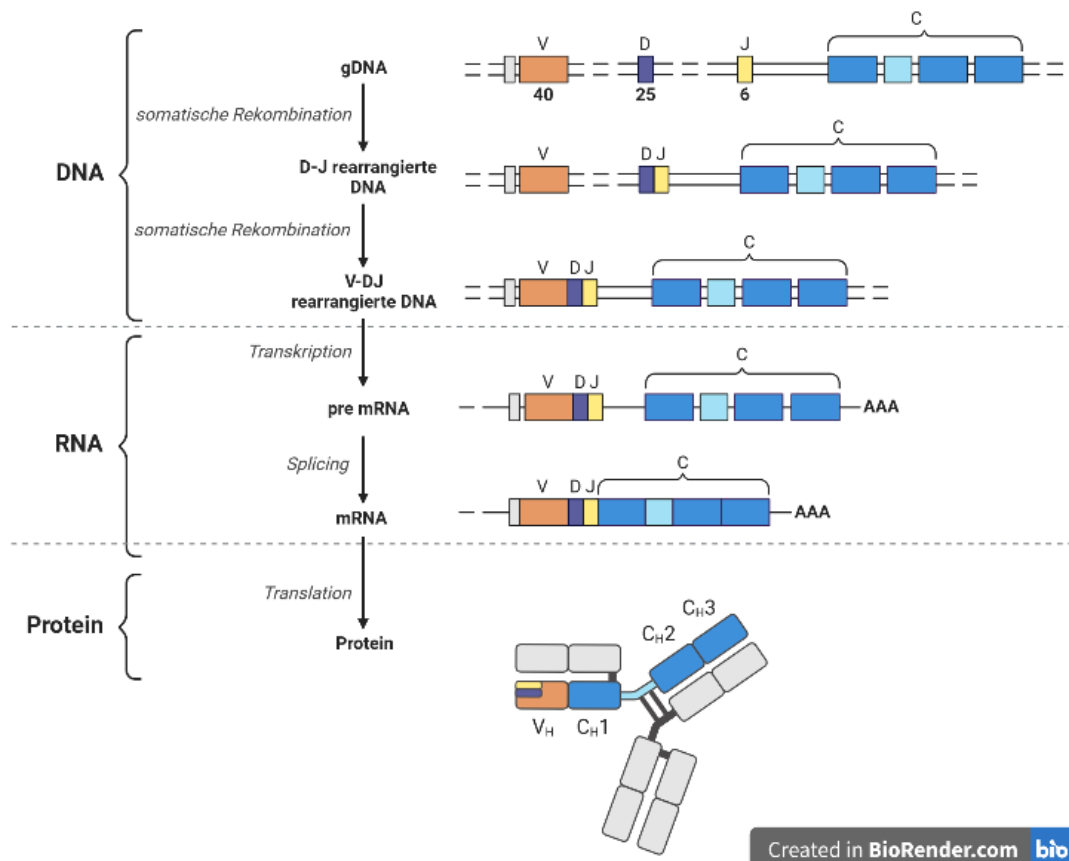


Abbildung 4: Rekombination der schweren Kette von Immunoglobulinen/Antikörpern des B-Zellrezeptors (BCR)

Bei der ersten somatischen Rekombination der V_H werden ein D- und ein J-Gensegment miteinander verbunden, bei der zweiten somatischen Rekombination wird ein V-Gensegment an das bereits entstandene DJ-Gensegment angehängt. Somit ist das VDJ-Gensegment komplett und die H-Kette des BCRs kann transkribiert und translatiert werden.

Abbildung modifiziert nach (Iwasaki, 2020)

Im KM startet die V(D)J-Rekombination der H-Kette mit den D- und J-Gensegmenten der V_H . Die so entstandene frühe pro-B-Zelle wird nach Rearrangement des V-Gensegments an das bereits rearrangierte DJ-Gensegment zur späten pro-B-Zelle, siehe Abbildung 3 und Abbildung 4. Nach einem erfolgreichen Rearrangement der Gensegmente der H-Kette kann die große pre-B-Zelle entstehen, welche einen pre-BCR exprimiert, der aus μ -Ketten, Ersatzleichte-Ketten und dem membranständigen signalübertragenden Heterodimer $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ besteht (Eibel et al., 2014, pp. 1). Die Transkription des pre-BCR ist nur nach erfolgreicher Umlagerung der VDJ-Gensegmente möglich, da sich dadurch

die Lage des Promotors zu Enhancern und Silencern ändert (Alberts et al., 2011, pp. 1790). Die Assoziation mit $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ ist erforderlich, um den pre-BCR zur Zelloberfläche zu transportieren (Surova und Jumaa, 2014, pp. 103). Durch die Expression des pre-BCR wird die VJ-Rekombination der L-Kette induziert. Nach erfolgreichem Rearrangement der VJ-Gensegmente der L-Kette exprimiert die unreife pre-B-Zelle IgM. Damit ist die antigen-unabhängige Entwicklung im KM abgeschlossen und die Zellen können in sekundäre lymphatische Organe wie die Milz oder Lymphknoten migrieren (Eibel et al., 2014, pp. 1–2) (Young und Brink, 2021, pp. 1652).

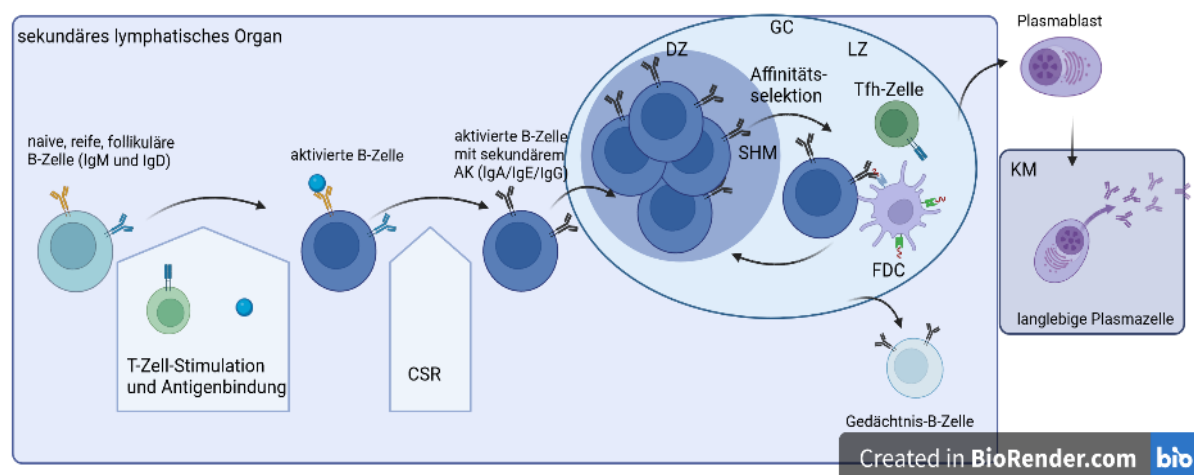


Abbildung 5: B-Zell-Aktivierung, Affinitätsreifung und Differenzierung zu Gedächtniszellen und Plasmazellen

Durch Antigenbindung und Stimulation von T-Helferzellen werden naive, follikuläre reife B-Zellen aktiviert. Es folgen CSR und SHM zur weiteren Affinitätsreifung. Während in der DZ des GC die Proliferation und SHM stattfindet, wird in der LZ die Spezifität des BCR durch FDC und Tfh-Zellen getestet. Je nach Spezifität kehrt die B-Zelle zurück in die DZ oder die Zellen verlassen als Gedächtniszellen oder Plasmablasten das GC. Durch Rückkehr zum KM differenziert der Plasmablast zur langlebigen Plasmazelle.

Abbildung modifiziert nach (Mesin et al., 2016, pp. 472) und (Küppers, 2005, pp. 255)

Nachdem die B-Zellen das KM verlassen haben fangen sie an, neben IgM noch membrangebundenes IgD zu synthetisieren. In diesem Stadium wird die B-Zelle als (naive) reife, follikuläre B-Zelle bezeichnet, siehe auch Abbildung 5. Beide Rezeptoren besitzen dieselbe Antigen-Bindungsstelle, da dieselben V(D)J-Gensegmente verwendet werden. Dies passiert noch vor der ersten

Antigenbindung (Alberts et al., 2011, pp. 1797) (Abbas et al., 2017, pp. 197). Sobald die B-Zelle ein Antigen bindet, wird diese in Abhängigkeit von T-Helferzellen-Stimulation aktiviert, was dazu führt, dass sie AK, die die gleiche Antigen-Bindungsstelle wie der BCR besitzen, sezerniert (Alberts et al., 2011, pp. 1778).

Ein weiterer Effekt ist, dass die B-Zellen Keimzentren (germinal centers; GC) ausbilden, in denen sie proliferieren, mutieren und ihre neue BCR-Spezifität austesten. Ein GC besteht aus zwei Zonen: einer hellen (light zone; LZ) und einer dunklen Zone (DZ) (Suan et al., 2017, pp. 97) (Ise und Kurosaki, 2019, pp. 65).

In der DZ wird durch Hochregulierung des Enzyms aktivierungsinduzierte Deaminase (AID) erreicht, dass sich die B-Zelle somatischer Hypermutation (SHM) unterzieht (Pieper et al., 2013, pp. 965). AID wird nur in aktivierten B-Zellen exprimiert und desaminiert vor allem in den CDR1-3 der V-Regionen Cytosin (C) zu Uracil (U). Dieser Vorgang führt durch die Entstehung von U:G (Guanin)-Fehlpaarungen zur Aktivierung von Reparaturmechanismen der DNA, wie zum Beispiel mismatch repair (MMR) oder base excision repair (BER), die je nach verwendetem Reparaturmechanismus zu unterschiedlichen Mutationen führen. Die höhere Fehlerhäufigkeit des Reparaturmechanismus wird durch nicht-kanonischen MMR und BER unter anderem dadurch erreicht, dass fehleranfälliger Polymerasen rekrutiert werden (Chi et al., 2020, pp. 239) (Mesin et al., 2016, pp. 472) (Abbas et al., 2017, pp. 266–267). Der Name SHM kam zustande, da die Mutationen mit einer Frequenz von einer Mutation je V-Region in jeder Zellgeneration stattfinden, was 1.000.000-mal häufiger ist als in anderen Genen (Alberts et al., 2011, pp. 1795).

In der LZ des GC wird der BCR der B-Zelle, welche SHM durchlaufen hat, durch antigenpräsentierende folliculäre dendritische Zellen (FDC) und antigenspezifische folliculäre T-Helferzellen (Tfh-Zellen) auf seine Spezifität getestet. Je nach Stärke der Spezifität erhält die B-Zelle das Signal zur DZ des GC für weitere SHM zurückzukehren, oder ihren Weg zur Differenzierung in Richtung Gedächtniszellen oder Plasmazellen fortzusetzen (Suan et al., 2017, pp. 97) (Ise und Kurosaki, 2019, pp. 65).

Ein weiterer Vorgang, bei der AID involviert ist, ist class switch recombination (CSR) (Pieper et al., 2013, pp. 965) (Abbas et al., 2017, pp. 264). Hierbei ändert die B-Zelle ihre AK-Klasse, indem sie die C_H-Sequenz ändert, die die Klasse eines Antikörpers definiert, während die Antigen-kodierenden VDJ-Sequenzen der V-Region unverändert bleiben. Der Klassenwechsel (class switch; CS) ist ein unumkehrbarer Prozess, dessen Ergebnis Gedächtniszellen sind, bei denen IgG, IgE oder IgA membrangebunden vorliegt, oder Plasmazellen, die IgG, IgE oder IgA sezernieren (Alberts et al., 2011, pp. 1795–1796). Erreicht wird der CS durch einen AID-induzierten DSB in den nicht kodierenden Rekombinations-Signalsequenzen, die zwischen den verschiedenen C_H liegen, die man Switch-Regionen nennt. Die Sequenz zwischen einer Donor- und einer Akzeptor-Switch-Region wird deletiert und die Sequenzen durch NHEJ zusammengefügt (Chi et al., 2020, pp. 239–240).

Lange hatte man angenommen, dass CSR wie SHM im GC stattfindet. Dafür gibt es allerdings keine Belege, stattdessen gibt es Hinweise, dass der CS vor der Formation des GC in aktivierten B-Zellen stattfindet (Young und Brink, 2021, pp. 1657–1658). Durch die beiden positiven Selektionen des CS und der SHM entstehen hochspezifische B-Zellen (Young und Brink, 2021, pp. 1658).

Nach Durchlaufen des GC zirkulieren Plasmablasten, bis sie in die KM-Nische zurückkehren, wo sie weiter differenzieren und zu langlebigen Plasmazellen werden (Abbas et al., 2017, pp. 269).

1.2. Das multiple Myelom

Das multiple Myelom (MM) zählt laut WHO innerhalb der B-Zell-Lymphome zu den Plasmazellneoplasien (Alaggio et al., 2022, pp. 1722–1724). Das MM macht etwa 1 % aller Krebsarten und 10 % aller hämatologischen Krebsarten aus und ist damit die zweithäufigste hämatologische Krebsart in Europa, mit einer Inzidenz von 4,5 - 6 : 100.000 pro Jahr (Dimopoulos et al., 2021, pp. 309) (Rajkumar, 2022, pp. 1086). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen und Afroamerikaner etwa doppelt so häufig im Vergleich zu weißen US-Amerikanern. Das mediane Alter bei der Erstdiagnose beträgt etwa 65 Jahre (Rajkumar, 2022, pp. 1086). Vor der Einführung moderner Therapien und der autologen Stammzelltransplantation (ASCT) galt das MM als unheilbare Krankheit (Dimopoulos et al., 2021, pp. 319).

Auch wenn sich die Heilungschancen verbessert haben, hängt das Gesamtüberleben von der Tumorlast, der Tumorbilogie und dem Ansprechen auf die Therapie ab und beträgt ca. 10-15 % (Rajkumar, 2022, pp. 1089) (Dimopoulos et al., 2021, pp. 309). Trotz der Verbesserungen bei der Behandlung können die meisten Patient*innen nicht geheilt werden und erleiden irgendwann ein Rezidiv (Rodriguez-Otero et al., 2021, pp. 1).

Bei fast allen Patient*innen entsteht das MM aus der asymptomatischen prämaligen Vorstufe der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), bei der im KM < 10 % klonale Plasmazellen gefunden werden, siehe auch Abbildung 7. Bei MGUS sind die monoklonalen AK, die auch als monoklonales M-Protein bezeichnet werden, im Blut nachweisbar. Durch Immunfixation in Serum und Urin lassen sich diese nachweisen und durch Serumprotein-Elektrophorese und einem freie Leichtketten-Test quantitativ bestimmen (Caers et al., 2018, pp. 1773). Aus einer MGUS entwickelt sich nur aus 1 % der Fälle pro Jahr ein MM und ist bei etwa 50 % aller Menschen über 50 Jahren nachweisbar. Eine weitere asymptomatische Vorstufe des MM ist das schwelende multiple Myelom (SMM). SMM ist eine fortgeschrittenere Vorstufe, bei der 10 - 60 % klonale Plasmazellen im KM nachweisbar sind, aber weiterhin keine Endorganschäden. Ca. 10 % der SMM-Fälle entwickeln sich innerhalb der ersten fünf Jahre zu einem MM, danach nimmt die Progressionsrate ab, bis sie nach zehn Jahren noch bei 1,5 % pro Jahr liegt (Rajkumar, 2022, pp. 1087) (Rodriguez-Otero et al., 2021, pp. 1). Während ca. 80 % aller MM aus nicht-IgM MGUS hervorgeht, entwickeln sich die restlichen ca. 20 % aus Leichtketten MGUS (Rajkumar et al., 2014, pp. e538).

Die Patient*innen leiden beim MM unter Knochenschmerzen, Müdigkeit, Infektneigung und schäumendem Urin (Wörmann et al., 2018). Bedingt werden diese Symptome durch die Endorganschäden, welche unter dem Akronym CRAB zusammengefasst werden: hyper**C**alcemia (Hyperkalzämie), **R**enal failure (Nierenversagen), **A**nämie, lytic **B**one lesions (Osteolysen), siehe auch Abbildung 6 (Cowan et al., 2022, pp. 464) (Rajkumar, 2022, pp. 1087).

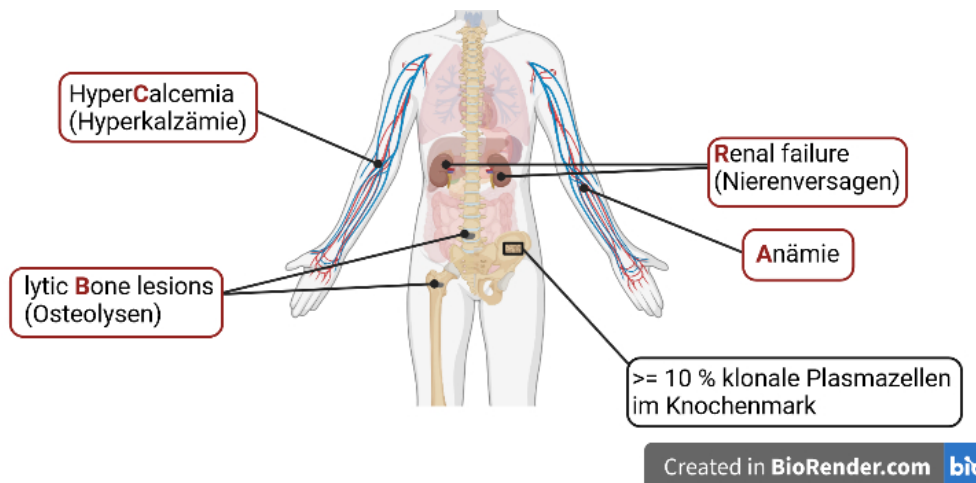


Abbildung 6: CRAB-Kriterien beim MM

Unter den CRAB-Kriterien zur Diagnose eines MM versteht man folgende Endorganschäden: Hyperkalzämie, Nierenversagen, Anämie und Osteolysen. Zusätzlich müssen für die Diagnosestellung mindestens 10 % klonale Plasmazellen im KM vorhanden sein.

Um die Diagnose eines MM zu stellen, muss ein oder mehr Myelom-definierendes Event und $\geq 10\%$ klonale Plasmazellen im KM vorliegen. Zu den Myelom-definierenden Events zählen neben den CRAB-Kriterien noch drei Biomarker, die unter dem Namen SLiM zusammengefasst werden: klonale Plasmazellen im KM $> 60\%$ (**S**ixty), ein abnormaler freier Leichtketten-Quotient ≥ 100 (**L**ight chain) und mehr als ein Herdbefund $> 5\text{ mm}$ bei der **M**agnetresonanztomographie (MRT), siehe auch Abbildung 6 und Abbildung 7. Die drei Biomarker der SLiM-Kriterien sind mit einem 80 % Risiko für Endorganschäden assoziiert. Ihre Einführung durch die International Myeloma Working Group (IMWG) als Diagnosekriterien im Jahre 2014 sorgte dafür, dass, im Vergleich zu den CRAB-Kriterien alleine, eine frühere Diagnose gestellt werden kann. Dadurch kann eine Therapie bereits eingeleitet werden, bevor die Endorganschäden entstehen (Rajkumar et al., 2014, pp. e540–e542) (Rajkumar, 2022, pp. 1087) (Caers et al., 2018, pp. 1773).

Diagnose/ Kriterien	MGUS	SMM	MM	
klonale Plasmazellen im KM [%]	< 10	≥ 10 - 60	≥ 10	≥ 60
	und	und/ oder	und/ oder	
Monoklonales Protein im Serum/ Urin	< 30 g/l / < 500 mg/24 h ³	≥ 30 g/l / ≥ 500 mg/24 h ³	nachweisbar	
	und	und	und	
Endorganschäden	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	nachweisbar	
	und		oder	
abnormaler freier Leichtkettenquotient	nachweisbar		> 100 und betroffene Leichtkette ≥100 mg/l	
			oder	
bildgebende Verfahren			> 1 Herdbefund im MRT	

Abbildung 7: Übersicht der Diagnosekriterien von MGUS, SMM und MM inklusive der SLiM-CRAB-Kriterien.

Je nach Anzahl der klonaler Plasmazellen im KM, monoklonalem Protein im Serum und Urin und dem Nachweis von Endorganschäden (unter den Endorganschäden versteht man die CRAB-Kriterien: Hyperkalzämie, Nierenversagen, Anämie und Osteolysen), sowie weiteren Myelom-definierenden Events unterscheidet man die prämaligen Vorstufen MGUS und SMM vom MM.

Abbildung modifiziert nach (Wörmann et al., 2018)

Zur Diagnose des MM sind unterschiedliche Disziplinen und Tests erforderlich.

Während die Anzahl an Plasmazellen im KM zytomorphologisch bestimmt werden kann, muss deren Monoklonalität durch Durchflusszytometrie bestätigt werden. Bei der Durchflusszytometrie werden immunphänotypische Marker untersucht, die neoplastische Plasmazellen von normalen Plasmazellen unterscheiden, z.B. CD38, CD45, CD138 und zur Abgrenzung zu normalen Plasmazellen CD19, CD20, CD27, CD28, CD56, CD81 und CD117. Die Durchflusszytometrie spielt nicht nur bei der Erstdiagnose, sondern auch bei der Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) eine wichtige Rolle (Caers et al., 2018, pp. 1774).

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Untersuchungen, ist eine FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)-Untersuchung an sortierten CD138 positiven-KM-Zellen erforderlich, um eine Stadieneinteilung und Prognoseabschätzung vorzunehmen. Untersucht wird unter anderem auf del(17p), Translokationen mit Beteiligung des *IGH*-Lokus (z.B. t(4;14), t(6;14), t(11;14), t(14;16), t(14;20)), Zugewinn (1q) und Trisomien (Rajkumar, 2022, pp. 1087) (Caers et al., 2018, pp. 1775).

Auch auf DNA-Ebene lassen sich mittels NGS (Next Generation Sequencing) zahlreiche Veränderungen feststellen, deren klinische Relevanz noch nicht klar und Teil von Studien ist. Mutationen in den *RAS*-Genen (*KRAS*, *NRAS*) sowie *BRAF* stellen potenziell klinisch relevante Veränderungen oder therapeutische Ziele dar, auch wenn die Untersuchung auf Mutationen bisher kein Standard im klinischen Setting ist (Caers et al., 2018, pp. 1776) (Rajkumar, 2022, pp. 1089). Auch *TP53* Veränderungen können gefunden werden, welche mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind, im Revised Multiple Myeloma International Staging System (R-ISS) der IMWG aber bisher nicht berücksichtigt werden (Walker et al., 2018, pp. 167–168).

Was für die Entstehung eines MM verantwortlich ist, ist immer noch Teil wissenschaftlicher Untersuchungen und nicht abschließend geklärt. Zu den Risikofaktoren zählen, wie bei anderen Krebsarten auch, unter anderem Übergewicht, chronische Entzündungen und Exposition zu Pestiziden und Strahlung. Außerdem gibt es Hinweise auf genetische Prädisposition (Donk et al., 2021, pp. 410) (Cowan et al., 2022, pp. 465).

Man geht davon aus, dass der erste Schritt der Transformation der regulären B-Zelle zur Myelom-Zelle der Erwerb von Trisomien (ca. 40 % der MM-Fälle) oder *IGH*-Translokationen (ca. 60 % der MM-Fälle) ist. Bei einer kleinen Anzahl an Patient*innen kann man Trisomien und *IGH*-Translokationen gleichzeitig beobachten. Diese Veränderungen treten bereits bei MGUS und SMM auf und werden auch als primäre zytogenetische Veränderungen bezeichnet (Rajkumar, 2022, pp. 1087) (Donk et al., 2021, pp. 411). Die Translokationen resultieren in aberranten Fusionsgenen, wenn durch AID-induzierte DSB bei der CSR der starke *IGH*-Enhancer in räumliche Nähe zu Onkogenen gebracht wird. Durch den dadurch entstehenden Überlebens- und Proliferationsvorteil der prämaligen Zelle werden dann im Laufe der Zeit weitere, sekundäre Veränderungen, wie weitere Translokationen, Kopienzahlveränderungen und somatische Mutationen akkumuliert, die die Transformation zur malignen Myelom-Zelle vorantreiben (González et al., 2007, pp. 3112) (Rodríguez-Otero et al., 2021, pp. 1) (Morgan et al., 2012, pp. 336) (Donk et al., 2021, pp. 411). Die Häufigkeit der sekundären Veränderungen ist in den einzelnen zytogenetischen Untergruppen sehr

unterschiedlich und auch epigenetische Veränderungen spielen bei der Entstehung des MM eine Rolle (Donk et al., 2021, pp. 411).

Auf die endgültig maligne Transformation und die Immortalisierung der Myelom-Zelle scheint die KM-Nische einen großen Einfluss zu haben (González et al., 2007, pp. 3117–3118) (Morgan et al., 2012, pp. 337). Durch den Selektionsdruck beim Zugang zur Nische und einer Koevolution zwischen den Myelom-Zellen und den Zellen des Microenvironment des KM wird die Proliferation und das Überleben der Myelom-Zellen gefördert. Diese Koevolution kann auch die klonale Heterogenität von Proben erklären, die von unterschiedlichen Stellen des KM einer Patientin oder eines Patienten entnommen werden. Erreicht wird das verbesserte Überleben der Myelom-Zellen durch mesenchymale Stromazellen, die direkt mit den Myelom-Zellen interagieren oder Wachstumsfaktoren und anti-apoptischen Faktoren sekretieren (Ghobrial et al., 2018, pp. 221) (Donk et al., 2021, pp. 411).

Aufgrund der genetischen Komplexität wird vorgeschlagen, dass man das MM nicht als einzelne Entität, sondern als Kollektion verschiedener Krankheitssubtypen betrachten sollte, die sich zytogenetisch unterscheiden (Rajkumar, 2022, pp. 1087) (Rodriguez-Otero et al., 2021, pp. 2).

1.3. Minimale Resterkrankung

Die Entwicklung immer effektiverer Behandlungsmöglichkeiten geht auch immer mit der Entwicklung sensitiverer Methoden zum Nachweis der Resterkrankung einer Krebserkrankung im Verlauf einher, so auch beim MM.

Während in der Vergangenheit das Therapieziel eine Stabilisierung der damals unheilbaren Krankheit war, bei der ein partielles Ansprechen auf die Behandlung ausreichte, wurde es im Laufe der Zeit in Richtung kompletter Remission (CR) verschoben. Maßgeblich daran beteiligt war die Entwicklung neuer Agenzien, wie zum Beispiel Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib und der ASCT. CR wurde im Jahre 2006 definiert als die Abwesenheit von monoklonalen Urin- und Serum-Paraproteinen in der Immunfixation und weniger als 5 % Plasmazellen im KM. Auf CR folgte dann im Jahre 2011 die strenge CR (sCR), bei der zusätzlich durch Immunhistochemie keine klonalen Plasmazellen im KM nachweisbar sein dürfen

und ein normalisierter freier Leichtkettenquotient vorliegen muss (Martinez-Lopez et al., 2014, pp. 3073) (Ho et al., 2021, pp. 182) (Landgren und Owen, 2016, pp. 14).

Diese Entwicklungen spiegeln auch die Einführung der SLiM-Kriterien zur Diagnose wider, die, im Vergleich zu den CRAB-Kriterien, ein frühzeitigeres Erkennen der Erkrankung und eine Behandlung möglich machen (Rodriguez-Otero et al., 2021, pp. 4).

Während mit älteren Therapien weniger als 50 % der Patient*innen eine CR erreichten, erreichen heutzutage bis zu 80 % der Patient*innen eine CR. Trotzdem erleiden die meisten Patient*innen ein Rezidiv. Dies deutet darauf hin, dass CR und auch sCR als Kriterium nicht ausreichen, um das Ansprechen auf eine Therapie zu beurteilen und Patient*innen prognostisch zu stratifizieren (Martinez-Lopez et al., 2014, pp. 3073) (Ho et al., 2021, pp. 182) (Mailankody et al., 2015, pp. 286) (Landgren und Owen, 2016, pp. 15).

Um langfristig das Ziel der Heilung anzuvisieren, ist bei Krebserkrankungen eine Eliminierung aller Tumorzellen nötig. Das Erreichen und Aufrechterhalten einer möglichst tiefen Remission, was einen Kernpunkt für die Bewertung einer Therapie darstellt, benötigt eine Überwachung durch möglichst sensitive Methoden (Rodriguez-Otero et al., 2021, pp. 2–4). Um auf den Bedarf an sensitiveren Methoden für die Untersuchung und Quantifizierung von minimaler Resterkrankung (MRD) zu reagieren, wurden vermehrt Tests für KM-Aspirate, wie MFC, allelspezifische Oligonukleotid-qPCR (ASO-qPCR) und NGS in klinischen Studien eingesetzt (Kumar et al., 2016, pp. e329).

In den Studien konnten zum Beispiel Paiva et al., Rawstron et al., Puig et al. und Martinez-Lopez et al. zeigen, dass der MRD-Status einen unabhängigen Prognosemarker für progressionsfreies Überleben (PFS; progression free survival) und Gesamtüberleben (OS; overall survival) darstellt (Paiva et al., 2008, pp. 4020) (Rawstron et al., 2013, pp. 2542) (Puig et al., 2013, pp. 396) (Martinez-Lopez et al., 2014, pp. 3075). Diese Beobachtungen konnten auch in Meta-Analysen bestätigt werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Sensitivität der Untersuchung eine entscheidende Rolle spielt: je tiefer die MRD-Negativität nachgewiesen wurde, desto länger waren das PFS und OS (Landgren et al., 2016,

pp. 1567) (Munshi et al., 2017, pp. 32–33) (Munshi et al., 2020, pp. 5989–5990). Die klinische Interpretation wird allerdings durch die verschiedenen Herangehensweisen der unterschiedlichen Methoden zur Untersuchung von MRD erschwert (Mailankody et al., 2015, pp. 286).

2016 veröffentlichte die IMWG eine Empfehlung, dass bei klinischen Studien die Überwachung von MRD durch MFC und/oder NGS erfolgen sollte und forderten außerdem dazu auf, auch archivierte Proben zur Validierung des klinischen Nutzens zu untersuchen (Kumar et al., 2016, pp. e342).

ASO-qPCR gehört nicht zu den von der IMWG empfohlenen Methoden, obwohl sie eine Sensitivität von 10^{-5} erreichen kann und es sich hierbei um eine weit verbreitete und spezifische Methode handelt (Kumar et al., 2016, pp. e331–e333) (Caers et al., 2018, pp. 1779) (Puig et al., 2013, pp. 391). Grund dafür ist, dass diese Methode sehr zeitaufwendig und technisch komplex ist. So muss eine Diagnoseprobe verfügbar sein, aus der als ersten Schritt eine qualitative Bestimmung der Klonalität der rearrangierten V(D)J-Gensegmente der V-Region der H- und L-Kette durch mehrere Multiplex-PCRs mit Konsensprimern der BIOMED-2 Gruppe bestimmt werden kann. Danach findet eine Sanger-Sequenzierung statt, um die für die Patientin oder den Patienten spezifische CDR3-Sequenz zu identifizieren. Durch diese Sequenz können dann spezifische Primer und/oder Sonden designt werden. Erst danach kann die ASO-qPCR mit designten oder Konsensprimern und/oder designten oder Konsenssonden stattfinden. Zusätzlich muss aus der DNA, die bei der Diagnose verwendet wurde, zusammen mit fünf bis zehn Wildtyp (WT)-DNAs eine Standardkurve hergestellt werden, um die Quantifizierung der zukünftigen Verlaufspalten zu erlauben (Caers et al., 2018, pp. 1779) (Bai et al., 2018, pp. 12).

Ein weiterer, sehr kritischer Nachteil ist die geringe Anwendbarkeit der Methode. Es kann nur ein geringer Anteil an Patient*innen mit MM von einer MRD-Untersuchung mittels ASO-qPCR profitieren. Die Zahlen schwanken zwischen ~ 40 % und 75 % bei Verwendung von Primern und Sonden, die spezifisch für die Patientin oder den Patienten sind, und liegen bei der Verwendung von Konsensprimern und -sonden nur bei 23 %. Grund dafür sind die SHM in den V-Regionen, die sowohl den Nachweis der Klonalität durch die PCR, als auch die

Performance der qPCR beeinflussen können (Puig et al., 2013) (Martinez-Lopez et al., 2014, pp. 3073–3074) (Bai et al., 2016, pp. 1) (Sarasquete et al., 2005, pp. 1368).

Eine deutlich bessere Anwendbarkeit haben MFC (fast 100 %) und NGS (über 90 %) (Yanamandra und Kumar, 2018, pp. 1776) (Martinez-Lopez et al., 2014, pp. 3074) (Ho et al., 2021, pp. 181).

Bei der MFC nutzt man die unterschiedlichen exprimierten Oberflächenmarker, um zwischen normalen und Myelom-Plasmazellen zu unterscheiden. Indem man fluoreszenzmarkierte AK verwendet, die in neoplastischen Plasmazellen nicht vorhanden (z. B. CD19 und CD45) und stark positiv (z.B. CD56 und CD117) sind, sowie Marker, die in allen Plasmazellen des KM vorkommen (CD38 und CD138), können die Myelom-Zellen identifiziert werden. Zusätzlich können Marker verwendet werden, die über die Leichtkettenrestriktion eine Aussage über die Klonalität erlauben (Mailankody et al., 2015, pp. 287) (Bai et al., 2018, pp. 19) (Flores-Montero et al., 2017, pp. 2097).

