

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
– Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. R. Haas–

**Prognostische Bedeutung der minimalen Resterkrankung  
bei Patienten mit Multiplen Myelom im Knochenmark und peripheren Blut  
nach Hochdosistherapie und autologer Blutstammzelltransplantation**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Nina Sehnke

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Roland Fenk  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Das Multiple Myelom.....	5
1.2 Die minimale Resterkrankung (MRD).....	7
1.3 CDR3-IgH als tumorspezifisches Antigen zur Messung der MRD.....	8
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	10
<b>2 Materialien und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1 Materialien.....	11
2.1.1 Geräte und Software.....	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	11
2.1.3 Chemikalien und Enzyme.....	12
2.1.4 Kits.....	13
2.1.5 Synthetische Oligonukleotide.....	13
2.2 Methoden.....	14
2.2.1 Identifizierung der IgH-Sequenz.....	14
2.2.1.1 Patienten und Probegewinnung.....	14
2.2.1.2 RNA-Isolierung.....	15
2.2.1.3 cDNA-Synthese und konventionelle PCR.....	16
2.2.1.4 Gelextraktion.....	17
2.2.1.5 Klonierung der cDNA-Fragmente in E.coli Bakterien.....	17
2.2.2 Etablierung einer patientenspezifischen, quantitativen real-time IgH-PCR.....	19
2.2.3 Quantifizierung der MRD in mononuklearen Zellpräparationen.....	20
2.2.4 Statistische Auswertungen.....	21
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>24</b>
3.1 Patienten, Ermittlung der IgH-Sequenz und Etablierung einer RQ-IgH-PCR.....	24
3.2 Vergleichende Untersuchung zwischen Proben aus Knochenmark und peripherem Blut .....	25
3.3 Molekulares Monitoring der minimalen Resterkrankung im Knochenmark.....	26
3.3.1 Definition eines Grenzwertes im Knochenmark mit prognostischer Bedeutung.....	26
3.3.2 Korrelation der minimalen Resterkrankung im Knochenmark mit Remissionsraten.....	29
3.3.3 Minimale Resterkrankung im Knochenmark vor Hochdosistherapie ist ein Prognosefaktor für das ereignisfreie Überleben und Gesamtüberleben.....	30
3.3.4 Minimale Resterkrankung im Knochenmark nach Hochdosistherapie ist ein Prognosefaktor für das ereignisfreie Überleben, aber nicht für das Gesamtüberleben.....	30
3.4 Molekulares Monitoring der minimalen Resterkrankung im peripheren Blut .....	33
3.4.1 Minimale Resterkrankung im peripheren Blut zu bestimmten Zeitpunkten ist kein Prognosefaktor.....	33
3.4.2 Sequentielles Monitoring der minimalen Resterkrankung im peripheren Blut.....	37

<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>42</b>
4.1	Stellenwert des Grenzwertes im Knochenmark vor Hochdosistherapie.....	42
4.2	Molekulares Monitoring der MRD im peripheren Blut.....	43
4.3	Vergleich der minimalen Resterkrankung - Messung zu konventionellen Remissions- parametern.....	46
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Zusammengefasste Publikationen</b> .....	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>55</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>56</b>
10.1	Abkürzungen .....	56
10.2	Ermittelte patientenspezifische Sequenzen .....	57
10.3	Lebenslauf.....	63
10.4	Danksagung.....	64
10.5	Erklärung.....	65

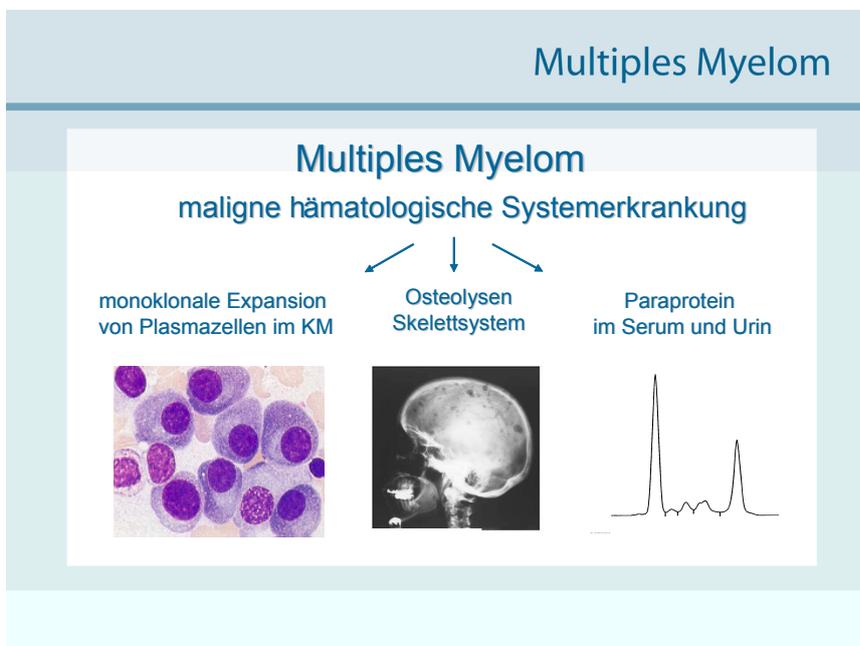
# 1 Einleitung

## 1.1 Das Multiple Myelom

Mit einer Inzidenz von 3 - 4 Neuerkrankungen/100.000/Jahr gehört das Multiple Myelom (MM) zu den häufigen hämatologischen Neoplasien.

Das MM ist eine maligne B-Zellerkrankung, die durch eine monoklonale Vermehrung von Plasmazellen im Knochenmark (KM) charakterisiert ist. Die Knochenmarksinfiltration hat eine Verdrängung der Hämatopoese zur Folge. Diese führt zu Anämie, Leukozytopenie und Thrombozytopenie, die wiederum zu Belastungsschwäche, häufigen Infektionen und Blutungen führen. Zudem kommt es zu Osteolysen vor allem in der Wirbelsäule, Rippen, Becken und Schädel und damit verbunden zu pathologischen Frakturen (Abbildung 1-1).

Darüber hinaus ist die Erkrankung assoziiert mit monoklonalen Immunglobulinen im Serum und/oder einer monoklonalen Leichtkettensekretion. Bei etwa 15 Prozent der Patienten mit MM finden sich Ablagerungen von Leichtketten des monoklonalen Proteins in den Organen. Besonders in Herz, Niere und Nervenzellen lagern sich die monoklonalen Immunglobuline ab, so dass es zu Herz- und Niereninsuffizienz sowie Polyneuropathien kommt.



**Abbildung 1-1:**

Das Multiple Myelom ist eine maligne hämatologische Systemerkrankung. Die drei Hauptmerkmale der Erkrankung sind eine monoklonale Expansion von Plasmazellen im KM, Osteolysen im Skelettsystem sowie die Sekretion von Paraprotein in Serum und Urin.

Zur klinischen Stadieneinteilung des MM wird das System nach Salmon und Durie aus dem Jahre 1975 verwendet. Basierend auf den Werten von Hämoglobin und Kalzium, der Höhe des jeweiligen Paraproteins und dem Ausmaß der Skelettbeteiligung wird der Gesamtbefall des Körpers in gering (Tumorstadium I), mittel (Tumorstadium II) und hoch (Tumorstadium III) eingeteilt. Eine Zusatzeinteilung wird anhand der Nierenfunktion vorgenommen (A: Serumkreatinin < 2mg/dl, B: Serumkreatinin >2 mg/dl). Für die Stadieneinteilung hat sich neben der Stadieneinteilung nach Salmon und Durie das International Staging System (ISS) durchgesetzt, da es mit einfachen Parametern wie  $\beta_2$  - Mikroglobulin und Albumin im Serum eine prognostische Einteilung in 3 Stadien erlaubt. {Greipp 2005}

Eine Behandlung wird bei symptomatischer Erkrankung begonnen. Eine symptomatische Erkrankung wird nach den CRAB - Kriterien (Hyper**C**alzämie, **R**enale Insuffizienz, **A**nämie, **B**one disease) eingeteilt. Patienten, die keine CRAB-Kriterien aufweisen sind nicht behandlungsbedürftig und müssen im weiteren Verlauf sorgfältig beobachtet werden.

Die Möglichkeit der Heilung des MM ist bis heute nicht gegeben. Die im Jahre 1969 von Alexanian et al. publizierte konventionelle Chemotherapie mit Melphalan und Prednisolon stellte jahrzehntelang die Standardtherapie des MM dar. {Alexanian 1969} Dabei wurde eine komplette Remission nur selten erreicht und das mediane Überleben war nicht länger als 3 Jahre. {Barlogie 2004}

Eine Verbesserung der Prognose der Patienten mit MM wurde durch die Einführung der Hochdosistherapie (HDT) mit anschließender autologer Blutstammzelltransplantation (autoPBSCT) erreicht. Mehrere Studien {Attal 1996, Child 2003} zeigten, dass eine HDT mit autoPBSCT bei Patienten unter 65 Jahren zu einem verlängerten ereignisfreien Überleben sowie medianen Gesamtüberleben führten. Aus diesem Grund ist die HDT mit autoPBSCT heutzutage die Standardtherapie für Patienten unter 65 Jahren. Des Weiteren konnten die „neuen Substanzen“ wie Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib mit Erfolg bei MM eingesetzt werden.

Thalidomid wurde unter dem Markennamen „Contergan“ bekannt und wurde aufgrund von schweren Schädigungen an ungeborenen Kindern in den sechziger Jahren vom Markt genommen. 1999 zeigten Singhal et. al. {Singhal 1999} eine durch Einsatz von Thalidomid Remissionsraten von 30 % der Patienten mit einem rezidierten oder refraktären MM.

Lenalidomid ist ein synthetisches Analogon zum Thalidomid und wird als Wirkstoff für Patienten mit refraktären oder rezidivierendem MM eingesetzt. In zwei randomisierten Studien zeigte sich die Überlegenheit aus der Kombination von Lenalidomid und Dexamethason gegenüber einer Monotherapie mit Dexamethason, indem das ereignisfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben durch den Einsatz von Lenalidomid verlängert wurde {Dimopoulos 2007, Weber 2007}.

Bortezomib gehört zu der neuen Substanzgruppe der Proteasomen-Inhibitoren. Auch hier zeigten Studien bei Patienten mit refraktärem oder rezidivierendem MM eine Verlängerung des ereignisfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens {Richardson 2007}.

Die 10-Jahresüberlebensrate liegt mit Hilfe der HDT und neuen Substanzen bei etwa 50 %. Auf experimenteller Ebene wurde zudem die allogene Transplantation durchgeführt und verfolgt durch den Graft-versus-myeloma-Effekt ein potentiell kuratives Therapiekonzept. Unter dem Graft-versus-myeloma-Effekt versteht man die immunologische Reaktion, bei der Tumorzellen durch das Immunsystem des Spenders zerstört werden. Die transplantationsbezogene Mortalität von 10-30% im Zusammenhang mit Graft-versus-Host-Disease und opportunistischen Infektionen limitiert jedoch den Nutzen dieser Therapie. {Bensinger 2006}

Trotz intensiver Bemühungen bei der Therapie des MM sieht der typische Verlauf eines Patienten folgendermaßen aus: Der Patient erreicht nach einer Primärtherapie eine Remission. Nach unterschiedlicher Zeit entwickelt er ein Rezidiv und wird erneut behandelt. Nach einiger Zeit entwickelt er nach erneuter Remission wieder ein Rezidiv. Die Dauer der Remission nimmt im Verlauf der Erkrankung ab und die meisten Patienten versterben letztendlich an den Folgen des MM. Der Ursprung eines solchen Rezidivs ist eine kleine Anzahl von persistierenden Tumorzellen, benannt als minimale Resterkrankung (MRD), die der zytotoxischen Wirkung der vorangegangenen Therapieoption entgangen sind. {Fenk 2004}

## **1.2 Die minimale Resterkrankung**

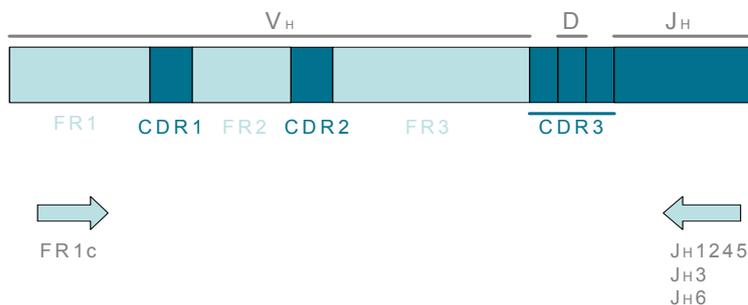
Durch eine intensivierete Chemotherapie in Verbindung mit autologer und allogener Blutstammzelltransplantation bei der Behandlung von Patienten mit malignen B-Zellerkrankungen konnten erhebliche Fortschritte erzielt werden. Im Zuge dieser verbesserten therapeutischen Konzepte ist eine im gleichen Maße verbesserte Diagnostik zur Bestimmung des Behandlungserfolges unerlässlich. Der Einsatz hochempfindlicher molekularer Techniken ermöglicht das Ausmaß und den zeitlichen

Verlauf der MRD als Reservoir für die Entstehung von Rezidiven zu bestimmen. Bei der akuten lymphatischen Leukämie {Campana 2009} und der chronisch myeloischen Leukämie {Neumann 2003} hat die Bestimmung der MRD bereits einen festen Stellenwert innerhalb des diagnostischen Spektrums und wird im Rahmen der klinischen Routine für Therapieentscheidungen herangezogen. Im Rahmen von Therapiestudien muss daher geprüft werden, ob durch den Nachweis einer MRD auch bei anderen malignen Erkrankungen neue Kriterien für die Beurteilung des Therapieerfolgs und für die Abschätzung der Prognose definiert werden können.

### **1.3 CDR3-IgH als tumorspezifisches Antigen zur Messung der minimalen Resterkrankung beim Multiplen Myelom**

Der maligne Zellklon beim MM lässt sich durch seinen spezifischen Idiotyp identifizieren. Unter dem Idiotyp versteht man einen durch die B-Zelle gebildeten individuellen Antikörper (AK) mit einer für diese B-Zelle einzigartigen Antigenbindungsstelle. Diesen AK präsentiert bereits die frühe B-Zelle auf ihrer Oberfläche und dieser wird am Ende der B-Zellentwicklung von der enddifferenzierten Plasmazelle sezerniert. Bei der malignen Transformation einer B-Zelle stellt der Idiotyp daher einen individuellen Fingerabdruck dar, der nur auf dem malignen Zellklon eines bestimmten Patienten zu finden ist. Somit eignet sich der Idiotyp als hoch spezifischer Tumormarker für die Bestimmung der MRD.

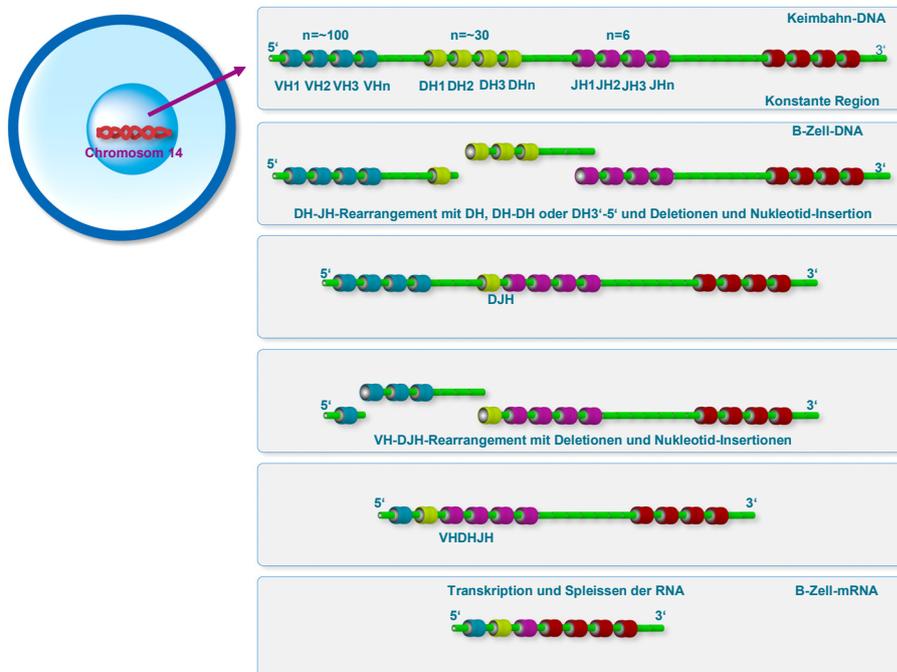
Der Idiotyp besteht wie alle AK aus zwei identischen schweren und leichten Ketten, die durch kovalente Disulfidbrücken zu einer Ypsilon-förmigen Struktur miteinander verbunden sind. Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen (V -) und einer konstanten (C -) Region. Dabei besteht die Sequenz der V-Domäne aus vier relativ konstanten „Frameworkregions“ (FR1 - 4) und drei hochvariablen Gerüstsequenzen, den „complementary determining regions“ (CDR). Die FR1-4 Regionen beinhalten nur wenige, meist stumme Mutationen, hingegen beinhalten die CDR1-3 Regionen viele, produktive Mutationen, wobei die höchste Diversität bei der CDR3 zu beobachten ist (Abbildung 1-2). Der Variabilität und Spezifität des Idiotyps wird durch das Rearrangement des Immunglobulin-Schwerkettenlokus (IgH) sowie die somatische Hypermutation erreicht. Die Antigenspezifität des Rezeptors wird durch die Verknüpfung bestimmter Gensegmente bestimmt.



**Abbildung 1-2:**

Schematische Darstellung der variablen Region der IgH-cDNA-Sequenz, die durch somatische Rekombination der variablen Gensegmente  $V_H$ ,  $D$  und  $J_H$  (*VDJ-Rearrangement*) entsteht. Gezeigt sind auch die Bindungsstellen der Konsens-Primer FR1c (Vorwärts-Primer) und JH1245, JH3 und JH6 (Rückwärts-Primer) für die Amplifikation der CDR3-Region.

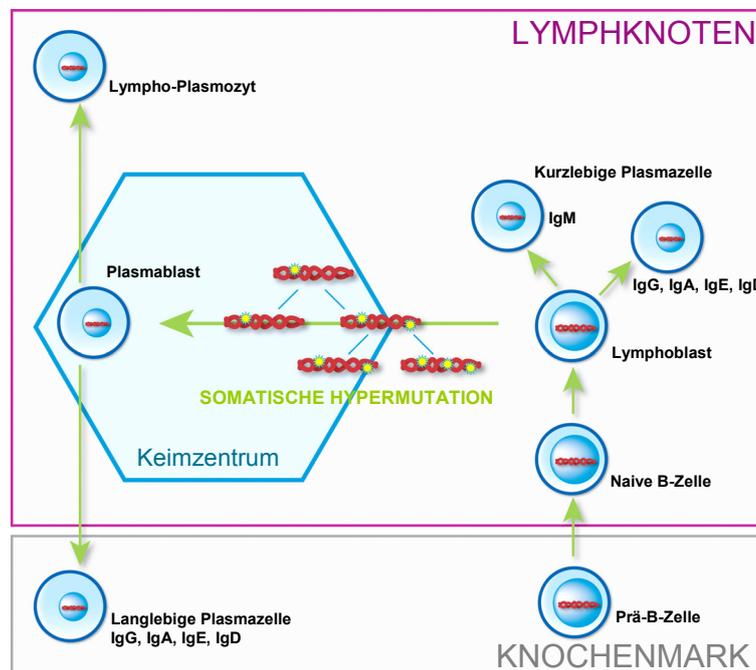
Dabei werden diese Segmente, die den antigenbindenden Teil des B-Zell-Rezeptors bilden, im Stadium der Pro- und Prä-B-Zellen nach erstmaligem Antigenkontakt umgeordnet. Es wird je eins von 65  $V_H$ -, 27  $D_H$ - und 6  $J_H$ -Gensegmenten für die schwere Kette sowie je eins von 40  $V_k$ - und 5  $J_k$ -Gensegmenten für die leichte Kette miteinander verbunden (Abbildung 1-3). Nach der Transkription wird das Exon für die V-Region durch das mRNA-Spleißen mit einem Exon für die C-Region verknüpft.



**Abbildung 1-3:** Mechanismus des V(ariabel) D(iversity) J(oining)-Rearrangement in frühen B-Zellen zur Herstellung der Antigenvariabilität

Die somatische Hypermutation erhöht zusätzlich die Variabilität des Idiotyps. Darunter versteht man das Einfügen von Punktmutationen in die Antikörpergene einer reifen B-Zelle nach erneutem Antigenkontakt im Keimzentrumsfollikel

(Abbildung 1-4). Somit entstehen zufällige Veränderungen in der DNA, die zu einer Affinitätserhöhung der durch die B-Lymphozyten produzierten Antikörper führen.



**Abbildung 1-4:** Schematische Darstellung der somatischen Hypermutation, die genauso wie das VDJ-Rearrangement zu einer Erhöhung der Antigenvielfalt beiträgt.

Der Nachweis des Idiotyps ist über eine PCR (Polymerase-Kettenreaktion) möglich, deren Primer komplementär zu der IgH-Sequenz gewählt werden. Dabei entsteht die grösste Spezifität durch komplementäre Primer zur CDR3.

#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, beim multiplen Myelom im Rahmen der Düsseldorfer Studie 2001 zur primären Therapie mit Hochdosistherapie und autologer Blutstammzelltherapie eine molekulare Begleitdiagnostik zur Erfassung der minimalen Resterkrankung im Knochenmark und im peripheren Blut durchzuführen. Dazu wurde mit Hilfe der LightCycler-Technologie für Patienten mit multiplen Myelom eine quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion des patientenspezifischen Schwerkettenlokus des IgH etabliert und Verläufe der minimalen Resterkrankung der Patienten im Knochenmark und peripheren Blut gemessen.

Durch Korrelation der gemessenen minimalen Resterkrankung mit dem klinischen Verlauf sollte die Frage nach der prognostischen Bedeutung der minimalen Resterkrankung in diesem Patientenkollektiv geklärt werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Software

Cycler Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Geldokumentationssystem Alphamager™ mit Software	Biozym (Oldenburg)
Gelelektrophorese-Kammer	OWL Separations Systems (Portsmouth, USA)
LightCycler-System mit LightCycler Software 3.5	Roche (Mannheim)
LightCycler Centrifuge Adapters	Roche (Mannheim)
Nanodrop	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Personal Cycler	Biometra (Göttingen)
Pipettierhilfe	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschmann (Eberstadt)
Spektrometer BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Thermorührer MR3302	Heidolph (Schwabach)
Thermoschüttler Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Osterode)
Wasserbad	Köttermann (Hänigsen)

#### Zusätzliche Software-Programme wurden verwendet:

ALFwin Sequence Analyser v2.10.06 Software	Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Excel Software (2003)	Microsoft
IgBlast Software	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/</a>
SPSS 18.0	IBM Company (München)
Word Software (2003)	Microsoft
PowerPoint Software (2003)	Microsoft

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Reaktionsröhrchen	Eppendorf (Hamburg)
2 ml Reaktionsröhrchen	Eppendorf (Hamburg)
50 ml Röhrchen	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
Bakterien-Kulturschalen	Greiner Cellstar (Frickenhausen)
Küvetten 1 cm	Eppendorf (Hamburg)
LightCycler-Kapillaren	Roche (Mannheim)
PCR-Röhrchen 0,2 ml und 0,5ml	Biozym (Oldenburg)

### 2.1.3 Chemikalien und Enzyme

β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Agarose (Agar-Agar technisch)	Wallak (Turku, Finnland)
Ampicillin	Sigma (Steinheim)
AmpliAq-Polymerase und PCR-Puffer	Applied Biosystems (Darmstadt)
Blue white select Screening Solution	Sigma (Steinheim)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
DNA-Ladder 100bp	Promega (Madison, WI, USA)
dNTPs	Amersham Biosciences (Braunschweig)
dNTPs	Applied Biosystems (Darmstadt)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid-Lösung, 1%ig	Sigma (Stienheim)
Gelelektrophoresepuffer Blue/Orange Loading dye	Promega (Madison, WI, USA)
Glycerin	Sigma (Mannheim)
Hefeextrakt	BD (Heidelberg)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)	Braun (Melsungen)
Lymphoprep	Axis-Shield (Oslo, Norwegen)
MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems (Darmstadt)
MS2-Phagen-RNA	Roche (Mannheim)
MuLV Reverse Transkriptase und PCR-Puffer II	Applied Biosystems (Darmstadt)
NaCl	Merck (Darmstadt)
Oligo (dT)16-Primer	Applied Biosystems (Darmstadt)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG (Berlin)
Restriktionsenzym EcoRI und Reaktionspuffer	BioLabs (New England, USA)
Restriktionsenzym PstI und Reaktionspuffer	BioLabs (New England, USA)
Reverse Transkriptase M-MLV und Reaktionspuffer	Invitrogen (Karlsruhe)
RLT-Puffer	Qiagen (Hilden)
RNase-freies Wasser	Qiagen (Hilden)
TRIS	Sigma (Mannheim)
Trypton	Beckton Dickinson (Le Pont de Claix, Frankreich)

### 2.1.4 Kits

GeneAmp RNA PCR Core Kit	Applied Biosystems, Branchburg (USA)
LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit	Roche (Mannheim)
QIAmp DNA Blood Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAmp Miniprep Kit zur Isolierung von Plasmid-DNA	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
TaqMan $\beta$ -actin control Reagents Kit	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
TaqMan Universal PCR Master Mixes	Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH (Darmstadt)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

### 2.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Primer	Nukleotidsequenz	Firma
FR1c	5'-AGG TGC AGC TGS WGS AGT CDG-3'	ThermoHybaid (Ulm)
JH1245	5'-ACC TGA GGA GAC GGT GAC GAG GGT-3'	ThermoHybaid (Ulm)
JH3	5'-TAC CTG AAG AGA CGG TGA CCA TTG T-3'	ThermoHybaid (Ulm)
JH6	5'-ACC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT-3'	ThermoHybaid (Ulm)
M13 Vorwärtsprimer	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	Invitrogen (Karlsruhe)

Abkürzungen: A=Adenin, G=Guanin; T=Thymin; C=Cytosin; D=A,G oder T; S=G oder C; W=A oder T nach dem IUB Code

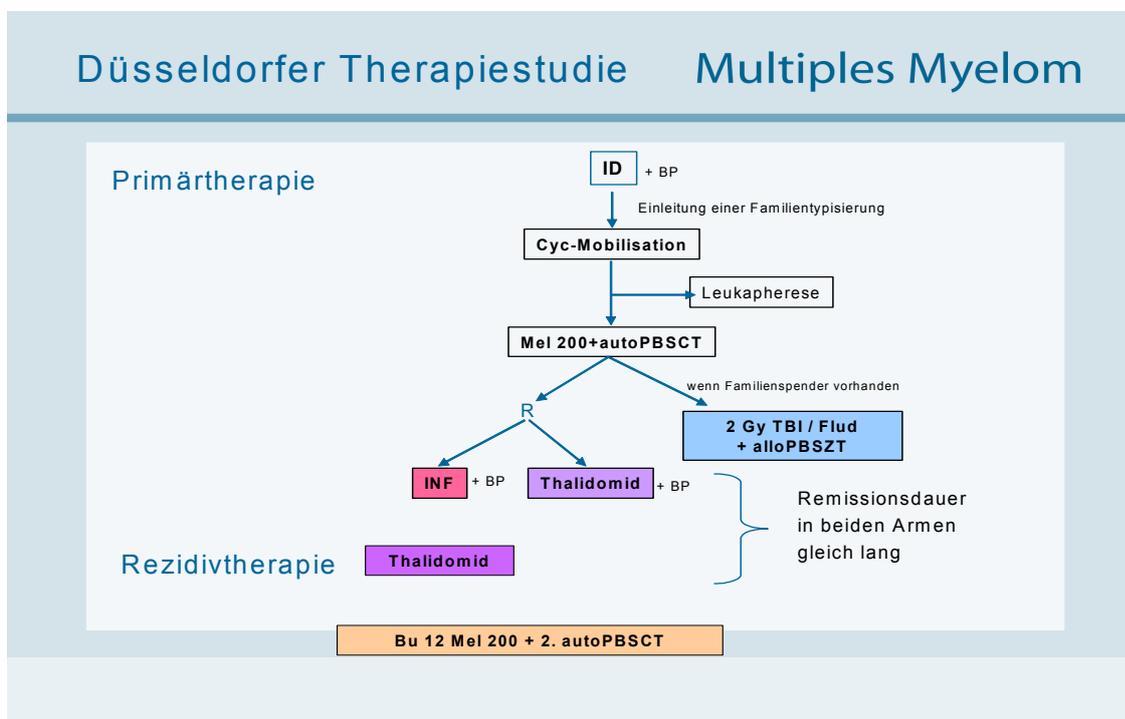
## 2.2 Methoden und Patienten

### 2.2.1 Identifizierung der IgH-Sequenz

#### 2.2.1.1 Patienten und Probengewinnung

Wir sammelten Proben aus dem PB und dem KM von Patienten mit MM, die innerhalb der Düsseldorfer Studie 2001 zur Primärtherapie mit HDT und autoPBSCT zwischen November 2000 und Oktober 2007 behandelt wurden (Abbildung 2-1).

Innerhalb der Düsseldorfer Therapiestudie zur Primärtherapie des MM wurden Patienten nach einer konventionellen Induktionstherapie mit Idarubicin/Dexamethason und anschließender Stammzellmobilisierung mit Cyclophosphamid und Pegfilgrastin behandelt. Im Anschluss fand eine genetische Randomisierung statt. Patienten mit einem HLA-identischen Geschwisterspender wurden mit einer konsolidierenden allogenen PBSCT mit dosisreduzierter Konsolidierung behandelt. Die anderen Patienten wurden zwischen einer Therapie mit Interferon (INF) als Standardarm oder mit Thalidomid als experimentelle intensivierte Erhaltungstherapie randomisiert.



**Abbildung 2-1:** schematische Darstellung der Düsseldorfer Therapiestudie des Multiplen Myeloms

Den Patienten wurde bei der Diagnose Citrat - KM entnommen und innerhalb von 24 Stunden nach der Entnahme weiter verarbeitet. Weitere KM-Proben wurden vor und 3 Monate nach HDT gewonnen. PB-Proben wurden in monatlichen Abständen gesammelt. Die Experimente sowie die Auswertung der KM-Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Mark Korthals, hingegen wurden die Experimente

der PB-Proben sowie die Daten dieser durch mich erhoben. Die Isolierung der mononukleären Zellen aus dem KM und PB erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll. Pro 10 ml KM oder PB wurden 8 ml Ficoll verwendet. Die ausgerechnete Menge an Ficoll wurde vorsichtig mit dem KM oder PB überschichtet und danach 30 Minuten bei 1600 Umdrehungen pro Minute (Upm) zentrifugiert. Anschließend wurde die lymphozytenreiche Interphase vorsichtig abgenommen und einmal mit Phosphat gepufferter Salzsäure (PBS) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die mononukleären Zellen mit 900 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurde ein Teil der mononukleären Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen eingefroren. Bei der Erstprobe wurde der Rest zur Ribonukleinsäure (RNA) - Isolierung weiterverwendet, indem  $1 \times 10^7$  Zellen aus dem KM in 600 µl RLT-Puffer suspendiert und durch kräftiges „Vortexen“ lysiert und anschließend eingefroren wurden.

#### **2.2.1.2 RNA-Isolierung**

Es wurde das RNeasy Blood Total RNA Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

Die mit RLT-Puffer stabilisierten und tiefgefrorenen Proben wurden zur weiteren Verarbeitung schonend auf Eis aufgetaut. Unter einem Abzug wurde das aufgetaute Lysat direkt auf eine QIAshredder-Säule gegeben und 2 Minuten bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Das Homogenisat wurde mit 600 µl 70 % Ethanol vermischt und anschließend auf eine RNeasy Spin-Säule gegeben. Nach 15 Sekunden Zentrifugation bei 10.000 Upm und Verwerfen des Durchflusses wurden 700 µl RW1 Waschpuffer auf die Säule gegeben und wiederum 15 Sekunden bei 10.000 Upm zentrifugiert. Nach Einbringen in ein neues Sammelröhrchen und Zugabe von 500 µl RPE Waschpuffer wurde bei 10.000 Upm wieder 15 Sekunden zentrifugiert. Mit dem alkoholhaltigen RPE-Puffer wurde die RNA ausgewaschen. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen, die Säule in ein neues Sammelröhrchen gestellt und 500 µl RPE Waschpuffer hinzugegeben. Dieses wurde dann 2 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert, um danach die trockene Säule vorsichtig entnehmen zu können. Anschließend wurde die RNA mit 50 µl RNase-freies Wasser durch einminütige Zentrifugation bei 10.000 Upm eluiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **2.2.1.3 cDNA-Synthese und konventionelle Polymerase-Kettenreaktion**

Die cDNA-Synthese der variablen Region der schweren Immunglobulin-Kette wurde mit Hilfe der Konsensus-Primer FR1c, C $\alpha$  und C $\gamma$  durchgeführt.

Es wurden jeweils 5  $\mu$ l eluierte RNA in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben, 5 Minuten bei 65°C inkubiert und danach 10 Minuten auf Eis abgekühlt. Die weitere cDNA-Synthese erfolgte mit GeneAmp RNA PCR Core Kit entsprechend den Angaben des Herstellers. Pro Ansatz wurde zunächst eine 15  $\mu$ l umfassende Mischung aus 2  $\mu$ l 10xbuffer, 4  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 8  $\mu$ l dNTP, 1  $\mu$ l 50  $\mu$ M OligodT16 hergestellt und wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1  $\mu$ l Moloney murine leukemia virus (MuLv-RT) und 1  $\mu$ l RNase-Inhibitor sowie 3  $\mu$ l der vorbereiteten RNA hinzugegeben. Die bisherigen Angaben beziehen sich auf eine einzelne Probe, für den Versuch wurde ein Master-Mix entsprechend der benötigten Menge angefertigt. Zusätzlich wurde zu jeder cDNA-Synthese ein Ansatz ohne RNA hergestellt, bei dem der Reaktions-Mix in 3  $\mu$ l RNase-freies Wasser gegeben wurde. Die Proben wurden 15 Minuten bei 42°C, 5 Minuten bei 99°C und 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Eine PCR wurde unmittelbar an die cDNA-Synthese angeschlossen.

Die konventionelle PCR wurde im Thermocycler Personal Cycler durchgeführt, wobei als Quelle der cDNA DNA aus Knochenmarksproben genutzt wurde. Pro Ansatz wurden 67,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 8  $\mu$ l 10 x Puffer, 1  $\mu$ l Primer C $\alpha$  (100  $\mu$ M), 1  $\mu$ l Primer C $\gamma$  (100  $\mu$ M), 1  $\mu$ l Primer FR1c (100  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ l AmpliTaqPolymerase (5 U/  $\mu$ l) angesetzt und jeweils 20  $\mu$ l cDNA aus der vorangegangenen reversen Transkription hinzugefügt. Auf die Denaturierungsphase von 5 Minuten bei 92°C folgten 40 Zyklen mit jeweils einer Denaturierung von 1 Minute bei 92°C, 1 Minute Primer-Annealing bei 60°C und 2 Minuten Kettenverlängerung bei 72°C. Die letzte Kettenverlängerung war 10,5 Minuten lang, um eine komplette Synthese der amplifizierten DNA sicherzustellen. Am Ende erfolgte eine Abkühlung auf 4°C.

Die PCR-Produkte wurden mittels einer 1,5 % Agarosegel-Elektrophorese beurteilt. Hierzu wurden 1,5 g Agarose auf ein Endvolumen von 100 ml mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt und in der Mikrowelle erhitzt und in einer Gelkammer erkaltet. 40  $\mu$ l des PCR-Produktes wurde mit 5  $\mu$ l 6x Auftragspuffer vermischt und 22  $\mu$ l pro Gelslot verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 120 V 1 Stunde lang durchgeführt.

Danach wurde das Gel maximal für 30 Minuten in ein Wasserbad aus destilliertem Wasser und Ethidiumbromid inkubiert. Daraufhin wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und per Fotografie dokumentiert.

#### **2.2.1.4 Gelextraktion**

Die Klon-spezifische cDNA-Banden, die einer Nukleotidlänge von 300-500 bp entsprechen, wurden mittels eines Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten.

Die Gelextraktion der PCR-Produkte wurde mittels des QIAquick Gel Extraktion Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde die dreifache Menge [ $\mu\text{l}$ ] des Puffers (QG) vom Gewicht des [ $\text{mg}$ ] Gelstückchens dazugegeben und 10 Minuten bei  $50^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Probe alle 2 bis 3 Minuten „gevortext“. Danach wurde Isopropanol in der gleichen Menge des Gelgewichtes hinzugefügt und gut gemischt. Der Ansatz wurde auf eine QIAquick Zentrifugationssäule gegeben und 1 Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500  $\mu\text{l}$  QG Puffer hinzugefügt. Die befüllte Säule wurde eine Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert und der Durchfluss wiederum verworfen. Nach Einbringen der Säule in ein neues Sammelröhrchen und Zugabe von 750  $\mu\text{l}$  PE Puffer wurde die Säule 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Säule 1 Minute bei 13.000 upm zentrifugiert, um daraufhin die Säule 1 Minute bei 13.000 Upm trocken zentrifugieren zu lassen. Die DNA wurde mit 50  $\mu\text{l}$  EB Puffer durch einminütige Zentrifugation bei 13.000 Upm eluiert.

#### **2.2.1.5 Klonierung der cDNA-Fragmente in E.coli Bakterien**

Zu 2  $\mu\text{l}$  aus dem Agarosegel eluierten cDNA-Fragment wurde 24  $\mu\text{l}$  Mix mit DNA TaqPolymerase hinzugegeben und 15 Minuten bei  $72^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Der Mix bestand aus 3  $\mu\text{l}$  10xPuffer, 1  $\mu\text{l}$  dATP, 19,9  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O und 0,1  $\mu\text{l}$  DNA TaqPolymerase.

Für die Herstellung von Agar-Platten zur Klonierung wurde LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agarose und 0,5 mg / ml Ampicillin verwendet. Die Agar-Platten wurden mit 40  $\mu\text{l}$  je Platte einer Lösung mit IPTG und x-Gal bestrichen.

Die Klonierung erfolgte mittels des TOPO TA Cloning Kits von Invitrogen nach Herstellerangaben. Dabei wurden 4  $\mu\text{l}$  des PCR-Produktes mit 1  $\mu\text{l}$  Salt-Solution und 1  $\mu\text{l}$  PCR 2.1-TOPO-Vektor (3908bp) vorsichtig vermischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die kompetenten Zellen (TOP 10F) wurden auf Eis aufgetaut und mit 4  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes gemischt. Dann wurde der Ansatz für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte die Transformation innerhalb von 30 Sekunden bei  $42^{\circ}\text{C}$ . Der Ansatz wurde auf Eis gestellt, mit 250  $\mu\text{l}$  vorgewärmten SOC-Medium versetzt und 60 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Die 250  $\mu\text{l}$  wurden aufgeteilt in je 150  $\mu\text{l}$  und 100  $\mu\text{l}$  und auf die vorbereiteten LB amp. Platten

ausgestrichen, um über Nacht bei 37°C zu inkubieren. Je Patient wurden 10 einzelne weiße Kolonien in 3 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und zum Bakterienwachstum über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Plasmidisolierung wurde das QIAprep Miniprep Kit benutzt. Zuvor wurden 1500 µl der Bakterienkultur 1 Minute bei 10.000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 200 µl sterilem Glycerin versetzt und vermischt. Das Gefäß wurde zur Aufbewahrung des jeweiligen Klons bei -80°C eingefroren. Die verbliebene Kultur wurde 1 Minute bei 10.000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in 250 µl RNase-haltigen P1 Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch gründliches Mischen in 250 µl P2 Puffer lysiert, die Suspension anschließend durch gründliches Mischen mit 350 µl N3 Puffer neutralisiert, um dann durch einen weiteren Zentrifugationsschritt unlösliche Bestandteile zu entfernen. Der verbliebene Überstand enthielt die gelöste Plasmid-DNA, die mittels einer Zentrifugationschromatographiesäule (QIAprep Spin Column) weiter gereinigt wurde. Durch aufeinander folgende Zentrifugationsschritte von je einer Minute in einer Minizentrifuge bei 10.000 Upm wurde zuerst die Säule mit dem Überstand beladen und mittels der Puffer PB und PE die DNA gereinigt. Die Elution der gereinigten DNA erfolgte mit 75 µl EB durch eine abschließende Zentrifugation bei 10.000 Upm für eine Minute.

Im Anschluss wurde mit der Plasmid-DNA ein Restriktionsansatz mit EcoR1 durchgeführt, um die Größe und das Vorhandensein des klonierten Produktes zu testen. Zu 1,2 µl eluierter Plasmid-DNA wurden 18,8 µl Mix hinzugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Mix bestand aus: 15,8 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl NEB1 Puffer und 1 µl Restriktionsenzym EcoRI. Die Produkte aus dem Restriktionsansatz wurden mittels einer 1,5 % Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

Die Sequenzierung der CDR3-Region wurde extern durch die Firma SeqLab in Göttingen durchgeführt. Hierzu wurden etwa 600 ng des Plasmids mit 20 pmol eines M13 Vorwärts - Primers, der am 5'-Ende der Integrationsstelle des Plasmids bindet, an die Firma verschickt. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde als Text- und Graphik-Datei per E-mail versendet.

Identische Sequenzen sowie die Bindungssequenzen für die Konsensus-Primer wurden mit Hilfe der ALFwin Sequence Analyser v2.10.06 Software identifiziert. Wenn die Sequenzen von mindestens drei der 10 verschiedenen Klone identisch waren, wurde diese Sequenz als die Patienten- und Tumor - spezifische IgH-

Sequenz definiert. Mit Hilfe der IgBlast Software wurden die V<sub>H</sub>-, D<sub>H</sub>- und J<sub>H</sub>-Sequenzen sowie die Patienten-spezifische CDR3-Peptid-Sequenz identifiziert. Basierend auf diesen Aminosäuresequenzen wurde die Synthese von patientenspezifischen Primern und Sonden bei der Firma Seqlab in Auftrag gegeben.