Je mehr Farben verwendet werden, desto sensitiver und spezifischer ist die Untersuchung. Im Laufe der Entwicklung der Methode vom 4-Farben MFC, über 8- bis 10-Farben MFC zu durch EuroFlow standardisierten Next Generation Flow Cytometry (NGF) mit 2-Tubes-8-Farben-Ansatz hat sich auch die Sensitivität von anfangs 10^{-4} auf bis zu 10^{-6} verbessert (Mailankody et al., 2015, pp. 292) (Caers et al., 2018, pp. 1779). Die Standardisierung durch EuroFlow beinhaltet sowohl Aspekte der Probenvorbereitung, der Zusammensetzung des AK-Panels und die automatisierte Analyse der Daten, bei denen Referenzdatenbankengenutzt werden (Flores-Montero et al., 2017, pp. 2094). Dadurch kann die in der Vergangenheit kritisierte hohe Variabilität zwischen einzelnen Laboren durch fehlende Standards überwunden werden. Im Jahre 2014 hatte ein Vergleich zwischen den größten Instituten in den USA aufgezeigt, dass MRD-Untersuchungen beim MM durch MFC einen einhundertfachen Sensitivitätsunterschied aufweisen, die Qualität der Untersuchung also stark unterschiedlich sein kann (Mailankody et al., 2015, pp. 292).

Weitere Vorteile der MFC/ NGF sind, dass es sich hierbei um eine weit verbreitete Methode handelt, die relativ günstig ist und innerhalb weniger Stunden Ergebnisse

liefern kann. Vor allem NGF ist sehr robust und spezifisch (Kumar et al., 2016, pp. e331) (Mailankody et al., 2015, pp. 286). Allerdings hängt die Qualität der Untersuchung sehr von der Qualität der Probe ab. Die KM-Proben müssen daher möglichst frisch sein (bevorzugt unter 48 Stunden alt), damit möglichst viele lebende Zellen enthalten sind. Zudem kann eine Therapie mit einem monoklonalen AK (wie z.B. Daratumumab) das Ergebnis von MFC/ NGF beeinflussen (Bai et al., 2018, pp. 19–20) (Yanamandra und Kumar, 2018, pp. 1779–1780).

Unbeeinflusst von der verwendeten Therapie ist der MRD-Nachweis durch NGS. Die Untersuchung mittels NGS beruht wie die ASO-qPCR auf der Analyse des *IGH*-Rearrangements. Allerdings ist es beim NGS nicht nötig Primer zu designen, die spezifisch für die Patient*innen sind. Stattdessen werden Konsensprimer, sowohl für die Untersuchung bei der Diagnose, als auch im Verlauf bei der Untersuchung auf MRD verwendet, was die höhere Anwendbarkeit im Vergleich zu ASO-qPCR erklärt (Bai et al., 2018, pp. 17) (Kumar et al., 2016, pp. e333). Der Nachteil, dass die patientenspezifische Sequenz bei der Diagnose für die Analyse auf MRD bekannt sein muss, bleibt allerdings bestehen (Kumar et al., 2016, pp. e333) (Kumar et al., 2016, pp. e333).

Der Illumina-NGS-Workflow gliedert sich in vier Teile: Library Preparation, Clustergenerierung, Sequenzierung und Datenanalyse. Bei der Library Preparation wird der VDJ-Lokus von *IGH* durch PCR vervielfältigt, die Primer binden an den Framework-Regionen (Invivoscribe, 2022, pp. 4). Zusätzlich werden die Sequenzen bei der Illumina-Sequenzierung mit einem Barcode versehen, der es erlaubt die Sequenzen einer Patientin oder einem Patienten nach der Sequenzierung zuzuordnen. Des Weiteren enthalten die PCR-Amplifikate einen Adapter, der nach der Denaturierung der Doppelstränge die Bindung an der FlowCell ermöglicht, welche die beiden komplementären Adapter-Sequenzen enthält und durch ein Gel immobilisiert wurde, sowie eine Bindungsstelle für die Sequenzierungsprimer. Bei der Clustergenerierung binden die einzelsträngigen PCR-Produkte an die auf der FlowCell komplementär vorliegenden Oligonukleotide und werden isothermal amplifiziert. Die amplifizierten Produkte bilden nach jedem Denaturierungsschritt eines jeden Zyklus eine Brücke mit dem zweiten zu dem Adapter komplementären Oligonukleotid auf der

FlowCell, weshalb man auch von Bridge Amplification spricht. Dieser Prozess wird wiederholt, wodurch Cluster von ca. 1.000 klonalen Amplifikaten entstehen, die durch die zur Adapterregion komplementären Oligonukleotide auf der FlowCell immobilisiert vorliegen. Nachdem der reverse Strang abgespalten wurde, kann die Sequenzierung beginnen. Bei der Sequenzierung werden in jedem Zyklus fluoreszenzmarkierte Nukleotide komplementär zum Template eingebaut. Am Ende eines Zyklus werden die eingebauten fluoreszenzmarkierten Nukleotide von einem Laser angeregt. Dadurch kann das Fluoreszenzsignal gemessen werden, welches durch die Vervielfältigung bei der Clustergenerierung stark genug ist, um von einer Kamera erfasst zu werden. Bei der paired-end Sequenzierung kann durch erneute Brückenbildung durch Hybridisierung mit dem komplementären Adapter auf der FlowCell, Amplifikation des Template-Strangs, Denaturierung und Abspaltung des forward Strangs, dann auf gleiche Weise die Basenabfolge des reverse Strangs erfolgen. Die bioinformatische Datenanalyse umfasst die Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu einer Base (Basecalling), eine Qualitätsanalyse der gecallten Base, das Zuordnen der Barcodes zu den entsprechenden Patient*innen (Demultiplexing) und das Alignment der Sequenzen zu einem Referenzgenom (Illumina, 2017, pp. 4–7) (Illumina, 2016).

Durch die massive parallele Sequenzierung, die die Methode bedingt, kann eine Sensitivität von 10^{-5} bis 10^{-6} erreicht werden (Kumar et al., 2016, pp. e333) (Martinez-Lopez et al., 2014, pp. 3076) (Caers et al., 2018, pp. 1779) (Bai et al., 2018, pp. 17). Ein großer Vorteil bei NGS ist, dass Subklone und klonale Evolution verfolgt werden können (Mailankody et al., 2015, pp. 293).

Ein großer Nachteil ist die geringere Verbreitung der Methode. Das liegt zum einen an den höheren Kosten der Geräte und Reagenzien im Vergleich zu den anderen beiden Methoden, aber auch daran, dass es eine geringe Verfügbarkeit kommerzieller Kits gibt (Ho et al., 2021, pp. 182). Es gibt bisher nur einen kommerziellen IVD (in-vitro-diagnostic)-zertifizierten Kit (LymphoTrack® Dx IGH FR1/2/3 Assay Panel von Invivoscribe, San Diego, USA), der in externen Laboren durchgeführt werden kann. Die IVD-Zertifizierung beschränkt sich dabei allerdings auf die Sequenzierung zur Ermittlung der klonalen Indexsequenz. Für den MRD-Ansatz wird eine Spike-in-Kontrolle und eine low Positivkontrolle verwendet, welche beide nicht IVD-zertifiziert sind. Es existiert zwar ein weiterer IVD-

zertifizierter Test (clonoSEQ® von Adaptive Biotechnologies, Seattle, USA; vor der Übernahme von Sequentia durch Adaptive Biotechnologies unter dem Namen LymphoSIGHT bekannt (Wasserman, 2015)), dieser wird aber exklusiv nur in Laboren der Firma durchgeführt (Adaptive Biotechnologies, n.d., pp. 7). Zwar gab die Firma 2019 bekannt zusammen mit Illumina einen Kit zu entwickeln, der auch außerhalb der firmeneigenen Labore durchgeführt werden kann, dieser ist aber noch nicht auf dem Markt (Adaptive Biotechnologies, 2019). Eine weitere Möglichkeit ist der Ansatz nach der Anleitung der EuroClonality-NGS Working Group (Langerak, 2022, pp. 7). Da es sich aber hierbei um ein in-house-Verfahren ohne IVD-Zertifizierung handelt, kommt es nach der Verordnung über IVD des Europäischen Parlaments für einen Einsatz in einem Routinelabor nicht infrage, da ein in house-Test nicht verwendet werden darf, sobald eine IVD-zertifizierte Alternative zur Verfügung steht (Hafen, 2022). Des Weiteren gibt es noch keine internationale Standardisierung für die MRD-Analyse durch NGS. Erste Vorschläge, was eine ausreichende Menge an DNA, Anzahl an sequenzierten Replikaten, Menge an Spike-in-Kontrolle und Coverage darstellt sind auf dem Weg (Yao et al., 2019, pp. 2) Ein weiterer Nachteil ist, dass die längere Dauer der Analyse von NGS im Vergleich zu MFC/NGF (Kumar et al., 2016, pp. e334).

Tabelle 1: Vergleich der Methoden zur Untersuchung von MRD beim MM modifiziert nach (Kumar et al., 2016, pp. e334) und (Bai et al., 2018, pp. 15)

	ASO-qPCR	NGS	MFC/ NGF
Sensitivität	10 ⁻⁴ bis 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵ bis 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵ bis 10 ⁻⁶
Kosten	zwischen MFC/NGF und NGS	am höchsten	am geringsten
Anwendbarkeit	~ 40 - 75 %	> 90 %	~ 100 %
Standardisierung	hoch, durch EuroMRD	IVD-zertifizierte Methoden verfügbar, aber bisher noch keine Standardisierung	hoch, durch EuroFlow Konsortium
Verfolgung klonaler Evolution	nicht möglich	möglich	nicht möglich
Limitationen	<ul style="list-style-type: none"> • SHM erschweren die Anwendbarkeit • Klonalität der Erstdiagnose muss bekannt sein 	<ul style="list-style-type: none"> • auch durch SHM beeinflusst, aber in nicht so großem Ausmaß wie ASO-qPCR • Klonalität der Erstdiagnose muss bekannt sein 	<ul style="list-style-type: none"> • KM-Probe muss möglichst frisch sein (max. 36 h (NGF) oder 48 h (MFC)) • Therapie mit monoklonalen Antikörpern kann Ergebnis beeinflussen
Verbreitung der Methode	weit verbreitet	gering	weit verbreitet
Dauer der Durchführung	mehrere Tage	mehrere Tage bis eine Woche	wenige Stunden

Jede der drei Methoden zur Bestimmung von MRD beim MM hat ihre Vor- und Nachteile. Ein idealer Test würde neben einer hohen Anwendbarkeit eine hohe Sensitivität und Spezifität, sowie Robustheit und Genauigkeit aufweisen. Außerdem wäre leicht verfügbar und weit verbreitet, unter den Aspekten, dass er kosteneffizient und technisch standardisierbar ist. Des Weiteren muss er einen gut nachgewiesenen klinischen Wert haben, der in multizentrischen Studien validiert wurde. Zudem ist er schnell durchführbar und die dafür verwendeten Proben können leicht transportiert werden und sind schonend für die Patient*innen zu entnehmen. Alle diese Kriterien können bisher nicht von einer einzigen Methode abgedeckt werden. Die meisten werden aber von NGF und NGS erfüllt, weshalb diese beiden Methoden von der IMWG empfohlen werden (Kumar et al., 2016, pp. e334) (Yanamandra und Kumar, 2018, pp. 1774).

Neben der Wahl der Methode, die am geeignetsten ist, stellt sich auch die Frage, welche Konsequenz MRD beim MM hat. Während der MRD-Status zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Therapie bei anderen hämatologischen Krebsarten, wie zum Beispiel der chronischen myeloischen Leukämie, einen klaren Hinweis für die weitere Behandlung darstellt, ist das beim

MM noch nicht der Fall (Hochhaus et al., 2020, pp. 969). Es gibt noch ungeklärte Fragen, die adressiert werden und Studien, die folgen müssen. So gibt es zum Beispiel noch keine Richtlinie, wann und wie oft die MRD-Untersuchungen erfolgen und wann MRD-Negativität erreicht werden soll (Landgren und Owen, 2016, pp. 18).

Die Deutsche Krebsgesellschaft und Deutsche Krebshilfe betont in der S3-Leitlinie aus dem Jahre 2022, dass MRD einen hohen prognostischen Stellenwert hat und MRD-Negativität mit einem verlängertem PFS und OS assoziiert ist, die routinemäßige Bestimmung des MRD-Status wird allerdings nicht empfohlen. Grund dafür ist, dass bisher keine Studien zum Nutzen des MRD-Status für therapeutische Entscheidungen vorliegen und die Bestimmung von MRD daher nur innerhalb von klinischen Studien erfolgen sollte. Die Deutsche Krebsgesellschaft geht aber davon aus, dass Therapieentscheidungen in der Zukunft vom MRD-Status zu spezifischen Zeitpunkten abhängig sein werden (Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2022, pp. 97–98). Auch die IMWG hebt 2022 die Aussagekraft von MRD durch NGS und NGF auf die Prognose hervor. Sie stellt jedoch auch klar, dass noch weitere Studien erforderlich sind, die untersuchen, ob aufgrund des MRD-Status die Therapie geändert werden sollte. Ob eine langanhaltende MRD-Negativität ein Hinweis auf Heilung sein kann, sollte laut IMWG ebenfalls in Studien untersucht werden (Rajkumar, 2022, pp. 1091).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Plastikware

Tabelle 2: Verwendete Plastikware

Plastikware	Hersteller
15 ml Zentrifugenröhren	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
2 ml Deep Well Plates 96 Square Well Clear	Axygen, Union City, USA
4titude PCR-Seal 96/8	Azenta, Burlington, USA
5 ml Messröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
5 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well Plate Septa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
96-well-Platte mit 0,5 ml Röhrchen (FluidX 96-Format, 0.3ml Internal Thread, Next-Gen Dual-Coded Tube)	Brooks Life Sciences, Chelmsford, USA
96-well-Platte mit 0,7 ml Röhrchen (FluidX 96-Format, 0.7ml Internal Thread, Next-Gen Dual-Coded Tube)	Brooks Life Sciences, Chelmsford, USA
DNA LoBind-Tubes 1,5 ml, PCR clean	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon Round-Bottom Polystyrene Tubes, 5 ml	Corning, Corning, USA
FrameStar 96 well semi-skirted PCR Plate	4titude, Surrey, UK
LightCycler 480 Multiwell 96, white, ohne Barcode	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Loading Tip	Agilent, Santa Clara, USA
Lunatic Plate	Unchained Labs, Pleasanton, USA
Lunatic Strip	Unchained Labs, Pleasanton, USA
Microamp Fast Optical Reaktionsmikrotiterplatte mit 96 Wells, 0,1 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Multi- μ -Strip Pro 8er-Kette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MultiScreen Column Loader, 100 μ l	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MultiScreen-HV, 0,45 μ m, transparent	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Plate Septa, 96 well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pluriStrainer 200 μ m, PET-Mesh	pluriSelect Life Sciences, Leipzig, Deutschland
Retainer&Base Set for 3500/3500xL Genetic Analyzers, 96 well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Screw cap tube, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Tear-A-Way 96/8 Dividable PCR Plate	4titude, Surrey, UK
twin.tec PCR-Platte 96 semi-skirted	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
twin.tec PCR-Platte 96 skirted	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2. Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
1 N NaOH	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
AccuGene Molecular Biology Water	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
AmpliAq Gold DNA Polymerase 1000 Units	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
AMPure XP Reagent	Beckman Coulter, Brea, USA
custom DURAClone Plate	Beckman Coulter, Brea, USA
D1000 Sample Buffer	Agilent, Santa Clara, USA
D1000 ScreenTape	Agilent, Santa Clara, USA
DPBS, w/o: Ca and Mg	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
EasySep™ Human CD138 Positive Selection Kit II	Stemcell Technologies, Vancouver, Canada
Erythrozyten Lyse; pH 7,2, 155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0,13 mM EDTA	Laborhaus Scheller, Euerbach, Deutschland
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
ExoSAP-IT Express PCR Product Cleanup Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FalconTaq DNA Polymerase	Invivoscribe, San Diego, USA
Hi-Di Formamide	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LymphoQuant® B-cell Internal Control	Invivoscribe, San Diego, USA
LymphoTrack® B-cell Low Positive Control	Invivoscribe, San Diego, USA
PhiX Control v3	Illumina, San Diego, USA
Puffer RLT	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNase-Free Water	Qiagen, Venlo, Niederlande
RoboSep Buffer	Stemcell Technologies, Vancouver, Canada
ROX-Standard	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sephadex G-50	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Sodium hypochlorite reagent 5 % chlorine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taq PCR Master Mix	Qiagen, Venlo, Niederlande
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TE-Buffer, pH 8,0, RNase-frei	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trizma®-hydrochlorid-Lösung, 1 M, pH 8.0	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Tween®20	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
UltraPure BSA (50 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.3. Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DNA Clean&Concentrator®-5	Zymo Research, Irving, USA
IdentiClone™ IGH+IGK Gene Clonality Assay	Invivoscribe, San Diego, USA
KAPA Library Quantification Kit	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
LymphoTrack® Dx IGH FR1/2/3 Assay Panel - Illumina MiSeq® – CE-IVD	Invivoscribe, San Diego, USA
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
MiSeq Reagent Kit v3 (600 Zyklen)	Illumina, San Diego, USA

2.1.4. Geräte und Software

Tabelle 5: Verwendete Geräte und Software

Gerät	Software	Hersteller
2720 ThermalCycler		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
4200 TapeStation System	TapeStation Controller software (Version 4.1.1) und TapeStation Analysis Software (Version 4.1.1)	Agilent, Santa Clara, USA
Applied Biosystems™ 3500xL (Dx) Genetic Analyzer	3500 Series Data Collection Software 3 (Version 3.3) und GeneMapper® Software 6 (Version 6.0)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System	7500 Software (Version 2.3)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Applied Biosystems™ ProFlex PCR System		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Applied Biosystems™ QuantStudio 6 Real-Time PCR System	QuantStudio Real-Time PCR Software (Version 1.7.2)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Applied Biosystems™ SimpliAmp Thermal Cycler		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
custom Hamilton-Pipettierrobotersystem bestehend aus: Star	Hamilton Run Control (Version 4.5.0.7977)	Hamilton Company, Reno, USA Hamilton Company, Reno, USA

Star Plus Barcode Reader Rotanta 460 Platten-Zentrifuge HMotion Sysmex XN-1000		Hamilton Company, Reno, USA Hamilton Company, Reno, USA Hettich, Tuttlingen, Deutschland Hamilton Company, Reno, USA Hamilton Company, Reno, USA Sysmex, Kobe, Japan
Freedom EVO® System	Freedom EVOware® (Version 2.7)	Tecan, Männedorf, Schweiz
Heraeus Megafuge 40		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heraeus Multifuge 2 L-R		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IntelliXcap		Brooks Life Sciences, Chelmsford, USA
LiCONIC STC Einfrierroboter	LIMES 2.0 (Version 347.1)	Liconic Instruments, Mauren, Liechtenstein
LightCycler® 480 System	LightCycler® 480 Software (Version 1.5.0 SP4)	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Little Lunatic	Lunatic Client (Version 5.1.0.212)	Unchained Labs, Pleasanton, USA
Lunatic	Lunatic & Stunner Client (Version 8.2.1.278) und Lunatic & Stunner Analysis (Version 8.2.0.259)	Unchained Labs, Pleasanton, USA
MagNA Pure 96		Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Milli-Q® Direct		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MiSeq System	Sequence Analysis Viewer (Version 1.10.2)	Illumina, San Diego, USA
Navios Flow Cytometer	Navios Cytometry List Mode Data Acquisition & Analysis Software (Version 1.3) und Kaluza Analysis Software (Version 2.1)	Beckman Coulter, Brea, USA
RoboSep™-16		Stemcell Technologies, Vancouver, Canada
Sysmex XP-300		Sysmex, Kobe, Japan
QIAxcel (Advanced)	QIAxcel ScreenGel (Version 1.6.0.10)	Qiagen, Venlo, Niederlande
	cp-R	Daniel T. Holmes, Vancouver, Kanada
	JASP (Version 0.17.2.1)	University of Amsterdam, Amsterdam, Niederlande
	LIMES (Version 2.4427.2794; Omnis Version 6.0.2)	MLL Münchner Leukämielabor GmbH, München, Deutschland
	LIMES 2.0 (Version 347.1)	MLL Münchner Leukämielabor GmbH, München, Deutschland

	LymphoTrack MRD Software (Version 2.0.2)	Invivoscribe, San Diego, USA
	LymphoTrack Software (Version 2.4.3)	Invivoscribe, San Diego, USA
	MLL NeMo (Version 3669)	MLL Münchner Leukämielabor GmbH, München, Deutschland
	MAFFT (Version 7.511)	Kazutaka Katoh (Osaka University), Osaka, Japan
	Primer Express (Version 3.0)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
	Variance Function Programm (Version 19.0)	Bill Sadler, Christchurch, Neuseeland

2.2. Methoden

Eigenständig durchgeführt wurden folgende Methoden:

- Aufreinigung der DNAs mithilfe des DNA Clean&Concentrator-5 Kits
- Herstellung der Verdünnungsreihen
- LymphoTrack *IGH* Assays
- KAPA-Library-Quantifizierung
- TapeStation-Quantifizierung
- MiSeq Laufstart
- Auswertung der LymphoTrack Ansätze mit der LymphoTrack Software und der LymphoTrack MRD Software
- Vergleich der Sequenz mit MAFFT
- Statistische Auswertung

Beherrscht werden folgende Methoden, wurden aber nicht für die in der Arbeit verwendeten Proben selbst durchgeführt:

- Zell-Isolation
- *IGH*- und *IGK*-Fragmentanalyse, exklusive Auswertung
- *IGHV*-Fragmentanalyse und Sanger-Sequenzierung (Teile der ASO-qPCR), exklusive Auswertung

Nicht selbst durchgeführt wurden folgende Methoden:

- DNA-Isolation
- Isolation der CD138+-MACS-Zellen
- MFC
- Auswertung der *IGH*- und *IGK*-Fragmentanalyse
- ASO-qPCR
- WGS

2.2.1. Patient*innen

Untersucht wurden Proben von Patient*innen mit MM, bei denen die MLL Münchner Leukämielabor GmbH eine Einsendung für eine Verlaufsuntersuchung zwischen dem 01.02.23 und dem 05.07.23 erhalten hat und folgende Bedingungen erfüllten:

- asservierte Zellen oder DNA der Indexprobe aus CD138+-Zellen oder KM ebenfalls vorhanden
- in der Verlaufsprobe wurden ≤ 3 % aberrante Plasmazellen in der Immunphänotypisierung gemessen
- vom eingesandten KM der Verlaufsuntersuchung ist nach den Routineuntersuchungen noch Material vorhanden

Es wurden insgesamt Proben von 16 Patient*innen zwischen 42 und 77 Jahren untersucht (Median: 71,5). Das Geschlechterverhältnis betrug 43,75 % Frauen (7/16) und 56,25 % Männer (9/16). Die Probenanzahl beträgt 19 für die Ermittlung der Klonalität und 11 für die MRD-Untersuchung. Die höhere Probenanzahl der Indexproben kommt dadurch zustande, dass bei zwei Patient*innen sowohl DNA aus KM als auch 138+-MACS-Zellen zur Verfügung stand. Bei einer weiteren Patientin waren DNAs aus zwei Zeitpunkten der Krankheitsentwicklung verfügbar. Außerdem war nicht für alle Indexpatient*innen Material für die Untersuchung auf MRD verfügbar, oder eine Untersuchung auf MRD nicht möglich, da keine klonale Sequenz nachgewiesen werden konnte.

Zusätzlich wurden Proben von Patient*innen mit einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) untersucht, für die die MLL Münchner Leukämielabor GmbH eine Einsendung für eine Verlaufsuntersuchung zwischen dem 24.05.23 und dem 28.06.23 erhalten hat und folgende Bedingungen erfüllten:

- asservierte Zellen oder DNA der Indexprobe aus peripherem Blut (PB) oder KM ebenfalls vorhanden
- in der Verlaufsprobe wurden ≤ 5 % aberrante reife B-Zellen in der Immunphänotypisierung gemessen
- vom eingesandten PB oder KM der Verlaufsuntersuchung ist nach den Routineuntersuchungen noch Material vorhanden

Es wurden insgesamt Proben von 13 Patient*innen untersucht, die zwischen 56 und 86 Jahren alt waren (Median: 74) mit einem Geschlechterverhältnis von 15,4 % Frauen (2/13) zu 84,6 % Männern (11/13). Die Probenanzahl beträgt für die Ermittlung der Klonalität und für die MRD-Untersuchung je 13.

Zusätzlich wurden Proben von einer Patientin (Alter: 76) untersucht, die mit bekannter CLL ein MM entwickelte.

Des Weiteren wurden Proben von 7 Patient*innen retrospektiv untersucht, davon 2 Patient*innen mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL), die im Verlauf ihrer Krankheit eine ASO-qPCR erhalten hatten. Von diesen zwei Patient*innen waren vier Proben für die Untersuchung der Indexklonalität und drei Proben für die MRD-Untersuchung verfügbar. Außerdem Proben von 5 Patient*innen mit MM, die eine WGS-Untersuchung erhalten hatten. Für diese Patient*innen wurde nur die Klonalität der Indexprobe ermittelt, da kein Material für die MRD-Untersuchung zur Verfügung stand.

Insgesamt wurden 42 Proben von 37 Patient*innen zu Ermittlung der Indexklonalität sequenziert. Für die Untersuchung im Verlauf waren 28 Proben von 27 Patient*innen verfügbar, siehe auch Tabelle 6.

Tabelle 6: Zusammenfassung der untersuchten Proben

Entität	Anzahl Indexpatient*innen	Anzahl Indexproben	Anzahl Verlaufspatient*innen	Anzahl Verlaufsproben
MM	21	24	11	11
CLL	13	13	13	13
CLL/MM	1	1	1	1
ALL	2	4	2	3
Gesamt	37	42	27	28

Ein Ethikvotum (Ethik-Kommissions-Nr. 05117) sowie eine von den Patient*innen unterschriebene Einverständniserklärung liegt vor.

2.2.2. MFC

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Proben fand in der Abteilung für Immunphänotypisierung der MLL Münchner Leukämielabor GmbH statt.

Eine MRD-Analyse beim MM wird durchgeführt, wenn der Standard-Ansatz bei Verlaufsproben negativ ausfällt oder bereits in der Voreinsendung eine MRD-Analyse durchgeführt wurde.

Als Erstes wird die Zellzahl der Proben am Sysmex XP-300 (Sysmex, Kobe, Japan) bestimmt. Bei weniger als 5.000 Leukozyten pro μl werden drei Ansätze, ab 5.000 Leukozyten pro μl werden zwei Ansätze mit je 200 μl KM pipettiert. Für den Ansatz werden 5 ml Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Es werden 100 μl des in 100 μl DPBS (w/o: Ca and Mg) (PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) gelösten Antikörper-Mixes aus der DURAClone-Platte (Beckman Coulter, Brea, USA) hinzugegeben und gemischt. Folgende Antikörper werden für den MRD-Ansatz analysiert:

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für den MFC MRD-Ansatz

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Klon
CD19	ECD	J3-119
CD117	PC5	104D2D1
CD56	PC7	N901(NKH-1)
CD138	APC	B-A38
CD38	APCA750	LS198-4-3
CD20	PacB	HRC20
CD45	KrOr	J33

Der Ansatz wird bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 min inkubiert, bevor 4 ml Erythrozyten Lyse pH 7,2 (Laborhaus Scheller, Euerbach, Deutschland) hinzugegeben wird. Es folgt eine Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 10 min. Danach werden die Proben bei 1200 rpm für 5 min ohne Bremse in einer Heraeus Multifuge 2 L-R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Lyse-Schritt wird wiederholt und das entstandene Pellet in 150 µl DPBS (w/o: Ca and Mg) (PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) resuspendiert. Die Ansätze werden danach je Probe in einem 5 ml Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gepoolt und bis zur Messung kühl und dunkel gelagert.

Die Analyse erfolgt durch ein Navios Flow Cytometer mit der Navios Cytometry List Mode Data Acquisition & Analysis Software (Version 1.3) (Beckman Coulter, Brea, USA). Für die Auswertung wird die Software Kaluza Analysis Software (Version 2.1) (Beckman Coulter, Brea, USA) verwendet. Für eine MRD-Analyse werden 500.000 Events gemessen, was einer Sensitivität von 0,001 % entspricht. Bei weniger als 5 Zellen gilt eine Probe als negativ, ab 5 Zellen als positiv. Beim Standard-Ansatz werden 35.000 Events gemessen und die Probe auf eine Leichtkettenrestriktion Kappa und Lambda untersucht.

2.2.3. Zell-Isolation

Für die Isolation der Zellen werden maximal 10 ml KM oder PB (in EDTA, Heparin oder Citrat antikoaguliert) durch ein pluriStrainer 200 µm, PET-Mesh (pluriSelect Life Sciences, Leipzig, Deutschland) in ein 50 ml Screw cap tube (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Alle weiteren Schritte erfolgen automatisiert mit einem custom Hamilton-Pipettierrobotersystem mit der Hamilton Run Control Software (Version 4.5.0.7977) (Hamilton Company, Reno, USA), bestehend aus Star, Star Plus und HMotion sowie integrierten Zentrifugen, Barcode-Readern und Sysmex XN-1000 (Sysmex, Kobe, Japan), siehe auch Abbildung 8.

Zum Primärmaterial wird die dreifache Menge Erythrozyten Lyse pH 7,2 (Laborhaus Scheller, Euerbach, Deutschland) gegeben und 10 min inkubiert. Danach wird das Material vom HMotion in die Rotanda 460 (Hettich, Tuttlingen, Deutschland) transportiert und für 10 min bei 1500 rpm/ 470 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wird in 1 ml DPBS (w/o: Ca

and Mg) (PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) gelöst und 100 µl des gelösten Materials werden zusammen mit 400 µl PBS in ein 2 ml Messröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und die Leukozytenzahl am Sysmex XN-1000 (Sysmex, Kobe, Japan) gemessen. Das restliche Material wird in eine Deep Well Plate (Axygen, Union City, USA) überführt. Das entsprechende Volumen, um bis zu vier 5 Mio. Asservate zu erstellen, wird in 0,7 ml FluidX-Röhrchen mit Barcode (FluidX 96-Format, 0.7ml Internal Thread, Next-Gen Dual-Coded Tube; Brooks Life Sciences, Chelmsford, USA) überführt. Sollte das Volumen über 100 µl betragen wird das Material 5 min bei 1000 rpm in der Plattenzentrifuge (Hamilton Company, Reno, USA) zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl abgenommen und verworfen. Zu den isolierten Zellen wird 300 µl RLT-Puffer (Qiagen, Venlo, Niederlande) gegeben, welcher mit 1 % 2-Meracptoethanol (β -ME) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) versetzt wurde. Die Lagerung bis zur Isolierung der DNA erfolgt im LiCONiC STC Einfrierroboter (Liconic Instruments, Mauren, Liechtenstein) bei - 80°C.

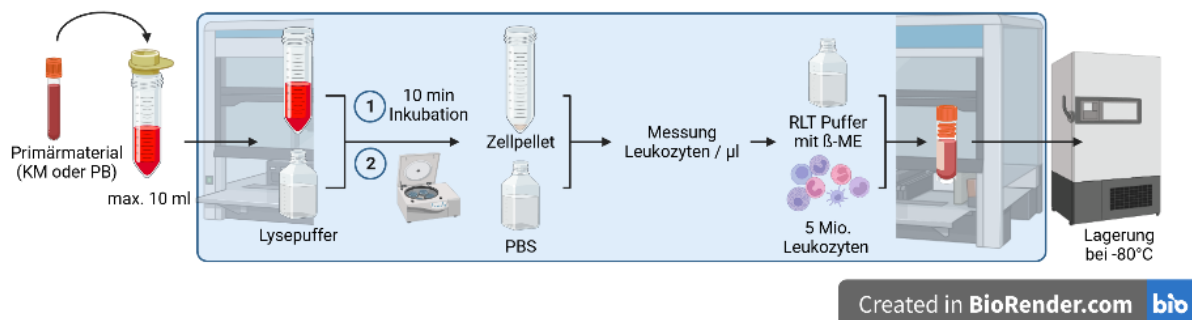


Abbildung 8: Übersicht der Schritte des Workflows zur Isolation der Zellen.

Die Überführung des Primärmaterials (KM oder PB) erfolgt manuell. Alle weiteren Schritte erfolgen im Hamilton-Pipettierrobotersystem. Das Material wird lysiert, abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wird in DPBS gelöst, die Leukozytenzahl durch einen Sysmex XN-1000 gemessen und das Volumen für bis zu vier 5 Mio. Asservate in 0,7 ml FluidX-Röhrchen mit Barcode überführt. Es folgt bei einem Volumen > 100 µl ein weiterer Zentrifugationsschritt, bevor das Pellet in 300 µl RLT-Puffer mit 1 % 2-Meracptoethanol resuspendiert wird. Die Zellen werden bis zur DNA-Isolation im LiCONiC STC Einfrierroboter bei – 80 °C gelagert.

Die CD138+-MACS-Zellen werden von der Abteilung für Zytomorphologie der MLL Münchner Leukämielabor GmbH isoliert. Hierfür werden dem KM die dreifache Menge Erythrozyten Lyse pH 7,2 (Laborhaus Scheller, Euerbach, Deutschland)

hinzugegeben, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 1.000 rpm/ 176 g 20 min ohne Bremse in einer Heraeus Multifuge 2 L-R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in ein Falcon Round-Bottom Polystyrene Tubes, 5 ml (Corning, Corning, USA) überführt. Die Isolation der CD138+-Zellen erfolgt automatisiert auf dem RoboSep™-16 (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) nach Herstellerangaben mit dem EasySep™ Human CD138 Positive Selection Kit II (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada). Die in 2 ml RoboSep Buffer (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) gepufferte Positivfraktion wird vom 5 ml Round-Bottom Polystyrene Tube in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt und die Zellzahl am Sysmex XP-300 (Sysmex, Kobe, Japan) bestimmt. Ab einer Zellzahl von $> 0,4 \times 10^3$ Zellen bleibt Material nach den Routineuntersuchungen für die Weitergabe an Molekulargenetik übrig.

Sollte > 1 ml Volumen vorhanden sein, wird die Probe 10 min bei 1500 rpm/ 470 g in einer Heraeus Megafuge 40 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) abzentrifugiert, der Überstand bis auf 1 ml abgenommen und verworfen, bevor sie über das custom Hamilton-Pipettierrobotersystem weiterprozessiert wird. Dort wird die Probe in eine Deep Well Plate (Axygen, Union City, USA) überführt, 5 min bei 1000 rpm in der Plattenzentrifuge (Hamilton Company, Reno, USA) zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 μ l abgenommen und verworfen. Das Pellet wird resuspendiert, in 0,7 ml FluidX-Röhrchen mit Barcode (FluidX 96-Format, 0.7ml Internal Thread, Next-Gen Dual-Coded Tube; Brooks Life Sciences, Chelmsford, USA) überführt und mit 300 μ l RLT-Puffer (Qiagen, Venlo, Niederlande), welcher mit 1 % β -ME (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) versetzt wurde, gepuffert. Die Lagerung der Zellen erfolgt bis zur Isolierung der DNA im LiCONiC STC Einfrierroboter (Liconic Instruments, Mauren, Liechtenstein) bei -80 °C.

2.2.4. DNA-Isolation und Aufreinigung

Die Isolation der DNA aus den RLT-gepufferten Zellen erfolgt am MagNA Pure 96 (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) mit dem MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) nach Herstellerangaben. Hierbei werden die Zellen durch Zugabe von Lysepuffer aufgebrochen und die

Proteine durch Zugabe von Proteinase K verdaut. Es werden magnetische Glaspartikel hinzugegeben, an denen die Nukleinsäuren binden und der Nukleinsäure-Glaspartikel-Komplex kann durch einen Magnet von der restlichen Flüssigkeit separiert werden. Es folgen Waschschriffe zur Entfernung der restlichen zellulären Bestandteile. Am Ende werden die Nukleinsäuren durch Wärme von den Glaspartikeln getrennt und eluiert (Roche Diagnostics GmbH, 2021, pp. 149).

Die Konzentration der isolierten DNA wird am Lunatic oder Little Lunatic (Unchained Labs, Pleasanton, USA) gemessen und für Indexproben auf 25 ng/µl eingestellt. Für die Zugabe des Wassers zur Verdünnung und die Überführung aus der MagNA Pure 96 Output Plate (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) in eine 96-well-Platte mit 0,5 ml Röhrchen (FluidX 96-Format, 0.3ml Internal Thread, Next-Gen Dual-Coded Tube; Brooks Life Sciences, Chelmsford, USA) wird ein Freedom EVO® System (Tecan, Männedorf, Schweiz) verwendet.

Sollte die Konzentration für Erstdiagnosen/Indexproben unter 15 ng/µl betragen, sowie für die MRD-Proben unter 125 ng/µl und eine A260/280 Ratio außerhalb von 1,8-2, wird die DNA mithilfe des DNA Clean&Concentrator-5 Kits (Zymo Research, Irving, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Hierbei wird zu der DNA das zweifache Volumen an DNA Binding Buffer gegeben und in eine Spin Column überführt, die sich in einem Collection Tube befindet. Es wird bei ≥ 10.000 g 30 s abzentrifugiert und das durchgeflossene Volumen verworfen. Danach folgen bei denselben Zentrifugeneinstellungen zwei Waschschriffe mit 200 µl DNA Wash Buffer. Um die DNA von der Spin Column zu lösen wird ein variables Volumen an RNase freiem Wasser (je nach Ausgangskonzentration und Ausgangsvolumen) (Qiagen, Venlo, Niederlande) auf die Spin Column in einem 1,5 ml Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben, eine Minute inkubiert und abzentrifugiert (Zymo Research, 2022, pp. 7). Die DNA wird dann erneut mit dem Lunatic oder Little Lunatic (Unchained Labs, Pleasanton, USA) gemessen und mit RNAase freiem Wasser (Qiagen, Venlo, Niederlande) auf die gewünschte Konzentration (25 oder 125 ng/µl) eingestellt.

2.2.5. *IGH*- und *IGK*-Fragmentanalyse

Für die Untersuchung von *IGH* und *IGK* bei Proben für den WT-Pool für die Verdünnungsreihe und bei Indexproben, für die durch den LymphoTrack Assay keine Klonalität festgestellt werden kann, wurde der IdentiClone™ *IGH+IGK* Gene Clonality Assay (Invivoscribe, San Diego, USA) verwendet.

Der folgende Mastermix und die DNA/Kontrollen werden von einem Freedom EVO® System (Tecan, Männedorf, Schweiz) in eine Tear-A-Way 96/8 Dividable PCR Plate (4titude, Surrey, UK) pipettiert:

Tabelle 8: Zusammensetzung des Ansatzes der *IGH*- und *IGK*-Fragmentanalyse

Reagenz	Volumen [µl]
Master-Mix	22,75
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	0,25
DNA/Kontrollen	2

Es gibt für *IGH* drei und für *IGK* zwei verschiedene Multiplex-Mastermixe. Zusätzlich wird zur Amplifikationskontrolle ein weiterer Mastermix mitgeführt (Specimen Control Size Ladder). Für jede Art von Mastermix (*IGH*, *IGK* und Specimen Control Size Ladder) wird eine Positivkontrolle, eine Negativkontrolle und eine non template control (NTC) mitgeführt.

Die Amplifikation erfolgt auf einem 2720 ThermalCycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), einem Applied Biosystems ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) oder einem Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit folgendem Protokoll:

Tabelle 9: Thermocyclerprotokoll der *IGH*- und *IGK*-Fragmentanalyse

Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Zyklen
95	05:00	1
95	00:45	34
60	00:45	
72	01:30	
72	10:00	1
12	∞	

Für die Analyse auf dem Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer oder dem Applied Biosystems 3500xL Dx Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, USA) werden je 10 µl Hi-Di Formamide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und 1 µl ROX-Standard (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit 1 µl PCR-Produkt in eine FrameStar 96 well semi-skirted PCR-Platte (4titude, Surrey, UK) gegeben. Dies wird mit einer Plate Septa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verschlossen und die Platte für die Denaturierung des PCR-Produkts 2 min bei 95 °C zur und 5 min bei 10 °C inkubiert.

Danach wird die Platte in ein Retainer&Base Set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gegeben und auf dem Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer oder dem Applied Biosystems 3500xL Dx Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) analysiert.

Die Auswertung erfolgt mit der GeneMapper® Software 6 (Version 6.0) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

2.2.6. Verdünnungsreihen

Zur Untersuchung der Sensitivität wurden zwei Verdünnungsreihen aus zwei DNAs aus 138+-MACS-Zellen erstellt, für die zuvor die Klonalität durch den LymphoTrack Assay ermittelt wurden (siehe 2.2.8. LymphoTrack® *IGH* Assays). Die Verdünnung erfolgte mit DNA von fünf verschiedenen Patient*innen mit Polyglobulie oder Hämochromatose, die in der *IGH*- und *IGK*-Fragmentanalyse negativ waren (siehe 2.2.5. *IGH*- und *IGK*-Fragmentanalyse), welche gepoolt wurden. Der WT-Pool als auch die DNAs der MM-Patient*innen wurden mithilfe des DNA Clean&Concentrator-5 Kits (Zymo Research, Irving, USA) auf eine Konzentration von 125 ng/µl gebracht (siehe 2.2.4. DNA-Isolation und Aufreinigung) und dann wie folgt gemischt:

Für die Verdünnungsreihe 1 wurde eine serielle Verdünnung in acht 1:10 Schritten erstellt. Es wurden je 3,5 µl der vorherigen Verdünnungsstufe mit je 31,5 µl des WT-Pools gemischt. Untersucht wurde die erste Verdünnungsstufe, sowie die Verdünnungsstufen 4 bis 8.

Für die Verdünnungsreihe 2 wurde eine serielle Verdünnung in sechs 1:50 Schritten erstellt. Es wurden je 1,2 µl der vorherigen Verdünnungsstufe mit je 58,8 µl des WT-Pools gemischt. Es wurden alle 6 Verdünnungsstufen untersucht.

2.2.7. ASO-qPCR

Die ASO-qPCR lässt sich in drei Schritte unterteilen. Zunächst muss das klonale Rearrangement bekannt sein. Dafür wird bei der Erstdiagnose oder einem Rezidiv eine Fragmentanalyse mit Konsensprimern angesetzt. Beim Nachweis von Klonalität folgt dann eine spezifischen PCR und Sanger-Sequenzierung. Mithilfe der Sequenzen werden dann Primer entworfen, die spezifisch für den oder die jeweilige Patient*in sind. Mit diesen Primern kann dann die ASO-qPCR angesetzt werden.

1) Fragmentanalyse

Für die Fragmentanalyse wird cDNA verwendet. Es werden zwei Multiplex-Mixe mit folgenden Primern verwendet:

Tabelle 10: Primersequenzen der IGHV-Fragmentanalyse

Multiplex-Mix	Primername	Orientierung	Fluoreszenz-Markierung	Sequenz 5' → 3'
Mix A	VH1-FR1	forward	FAM	GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
Mix A	VH3-FR1	forward	HEX	CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
Mix A	VH4-FR1	forward	TAMRA	CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG
Mix B	VH2-FR1	forward	FAM	GTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCC
Mix B	VH6-FR1	forward	HEX	TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG
Mix B	VH5-FR1	forward	TAMRA	CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT
Mix A/B	JH	reverse		CTTACCTGAGGAGACGGTGACC

Für die Herstellung der Multiplex-Mixe A und B werden je 35 µl der oben genannten forward Primer (Stockkonzentration von 100 pmol/µl) mit 245 µl TE-Buffer, pH 8,0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemischt.

Der folgende Mastermix und die cDNA wird von einem Freedom EVO® System (Tecan, Männedorf, Schweiz) für den Ansatz der PCR in eine Tear-A-Way 96/8 Dividable PCR Plate (4titude, Surrey, UK) pipettiert:

Tabelle 11: Zusammensetzung des Ansatzes der IGHV-Fragmentanalyse

Reagenz	Volumen [µl]
Wasser	9,5
Taq PCR Master Mix	12,5
Mix A/ B [10 µM je Primer]	1
JH-Primer [10 µM]	1
cDNA	1

Die Amplifikation erfolgt auf einem 2720 ThermalCycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), einem Applied Biosystems ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) oder einem Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit folgendem Protokoll:

Tabelle 12: Thermocyclerprotokoll der IGHV-Fragmentanalyse

Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Zyklen
95	05:00	1
95	00:30	34
60	00:30	
72	00:30	
72	05:00	1
10	∞	

Für die Analyse auf dem Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer oder dem Applied Biosystems 3500xL Dx Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) werden je 10 µl Hi-Di Formamide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und 1 µl ROX-Standard (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit 1 µl PCR-Produkt in eine FrameStar 96 well semi-skirted PCR-Platte (4titude, Surrey, UK) gegeben. Dies wird mit einer Plate Septa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verschlossen und die Platte für die Denaturierung des PCR-Produkts 2 min bei 95 °C zur und 5 min bei 10 °C inkubiert.

Danach wird die Platte in ein Retainer&Base Set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gegeben und auf dem Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer oder dem Applied Biosystems 3500xL Dx Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) analysiert.

Die Auswertung erfolgt mit der GeneMapper® Software 6 (Version 6.0) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

2) Spezifische PCR und Sanger-Sequenzierung

Die spezifische PCR wird mit VH-spezifischen forward und JH-Konsensprimer angesetzt. Für DNA werden folgende forward Primer eingesetzt, die in der FR1-Region liegen, für cDNA folgende forward Primer in der Leader-Region:

Tabelle 13: Primersequenzen der spezifischen PCR

Primername	Orientierung	Sequenz 5' → 3'
VH1-FR1	forward	GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
VH2-FR1	forward	GTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCC
VH3-FR1	forward	CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
VH4-FR1	forward	CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG
VH5-FR1	forward	CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT
VH6-FR1	forward	TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG
VH1-L	forward	ATGGACTGGACCTGGAGG
VH2-L	forward	CAC(GA)CTCCTGCTGCTGACCA
VH3A-L	forward	GCTGGGTTTTTCCTTGTTGC
VH3B-L	forward	ATGGAGTT(TG)GG(AG)CTGAGCTG
VH4-L	forward	GCTCCCAGATGGGGTCCTG
VH5-L	forward	CTCCTCCTGGCTGTTCTCC
VH6-L	forward	CTGTCTCCTTCCTCATCTTCC
JH	reverse	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC

Für jeden Mix wird eine NTC mitgeführt. Der Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 14: Zusammensetzung des Ansatzes der spezifischen PCR

Reagenz	Volumen [µl]
Wasser	9,5
Taq PCR Master Mix	12,5
forward Primer [10 µM]	1
JH-Primer [10 µM]	1
cDNA/DNA	1

Für den Ansatz mit DNA und FR1-Primern wird das gleiche Cyclothermocyklprotokoll wie für die Fragmentanalyse verwendet (siehe Tabelle 9). Für den Ansatz mit cDNA und Leader-Primern wird folgendes Thermocyklprotokoll verwendet:

Tabelle 15: Thermocyklprotokoll der spezifischen PCR bei Einsatz von DNA

Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Zyklen
95	05:00	1
95	00:30	34
62	00:30	
72	00:45	
72	05:00	1
10	∞	

Nach der PCR erfolgt die Analyse aller NTCs auf dem QIAxcel oder QIAxcel Advanced (Qiagen, Venlo, Niederlande). Für die Auswertung wird die QIAxcel ScreenGel Software (Version 1.6.0.10) (Qiagen, Venlo, Niederlande) verwendet.

Der Ansatz kann weiter prozessiert werden, wenn die NTCs keine Bande aufweisen.

Danach werden für die Aufreinigung der PCR je 8 µl der PCR-Produkte mit je 2 µl ExoSAP-IT Express PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in einer FrameStar 96 well semi-skirted PCR Plate (4titude, Surrey, UK) gemischt und mit folgendem Thermocyclerprotokoll gestartet:

Tabelle 16: Thermocyclerprotokoll der Exo-SAP IT Aufreinigung

Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Zyklen
37	04:00	1
80	01:00	1
4	∞	

Mit dem aufgereinigten PCR-Produkten kann die Sequenzierungs-PCR in einer FrameStar 96 well semi-skirted PCR Plate (4titude, Surrey, UK) angesetzt werden. Der Ansatz von forward und reverse erfolgt getrennt mit folgenden Reagenzien:

Tabelle 17: Zusammensetzung des Ansatzes der Sequenzierungs-PCR

Reagenz	Volumen [µl]
Wasser	3
BigDye Terminator	2
5x Sequencing Buffer	1
Primer [3,3 µM]	2
PCR-Produkt	2

Für die Sequenzierungs-PCR wird folgendes Thermocyclerprotokoll verwendet:

Tabelle 18: Thermocyclerprotokoll der Sequenzierungs-PCR

Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Zyklen
95	02:00	1
95	00:10	25
50	00:10	
60	03:00	
12	∞	

Für die Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR wird ein Sephadex-Gel verwendet. Für die Herstellung des Sephadex-Gels wird Sephadex G-50 Pulver (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) zur Portionierung in einen MultiScreen Column Loader (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gegeben, wodurch das Pulver in eine MultiScreen-HV, 0,45 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) überführt

werden kann. Auf das Pulver wird dann 300 µl Milli-Q Wasser (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gegeben und die Platte mit dem Sephadex-Gel mindestens 2 h im Kühlschrank inkubiert. Die Gelplatte wird dann bei 900 g für 5 min abzentrifugiert, bevor sie auf einer FrameStar 96 well semi-skirted PCR-Platte (4titude, Surrey, UK) platziert wird, die mit 10 µl Hi-Di Formamide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) je well befüllt ist. Auf das Sephadex-Gel werden dann 10 µl des Produkts der Sequenzierungs-PCR pipettiert und bei 900 g für 5 min abzentrifugiert.

Danach wird die FrameStar 96 well semi-skirted PCR-Platte, die das aufgereinigte Sequenzierungs-Produkt mit Hi-Di Formamide enthält, in ein Retainer&Base Set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) geben und auf dem Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer oder dem Applied Biosystems 3500xL Dx Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) analysiert.

Die Sequenzen werden dann mit der IMGT-Datenbank verglichen und das ähnlichste Gen ermittelt.

3) ASO-qPCR

Für den Ansatz der ASO-qPCR wird ein forward Primer für die in der Sequenzierung ermittelte Sequenz entworfen, der im Bereich der VDJ-Verbindungsstelle liegt. Es wird dafür die Software Primer Express (Version 3.0) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Der Primer muss folgende Kriterien erfüllen:

- Länge 15 - 30 bp
- Schmelztemperatur 58 - 60 °C
- GC-Gehalt 30 - 80 %
- Produktgröße 50 - 150 bp
- es sind maximal 2 Nukleotide der letzten 5 Nukleotiden des 3'-Endes ein G und/oder C
- weniger als 4 Gs hintereinander

Außerdem werden folgende reverse Primer und Sonden verwendet, welche spezifisch für die jeweilige Genfamilie sind:

Tabelle 19: Primer- und Sondensequenzen der JH-Genfamilien nach (Brüggemann et al., 2000) und (Verhagen et al., 2000).

JH-Familie	Name	Art	Sequenz 5' → 3' (Fluoreszenz-Markierung)
JH1	DPJH1	Primer	CGCTATCCCCAGACAGCAGA
JH2	R-JH2-Intron	Primer	GGTGCCTGGACAGAGAAGACT
JH3	R-JH3-Intron	Primer	AGGCAGAAGGAAAGCCATCTTAC
JH4	DPJH4	Primer	GAGTTAAAGCAGGAGAGAGGTTGTG
JH5	DPJH5	Primer	TGGCAAGCTGAGTCTCCCTAA
JH6	DPJH6	Primer	GCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGT
JH1, JH2, JH4, JH5	JHQ1/4/5	Sonde	(FAM) ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG (TAMRA)
JH3	T-JH3	Sonde	(FAM) CAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA (TAMRA)
JH6	JHQ6	Sonde	(FAM) ACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAG (TAMRA)

Die Primer werden auf eine Konzentration von 10 µM, die Sonden auf 5 µM mit 1:10 in Wasser verdünntem TE-Buffer, pH 8,0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingestellt.

Als Referenzgen wird das Gen für Albumin mit folgender Primer- und Sondensequenz verwendet:

Tabelle 20: Primer- und Sondensequenzen des Referenzgens Albumin nach (Pongers-Willemse et al., 1998).

Name	Art	Sequenz 5' → 3'
Albumin_F	Primer	TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT
Albumin_R	Primer	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT
Albumin_S	Sonde	TGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGA

Für die Standardkurve wird die DNA aus der Erstdiagnose mit einem WT-Pool aus 8-10 DNAs von Patient*innen mit MPN oder Hämochromatose bis zu einer Verdünnung von 1:10⁶ gemischt. Für die Albumin-Standardkurve wird der WT-Pool bis zu einer Verdünnung von 1:10⁶ mit Wasser gemischt.

Der Ansatz erfolgt in Triplikaten und setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 21: Zusammensetzung des Ansatzes der ASO-qPCR

Reagenz	Volumen [μ l]
Wasser	0,25
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	10
forward Primer [10 μ M]	1,8
reverse Primer [10 μ M]	1,8
Sonde [5 μ M]	1
BSA [50 mg/ml]	0,15
DNA	5

Eine NTC wird pro Mastermix mitgeführt.

Der Ansatz erfolgt in einer Microamp Fast Optical Reaktionsmikrotiterplatte mit 96 Wells (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf dem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System oder Applied Biosystems QuantStudio 6 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit folgendem Protokoll:

Tabelle 22: Cyclertprotokoll der ASO-qPCR

Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min:s]	Zyklen
95	00:20	1
95	00:15	50
60	00:30	

Die Auswertung erfolgt mit der 7500 Software (Version 2.3) oder QuantStudio Real-Time PCR Software (Version 1.7.2) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

2.2.8. LymphoTrack® *IGH* Assays

Der Ansatz der LymphoTrack *IGH* Assays FR1/FR2/FR3 erfolgt nach Herstellerangaben.

Für die Bestimmung der Klonalität der Indexprobe werden alle drei Assays (FR1, FR2 und FR3) gleichzeitig mit folgender Zusammensetzung in einer twin.tec PCR-Platte 96 semi-skirted (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) angesetzt:

Tabelle 23: Zusammensetzung des Ansatzes der Indexproben

Reagenz	Volumen [μ l]
Master-Mix (FR1/2/3)	45
FalconTaq DNA Polymerase	0,2
DNA/ Kontrollen	5

Es werden pro Assay eine Negativkontrolle, eine Positivkontrolle und eine NTC mitgeführt.

Für die Analyse der MRD-Proben wird gezielt nur der Assay verwendet, in dem bei der Indexprobe die Klonalität nachweisbar war. Der Ansatz erfolgt in Triplikaten mit verschiedenen Indices in einer twin.tec PCR-Platte 96 semi-skirted (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und idealerweise mit einem DNA-Input von 1.000 ng pro Ansatz. Die DNA muss außerdem eine A260/280-Ratio zwischen 1,8 und 2 aufweisen.

Zur Bestimmung der klonalen Frequenz, der geschätzten klonalen Zelläquivalente und der geschätzten klonale Zelläquivalente pro 1 Million kernhaltigen Zellen wird den MRD-Proben und der LymphoTrack® B-cell Low Positive Control die Spike-in Kontrolle LymphoQuant® B-cell Internal Control (Invivoscribe, San Diego, USA) hinzugegeben:

Tabelle 24: Zusammensetzung des Ansatzes der MRD-Proben

Reagenz	Volumen [μ l]
Master-Mix (FR1/2/3)	45
FalconTaq DNA Polymerase	0,2
LymphoQuant® B-cell Internal Control	2
DNA/ low positive Control	8

Der Negativkontrolle und der NTC wird die Spike-in Kontrolle nicht hinzugegeben, sondern stattdessen 10 μ l der Kontrolle/ des Wassers (RNase-Free Water - Qiagen, Venlo, Niederlande) verwendet.

Die PCR erfolgt dann auf einem 2720 ThermalCycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit folgendem Protokoll, welches für Index- und MRD-Proben identisch ist:

Tabelle 25: Thermocyclerprotokoll LymphoTrack IGH Assays

Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Zyklen
95	07:00	1
95	00:45	29
60	00:45	
72	01:30	
72	10:00	1
15	∞	

Nach der PCR werden die entstandenen Produkte mit aufgereinigt. Hierbei werden die PCR-Produkte 1:1 (im Falle von Indexproben 50 µl, bzw. bei MRD-Proben 55 µl) mit AMPure XP Reagent (Beckman Coulter, Brea, USA) gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Platte auf einem Magnetständer platziert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Während die Platte weiterhin auf dem Magnetständer platziert ist, folgen zwei Waschschrte mit je 200 µl 80 % Ethanol (Ethanol absolute - Sigma-Aldrich, St Louis, USA und AccuGene Molecular Biology Water - Biozym Scietific, Hessisch Oldendorf, Deutschland), mit einer Inkubationszeit von je 30 s. bei Raumtemperatur. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Danach werden die Magnetpartikel in der Platte auf dem Magnetständer für 5 min bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Die Platte wird vom Magnetständer genommen und die Magnetpartikel in 25 µl 10 mM Tris-HCL-Puffer, pH 8.0 (Trizma®-hydrochlorid-Lösung, 1 M, pH 8.0 - Sigma-Aldrich, St Louis, USA und AccuGene Molecular Biology Water - Biozym Scietific, Hessisch Oldendorf, Deutschland) gelöst und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wird auf dem Magnetständer platziert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 22 µl des Überstandes werden dann in eine neue twin.tec PCR-Platte 96 skirted (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt.

Die aufgereinigten Produkte werden dann quantifiziert (siehe 2.2.9. KAPA-Library-Quantifizierung und 2.2.10. TapeStation Quantifizierung).

Die PCR-Produkte werden auf 4 nM mit einem Verdünnungspuffer, bestehend aus 10 mM Tris-HCL, pH-Wert 8,0 und 0,05 % Tween 20-Lösung (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) in einem Multi-µ-Strip Pro 8er-Kette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit einem Volumen von 20 µl eingestellt und Assay-weise 10 µl

gepoolt. Sollte ein PCR-Produkt unter 4 nM aufweisen, werden davon direkt 10 µl gepoolt. Die NTC wird nicht weiter mitgeführt.

Die Pools werden dann quantifiziert (Kapa-Library-Quantifizierung oder TapeStation Quantifizierung, siehe 2.2.9. KAPA-Library-Quantifizierung und 2.2.10. TapeStation Quantifizierung) und können für die Sequenzierung mittels NGS verwendet werden.

2.2.9. KAPA-Library-Quantifizierung

Für die Quantifizierung der aufgereinigten Amplikons des LymphoTrack-Ansatzes mit dem KAPA-Library-Quantification Kit (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) werden diese nach Angabe der LymphoTrack *IGH* Assay-Anweisung in zwei Schritten verdünnt. Dies geschieht auf 1:4.000 mit einem Verdünnungspuffer, bestehend aus 10 mM Tris-HCL, pH-Wert 8,0 und 0,05 % Tween 20-Lösung (Sigma-Aldrich, St Louis, USA):

- 1.) 2 µl PCR-Produkt werden mit 198 µl Verdünnungspuffer gemischt.
- 2.) 5 µl der Verdünnung aus 1.) werden mit 195 µl Verdünnungspuffer gemischt.

Für die Quantifizierung der gepoolten Amplikons werden die Pools in zwei Schritten auf 1:1.000 mit einem Verdünnungspuffer, bestehend aus 10 mM Tris-HCL, pH-Wert 8,0 und 0,05 % Tween 20-Lösung (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), verdünnt (Invivoscribe, 2022, pp. 20):

- 1) 2 µl Pool werden mit 198 µl Verdünnungspuffer gemischt.
- 2) 20 µl der Verdünnung aus 1) werden mit 180 µl Verdünnungspuffer gemischt.

Die Amplikons, Pools und Standards werden in Duplikaten quantifiziert.

Der Ansatz der qPCR setzt sich wie folgt zusammen und erfolgt nach Herstellerangaben (Roche, 2020, pp. 6):

Tabelle 26: Zusammensetzung des Ansatzes für die KAPA-Library-Quantifizierung

Reagenz	Volumen [µl]
Wasser	4
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix mit Primer-Premix	12
PCR-Produkt/ Standard	4

Es werden sechs Standards mit Konzentrationen von 20 pM bis 0,0002 pM zur Erstellung einer Standardkurve zur Bestimmung der Konzentration der Amplikons und Pools mitgeführt. Des Weiteren wird eine NTC mitgeführt.

Der Ansatz erfolgt in LightCycler 480 Multiwell 96-Platten (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) auf dem LightCycler® 480 System (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) gemäß Protokoll in Tabelle 27.

Tabelle 27: Cyclerprotokoll des LightCycler® 480 System zur KAPA-Library Quantifizierung

Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Zyklen
95	05:00	1
95	00:30	35
60	00:45	

Die Auswertung der qPCR erfolgt mit der LightCycler® 480 Software (Version 1.5.0 SP4) (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz). Der Ansatz ist auswertbar, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- der durchschnittliche ΔCt -Wert zwischen den Standards liegt zwischen 3,1 und 3,6.
- die ermittelte Reaktionseffizienz liegt zwischen 90 - 110 %.
- die Steigung der Standardkurve liegt zwischen -3,1 und -3,6.
- das Bestimmtheitsmaß R^2 der Standardkurve ist $\geq 0,99$.
- die NTC der qPCR weist einen Ct 3 Zyklen später als der durchschnittliche Ct des niedrigsten Standards auf.
- der LymphoTrack Assay weist keine Kontamination auf. Um dies zu ermitteln, wird folgende Formel verwendet: $\Delta Ct = Ct(\text{NTC LymphoTrack}) - Ct(\text{Kontrolle LymphoTrack})$. Sowohl für die Positivkontrolle, als auch für die Negativkontrolle, sollte der $\Delta Ct \geq 4$ betragen.

Sind alle Kriterien erfüllt, kann die Konzentration der Amplikons mit folgender Formel errechnet werden:

$$\text{Konzentration [nM]} = \frac{452 \cdot \text{durschn. Konz. qPCR [pM]}}{\text{durschn. Fragmentlänge}} \cdot 4$$

452 entspricht der durchschnittlichen Fragmentlänge in bp der Standards der KAPA-Library-Quantifizierung. Die durchschnittlichen Fragmentlängen der LymphoTrack Assays werden wie folgt angegeben:

- *IGH* FR1 - 450 bp
- *IGH* FR2 - 390 bp
- *IGH* FR3 - 260 bp

Für die Ermittlung der Konzentration der Pools wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Konzentration [nM]} = \frac{452 \cdot \text{durschn. Konz. qPCR [pM]}}{\text{durschn. Fragmentlänge}}$$

2.2.10. TapeStation Quantifizierung

Für die Quantifizierung der aufgereinigten Produkte des LymphoTrack-Ansatzes werden 3 µl D100 Buffer mit 1 µl PCR-Produkt in eine twin.tec PCR-Platte 96 skirted (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben, gevortext und abzentrifugiert. Die Amplikons werden in Singletons quantifiziert, die Pools in Triplikaten. Die TapeStation nutzt ScreenTapes, um die Nukleinsäuren mittels Elektrophorese aufzutrennen (Agilent Technologies Inc., 2022, pp. 18). Die Auswertung erfolgt mit der TapeStation Analysis Software (Version 4.1.1) (Agilent, Santa Clara, USA), in der die Region für die Quantifizierung auf 200 bis 1.000 bp eingestellt wurde, um alle drei FR-Produkte abzudecken.

Für die Ermittlung der Konzentration der Amplikons und der Pools wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Konzentration [nM]} = \frac{(\text{durschn.}) \text{Konz. TapeStation [ng/}\mu\text{l]}}{660 \text{ g/mol} \cdot \text{durschn. Fragmentlänge}} \cdot 10^6$$

Für die Pools wird die durchschnittliche Konzentration der Triplikate verwendet. 660 g/mol entsprechen der durchschnittlichen Masse eines DNA-bp. Die durchschnittlichen Fragmentlängen der LymphoTrack Assays werden wie folgt angegeben:

- *IGH* FR1 - 450 bp
- *IGH* FR2 - 390 bp
- *IGH* FR3 - 260 bp

2.2.11. NGS

Die Sequenzierung der Pools des LymphoTrack-Ansatzes erfolgen auf dem MiSeq (Illumina, San Diego, USA) mit dem MiSeq Reagent Kit v3 (600 Zyklen) (Illumina, San Diego, USA).

Wird mehr als ein Assay sequenziert, werden 40 fmol der Pools zusammen mit einem Verdünnungspuffer (bestehend aus 10 mM Tris-HCL, pH-Wert 8,0 und 0,05 % Tween 20-Lösung (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)) auf ein Gesamtvolumen von 18 µl gebracht. Die Denaturierung erfolgt mit 2 µl 1 N NaOH (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) bei Raumtemperatur für 5 min.

Wird nur ein Assay sequenziert, werden 10 µl des auf 4 nM eingestellten Pools mit 10 µl 0,2 N NaOH (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) bei Raumtemperatur für 5 min denaturiert.

Danach werden unabhängig von der Anzahl an sequenzierten Pools 980 µl HT1-Puffer (Illumina, San Diego, USA) hinzugegeben und der Pool ebenfalls mit HT1-Puffer auf 8 pM mit einem Gesamtvolumen von 600 µl eingestellt. Zuletzt werden 30 µl des Pools verworfen und 30 µl 8 pM PhiX (Illumina, San Diego, USA) hinzugegeben.

Es werden 2 x 301 Zyklen sequenziert. Nach jedem Lauf wird ein Post-Run-Wash mit 0,01%iger NaOCl-Waschlösung (Sodium hypochlorite reagent 5 % chlorine - Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA und Milli-Q Wasser) für die Matrizenleitung und 0,5%iger Tween 20-Lösung (Sigma-Aldrich, St Louis, USA und Milli-Q Wasser) für die übrigen Leitungen durchgeführt, um Kontaminationen zu verhindern.

Die Qualitätskontrolle des Laufs erfolgt mit dem Sequence Analysis Viewer (Version 1.10.2) (Illumina, San Diego, USA). Die %Q30-Werte des Laufs sollten > 70 % betragen, sind aber abhängig von der Probenqualität. Daher können Analysen, deren individueller %Q30-Wert > 70 % beträgt, ausgewertet werden, auch wenn der %Q30-Wert des Laufs darunter liegen sollte (Invivoscribe, 2022, pp. 25). Die Berechnung der individuellen %Q30-Werte und Auswertung der einzelnen Indexpatienten erfolgt mit der LymphoTrack Software (Version 2.4.3) (Invivoscribe, San Diego, USA).