### **2.2.2 Etablierung einer patienten-spezifischen, quantitativen Real-Time-IgH-PCR**

Die Messung der IgH-Kopienzahl mittels RQ-PCR ist ein direktes Maß für die Tumorzellzahl in einer Probe, da die klon-spezifische IgH-DNA-Sequenzen genau in einer Kopie je Tumorzelle vorhanden sind. Die RQ-PCR zum quantitativen Nachweis der patientenspezifischen IgH-Sequenzen wurde wie von Fenk et al. beschrieben auf dem LightCycler - System durchgeführt {Fenk 2004}. Für jeden Patient wurde eine patientenspezifische PCR auf dem LightCycler-System etabliert.

Anhand der ermittelten CDR3-Sequenzen wurde von der Firma TIBMOBIOLOG je eine Allel-spezifische Oligonukleotid (ASO) - Taqman-Sonde für die tumor-spezifische CDR3 - Region der einzelnen Patienten sowie ein ASO - Vorwärts- und Rückwärts-Primer entworfen und synthetisiert.

Wir verwendeten als externen Standard zur Quantifizierung der klonspezifischen Kopienzahl das patientenspezifische linearisierte Plasmid. Vor der Etablierung wurden die Plasmide in einer Konzentration von  $5 \times 10^7$  Kopien/ $\mu$ l mit 1 U/ $\mu$ l Pst1 in 1xPuffer bei 37°C eine Stunde linearisiert und danach das Restriktionsenzym bei 95°C 10 Minuten inaktiviert. Es wurde zunächst eine serielle Verdünnungsreihe mit dem patientenspezifischen linearisierten Plasmid mit 6 ng/ml MS2-Phagen-RNA angefertigt. Die Amplifikation wurde in Anwesenheit von unterschiedlichen MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen von 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM und 7 mM und verdünnten Plasmidkonzentrationen von  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  und  $10^4$  Plasmid-Kopien durchgeführt. Die Kopienzahl ließ sich aus der Konzentration (w / v) und der Größe des Plasmids sowie der mittleren molekularen Masse der Basenpaare berechnen, mit einer molekularen Masse des Plasmids von  $(4.300 \times 650 \text{ g}) / 6,022 \times 10^{23} \text{ Molekülen} = 0,46 \text{ ng} / 1 \times 10^8 \text{ Plasmid-Kopien}$ .

Wir verwendeten das  $\beta$ -Aktin Gen als „housekeeping“-Gen als internen Standard zur Normalisierung, um unterschiedliche Mengen und Qualität der einzelnen DNA-Proben sowie Schwankungen des Amplifikationsverhaltens auszugleichen. Dazu verwendeten wir das TaqMan  $\beta$ -actin control Reagents Kit nach Herstellerangaben, das spezifische  $\beta$ -aktin „forward“ - und „reverse“ - Primer sowie eine  $\beta$ -aktin-Taqman-

Sonde enthält. Eine im Kit vorhandene DNA-Stammlösung diente zur Herstellung der Standardverdünnungsreihe.

Für eine erfolgreiche Etablierung forderten wir: 1) eine Sensitivität von mindestens  $10^{-4}$ , 2) keine Amplifikation bei Verwendung von DNA eines anderen Spenders und 3) eine lineare Amplifikation mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,98$  bei  $10^6$  bis  $10^1$  Kopien {Ladetto 2002}.

### **2.2.3 Quantifizierung der MRD in mononukleären Zellpräparationen**

Aus dem KM oder PB-Verlaufsproben wurde genomische DNA mit dem QIAmp Blood Mini Kit nach Herstellerangaben extrahiert.

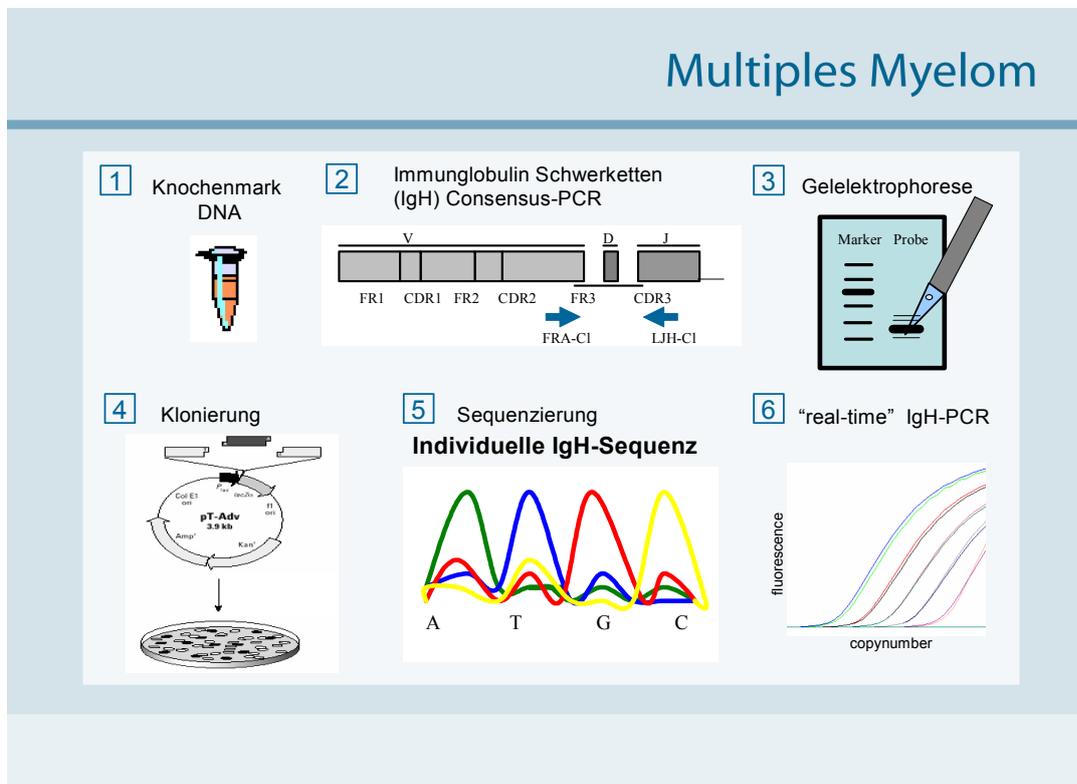
Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und eine Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette abgenommen und danach 180  $\mu$ l PBS hinzugefügt. Im nächsten Schritt wurden 33  $\mu$ l Protease und 200  $\mu$ l AL Puffer hinzugegeben und das Zellpellet gelöst und „gevortext“. Danach wurden die Proben für zehn Minuten bei 56°C im Thermocycler inkubiert und anschließend mit 200  $\mu$ l Ethanol vermischt. Nach dem Abzentrifugieren wurde die Mischung auf eine QIAmp Säule pipettiert und 1 Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule in ein neues Sammel tube eingebracht und 500  $\mu$ l AW1-Puffer hinzugegeben. Nach einer Minute Zentrifugation bei 13.000 Upm und Verwerfen des Durchflusses wurden 500  $\mu$ l AW2-Puffer auf die Säule gegeben und vier Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die trockene Säule wurde entnommen und 70  $\mu$ l AE-Puffer hinzugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die DNA durch einminütige Zentrifugation bei 8.000 Upm eluiert.

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion wurde mit dem LightCycler-System unter Verwendung des „LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes“ Kits durchgeführt. Die PCR-Reaktion fand in Glaskapillaren statt, die über Luft erwärmt wurden, was eine starke Verkürzung der einzelnen PCR-Zyklen im Vergleich zur konventionellen PCR gestattet.

Jede Glaskapillare enthielt ein Endvolumen von 20  $\mu$ l, wobei zuerst ein PCR-Mix ohne DNA, bestehend aus: 1  $\mu$ l LJH, 1  $\mu$ l patientenspezifischer Forward-Primer, 1  $\mu$ l der patientenspezifischer Sonden (4  $\mu$ M), 2  $\mu$ l der Enzymmischung und eine Sondenabhängige  $MgCl_2$ -Konzentration in jede Kapillare pipettiert wurden, und danach 1000 ng DNA in maximal 9  $\mu$ l Volumen oder Wasser zugegeben wurde. Jeder PCR-Lauf bestand aus vier Teilprogrammen: Denaturierung (10 Minuten bei 95°C), Amplifikation (Patienten-abhängig siehe Ergebnisse) und abschließende Kühlung (30

Sekunden bei 40°C). Jeder PCR-Lauf enthielt Standards dreier verschiedener Konzentrationen zum Quantifizieren, sowie eine Wasser-Kontrolle. Wir führten bei allen Messungen Doppelbestimmungen durch, negative Messwerte wurden durch Fünffachmessungen bestätigt.

Bei jeder Probe ermittelten wir die IgH-Kopienzahl (1 Allel) und die  $\beta$ -Aktin-Kopienzahl (2 Allele) anhand der beiden Standardkurven. Der Quotient aus 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Kopien multipliziert mit 100 wurde als das prozentuale Maß für die Menge an Tumorzellen in der Probe bestimmt. In Abbildung 2-2 sind die wesentlichen Arbeitsschritte zur Gewinnung der patientenspezifischen Sequenz zusammengefasst.



**Abbildung 2-2:** Schematischer Überblick der benötigten Methoden zur Ermittlung der minimalen Resterkrankung im Multiplen Myelom

## 2.2.4 Statistische Auswertungen

Die Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen und Medianen der Messergebnisse sowie die Erstellung von Graphiken wurden mit dem Excel-Programm (MS Office Professional Edition 2003), PowerPoint-Programm (MS Office Professional Edition 2003) sowie mit SPSS 18.0 durchgeführt. Das Gesamtüberleben und die Zeit zur Progression wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven und log rank Tests

analysiert. Korrelationen zwischen den Patientencharakteristika wurden durch Fisher- und T-Tests ermittelt. Uni- und multivariate Analysen wurden durch Verwendung der Cox Regressions - Analyse berechnet. Alle Patientencharakteristika mit  $p \leq 0.1$  in der univariaten Analyse erreichten die multivariate Analyse.

Das Gesamtüberleben und die Zeit zur Progression waren definiert als die Zeit von Beginn der Behandlung nach Erstdiagnose bis zum Rezidiv oder Tod. Um die statistischen Aussagen zu verstärken, fasste man die Daten von 10 Patienten aus einer vorangegangenen Studie {Fenk 2004} und die nachfolgenden 43 Patienten in ein Kollektiv zusammen. Dieses benötigt keine weitere statistische Angleichung, da die Entscheidung zur mehr Patienten nicht auf die Analyse der ersten zehn Patienten beruht.

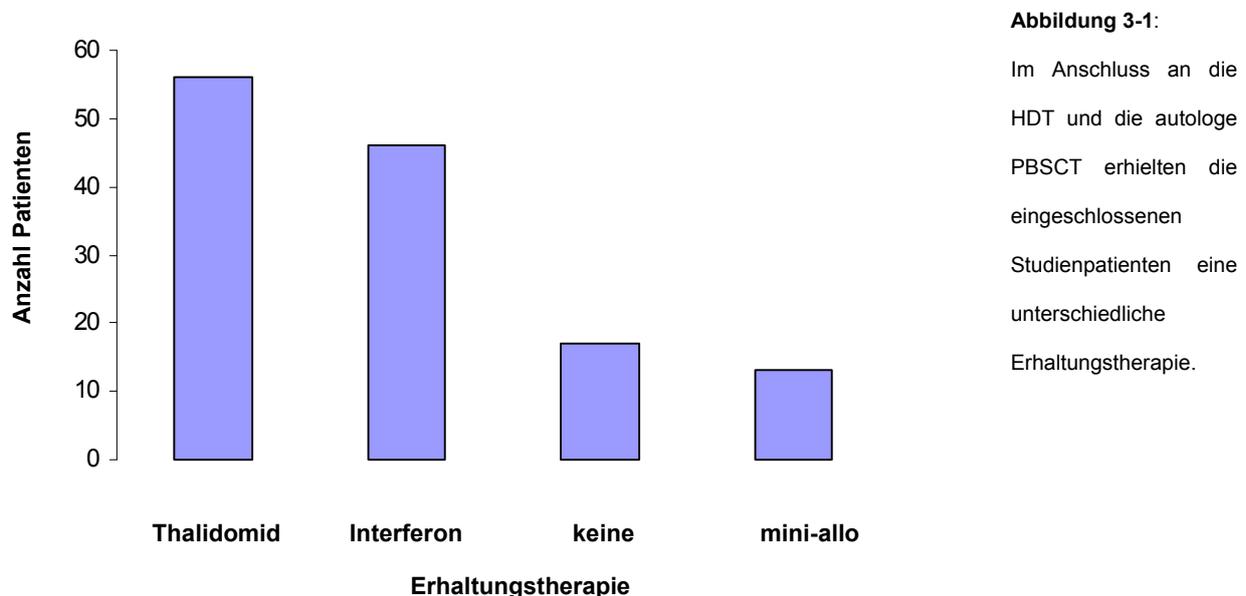
Um den optimalen Grenzwert (Cut-off Level) eines diagnostischen Markers zu bestimmen, wurde der Youden Index verwendet. Hierfür wurde zur Ermittlung eines prognostischen Grenzwertes der quantitative MRD drei Schritte benötigt: (i) Vergleich der empirischen Verteilungsfunktion als kumulative prozentuale Summe der Kurven über der Achse der quantitativen MRD Werte zwischen einem positiven und negativen Ergebnis der statistischen Signifikanz ( $p < 0,05$ ) als Unterschiede mittels des Kolmogorov-Smirnov Tests, (ii) Bestimmung des Wertes der quantitativen MRD mit einer maximalen Distanz zwischen den beiden empirischen Verteilungsfunktionen in einem binären Endpunkt eines signifikanten Kolmogorov-Smirnov Tests in Schritt (i), und (iii) Bestimmung des Grenzwertes mittels der Receiver - Operating Characteristic (ROC) – Kurve als Größe der quantitativen MRD mit maximalem Youden Index. Zwischen Schritt (ii) und (iii) könnte es numerische Unterschiede geben, diese Größen sollten sehr eng bei einander liegen. Statistische Analysen wurde mittels SAS® Statistical Analysis System Software Version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) unter Windows® XP-Professional auf einer IBM® ThinkPad®

platform getätigt. Für Schritt (i) wurde die Einstellung PROC NPAR1WAY verwendet, die gleichzeitig auch ein Ergebnis für Schritt (ii) ergibt. Die ROC-Analyse von Schritt (iii) wurde danach mittels der OUTROC Datei von PROC LOGISTIC berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-2 für die MRD vor und nach HDT unter Einbeziehung zweier binärer Endpunkte (Rezidiv (ja/nein) sowie Tod (ja/nein) aufgelistet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patienten, Ermittlung der IgH-Sequenz und Etablierung der IgH-PCR

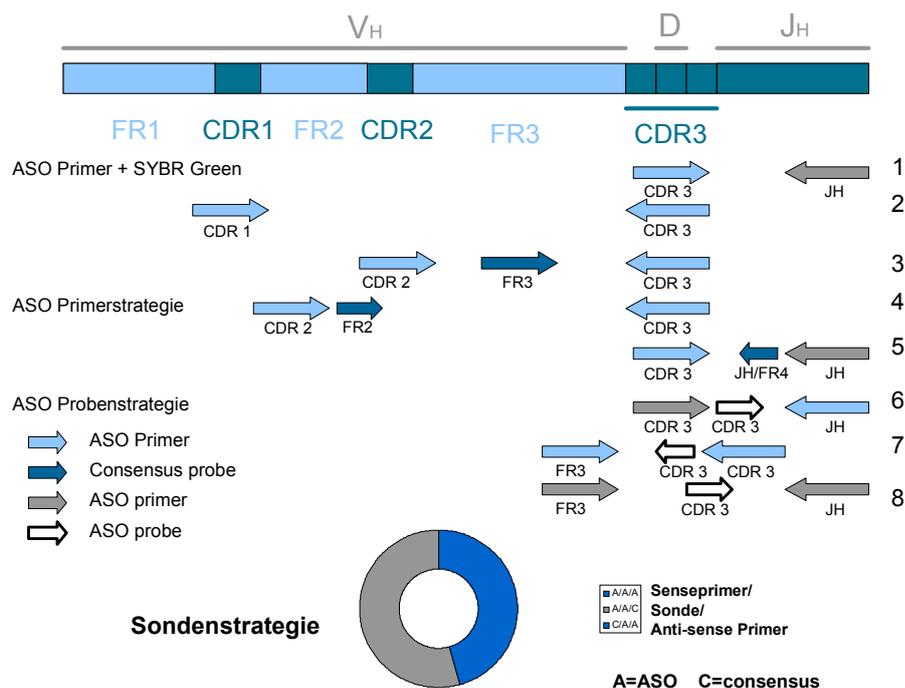
Wir untersuchten 121 Patienten mit MM, die im Stadium II/III nach Salmon und Durie mit einer HDT und autologer PBSCT als Erstlinientherapie behandelt wurden. Alle Patienten erhielten eine konventionelle Induktionstherapie gefolgt von einer zytotoxischen und mit G-CSF unterstützten Stammzellmobilisation sowie eine HDT mit autologer PBSCT. Im Anschluss erhielten 56 Patienten eine Erhaltungstherapie mit Thalidomid, 46 mit Interferon, 17 mit RIC und 13 erhielten keine Erhaltungstherapie (Abbildung 3-1).



80 Patienten hatten ein MM mit dem Subtyp IgA oder IgG und waren somit für ein molekulares Monitoring mittels IgH-PCR geeignet. Von 71 Patienten konnten wir Proben aus KM bei Erstdiagnose gewinnen. Von 55 Patienten (78%) dieser 71 Patienten konnten wir eine IgH-Sequenz ermitteln. (siehe Anhang)

Es konnte für 53 (76%) Patienten eine patientenspezifische RQ-IgH-PCR nach den zuvor festgelegten Standards etabliert werden, wohingegen bei 2 Patienten die minimal erforderliche Sensitivität von  $10^{-4}$  nicht erreicht wurde. Wir verwendeten in allen Fällen die „ASO-Sonden-Strategie“ {Fenk 2004}, in dem in 55% (n= 29) der Fälle ein ASO-sense Primer in der CDR123-Region und ein J<sub>H</sub>-Consensus-Primer verwendet wurde und in 45% (n=24) der Fälle ein ASO-sense-Primer und ein J<sub>H</sub>-ASO-

antisense-Primer benutzt wurde (Abbildung 3-2). Die maximale Sensitivität der etablierten PCR betrug dabei in 15% (n=9) der Fälle  $10^{-4}$  und in 85% (n=44) der Fälle mindestens  $10^{-5}$ . Die lineare Sensitivität betrug in 20% der Fälle  $10^{-5}$ , in 45% (n=23) der Fälle  $10^{-4}$  und in 20% der Fälle  $10^{-3}$ . Alle PCR-Tests waren zu 100% spezifisch. Die verwendeten Temperaturen und Magnesiumchloridkonzentrationen zeigt Abbildung 3-3.



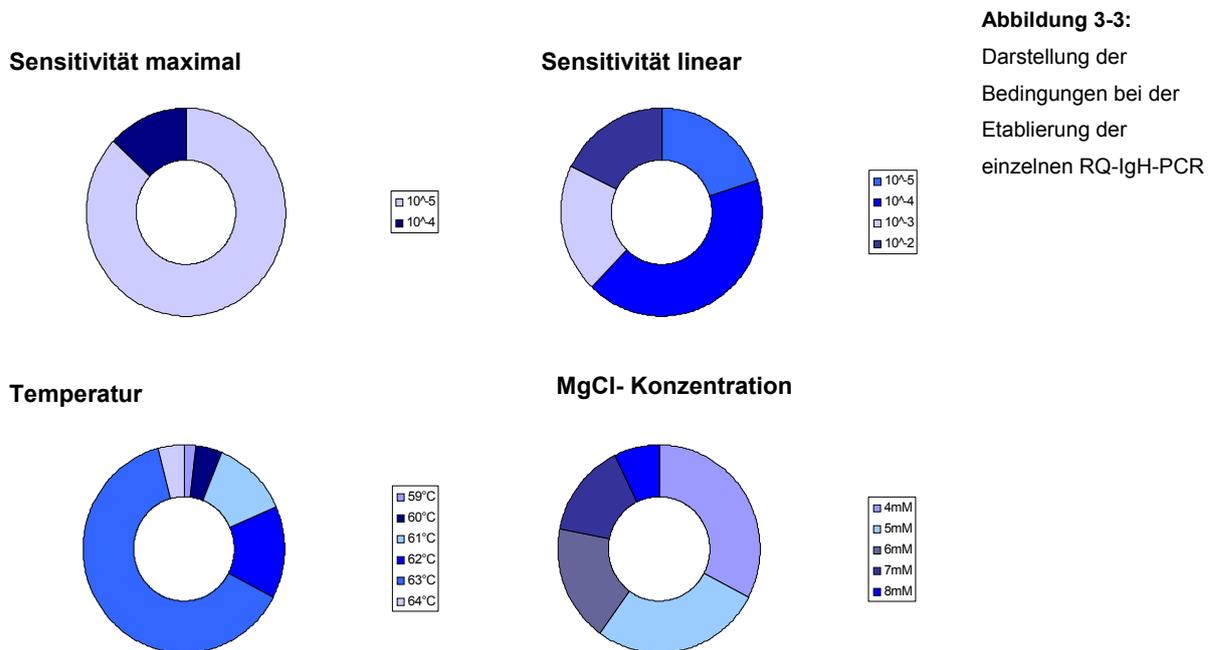
**Abbildung 3-2:**

Darstellung der möglichen Sondenstrategien zur Ermittlung der CDR3-Region.