Bei der mitgeführten Positivkontrolle sollte die am häufigsten zusammengelegte Sequenz einen Anteil von $\geq 2,5\%$ der Gesamtreads aufweisen. Bei der Negativkontrolle sollte die am häufigsten zusammengelegten Sequenzen einen Anteil $< 1\%$ der Gesamtreads aufweisen. Die Depth of Coverage der Kontrollen sollte > 20.000 Reads betragen.

Die Depth of Coverage der Indexprobe sollte ≥ 10.000 , idealerweise aber > 20.000 Reads betragen. Unter 10.000 Reads ist keine Beurteilung möglich. Für die Bestimmung der Klonalität der Indexprobe wurden folgende Kriterien angewandt:

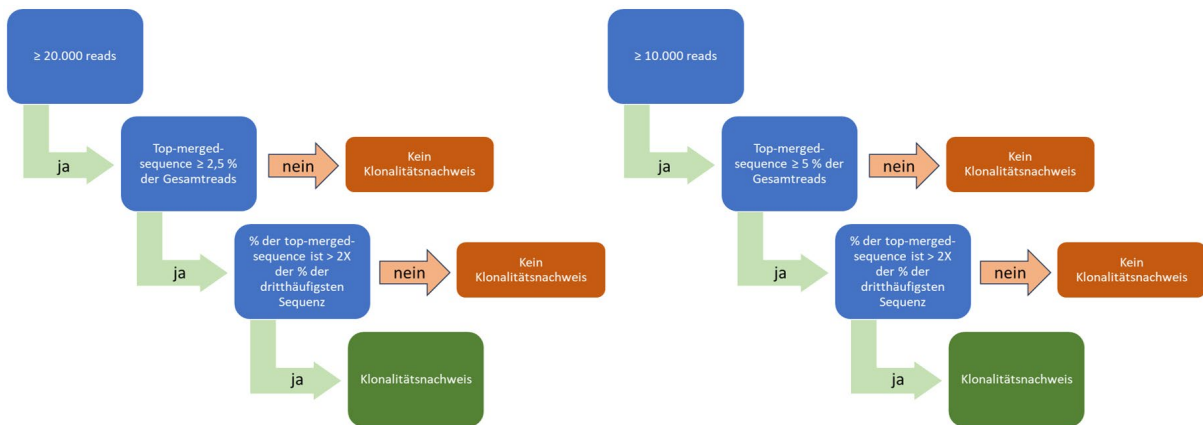


Abbildung 9: Kriterien zur Bestimmung der Klonalität einer Indexprobe.

Zur Bestimmung der Klonalität einer Indexprobe wird zunächst unterschieden, ob die Anzahl der Reads ≥ 10.000 oder ≥ 20.000 beträgt. Unter 10.000 Reads ist keine Beurteilung möglich. Bei ≥ 10.000 muss die top merged sequence (die am häufigsten zusammengelegte Sequenz, Abweichungen von bis zu zwei Basen werden akzeptiert) einen Anteil $\geq 5\%$, bei ≥ 20.000 $\geq 2,5\%$ aller Reads betragen. Außerdem muss der Anteil der top merged sequence mehr als doppelt so groß sein, wie der Anteil der dritthäufigsten Sequenz.

Abbildung modifiziert nach (Invivoscribe, 2022, pp. 27).

In Abbildung 10 ist ein Beispiel für die Darstellung der Ergebnisse für die Ermittlung der Indexklonalität durch die LymphoTrack Software dargestellt. Da der Total Read count mit 129.072 über 20.000 liegt, gilt der Grenzwert der top merged sequence von $\geq 2,5\%$ für den Nachweis von Klonalität, was im Beispiel mit $14,2\%$ erfüllt ist. Bei den merged Sequenzen werden Sequenzen mit einem Mismatch von bis zu zwei Basen zusammengelegt. Die dritthäufigste zusammengelegte Sequenz liegt bei $0,13\%$. Da die top merged sequence damit mehr als zweimal so häufig vorkommt, ist der Nachweis von Klonalität für IGHV5-51_02/IGHJ4_02

erbracht. Zusätzlich werden die 200 häufigsten nicht zusammengelegten Sequenzen grafisch dargestellt, siehe Abbildung 10B.

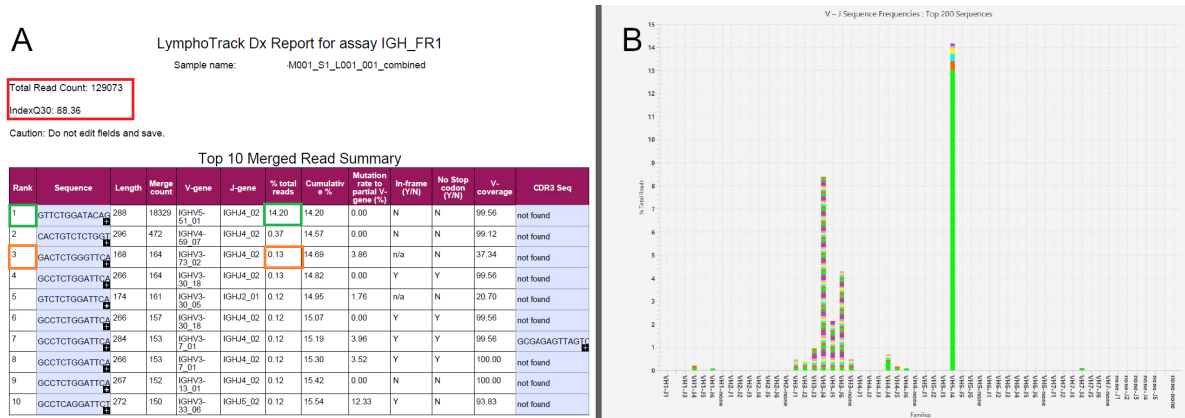


Abbildung 10: Darstellung der Ergebnisse bei der Ermittlung der Indexklonalität durch die LymphoTrack Software

A: Da die verwendeten Kriterien abhängig von der Anzahl der Reads sind, werden diese im PDF ganz oben dargestellt, zusammen mit für die Probe individuellen %Q30-Wert (markiert durch rote Umrandung). Darunter werden, nach ihrer Häufigkeit sortiert, die Sequenzen dargestellt, die bis zu einem Mismatch von zwei Basen zusammengelegt wurden. Betrachtet wird die am häufigsten gefundene merged sequence (grüne Umrandung), in Bezug zur dritthäufigsten merged sequence (orange Umrandung) für die in Abbildung 9 genannten Kriterien für den Nachweis von Klonalität.

B: Zusätzlich werden die nicht zusammengelegten häufigsten 200 Sequenzen grafisch dargestellt. Hierbei werden die Sequenzen ihrer Group-Usage nach auf der x-Achse aufgetrennt. Die unterschiedlichen Farben stellen die einzelnen Sequenzen dar, während die Länge der Balken die Häufigkeit in Relation zur Gesamtreadanzahl widerspiegelt.

Für die Auswertung der MRD-Proben wird nach der Analyse mit der LymphoTrack Software (Version 2.4.3) (Invivoscribe, San Diego, USA) die LymphoTrack MRD Software (Version 2.0.2) (Invivoscribe, San Diego, USA) verwendet. Hierbei wird die in der Indexprobe bestimmte klonale Sequenz gezielt in der MRD-Probe gesucht und mithilfe der Spike-in Kontrolle LymphoQuant® B-cell Internal Control (Invivoscribe, San Diego, USA) und der Angabe des DNA-Inputs die klonale Frequenz, die geschätzten klonalen Zelläquivalente und die geschätzte klonalen Zelläquivalente pro 1 Million kernhaltigen Zellen insgesamt errechnet, falls die Sequenz detektiert werden kann. Falls die Indexsequenz nicht gefunden werden kann, gibt die Software das Konfidenzintervall für das ermittelte Sensitivitätslevel an.

Für den Vergleich von gefundenen klonalen Sequenzen wurde die online Version von MAFFT (Version 7.511) (Kazutaka Katoh (Osaka University), Osaka, Japan) verwendet.

2.2.12. WGS

Das WGS wird in der Abteilung für Forschung und Entwicklung der MLL Münchner-Leukämielabor-GmbH durchgeführt. Für genaue Angaben zum Protokoll siehe (Da Vià et al., 2021, pp. 620).

2.2.13. Statistische Auswertung

Shapiro-Wilk-Test

Um zu entscheiden, welche statistischen Tests für die Analyse geeignet sind, muss zunächst eine Überprüfung erfolgen, ob eine Normalverteilung der Daten vorliegt. Hierzu wurde ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Dieser führt einen Vergleich des Datensets mit einem normalverteilten Datenset durch, das denselben Mittelwert und dieselbe Standardabweichung aufweist. Da damit die Nullhypothese lautet, dass eine Normalverteilung vorliegt, sollte man bei einem p-Wert $< 0,05$ (was dem Grenzwert eines akzeptablen α -Fehlers entspricht) die Nullhypothese verwerfen und davon ausgehen, dass keine Normalverteilung vorliegt (Ghasemi und Zahediasl, 2012, pp. 487). In dem Fall werden nicht-parametrische statistische Verfahren gewählt. Die Auswertung erfolgte mit JASP (Version 0.17.2.1, University of Amsterdam, Amsterdam, Niederlande).

Passing-Bablok-Regression

Für einen Methodenvergleich, bei dem beide Variablen mit Fehlern behaftet sind und ein linearer Zusammenhang besteht, eignet sich eine Passing-Bablok-Regression. Eine Normalverteilung der Daten ist keine Voraussetzung für die Passing-Bablok-Regression, außerdem ist dieses Verfahren nicht empfindlich gegenüber Ausreißern. Es sollten mindestens 40 Proben mit beiden Messmethoden gemessen werden. Es werden die 95 %-Konfidenzintervalle des y-Achsenabschnitts und der Steigung berechnet und mit deren Hilfe die Gleichheit der Methoden verglichen und proportionale und systematische Fehler ausgeschlossen. Im Falle einer guten Übereinstimmung zweier Messmethoden

enthalten diese für die Steigung die 1 und für den y-Achsenabschnitt die 0 (Bilić-Zulle, 2011, pp. 49–50). Die Auswertung und Diagrammerstellung erfolgte mit der Software cp-R (Daniel T. Holmes, Vancouver, Kanada).

Bland-Altman-Analyse

Ein weiteres Verfahren für den Vergleich zweier quantitativer Methoden ist die Bland-Altman-Analyse. Hierbei wird der Unterschied der beiden Messmethoden gegen deren Mittelwert dargestellt. Außerdem wird der Mittelwert, und die Limits of Agreement, welche \pm der 1,96fachen Standardabweichung um den Mittelwert liegen, dargestellt. 95 % der Datenpunkte sollten innerhalb der Limits of Agreement liegen (Giavarina, 2015, pp. 143). Des Weiteren werden die 95 %-Konfidenzintervalle für den Mittelwert, und den oberen und unteren Limit of Agreement angegeben. Bei nicht-normalverteilten Daten sollte eine logarithmische Transformation erfolgen (Giavarina, 2015, pp. 145). Die Auswertung und Diagrammerstellung erfolgte mit JASP (Version 0.17.2.1, University of Amsterdam, Amsterdam, Niederlande).

Variationskoeffizient

Um die Übereinstimmung von Messungen in Inter-Präzisionsassays zu vergleichen, wird der Variationskoeffizient (CV) herangezogen. Dieser setzt die Standardabweichung in Bezug zum Mittelwert fest und kann auch in Prozent angegeben werden (%CV) (Weiß, 2019, pp. 48–49).

Limit of Blank

Das Limit of Blank wird bei der Methodvalidierung ermittelt, um festzustellen, wie hoch der Grenzwert ist, bei dem ein Messverfahren ein Messergebnis erzeugt, obwohl die getestete Probe keinen Analyten enthält. Das Limit of Blank gibt also einen Grenzwert zur Unterscheidung von falsch positiven und korrekt positiven Werten an. Für normalverteilte Proben beträgt es den gemessenen Mittelwert addiert mit der 1,645fachen Standardabweichung. Damit umfasst es 95 % der gemessenen Werte und lässt einen α -Fehler von 5 % zu (Armbruster und Pry, 2008, pp. 49–50). Für die Ermittlung des Limits of Blank sollten 60 Replikate getestet werden (Armbruster und Pry, 2008, pp. 52). Bei nicht-normalverteilten Werten beträgt das Limit of Blank das Perzentil, welches der Differenz des

festgelegten α -Fehlers von 1 entspricht. Bei einem akzeptierten α -Fehler von 5 % beträgt das Limit of Blank also das 95te Perzentil der gemessenen Werte (Linnet und Kondratovich, 2004, pp. 734).

3. Ergebnisse

3.1. Ermittlung der Klonalität der Indexproben

Die Ermittlung des Klonotyps der Indexprobe wurde für insgesamt 37 Patient*innen mit 42 Proben durchgeführt. Die höhere Probenanzahl kam dadurch zustande, dass für zwei ALL-Patient*innen und einen MM-Patienten je zwei Proben im Verlauf mit aktivem Krankheitsgeschehen vorhanden waren. Außerdem gab es für zwei MM-Patient*innen je zwei Materialien (CD138+-MACS-Zellen und KM), welche beide untersucht wurden.

In 90,5 % der Fälle (38/ 42 Proben) und für 91,9 % der Patient*innen (34/ 37) konnten klonale Sequenzen nachgewiesen werden, siehe Tabelle 28. Die vier Proben, bei denen kein Klonotyp ermittelt werden konnte, stammen von drei MM-Patient*innen.

Tabelle 28: Ermittlungsraten der Klonalität der Indexproben in den drei Assays

	MM	CLL/MM	CLL	ALL	Total
Anzahl Patient*innen	21	1	13	2	37
Anzahl Proben	24	1	13	4	42
Detektionsrate der Patient*innen (Anzahl / Prozent)	18 85,70%	1 100,00%	13 100,00%	2 100,00%	34 91,90%
Detektionsrate der Proben (Anzahl / Prozent)	20 83,30%	1 100,00%	13 100,00%	4 100,00%	38 90,50%
nachweisbar in FR1 (Anzahl / Prozent)	8 33,30%	1 100,00%	13 100,00%	4 100,00%	26 61,90%
nachweisbar in FR2 (Anzahl / Prozent)	17 70,80%	1 100,00%	13 100,00%	4 100,00%	35 83,30%
nachweisbar in FR3 (Anzahl / Prozent)	10 47,60%	1 100,00%	12 92,30%	4 100,00%	27 64,30%

Während für die Proben der ALL- und der meisten CLL-Patient*innen die Klonotypen in allen drei Assays nachweisbar war, verhielt es sich für die Proben von MM-Patient*innen anders. So war die klonale Sequenz durch den FR2-Assay in 70,8 % nachweisbar, im FR3- in 47,6 % und im FR1-Assay in 33,3 % der Fälle.

Für die beiden MM-Patient*innen, bei denen sowohl durch eine Probe aus CD138+-MACS-Zellen als auch KM die Indexklonalität untersucht wurde, waren jeweils in beiden Materialien identische Klonotypen nachweisbar. Die Proben

beider Patient*innen waren von ihren Charakteristika, wie der aberranten Plasmazellpopulationen und des Reinheitsgrad der sortierten CD138+-Zellen, ähnlich. Bei MLL_216261 wurden mit MFC 1 % aberrante Zellen gemessen und die CD138+-MACS-Zellen wiesen einen Reinheitsgrad von 98 % auf. Bei MLL_226239 wurden mit MFC 3 % aberrante Zellen gemessen und die CD138+-MACS-Zellen wiesen einen Reinheitsgrad von 80 % auf.

Tabelle 29: Vergleich der Ergebnisse von unterschiedlichen Materialien (KM und CD138+-MACS-Zellen) von zwei MM-Patient*innen; 1: Übereinstimmung der Sequenz aus dem FR2-Assay beträgt mit MAFFT 100 %.

Assay	Study ID	Material	Reads	%top merged seq	%3rd merged seq	Klonalitäts-nachweis	V-Gen	J-Gen
FR1	MLL_216261	CD138+-MACS	70574	0,15	0,12	nein		
FR2	MLL_216261		211056	36,97	0,13	ja	IGHV3-33_06	IGHJ5_02
FR3	MLL_216261		227956	0,22	0,18	nein		
FR1	MLL_216261	KM	92871	0,34	0,25	nein		
FR2	MLL_216261		186396	10,11	0,18	ja	IGHV3-33_06	IGHJ5_02
FR3	MLL_216261		222922	0,34	0,32	nein		
FR1	MLL_226239	CD138+-MACS	2714			N.A.		
FR2	MLL_226239		45017	86,12	0,07	ja	IGHV3-30_18	IGHJ4_02
FR3	MLL_226239		80019	5,49	1,48	ja	IGHV3-NL1_01 ¹	IGHJ4_02
FR1	MLL_226239	KM	40878	1,08	0,82	nein		
FR2	MLL_226239		378092	45,65	0,17	ja	IGHV3-30_18	IGHJ4_02
FR3	MLL_226239		332043	0,94	0,69	nein		

Trotz des geringen Infiltrationsgrades der aberranten Plasmazellpopulation wurde auch in den unsortierten KM-Zellen der Grenzwert der % total reads der top merged sequence überschritten und die Kriterien für den Nachweis von Klonalität erfüllt. Für die CD138+-MACS-Zellen wurde jeweils ein höherer Wert der % total reads der top merged sequence nachgewiesen, für MLL_216261 war er um 26,86 % höher, während er für MLL_226239 um 40,47 % höher war. Die generierten Reads waren für MLL_216261 für beide Materialien auf gleichem Niveau (Mittelwert der durch CD138+-MACS-Zellen generierten Reads: 169.862; Mittelwert der durch KM generierten Reads: 167.396). Für MLL_226239 funktionierte die Amplifikation mit KM deutlich besser als mit CD138+-MACS-Zellen (250.338 Reads im Mittel bei KM und 42.583 Reads im Mittel bei CD138+-MACS-Zellen). Im FR1-Assay des Ansatzes mit CD138+-MACS-Zellen wurden bei MLL_226239 zu wenige Reads generiert, um den Ansatz auszuwerten. Allerdings

lag hier auch im KM-Ansatz die Read-Anzahl deutlich geringer als im FR2- und FR3-Assay, siehe Tabelle 29.

Bei 20,59 % der Proben, für die der Klonotyp ermittelt werden konnte (7/ 34 Patient*innen: vier CLL-Patient*innen, der Patientin mit CLL/MM und zwei MM-Patient*innen), erfüllte neben der top merged sequence auch die zweithäufigste Sequenz die Kriterien für den Nachweis von Klonalität. Daher wurden für die insgesamt 34 Patient*innen, für die Klonalität nachgewiesen wurde, 41 klonale Sequenzen gefunden.

Die meisten gefundenen klonalen Sequenzen gehören mit 68,29 % (28/ 41) zur V_H-Gruppe V3, gefolgt von V4, was in 21,95 % (9/ 41) und V1 4,88 % (2/41) nachweisbar war. V2 und V5 war in jeweils 2,44 % (1/ 41) der Fälle nachweisbar. Für die Verwendung der J_H-Gruppe zeigt sich auch, dass bestimmte Gruppen häufiger nachgewiesen wurden. Am häufigsten wurde J4 mit 34,15 % (14/ 41) ermittelt, gefolgt von J6 mit 29,27 % (12/ 41), J5 21,95 % (9/41) und J3 9,76 % (4/41). J1 und J2 wurde zu je 2,44 % (1/ 41) nachgewiesen, siehe Abbildung 11.

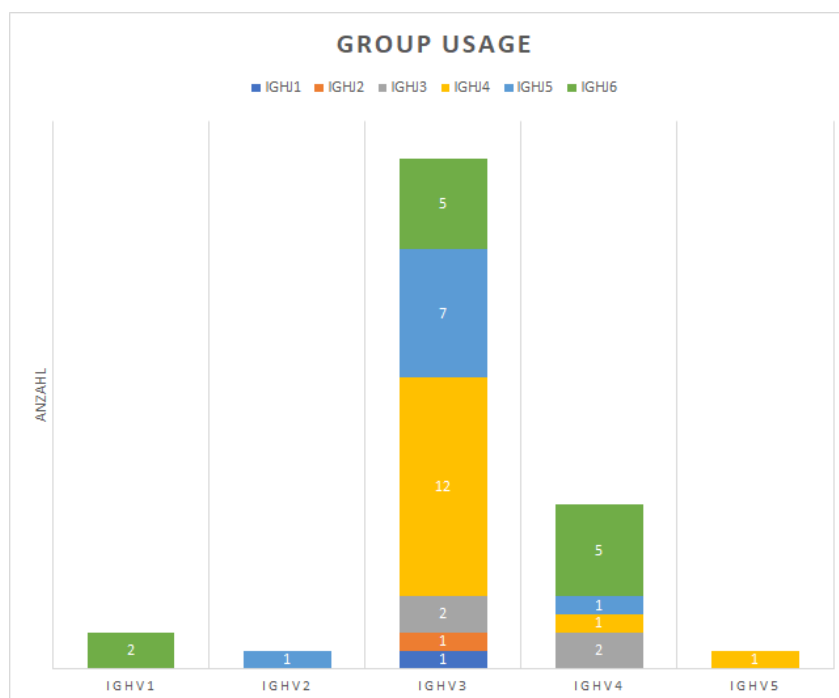


Abbildung 11: Group Usage der klonalen Sequenz aller Patient*innen (n=41)

Die am häufigsten verwendete Gruppe der V_H-Gene war V3 (n=28), gefolgt von V4 (n=9) und V1 (n=2). Für V2 und V5 war jeweils eine Sequenz nachweisbar. Die am häufigsten verwendete Gruppe der J_H-Gene war J4 (n=14), gefolgt von J6 (n=12), J5 (n=9) und J3 (n=4). Für J1 und J2 war jeweils eine Sequenz nachweisbar.

Betrachtet man nur die Proben von MM-Patient*innen, zeigt sich ein sehr ähnliches Bild. Die V_H -Gruppe V3 war in 65,00 % (13/ 20) der Proben nachweisbar, gefolgt von 25,00 % der V4-Gruppe (5/ 20). V1 und V2 wurde in jeweils 5,00 % (1/20) ermittelt. V5 wurde in den untersuchten Proben von MM-Patient*innen nicht verwendet. Die J_H -Gruppe J5 war in 40,00 % (8/ 20) der Proben nachweisbar, gefolgt von 25,00 % der J6-Gruppe (5/ 20) und je 15,00 % der J3- und J4-Gruppe (3/20). J1 wurde in 5,00 % (1/20) ermittelt, während J2 in den untersuchten Proben von MM-Patient*innen nicht gefunden wurde, siehe Abbildung 12.

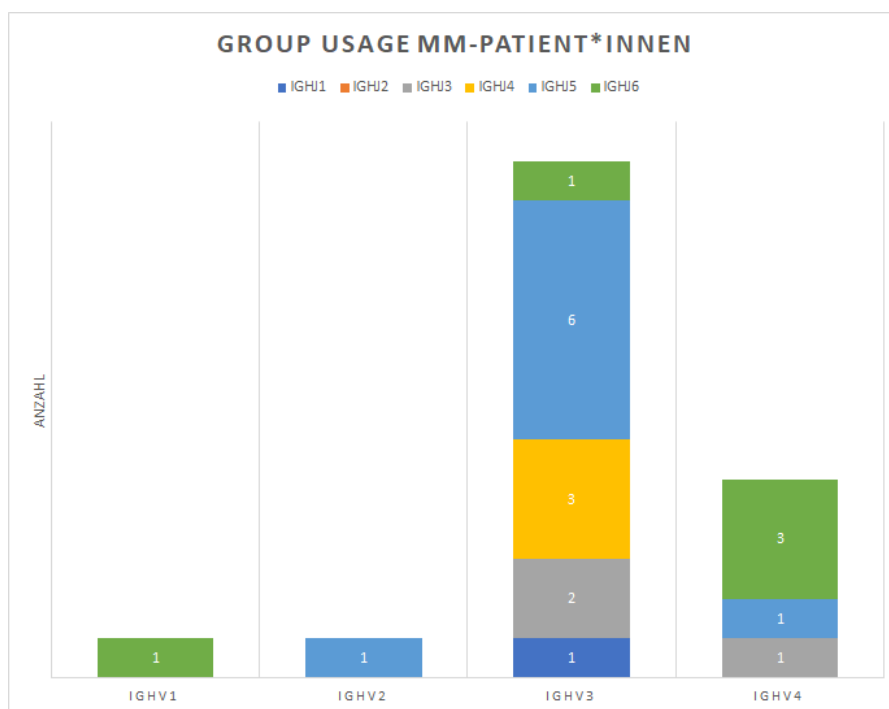


Abbildung 12: Group Usage der klonalen Sequenz der Proben von MM-Patient*innen (n=20)

Die am häufigsten verwendete Gruppe der V_H -Gene war V3 (n=13), gefolgt von V4 (n=5). Für V1 und V2 war jeweils eine Sequenz nachweisbar. V5 war in keiner klonalen Sequenz der Proben von MM-Patient*innen verwendet worden. Die am häufigsten verwendete Gruppe der J_H -Gene war J5 (n=8), gefolgt von J6 (n=5). J3 und J4 war jeweils in drei Sequenzen nachweisbar, gefolgt von J1 mit einer Sequenz. J2 konnte in den untersuchten Proben von MM-Patient*innen nicht nachgewiesen werden.

Für die vier Proben, für die kein Klonotyp durch den LymphoTrack-Assay gefunden wurde, wurde eine *IGH*- und *IGK*-Fragmentanalyse durchgeführt.

Tabelle 30: Eigenschaften und Ergebnisse der Proben für die keine klonale Sequenz im NGS gefunden wurde

Study ID	Diag.	Material	Reads FR1	Reads FR2	Reads FR3	atyp. PZ in Z [%]	aberr. PZ in I [%]	Reinheitsgrad PZ [%]	Ergebnis <i>IGH</i> - und <i>IGK</i> -Fragmentanalyse
MLL_246856	MM	CD138+MACS	47353	154443	113974	64	31	98	N.A., mit neuer DNA <i>IGH</i> klonal, <i>IGH</i> polyklonal
MLL_249858	MGUS	CD138+MACS	767087	600213	709924	9	2	80	<i>IGK</i> klonal, <i>IGH</i> polyklonal
MLL_224722	SMM	CD138+MACS	75145	95663	225114	n.d.	n.d.	20	vorbekanntes <i>IGK</i> -Rearrangement nicht mehr nachweisbar; <i>IGH</i> polyklonal
MLL_256916	MM	CD138+MACS	22660	94553	791242	n.d.	25	98	<i>IGH</i> und <i>IGK</i> klonal

n.d. - nicht durchgeführt; Z - Zytomorphologie; I – Immunphänotypisierung; PZ - Plasmazellen

Für MLL_246856 war der Ansatz zunächst nicht auswertbar. Es wurde daraufhin eine neue DNA-Isolation durchgeführt. Mit dieser war die *IGH*-Fragmentanalyse polyklonal, während für *IGK* Klonalität festgestellt werden konnte. Bei MLL_246856 und MLL_224722 handelt es sich um zwei Proben einer Patientin zu unterschiedlichen Verlaufszeitpunkten. Während für MLL_246856 mit 9 % atypischen Plasmazellen in der Zytomorphologie eine MGUS diagnostiziert wurde, da der Grenzwert von 10 % nicht erreicht wird, handelt es sich bei MLL_224722 laut einsendender Ärztin um ein SMM. Eine zytomorphologische oder immunphänotypisierende Untersuchung wurde für diesen Verlaufszeitpunkt nicht durchgeführt. Auch in der Fragmentanalyse kann für MLL_224722 keine klonale Sequenz in *IGH* oder *IGK* bei einem geringen Reinheitsgrad von 20 % der CD138+MACS-Zellen ermittelt werden. Für MLL_256916 wurde eine Sequenz im FR3-Assay gefunden, die den Kriterien für die Ermittlung der Klonalität entspricht mit 98,68 % total reads der top merged Sequenz und 0,01 % total reads der dritthäufigsten Sequenz. Allerdings handelt es sich um bei IGHV4/OR15-8_03, IGHJ4_02 um ein *IGH*-Orphon, ein Gen, das außerhalb des 14q-*IGH*-Lokus auf Chromosom 15 gefunden wird und daher nicht Teil eines Immunglobulin-kodierendes Gen sein kann (Lefranc, 2001, pp. 109). Für MLL_256916 wurde sowohl in der *IGH*- als auch in der *IGK*-Fragmentanalyse Klonalität nachgewiesen. Die anschließende Ermittlung der Sequenz durch Sanger-Sequenzierung war nicht auswertbar.

Für Proben von sieben Patient*innen (fünf CLL-Patient*innen, der CLL/MM-Patientin und einer ALL-Patientin) wurden im FR3-Assay jeweils eine, bzw. für einen Fall, welcher zwei klonale Sequenzen aufwies, zwei zusätzliche Sequenzen gefunden, die die Kriterien für den Nachweis von Klonalität erfüllten. Beim Vergleich mit den übrigen gefundenen klonalen Sequenzen mittels MAFFT zeigte sich, dass sich nur die erste Base der zusätzlichen Sequenz in FR3 unterscheidet, siehe Abbildung 13. Von fünf der sieben Proben waren die CDR3-Sequenzen verfügbar, welche jeweils nach Überprüfung mit MAFFT identisch waren. Bei zwei der Proben wurden keine CDR3-Sequenzen ermittelt und konnte daher nicht verglichen werden.

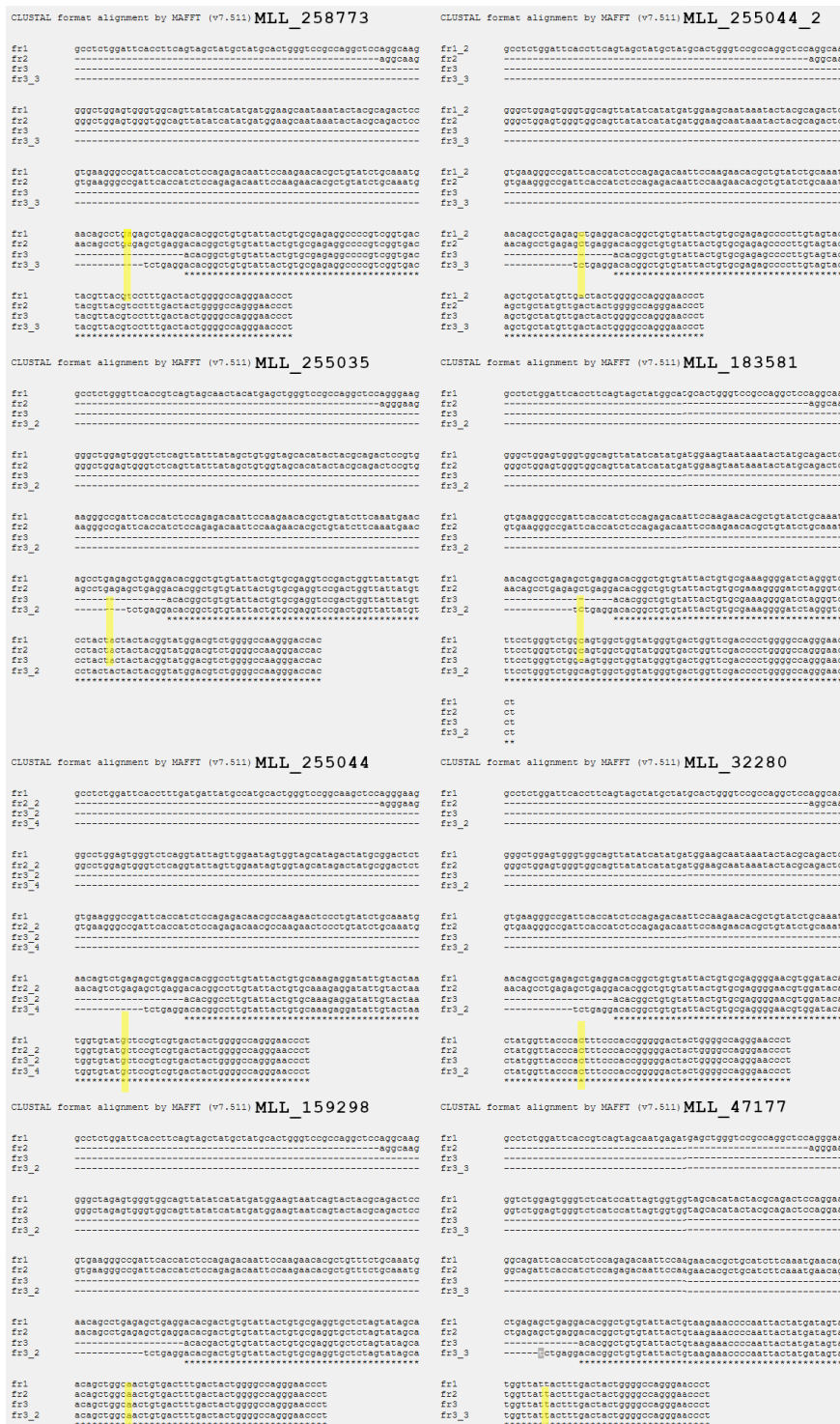


Abbildung 13: Vergleich der zusätzlichen FR3-Sequenz bei Proben sieben Patient*innen

Für Proben von sieben Patient*innen wurden im FR3-Assay jeweils eine, bzw. für einen Fall, welcher zwei klonale Sequenzen aufwies, zwei zusätzliche Sequenzen gefunden, die die Kriterien für den Nachweis von Klonalität erfüllten. Beim Vergleich mit den übrigen gefundenen klonalen Sequenzen mittels MAFFT zeigte sich, dass sich nur die erste Base der zusätzlichen Sequenz in FR3 unterscheidet, siehe gelbe Markierung. * markiert Basen, welche in allen untersuchten Sequenzen übereinstimmen

3.2. Vergleich mit anderen Methoden (Indexproben)

Für zwei ALL-Patient*innen waren je zwei Proben mit aktivem Krankheitsgeschehen zur Verfügung, die in der qPCR positiv waren und eine Sanger-Sequenzierung erhalten hatten. Für diese vier Proben konnte in allen Assays die klonale Sequenz ermittelt werden, siehe Tabelle 31.

Tabelle 31: Vergleich zwischen NGS LymphoTrack und Sanger-Sequenzierung/qPCR bei der Ermittlung des Klonotyps

Fall	Study ID	Sanger-Sequenzierung/ qPCR		NGS			MAFFT NGS FR1 und Sanger
		qPCR Ratio	Ergebnis Sanger- Sequenzierung	V Gen	J Gen	MAFFT NGS	
1	MLL_13367	98,9	VH5, JH4	VH5- 51*3	IGHV5- 51_01	IGHJ4_02	100%
	MLL_255034	13,5295			IGHV5- 51_01	IGHJ4_02	
2	MLL_246852	97,7429	VH3, JH6	VH3- 66*3	IGHV3- 66_03	IGHJ6_02	100%
	MLL_255035	11,2944			IGHV3- 66_03	IGHJ6_02	
					IGHV4- 39_02	IGHJ6_02	

Die ermittelten Sequenzen im FR1-Assay zu beiden Krankheitszeitpunkten wurden durch MAFFT mit denen der Sanger-Sequenzierung verglichen und wiesen eine Übereinstimmung von 100 % auf, siehe Abbildung 14.

```

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.511)

Sanger_MLL -----
MLL_13367_ gttctggatacagctttaccagctactggatcggtcggtgcgccagatgccccgggaaag
MLL_255034_ gttctggatacagctttaccagctactggatcggtcggtgcgccagatgccccgggaaag

Sanger_MLL -----
MLL_13367_ gcctggagtggatggggatcatctatcctggtgactctgataccagatacagcccgctcct
MLL_255034_ gcctggagtggatggggatcatctatcctggtgactctgataccagatacagcccgctcct

Sanger_MLL -----
MLL_13367_ tccaaggccaggtcaccatctcagccgacaagtccatcagcaccgcctacctgcagtgga
MLL_255034_ tccaaggccaggtcaccatctcagccgacaagtccatcagcaccgcctacctgcagtgga

Sanger_MLL -----tgtgcgagacccccgtattatgatt
MLL_13367_ gcagcctgaaggcctcggacaccgcatgtattactgtgcgagacccccgtattatgatt
MLL_255034_ gcagcctgaaggcctcggacaccgcatgtattactgtgcgagacccccgtattatgatt
*****

Sanger_MLL acatttggggaactacgggggctttgactactgg-----
MLL_13367_ acatttggggaactacgggggctttgactactggggccagggaaacct
MLL_255034_ acatttggggaactacgggggctttgactactggggccagggaaacct
*****

```

Abbildung 14: Vergleich der Sequenzen der Sanger-Sequenzierung (MLL_13367) mit NGS der Proben MLL_13367 und MLL_255034

* markiert Basen, welche in allen untersuchten Sequenzen übereinstimmen

Für die Patientin der beiden Proben MLL_246852 und MLL_255035 war die für die Ermittlung der Sanger-Sequenz verwendete DNA der Erstdiagnose nicht mehr für eine Analyse mit NGS verfügbar. Daher entsprechend die drei verglichenen Sequenzen drei unterschiedliche Krankheitszeitpunkte, siehe Abbildung 15.

```

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.511)

Sanger_ED -----
MLL_246852_ gcctctgggttcaccgctcagtagcaactacatgagctgggtccgcccaggctccagggaaag
MLL_255035_ gcctctgggttcaccgctcagtagcaactacatgagctgggtccgcccaggctccagggaaag

Sanger_ED -----
MLL_246852_ gggctggagtgggtctcagttatttatagctgtggttagcacatactacgcagactccgtg
MLL_255035_ gggctggagtgggtctcagttatttatagctgtggttagcacatactacgcagactccgtg

Sanger_ED -----
MLL_246852_ aagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatcttcaaatgaac
MLL_255035_ aagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatcttcaaatgaac

Sanger_ED -----tgtgcgaggtccgactggttattatgt
MLL_246852_ agcctgagagctgaggacacggctgtgtattactgtgcgaggtccgactggttattatgt
MLL_255035_ agcctgagagctgaggacacggctgtgtattactgtgcgaggtccgactggttattatgt
*****

Sanger_ED cctactactactacgggtatggacgtctgg-----
MLL_246852_ cctactactactacgggtatggacgtctggggccaagggaccac
MLL_255035_ cctactactactacgggtatggacgtctggggccaagggaccac
*****

```

Abbildung 15: Vergleich der Sequenzen der Sanger-Sequenzierung (ED - Erstdiagnose) mit NGS der Proben MLL_246852 und MLL_255035

* markiert Basen, welche in allen untersuchten Sequenzen übereinstimmen

Für MLL_255035 wurden im FR3-Assay zwei klonale Sequenzen gefunden. Bei der am häufigsten klonalen Sequenz handelt es sich um dieselbe, die auch in den anderen Assays gefunden wurde (IGHV3-66_03, IGHJ6_02). Bei der zweithäufigste Sequenz, welche ebenfalls den Kriterien für Klonalität entspricht, handelt es sich um IGHV4-39_02, IGHJ6_02. Die klonalen Sequenzen in allen Assays wurden durch MAFFT verglichen. Die zweite klonale Sequenz im FR3-Assay weist eine Abweichung in der ersten Base auf, siehe Abbildung 16.

```

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.511)

fr1      gcctctgggttcaccgtcagtagcaactacatgagctgggtccgccaggctccaggaag
fr2      -----aggaag
fr3      -----
fr3_2    -----

fr1      gggctggagtggtctcagttatttatagctgtggtagcacatactacgcagactccgtg
fr2      gggctggagtggtctcagttatttatagctgtggtagcacatactacgcagactccgtg
fr3      -----
fr3_2    -----

fr1      aaggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatcttcaaataaac
fr2      aaggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatcttcaaataaac
fr3      -----
fr3_2    -----

fr1      agcctgagagctgaggacacggctgtgtattactgtgaggtccgactgggtattatgt
fr2      agcctgagagctgaggacacggctgtgtattactgtgaggtccgactgggtattatgt
fr3      -----acaggtctgtgtattactgtgaggtccgactgggtattatgt
fr3_2    -----tctgaggacacggctgtgtattactgtgaggtccgactgggtattatgt
*****

fr1      cctactactactacggtatggacgtctggggccaagggaccac
fr2      cctactactactacggtatggacgtctggggccaagggaccac
fr3      cctactactactacggtatggacgtctggggccaagggaccac
fr3_2    cctactactactacggtatggacgtctggggccaagggaccac
*****

```

Abbildung 16: Vergleich der klonalen Sequenzen der drei Assays von MLL_255035

* markiert Basen, welche in allen untersuchten Sequenzen übereinstimmen; bei fr3_2 handelt es sich um die klonale Sequenz, die am zweithäufigsten gefunden wurde und die Kriterien für den Nachweis von Klonalität erfüllt.

Für fünf Proben von Patient*innen mit MM wurden die Ergebnisse von WGS und Ermittlung der Indexklonalität durch LymphoTrack verglichen. Für alle fünf Proben wurden dieselben V- und J-Gene ermittelt.

Tabelle 32. Vergleich zwischen NGS LympHoTrack und WGS bei der Ermittlung der Index-Klonalität

Study-ID	Material	NGS LympHoTrack		WGS	
		V-Gen	J-Gen	V-Gen	J-Gen
MLL_62418	CD138+ MACS	IGHV2-5_08	IGHJ5_02	IGHV2-5*00(155,6)	IGHJ5*00(93,7)
MLL_62419	CD138+ MACS	IGHV4-39_07	IGHJ6_03	IGHV4-3400(121,2), IGHV4-400(120,2), IGHV4-3900(117,7), IGHV4-5900(112,2)	IGHJ6*00(135,1)
MLL_62420	CD138+ MACS	IGHV3-9_01	IGHJ5_02	IGHV3-9*00(128,5)	IGHJ5*00(109,1)
MLL_62421	CD138+ MACS	IGHV1-69_13	IGHJ6_02	IGHV1-69D00(168,8), IGHV1-6900(167,8)	IGHJ6*00(94,1)
MLL_62422	CD138+ MACS	IGHV3-30-3_01	IGHJ5_02	IGHV3-30*00(128,7)	IGHJ5*00(121,5)

Zur genaueren Untersuchung wurden die klonalen Sequenzen des WGS und NGS durch MAFFT auf Übereinstimmungen und Unterschiede untersucht. Alle Sequenzen wiesen eine Übereinstimmung zu 100 % auf, siehe Abbildung 17.

```

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.511) MLL_62418
WGS -----
fr2 aggaagggccctggagtggttggaactcattatggggatgatgataagcattacagtc

WGS -----
fr2 atctctgaagagcaggctcaccatcaccagggaaccccaaaaacaggttgctcttac
*****

WGS agtgaccaactggaccagctggacacagccacatattactgtgcaaacacctgatgac
fr2 agtgaccaactggaccagctggacacagccacatattactgtgcaaacacctgatgac
*****

WGS tgcctattcgcacttgcactcctggggccaagggagcccttgcacogtctctccagctc
fr2 tgcctattcgcacttgcactcctggggccaagggagcccttgcacogtctctccagctc
*****

WGS caccaagggcccatcggctctcccccctggcaacct
fr2 -----

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.511) MLL_62419
WGS -----
fr3 -----
fr2 agggatggggctggagtggttggaagtgctattatagtgaggacacctactacaacc

WGS -----
fr3 -----
fr2 gtcctcaagagtogagtcaccatatacctagacaggtccaagaaccagttctccctgag

WGS gctgagctctgtgaccccgagacacggccgtatattactgtgagagagcggtctattg
fr3 -----
fr2 gctgagctctgtgaccccgagacacggccgtatattactgtgagagagcggtctattg
*****

WGS tactactaccagctgctatgagtaacttctactactacatggacgtctggggcaaggac
fr3 tactactaccagctgctatgagtaacttctactactacatggacgtctggggcaaggac
fr2 tactactaccagctgctatgagtaacttctactactacatggacgtctggggcaaggac
*****

WGS caccgtcaccgtctctccagcattcccgac
fr3 cacc-----
fr2 cacc-----
***

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.511) MLL_62420
WGS -----
fr1 gctctcggattcacccttgatgattatggcatgcactgggtccggcaagtccagggaag

WGS -----
fr1 ggcctggagtggtctcaggatcagttggagtagcgtacggtagactacogggactct

WGS -----
fr1 tctagagacaagccaagaagtccctctatctggaaatg
fr1 gtgagggggcatttttcctctctagagacaagccaagaagtccctctatctggaaatg
*****

WGS cacagctcagagctgaggacacggccctctatctactgcgaagagatggaccagagatc
fr1 cacagctcagagctgaggacacggccctctatctactgcgaagagatggaccagagatc
*****

WGS ggtaatcccggggaactggttcgacccctggggccaaggaactctgcctcaccgtctcc
fr1 ggtaatcccggggaactggttcgacccctggggccaaggaactctgcctcaccgtctcc
*****

WGS tccgctccaccaagggccc
fr1 -----

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.511) MLL_62421
WGS -----
fr3 -----
fr3_2 -----
fr1 cctctggaggcaaccttcagtagcaatattatcagttgggtggcagggccctggagaag
fr2 -----
tggagaag

WGS -----
fr3 -----
fr3_2 -----
fr1 ggtttgagtggtggggagggatcctcctagttttggaatagcaaaactcgcagaaggt
fr2 ggtttgagtggtggggagggatcctcctagttttggaatagcaaaactcgcagaaggt

WGS -----
fr3 -----
fr3_2 -----
fr1 -----
fr2 -----
gaatccagagacaagcctcaatggagctga

WGS -----
fr3 -----
fr3_2 -----
fr1 tccagggcagagtcacgatgacccgggacgaatccacagacacagcctacatggagctga
fr2 tccagggcagagtcacgatgacccgggacgaatccacagacacagcctacatggagctga

WGS gacgctcagatctgaggacacggccgtgtattatgtgagagataaaggccattgttg
fr3 -----
fr3_2 -----
fr1 -----
fr2 -----
tctgaggacacggccgtgtattatgtgagagataaaggccattgttg

WGS -----
fr3 -----
fr3_2 -----
fr1 gacgctcagatctgaggacacggccgtgtattatgtgagagataaaggccattgttg
fr2 gacgctcagatctgaggacacggccgtgtattatgtgagagataaaggccattgttg
*****

WGS tggagaaggttctattcccgactactactacggctcggacgtctggggccaaggacog
fr3 tggagaaggttctattcccgactactactacggctcggacgtctggggccaaggacog
fr3_2 tggagaaggttctattcccgactactactacggctcggacgtctggggccaaggacog
fr1 tggagaaggttctattcccgactactactacggctcggacgtctggggccaaggacog
fr2 tggagaaggttctattcccgactactactacggctcggacgtctggggccaaggacog
*****

WGS cggctcaccgtctctccagcctccaccaagggcccatcggctctcc
fr3 -----
fr3_2 -----
fr1 -----
fr2 -----
*

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.511) MLL_62422
WGS -----
fr1 -----
fr2 gctctcggattcaccctcagtagcttggctctccactgggtccggcaagtcaccaggcaag
-----
aggcaag

WGS -----
fr1 -----
fr2 gggctggagtggtggcagctatctcatctgatggagacaataaataactcagtagactcc
gggctggagtggtggcagctatctcatctgatggagacaataaataactcagtagactcc

WGS -----
fr1 -----
fr2 -----
gtccaagaatacgggtgtatctgcaaatg
gtgagggccogattcagcgtctccagagacacgtccaagaatacgggtgtatctgcaaatg
gtgagggccogattcagcgtctccagagacacgtccaagaatacgggtgtatctgcaaatg
*****

WGS aacaggctgacagctgaggacaagcgtgtctattttctgtgagagagagctcggggagtg
fr1 aacaggctgacagctgaggacaagcgtgtctattttctgtgagagagagctcggggagtg
fr2 aacaggctgacagctgaggacaagcgtgtctattttctgtgagagagagctcggggagtg
*****

WGS gatctactcagggtcttgaccctggggccaagggaccctggtcacogtctctccggca
fr1 gatctactcagggtcttgaccctggggccaagggaccctggtcacogtctctccggca
fr2 gatctactcagggtcttgaccctggggccaagggaccctggtcacogtctctccggca
*****

WGS tccccaccagcccaaggtcttcccgctgagcctctgcagcaccacagcc
fr1 -----
fr2 -----

```

Abbildung 17: Vergleich der klonalen Sequenzen der fünf WGS-Proben

* markiert Basen, welche in allen untersuchten Sequenzen übereinstimmen; bei fr3_2 handelt es sich um die klonale Sequenz, die am zweithäufigsten gefunden wurde und die Kriterien für den Nachweis von Klonalität erfüllt.

Die Richtigkeit der Sequenzen beträgt also im Vergleich mit den beiden Methoden Sanger-Sequenzierung und WGS für die insgesamt 9 Proben 100 %.

3.3. Bestimmung der MRD

Für alle Proben der 13 CLL-Patient*innen stand eine gekoppelte Probe für eine MRD-Untersuchung zur Verfügung. Von den 21 MM-Patient*innen mit 24 Proben, die eine Untersuchung zur Ermittlung der Indexklonalität erhalten hatten, stand für elf Patient*innen eine Probe zur MRD-Untersuchung zur Verfügung. Für die restlichen zehn MM-Patient*innen konnte keine MRD-Analyse durchgeführt werden, da für die fünf Patient*innen, die eine WGS-Untersuchung erhalten hatten, keine gekoppelte Probe im Verlauf verfügbar war, für drei Patient*innen konnte in der Indexuntersuchung keine klonale Sequenz gefunden werden und für zwei weitere Patient*innen war das DNA-Volumen (je 60 µl) und die DNA-Konzentration (17,2 ng/µl und 37,6 ng/µl) zu gering.

Insgesamt waren für den Vergleich von MFC und NGS also 24 Proben von 11 MM-Patient*innen und 13 CLL-Patient*innen verfügbar.

Für die beiden ALL-Patient*innen waren insgesamt drei Proben im Krankheitsverlauf verfügbar, die in der ASO-qPCR negativ waren, bzw. eine Ratio von 0,0099 ermittelt wurde.

Tabelle 33: Kreuztabelle des Nachweis von MRD mit NGS der 27 untersuchten Proben

Entität	Anzahl NGS positiv	Anzahl NGS negativ	MRD-positiv [%]
MM	9	2	81,82
CLL	12	1	92,31
ALL	0	3	0
Total	21	6	84

Die mit MFC untersuchten MM- und CLL-Proben wiesen im Median eine aberrante Zellpopulation von 0,105 % auf, wobei die Range 0 % bis 5 % betrug.

Die mittels NGS untersuchten Proben wurden mit einem insgesamten DNA-Input der Triplikate zwischen 1156 und 3000 ng eingesetzt, der Mittelwert lag bei 2441 ng, der Median bei 3000 ng. Es wurden pro Probe im Median 1.770.941 Reads generiert und eine klonale Frequenz von 0,0399 % ermittelt, siehe Tabelle 34.

Tabelle 34: Charakteristika und Ergebnisse der 27 untersuchten Proben der MRD-Untersuchung

n=27	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
aberrante Zellen MFC (MM und CLL) [%]	0,615	0,105	0	5
Ratio qPCR (ALL)	0,003	0	0	0,0099
DNA-Input (Summe der Triplikate) [ng]	2441	3000	1156	3000
klonale Frequenz NGS	2,05E-02	3,99E-04	0	2,76E-01
Reads (Summe der Triplikate)	1.755.667	1.770.941	419.900	2.694.923
Confidence -5	77,52%	82,58%	60,38%	91,85%
Confidence -6	9,63%	9,62%	3,21%	17,77%

Für alle MRD-negative Patient*innen konnte eine Sensitivität von 10^{-4} mit einem Konfidenzintervall von 100 % erreicht werden, das Konfidenzintervall von 95 % für eine höhere Sensitivität von 10^{-5} und 10^{-6} wurde hingegen von allen unterschritten, siehe Tabelle 34. Für die acht Sequenzen, die in den Proben bei der MRD-Untersuchung nicht detektierbar waren, wurden im Mittel 2.915 ng DNA eingesetzt und eine Readanzahl der Triplikate von 1.737.027 erreicht, siehe Tabelle 35.

Tabelle 35: Charakteristika und Ergebnisse für acht klonale Sequenzen, die in den Proben der MRD-Untersuchung nicht detektierbar waren

n=8	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert
DNA-Input [ng]	2323	3000	3000	2915
Reads total (Summe der Triplikate)	821.169	2.694.923	1.704.386	1.737.027

Auffällig ist, dass in allen Proben der 27 MRD-Patient*innen und in allen mitgeführten low Positivkontrollen das Rearrangement IGH1-69_13-IGHJ6_03 zu finden ist. In 55,56 % der Fälle (15/ 27) werden die Kriterien für den Nachweis von Klonalität für dieses Rearrangement erfüllt. Beim Vergleich der Sequenzen mit MAFFT stellte sich heraus, dass die Sequenzabfolgen identisch sind. Auch der Vergleich der CDR3-Sequenzen ergab, dass es sich um identische Sequenzen handelt. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um die mitgeführte Spike-in Kontrolle LymphoQuant handelt, zu deren Sequenz oder V- und J-Genen der Hersteller keine Angaben macht.

3.4. Verfolgung klonaler Evolution

Des Weiteren wurden Proben einer Patientin mit CLL untersucht, die im Krankheitsverlauf ein MM entwickelte. Bei MLL_251377 wurden in der MRD-Analyse sowohl die beiden in der Indexprobe MLL_255044 gefundenen Klonotypen detektiert (klonale Frequenzen von 31,6 % und 27,0 %), als auch eine weitere Sequenz, die den höchsten % total read-Wert aufweist:

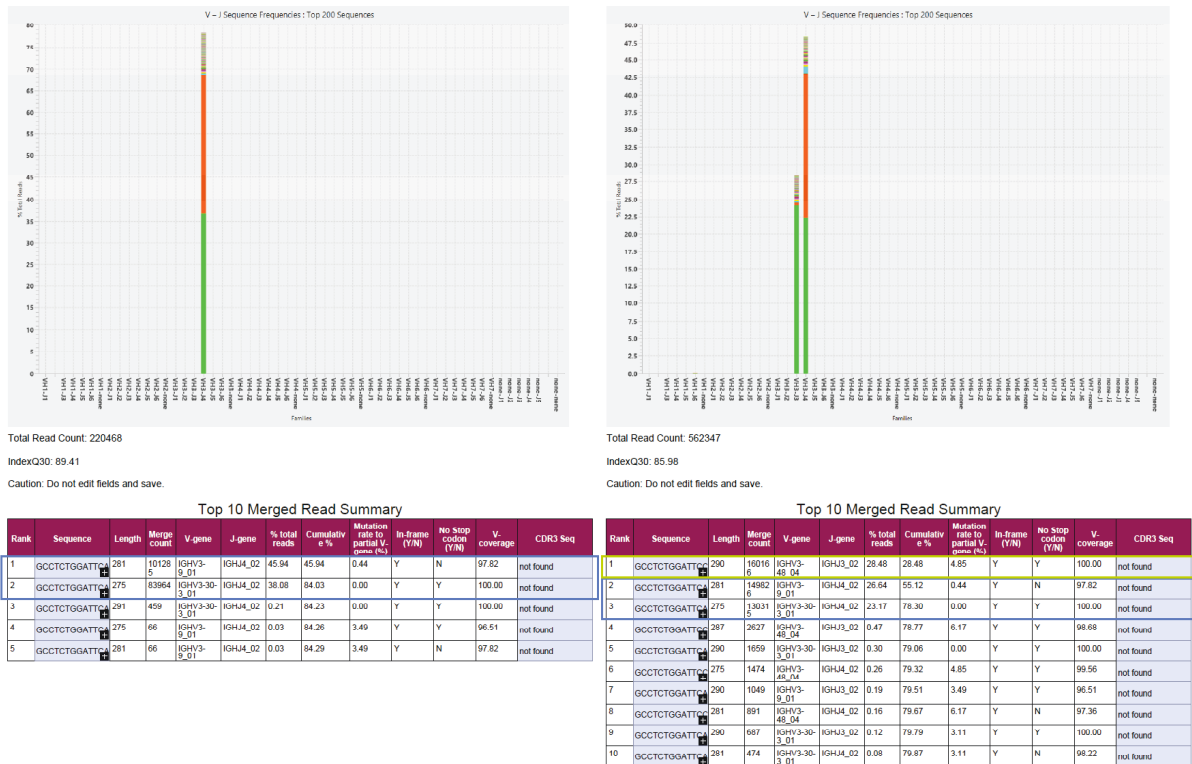


Abbildung 18: Verfolgung der klonalen Evolution der Patientin mit CLL die ein MM entwickelte

Links sieht man die beiden klonalen Sequenzen der Indexprobe MLL_255044 aus PB in unterschiedlichen Farben, zusammengefasst innerhalb der Genfamilien. Unterhalb des Diagramms sind die top 10 merged Sequenzen zusammengefasst. Rechts sieht man die neu detektierte klonale Sequenz der Verlaufsprobe MLL_251377 aus KM. In den Tabellen blau umrandet sind die Klonotypen der Indexprobe, in Grün ist die neue klonale Sequenz markiert.

Für die Ermittlung der Indexklonalität wurde PB untersucht, während für die MM-Diagnose die Analyse mit KM erfolgte. Zwischen den beiden Proben lagen circa 1,5 Jahre. Während in der Immunphänotypisierung in der Indexprobe eine aberrante reife B-lymphatische Population von 25 % gemessen wurde, waren es für die Verlaufsprobe im KM 14 %, sowie 64 % aberrante Plasmazellen. Auch in

der Zytomorphologie wurde mit 88,5 % atypische Plasmazellen eine hohe Infiltration am MM-Zellen nachgewiesen, während keine lymphatischen Zellen nachweisbar waren.

Tabelle 36: Vergleich der Index- und der MRD-Probe der Patientin mit CLL, die ein MM entwickelte

Study ID	MLL_255044	MLL_251377
untersuchtes Material	PB	KM
aberrante reife B-lymphatische Population MFC [%]	25	14
aberrante Plasmazellen MFC [%]	n.d.	64
atypische Plasmazellen Z [%]	n.d.	88,5
lymphatische Zellen Z [%]	n.d.	0
klonale Rearrangements	IGHV3-9_01, IGHJ4_02	IGHV3-9_01, IGHJ4_02
	IGHV3-30-3_01, IGHJ4_02	IGHV3-30-3_01, IGHJ4_02
		IGHV3-48_04, IGHJ3_02

n.d. - nicht durchgeführt; Z - Zytomorphologie

Neben den verschiedenen Materialien, die den Vergleich der beiden Untersuchungen erschweren, wird bei der Untersuchung der Indexprobe keine Spike-in-Kontrolle zur Normalisierung mitgeführt. Dadurch kann keine klonale Frequenz für die Indexprobe ermittelt werden. Wenn man die % total Reads betrachtet, sind diese in der Verlaufsprobe um 19,3 % bzw. 14,91 % niedriger als in der Indexprobe, während der neue Klonotyp mit 28,48 % die am häufigsten gefundene Sequenz ausmacht.

3.5. Vergleich mit anderen Methoden (MRD)

Für den Vergleich zwischen MFC und NGS standen insgesamt 24 Proben zur Verfügung. Elf der Proben stammten von Patient*innen mit MM und 13 von Patient*innen mit CLL.

In 83,3 % der Fälle (20/ 24) stimmte das Ergebnis von NGS und MFC überein. Die positive prozentuale Übereinstimmung lag bei 94,7 % (18/19) und die negative prozentuale Übereinstimmung bei 40 % (2/ 5).

Tabelle 37: Kreuztabelle des Vergleichs des MRD-Status von MFC und NGS

MRD-Nachweis	NGS negativ	NGS positiv	Summe
MFC negativ	2	3	5
MFC positiv	1	18	19
Summe	3	21	24

Abweichungen der beiden Methoden gab es für insgesamt vier Fälle. Bei drei Fällen konnte im NGS MRD gemessen werden, die in der MFC negativ waren. Für einen Fall konnte in der MFC MRD nachgewiesen werden, während die Probe im NGS negativ war.

Tabelle 38: Proben mit abweichendem MRD-Status im NGS und MFC

Study ID	Diag.	DNA-Input [ng]	Reads Triplikate	MRD Status NGS	Confid. -4	Confid. -5	Confid. -6	klonale Freq. NGS [%]	aberr. Zellen MFC [%]	Events MFC
MLL_244304	MM	1899	2.275.091	positiv				1,22E-04	0	39955
MLL_255053	MM	3000	1.699.291	positiv				2,26E-03	0	36707
MLL_256913	MM	1190	1.520.899	positiv				1,77E-03	0	36467
MLL_246792	CLL	3000	1.964.500	negativ	100,00%	82,58%	9,62%	0,00E+00	0,08	578277

In allen drei Fällen, in denen MRD in NGS nachweisbar war, während durch MFC keine aberranten Zellen gemessen wurden, handelt es sich um Proben von MM-Patient*innen. Im MFC wurden für diese Proben nur ca. 36.000 bis 40.000 Events gemessen, statt der für die Analyse von MRD notwendigen 500.000, da von der einsendenden Ärztin oder dem einsendenden Arzt keine MRD-Untersuchung gewünscht war. Daher ist NGS hier die sensitivere Untersuchung, da im MFC nur eine Sensitivität von 10^{-1} erreicht wurde.

Im Fall, bei dem durch MFC MRD gemessen werden konnte, im NGS die klonale Sequenz nicht nachweisbar war, handelt es sich um eine Probe eines CLL-Patienten. Im NGS wurde mit einer Sensitivität von 10^{-4} der Klonotyp nicht mehr nachgewiesen. In der MFC wurden circa 578.000 Events gemessen und es waren 0,08 % aberrante reife B-Zellen nachweisbar, siehe Tabelle 38.

Für den Vergleich der in den beiden Methoden -NGS und MFC- erhaltenen MRD-positiven Werte (n=18), wurden eine Passing-Bablok-Regression und eine Bland-Altman-Analyse herangezogen, siehe auch Tabelle 53, nachdem ermittelt wurde, ob eine Normalverteilung der Daten vorliegt. Der Shapiro-Wilk-Test ergab, dass die Daten signifikant von einer Normalverteilung abweichen, da ein p-Wert von <

0,001 ermittelt wurde, welcher kleiner als der akzeptierte α -Fehler von 0,05 ist, siehe Tabelle 39.

Tabelle 39: Ergebnis des Shapiro-Wilk-Test zur Untersuchung auf Normalverteilung

	aberrante Zellen MFC [%]	klonale Frequenz NGS [%]
Shapiro-Wilk	0,654	0,471
P-Wert Shapiro-Wilk	< 0,001	< 0,001

Da keine Normalverteilung vorliegt, wurden die Daten für die Bland-Altman-Analyse logarithmisch transformiert.

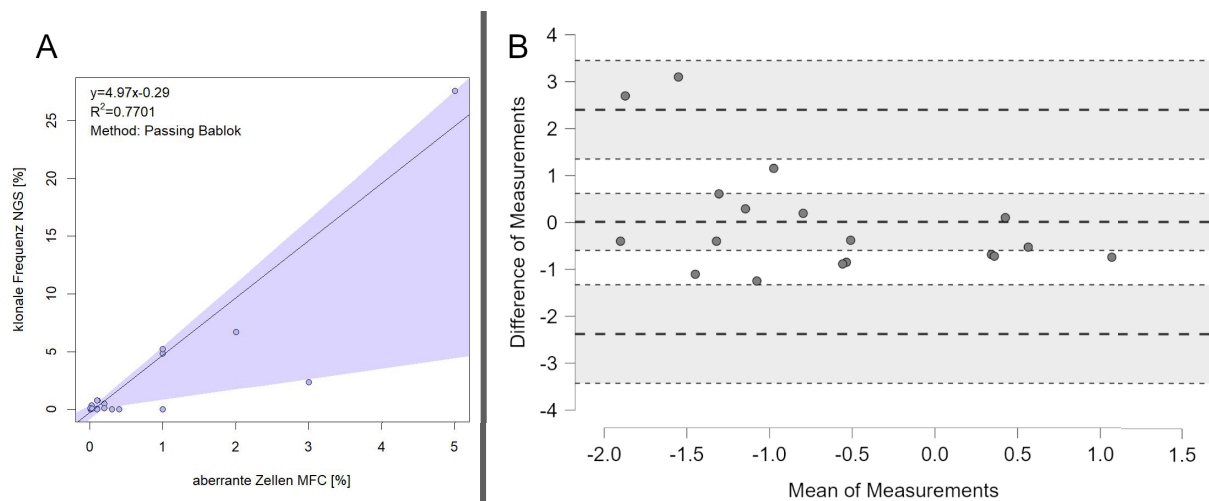


Abbildung 19: Passing-Bablok-Regression und Bland-Altman-Analyse der in beiden Methoden MRD-positiven Proben von CLL- und MM-Patient*innen (n=18)

A: Durch die Betrachtung der 95 %-Konfidenzintervalle des y-Achsenabschnittes (y-Achsenabschnitt: -0,292; 95 %-Konfidenzintervall: -0,71 bis 0,064) und der Steigung (Steigung: 4,969; 95 %-Konfidenzintervall: 1,858 bis 5,95) kann durch die Passing-Bablok-Regression ein proportionaler Fehler zwar ausgeschlossen werden, deutet aber auch darauf hin, dass ein systematischer Fehler vorliegt.

B: Die Bland-Altman-Analyse zeigt eine sehr geringe, nicht signifikante Verschiebung der Messwerte. Die Limits of Agreement liegen zwischen -2,38 und 2,4 und werden in zwei Fällen (11,11 %) überschritten.

Durch die Passing-Bablok-Regression kann man proportionale und systematische Fehler überprüfen, indem man die 95 %-Konfidenzintervalle der Steigung und des y-Achsenabschnitts betrachtet. Im Falle einer guten Übereinstimmung zweier

Methoden enthalten diese für die Steigung die 1 und für den y-Achsenabschnitt die 0. Der y-Achsenabschnitt für den Methodenvergleich von MFC und NGS beträgt -0,292 mit einem 95 %-Konfidenzintervall von -0,71 bis 0,064. Da dieser Bereich die 0 beinhaltet, kann ein proportionaler Fehler ausgeschlossen werden. Die Steigung für den Methodenvergleich von MFC und NGS beträgt 4,969 mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 1,858 bis 5,95. Da dieser Bereich die 1 nicht beinhaltet, liegt ein systematischer Fehler vor, der zu einer Verschiebung der Geraden führt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt mit 0,77 unter der inhouse festgelegten Grenze von $\geq 0,9$, siehe Abbildung 19A.