### 3.2 Vergleichende Untersuchung zwischen Proben aus dem Knochenmark und peripherem Blut

Wir untersuchten zusätzlich die intra-individuellen Unterschiede von Proben aus dem PB und dem KM aus insgesamt 60 gepaarten Proben, die am gleichen Tag gewonnen wurden. Es handelte sich dabei um Proben, die zu unterschiedlichen Zeiten während des Verlaufs der Erkrankung gewonnen wurden und daher Zeitpunkte mit unterschiedlichen Tumorzellanteilen beinhalteten (Abbildung 3-4). Ein negatives PCR-Ergebnis in Blutproben (n= 31) führte in 19 % der Fälle auch zu einem negativem Ergebnis in der dazugehörigen Knochenmarksprobe, währenddessen in 81 % der Fälle positive Ergebnisse im Knochenmark gemessen wurden. Umgekehrt war in allen Fällen mit einem negativen Ergebnis in der

Knochenmarkspröbe auch ein negatives Ergebnis im peripheren Blut vergesellschaftet.

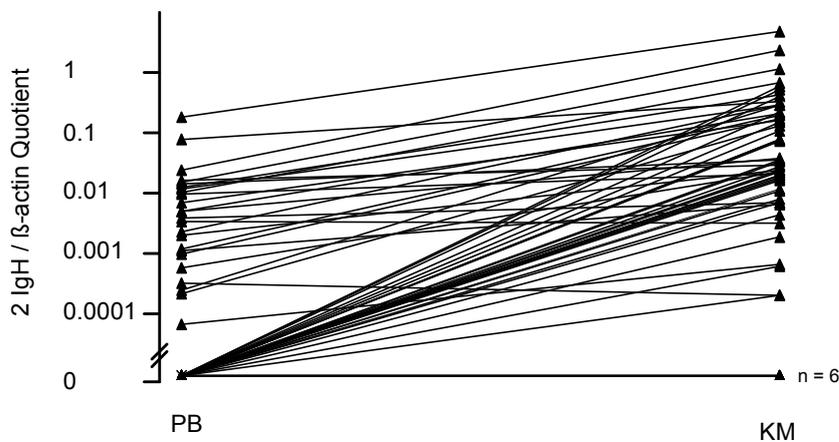


Insgesamt war der Tumorzellanteil im PB (medianer 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Quotient 0%, Reichweite 0% - 0,012%) signifikant niedriger als im KM (medianer 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Quotient 0,0014%, Reichweite 0,000087 % - 1,026 %). Der Unterschied zwischen den gepaarten Messwerten im PB und im KM betrug im Median zwei Zehnerpotenzen mit einer Spanne von 10 bis 1000.

### 3.3 Minimale Resterkrankung im Knochenmark

#### 3.3.1 Definition eines Grenzwertes im Knochenmark mit prognostischer Bedeutung

Wir konnten von 53 Patienten die MRD im KM vor HDT und autologer PBSCT messen, dabei besaßen 44 Patienten einen positiven und 9 Patienten einen negativen 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Quotienten. Die Ergebnisse der positiv getesteten Proben lagen zwischen 0,00003% und 86% 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Quotient mit einem Median von 0,2% 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Quotient. Die mediane Zeit zur Progression (EFS) lag bei allen 53 Patienten bei 28 Monaten und das Gesamtüberleben (OS) bei 61 Monaten.



**Abbildung 3-4:**

Unterschiede der 2IgH/β-Aktin-Quotienten von 60 Proben, die am gleichen Tag und vom selben Patienten im peripheren Blut und im Knochenmark gewonnen wurden

Es konnten 40 Patienten mit erlittenem Rezidiv und 29 verstorbene Patienten im Beobachtungszeitraum erfasst werden. Die Patientencharakteristika dieser 53 Patienten können aus Tabelle 3-1 entnommen werden.

MRD-Werte nach HDT waren nur bei 39 Patienten vorhanden. Von diesen Patienten erlitten 29 ein Rezidiv und 19 Patienten verstarben. Die statistische Verteilung der MRD Werte vor HDT und nach HDT wurden zwischen den Patienten mit und ohne erreichtem Rezidiv sowie mit den Überlebenden und Toten mittels des nicht parametrischen Kolmogorov-Smirnov Tests verglichen. Während die Verteilung der MRD-Werte nach HDT sich statistisch nicht unterscheiden, zeigten sich Abweichungen zwischen der Verteilung der MRD-Werte vor HDT und den Überlebenden bzw. Verstorbenen mit einem nominalen Signifikanzlevel von  $p < 0,05$  und sowie den Patienten mit bzw. ohne Rezidiv mit einem nominalen Signifikanzlevel von  $p = 0,06$ . (Tabelle 3-2)

Die Sensitivität und Spezifität mittels ROC Analyse für verstorbene Patienten mit einer gemessenen MRD  $> 0,2\%$  2IgH/β-actin Quotient vor HDT wurde mit 0,78 (95%KI: 0,56-0,93) ermittelt. Bei den Patienten mit einer MRD  $> 0,2\%$  2IgH/β-actin Quotient vor HDT unter den Überlebten betrug der Wert 0,6 (95%KI: 0,4-0,78). Mittels des Kolmogorov-Smirnov-Test betrug die Werte für einen Grenzwert von 0,12 0,61 (95%KI: 0,38-0,81) und 0,60 (95%KI: 0,4-0,78).

	Patienten (n=53)	MRD < 0.2% (n=26)	MRD > 0.2% (n=27)	p
Alter (Median Jahre; range)	54 (31 – 75)	54 (32 – 69)	54 (31 – 75)	0.9
Geschlecht (m : f; %)	66 : 34	58 : 42	74 : 26	0.3
Ig Subtype (IgG : IgA; %)	77 : 23	77 : 23	78 : 22	1.0
Stadium S+D (I+II : III; %)	11 : 89	12 : 88	11 : 89	1.0
Stadium ISS (1 : 2 : 3; %)	53 : 34 : 13	54 : 35 : 12	52 : 33 : 15	0.9
Zytogenetik (abnormal : normal; %)	26 : 74	23 : 77	30 : 70	0.8
Erhaltungstherapie (IFN : Thal : RIC; %)	51 : 34 : 15	54 : 35 : 12	44 : 37 : 19	0.7
Remission vor HDT (nCR : PR : MRSD; %)	8 : 62 : 30	12 : 73 : 15	4 : 52 : 44	0.1
Remission nach HDT (nCR : PR : MRSD; %)	25 : 64 : 11	31 : 62 : 8	19 : 67 : 15	0.5
PC KM Infiltration vor HDT (< : >10%; %)	49 : 51	57 : 43	45 : 55	0.1

**Tabelle 3-1: Patientencharakteristika des Gesamtkollektiv (n = 53)**

**Tabelle 3-2: Vergleich der Patienten mit und ohne Rezidiv sowie Überlebten und Verstorbenen im Verlauf des Beobachtungszeitraum mittels Kolmogorov-Smirnov Test, MRD Werte mit maximalen Abstand und maximalen Youden Index**

	Fälle / Gesamtzahl	Differenztest	Kolmogorov-Smirnov Test	ROC Analyse
		P Betrag	Maximaler Abstand MRD	Maximaler Youden index MRD
			[%2IgH/β-actin]	[%2IgH/β-actin]
<b>Rezidiv</b>				
MRD vor HDT	40 / 53	0.06	(0.52) <sup>3)</sup>	(0.12) <sup>3)</sup>
MRD nach HDT	29 / 39	0.13	n.a. <sup>4)</sup>	n.a. <sup>4)</sup>
<b>Tod</b>				
MRD vor HDT	23 / 53	0.04	0.12 <sup>1)</sup>	0.20 <sup>2)</sup>
MRD nach HDT	19 / 39	0.60	n.a. <sup>4)</sup>	n.a. <sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Sensitivität Schätzwert: 0.6087 (95%ci: 0.38-0.81), Spezifität Schätzwert: 0.6000 (95%ci: 0.40-0.78)

<sup>2)</sup> Sensitivität Schätzwert: 0.7826 (95%ci: 0.56-0.93), Spezifität Schätzwert: 0.6000 (95%ci: 0.40-0.78)

<sup>3)</sup> Werte in Klammern aufgrund der grenzwärtigen statistischen Signifikanz von 0.05 < P ≤ 0.10.

<sup>4)</sup> n.a.= nicht verwendbar für mehr als aufgrund grenzwärtiger fehlender statistischer Signifikanz (P > 0.10)

Da die bei prognostischer Betrachtung beim Grenzwert vor HDT beginnt, sind die positiven und negativen umgekehrten Größenverhältnisse, berechnet als Prognosemusterwert am ehesten zu verwenden. Die Todeswahrscheinlichkeit bei Patienten mit einer MRD > 0,2% 2IgH/ $\beta$ -actin Quotient vor HDT lag bei 0,54 (95%KI: 0,33-0,74) und die Überlebenschance bei Patienten mit einer MRD < 0,2% 2IgH/ $\beta$ -actin Quotient vor HDT bestand bei 0,67 (95%KI: 0,46-0,84). Die entsprechenden Ergebnisse des Grenzwertes von 0,12% 2IgH/ $\beta$ -actin Quotient aus dem Kolmogorov-Smirnov-Test waren 0,6 (95%KI: 0,4-0,78) und 0,78 (95%KI: 0,56-0,93) für Verstorbene und Überlebende. Daraus resultiert ein signifikanter prognostischer Grenzwert des 2IgH/ $\beta$ -actin Quotienten in Knochenmarkspuren vor HDT. Der Gebrauch des Grenzwertes von 0,2% 2IgH/ $\beta$ -actin Quotienten, wie in den ROC Analysen gezeigt, resultierte als der sensitivste und spezifischste prognostische Schätzwert.

### **3.3.2 Korrelation der minimalen Resterkrankung im Knochenmark mit Remissionsraten**

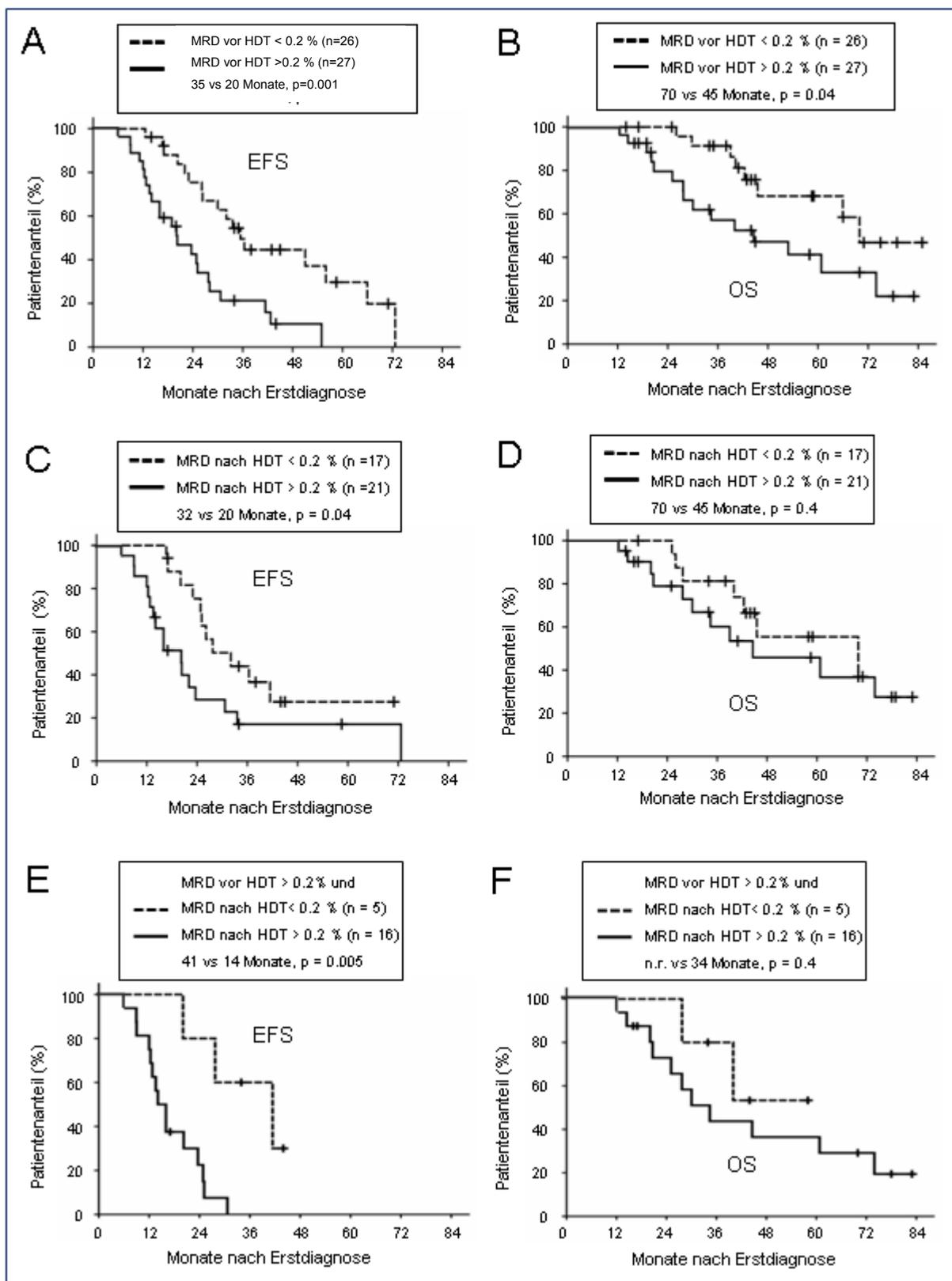
Vier Patienten erreichten eine komplette Remission (CR) vor der HDT, dabei lag der Median der MRD vor HDT und autoPBSCT bei 0,07 % 2IgH/ $\beta$ -Actin-Quotient. Bei 32 Patienten konnte eine partielle Remission (PR) erreicht werden, hier zeigte sich ein medianer 2IgH/ $\beta$ -Actin-Quotient vor HDT von 0,12 %. Hingegen erreichten 16 Patienten ein minimales Ansprechen (MRSD) vor HDT und autoPBSCT. Der mediane 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotient vor HDT dieser Patienten lag bei 1,7 %. Bei Betrachtung nach HDT erreichten 11 Patienten eine CR mit einer medianen MRD nach HDT von 0,06 % 2IgH/ $\beta$ -Actin-Quotient. 23 Patienten erreichten eine PR und 5 eine MRSD nach HDT. Der mediane 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotient nach HDT der Patienten mit PR nach HDT lag bei 0,44 % und der bei Patienten mit MRSD nach HDT bei 0,41 %. (Abbildung 3-5). Es zeigte sich keine Korrelation der MRD vor oder nach HDT mit dem jeweiligen klinischen Remissionsstatus.

### **3.3.3 Minimale Resterkrankung im Knochenmark vor Hochdosistherapie ist ein Prognosefaktor für das ereignisfreie Überleben und Gesamtüberleben**

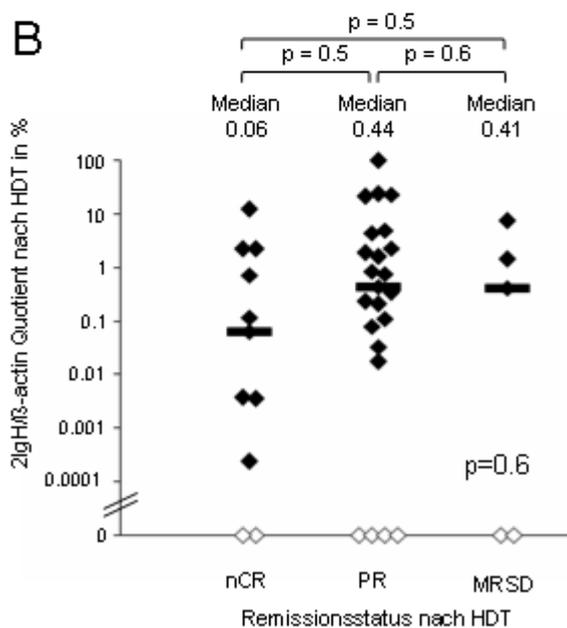
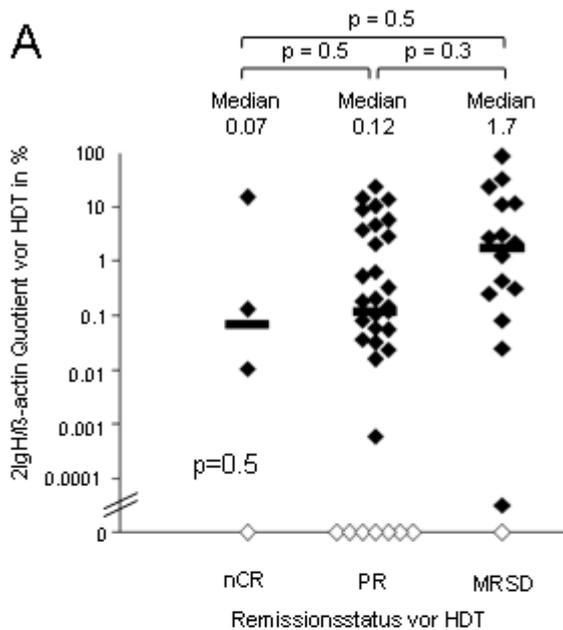
Wir teilten die Patienten in eine „niedrig“ MRD- und eine „hohe“ MRD-Gruppe nach dem definierten Grenzwert von 0,2 % 2IgH/ $\beta$ -actin Quotient im KM vor HDT ein. Von diesen Patienten, gehörten 26 zur „niedrigen“ MRD-Gruppe, hingegen wurden 27 zu der „hoch“ MRD-Gruppe eingeteilt. Zwischen diesen beiden Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied im Bezug auf Alter, Geschlecht, MM-Subtyp, Stadium nach Salmon und Durie, ISS-Stadium, Zytogenetik, Erhaltungstherapie, Plasmazellinfiltration im KM vor HDT oder dem Remissionsstatus vor oder nach HDT (Tabelle 3-1). Das EFS der Patienten mit einer geringeren MRD unter 0,2% 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotient war signifikant länger als das, der Gruppe mit einem 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotienten höher als 0,2% ( $p=0,001$ ). Die mediane EFS lag bei den Patienten mit dem geringen MRD im KM vor HDT bei 35 Monaten, wohingegen die mediane EFS bei 20 Monaten bei erhöhter MRD über 0,2% 2IgH/ $\beta$ -actin Quotienten lag (Abbildung 3-4). Eine Gruppierung durch den gleichen MRD-Grenzwert zeigte zudem ein unterschiedliches OS der Patienten innerhalb beider Gruppen. Patienten der „niedrig“ MRD-Gruppe hatten ein signifikantes ( $p=0,04$ ) längeres OS mit einem Median von 70 Monaten, als die Patienten der „hoch“ MRD-Gruppe, welche ein medianes OS von 45 Monaten besaßen (Abbildung 3-5 A;B).

### **3.3.4 Minimale Resterkrankung im Knochenmark nach Hochdosistherapie ist ein Prognosefaktor für das ereignisfreie Überleben, aber nicht für das Gesamtüberleben**

Anschließend untersuchten wir die MRD im KM nach erfolgter HDT und autoPBSCT. Dazu sammelten wir KM-Proben von 38 der insgesamt 53 Patienten zum Zeitpunkt 3 bis 6 Monate nach HDT mit autoPBSCT. Diese Patientenproben hatten einen medianen MRD-Wert von 0,3% 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Quotient. Die PCR-Ergebnisse waren für 8 Patienten negativ, wobei bei 3 Patienten die 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Quotienten schon vor HDT negativ waren. Die restlichen 30 Patienten hatten MRD-Werte zwischen 0,0002% 2IgH/ $\beta$ -Actin-Quotient und 100% 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Quotient. Bei Gruppierung der 38 Patienten nach dem oben genannten Grenzwert von 0,2% 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Quotient nach HDT zeigt sich ein signifikanter Unterschied der EFS (32 vs. 20



**Abbildung 3-5:** Die MRD-Werte im KM vor (2-10 Tage) und nach (3-6 Monate) HDT definieren Patientengruppen mit unterschiedlichen EFS (A) und OS (B). EFS und OS der 53 Patienten, die zu einer „hoch“ oder „niedrig“ MRD-Gruppe mittels des Grenzwertes von 0,2 2IgH/β-actin Quotient im KM vor HDT zugeteilt wurden. (C) EFS und (D) OS der 38 Patienten mit MRD Werten höher oder niedriger als 0,2% 2IgH/β-actin Quotient im KM nach HDT wurden ebenso analysiert. (E) EFS und (F) OS wurden auch unter den 21 Patienten, die hohe MRD-Werte vor HDT und Zuteilung mit Berücksichtigung der MRD-Werte nach HDT.



**Abbildung 3-6:**

Das MRD-Level vor (A) oder nach (B) HDT und autoPBSCT korreliert nicht mit dem klinischem Remissionsstatus vor oder nach Transplantation.

Monate,  $p=0,04$ , Abbildung 3-5C. Im Gegenteil dazu zeigt sich beim OS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten ( $p=0,4$ , Abbildung 3-5 D). Um die Aussagekraft zur Prognose der MRD-Werte nach HDT in Kombination zu den MRD-Werten vor HDT zu ermitteln, analysierten wir die EFS unter den Patienten, die eine hohe MRD vor HDT hatten im Verhältnis zu deren MRD-Werten nach HDT (Abbildung 3-5 E; F). Patienten, deren MRD-Werte nach HDT und autoPBSCT unter 0,2% 2IgH/β-actin Quotient gefallen waren, hatten ein verlängertes EFS ( $p=0,005$ ) im Vergleich zu denen, die nach HDT immer noch erhöhte MRD-Werte besaßen. Das EFS lag bei 41 Monaten im Vergleich zu 14 Monaten. Dennoch war das OS dieser

Patienten mit geringen MRD-Werten nach HDT und autoPBSCT nicht signifikant verlängert (Median nicht erreicht vs 34 Monate,  $p=0,4$ , Abbildung 3-5 E; F).

Weiterhin führten wir eine uni- sowie multivariate Analyse durch, um allgemeine Prognosefaktoren im Bezug auf die gemessene minimale Resterkrankung im KM zu eruieren (Tabelle 3-3).

Die Univariateanalyse zeigte, dass der MRD-Grenzwert in Knochenmarksproben vor HDT von 0,02% 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Quotient ( $p=0.001$ ), derselbe MRD-Grenzwert nach HDT ( $p=0.04$ ) und die Art der Erhaltungstherapie ( $p=0.02$ ) eine prognostische Vorhersagekraft für das EFS besitzen. In der Multivariateanalyse zeigten sich zudem diese Faktoren als unabhängige prognostische Parameter für das EFS ( $p<0.001$ ;  $p=0.04$ ,  $p=0.002$ ).

Für das OS zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem MRD-Wert im KM vor HDT ( $p=0.04$ ), der Zytogenetik ( $p<0.001$ ) und dem Stadium nach ISS-Kriterien ( $p=0.06$ ). Das MRD-Level vor autoPBSCT und der Zytogenetikstatus waren unabhängige prognostische Faktoren für das OS ( $p=0,05$ ,  $p=0,003$ ).

### **3.4 Minimale Resterkrankung im peripheren Blut**

#### **3.4.1 Minimale Resterkrankung im peripheren Blut zu bestimmten Zeitpunkten ist kein Prognosefaktor**

Neben dem KM untersuchten wir auch die MRD im PB. Dabei konnten wir von 44 Patienten 953 Proben im Verlauf der Erkrankung sammeln und auswerten. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnosenstellung konnten Proben von 9 Patienten gesammelt werden, vor HDT von 36 Patienten und 3 Monate nach HDT von 36 Patienten. Zum Zeitpunkt des Rezidivs konnten Proben von 18 Patienten ausgewertet werden. Die Patientencharakteristika können aus Tabelle 3-4 entnommen werden. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnosenstellung konnten wir bei 67% der Patienten ( $n=6$ ) eine minimale Resterkrankung mit einer medianen Tumorlast von 0,0004 % 2IgH/ $\beta$ -actin Quotient ermitteln. Vor HDT war die Anzahl der klonalen Zellen im PB reduziert, indem nur 34 % der Proben positiv gemessen wurden ( $n=15$ ) und eine niedrigere mediane Tumorlast mit einem 0% 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotient (Reichweite: 0% - 2,5% 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotient) gemessen wurde. Zudem zeigten die Proben 3 Monate nach HDT eine weitere Reduktion der Tumorlast mit einer positiven PCR in nur noch 16% ( $n=7$ ) und eine niedrigere MRD mit einem Median von 0% 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotient (Reichweite:

0% - 0.8 % 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotient). Zum Zeitpunkt des Rezidivs betrug die mediane MRD 0,01 % 2IgH/ $\beta$ -actin Quotient (Reichweite: 0% - 64 % 2IgH/ $\beta$ -actin Quotient).

Univariate Analyse	EFS		OS	
	p	Hazard ratio	p	Hazard ratio
Alter (< : > 60 Jahre)	0.3	0.68	0.3	0.61
Geschlecht (m : f)	0.8	0.93	0.6	0.78
Ig Subtyp (IgG : IgA)	0.5	0.78	0.8	0.90
Stadium S+D (I+II : III)	0.7	0.80	0.9	0.92
Stadium ISS (1 : 2+3)	0.5	0.82	<b>0.06</b>	0.45
Zytogenetik (abnormal : normal)	0.1	0.58	<b>0.001</b>	0.24
Erhaltungstherapie (IFN : Thal/RIC)	<b>0.02</b>	0.45	0.4	0.70
Remission vor HDT (nCR/PR : MRSD)	0.9	0.95	0.3	0.64
Remission nach HDT (nCR : PR/MRSD)	0.3	0.66	0.8	0.90
PC KM Infiltration vor HDT (< : > 10%)	0.4	0.74	0.6	0.81
MRD vor HDT (< : > 0.2% 2IgH/ $\beta$ -actin Quotient)	<b>0.001</b>	0.33	<b>0.04</b>	0.41
MRD nach HDT (< : > 0.2% 2IgH/ $\beta$ -actin Quotient)	<b>0.04</b>	0.44	0.4	0.67

Multivariate Analyse	EFS		OS	
	p	Hazard ratio	p	Hazard ratio
Zytogenetik (abnormal : normal)	0.1	0.40		
Erhaltungstherapie (IFN : Thal/RIC)	<b>0.002</b>	0.22		
MRD vor HDT (< : > 0.2% IgH/2 $\beta$ -actin Quotient)	<b>&lt;0.001</b>	0.16		
MRD nach HDT (< : > 0.2% IgH/2 $\beta$ -actin Quotient)	0.04	0.36		
Zytogenetik (abnormal : normal)			<b>0.003</b>	0.28
Stadium ISS (1 : 2+3)			<b>0.06</b>	0.43
MRD vor HDT (< : > 0.2% IgH/2 $\beta$ -actin Quotient)			<b>0.05</b>	0.42

**Tabelle 3-3: Univariate Analyse und Multivariate Analyse für die Beziehung zwischen Prognosefaktoren und dem EFS oder OS**

Bei fünf von insgesamt 18 Patienten zeigte die MRD Messung eine negative Tumorlast. Außerdem verglichen wir die MRD-Werte zu zwei definierten Zeitpunkten,

zum einen eine Woche vor HDT und autoPBSCT sowie 3 Monate nach Transplantation, mit dem klinischen Verlauf der Patienten. Wir konnten keine Beziehung zwischen den MRD-Werten in PB-Proben zu den oben genannten Zeitpunkten und den Remissionsraten vor oder nach HDT und autoPBSCT schließen oder einen Zusammenhang mit dem OS oder PFS entdecken. (Abbildung 3 – 7)

Patienten, die nach HDT und autoPBSCT eine komplette Remission (CR) als bestes Ansprechen erreichten, hatten ein medianen Tumorgehalt in PB von 0% 2IgH/ $\beta$ -actin Quotient (Reichweite: 0 % - 0,02 %). Diese Werte zeigten sich nicht signifikant verschieden zu den medianen MRD-Werten von 0% 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotient von Patienten mit einer erreichten partiellen Remission (PR) (Reichweite: 0 % - 0,07%;  $p = 0,4$ ) oder vom medianen Tumorlevel 0% 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotient (Reichweite: 0 % - 0,0002%;  $p=0,4$ ) bei Patienten mit MR oder SD nach HDT und autoPBSCT (Abbildung 3-8).

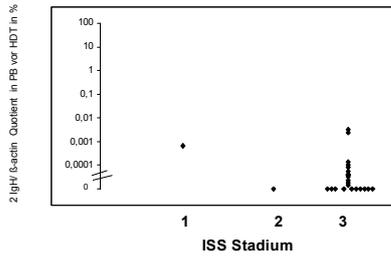
Bei Patienten mit einer positiven MRD vor HDT betrug die mediane EFS 17 Monate und bei Patienten mit negativer MRD vor HDT betrug die mediane EFS 22 Monate ( $p=0,4$ ). Zudem betrug die mediane EFS 17 Monate bei Patienten mit einer positiven MRD nach HDT und 18 Monate, wenn diese negativ nach HDT war. Der gleiche Zusammenhang konnte im Hinblick auf das OS beobachtet werden. Das mediane OS war 28 Monate bei Patienten mit einer positiven Tumorlast vor HDT und 35 Monate bei einer negativen Tumorlast zum gleichen Zeitpunkt ( $p=0,4$ ). Das mediane OS bei Patienten mit einer positiven MRD nach HDT betrug 21 Monate und bei einer negativen MRD zu diesem Zeitpunkt 35 Monate. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Dieser Zusammenhang wurde zusätzlich mittels einer Univariateanalyse bestätigt. (Abbildung 3–9; Tabelle 3-5)

Ebenso konnte man keinen Zusammenhang zwischen der gemessenen MRD-Werten und etablierten prognostischen Parametern wie  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2 <3.5 mg/dl: Median 0% 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotient (Reichweite: 0% - 0,92 %);  $\beta$ 2 >3.5 mg/dl: Median 0% 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotient (Reichweite: 0% - 0,27 %);  $p=0,4$ ) oder zytogenetischen Auffälligkeiten (Zytogenetik normal: Median 0 % 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotient (Reichweite: 0% - 0,86 %); Zytogenetik abnormal: Median 0 % 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotient; (Reichweite: 0% - 0,28 %);  $p=0,5$ ). (Abbildung 3 – 7)

**Abbildung 3-7:** Der Zusammenhang zwischen den MRD-Werten und ISS Stadium (A+B), Zytogenetik (C+D), Remissionsstatus vor HDT (E+F) und Remissionsstatus nach HDT (G+H).

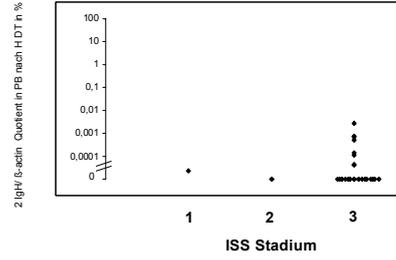
**A**

Zusammenhang zwischen 2 IgH/  $\beta$ -actin Quotient in PB vor HDT und ISS Stadium



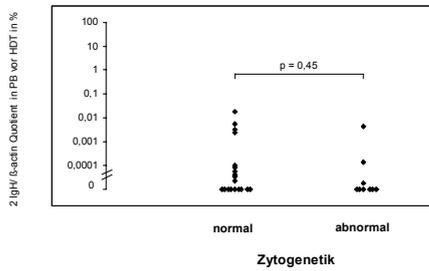
**B**

Zusammenhang zwischen 2 IgH/  $\beta$ -actin Quotient in PB nach HDT und ISS Stadium



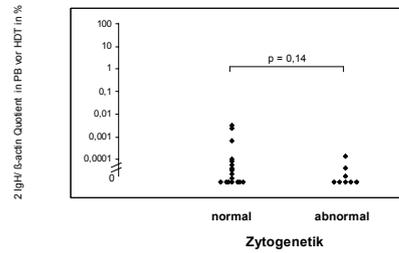
**C**

Zusammenhang zwischen 2 IgH/  $\beta$ -actin Quotient in PB vor HDT und Zytogenetik



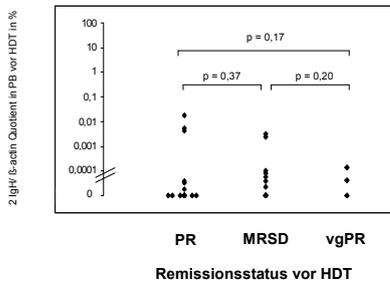
**D**

Zusammenhang zwischen 2 IgH/  $\beta$ -actin Quotient in PB nach HDT und Zytogenetik



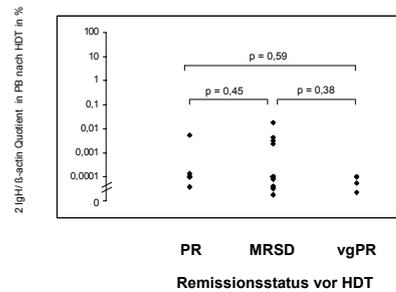
**E**

Zusammenhang zwischen 2 IgH/  $\beta$ -actin Quotient in PB vor HDT und Remission vor HDT



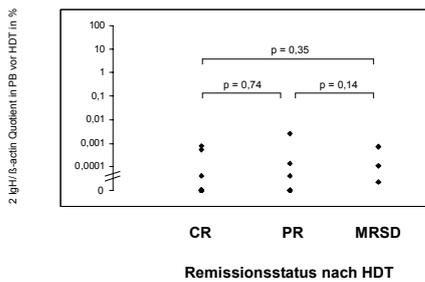
**F**

Zusammenhang zwischen 2 IgH/  $\beta$ -actin Quotient in PB nach HDT und Remission vor HDT



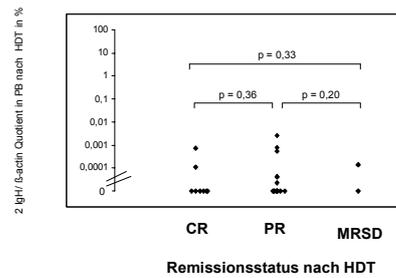
**G**

Zusammenhang zwischen 2 IgH/  $\beta$ -actin ratio in PB vor HDT und Remission nach HDT

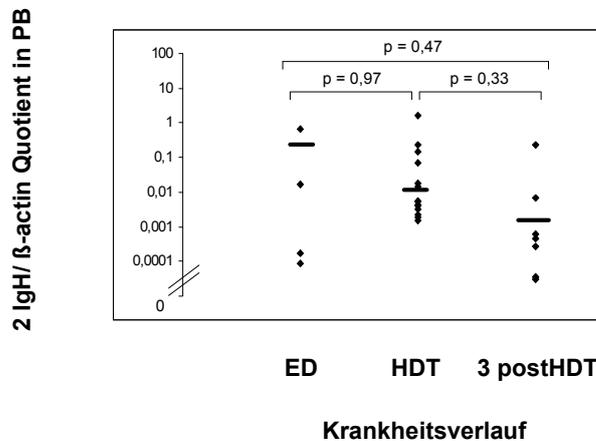


**H**

Zusammenhang zwischen 2 IgH/  $\beta$ -actin Quotient in PB nach HDT und Remission nach HDT



### Zusammenhang zwischen 2 IgH/ $\beta$ -actin Quotient in PB and Krankheitsverlauf



**Abbildung 3-8:**

Der Zusammenhang zwischen den MRD - Werten und dem Krankheitsverlauf

### 3.4.2 Sequentielles Monitoring der minimalen Resterkrankung im peripheren Blut

Dennoch konnten wir zeigen, dass die quantitative Bestimmung der MRD im peripheren Blut wertvolle diagnostische Informationen geben kann. Wenngleich die absolute Menge an klonspezifischen Zellen im peripheren Blut zu einem einzelnen Zeitpunkt wenig klinisch relevante Hinweise ergab, konnten wir über die Dynamik der Veränderungen im Zeitverlauf klinische Rezidive durch einen Anstieg des 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Quotienten vorhersagen.

Nach einem medianen Verlauf von 61 Monaten erlitten 28 Patienten (64%) ein Rezidiv, hingegen befanden sich 16 (36%) Patienten weiterhin in Remission. Das sequentielle Monitoring der klonalen Zellen im PB zeigte, dass bei 22 von 28 Patienten (79%) mit einem Progress der Erkrankung zu einem früheren Zeitpunkt ein Anstieg des 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Quotienten erkennbar war. Dieser Anstieg konnte im Mittel schon 4 Monate (Reichweite:1-24 Monate) vor der Diagnose eines Rezidives festgestellt werden (Abbildung 3-10). Bei den Patienten mit anhaltender Remission nach Hochdosistherapie waren alle Patienten konstant MRD negativ im PB oder zeigten einen unveränderten niedrigen Tumorzellanteil ohne Anstieg über eine Zehnerpotenz hinweg.

**Tabelle 3-4: Patientencharakteristika der Patienten für die Analyse der MRD im PB**

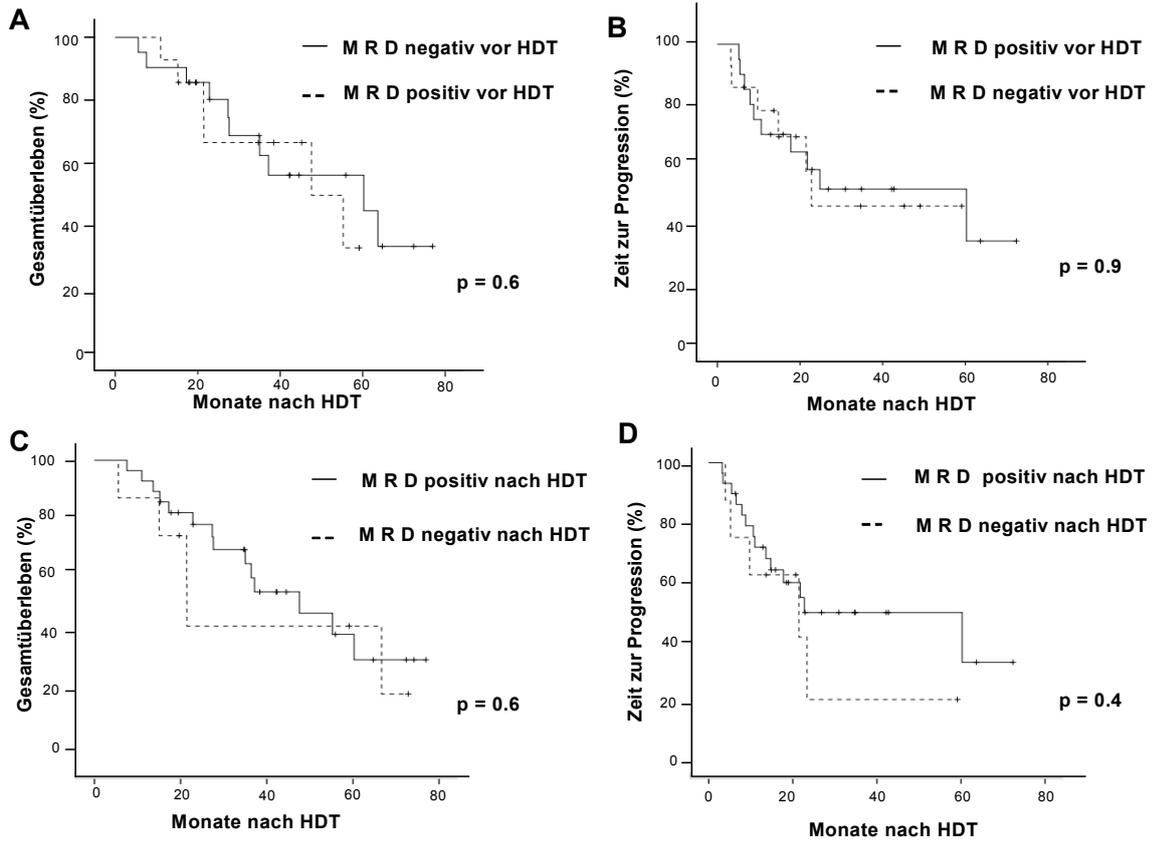
<b>Parameter</b>	<b>Patienten (n=44)</b>	<b>MRD + vor HDT (n=15)</b>	<b>MRD – vor HDT (n=21)</b>	<b>p</b>	<b>MRD + nach HDT (n=9)</b>	<b>MRD –nach HDT (n=34)</b>	<b>p</b>
Alter (Median; Range; Jahre)	41 (32 – 65)	57 (44 – 65)	54 (45 – 64)	0.2	51 (42 – 66)	54 (32 – 65)	0.4
Geschlecht (m : f; %)	64 : 36	64 : 36	62 : 38	0.8	63 : 37	66 : 34	0.9
Ig Subtyp (IgG : andere; %)	71 : 29	79 : 21	58 : 42	0.2	63 : 37	71 : 29	0.6
S+D Stadium (1+2 : 3; %)	14 : 86	14 : 86	7 : 93	0.5	12 : 88	10 : 90	0.2
ISS Stadium (1 : 2+3; %)	41 : 59	43 : 57	37 : 63	0.3	12 : 88	46 : 54	0.1
Metaphasezytogenetik (abnormal : normal; %)	29 : 71	21 : 79	26 : 74	0.9	33 : 67	29 : 71	0.6
CRP (Median; Range; g/dl)	0.6 (0.3 – 9.8)	0.6 (0.3 – 4.9)	0.8 (0.3 – 9.8)	0.5	0.5 (0.3 – 2.0)	0.7 (0.3 – 9.8)	0.4
LDH (Median; Range; U/l)	160 (79 – 346)	176 (94 – 346)	138 (79 – 285)	0.1	147 (107 – 346)	160 (79 – 335)	0.1
Albumin (Median; Range; g/l)	3.9 (2.5 – 5.1)	4.0 (2.5 – 5.1)	3.7 (2.9 – 5.1)	0.5	3.7 (2.9 – 4.9)	3.9 (2.5 – 5.1)	0.5
β2-Mikroglobulin (Median; Range; mg/dl)	3.0 (1.2 – 10.2)	3.0 (2.6 – 10.2)	3.2 (1.5 – 8.5)	0.1	3.2 (1.8 – 10.2)	2.6 (1.2 – 8.5)	0.8
Hämoglobin (Median; Range; g/dl)	11 (6.0 – 17)	10.9 (7.5 – 17 )	11.1 (6.0 – 14.2)	0.8	10.1 (7.8 – 13.6)	11.1 (6.9 – 17)	0.9
Thrombozyten (Median; Range; g/l)	258 (108 – 475)	279 (115 – 475)	233 (108 – 351)	0.1	283 (115 – 475)	248 (108 – 446)	0.1
Remission vor HDT (CR : vgPR: PR : MR+SD; %)	0 : 10 : 63 : 29	0 : 14 : 43 : 43	0 : 10 : 74 : 16	0.3	0 : 25 : 25 : 50	0 : 4 : 75 : 21	0.1
Remission nach HDT (CR : vgPR : PR : MR+SD; %)	7 : 23 : 63 : 7	12 : 12 : 64 : 12	7 : 18 : 71 : 4	0.4	8 : 64 : 14 : 14	6 : 63 : 25 : 6	0.9
Erhaltungstherapie (IFN : Thal : RIC; %)	43 : 39 : 18	24 : 43 : 33	48 : 43 : 9	0.3	50 : 25 : 25	49 : 38 : 13	1.0