Auch die Bland-Altman-Analyse zeigt einen sehr geringen Bias von 0,012, der mittleren Differenz der beiden Methoden. Dies deutet darauf hin, dass im Durchschnitt im MFC ein höherer Wert gemessen wurde als im NGS, allerdings liegt die Nulllinie innerhalb des 95 %-Konfidenzintervalls des Mittelwerts (mittlerer grauer Bereich in Abbildung 19B), weshalb der Bias nicht signifikant ist. Die Limits of Agreement liegen zwischen -2,38 und 2,4, welche von 11,11 % der Fälle (2/18) überschritten werden, siehe Tabelle 40 und Abbildung 19B. Damit liegt eine höhere Abweichung als 5 % vor, was dem Grenzwert für eine gute Übereinstimmung zweier Messmethoden entspricht.

Tabelle 40: Bland-Altman-Tabelle (n=18) zu Abbildung 19

aberrante Zellen MFC [%] \log_{10} - klonale Frequenz NGS [%] \log_{10}			
Verzerrung & Grenzen	Punktwert	Untergrenze 95%-KI	Obergrenze 95%-KI
Mittlere Differenz + 1,96 SD	2,401	1,351	3,451
Mittlere Differenz	0,012	-0,595	0,618
Mittlere Differenz – 1,96 SD	-2,378	-3,428	-1,328

Die Limits of Agreement sind definiert als die mittlere Differenz addiert und subtrahiert mit der 1,96fachen Standardabweichung und in der Tabelle 40 inklusive der 95 %-Konfidenzintervalle an erster und letzter Position zu finden. In Abbildung 19B entsprechen die Limits of Agreement den oberen und unteren dicker gestrichelten Linien.

Für den Vergleich zwischen ASO-qPCR und NGS wurden drei Proben von zwei Patient*innen mit ALL untersucht.

In 66,7 % der Fälle (2/ 3) stimmte das Ergebnis von NGS und ASO-qPCR überein. Für 33,3 % der Proben (1/ 3) war in der ASO-qPCR MRD nachweisbar, die im NGS negativ waren.

Tabelle 41: Vergleich des MRD-Status von ASO-qPCR und NGS

Study ID	ASO-qPCR Ratio	Sensitivität ASO-qPCR	DNA-Input [ng]	NGS Assay	Reads Triplikate	MRD Status NGS	Confid. -4 NGS	Confid. -5 NGS	Confid. -6 NGS
MLL_258211	0	1:100.000	3000	FR1	2.163.274	negativ	100%	85,96%	11,87%
MLL_258212	0	1:10.000	3000	FR1	1.444.272	negativ	100%	67,62%	4,80%
MLL_258774	0,0099	1:100.000	3000	FR1	821.169	negativ	100%	32,28%	0,82%

Während in der ASO-qPCR von MLL_258774 eine Sensitivität von 10^{-5} erreicht wurde und mit dieser Sensitivität MRD nachweisbar war, wurde im NGS lediglich eine Sensitivität von 10^{-4} erreicht. Auch die anderen beiden Proben MLL_258211 und MLL_258212 erreichten nur eine Sensitivität von 10^{-4} , wiesen aber im Konfidenzintervall von 10^{-5} mit 85,96 % und 67,62 % einen deutlich höheren Wert auf als MLL_258774 mit 32,28 %.

3.6. Verdünnungsreihen

Für die Verdünnungsreihe 1 wurde die DNA aus CD138+-MACS-Zellen der MM-Patientin MLL_62421 verwendet und eine serielle Verdünnung in acht 1:10 Schritten erstellt. Untersucht wurde die erste Verdünnungsstufe, sowie die Verdünnungsstufen 4 bis 8. Bei der Ermittlung der Klonalität wurden für die klonale top merged sequence im FR1-Assay 84,13 % der total reads ermittelt. Davon ausgehend wurden folgende Erwartungswerte für die Verdünnungsreihe errechnet:

Tabelle 42: Verdünnungsreihe 1 aus MLL_62421

% von Ausgangs-DNA	10	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06
erwartete Klonalität Probe [%]	8,4	8,40E-03	8,40E-04	8,40E-05	8,40E-06	8,40E-07
gemessene klonale Frequenz [%]	1,20E+01	1,20E-02	1,36E-03	3,09E-04	2,27E-04	1,70E-04

Die erwarteten Werte wurde dann gegen die gemessenen Werte der Triplikate aufgetragen, um die Linearität und das Limit of Detection zu ermitteln.

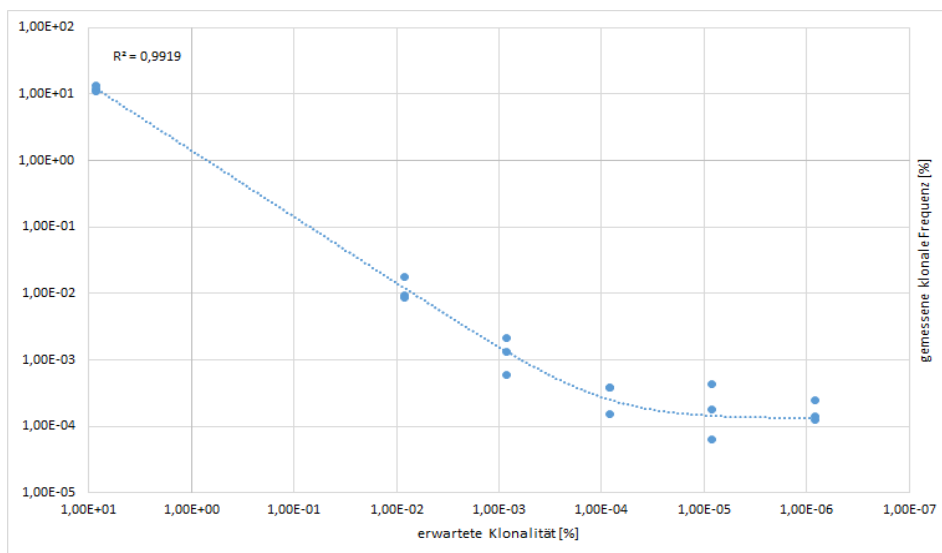


Abbildung 20: Verdünnungsreihe 1

Aufgetragen wurden die erwartete Klonalität der Probe gegen die im FR1-Assay gemessene klonale Frequenz in % der Triplikate.

Da für jede Verdünnungsstufe messbare Werte ermittelt werden konnten, wurde eine zweite Verdünnungsreihe mit niedrigeren Konzentrationen an klonalen B-Zellen erstellt.

Für die Verdünnungsreihe 2 wurde mit der DNA aus CD138+-MACS-Zellen des MM-Patienten MLL_246857 eine serielle Verdünnung in sechs 1:50 Schritten erstellt. Es wurden alle 6 Verdünnungsstufen untersucht. Bei der Ermittlung der Indexklonalität wurden für die klonale top merged sequence im FR2-Assay 92,31 % der total reads ermittelt. Davon ausgehend wurden folgende Erwartungswerte für die Verdünnungsreihe errechnet:

Tabelle 43: Verdünnungsreihe 2 aus MLL_246857

% von Ausgangs-DNA	2	4,00E-02	8,00E-04	1,60E-05	3,20E-07	6,40E-09
erwartete Klonalität Probe [%]	1,84	3,68E-02	7,36E-04	1,47E-05	2,94E-07	5,89E-09
gemessene klonale Frequenz [%]	8,92E-01	1,72E-02	4,19E-04	1,36E-04	2,04E-05	1,04E-04

Auch für diese Verdünnungsreihe wurden die erwarteten Werte gegen die gemessenen Werte der Triplikate aufgetragen, um die Linearität und das Limit of Detection zu ermitteln.

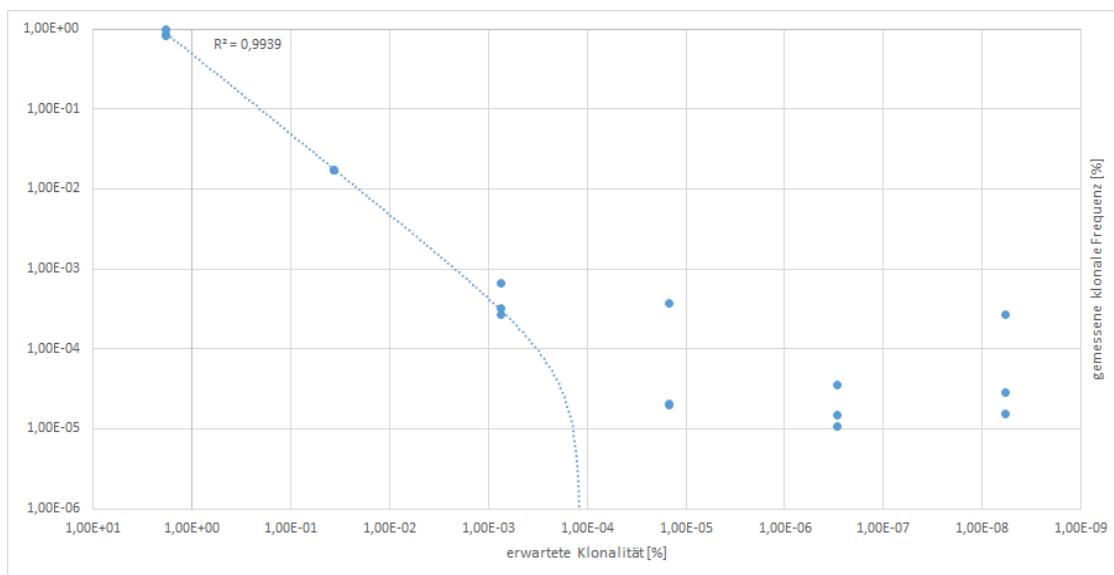


Abbildung 21: Verdünnungsreihe 2

Aufgetragen wurden die erwartete Klonalität der Probe gegen die im FR2-Assay gemessene klonale Frequenz in % der Triplikate.

Für beide Verdünnungsreihen zeigt sich eine gute Korrelation der erwarteten und gemessenen Werte mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von $> 0,99$. Bei beiden Diagrammen ist zu beobachten, dass die Triplikate der letzten drei Verdünnungsstufen stärker streuen und ein Plateau erreichen. Bei beiden Verdünnungsreihen betrifft dies die Werte ab einem erwarteten Wert im 10^{-5} -Bereich.

Die Library der letzten beiden Verdünnungsstufen der Verdünnungsreihe 1 und die letzten drei Verdünnungsstufen der Verdünnungsreihe 2 wurden dann in weiteren Läufen resequenziert.

Tabelle 44: Ergebnis der Resequenzierung der Verdünnungsreihen

Probe	DNA-Input [ng]	Assay	Reads Triplikate	Confid. -4	Confid. -5	Confid. -6
Verdünnungsreihe 1_5	3000	FR1	1.596.207	100,00%	72,99%	6,31%
Verdünnungsreihe 1_6	3000	FR1	1.518.443	100,00%	70,44%	5,32%
Verdünnungsreihe 2_4	3000	FR2	1.854.794	100,00%	80,17%	8,53%
Verdünnungsreihe 2_5	3000	FR2	1.387.483	100,00%	65,40%	4,06%
Verdünnungsreihe 2_6	3000	FR2	1.444.803	100,00%	67,76%	4,52%

Von Verdünnungsreihe 1 wurden die Library der letzten beiden Verdünnungsstufen und von Verdünnungsreihe 2 die letzten drei Verdünnungsstufen resequenziert. Für keine der Proben konnte die jeweilige klonale Sequenz nachgewiesen werden.

Die klonalen Sequenzen waren hier für keine der Verdünnungsstufen der beiden Verdünnungsreihen nachweisbar. Die Sensitivität beträgt 10^{-4} , für eine Sensitivität 10^{-5} wurde der Grenzwert von 95 % nicht erreicht, siehe Tabelle 44.

3.7. Optimierung der FlowCell Beladung

Die Qualitätsparameter der beiden MiSeq-Läufe der Verdünnungsreihen wurden außerdem verwendet, um die Beladung der FlowCell zu optimieren.

Die Amplikons und auch der Pool des Laufs der Verdünnungsreihe 1 wurde mittels KAPA-Library-Quantifizierung gemessen, während bei Verdünnungsreihe 2 die TapeStation zur Quantifizierung verwendet wurde. Vergleicht man die beiden Läufe, sieht man, dass der Lauf der Verdünnungsreihe 1 mit einer Clusterdichte von 451 K/mm^2 stark unterclustert (Optimalwert: zwischen 1.200 und 1.400 K/mm^2 (Illumina, 2021, pp. 4)) ist und auch dementsprechend weniger Reads generiert werden. Bei der Quantifizierung durch die TapeStation der Verdünnungsreihe 2 erreicht man etwa eine doppelt so hohe Clusterdichte und auch doppelt so viele Reads, siehe Tabelle 45.

Tabelle 45: Vergleich der Anzahl der total Reads pro Replikat und Cluster Densities der Läufe der Verdünnungsreihen 1 und 2. Daten siehe Tabelle 54 und Tabelle 54

	KAPA-Quantifizierung (Verd.1)	TapeStation- Quantifizierung (Verd.2)
Median total Reads pro Replikat	375.435	775.275
Minimum total Reads pro Replikat	293.942	661.456
Maximum total Reads pro Replikat	584.492	929.760
Cluster Density [K/mm^2]	451 ± 10	874 ± 25

Daher wurden alle weiteren Läufe mit der TapeStation quantifiziert.

3.8. Präzision

Zur Ermittlung der Inter-Assay-Präzision des Indexansatzes wurden die % total reads der top merged sequence der in jedem Assay mitgeführten Positivkontrolle herangezogen. Es wurden drei verschiedene MiSeqs und zwei verschiedene Lots

der LymphoTrack-Assays verwendet. Es konnten je sechs Werte für jeden der drei Assays analysiert werden. Wie in Tabelle 46 zu entnehmen ist, wurde für den FR1-Assay ein Variationskoeffizient %CV von 14,9 %, für den FR2-Assay von 13,6 % und für den FR3-Assay von 16,1 % ermittelt.

Tabelle 46: Analyse der in jedem Lauf und jedem Assay mitgeführten Positivkontrolle der Sequenzierung zur Ermittlung der Indexklonalität (n=6)

n=6 pro Assay	%top merged seq. Poko FR1	%top merged seq. Poko FR2	%top merged seq. Poko FR3
Mittelwert	3,277	7,803	5,245
Standardabweichung	0,490	1,062	0,846
Variationskoeffizient	0,149	0,136	0,161
Minimum	2,740	6,450	4,410
Maximum	3,930	9,070	6,830

Damit liegt der gemessene Variationskoeffizient innerhalb des vom Hersteller angegebenen Werts von < 20 % für den FR1-Assay (Invivoscribe, 2022, pp. 31). Für den FR2- und FR3-Assay macht der Hersteller keine Angaben.

Ebenso werden für den MRD-Ansatz keine Angaben gemacht, da die low Positivkontrolle und die Spike-in-Kontrolle nicht IVD-zertifiziert sind. Hier wurde die klonale Frequenz für die Inter-Assay-Präzision-Ermittlung herangezogen. Es wurden drei verschiedene MiSeqs, zwei verschiedene Lots der low Positivkontrolle und zwei verschiedene Lots der LymphoTrack-Assays verwendet.

Tabelle 47: Analyse der in jedem Lauf und jedem Assay mitgeführten low Positivkontrolle der MRD-Analyse

	klonale Frequenz lowPoko FR1 [%] (n=5)	klonale Frequenz lowPoko FR2 [%] (n=4)	klonale Frequenz lowPoko FR3 [%] (n=2)
Mittelwert	0,015	0,007	0,013
Standardabweichung	0,009	0,004	0,002
Variationskoeffizient	0,604	0,586	0,12
Minimum	0,005	0,004	0,012
Maximum	0,025	0,012	0,014

Die gemessenen klonalen Frequenzen sind deutlich niedriger als die % total reads des Indexansatzes. Die Variationskoeffizienten %CV für den FR1- und FR2-Assay liegen mit 60,4 % und 58,6 % deutlich höher, während der FR3-Assay bei nur zwei gemessenen low Positivkontrollen mit 12,0 % innerhalb der 20 %-Grenze des Herstellers liegt, die sich auf den Indexansatz bezieht.

3.9. Limit of Blank

Um das Limit of Blank zu ermitteln, wurden alle klonalen Sequenzen in den FR1- und FR2-Assays untersucht, die bei der Ermittlung der Indexklonalität der MM-, CLL- und ALL-Patient*innen gefunden wurden, ob sie in den Verdünnungsreihen nachweisbar waren. Nicht verwendet wurden die klonalen Sequenzen der beiden Proben von MM-Patient*innen, mit denen die Verdünnungsreihen erstellt wurden. Für die Verdünnungsreihe 1, welche mit dem FR1-Assay angesetzt wurde, wurden 30 klonale Sequenzen und für die Verdünnungsreihe 2, welche mit dem FR2-Assay angesetzt wurde, wurden 34 klonale Sequenzen analysiert. Es wurden jeweils alle sechs Verdünnungsstufen zur Untersuchung herangezogen, welche mit einem WT-Pool aus fünf verschiedenen Patient*innen mit Polyglobulie oder Hämochromatose erstellt wurden. Es wurde mit einer Sensitivität von 10^{-4} keine der Sequenzen gefunden. Das Limit of Blank liegt damit für beide Assays bei 0.

4. Diskussion

Der MRD-Status zählt beim MM zu den wichtigsten Prognosefaktoren, wird im Moment aber nur im Rahmen von klinischen Studien ermittelt, die immer häufiger MRD als Endpunkt berücksichtigen. Es ist denkbar, dass in der Zukunft MRD die Therapieentscheidung beeinflussen und so ein wichtiger Faktor für die personalisierte Medizin beim Multiplen Myelom sein könnte.

Aufgrund der geringen Anzahl von Proben von MM-Patient*innen wurden zusätzlich Proben von CLL- und ALL-Patient*innen mit in die Untersuchungen aufgenommen, welche ebenfalls einen rearrangierten B-Zell-Rezeptor aufweisen. Diese erlauben zwar keine klinischen Rückschlüsse, aber ermöglichen eine erweiterte technische Austestung der verwendeten Methoden. Insgesamt ist trotz der Inklusion von Proben von Patient*innen weiterer Entitäten die Probenanzahl zu gering für tiefgreifende statistische Aussagen, ermöglicht aber erste Einblicke und gibt Hinweise auf Trends, die durch weitere Experimente gesichert werden sollten.

Es konnte gezeigt werden, dass die Untersuchung von MRD durch NGS eine hohe Anwendbarkeit hat, die klonalen Sequenzen in der MRD-Untersuchung mit einer hohen Spezifität detektierbar sind und die Ergebnisse mit der Goldstandardmethode MFC vergleichbar sind.

4.1. Ermittlung der Klonalität der Indexproben

Ein notwendiger Schritt bei der Untersuchung von MRD durch klonale *IGH*-Rearrangements mithilfe von NGS ist die Ermittlung der klonalen Sequenz in einer Probe mit aktivem Krankheitsgeschehen. Erst nach erfolgreicher Detektion des Klonotyps in der Indexprobe ist es möglich im weiteren Krankheitsverlauf gezielt nach dieser Sequenz zu suchen und so Rückschlüsse auf das Vorliegen von MRD zu ziehen.

Bei 91,9 % der 37 mithilfe der LymphoTrack Assays untersuchten Patient*innen (34/37) konnte der Klonotyp in der Untersuchung der Indexprobe erfolgreich ermittelt werden. Während bei den Proben von CLL- und ALL-Patient*innen die Detektionsrate sogar bei 100 % lag (n=16), wurde bei den Proben von MM-Patient*innen in 85,7 % der Fälle (18/21) eine klonale Sequenz ermittelt, siehe

Tabelle 28. Die mit LymphoTrack NGS gefundenen Sequenzen wurden exemplarisch mit WGS und Sanger-Sequenzierung verglichen und waren identisch (n=9, siehe 3.2. Vergleich mit anderen Methoden (Indexproben)).

Die ermittelte Detektionsrate für Proben von Patient*innen mit MM war auf einem ähnlichen Niveau wie bei Ferla et al., welche ebenfalls mithilfe der LymphoTrack Assays (FR1, FR2 und FR3) bei 84,62 % der Proben von MM-Patient*innen (22/24) den Klonotyp detektieren konnten und etwas höher als die von Ho et al. mit 79,4 % (27/34) (ebenfalls durch die LymphoTrack Assays und Proben von MM-Patient*innen), allerdings verwendeten sie in ihrer Arbeit zusätzlich zwei weitere Assays (Leader und *IGK*) (Ferla et al., 2022, pp. 6) (Ho et al., 2021, pp. 184). Die höhere Rate im Vergleich zu Ho et al., obwohl in dessen Arbeit weitere Assays verwendet wurden, die die Rate erhöhen sollten, könnte daran liegen, dass Ho et al. DNA aus KM verwendete, während in dieser Arbeit für 95,24 % der Proben (20/21) DNA aus CD138+-MACS-Zellen verwendet wurde. Durch die Anreicherung der Plasmazellen mithilfe des Plasmazellmarkers CD138 wird bei einer niedrigeren Infiltrationsrate die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Bestimmung des Klonotyps erhöht. So konnten auch Puig et al. zeigen, dass sich ihre Detektionsrate der klonalen Sequenz bei Proben von Patient*innen mit MM durch Sanger-Sequenzierung von 60 % (15/ 25) auf 96 % (24/ 25) erhöhte, wenn sie DNA aus CD138+-MACS-Zellen einsetzten (Puig et al., 2013, pp. 98). Für 2 Patient*innen war sowohl DNA aus KM und CD138+-MACS-Zellen verfügbar. Trotz der geringen Infiltrationsrate von 1 % und 3 % aberranter Plasmazellen im KM, gemessen durch MFC, konnte in beiden KM-Proben die klonale Frequenz erfolgreich detektiert werden.

Bei Arcila et al. lag die Detektionsrate bei Proben von Patient*innen mit B-Zell-Neoplasien und Plasmazellneoplasien bei 97 % (743/766). Damit lag sie etwas höher als die ermittelte Gesamtdetektionsrate von 91,9 % aller Proben, was damit zusammenhängen könnte, dass Arcila et al. neben dem LymphoTrack FR1-, FR2- und FR3-Assays auch den Leader- und *IGK*-Assay verwendete (Arcila et al., 2019, pp. 336).

Von insgesamt drei Proben von MM-Patient*innen, für die keine klonale Sequenz gefunden wurde, waren zwei auch in einer orthogonalen Methode, der *IGH*-

Fragmentanalyse, polyklonal. Diese untersucht ebenfalls den *IGK*-Lokus. Bei einem Patienten mit zwei Proben handelte es sich bei den Indexproben laut einsendender Ärztin oder einsendendem Arzt um die MM Vorstufen MGUS und SMM. Die Probe mit MGUS wies mit 9 % atypischen Plasmazellen in der Zytomorphologie einen Wert knapp unter dem Grenzwert von 10 % auf. Bei der darauffolgenden Einsendung mit der Diagnose SMM wurde keine zytomorphologische oder immunphänotypisierende Untersuchung durchgeführt. Weiterhin wurde keine Angabe zur Therapie gemacht, daher könnte es sich im Falle eines Hochrisiko-SMM um einen bereits therapierten Patienten handeln und damit nicht um eine Probe mit aktivem Krankheitsgeschehen. Lediglich bei einer im NGS polyklonalen Probe war die *IGH*-Fragmentanalyse positiv. Die darauffolgende Sanger-Sequenzierung war für diese Probe nicht auswertbar. Da Invivoscribe keine Angaben zu den für die in den LymphoTrack Assays oder den in der *IGH*- und *IGK*-Fragmentanalyse verwendeten Primern macht, kann leider keine Aussage dazu getroffen werden, inwieweit sie sich von denen in der Fragmentanalyse oder in der Sanger-Sequenzierung verwendeten Primern unterscheiden. Ein Grund für ein Scheitern der Amplifizierung klonaler Sequenzen könnten SHM sein und das damit verbundene mangelhafte Primerannealing. Auffällig ist, dass die Detektionrate in Proben von MM-Patient*innen deutlich niedriger ist, im Vergleich zu Proben von CLL- Patient*innen (85,7 % vs. 100 %).

Ferrero et al. konnten in 98,9 % der Proben von MM-Patient*innen (341/ 345) SHM-Raten beobachten, die den Grenzwert von 98 % Homologie der Sequenzen im Vergleich zur Keimbahnsequenz überschreiten. Die SHM-Raten der einzelnen Proben lagen dabei im Median bei 7,8 %, ein Wert, der in gesunden Plasmazellen ebenfalls beobachtet wurde und die Vermutung stützt, dass es sich beim MM um eine Erkrankung handelt, die aus B-Zellen hervorgeht, die das GC passiert haben (Ferrero et al., 2012, pp. 852). Allerdings können beim MM SHM-Raten bis zu 23 % beobachtet werden, ein Wert, der höher ist als in allen anderen B-Zell-Neoplasien (González et al., 2007, pp. 3115). Bahlo et al. konnten zeigen, dass in 60 % der Proben von CLL-Patient*innen (1432/ 2379) der SHM-Grenzwert von 98 % unterschritten wird und nur von 40 % (947/2379) überschritten wird (Bahlo et al., 2016, pp. 782). Der große Unterschied in den SHM-Raten der beiden Entitäten könnte also eine mögliche Erklärung für die Beobachtung sein, dass bei Proben

von MM-Patient*innen der Klonotyp im Gegensatz zu den meisten Proben von Patient*innen mit CLL generell seltener und auch nicht in allen drei Assays (CLL: 93,33 % in allen drei Assays; 14/15) gefunden wurde, siehe 3.1. Ermittlung der Klonalität der Indexproben. SHM treten in den VDJ-Gensegmenten der V_H-Region auf (Diaz und Casali, 2002, pp. 235–236). Allerdings sind SHM in einem höheren Maße im V-Gensegment als in den DJ-Gensegmenten zu finden, da die Mutationsfrequenz downstream exponentiell mit der Entfernung zum Promotor abnimmt und auch im V-Gensegment ist die Verteilung der SHM nicht homogen (Odegard und Schatz, 2006, pp. 574). Die höchste Frequenz der SHM ist in den CDR zu finden und geringe Frequenzen in den FR, wobei FR3 eine höhere Rate an Mutationen aufweist, als FR1 und FR2 (Cohen et al., 2011, pp. 1482).

Ein weiterer Grund für unzureichendes Primerannealing könnten die bei der VDJ-Rekombinationen entstehenden inframe Deletionen und Insertionen sein. Diese sind nicht gleichmäßig über V_H verteilt, sondern wie die SHM mit einer höheren Rate in den CDR und in den FR nahe der CDR zu finden, als innerhalb der FR. Allerdings existieren Hotspots für inframe Deletionen und Insertionen in FR3 (Lupo et al., 2022, pp. 9) (Briney et al., 2012, pp. 525–526). Diese Beobachtungen könnte neben SHM eine Erklärung für die am zweithäufigsten gefundenen klonalen FR3-Sequenzen sein, welche in 18,92 % der Proben (7/37) gefunden wurde, die sich um eine Base am Anfang der Sequenz von den anderen klonalen Sequenzen in FR1/FR2 unterscheiden, siehe Abbildung 13. Bei 71,42 % (5/7) war die CDR3-Sequenz identisch mit der häufigsten gefundene FR3-Sequenz, in zwei Fällen konnte keine CDR3-Sequenz ermittelt werden. Außerdem ist denkbar, dass es sich hier um einen Polymerasefehler handeln könnte, der während der PCR auftritt.

Eine zusätzliche Erklärung für Unterschiede in berichteten Detektionsraten und damit der Anwendbarkeit der Methode können unterschiedlich festgelegte Grenzwerte sein, ab wann eine Sequenz als klonal zu betrachten ist. Invivoscribe hat für die LymphoTrack *IGH*-Assays bei einer Readanzahl ≥ 20.000 einen Wert von 2,5 % der top merged sequence an den %total reads festgelegt, sowie einen zweifachen Abstand zur dritthäufigsten Sequenz bestimmt (Invivoscribe, 2022, pp. 27). Bei Faham et al. wird mit dem clonoSEQ Assay (früher unter dem Namen LymphoSIGHT) ein Grenzwert von 5 % verwendet, während bei Ching et al. ein

Grenzwert von 3 % etabliert wurde, wenn die Sequenz gut vom Hintergrund abgegrenzt ist, definiert als einen Faktor 10 Abstand zu Sequenzen desselben Locus (Faham et al., 2012, p. 5174) (Ching et al., 2020, pp. 4). Es sollten Guidelines zur Standardisierung erarbeitet werden, um eine einheitliche Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen und eine weltweite Vergleichbarkeit zu erreichen.

Neben der Frage nach den geeigneten Kriterien zur Ermittlung von Klonalität sind weitere Faktoren zu berücksichtigen, die zu abweichenden Ergebnissen führen könnten. Das Vorkommen von anderen klonalen Prozessen, wie die monoklonale B-Zell-Lymphozytose, reaktive Immunantworten oder Immunerkrankungen, könnte bei KM Proben mit Hämodilution zu falsch positiven Ergebnissen bei der MRD-Untersuchung führen, wenn bei der Ermittlung der Indexklonalität eine Klonotyp gefunden wird, der nicht mit dem MM in Verbindung steht (Mailankody et al., 2015, pp. 8) (Scheijen et al., 2019, pp. 2234). Monoklonale B-Zell-Lymphozytose wurde bei gesunden Blutspendern im Alter zwischen 45 und 91 Jahren in 7,1 % der Fälle (149/ 2098) mit einer steigenden Prävalenz im Alter nachgewiesen und stellt damit keinen seltenen Befund dar (Shim et al., 2014, pp. 1321–1322). Daher sollten bei der Interpretation des Befundes auch weitere klinische Aspekte berücksichtigt werden.

Um festzustellen, ob die untersuchten Proben mit Proben anderer MM-Kohorten vergleichbar waren, wurden die Häufigkeiten der verwendeten V- und J-Gruppe analysiert. Die verschiedenen Stadien bei der Reifung von B-Zellen weisen unterschiedliche Group-Usage der Gensegmente auf und entsprechen beim MM der von normalen Plasmazellen (González et al., 2007, pp. 3114) (Deng et al., 2022, pp. 12). Die V_H-Gruppe V3 war mit 65,00 % am häufigsten nachweisbar, gefolgt von 25,00 % der V4-Gruppe und jeweils 5 % der V1- und V2-Gruppe. V5 wurde in den untersuchten Proben von MM-Patient*innen nicht verwendet, siehe Abbildung 12. Damit sind die ermittelten Häufigkeiten vergleichbar mit denen bei Ferrero et al. und Medina et al. beobachteten Werte von 53,9 % und 52,7 % für V3, 18,6 % und 18,5 % für V4 und 12,5 % und 15,2 % für V1 (Ferrero et al., 2012, pp. 850). Bei Medina et al. wurde außerdem zu 8,6 % die Verwendung von V2 beobachtet und zu 5 % die Verwendung von V5 (Medina et al., 2020a, pp. 6). Für die J_H-Gruppe J5 konnte eine Frequenz von 40,00 % ermittelt werden, gefolgt von

25,00 % der J6-Gruppe, je 15,00 % der J3- und J4-Gruppe und 5 % für die J1-Gruppe, siehe Abbildung 12. Damit weichen die beobachteten Häufigkeiten von denen von Ferrero et al. und Medina et al. stark ab, die am häufigsten J4 nachgewiesen hatten mit 54,8 % und 46,4 %, bei Medina et al. gefolgt von J6 mit 25 %. Auch bei Kim et al. und Hadzidimitriou et al. wurden J4 (44,19 % und 45,9 %) und J6 (25,58 % und 19 %) am häufigsten nachgewiesen, während J5 in 16,28 % und 9,5 % der Fälle vertreten war (Kim et al., 2021, pp. 6) (Hadzidimitriou et al., 2006, pp. 783). Damit war J5 bei den analysierten Proben von MM-Patient*innen stark überrepräsentiert und J4 stark unterrepräsentiert. Da es sich um eine sehr kleine Kohorte von 18 Patient*innen handelte, sollten die J-Gruppenhäufigkeiten im Laufe von weiteren Analysen beobachtet werden.

4.2. Bestimmung der MRD

Da für die Untersuchung von MRD eine erfolgreiche Ermittlung des Indexklons, ausreichend DNA und eine gekoppelte Verlaufsprobe nötig ist, standen für die MRD-Untersuchung nur 27 Proben zur Verfügung.

In 84 % der Fälle könnte MRD-Positivität nachgewiesen werden, siehe Tabelle 33. Im Falle der Probe der Patientin mit CLL, die ein MM entwickelte, konnte gezeigt werden, dass der Assay in der Lage ist klonale Evolution zu verfolgen. Neben den in der Indexprobe ermittelten klonalen Sequenzen war hier in der Verlaufsprobe ein weiterer Klonotyp detektiert worden.

Beim Vergleich der MRD-Untersuchung zwischen MFC und NGS zeigte sich eine gute Gesamtübereinstimmung von 83,3 % der Fälle, mit einer positiven prozentualen Übereinstimmung von 94,7 %. Der ermittelte Wert für die Gesamtübereinstimmung liegt damit auf einem vergleichbaren Level wie die Werte von Medina et al. und Ho et al. Beide haben ebenfalls mithilfe der LymphoTrack Assays die NGS-MRD-Untersuchung durchgeführt und Werte von 85,85 % und 92,9 % detektiert (Medina et al., 2020b, pp. 4) (Ho et al., 2021, pp. 186).