Parameter	EFS		OS	
	Hazard Ratio	p	Hazard Ratio	p
Alter (< : > 60 years)	1.9 (0.7 – 4.7)	0.2	1.9 (0.7 – 4.8)	0.2
Myeloma Subtypen (IgG : andere)	1.3 (0.5 – 3.4)	0.6	1.2 (0.5 – 3.1)	0.7
S+D Stadium (1+2 : 3)	1.5 (0.4 – 6.7)	0.7	1.9 (0.4 – 8.5)	0.4
ISS Stadium ( 1 : 2+3)	1.5 (0.6 – 3.7)	0.7	1.2 (0.5 – 2.8)	0.7
Metaphasezytogenetik (normal : abnormal)	2.3 (1.0 – 5.4)	<b>0.06</b>	3.0 (1.3 – 7.1)	<b>0.01</b>
Albumin (< : > 3,5 g/l)	1.2 (0.5 – 3.0)	0.7	1.2 (0.5 – 3.0)	0.7
β2-Microglobulin (< : > 3,5)	1.2 (0.5 – 2.9)	0.7	1.3 (0.5 – 3.4)	0.5
LDH (< : > 200 U/l)	2.3 (0.9 – 5.9)	<b>0.08</b>	3.7 (1.4 – 10.0)	<b>0.01</b>
CRP (< : > 0,6 g/dl)	1.6 (0.7 – 3.9)	0.3	1.7 (0.7 – 4.1)	0.2
Hämoglobin (< : > 10 g/dl)	1.0 (0.4 – 2.6)	0.9	1.3 (0.5 – 3.4)	0.6
Thrombozyten (< : > 100 x10 <sup>3</sup> /μl)				
Remission vor HDT (CR+vgPR : andere)	1.4 (0.4 – 4.8)	0.6	1.3 (0.4 – 4.4)	0.7
Remission nach HDT (CR+vgPR : andere)	1.7 (0.3 – 4.8)	0.3	1.6 (0.4 – 4.3)	0.4
Erhaltungstherapie (INF : Thal/RIC)	2.4 (1.0 – 5.7)	<b>0.05</b>	1.7 (0.7 – 4.0)	0.3
MRD in PB vor HDT (negativ : positiv)	1.1 (0.4 – 3.1)	0.9	1.3 (0.4 – 3.7)	0.6
MRD in PB nach HDT (negativ : positiv)	1.6 (0.6 – 4.4)	0.4	1.4 (0.5 – 3.9)	0.6

**Tabelle 3-5: Univariate Analyse PB-Proben**

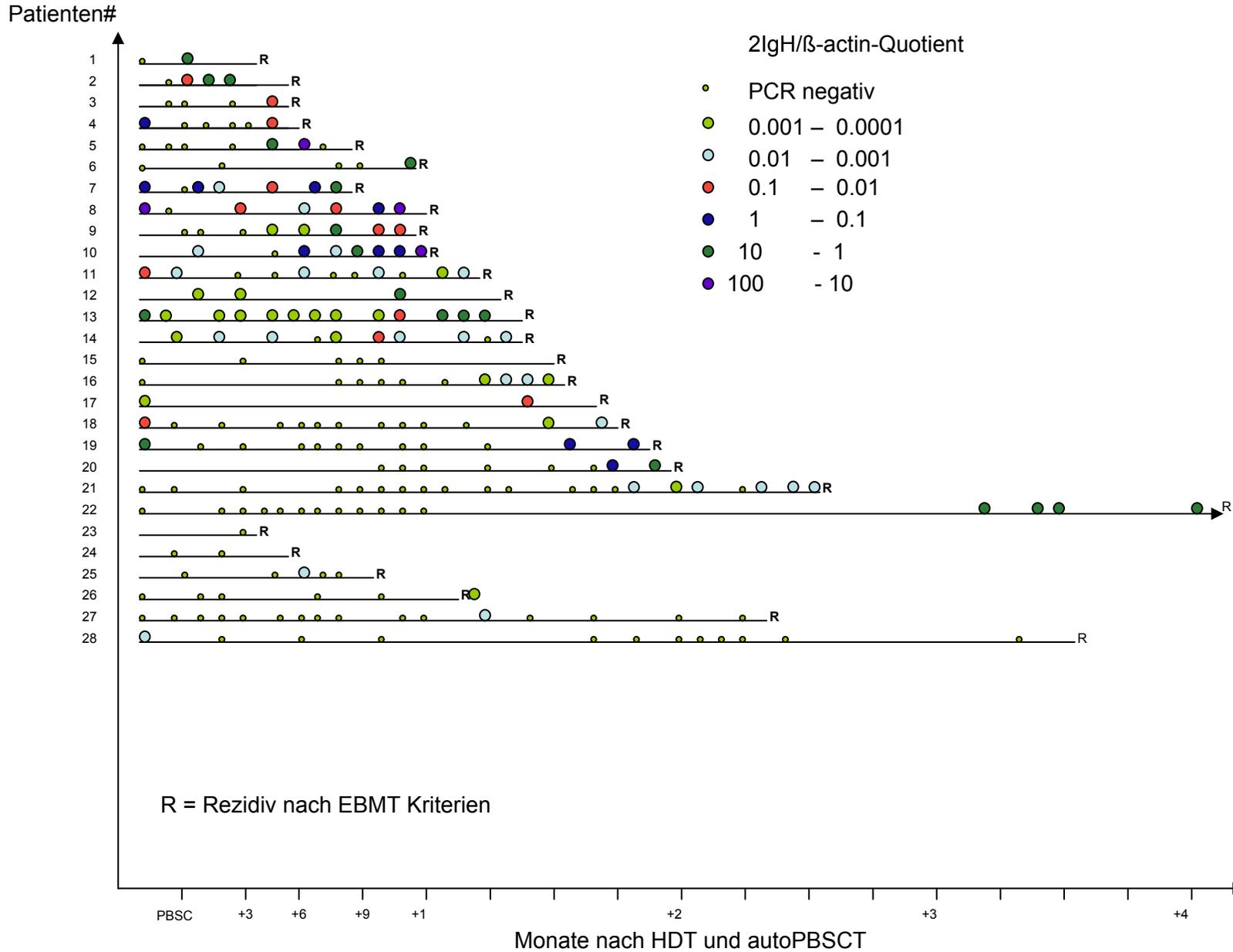
In Subgruppenanalysen zeigte sich, dass die Art der Erhaltungstherapie nach HDT die Kinetik der molekularen Erkrankungsprogression beeinflusst. Alle Patienten wurden einheitlich behandelt mit der Ausnahme der Erhaltungstherapie. Hier erhielten 47% (n=25) eine Erhaltungstherapie mit IFN und 45% (n=20) wurden mit Thalidomid behandelt. 9 Patienten entwickelten während der Therapie mit Thalidomid ein Rezidiv und 16 während der Therapie mit IFN.

Mit der Betrachtung der rezidierten Patienten konnte man bei allen Patienten mit Thalidomid (n=9) einen 2IgH/β-actin Quotient-Anstieg vor dem klinisch gesichertem Rezidiv bemerken. Hingegen konnte man nur in 56% der Fälle (n=9) bei Patienten mit einer INF-Erhaltungstherapie (n=16) einen frühen MRD-Anstieg beobachten. Demnach war die Detektionsrate signifikant höher in der Gruppe der Patienten, die Thalidomid als Erhaltungstherapie erhielten, im Vergleich zu den Patienten mit einer IFN-Erhaltungstherapie (p=0,01).



**Abbildung 3-9:** MRD in PB zu einem gegebenen Zeitpunkt. OS nach der MRD Positivität/Negativität in PB vor (A) und 3-9 Monate nach Transplantation (C). EFS nach der MRD Positivität/Negativität in PB vor (B) und 3-9 Monate nach Transplantation (D).

**Abbildung 3-10:** Sequentielles Monitoring der MRD im PB nach HDT und autoPBSCT bei 28 Patienten. Bei 22 Patienten (76%) konnte ein Anstieg der 2IgH/ $\beta$ -actin Kopien von mehr als 1 log-Stufe im PB vor dem klinischen Rezidiv gemessen werden.



## 4 Diskussion

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die quantitative Bestimmung der MRD eine prognostische Relevanz bei Patienten mit MM besitzt. Damit tragen die Ergebnisse der Arbeit dazu bei, Überzeugungsarbeit beim Fachpublikum zu leisten mit dem Ziel, dass in Zukunft ähnlich wie bei der ALL oder CML, die Bestimmung der MRD zu therapeutischen Entscheidungen bei Patienten mit MM genutzt werden kann.

### 4.1 Stellenwert des Grenzwertes im KM vor HDT

Auf der Basis von 53 Patienten konnten wir einen Grenzwert von 0,2% 2IgH/ $\beta$ -Actin-Quotient bei Patienten mit MM im KM vor HDT und autoPBSCT als unabhängigen prognostischen Parameter für das EFS definieren.

Zudem konnte gezeigt werden, dass in unserem Kollektiv ein Erreichen des MRD unter 0,2% 2IgH/ $\beta$ -Actin-Quotient vor HDT auch mit einem längeren OS verbunden ist. Der Einfluss der Höhe der MRD vor Transplantation auf den Behandlungsverlauf war unabhängig von den etablierten Prognosefaktoren wie z. B. dem ISS-Stadium, dem Ergebnis der zytogenetischen Untersuchung und auch der Art der Erhaltungstherapie nach HDT. Damit konnte die Reduktion der Tumorlast unter den genannten 2IgH/ $\beta$ -Aktin-Quotienten als Behandlungsziel vor Hochdosistherapie definiert werden. Als Konsequenz aus diesen Ergebnissen besteht die Notwendigkeit, die Induktionstherapie bei den Patienten mit hohen MRD Werten zu intensivieren. Man könnte z.B. neue Substanzen, wie Thalidomid {Glasmacher 2006}, Bortezomib {Richardson 2007} oder Lenalidomid {Dimopoulos 2007} in der Induktionsbehandlung einsetzen, die die Raten der kompletten Remission vor HDT von 15 % auf 50 % steigern können. Trotzdem muss in der Zukunft überprüft werden, ob ein Erreichen eines niedrigen MRD-Quotienten durch diese neuen Substanzen den gleichen Stellenwert wie ein niedriger MRD vor HDT durch konventionelle Chemotherapie besitzt.

Diese Arbeit zeigt, dass ein niedriger MRD-Wert vor HDT und autoPBSCT mit einem verlängerten EFS einhergeht. Ist der MRD Wert zu diesem Zeitpunkt hoch und erreicht erst niedrige Werte nach der HDT handelt es sich um eine intermediäre Prognosegruppe. Patienten mit hohen MRD-Werten vor und nach HDT haben die schlechteste Prognose. Diese Ergebnisse haben Paiva et al.

mittels einer anderen Methode, der Multiparameter-Durchflußzytometrie, an 157 Patienten in gleicher Weise gezeigt. In dieser Studie wurde ein Grenzwert von  $\leq 0,01\%$  mittels der Durchflußzytometrie ermittelt, der durch die Sensitivitätsgrenze der Methode bestimmt war. {Paiva 2008}

Zusätzlich haben andere Gruppen mit ähnlichen quantitativen Verfahren wie der „limiting dilution“ Methode oder einer „RQ-Consensus-Sonden-Strategie“ Grenzwerte von  $0,015\%$  {Bakkus 2004} und  $0,01\%$  {Sarasquete 2005} zum Zeitpunkt 3 Monate nach Hochdosistherapie festgelegt. Damit kann ein Grenzwert vor und nach HDT als durch verschiedene Methoden bestätigt angenommen werden, da bei der RQ-PCR relevante Unterschiede nur bei Differenzen um Zehnerpotenzen zu sehen sind.

Eine andere wichtige Beobachtung dieser Arbeit ist, dass die Messung des MRD-Levels auf molekularer Ebene vor HDT nicht nur ein neuer prognostischer Marker ist, sondern auch ein unabhängiger. Er gibt daher zusätzliche Informationen zum ISS-Stadium oder zur zytogenetischen Analyse, wie die multivariate Analyse gezeigt hat. Während das ISS-Stadium und die Zytogenetik bei Diagnosestellung erhoben werden, kann der MRD-Verlauf während späterer Behandlungsphasen erfasst werden und gibt daher zu einem späteren Verlauf zusätzliche Informationen.

Darüber hinaus ergibt sich aus den genannten Ergebnissen, die klare therapeutische Konsequenz bei den Hoch-Risiko-Patienten mit hoher MRD die Induktionstherapie zu intensivieren.

#### **4.2 Molekulares Monitoring der MRD im PB**

Mit Blick auf das zweite untersuchte Kompartiment – das PB – ist zu sagen, dass neben der prognostischen Bedeutung an einem bestimmten Zeitpunkt das sequentielle quantitative Monitoring der MRD eine besondere Rolle spielt. Das konnten die Ergebnisse dieser Arbeit anhand der Untersuchungen im PB von 47 Patienten zeigen. Bisher wurden zum sequentiellen MRD Monitoring bei Patienten mit Multiplen Myelom nur Einzelfälle oder kleine Patientengruppen mit maximal 27 Patienten publiziert {Lipinski 2001; Billadeau 1997; Rasmussen 2000}. In unserem verhältnismäßig großen Patientenkollektiv von 44 Probanden konnten wir ein Rezidiv der Erkrankung um im Median 4 Monate vor dem klinischen Progress der Erkrankung nach EBMT-Kriterien vorhersagen. Raab et al. fanden in ihrer Studie

mit einem kleineren Kollektiv ähnliche Ergebnisse, indem sie bei 5 von 6 Patienten ein Anstieg der klonalen Zellen im PB vor einem klinischem Rezidiv gemessen haben {Raab 2005}.

Wenn man die Rolle der MRD-Messung im PB klären will, muss man zunächst die klärende Frage stellen, inwieweit ein Unterschied zwischen der MRD-Messung im KM und PB besteht. Der Vergleich beider Kompartimente zeigt einen großen Unterschied in der Höhe der gemessenen klonalen Zellen mit einer Variation um den Faktor 10 bis 1000. Somit ist es notwendig die MRD auch im PB und nicht nur im KM zu untersuchen.

Die zweite Frage ist, welcher MRD Level im PB eine prognostische Relevanz zu einem einzelnen Zeitpunkt besitzt. Von anderen Arbeitsgruppen wurde durch die Benutzung der Durchflußzytometrie gezeigt, dass das Vorhandensein von zirkulierenden Myelomzellen im PB zu einem festgesetzten Zeitpunkt mit einem schlechten klinischen Verlauf der Patienten nach HDT und autologen PBSCT einhergeht. Dieses gilt für den Zeitpunkt der Diagnosestellung {Nowakowski 2005}, dem Zeitpunkt vor {Dingli 2006} sowie drei Monate nach HDT {Liu 2008} und autologer PBSCT. Für die IgH-PCR können zur Zeit leider keine konkreten Aussagen getroffen werden, da die Zahl der Probanden in den einzelnen Studien (n=6-20) zu gering für eine fundierte Aussage ist .{Cremer 2000; Lipinski 2001; Kiel 1999; Raab 2005; Billadeau 1997}. Aber hier können die Ergebnisse unserer Studie mit 47 Patienten weitere Informationen und erste Hinweise geben. Im Unterschied zu den veröffentlichten Daten, die von Arbeitsgruppen mittels FACS Analyse {Paiva 2008; Nowakowski 2005; Dingli 2006} erzielt worden sind, zeigen unsere Daten keinen prognostischen Nutzen des molekularen Ansprechen im PB in Bezug auf die EFS oder OS. Ein Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Daten könnte die geringere Probandenanzahl in unserer Studie im Gegensatz zu den oben genannten Studien sein. Auf der anderen Seite können unterschiedliche Methoden auch unterschiedliche Ergebnisse liefern. Während in der Durchflußzytometrie zirkulierende Plasmazellen in gezählt werden, werden bei der IgH-PCR alle klonalen Zellen erkannt, die im Fall des MM auch Zellen innerhalb der B-Zell-Reihe beinhalten kann. {Davies 2001} Somit könnten die zirkulierenden Plasmazellen, die bei der FACS-Analyse gezählt werden und die zirkulierenden B-Zellen, die bei der IgH-PCR detektiert werden, eine unterschiedliche pathophysiologische Rolle für die Krankheitsentwicklung besitzen und so die

unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

Eine dritte Frage wäre die Rolle der MRD, nicht an einem einzelnen bestimmten Zeitpunkt, sondern als sequentielle Betrachtung der dynamischen Veränderungen der residualen klonalen Zellen im PB. In diesem Zusammenhang sind Daten zu FACS-Analysen nicht publiziert, während Messungen mittels IgH-PCR in Studien mit geringen Probandenzahlen (n=1-6) zeigen, dass ein Anstieg der MRD im PB schon vor der klinischen Diagnose eines Rezidivs gemessen werden kann. {Cremer 2000; Cooke 1999} Wir können diese Daten mittels unserer Studie mit 47 Probanden bestätigen, in welcher ein molekulares Rezidiv in 76% der Patienten im Median schon 4 Monate vor dem klinischen Rezidiv hervorgesagt werden konnte. Diese interessante Erkenntnis weist auf eine Rolle dieser klonalen Zellen für die Entstehung eines Rezidivs hin. Demgegenüber ist die klinische Relevanz dieses Ergebnisses relativ gering, da die behandelnden Ärzte wahrscheinlich Patienten mit MM nicht aufgrund eines molekularen Rezidivs behandeln werden. In der gleichen Weise werden Patienten mit einem Rezidiv aus einer CR nicht behandelt, sondern erst wenn das Rezidiv mit einem Anstieg der Krankheitsaktivität oder einem Endorganschaden verbunden ist. {Durie 1975} In Kombination mit der Tatsache, dass die IgH-PCR nur bei circa 50% der Patienten mit MM aus technischen Gründen eingesetzt werden kann {Fenk 2004}, sehen wir kein großes Potenzial als Routinediagnostikum der Zukunft für das PB.

Allerdings könnte die RQ-IgH-PCR ein nützliches Mittel zur Bewertung des Therapieansprechens von neuen experimentellen Medikamenten sein, bei denen der Wirkmechanismus und der Grund für eine Medikamentenresistenz von Tumorzellen nicht bekannt ist. In dieser Arbeit konnte bei 54% der Patienten, die mit Interferon als Erhaltungstherapie nach HDT und autologer PBSCT behandelt wurden, ein Rezidiv vorhergesagt werden. Hingegen konnte das Rezidiv in 100% der Patienten, die als Erhaltungstherapie Thalidomid erhalten haben, vorhergesagt werden. In der Annahme, dass das Vorhandensein von klonalen Zellen ein Rezidiv bedeutet, ist zu spekulieren, ob eine Behandlung mit INF das Rezidiv nur in einigen Patienten abmildern kann und bei diesen Patienten ein Anstieg der klonalen Zellen über einige Monate beobachtet werden kann. Aber in der anderen Hälfte der Patienten kann das Rezidiv nicht verhindert werden und ein klinisches und molekulares Rezidiv werden zeitgleich gesehen. Im Gegensatz hierzu kann eine Erhaltungstherapie mit Thalidomid die Proliferation von Tumorzellen zum

Zeitpunkt des Rezidivs in allen Patienten für eine gewisse Zeit dämpfen und bei all diesen Patienten sind währenddessen klonale Zellen im PB nachweisbar. Dieses könnte ein Grund für die Verlängerung der Remissionsdauer nach HDT und autologer PBSCT durch eine Erhaltungstherapie mit Thalidomid sein.