Von den vier abweichenden Fällen waren es in drei Fällen Proben von MM-Patient*innen, die im NGS MRD-positiv waren, während durch MFC keine aberranten Zellen gemessen wurden, siehe Tabelle 37. Für diese drei Proben wurden durch MFC allerdings nur ca. 36.000 bis 40.000 Events gemessen, statt

der für die Analyse von MRD notwendigen 500.000, weshalb nur eine Sensitivität von 10^{-1} erreicht wurde. Grund hierfür war, dass die einsendende Ärztin oder der einsendende Arzt keine MRD-Untersuchung gewünscht hatte. Da im NGS für die Proben klonale Frequenzen zwischen $1,22 \times 10^{-4}$ und $2,26 \times 10^{-3}$ ermittelt wurden, könnte die geringere Sensitivität in der MFC der Grund für die abweichenden Ergebnisse sein. Für eine Probe eines CLL-Patienten wurden reziproke Ergebnisse festgestellt: während er in der MFC MRD-positiv war, wurde im NGS die klonale Sequenz in der MRD-Untersuchung nicht detektiert. Die Sensitivität der NGS-Analyse lag dabei bei 10^{-4} , in der MFC wurden 0,08 % aberrante Zellen gemessen, was ausschließt, dass auch in dem Fall unterschiedliche Sensitivitätsniveaus für das abweichende Ergebnis verantwortlich sind. Generell ist es bei divergenten Ergebnissen zwischen MFC und NGS mit MRD-Positivität im MFC und MRD-Negativität im NGS denkbar, dass Subsampling als mögliche Ursache infrage kommt. Bei MFC handelt es sich um eine Methode mit deutlich weniger notwendigen Schritten als bei NGS. Der MRD-NGS Workflow beinhaltet Zell-Isolation, DNA-Isolation, DNA-Aufkonzentration, PCR-Amplifikation, Sequenzierung und Datenanalyse und -interpretation. Bei jedem dieser Schritte kommt es zum stochastischen Subsampling, so dass trotz einer hohen Zellzahl nach der Zell-Isolation nur ein geringer Anteil der Zellen aus der abgenommenen PB- oder KM-Probe der Patientin oder des Patienten am Ende analysiert wird. Diesen Effekt sollte man mit einer möglichst hohen Zellzahl und DNA-Input versuchen zu minimieren (Hansen et al., 2021, pp. 18). Bei KM-Proben von MM-Patient*innen ist es außerdem möglich, dass die nicht uniforme KM-Infiltration, die beim MM beobachtet wird, für abweichende Ergebnisse verantwortlich ist (Anderson et al., 2017, pp. 3982). Oft wird das erste abgenommene Röhrchen bei einer KM-Punktion für MFC verwendet, während die weiteren Röhrchen mit potenziell höherer Hämodilution in der Molekulargenetik oder mit anderen Methoden analysiert werden (Ho et al., 2021, pp. 195) (Bai et al., 2018, pp. 21–22). Allerdings handelt es sich bei dem abweichenden Ergebnis zwischen MFC und NGS um eine Probe eines CLL-Patienten, weshalb Subsampling der wahrscheinlichere Grund sein könnte, da die Analysen bei CLL mit PB stattfinden.

Für die mit MFC und NGS positiven Proben zeigte die Passing-Bablok-Regression mit $R^2 = 0,77$ einen geringeren Wert für das Bestimmtheitsmaß als der inhouse festgelegte Grenzwert von $R^2 \geq 0,9$. Des Weiteren konnte durch die Passing-Bablok-Regression ein proportionaler Fehler zwischen den beiden Messmethoden ausgeschlossen werden, gibt aber Hinweise auf einen systematischen Fehler, siehe Abbildung 19. Allerdings könnte das geringe Bestimmtheitsmaß und der Hinweis auf einen systematischen Fehler der geringen Anzahl an Proben geschuldet sein, da für eine Passing-Bablok-Regression mindestens 40 Proben gemessen werden sollten (Bilić-Zulle, 2011, pp. 49–50). Es sollten daher weitere Messungen erfolgen und die Passing-Bablok-Regression mit mehr Proben reanalysiert werden.

Die darüber hinaus durchgeführte Bland-Altman-Analyse konnte zeigen, dass es einen sehr geringen, nicht signifikanten Bias gab, und die Werte bei einem guten Level of Agreement (zwischen -2,38 und 2,4) eine hohe Übereinstimmung zeigen, siehe Abbildung 19. Allerdings lagen 11,11 % der Fälle außerhalb der Level of Agreement, was höher als der 5 % Grenzwert ist, unter dem zwei Messmethoden eine gute Übereinstimmung zeigen. Der etwas höhere Wert könnte der geringen Probenanzahl geschuldet sein, die analysiert wurden und sollte in weiteren Analysen beobachtet werden. Insgesamt entsprechen die beobachteten Werte der von Medina et al. durchgeführten Bland-Altman-Analyse sehr gut. Bei Medina et al. ist der Bias ebenfalls nicht signifikant, die Level of Agreement haben ein sehr ähnliches Niveau (-2,2 bis 2,3) und 7 % der Werte liegen außerhalb der Level of Agreement (Medina et al., 2020b, pp. 5).

Neben dem Vergleich zwischen MFC und NGS als Methoden zur Untersuchung von MRD, konnte NGS bei einer geringen Anzahl an Proben von ALL-Patient*innen auch mit der ASO-qPCR verglichen werden. Es zeigte sich bei einer Probenanzahl von drei ALL- eine Übereinstimmung von 66,7 % zwischen den ermittelten MRD-Ergebnissen der beiden Methoden. Eine Probe wies eine Ratio von 0,0099 in der ASO-qPCR auf, welche im NGS mit einer Sensitivität von 10^{-4} MRD-negativ war. Da bei beiden Methoden die gleiche DNA verwendet wurde, lassen sich die Gründe, die bei abweichenden Ergebnissen zwischen MFC und NGS aufgeführt wurden, ausschließen. Auch Yao et al. konnten ein diskrepantes Ergebnis zwischen ASO-qPCR beobachten, bei dem in der ASO-qPCR MRD-

Positivität ermittelt wird, im NGS aber MRD-Negativität, obwohl in der NGS-Analyse eine höhere Sensitivität erreicht wurde (Yao et al., 2020, pp. 682–683). Auslöser könnte hierfür ein fehlerhaftes Ergebnis der ASO-qPCR sein. So konnten Kotrova et al. bei Proben von ALL-Patient*innen zeigen, dass es bei der ASO-qPCR zu unspezifischer Primerbindung an ähnlichen VDJ-Sequenzen kommt, was zu falsch positiven Ergebnissen führt (Kotrova et al., 2017, pp. 965–966).

Auffällig war, dass für die MRD-negativen Proben mit NGS nur eine Sensitivität von 10^{-4} erreicht werden konnte, siehe Tabelle 51. Yao et al., Ferla et al., Medina et al. und Ho et al. konnten unter Verwendung des LymphoTrack Assays zeigen, dass eine Sensitivität von 10^{-5} für die meisten Proben von MM-Patient*innen erreichbar ist (Yao et al., 2019, pp. 4) (Ferla et al., 2022, pp. 6) (Medina et al., 2020b, pp. 4) (Ho et al., 2021, pp. 187). Eine Sensitivität von 10^{-5} sollte auch in einem Routinelabor erreichbar sein und ist laut den IMWG-Kriterien für den Nachweis von MRD-Negativität beim MM vorgeschrieben (Kumar et al., 2016, pp. e335). Um die gewünschte Sensitivität zu erreichen, sind verschiedene Herangehensweisen möglich. Die Sensitivität ist abhängig vom DNA-Input, der Anzahl an Replikaten und der Readanzahl. Laut des Projekt Planers der LymphoTrack MRD-Software sollten bei einem DNA-Input von 1.000 ng und drei Replikaten (wie in dieser Arbeit angewandt) ab einer Readanzahl von 1,1 Mio. Reads pro Replikat eine Sensitivität von 10^{-5} erreicht werden. Dies ist nur ein theoretischer Wert, da PCR-Bias nicht berücksichtigt wird. Bei der MRD-Untersuchung auf die acht Sequenzen, die nicht detektierbar waren, wies nur eine Probe einen etwas geringeren DNA-Input als 1.000 ng/ Replikat auf (774,3 ng/ Replikat) und der Ansatz erfolgte in Triplikaten. Allerdings wird die benötigte Readanzahl von 1,1 Mio. Reads pro Replikat nicht erreicht, bei einem Mittel von 579.009 Reads pro Replikat, siehe Tabelle 35. Um die Readanzahl zu erhöhen, könnte man die FlowCell stärker beladen. Während inhouse üblicherweise 8 pM verwendet werden, empfiehlt der Hersteller eine Beladung mit 20 pM bei einer v3-FlowCell nach KAPA-Library-Quantifizierung. Wie bei der Analyse der Laufparameter der Verdünnungsreihen 1 und 2 festgestellt wurde, wird bei einer Beladung mit 8 pM nach TapeStation-Quantifizierung eine höhere Clusterdensity und damit auch mehr Reads generiert, siehe Tabelle 45. Vorteile bei der TapeStation-Quantifizierung sind ein einfacherer Workflow und eine schnellere

Analyse, weshalb die Beladung der FlowCell trotz unterschätzter Werte im Vergleich zur KAPA-Library-Quantifizierung weiterverwendet wird. Es sollte eine schrittweise Erhöhung der Library-Konzentration erfolgen, bis eine optimale Beladung der FlowCell erreicht wird, welche nicht zu einer Überclustering führt. Ebenfalls möglich wäre, weniger Proben pro Lauf auf einer FlowCell zu sequenzieren, was aber die Kosten der Untersuchung pro Probe erhöhen würde. Eine weitere Option für die Erhöhung der Sensitivität wäre die Erhöhung des DNA-Inputs. Laut Hersteller liegt die Grenze für den DNA-Input des Assays bei 2.000 ng pro Replikat und es sollte bei einem Ansatz in Duplikaten und je 1,4 Mio. generierten Reads rein rechnerisch eine Sensitivität von 10^{-5} erreicht werden (Invivoscribe, 2021, pp. 6). Diese große Menge an DNA zu gewinnen kann für ein Routinelabor eine Herausforderung darstellen, insbesondere, wenn die eingesandten KM-Röhrchen für weitere Untersuchungen, wie FISH nach CD138-MACS und MFC verwendet werden.

4.3. Verdünnungsreihen

Für die Ermittlung der Linearität, des Limit of Detection und Limit of Quantification wurden zwei Verdünnungsreihen analysiert. Bei beiden Verdünnungsreihen zeigte sich eine sehr gute Korrelation der erwarteten und gemessenen Werte mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von $> 0,99$. Bei beiden Diagrammen ist zu beobachten, dass die Triplikate der letzten drei Verdünnungsstufen, also ab einem erwarteten Wert von 10^{-5} , stärker streuen und ein Plateau erreichen. Die Library der letzten beiden, bzw. letzten drei Verdünnungsstufen wurden dann in weiteren Läufen resequenziert, wobei die klonalen Sequenzen in keiner der Verdünnungsstufen mit einer Sensitivität von 10^{-4} detektiert werden konnte. Da bei der ersten Analyse der Verdünnungsreihen alle Verdünnungsstufen in einem Lauf sequenziert worden sind, könnte ein Grund für die falsch positiven Werte der unteren Verdünnungsstufen Indexhopping sein, bei dem ungebundene Indices beim Demultiplexing den falschen Reads zugeordnet werden (Illumina, 2018, pp. 1–2). Da bei den LympoTrack Assays nur ein Index verwendet wird und der MRD-Ansatz eine hohe Sensitivität aufweist, ist der Effekt hier gut sichtbar. Deshalb empfiehlt der Hersteller auch, dass Proben für die Ermittlung der Indexklonalität nicht zusammen mit MRD-Proben in einem Lauf prozessiert werden sollen (Invivoscribe, 2021, pp. 4). Da die MRD-Untersuchung im Routinelabor erst

erfolgen kann, nachdem die klonale Sequenz der Indexprobe ermittelt wurde, ergibt sich daraus kaum eine Gefahr von falsch-positiven Ergebnissen. Auch Arcila et al. konnten diese Auswirkung innerhalb der Runs auf einem Level von $< 0,005$ % der total Reads beobachten (Arcila et al., 2019, pp. 340). Um das Limit of Detektion und das Limit of Quantifikation zu ermitteln, müssen aufgrund des beobachteten Indexhoppings weitere Verdünnungsstufen der bereits angesetzten Verdünnungsreihen resequenziert werden. Des Weiteren sind zusätzliche Ansätze von Verdünnungsreihen notwendig.

Die Verdünnungsreihen wurden außerdem zur Ermittlung des Limits of Blank verwendet. Da hierbei jeweils eine DNA aus 138+-MACS-Zellen eines MM-Patienten oder -Patientin stark mit WT-DNA (Patient*innen mit Hämochromatose und Polyglobulie) verdünnt wurde, eignete sich diese, um zu untersuchen, inwiefern die bereits gefunden klonalen Sequenzen in der DNA von Gesunden nachweisbar sind. Es konnte keine der in den Proben der Patient*innen gefundene klonalen Sequenzen detektiert werden, weshalb das Limit of Blank 0 beträgt. Da der Test auf einzigartigen Sequenzen beruht, sind falsch-positive Ergebnisse kaum zu erwarten, wenn Kreuzkontaminationen durch einen Template-line Wash mit Natriumhypochloritlösung nach jedem Lauf des MiSeqs und der getrennten Prozessierung von Indexproben und MRD-Proben verhindert werden. Diese hohe Spezifität wurde auch bei Ching et al. mit einem Limit of Blank von 0 beobachtet (Ching et al., 2020, pp. 9).

4.4. Präzision

Zur Ermittlung der Inter-Assay-Präzision wurden die bei jedem Lauf und Assay mitgeführten Positivkontrollen und low Positivkontrollen analysiert.

Für den Ansatz zur Ermittlung der Indexsequenz wurde für alle drei Assays ein Variationskoeffizient %CV unter 20 % festgestellt, was auch der Angabe des Herstellers für den FR1-Assay entspricht, siehe Tabelle 46 (Invivoscribe, 2022, pp. 31).

Für den MRD-Ansatz wurden deutlich höhere Variationskoeffizienten %CV für den FR1- und FR2-Assay von 60,4 % und 58,6 % festgestellt, während für den FR3-Assay ein %CV von 12 % ermittelt wurde, siehe Tabelle 47. Da beim FR3-Assay

nur zwei Ergebnisse zur Verfügung standen, ist davon auszugehen, dass er auch mit steigender Analysenanzahl steigen wird, da zufällige Fehler bei niedrigeren Messwerten ansteigen. Ching et al. konnte bei der MRD-Untersuchung feststellen, dass der Variationskoeffizient %CV hauptsächlich vom Zellinput abhängig ist und beobachtete Werte zwischen 18 % und 68 % (Ching et al., 2020, pp. 9).

4.5. Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass NGS bei der Bestimmung von MRD bei Proben von MM-Patient*innen eine spezifische Methode mit hoher Anwendbarkeit ist und die Ergebnisse mit denen der Goldstandardmethode MFC vergleichbar sind.

Um die Anwendbarkeit noch weiter zu erhöhen und damit mehr Patient*innen die Möglichkeit zu geben, eine Untersuchung auf MRD zu erhalten, könnte man neben den verwendeten LymphoTrack FR1-, FR2- und FR3-Assay auch die Leader- und *IGK*-Assays einsetzen, wobei der *IGK*-Assay laut Hersteller je nach gefundener Sequenz nicht ideal für den Einsatz zur Ermittlung von MRD ist.

Wie bereits in "4.2. Bestimmung der MRD" erwähnt, muss die Methode in Hinblick auf das Sensitivitätslevel optimiert werden, um das von der IMWG empfohlene Sensitivitätsniveau von 10^{-5} zu erreichen. Das kann über eine optimalere Beladung der FlowCell und damit mehr generierten Reads, mehr DNA-Input oder eine größere Anzahl an Replikaten erreicht werden und sollte in weiteren Experimenten ausgetestet werden.

Da bisher nur eine geringe Anzahl an Proben von MM-Patient*innen verwendet wurde, sollten die Analysen mit einer größeren Kohorte wiederholt werden, um statistisch tiefergehende Aussagen treffen zu können.

Außerdem müssen weitere Verdünnungsstufen der analysierten Verdünnungsreihen resequenziert und weitere Verdünnungsreihen angesetzt werden. Es ist darauf zu achten, dass die einzelnen Verdünnungsstufen in verschiedenen Läufen sequenziert werden, um das beobachtete Indexhopping zu vermeiden und valide Werte zu erhalten. Durch weitere Verdünnungsreihen kann dann das Limit of Detection und das Limit of Quantification bestimmt werden.

Literaturverzeichnis

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S., 2017. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier, Philadelphia, UNITED STATES.
- Adaptive Biotechnologies, n.d. Technical Summary | clonoSEQ MRD for Clinicians.
- Adaptive Biotechnologies, 2019. Adaptive Biotechnologies Enters Partnership with Illumina to Develop Distributable IVD Test Kits for clonoSEQ and immunoSEQ Dx | Adaptive Biotechnologies.
- Agilent Technologies Inc., 2022. Gebrauchsanweisung Agilent 4200 TapeStation System.
- Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A.D., Araujo, I.B. de O., Berti, E., Bhagat, G., Borges, A.M., Boyer, D., Calaminici, M., Chadburn, A., Chan, J.K.C., Cheuk, W., Chng, W.J., Choi, J.K., Chuang, S.S., Coupland, S.E., Czader, M., Dave, S.S., Jong, D. de, Du, M.Q., Elenitoba-Johnson, K.S., Ferry, J., Geyer, J., Gratzinger, D., Guitart, J., Gujral, S., Harris, M., Harrison, C.J., Hartmann, S., Hochhaus, A., Jansen, P.M., Karube, K., Kempf, W., Khoury, J., Kimura, H., Klapper, W., Kovach, A.E., Kumar, S., Lazar, A.J., Lazzi, S., Leoncini, L., Leung, N., Leventaki, V., Li, X.Q., Lim, M.S., Liu, W.P., Louissaint, A., Marcogliese, A., Medeiros, L.J., Michal, M., Miranda, R.N., Mitteldorf, C., Montes-Moreno, S., Morice, W., Nardi, V., Naresh, K.N., Natkunam, Y., Ng, S.B., Oschlies, I., Ott, G., Parrens, M., Pulitzer, M., Rajkumar, S.V., Rawstron, A.C., Rech, K., Rosenwald, A., Said, J., Sarkozy, C., Sayed, S., Saygin, C., Schuh, A., Sewell, W., Siebert, R., Sohani, A.R., Tooze, R., Traverse-Glehen, A., Vega, F., Vergier, B., Wechalekar, A.D., Wood, B., Xerri, L., Xiao, W., 2022. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022 36:7 36, 1720–1748. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Häcker, B.Ä., 2011. Molekularbiologie der Zelle. Wiley.

- Anderson, K.C., Auclair, D., Kelloff, G.J., Sigman, C.C., Avet-Loiseau, H., Farrell, A.T., Gormley, N.J., Kumar, S.K., Landgren, O., Munshi, N.C., Cavo, M., Davies, F.E., Di Bacco, A., Dickey, J.S., Gutman, S.I., Higley, H.R., Hussein, M.A., Jessup, J.M., Kirsch, I.R., Little, R.F., Loberg, R.D., Lohr, J.G., Mukundan, L., Omel, J.L., Pugh, T.J., Reaman, G.H., Robbins, M.D., Sasser, A.K., Valente, N., Zamagni, E., 2017. The role of minimal residual disease testing in myeloma treatment selection and drug development: Current value and future applications. *Clinical Cancer Research* 23, 3980–3993. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2895/129374/AM/THE-ROLE-OF-MINIMAL-RESIDUAL-DISEASE-TESTING-IN>
- Arcila, M.E., Yu, W., Syed, M., Kim, H., Maciag, L., Yao, J.J., Ho, C., Petrova, K., Mounq, C., Salazar, P., Rijo, I., Baldi, T., Zehir, A., Landgren, O., Park, J., Roshal, M., Dogan, A., Nafa, K., 2019. Establishment of Immunoglobulin Heavy (*IGH*) Chain Clonality Testing by Next-Generation Sequencing for Routine Characterization of B-Cell and Plasma Cell Neoplasms. *Journal of Molecular Diagnostics* 21, 330–342. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.10.008>
- Armbruster, D.A., Pry, T., 2008. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *The Clinical Biochemist Reviews* 29, S49.
- Bahlo, J., Kutsch, N., Bauer, K., Bergmann, M.A., Byrd, J., Chaffee, K.G., Döhner, H., Eichhorst, B.F., Else, M., Geisler, C., Grever, M., Leprêtre, S., Neuberg, D., Oscier, D., Robak, T., Rosenquist, R., Shanafelt, T.D., Stilgenbauer, S., Hallek, M., 2016. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology* 17, 779–790. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30029-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30029-8)
- Bai, Y., Orfao, A., Chim, C.S., 2018. Molecular detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 181, 11–26. <https://doi.org/10.1111/BJH.15075>
- Bai, Y., Wong, K.Y., Fung, T.K., Chim, C.S., 2016. High applicability of ASO-RQPCR for detection of minimal residual disease in multiple myeloma by

- entirely patient-specific primers/probes. *Journal of Hematology and Oncology* 9, 1–3. <https://doi.org/10.1186/S13045-016-0336-4/TABLES/2>
- Bilić-Zulle, L., 2011. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochemia Medica* 21, 49–52. <https://doi.org/10.11613/BM.2011.010/FULLARTICLE>
- Briney, B.S., Willis, J.R., Crowe, J.E., 2012. Location and length distribution of somatic hypermutation-associated DNA insertions and deletions reveals regions of antibody structural plasticity. *Genes & Immunity* 2012 13:7 13, 523–529. <https://doi.org/10.1038/GENE.2012.28>
- Brüggemann, M., Droese, J., Bolz, I., Lüth, P., Pott, C., Von Neuhoff, N., Scheuering, U., Kneba, M., 2000. Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. *Leukemia* 2000 14:8 14, 1419–1425. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2401831>
- Caers, J., Garderet, L., Kortüm, K.M., O'dwyer, M.E., Donk, N.W.C.J. van de, Binder, M., Dold, S.M., Gay, F., Corre, J., Beguin, Y., Ludwig, H., Larocca, A., Driessen, C., Dimopoulos, M.A., Boccadoro, M., Gramatzki, M., Zweegman, S., Einsele, H., Cavo, M., Goldschmidt, H., Sonneveld, P., Delforge, M., Auner, H.W., Terpos, E., Engelhardt, M., 2018. European Myeloma Network recommendations on tools for the diagnosis and monitoring of multiple myeloma: what to use and when. *Haematologica* 103, 1772–1784. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2018.189159>
- Chi, X., Li, Y., Qiu, X., 2020. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology* 160, 233–247. <https://doi.org/10.1111/IMM.13176>
- Ching, T., Duncan, M.E., Newman-Eerkes, T., McWhorter, M.M.E., Tracy, J.M., Steen, M.S., Brown, R.P., Venkatasubbarao, S., Akers, N.K., Vignali, M., Moorhead, M.E., Watson, D., Emerson, R.O., Mann, T.P., Cimler, B.M., Swatkowski, P.L., Kirsch, I.R., Sang, C., Robins, H.S., Howie, B., Sherwood, A., 2020. Analytical evaluation of the clonoSEQ Assay for establishing measurable (minimal) residual disease in acute lymphoblastic

- leukemia, chronic lymphocytic leukemia, and multiple myeloma. *BMC Cancer* 20, 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12885-020-07077-9/TABLES/4>
- Cohen, R.M., Kleinstein, S.H., Louzoun, Y., 2011. Somatic hypermutation targeting is influenced by location within the immunoglobulin V region. *Molecular Immunology* 48, 1477–1483. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2011.04.002>
- Cowan, A.J., Green, D.J., Kwok, M., Lee, S., Coffey, D.G., Holmberg, L.A., Tuazon, S., Gopal, A.K., Libby, E.N., 2022. Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review. *JAMA* 327, 464–477. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2022.0003>
- Da Vià, M.C., Dietrich, O., Truger, M., Arampatzi, P., Duell, J., Heidemeier, A., Zhou, X., Danhof, S., Kraus, S., Chatterjee, M., Meggendorfer, M., Twardziok, S., Goebeler, M.E., Topp, M.S., Hudecek, M., Prommersberger, S., Hege, K., Kaiser, S., Fuhr, V., Weinhold, N., Rosenwald, A., Erhard, F., Haferlach, C., Einsele, H., Kortüm, K.M., Saliba, A.E., Rasche, L., 2021. Homozygous BCMA gene deletion in response to anti-BCMA CAR T cells in a patient with multiple myeloma. *Nature Medicine* 2021 27:4 27, 616–619. <https://doi.org/10.1038/S41591-021-01245-5>
- Deng, X., Zhang, M., Zhou, J., Xiao, M., 2022. Next-generation sequencing for MRD monitoring in B-lineage malignancies: from bench to bedside. *Experimental Hematology & Oncology* 2022 11:1 11, 1–27. <https://doi.org/10.1186/S40164-022-00300-2>
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2022. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) oder Multiplem Myelom, Langversion 1.0. Leitlinienprogramm Onkologie. <https://doi.org/https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/multiples-myelom/>
- Diaz, M., Casali, P., 2002. Somatic immunoglobulin hypermutation. *Current Opinion in Immunology* 14, 235–240. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(02\)00327-8](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(02)00327-8)

- Dimopoulos, M.A., Moreau, P., Terpos, E., Mateos, M.V., Zweegman, S., Cook, G., Delforge, M., Hájek, R., Schjesvold, F., Cavo, M., Goldschmidt, H., Facon, T., Einsele, H., Boccadoro, M., San-Miguel, J., Sonneveld, P., Mey, U., 2021. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology* 32, 309–322. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2020.11.014>
- Donk, N.W.C.J. van de, Pawlyn, C., Yong, K.L., 2021. Multiple myeloma. *The Lancet* 397, 410–427. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00135-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00135-5)
- Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A.K., Rizzi, M., 2014. B cell biology: An overview topical collection on basic and applied science. *Current Allergy and Asthma Reports* 14, 1–10. <https://doi.org/10.1007/S11882-014-0434-8/METRICS>
- Ferla, V., Antonini, E., Perini, T., Farina, F., Masottini, S., Malato, S., Markt, S., Lupo Stanghellini, M.T., Tresoldi, C., Ciceri, F., Marcatti, M., 2022. Minimal residual disease detection by next-generation sequencing in multiple myeloma: Promise and challenges for response-adapted therapy. *Frontiers in oncology* 12. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.932852>
- Ferrero, S., Capello, D., Svaldi, M., Boi, M., Gatti, D., Drandi, D., Rossi, D., Barbiero, S., Mantoan, B., Mantella, E., Zanni, M., Ghione, P., Larocca, A., Passera, R., Bertoni, F., Gattei, V., Forconi, F., Laurenti, L., Poeta, G. del, Marasca, R., Cortelazzo, S., Gaidano, G., Palumbo, A., Boccadoro, M., Ladetto, M., 2012. Multiple myeloma shows no intra-disease clustering of immunoglobulin heavy chain genes. *Haematologica* 97, 849–853. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2011.052852>
- Flores-Montero, J., Sanoja-Flores, L., Paiva, B., Puig, N., García-Sánchez, O., Böttcher, S., Van Der Velden, V.H.J., Pérez-Morán, J.J., Vidriales, M.B., García-Sanz, R., Jimenez, C., González, M., Martínez-López, J., Corral-Mateos, A., Grigore, G.E., Fluxá, R., Pontes, R., Caetano, J., Sedek, L., Del Cañizo, M.C., Bladé, J., Lahuerta, J.J., Aguilar, C., Báñez, A., García-Mateo, A., Labrador, J., Leoz, P., Aguilera-Sanz, C., San-Miguel, J., Mateos, M.V., Durie, B., Van Dongen, J.J.M., Orfao, A., 2017. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal

- residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 2017 31:10 31, 2094–2103. <https://doi.org/10.1038/LEU.2017.29>
- Georgiou, G., Ippolito, G.C., Beausang, J., Busse, C.E., Wardemann, H., Quake, S.R., 2014. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nature Biotechnology* 2014 32:2 32, 158–168. <https://doi.org/10.1038/nbt.2782>
- Ghasemi, A., Zahediasl, S., 2012. Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. *International Journal of Endocrinology and Metabolism* 10, 486. <https://doi.org/10.5812/IJEM.3505>
- Ghobrial, I.M., Detappe, A., Anderson, K.C., Steensma, D.P., 2018. The bone-marrow niche in MDS and MGUS: implications for AML and MM. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2018 15:4 15, 219–233. <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2017.197>
- Giavarina, D., 2015. Understanding Bland Altman analysis. *Biochimica Medica* 25, 141. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.015>
- González, D., Van Der Burg, M., García-Sanz, R., Fenton, J.A., Langerak, A.W., González, M., Van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F., Morgan, G.J., 2007. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 110, 3112–3121. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-02-069625>
- Hadzidimitriou, A., Stamatopoulos, K., Belessi, C., Lalayanni, C., Stavroyianni, N., Smilevska, T., Hatzi, K., Laoutaris, N., Anagnostopoulos, A., Kollia, P., Fassas, A., 2006. Immunoglobulin genes in multiple myeloma: expressed and non-expressed repertoires, heavy and light chain pairings and somatic mutation patterns in a series of 101 cases. *Haematologica* 91, 781–787. <https://doi.org/10.3324/haem>
- Hafen, U., 2022. Sind In-house IVD noch erlaubt? - Die EU reguliert medizinische Labore.
- Hansen, M.H., Cédile, O., Larsen, T.S., Abildgaard, N., Nyvold, C.G., 2021. Perspective: sensitive detection of residual lymphoproliferative disease by

NGS and clonal rearrangements—how low can you go? *Experimental Hematology* 98, 14–24. <https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2021.03.005>

Ho, C., Syed, M., Roshal, M., Petrova-Drus, K., Moung, C., Yao, J., Quesada, A.E., Benhamida, J., Vanderbilt, C., Liu, Y., Zhu, M., Yu, W., Maciag, L., Wang, M., Ma, Y., Gao, Q., Rustad, E.H., Hultcrantz, M., Diamond, B.T., Zheng-Lin, B., Huang, Y., Hutt, K., Miller, J.E., Dogan, A., Nafa, K., Landgren, O., Arcila, M.E., 2021. Routine Evaluation of Minimal Residual Disease in Myeloma Using Next-Generation Sequencing Clonality Testing: Feasibility, Challenges, and Direct Comparison with High-Sensitivity Flow Cytometry. *Journal of Molecular Diagnostics* 23, 181–199. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.10.015>

Hochhaus, A., Baccarani, M., Silver, R.T., Schiffer, C., Apperley, J.F., Cervantes, F., Clark, R.E., Cortes, J.E., Deininger, M.W., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Hughes, T.P., Janssen, J.J.W.M., Kantarjian, H.M., Kim, D.W., Larson, R.A., Lipton, J.H., Mahon, F.X., Mayer, J., Nicolini, F., Niederwieser, D., Pane, F., Radich, J.P., Rea, D., Richter, J., Rosti, G., Rousselot, P., Saglio, G., Saußebe, S., Soverini, S., Steegmann, J.L., Turkina, A., Zaritskey, A., Hehlmann, R., 2020. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2020 34:4 34, 966–984. <https://doi.org/10.1038/S41375-020-0776-2>

Illumina, 2021. Cluster Optimization Overview.

Illumina, 2018. Effects of Index Misassignment on Multiplexing and Downstream Analysis.

Illumina, 2017. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology.

Illumina, 2016. Illumina Sequencing by Synthesis.

Invivoscribe, 2022. Gebrauchsanweisung LymphoTrack Dx *IGH* (FR1/FR2/FR3) Assays – MiSeq.

Invivoscribe, 2021. Gebrauchsanweisung LymphoTrack Low Positive Controls & LymphoQuant Internat Controls.