#### **4.3 Vergleich der MRD-Messung mit konventionellen Remissionsparametern**

Zu klären bleibt die Frage warum die molekulare MRD-Diagnostik und die konventionellen Methoden, wie die Proteinelektrophorese, die Immunfixation und die Plasmazellkonzentration im KM an denselben Zeitpunkten unterschiedliche Ergebnisse liefern.

Diese Arbeit zeigt, dass die Anzahl der klonotypischen Zellen unabhängig vom Remissionsstatus vor HDT ist. Dieser wird durch die Proteinelektrophorese, die Immunfixation und die Anzahl der Plasmazellen im KM definiert. Andere Gruppen zeigten, dass der Remissionsstatus {Majolino 1999; Nadal 2004; O'Shea 2006} oder die Anzahl der Plasmazellen im KM vor HDT {O'Shea 2006; Nadal 2004; Rajkumar 2001} mit einem besseren Überleben korrelieren. Beide prognostischen Parameter haben aber in unserem Kollektiv keinen prognostischen Einfluss auf EFS und OS. Dieses Ergebnis geht mit anderen Veröffentlichungen {Rajkumar 1999; Moreau 2002} einher, die keinen signifikanten Einfluss dieser Parameter auf das Überleben der Patienten veröffentlicht haben.

Die Tatsache, dass die Messung der MRD nicht mit dem Remissionsstatus sowie der Plasmazellinfiltration im KM korreliert, könnte anhand von folgenden Überlegungen erklärt werden. Der Remissionsstatus basiert hauptsächlich auf der Messung von Paraproteinkonzentrationen im Serum. Die Paraproteine von individuellen Patienten besitzen eine variable Halbwertszeit, die von ein paar Tagen bis hin zu mehreren Wochen betragen kann. Diese Spanne ist größtenteils abhängig von den Ig-Subtypen/Subklassen und deren Konzentration. {Mead 2004; Morell 1970} Somit könnte das Paraprotein eventuell für mehrere Wochen im Serum gemessen werden, während er maligne Zellklon schon auf einen niedrigeren oder nicht mehr messbaren Wert reduziert ist. Bei anderen Patienten könnte es zudem zu einer Verlagerung der Sekretion von intakten Immunglobulinen zu freien Leichtketten kommen. In diesem Fall würde man mit konventionellen Messungen keine Tumoraktivität messen, mit molekularen jedoch schon.

Zum anderen ist die histologische Beurteilung von Knochenmarksaspiraten von einem „sampling error“ betroffen. Weiter können gesunde Plasmazellanzahlen in Knochenmarksausstrichen nur schwer vom malignen Klon differenziert werden. Die Messung der MRD auf molekularer Ebene ist unabhängig von den zuvor genannten Einflüssen. Außerdem kann die PCR-basierte Messung der MRD in der Abwesenheit von messbarer Krankheitsaktivität, die durch serologische und histologische Veränderungen gemessen wird, die Präsenz von klonalen Zellen zeigen. Die nichts mit Plasmazellen gemein hat, sondern als Vorläuferzellen innerhalb der Gruppe der B-Zellen auftreten. Unterschiedliche Gruppen zeigten, dass eine große Anzahl an klonalen CD19+B-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit MM zirkulieren {Bergsagel 1995; Szczepek 1998}. Diese Zellen persistieren sogar bei Patienten innerhalb ihrer Krankheitsremission nach HDT {Kiel 1999; Rottenburger 1999}. Klonale CD138-B-Zellen wurden zudem im Knochenmark {Billadeau 1993} gefunden und diese Zellen stellen ein größeres Potenzial zum klonalen Wachstum als CD138+B-Zellen dar {Matsui 2004}. Die klonalen B-Zellen könnten somit „Stammzellen“ des MM darstellen mit der Fähigkeit sich zu vermehren und sich in maligne Plasmazellen zu differenzieren. Dieses ist im besonderen Interesse, da die Plasmazellen eines MM sensitiv auf die eingesetzten Wirkstoffe sind, wohingegen die klonalen B-Zellen gegen diese Wirkstoffe resistent sind {Matsui 2008}.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir eine valide Methode zur Bestimmung der quantitativen MRD bei Patienten mit Multiplen Myelom etablieren konnten. Die Ergebnisse aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut zeigen, dass der MRD-Diagnostik bei dieser Entität prognostische Bedeutung zukommt und dass die quantitative MRD-Bestimmung damit geeignet sein kann, um in Zukunft therapeutische Interventionen zu steuern.

Bei den Leukämien hat es Jahre gedauert bis die MRD Diagnostik zu therapeutischen Entscheidungen geführt hat und weitere Jahre bis sie bei der chronisch myeloischen Leukämie zum Standardverfahren wurde. Beim Multiplen Myelom ist der Anfang zu dieser Entwicklung gemacht.

## 5 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom ist eine maligne B-Zellerkrankung, die durch eine monoklonale Vermehrung von Plasmazellen im Knochenmark charakterisiert ist. Trotz intensivster Bemühungen ist eine Möglichkeit der Heilung des multiplen Myeloms bis heute nicht gegeben. Eine Verbesserung der Prognose der Patienten mit MM wurde aber durch die Einführung der Hochdosistherapie mit anschließender autologer Blutstammzelltransplantation erreicht. Trotzdem enden alle Krankheitsverläufe in einem Rezidiv, an dem die Patienten letztendlich versterben. Der Ursprung eines solchen Rezidivs ist eine kleine Anzahl von persistierenden Tumorzellen, auch minimale Resterkrankung genannt, die der zytotoxischen Wirkung der vorangegangenen Therapieoptionen entgangen sind. Die minimale Resterkrankung bei Patienten mit multiplen Myelom wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der LightCycler-Technologie mit einer quantitativen real-time Polymerasekettenreaktion des patientenspezifischen Schwerekettenlokus des IgH gemessen und eine Verlaufsbeobachtung der Verläufe der minimalen Resterkrankung im Knochenmark und peripheren Blut der Patienten durchgeführt.

Da das Level der minimalen Resterkrankung im peripheren Blut im Median 100x niedriger als in Knochenmarksproben, die am selben Tag gewonnen wurden, waren 2 separate Analysen notwendig. Im Knochenmark konnte ein prognostisch relevanter Grenzwert von 0,2 % IgH/2 $\beta$ -aktin Quotient definiert werden. Mittels multivariater Analyse konnte gezeigt werden, dass dieser Grenzwert ein unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben und die Zeit zur Progression darstellt ( $p < 0,001$ ). Patienten unterhalb dieses ermittelten Grenzwertes hatten ein verkürztes Gesamtüberleben (20 vs. 35 Monate) und progressionsfreie Zeit (45 vs. 70 Monate). Im peripheren Blut konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der gemessenen minimalen Resterkrankung und dem Krankheitsverlauf gefunden werden. In einer sequentiellen Beobachtung von 28 Patienten mit Rezidiv konnte jedoch bei 22 Patienten das Rezidiv im Median 4 Monate vor der klinischen Diagnosestellung mittels der EBMT Kriterien vorhergesagt werden.

Zusammenfassend, lässt sich sagen, dass die RQ-IgH-PCR eine sensitive Methode zur Messung der minimalen Resterkrankung des multiplen Myeloms darstellt und die quantitative Bestimmung der minimalen Resterkrankung damit geeignet sein kann, um in Zukunft therapeutische Interventionen zu steuern.

## 6 Zusammengefasste Publikationen

Fenk R, Korthals M, **Sehnke N**, Kobbe G, Steidl U, Graef T, Rohr U-P, Ruf L, Hoyer B, Neumann F, Haas R, Kronenwett R. Pre-transplantation level of minimal residual disease in bone marrow is a prognostic parameter in patients with multiple myeloma, *Onkologie*; 281-275 (2005)

Fenk R, Korthals M, **Sehnke N**, Bruns I, Czibere A, Zohren F, Safaian N, Dienst A, Ruf L, Neumann F, Haas R, Kronenwett R, Kobbe G. Molecular level of minimal residual disease in bone marrow before high-dose therapy and autologous stem cell transplantation is a prognostic parameter in patients with multiple myeloma, *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*; 110: 1496 (2007)

**Sehnke N**, Korthals M, Bruns I, Dienst A, Hovermann M, Czibere A, Zohren F, Kondakci M, Neumann F, Kronenwett R, Kobbe G, Haas R, Fenk R, Impact of molecular assessment of disease activity in the peripheral blood of patients with multiple myeloma undergoing high-dose therapy, *Onkologie* (2008)

Korthals M, **Sehnke N**, Kronenwett R, Bruns I, Czibere A, Zohren F, Haas R, Kobbe G, Fenk R. The level of minimal residual disease in the bone marrow of patients with multiple myeloma before high-dose therapy and autologous blood stem cell transplantation is an independent prognostic parameter  
*Submitted*

**Sehnke N**, Korthals M, Kronenwett R, Bruns I, Kobbe G, Haas R, Fenk R, Molecular monitoring of minimal residual disease in the peripheral blood of patients with multiple myeloma.  
*Submitted*

## 7 Literaturverzeichnis

1. Alexanian, R. *et al.* Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens, *JAMA* **9**, 1680–1685, (1969).
2. Attal, M. *et al.* A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome, *N. Engl. J. Med.* **2**, 91–97, (1996).
3. Bakkus, M. H. *et al.* Post-transplantation tumour load in bone marrow, as assessed by quantitative ASO-PCR, is a prognostic parameter in multiple myeloma, *Br J Haematol* **5**, 665–674, doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05120.x, (2004).
4. Barlogie, B. *et al.* Treatment of multiple myeloma, *Blood* **1**, 20–32, doi:10.1182/blood-2003-04-1045, (2004).
5. Bensinger, W. I. The current status of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma, *Leukemia* **10**, 1683–1689, doi:10.1038/sj.leu.2404333, (2006).
6. Bergsagel, P. L. *et al.* In multiple myeloma, clonotypic B lymphocytes are detectable among CD19+ peripheral blood cells expressing CD38, CD56, and monotypic Ig light chain., *Blood* **2**, 436–447, (1995).
7. Billadeau, D., Ahmann, G., Greipp, P. & Van Ness, B. The bone marrow of multiple myeloma patients contains B cell populations at different stages of differentiation that are clonally related to the malignant plasma cell., *J Exp Med* **3**, 1023–1031, (1993).
8. Billadeau, D., Prosper, F., Verfaillie, C., Weisdorf, D. & Van Ness, B. Sequential analysis of bone marrow and peripheral blood after stem cell transplant for myeloma shows disparate tumor involvement., *Leukemia* **9**, 1565–1570, (1997).
9. Campana, D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia, *Semin. Hematol.* **1**, 100–106, doi:10.1053/j.seminhematol.2008.09.001, (2009).
10. Child, J. A. *et al.* High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma, *N. Engl. J. Med.* **19**, 1875–1883, doi:10.1056/NEJMoa022340, (2003).
11. Cooke, F. *et al.* Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America, *N. Engl. J. Med.* **21**, 2133–2142, doi:10.1056/NEJMoa070596, (2007).
12. Corradini, P. *et al.* Molecular remission after myeloablative allogeneic stem cell transplantation predicts a better relapse-free survival in patients with multiple myeloma, *Blood* **5**, 1927–1929, doi:10.1182/blood-2003-01-0189, (2003).
13. Cremer, F. W. *et al.* Evaluation of the kinetics of the bone marrow tumor load in the course of sequential high-dose therapy assessed by quantitative PCR as a predictive parameter in patients with multiple myeloma, *Bone Marrow Transplant.* **8**, 851–858, doi:10.1038/sj.bmt.1702628, (2000).
14. Davies, F. E. *et al.* The impact of attaining a minimal disease state after high-dose melphalan and autologous transplantation for multiple myeloma, *Br. J. Haematol.* **3**, 814–819, (2001).

15. Dietel, M., Dudenhausen, J. W., Suttrop, N. & [Ed.]. *Harrisons Innere Medizin. Deutsche Ausgabe. In Zusammenarbeit mit der Charite* (ABW Wissenschaftsverlagsgesellschaft, 2003).
16. Dimopoulos, M. *et al.* Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma., *N Engl J Med* **21**, 2123–2132, doi:10.1056/NEJMoa070594, (2007).
17. Dingli, D. *et al.* Flow cytometric detection of circulating myeloma cells before transplantation in patients with multiple myeloma: a simple risk stratification system, *Blood* **8**, 3384–3388, doi:10.1182/blood-2005-08-3398, (2006).
18. Durie, B. G. & Salmon, S. E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival, *Cancer* **3**, 842–854, (1975).
19. Fenk, R. *et al.* Levels of minimal residual disease detected by quantitative molecular monitoring herald relapse in patients with multiple myeloma, *Haematologica* **5**, 557–566, (2004).
20. Fenk, R., Haas, R. & Kronenwett, R. Molecular monitoring of minimal residual disease in patients with multiple myeloma, *Hematology* **1**, 17–33, doi:10.1080/10245330310001638965, (2004).
21. Glasmacher, A. *et al.* A systematic review of phase-II trials of thalidomide monotherapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma, *Br. J. Haematol.* **5**, 584–593, doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05914.x, (2006).
22. Goldschmidt, H. *Das Multiple Myelom (Plasmozytom). Uni-Med Science* (UNI-MED Verlag AG, 2002).
23. Greipp, P. R. *et al.* International staging system for multiple myeloma, *J Clin Oncol* **15**, 3412–3420, doi:10.1200/JCO.2005.04.242, (2005).
24. Kiel, K. *et al.* Analysis of circulating tumor cells in patients with multiple myeloma during the course of high-dose therapy with peripheral blood stem cell transplantation., *Bone Marrow Transplant* **10**, 1019–1027, doi:10.1038/sj.bmt.1701767, (1999).
25. Ladetto, M. *et al.* Real-time polymerase chain reaction in multiple myeloma: quantitative analysis of tumor contamination of stem cell harvests, *Exp Hematol* **6**, 529–536, (2002).
26. Lipinski, E., Cremer, F. W., Ho, A. D., Goldschmidt, H. & Moos, M. Molecular monitoring of the tumor load predicts progressive disease in patients with multiple myeloma after high-dose therapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant* **10**, 957–962, doi:10.1038/sj.bmt.1703276, (2001).
27. Liu, H. *et al.* Flow cytometric minimal residual disease monitoring in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: a retrospective study, *Leuk. Lymphoma* **2**, 306–314, doi:10.1080/10428190701813018, (2008).
28. Matsui, W. *et al.* Characterization of clonogenic multiple myeloma cells., *Blood* **6**, 2332–2336, doi:10.1182/blood-2003-09-3064, (2004).

29. Mayo, M. M. & Johns, G. S. Serum free light chains in the diagnosis and monitoring of patients with plasma cell dyscrasias, *Contrib Nephrol*, 44–65, doi:10.1159/000096760, (2007).
30. Mead, G. P. *et al.* Serum free light chains for monitoring multiple myeloma, *Br. J. Haematol.* **3**, 348–354, doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05045.x, (2004).
31. Moreau, P. *et al.* Long-term results (12 years) of high-dose therapy in 127 patients with de novo multiple myeloma, *Leukemia* **9**, 1838–1843, doi:10.1038/sj.leu.2402613, (2002).
32. Nadal, E. *et al.* High-dose therapy/autologous stem cell transplantation in patients with chemosensitive multiple myeloma: predictors of complete remission, *Bone Marrow Transplant* **1**, 61–64, doi:10.1038/sj.bmt.1704313, (2004).
33. Neumann, F. *et al.* Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction for diagnosis of BCR-ABL positive leukemias and molecular monitoring following allogeneic stem cell transplantation, *Eur J Haematol* **1**, 1–10, (2003).
34. Nowakowski, G. S. *et al.* Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma, *Blood* **7**, 2276–2279, doi:10.1182/blood-2005-05-1858, (2005).
35. Paiva, B. *et al.* Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation, *Blood* **10**, 4017–4023, doi:10.1182/blood-2008-05-159624, (2008).
36. Raab, M. S. *et al.* Molecular monitoring of tumour load kinetics predicts disease progression after non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma, *Ann Oncol* **4**, 611–617, doi:10.1093/annonc/mdi123, (2005).
37. Rajkumar, S. *et al.* Abnormal cytogenetics predict poor survival after high-dose therapy and autologous blood cell transplantation in multiple myeloma, *Bone Marrow Transplant* **5**, 497–503, doi:10.1038/sj.bmt.1701943, (1999).
38. Rajkumar, S. V. *et al.* Methods for estimation of bone marrow plasma cell involvement in myeloma: predictive value for response and survival in patients undergoing autologous stem cell transplantation, *Am J Hematol* **4**, 269–275, (2001).
39. Rajkumar, S. V. & Greipp, P. R. Prognostic factors in multiple myeloma, *Hematol Oncol Clin North Am* **6**, 1295–314, xi, (1999).
40. Rasmussen, T., Jensen, L., Honoré, L. & Johnsen, H. E. Frequency and kinetics of polyclonal and clonal B cells in the peripheral blood of patients being treated for multiple myeloma., *Blood* **13**, 4357–4359, (2000).
41. Rasmussen, T., Jensen, L. & Johnsen, H. E. The CD19 compartment in myeloma includes a population of clonal cells persistent after high-dose treatment, *Leuk Lymphoma* **5**, 1075–1077, (2002).
42. Rasmussen, T., Poulsen, T. S., Honore, L. & Johnsen, H. E. Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay, *Exp Hematol* **9**, 1039–1045, (2000).
43. Richardson, P. G., Mitsiades, C., Schlossman, R., Munshi, N. & Anderson, K. New drugs for myeloma., *Oncologist* **6**, 664–689, doi:10.1634/theoncologist.12-6-664, (2007).

44. Rottenburger, C. *et al.* Clonotypic CD20+ and CD19+ B cells in peripheral blood of patients with multiple myeloma post high-dose therapy and peripheral blood stem cell transplantation., *Br J Haematol* **2**, 545–552, (1999).
45. Sarasquete, M. E. *et al.* Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry, *Haematologica* **10**, 1365–1372, (2005).
46. Singhal, S. *et al.* Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma, *N. Engl. J. Med.* **21**, 1565–1571, (1999).
47. Szczepek, A. J. *et al.* A high frequency of circulating B cells share clonotypic Ig heavy-chain VDJ rearrangements with autologous bone marrow plasma cells in multiple myeloma, as measured by single-cell and in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction., *Blood* **8**, 2844–2855, (1998).