- Ise, W., Kurosaki, T., 2019. Plasma cell differentiation during the germinal center reaction. *Immunological Reviews* 288, 64–74. <https://doi.org/10.1111/IMR.12751>
- Iwasaki, A., 2021. The Variable Region of an Antibody Binds to the Antigen. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/likes/t-60db391fbac85700aafb6c2e-the-variable-region-of-an-antibody-binds-to-the-antigen>
- Iwasaki, A., 2020. B Cell Receptors (Light and Heavy Chains). <https://app.biorender.com/profile/virusesimmunity/templates/5f402d1d99acd600b27ca247>
- Kim, M., Jeon, K., Hutt, K., Zlotnicki, A.M., Kim, H.J., Lee, J., Kim, H.S., Kang, H.J., Lee, Y.K., 2021. Immunoglobulin gene rearrangement in Koreans with multiple myeloma: Clonality assessment and repertoire analysis using next-generation sequencing. *PloS one* 16. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0253541>
- Kotrova, M., Van Der Velden, V.H.J., Van Dongen, J.J.M., Formankova, R., Sedlacek, P., Brüggemann, M., Zuna, J., Stary, J., Trka, J., Fronkova, E., 2017. Next-generation sequencing indicates false-positive MRD results and better predicts prognosis after SCT in patients with childhood ALL. *Bone Marrow Transplantation* 2017 52:7 52, 962–968. <https://doi.org/10.1038/BMT.2017.16>
- Kumar, S., Paiva, B., Anderson, K.C., Durie, B., Landgren, O., Moreau, P., Munshi, N., Lonial, S., Bladé, J., Mateos, M.V., Dimopoulos, M., Kastritis, E., Boccadoro, M., Orłowski, 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., Hillengass, 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. *The Lancet Oncology* 17, e328–e346. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30206-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30206-6)

- Küppers, R., 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature reviews. Cancer* 5, 251–262. <https://doi.org/10.1038/NRC1589>
- Landgren, O., Devlin, S., Boulad, M., Mailankody, S., 2016. Role of MRD status in relation to clinical outcomes in newly diagnosed multiple myeloma patients: a meta-analysis. *Bone Marrow Transplantation* 2016 51:12 51, 1565–1568. <https://doi.org/10.1038/BMT.2016.222>
- Landgren, O., Owen, R.G., 2016. Better therapy requires better response evaluation: Paving the way for minimal residual disease testing for every myeloma patient. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 90, 14–20. <https://doi.org/10.1002/CYTO.B.21273>
- Langerak, A., 2022. *Immunogenetics - Methods and Protocols, Methods in molecular biology*. Springer US, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2115-8>
- Lefranc, M.-P., 2001. Nomenclature of the Human Immunoglobulin Heavy (*IGH*) Genes. *Experimental and Clinical Immunogenetics* 18, 100–116. <https://doi.org/10.1159/000049189>
- Linnet, K., Kondratovich, M., 2004. Partly nonparametric approach for determining the limit of detection. *Clinical chemistry* 50, 732–740. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2003.029983>
- Lupo, C., Spisak, N., Walczak, A.M., Mora, T., 2022. Learning the statistics and landscape of somatic mutation-induced insertions and deletions in antibodies. *PLoS computational biology* 18. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1010167>
- 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. *Nature reviews. Clinical oncology* 12, 286. <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2014.239>
- Martinez-Lopez, J., Lahuerta, J.J., Pepin, F., González, M., Barrio, S., Ayala, R., Puig, N., Montalban, M.A., Paiva, B., Weng, L., Jiménez, C., Sopena, M., Moorhead, M., Cedena, T., Rapado, I., Victoria Mateos, M., Rosiñol, L., Oriol, A., Blanchard, M.J., Martínez, R., Bladé, J., Miguel, J.S., Feham, M.,

- García-Sanz, R., 2014. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 123, 3073–3079. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-01-550020>
- Medina, A., Jiménez, C., Sarasquete, M.E., González, M., Chillón, M.C., Balanzategui, A., Prieto-Conde, I., García-Álvarez, M., Puig, N., González-Calle, V., Alcoceba, M., Cuenca, I., Barrio, S., Escalante, F., Gutiérrez, N.C., Gironella, M., Hernández, M.T., Sureda, A., Oriol, A., Bladé, J., Lahuerta, J.J., San Miguel, J.F., Mateos, M.V., Martínez-López, J., Calasanz, M.J., García-Sanz, R., 2020a. Molecular profiling of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements unveils new potential prognostic markers for multiple myeloma patients. *Blood Cancer Journal* 2020 10:2 10, 1–12. <https://doi.org/10.1038/S41408-020-0283-8>
- Medina, A., Puig, N., Flores-Montero, J., Jimenez, C., Sarasquete, M.E., Garcia-Alvarez, M., Prieto-Conde, I., Chillon, C., Alcoceba, M., Gutierrez, N.C., Oriol, A., Rosinol, L., Bladè, J., Gironella, M., Hernandez, M.T., Gonzalez-Calle, V., Cedena, M.T., Paiva, B., San-Miguel, J.F., Lahuerta, J.J., Mateos, M.V., Martinez-Lopez, J., Orfao, A., Gonzalez, M., Garcia-Sanz, R., 2020b. Comparison of next-generation sequencing (NGS) and next-generation flow (NGF) for minimal residual disease (MRD) assessment in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal* 2020 10:10 10, 1–10. <https://doi.org/10.1038/S41408-020-00377-0>
- Mesin, L., Ersching, J., Victora, G.D., 2016. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* 45, 471–482. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2016.09.001>
- Morgan, G.J., Walker, B.A., Davies, F.E., 2012. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer* 2012 12:5 12, 335–348. <https://doi.org/10.1038/NRC3257>
- Munshi, N.C., Avet-Loiseau, H., Anderson, K.C., Neri, P., Paiva, B., Samur, M., Dimopoulos, M., Kulakova, M., Lam, A., Hashim, M., He, J., Heeg, B., Ukropec, J., Vermeulen, J., Cote, S., Bahlis, N., 2020. A large meta-analysis establishes the role of MRD negativity in long-term survival outcomes in patients with multiple myeloma. *Blood Advances* 4, 5988–5999. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2020002827>

- 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 Oncology* 3, 28–35. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2016.3160>
- Odegard, V.H., Schatz, D.G., 2006. Targeting of somatic hypermutation. *Nature Reviews Immunology* 6:8 6, 573–583. <https://doi.org/10.1038/nri1896>
- Paiva, B., Vidriales, M.B., Cerveró, J., Mateo, G., Pérez, J.J., Montalbán, M.A., Sureda, A., Montejano, L., Gutiérrez, N.C., De Coca, A.G., De Las Heras, N., Mateos, M.V., López-Berges, M.C., García-Boyeró, R., Galende, J., Hernández, J., Palomera, L., Carrera, D., Martínez, R., De La Rubia, J., Martín, A., Bladé, J., Lahuerta, J.J., Orfao, A., San Miguel, J.F., 2008. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 112, 4017–4023. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-05-159624>
- Pieper, K., Grimbacher, B., Eibel, H., 2013. B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131, 959–971. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2013.01.046>
- Pongers-Willems, M.J., Verhagen, O.J.H.M., Tibbe, G.J.M., Wijkhuijs, A.J.M., De Haas, V., Roovers, E., Van Der School, C.E., Van Dongen, J.J.M., 1998. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia* 12, 2006–2014. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2401246>
- Puig, N., Sarasquete, M.E., Alcoceba, M., Balanzategui, A., Chillón, M.C., Sebastián, E., Marín, L.A., Díaz, M.G., San Miguel, J.F., Sanz, R.G., 2013. The use of CD138 positively selected marrow samples increases the applicability of minimal residual disease assessment by PCR in patients with multiple myeloma. *Annals of hematology* 92, 97–100. <https://doi.org/10.1007/S00277-012-1566-3>

- Puig, N., Sarasquete, M.E., Balanzategui, A., Martínez, J., Paiva, B., García, H., Fumero, S., Jiménez, C., Alcoceba, M., Chillón, M.C., Sebastián, E., Marín, L., Montalbán, M.A., Mateos, M.V., Oriol, A., Palomera, L., De La Rubia, J., Vidriales, M.B., Bladé, J., Lahuerta, J.J., González, M., Miguel, J.F.S., García-Sanz, R., 2013. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia* 2014 28:2 28, 391–397. <https://doi.org/10.1038/LEU.2013.217>
- Rajkumar, S.V., 2022. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American Journal of Hematology* 97, 1086–1107. <https://doi.org/10.1002/AJH.26590>
- Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M.A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastiris, E., Richardson, P., Landgren, O., Paiva, B., Dispenzieri, A., Weiss, B., LeLeu, X., Zweegman, S., Lonial, S., Rosinol, L., Zamagni, E., Jagannath, S., Sezer, O., Kristinsson, S.Y., Caers, J., Usmani, S.Z., Lahuerta, J.J., Johnsen, H.E., Beksac, M., Cavo, M., Goldschmidt, H., Terpos, E., Kyle, R.A., Anderson, K.C., Durie, B.G.M., Miguel, J.F.S., 2014. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology* 15, e538–e548. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)
- Rawstron, A.C., Child, J.A., De Tute, R.M., Davies, F.E., Gregory, W.M., Bell, S.E., Szubert, A.J., Navarro-Coy, N., Drayson, M.T., Feyler, S., Ross, F.M., Cook, G., Jackson, G.H., Morgan, G.J., Owen, R.G., 2013. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: Impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX study. *Journal of Clinical Oncology* 31, 2540–2547. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.2119>
- Roche, 2020. Gebrauchsanweisung KAPA Library Quantification Kit Illumina Platforms.
- Roche Diagnostics GmbH, 2021. Gebrauchsanweisung MagNA Pure 96 System.

- Rodriguez-Otero, P., Paiva, B., San-Miguel, J.F., 2021. Roadmap to cure multiple myeloma. *Cancer Treatment Reviews* 100, 102284. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2021.102284>
- Sarasquete, M., Garcia-Sanz, R., Gonzalez, D., Martinez, J., Mateo, G., Martinez, P., Ribera, J., Hernandez, J., Lahuerta, J., Orfao, A., Gonzalez, M., San Miguel, J., 2005. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 90, 1365–1372. <https://doi.org/10.3324/haem.2005.90.1365>
- Scheijen, B., Meijers, R.W.J., Rijntjes, J., Klift, M.Y. van der, Möbs, M., Steinhilber, J., Reigl, T., Brand, M. van den, Kotrová, M., Ritter, J.M., Catherwood, M.A., Stamatopoulos, K., Brüggemann, M., Davi, F., Darzentas, N., Pott, C., Fend, F., Hummel, M., Langerak, A.W., Groenen, P.J.T.A., 2019. Next-generation sequencing of immunoglobulin gene rearrangements for clonality assessment: a technical feasibility study by EuroClonality-NGS. *Leukemia* 2019 33:9 33, 2227–2240. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0508-7>
- Shim, Y.K., Rachel, J.M., Ghia, P., Boren, J., Abbasi, F., Dagklis, A., Venable, G., Kang, J., Degheidy, H., Plapp, F.V., Vogt, R.F., Menitove, J.E., Marti, G.E., 2014. Monoclonal B-cell lymphocytosis in healthy blood donors: an unexpectedly common finding. *Blood* 123, 1319–1326. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-08-523704>
- Suan, D., Sundling, C., Brink, R., 2017. Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. *Current Opinion in Immunology* 45, 97–102. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2017.03.006>
- Surova, E., Jumaa, H., 2014. The Role of BCR Isotype in B-Cell Development and Activation. *Advances in Immunology* 123, 101–139. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800266-7.00003-0>
- Verhagen, O.J.H.M., Willemse, M.J., Breunis, W.B., Wijkhuijs, A.J.M., Jacobs, D.C.H., Joosten, S.A., Van Wering, E.R., Van Dongen, J.J.M., Van Der Schoot, C.E., 2000. Application of germline *IGH* probes in real-time

quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000 14:8 14, 1426–1435. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2401801>

Walker, B.A., Mavrommatis, K., Wardell, C.P., Ashby, T.C., Bauer, M., Davies, F., Rosenthal, A., Wang, H., Qu, P., Hoering, A., Samur, M., Towfic, F., Ortiz, M., Flynt, E., Yu, Z., Yang, Z., Rozelle, D., Obenauer, J., Trotter, M., Auclair, D., Keats, J., Bolli, N., Fulciniti, M., Szalat, R., Moreau, P., Durie, B., Stewart, A.K., Goldschmidt, H., Raab, M.S., Einsele, H., Sonneveld, P., San Miguel, J., Lonial, S., Jackson, G.H., Anderson, K.C., Avet-Loiseau, H., Munshi, N., Thakurta, A., Morgan, G., 2018. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia* 2018 33:1 33, 159–170. <https://doi.org/10.1038/S41375-018-0196-8>

Wasserman, E., 2015. Adaptive Biotechnologies snatches up Sequentia to gain ground in cancer immunosequencing | Fierce Biotech.

Weiß, C., 2019. *Basiswissen Medizinische Statistik*, 7th ed, Springer-lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56588-9>

Wörmann, B., Driessen, C., Einsele, H., Goldschmidt, H., Gunsilius, E., Kortüm, M., Kröger, N., Ludwig, H., Mügge, L.-O., Naumann, R., Pritzkeleit, R., Röllig, C., Scheid, C., Taverna, C., Weisel, K., Weißinger, F., 2018. *Multiples Myelom — Onkopedia*.

Yanamandra, U., Kumar, S.K., 2018. Minimal residual disease analysis in myeloma—when, why and where. *Leukemia and Lymphoma* 59, 1772–1784. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1386304>

Yao, Q., Bai, Y., Orfao, A., Chim, C.S., 2019. Standardized Minimal Residual Disease Detection by Next-Generation Sequencing in Multiple Myeloma. *Frontiers in Oncology* 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00449>

Yao, Q., Bai, Y., Orfao, A., Kumar, S., Chim, C.S., 2020. Upgraded Standardized Minimal Residual Disease Detection by Next-Generation Sequencing in Multiple Myeloma. *The Journal of Molecular Diagnostics* 22, 679–684. <https://doi.org/10.1016/J.JMOLDX.2020.02.005>

Young, C., Brink, R., 2021. The unique biology of germinal center B cells. *Immunity* 54, 1652–1664. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2021.07.015>

Zymo Research, 2022. Gebrauchsanweisung DNA Clean & Concentrator -5.

Anhang

Tabelle 48: Zusammenfassung der Ermittlung der Klonalität der Indexproben aller Entitäten

Diagnose	Anzahl Patient*innen	Study ID Indexprobe	Material	erste klonale Sequenz		nachweisbar im FR1-Assay	nachweisbar im FR2-Assay	nachweisbar im FR3-Assay	Anzahl klonaler Sequenzen	zweite klonale Sequenz	
ALL	1	MLL_246852	KM	IGHV3-66_03	IGHJ6_02	ja	ja	ja	1		
ALL	1	MLL_255035	KM	IGHV3-66_03	IGHJ6_02	ja	ja	ja	1		
ALL	2	MLL_13367	KM	IGHV5-51_01	IGHJ4_02	ja	ja	ja	1		
ALL	2	MLL_255034	KM	IGHV5-51_01	IGHJ4_02	ja	ja	ja	1		
CLL	1	MLL_255036	PB	IGHV3-49_05	IGHJ2_01	ja	ja	nein	1		
CLL	2	MLL_13992	PB	IGHV3-23_04	IGHJ4_02	ja	ja	ja	1		
CLL	3	MLL_258773	PB	IGHV3-30-3_01	IGHJ4_02	ja	ja	ja	2	IGHV3-13_01	IGHJ4_02
CLL	4	MLL_31643	PB	IGHV3-11_01	IGHJ4_02	ja	ja	ja	1		
CLL	5	MLL_159298	PB	IGHV3-30_01/16	IGHJ4_02	ja	ja	ja	1		
CLL	6	MLL_255039	KM	IGHV3-23_04	IGHJ4_02	ja	ja	ja	1		
CLL	7	MLL_32280	PB	IGHV3-30-3_01	IGHJ4_02	ja	ja	ja	2	IGHV3-13_04	IGHJ6_02
CLL	8	MLL_183581	PB	IGHV3-30_18	IGHJ5_02	ja	ja	ja	1		
CLL	9	MLL_00735	PB	IGHV3-48_03	IGHJ6_02	ja	ja	ja	2	IGHV4-59_01	IGHJ6_03
CLL	10	MLL_255038	PB	IGHV3-21_02	IGHJ6_02	ja	ja	ja	1		
CLL	11	MLL_255042	PB	IGHV4-59_08	IGHJ3_02	ja	ja	ja	1		
CLL	12	MLL_184116	PB	IGHV4-39_02	IGHJ4_02	ja	ja	ja	1		
CLL	13	MLL_47177	PB	IGHV4-31_03	IGHJ6_04	ja	ja	ja	2	IGHV1-69_13	IGHJ6_02
CLL/MM	1	MLL_255044	PB	IGHV3-9_01	IGHJ4_02	ja	ja	ja	2	IGHV3-30-3_01	IGHJ4_02
MM	1	MLL_62421	CD138+-MACS	IGHV1-69_13	IGHJ6_02	ja	ja	ja	1		
MM	2	MLL_62418	CD138+-MACS	IGHV2-5_08	IGHJ5_02	nein	ja	nein	2	IGHV3-30_18	IGHJ4_02
MM	3	MLL_255041	CD138+-MACS	IGHV3-15_07	IGHJ1_01	ja	ja	nein	1		

MM	4	MLL_246859	CD138+- MACS	IGHV3-33_01	IGHJ3_02	ja	ja	ja	2	IGHV3-33_01	IGHJ3_02
MM	5	MLL_246855	CD138+- MACS	IGHV3-9_01	IGHJ4_02	nein	ja	ja	1		
MM	6	MLL_226239	CD138+- MACS	IGHV3-30_18	IGHJ4_02	nein	ja	ja	1		
MM	6	MLL_226239	KM	IGHV3-30_18	IGHJ4_02	nein	ja	nein	1		
MM	7	MLL_246857	CD138+- MACS	IGHV3-30_18	IGHJ5_02	nein	ja	nein	1		
MM	8	MLL_249857	CD138+- MACS	IGHV3-30_03	IGHJ5_02	nein	ja	nein	1		
MM	9	MLL_249862	CD138+- MACS	IGHV3-53_03	IGHJ5_02	nein	ja	nein	1		
MM	10	MLL_216261	CD138+- MACS	IGHV3-33_06	IGHJ5_02	nein	ja	nein	1		
MM	10	MLL_216261	KM	IGHV3-33_06	IGHJ5_02	nein	ja	nein	1		
MM	11	MLL_62420	CD138+- MACS	IGHV3-9_01	IGHJ5_02	ja	nein	nein	1		
MM	12	MLL_62422	CD138+- MACS	IGHV3-30-3_01	IGHJ5_02	ja	ja	nein	1		
MM	13	MLL_246854	KM	IGHV3-7_01	IGHJ6_02	ja	nein	ja	1		
MM	14	MLL_156697	CD138+- MACS	IGHV4-59_07	IGHJ3_01	ja	ja	ja	1		
MM	15	MLL_246858	CD138+- MACS	IGHV4-61_08	IGHJ5_02	nein	ja	ja	1		
MM	16	MLL_246853	CD138+- MACS	IGHV4-31_03	IGHJ6_04	ja	ja	ja	1		
MM	17	MLL_232826	CD138+- MACS	IGHV4-4_01	IGHJ6_02	nein	nein	ja	1		
MM	18	MLL_62419	CD138+- MACS	IGHV4-39_07	IGHJ6_03	nein	ja	ja	1		
MM	19	MLL_256916	CD138+- MACS	IGHV4/OR15- 8_03	IGHJ4_02	nein	nein	nein	0		
MM	20	MLL_246856	CD138+- MACS	N.A.	N.A.	nein	nein	nein	0		
MM	21	MLL_249858	CD138+- MACS	N.A.	N.A.	nein	nein	nein	0		
MM	21	MLL_224722	CD138+- MACS	N.A.	N.A.	nein	nein	nein	0		

Tabelle 49: Vergleich der Ergebnisse der Ermittlung der Indexklonalität mit WGS

Study ID	aberrante Plasmazellen MFC [%]	Material	NGS							WGS				Übereinstimmung Sequenz NGS und WGS mit MAFFT		
			Assay	Reads	%top merged seq	%3rd merged seq	Klonalitäts-nachweis	V Gen	J Gen	MAFFT	V Gen	D Gen	J Gen		clone fraction	
MLL_62418	35	CD138+ MACS	FR1	57488	1,87	1,6	nein				IGHV2-5*00(155,6)	IGHD3-900(44),	IGHJ5*00(93,7)	0,97	100%	
			FR2	31398	50,99	0,15	ja	IGHV2-5_08	IGHJ5_02			IGHD2-2100(40)				
			FR3	87869	3,26	1,85	nein									
MLL_62419	62	CD138+ MACS	FR1	249555	0,33	0,28	nein				IGHV4-3400(121,2),	IGHD2-2*00(93)	IGHJ6*00(135,1)	0,68	100%	
			FR2	215375	14,62	0,15	ja	IGHV4-39_07	IGHJ6_03	100%	IGHV4-400(120,2),					
			FR3	289775	41,35	0,15	ja	IGHV4/OR15-8_03	IGHJ6_03	100%	IGHV4-3900(117,7),					
MLL_62420	n.d.	CD138+ MACS	FR1	267315	71,35	0,07	ja	IGHV3-9_01	IGHJ5_02		IGHV3-9*00(128,5)	IGHD4-2300(39),	IGHJ5*00(109,1)	0,47	100%	
			FR2	124934	1,87	0,72	nein					IGHD3-900(34)				
			FR3	70740	2,48	1,79	nein									
MLL_62421	68	CD138+ MACS	FR1	338637	84,13	nur 2 vorhanden: 0,09	ja	IGHV1-69_13	IGHJ6_02	100%	IGHV1-69D00(168,8),	IGHD2-2100(35),	IGHJ6*00(94,1)	0,94	100%	
			FR2	317744	88,29	0,15	ja	IGHV1-69_13	IGHJ6_02	100%	IGHV1-6900(167,8)	IGHD2-1500(34)				
			FR3	327059	91,33	0,11	ja	IGHV1-69_13	IGHJ6_02	100%						
			FR3_2	327059	5,93	0,11	ja	IGHV4/OR15-8_03	IGHJ6_02	100%						
MLL_62422	n.d.	CD138+ MACS	FR1	99347	78,86	0,55	ja	IGHV3-30-3_01	IGHJ5_02		IGHV3-30*00(128,7)	IGHD1-26*00(49)	IGHJ5*00(121,5)	0,93	100%	
			FR2	336947	90,32	nur 2 vorhanden: 0,06	ja	IGHV3-30-3_01	IGHJ5_02							
			FR3	18759	28,45	6,76	nein									

Tabelle 50: Zusammenfassung der Ergebnisse der MRD-Untersuchung mit NGS für Proben von 27 Patient*innen

Study ID	DNA-Input [ng]	Diagnose	Assay	Reads total	MRD Status NGS	erste klonale Sequenz				zweite klonale Sequenz			
						Klonale Frequenz	Confidence -4	Confidence -5	Confidence -6	Klonale Frequenz	Confidence -4	Confidence -5	Confidence -6
MLL_246792	3000	CLL	FR1	1964500	negativ	0,00E+00	100,00%	82,58%	9,62%				
MLL_249942	3000	CLL	FR1	1915472	positiv	2,76E-01							
MLL_256506	3000	CLL	FR1	1381923	positiv	7,76E-03							
MLL_256507	3000	CLL	FR1	1802135	positiv	7,68E-03				5,69E-03			
MLL_256508	2808	CLL	FR1	1977768	positiv	3,53E-03							
MLL_256509	3000	CLL	FR1	1739746	positiv	4,83E-02							
MLL_256510	3000	CLL	FR1	1277576	positiv	0,00E+00	100,00%	60,38%	3,21%	4,80E-03			
MLL_256511	3000	CLL	FR1	1388970	positiv	1,99E-04							
MLL_256512	3000	CLL	FR1	419900	positiv	5,17E-04							
MLL_258207	3000	CLL	FR1	547205	positiv	1,28E-03							
MLL_258208	3000	CLL	FR1	2694923	positiv	5,24E-02				0,00E+00	100,00%	91,85%	17,77%
MLL_258209	3000	CLL	FR1	2599688	positiv	6,73E-02							
MLL_258210	1639	CLL	FR2	1353388	positiv	1,27E-03				9,11E-04			
MLL_256914	2323	MM	FR1	1421565	negativ	0,00E+00	100,00%	67,65%	6,33%				
MLL_256915	3000	MM	FR2	2108937	negativ	0,00E+00	100,00%	85,16%	11,22%				
MLL_230390	1704	MM	FR1	2160347	positiv	2,37E-02							
MLL_243183	1156	MM	FR3	2394597	positiv	5,30E-05							
MLL_244304	1899	MM	FR1	2275091	positiv	1,22E-06							
MLL_245977	3000	MM	FR2	1539522	positiv	7,53E-06							
MLL_255053	3000	MM	FR2	1699291	positiv	2,26E-05							
MLL_256908	1331	MM	FR1	2142933	positiv	2,47E-04							
MLL_256909	1259	MM	FR1	1711287	positiv	6,41E-06							
MLL_256910	1281	MM	FR1	2098346	positiv	7,61E-04							
MLL_256913	1190	MM	FR2	1520899	positiv	1,77E-05							
MLL_258211	3000	ALL	FR1	2163274	negativ	0,00E+00	100,00%	85,96%	11,87%				
MLL_258212	3000	ALL	FR1	1444272	negativ	0,00E+00	100,00%	67,62%	4,80%				
MLL_258774	3000	ALL	FR1	821169	negativ	0,00E+00	100,00%	32,28%	0,82%				

Tabelle 51: Proben für die die klonale Sequenz in der MRD-Untersuchung mit NGS nicht detektiert wurde

Study ID	DNA-Input [ng]	Diagnose	Assay	Reads total	Confidence -4	Confidence -5	Confidence -6
MLL_246792	3000	CLL	FR1	1964500	100,00%	82,58%	9,62%
MLL_256510	3000	CLL	FR1	1277576	100,00%	60,38%	3,21%
MLL_258208_2	3000	CLL	FR1	2694923	100,00%	91,85%	17,77%
MLL_256914	2323	MM	FR1	1421565	100,00%	67,65%	6,33%
MLL_256915	3000	MM	FR2	2108937	100,00%	85,16%	11,22%
MLL_258211	3000	ALL	FR1	2163274	100,00%	85,96%	11,87%
MLL_258212	3000	ALL	FR1	1444272	100,00%	67,62%	4,80%
MLL_258774	3000	ALL	FR1	821169	100,00%	32,28%	0,82%

_2 zeigt an, dass es sich hierbei um die bei der Indexermittlung zweithäufigste klonale Sequenz handelt

Tabelle 52: Ergebnisse der MRD-Untersuchung der Proben von CLL- und MM-Patient*innen (n=24)

Study ID	aberrante Zellen MFC [%]	regul-gerechte Zellen MFC [%]	DNA-Input [ng]	Diagnose	Assay	Reads Triplikate	MRD Status NGS	erste klonale Sequenz						zweite klonale Sequenz						
								Klonalität	Clonal Freq.	Cell Equivalents	Confid - 4	Confid - 5	Confid - 6	Klonalität	Clonal Freq.	Cell Equivalents	Confid - 4	Confid - 5	Confid - 6	
MLL_246792	0,08		3000	CLL	FR1	1964500	negativ	IGHV4-39_02, IGHJ4_02	0,00E+00	0	100,00%	82,58%	9,62%							
MLL_249942	5		3000	CLL	FR1	1915472	positiv	IGHV3-30_01/16, IGHJ4_02	2,76E-01	127071,77										
MLL_256506	0,11		3000	CLL	FR1	1381923	positiv	IGHV3-23_04, IGHJ4_02	7,76E-03	3577,16										
MLL_256507	0,1		3000	CLL	FR1	1802135	positiv	IGHV3-30-3_01, IGHJ4_02	7,68E-03	3544,59				IGHV3-13_01, IGHJ4_02	5,69E-03	2625,31				
MLL_256508	0,02		2808	CLL	FR1	1977768	positiv	IGHV3-30_18, IGHJ5_02	3,53E-03	1524,4										
MLL_256509	1		3000	CLL	FR1	1739746	positiv	IGHV3-11_01, IGHJ4_02	4,83E-02	22290,21										
MLL_256510	0,2		3000	CLL	FR1	1277576	positiv	IGHV3-48_03, IGHJ6_02	0,00E+00	0	100,00%	60,38%	3,21%	IGHV4-59_01, IGHJ6_03	4,80E-03	2210,86				
MLL_256511	0,008		3000	CLL	FR1	1388970	positiv	IGHV4-59_08, IGHJ3_02	1,99E-04	91,44										
MLL_256512	0,1		3000	CLL	FR1	419900	positiv	IGHV3-49_05, IGHJ2_01	5,17E-04	238,32										
MLL_258207	0,2		3000	CLL	FR1	547205	positiv	IGHV3-23_04, IGHJ4_02	1,28E-03	587,8										
MLL_258208	1		3000	CLL	FR1	2694923	positiv	IGHV3-30-3_01, IGHJ4_02	5,24E-02	24158,16				IGHV3-13_04, IGHJ6_02	0	0	100,00%	91,85%	17,77%	
MLL_258209	2		3000	CLL	FR1	2599688	positiv	IGHV3-21_02, IGHJ6_02	6,73E-02	31051,56										
MLL_258210	0,01		1639	CLL	FR2	1353388	positiv	IGHV3-d_01, IGHJ4_02	1,27E-03	319,03				IGHV1-69_13, IGHJ6_02	9,11E-04	229,44				
MLL_256914	0	0,002	2323	MM	FR1	1421565	negativ	IGHV3-15_07, IGHJ1_01	0,00E+00	0	100,00%	67,65%	6,33%							
MLL_256915	0	0,3	3000	MM	FR2	2108937	negativ	IGHV3-33_06, IGHJ5_02	0,00E+00	0	100,00%	85,16%	11,22%							
MLL_230390	3		1704	MM	FR1	2160347	positiv	IGHV4-59_07, IGHJ3_01	2,37E-02	6210,15										
MLL_243183	0,4		1156	MM	FR3	2394597	positiv	IGHV4-4_01, IGHJ6_02	5,30E-05	9,42										
MLL_244304	0	0,1	1899	MM	FR1	2275091	positiv	IGHV3-33_01, IGHJ3_02	1,22E-06	0,36				IGHV3-33_01, IGHJ3_02*	0	0	100,00%	86,85%	17,44%	

MLL_2459 77	1		300 0	MM	FR2	153952 2	positiv	IGHV3-30_03, IGHJ5_02	7,53E- 06	3,48								
MLL_2550 53	0		300 0	MM	FR2	169929 1	positiv	IGHV3-30_18, IGHJ4_02	2,26E- 05	10,42								
MLL_2569 08	0,2	0,1	133 1	MM	FR1	214293 3	positiv	IGHV4-31_03, IGHJ6_04	2,47E- 04	50,57								
MLL_2569 09	0,3		125 9	MM	FR1	171128 7	positiv	IGHV3-7_01, IGHJ6_02	6,41E- 06	1,25								
MLL_2569 10	0,03		128 1	MM	FR1	209834 6	positiv	IGHV3-9_01, IGHJ4_02	7,61E- 04	149,8								
MLL_2569 13	0	0,2	119 0	MM	FR2	152089 9	positiv	IGHV3-53_03, IGHJ5_02	1,77E- 05	3,24								

*10 bp Unterschied zu 1

Tabelle 53: Für Bland-Altman-Analyse und Passing-Bablok-Regression verwendete MRD-Daten der in beiden Methoden MRD-positiven Proben von CLL- und MM-Patient*innen

Diagnose	Study ID	klonale Frequenz NGS [%] log ₁₀	aberrante Zellen MFC [%] log ₁₀
CLL	MLL_249942	1,44E+00	6,99E-01
CLL	MLL_256506	-1,10E-01	-9,59E-01
CLL	MLL_256507	-1,15E-01	-1,00E+00
CLL	MLL_256508	-4,52E-01	-1,70E+00
CLL	MLL_256509	6,84E-01	0,00E+00
CLL	MLL_256510_2	-3,19E-01	-6,99E-01
CLL	MLL_256511	-1,70E+00	-2,10E+00
CLL	MLL_256512	-1,29E+00	-1,00E+00
CLL	MLL_258207	-8,93E-01	-6,99E-01
CLL	MLL_258208	7,19E-01	0,00E+00
CLL	MLL_258209	8,28E-01	3,01E-01
CLL	MLL_258210	-8,96E-01	-2,00E+00
MM	MLL_230390	3,75E-01	4,77E-01
MM	MLL_243183	-1,55E+00	-3,98E-01
MM	MLL_245977	-3,10E+00	0,00E+00
MM	MLL_256908	-1,61E+00	-1,00E+00
MM	MLL_256909	-3,22E+00	-5,23E-01
MM	MLL_256910	-1,12E+00	-1,52E+00

Bei der Probe MLL_256510 wurden die Daten der in der Indexprobe am zweithäufigsten gefundenen Sequenz verwendet, da die häufigste Sequenz in der MRD-Untersuchung nicht nachweisbar war. Daher wurde diese Probe mit _2 versehen.

Tabelle 54: Anzahl der Total Reads der Verdünnungsreihe 1 mit dem FR1-Assay nach KAPA-Library-Quantifizierung

Run	Probe/ Verdünnungsstufe	total Reads (KAPA-Library-Quantifizierung)
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_1	386204
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_1	525151
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_1	450880
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_2	342564
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_2	384774
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_2	321332
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_3	374949
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_3	375921
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_3	343479
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_4	301917
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_4	524345
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_4	334319
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_5	403112
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_5	584492
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_5	293942
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_6	569150
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_6	342594
Verdünnungsreihe 1	MLL_62421_6	335522

Tabelle 55: Anzahl der Total Reads der Verdünnungsreihe 2 mit dem FR2-Assay nach TapeStation-Quantifizierung

Run	Probe/ Verdünnungsstufe	total Reads (TapeStation-Quantifizierung)
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_1	780805
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_1	929760
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_1	750696
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_2	794613
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_2	769744
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_2	806426
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_3	766885
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_3	794755
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_3	719266
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_4	729693
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_4	661456
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_4	806954
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_5	689007
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_5	754158
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_5	832367
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_6	820557
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_6	723408
Verdünnungsreihe 2	MLL_246857_6	790969