## **8 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1-1: Das Multiple Myelom

Abbildung 1-2: IgH-cDNA-Sequenz

Abbildung 1-3: V(D)J-Rearrangement

Abbildung 1-4: Somatische Hypermutation

Abbildung 2-1: Düsseldorfer Therapiestudie 2001

Abbildung 2-2: Arbeitsschritte zur Ermittlung der MRD beim Multiplen Myelom

Abbildung 3-1: Düsseldorfer Therapiestudie 2001: Erhaltungstherapie

Abbildung 3-2: Sondenstrategie und Anteil der verwendeten Sonden

Abbildung 3-3: Etablierungsergebnisse

Abbildung 3-4: Vergleich des 2IgH/ $\beta$ -actin Quotienten in KM- und PB-Proben

Abbildung 3-5: MRD im KM und EFS und OS

Abbildung 3-6: MRD im KM und Remissionsstatus

Abbildung 3-7: MRD im PB und verschiedene klinische Merkmale

Abbildung 3-8: MRD im PB und der klinische Verlauf

Abbildung 3-9: MRD im PB und EFS und OS

Abbildung 3-10: Sequentieller 2IgH/ $\beta$ -actin-Quotientenverlauf im PB von Patienten mit Rezidiv

## **9 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 3-1: Patientencharakteristika der Patienten in der MRD-Analyse aus dem KM

Tabelle 3-2: Definition eines Grenzwertes für MRD im KM

Tabelle 3-3: Univariate Analyse und multivariate Analyse der KM-Proben

Tabelle 3-4: Patientencharakteristika der Patienten in der MRD-Analyse aus dem PB

Tabelle 3-5: Univariate Analyse der PB-Proben

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
ASO	allel-spezifisches Oligonukleotid
autoPBSCT	autologe Blutstammzelltransplantation
CDR	complementary determining regions
CML	chronisch myeloische Leukämie
CR	komplette Remission
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GvHD	Graft-versus-Host-Erkrankung
HDT	Hochdosistherapie
IgH	Imunglobulin-Schwerkettenloкус
INF	Interferon
ISS	International Staging System
KI	Konfidenzintervall
KM	Knochenmark
MM	Multiples Myelom
MRD	minimale Resterkrankung
MRSD	minimales Ansprechen/ stabile Erkrankung
MuLv-RT	Moloney murine leukemia virus
OS	Gesamtüberleben
PB	peripheres Blut
PBS	Phosphat gepufferte Salzsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PR	partielle Remission
RIC	reduzierte intensiviert konditionierte allogene Transplantation
RNA	Ribonukleinsäure
RQ	real-time quantitative
SD	Salmon und Durie
Thal	Thalidomid
TTP	Zeit zur Progression
Upm	Umdrehungen pro Minute
vgPR	sehr gute partielle Remission

## Ermittelte Sequenzen der Patienten

### Nr. CDR3-Sequenz und Bindungsstellen der Primer und Sonden

- 1 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGATGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT  
CTCCTGTAAAGGCTTCTGGTTACATCTTTACCAATTATGGTGT**CAGCTGGGTGCGACAGGC**  
CCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGAT**CAGCGTTATAATGGTAATACAAAGT**  
**ATGCACAGAGACTCCAGGGC**AGAGTCACCATGACCACAGACATAGCCACGAGCACAGTG  
TACATGGAGGTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTCTACTACTGTGCGAGAGA  
**TCAGATGATCGTACTGGTACCGTGTGCCTTCGTA**CCCGACACTAC**GACCACGGCATG**  
**GACG**TCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGT
- 2 AC**ACGGCTCTGTATTACTGTGCGAAA****TGTGGTGGGTTCTAGGATACTGTAGTGGTAAGA**  
**ATTATCCCGGGAAC**ACTACTTTGACAAGTGGGGTCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCC  
TCA +LJH
- 3 AGGTGCAGCTGdGAGTcdGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTC  
CTGTGCAGCCTCTGGTTTACCTTTGAT**GATTATGCCATGCAC**TGGG**CCGGCAAGTTCC**  
AGGGAGGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGT**GTTAGTTGGGATAGTGGTACCATCGGCTAT**  
**GCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCC**CCATCTCCAGAGACAACGCCAAGACCTCCCTGTA  
TCTGCAAATGAACAGTCTGAG**AACTGAGGACTCGGCCTTGTATTAT**TGTGTAAAAT**CTAGC**  
**GATATTTGACTGGTTTCGGGTGGA**TIGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
TCCTCAGCC +LJH
- 4 GAGTCGAGGACACGGCTGTTTATT**ACTGTGCGAGAGTACAAATACCAG****CTGCTCTTGATT**  
**CCTGGGGCCA**GGGACCCT**GGTCACCGTCTCCTCAG** +JH1245?
- 5 TGTTTATTACTGT**GCGAGAGATGAAGTGGGAGTTGC****GGGGGACTACTGGGGCCAGG**GAA  
CCCT +JH1245
- 6 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCGGGGGAGTCCCTGAGACT  
CTCCTGTGCAGTCTCTGGACTCACGTT**CAGTCTCCATAGCATACACT**TGGGTCCGCCAGG  
CTCCAGGGAAGGGGC**TGGAGTGGGTCTCCTCTGTTA**GTGGTACTGGTA**ATTTCAGATT**  
**TACGCAGACTCAATGAAGGGCCGATTACC**ATCTCCAGAGACAACGCCAAGA**AITCAGTI**  
TCTCTTCAATTGGGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGG**CTGTCTATTACTGTGCGACATCA**  
**CAAAGAAAA**GTGGCTGGCGAAC**TTGACTTCTGGGGCCAAGGAACCC**TGGTCATCGTCTC  
CTCAGCC
- 7 AGGTGCAGCTGCTGGAGTCGGGAGCAAGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
ACTTGCAGTGTCTCCGGTGGCTCCGTCAAA**ACTTACTACTGGAGT**TGGATCCGGCAGTCC  
CCAGGGAAG**GGACTGGAGTGGATTGGGTATGT**CTTT**GACACTGGGACCACCAATTACAA**  
**CCCCTCTCAAGAGT**CGAGTCACCATATCAATTGACACGTCAAAGAACCAGTTCTACCT  
GAGCCTGACCAGTGTGACCCTGCGGACACGGCCGTTTACTACTGTGCGAG**AGGGGTGG**  
**AACAGCAGCTGGTACAT**CACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAATCCAGGT**CACCGTC**  
TCCTCGGCC +LJH
- 8 AGGTGCAGCTGswGsAGTCGGGCCAGGCCTTCTTAAGCCTTCGGAGACTCTATCCCTCA  
CCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCGTCCGC**AGCGAGAAGAACTACTGGGCCTGGATT**CG  
GCAGTCCCAGGGAAG**GGACTGGAGTIGATTGGATACATCTATTACAGTGGAAGTACCA**  
**ACTACAGCCCCCTCTTTAGGAGT**CGAGTCACCATGTCAGTGGACACGTCCGAGAATCAG  
GTCTCCTTGAGGCTGCCTTTATGACCGCTGCGGA**CTCGGCCATATATTACTGTGCGAGA**  
**GGTCTACTGGGGGCCTGGACTTTTGGGGTTT**TGACA**ACTGGGGC**CAGGGAACCCTGGT  
CACCGTCTCTC
- 9 AGGTGCAGCTGCTGGAGTCAGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACT  
CTCCTGTGCAGCGTCTAGATTIACATTCAGTA**AATTATGGCATGCACTGGATCCGCCAGGC**  
**CCCAGGCAAGGGGCTGGA****GTGGGTGGCTCTTATATGGAGTGATGGACGTATTAAGATT**  
**ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG**TTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTAT  
ATTACAAATGCACAGICTGAGAGICGGCGGACGCGGCTCTCTATTACTG**TCCGAGAAAGT**  
**CGGGAATAACAACAGGT**CGGGTCTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGT  
CGCCGCAGCA +LJH
- 10 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGAC**GATTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGT**  
TCCAGGGAAGGGGCTGGAATGCGTCT**GCAATATTAATTGGAATGGTATTACACAGAGT**  
**GTGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACC**ATTCCAGAGACAACGCCAAGA**ACTCCCTGT**  
ATCTGCAAATGAATGGTCTGAGAGCCGATGACACGGCCTTGTATCAC**TGTACGAGAGACC**

**TCTACGATGGTAAC****TCGGGCGCG**GGT**TCCACCCCTGGGGC**CAGGGAACCCTGGTCAC  
 CGTCTCCTCAGGT  
 11 ACACGGCTCTGTATTA**CTGTGCAAAAGATCCTAACTGGGGGG****TGGGGAAGGCTTCTTT**  
**GACTCCTG**GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT +JH1245  
 12 AGGTGCAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGG  
 CTCCAGGGAAGGG**GCTGGAGTGGCTCTCAGG**ATTAGTGGTAGTGGTGGAAACACATAC  
**TACGCAGACTCCGTGAAGGGCC**GATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCT  
 GTATCTGCAAATGAACAGCCCGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAC**TGTGCGAAATT**  
**GAAAGGTGGAAGCTACTACGATTCCGTCCTTGACTACT**GGGGCCAGGGAACCCTGGTCA  
 CCGTCTCCTCAGGT  
 13 AGGTGCAGCTGTGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTACAGCCTGGGGAGTCCCTGAGACTCTC  
 CTGTGCAGCTTCTGGATTCAACTTTGGAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCGGGCTC  
 CAGGGAAGGGGCTAGAGTGGGTCTCGAGTATTAGTGGTACTGGTGGAAAGCACATACTAC  
**GCAGATTCCGTGAAGGGCCGTTACCATI**TCCAGAGACAAGTCCAAGAACACGCTGTAT  
 CTGGAAATGAACAGCCTGAAAGTCGAGGACACGGCCGTTATTCTGTGCGAAA**GATCGG**  
**GCTTTGTACGATTCTGCAATAAAI**TTTGATATCTGGGGCCAAGGACAAAGGTCACCGTC  
 TCTTCAGCA +LJH  
 14 ACACG**GCTCTGTATTACTGTGCGAGAAGCCCCACCCGGGG****AGGGTGGATCACTACTTT**  
**GACTACTGG**GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG +JH1245  
 15 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGCTGAGGTAAGAGGCCTGGGGCCTCAGTAAGGT  
 CTCCTGCAAGGTTCCGGAGACTCCCTCAGTGAATTATCCATT**CAC**TGGGTGCGACAGGC  
 GCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGAGGTTTTGATCCTGAAGATGTTAAATT**GCCT**  
**ACGGACAGAACTCCAGGGC**AGAGTCTCCATGACCGAGGACACATCTTCAGACACGGCC  
**CGCCCCACCCGGTGTCAACCCCGGAT**GATGCTTTTGATATCTGGGGCCAGGGGACAATGG  
 TCACCGTCTTTCAGCATCCCCGACCAGCCCCAAGGTCTTCCCGCTGAGCCTCTGCAGCA  
 CCCAGCCAGATGGGAACGTGGTCATCGCCTGCCTGGTCCAGGGCTTCTGAATTCCCAAG  
 GGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCC  
 CAATTCCG +LJH  
 16 AGGTGCAGCTGAGAGTCGGGCCAGGACTAGTGAACCTTCACAGACCCTGTCCCT**CAC**  
**CTGCACTGTCTCTGGTGGTACCATCAGC**AGTGGTGGTACTACTGGA**ACTGGATCCGCCA**  
 GCACCCAGGGAAGGGCCCTGGAGTGGATTGGT**TACATCTATTACACTGGAAGCACCTACT**  
**ACAACCCGTCCTGAAAGAGTCCGTTACCATATTAGTAGACACGTCTAAGAACCAATTCT**  
 CCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCCGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAG**AGAT**  
**TTAATTCCGTTGGTGGATTCCA**CCCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC  
 CTCAGCATCCCCGACCAGCCCCAAGGTCTTCCCGCTGAGCCTCTGCAGCACCCAGCCAG  
 ATGGGAACGTGGTCATCGCCTGCCTGGTCCAGGGCTTCTGAATCCCAAGGGCGAATTCT  
 GCAGATAT  
 17 GGTGCAGCTG<sub>sw</sub>GGAGTC<sub>d</sub>GGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC  
 TCCTGTGCAGACTCTGGACTCACCTTCAAG**AATTATGATATGCACT**GGGTCCGCCAGGCT  
 CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC**CATTATATCATTGATGGCACGTACACAGATTI**  
**CGCAGACTCCGTGAAGGGCC**GATTACCGTCTCCAGAGACAATTCCAAGAAGATCCTCTA  
 TCTCCAAATGAACA**ACGTGAGACTGACGACACGGCTCTATATT****TTGTGCGAGAGGGCGG**  
**ATTACCATAITGTGATGAAGAGTCTATTTT**TGACTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGT  
 CACCGTCTCCTCAGCA  
 18 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAAG**AGCCATGCCATGCACT**GGGTCCGCCAGG  
 CTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTAT**GATGGAAGTAAAACTI**  
**TATGCA**GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACGATTCCAAGGACACGCT  
 GTTCTGGAAATGAACAACCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTACTG**TTCGAGAGT**  
**ACTGTTAGCAGCAGCCTGTAAGCATTGCCCTATGGACGTCTG**GGGGCCAAGGGACCAG  
 GTCACCGTCTCCTCAGGT  
 19 AGGTGCAGCTGTGAGTCCGGGGGAG**GCCTAGTCAAGCCTGGAGA**GTCCCTGAGACTCTC  
 CTGTGCAGCCTCTGGAC**CCAACAGCGGCCACCCAGA****CGAGGGGCAAGGGCTCCTGATGT**  
**TCCTCCTCCTGATCCGCCAGCACGGGTCTGT**CTGTGGCCAGGGCCACCCTGGTCACC  
 GTCTCCTCAGGT +LJH  
 20 AGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGAGTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
 ACTTGC**ACTGTCTCTGGTGCCTCCACCAACAGTGCTGCTTATTACTGGAGCTGGATCCGC**  
 CAGCACCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGATTGGGT**TACATTTATTTCAGTGGGACCACCTA**  
**CTACAACCCGTCCTCAAGAGTCCGACCTACCATATCACTGGAC**ACCTATAACAATCAGTT  
 CTCTCTGAAGTTGAGCTCTGTGACTGCCCGGACACGGCCGTCTATT**ACTGTGCGAGCCA**

**CAATCACTACGACATCTCTTTT**GACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC  
 AGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCT + L<sup>JH</sup>  
 21 CTGTCTATTATTGTGTGAGA **CAAAATTGGGGGGTTCCTAAAGGAGGTGGGTACAACGAC**  
**TACTACTACTCCGGTCTGG**ACGTCTGGG +JH6  
 22 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTAAACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGGTTCAACATCAGTGGCTCTGCTATGCAC**TGGGTCCGCCAGG**  
 CTCCGGGAAAGGGCTGGAGT**GGATTGGCCGTATTAGAAGCAAAGTTAACGTTACGCG**  
**ACAGCATATGCTGCGTCCGTGAAAGGC**AGGTTACCATCTACAGAGATGACTCAAAGGA  
 CACGACATATCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC**TCGGCCGTCTATTATTGCAC**  
**TAGACATTCTTACCAGTACTGGTACCCCGAAGGG**GCTTTTGATATCTGGGGCCAAG  
 GGACAATGGTCACCGTCTCTCAGCC  
 23 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTGATACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGT**IGCCTCTGGATTACCTTACGCAACTATGCCATGACTTGGGTCCGCCAGGC**  
 TCCAGGGAAGGGCTAGACTGGGTCTCC**CTTATCAGTGGAAAGTGGTTTTGTACATACTA**  
**CTCAA**ACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACCCTGTA  
 TCTGCAAATGAGTAGCCTGAGAGCCGAAAACAGGCCATATATTACT**GTATAAAAGGCAG**  
**CAATCACTATTACGG**CATGGAC**TTCTGGGGCCAGGGGA**CCACGGTCACCGTCTCCTCAG  
 GT  
 24 GGAGTCTGGTCCGACGCTGGTGAACCCACACAGACCCTCACGCTGACTTGCACCTTCTC  
 TGGGTTCTCACTCATT**AATAGTGGAGTGGGTGTGGGC**TGGATCCGT**CAGCCCCCAGGAA**  
 AGGCCCTGGAGTGGCTTGCAG**TCATTTATTGGAATGATGATAAGCGCTACAGTCCATCTT**  
**TGAAGACC**AGGTTACCATCACC**AAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCTACAATGA**  
 CCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACA**TATTACTGTGCACATGCGGTGACTACGAGG**  
**GGCCCTGGTTTGACCCCTG**GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT  
 25 AGGTGCAGCTGDGAGTCTGGGGGAGACTTGATACAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGC**ACTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT**  
 CCTGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTCTC**AGGTATTGGGAAAAGTGGTGAAGA**CACATACA  
**ACGCAGACTCCGTGAAGGGT**CGCTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAACACGCTG  
 TATCTGCAGATGAGAGACGTGACAGT**CGAGGACACGGCCATATATTACTGTGCGAAAGCT**  
**CGCTGCGGGGGGGTATGTCAAGTTCATGAGGGTGGGATG**TGATTGC**ACTGGCGGTA**  
**GCTGCTTCTCGTTTGGTTAT**GACCCCTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA  
 GCA + L<sup>JH</sup>  
 26 AGGTGCAGCTGTGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCT  
 CCTGT**CAGCATCTGGATTCACTTCCATGTCTATGGCATGCAC**TGGGTCCGCCAGGCTC  
 CAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCACT**AATATGGTATGATGGAATTAATAAATACTAT**  
**GCAGACTCCGTGCAGGGCCGATTACCAC**CTCCAGAGACAATTCCAGGAACACGGTGT  
 TCTGCAAATGAACAACGTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTATTACTGTGCGAGAG**GATA**  
**GGCGAGAGTACGGGAATATCAGTGCCTGCCGG**CCTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCT  
 GGTACCGTCCCTCAGCA + L<sup>JH</sup>  
 27 AGGTGCAGCTGGwGsAGTcdGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTC  
 TCCTGTGCAGCCTCT**GGATTCACCTCAGGAGTTATGAAATGAA**TGGGTCCGCCAGGTT  
 CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATATATTAGTAGTAGT**GGTTATAGCATATATTAC**  
**GCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCTCCATCTCCAGAGACAACGCCAAGA**ACTCAGTGTTA  
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGT**CGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTACGACGCCTTAC**  
**ACTATGGGCCCATGTCCATCGTTCCCTCTGGTTGTACTACATGTACGTCTGGGGCAA**  
 GGGACCGCGTCTCCGTCTCCTCAGCC  
 28 AGGTGCAGCTGTGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTC  
 CTGCA**CGGCTTCTGGATACACCTTCATCGCCTATTATGTGCAC**TGGGTCCGACAGGCCCC  
 TGGACAAGGGCTT**GAGTGGATGGATCGACCCTAAGAGTGGTGACACAACTATG**  
**CACCGAAGTTTTAGGGC**AGGGTACCATGACTCGGGACACCTCCATCAG**CACAGTCTAC**  
**CTGGAGGTGAACAGA**CTGGGA**ACTGACGACACGGCCGTGATTICTGTGCGAGAGACCG**  
**TTACTATGAAACCAGGGGTTACTCTTGGTTCGA**CCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA  
 CCGTCTC**ATCAGCA** + L<sup>JH</sup>  
 29 AGGTGCAGCTGswGGAGTcdGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT**CAGGGACCCTGTCCCTC**  
 ACITGC**ACTGTCTCTGGTGA**CTC**CGTAAGGAGGGGGTGAATACC**ACTGGGGTGGCTCCG  
 CCAGCC**CCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGATATATCTATCACAGGGGGGGCGCC**  
**TACTACCAATCCGAACCTCAAGAGT**CGAGTATCCAT**TTCACTAGACAGGCCAAGA**ACCAG  
 TTCTCCCTGAGGTTAGGGTCTGTGACTGCCCGGACGGGGCCGTATATTATTGTG**CCCG**  
**GGGAGAGCAGCTGGATGCATTTGATATCT**GGGGCCAGGG**GACAATGGTCACCGTCTCTT**  
**CAGCA**  
 30 AGGTGCAGCTT**GAGT**CGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT**CGGAGACCCTGTCCCTCACC**  
 TGCAGTGTCTCTGGT**ACTCCGTCAGCAGTAGCAGTAGT**ACTACTGGGGCTGGATCCG

CCAGCCCCCGGGAGGGGGCTGGACTGGATTGGCACTTTCTATTACAGTGGGAGGGCC  
 TCCTACAGCCCCTCAAGAGTCGAGTCTCCATATCCGTGGACACGTGGAAGAACGA  
 ATTCTCTCTGGAGCTGACCTCTGTGACCCCGCAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAG  
 A – CTCCCCTCCCGGAACCGAATGATT –  
 TTTGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGGGCGAATTCCA  
 GCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATG  
 GTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCC  
 GGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAG + LJH  
 31 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGCAGAGGTCAAAAAGCCCAGGGAGTCTCTGAAAATC  
 TCCTGTGAGGGTCTGGATACAACCTTTAGCAACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGAC  
 CCCCGGAAAGCCCTGGAGTGGATGGGGGTCTCTATCGTGGGGACTCTGAGACCAGA  
 TACAGTCCGTCTCCAGGGCCAGGTACCATCTCAGTCGACAGTCCATCAGCACCCG  
 CTCTTGCAGTGGAGCAGGCTGAGGGCCTCGGACACCGCCATATATTCTGCGCGACCG  
 GCCCTTGGTATAATAGCAGGTGGTCTCTGACTACTGGGGCCGGGATCCCTGGTCACC  
 GTCTCCTCAACCTCCACCAAGGGCCCATCGGT  
 32 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGTAGAGGTGAAAAGCCCAGGGAGTCTCTCGAAATC  
 TCCTGTAAGGCGTCTGGATACCAATTTGCCAATTATTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATG  
 CCCGGGAGAGGCCTGGAGTGGCTGGGAATCGTCCATCCTCATGACTCTAATACCATATA  
 CAGTCCGTCTCCAGGGCCAGGTCTCCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAACACCGCCTA  
 TTTGCAGTGGAGCAGCCTGAGGGCCTCGGACACC GCCGTCTATTATTGTGCGAGGGCAGG  
 A GGGGGGCGGGCTCGTCTCTGGTCTCCCCCTAAATAACTACTACTACATGGACGTCTGG  
 GCGAAGGGACCGCGGTACCCGTGTCTC  
 33 AGGTGCAGCTGTGAGTcdGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAGAAAGTTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT  
 CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGTAATTTTCATATGATGGAAGTACTAAGTTGTA  
 TGCTGACTCCGTGAACGGCCGATTACCATCTCCAGAGACGATTCCAGCAATACGTTGTA  
 TCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAAATTGACGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAAAGATCT  
 GGTAGGAAGGTGGTGGCCACCACGTATTACTTTGAACACTGGGGCCCTGGGAACCCTG  
 TCGCCGTCCCTCAGCC + LJH  
 34 AGGTGCAGCTGGTGGAGTcdGGGGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGTAGCCTCTGGTTTCACCTTCAGTGCCTATAGCATGAATTTGGGTCCGCCAGGC  
 TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTTCATACATTAGTGGCAGTAGTAGTACCATATACT  
 ATGGACTCTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCAAGAACTCACTGT  
 ATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGCACGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGTGAGAGACA  
 GAGCGCTTCGGGACTTAGTCCCTACTACTTTGAGCACTGGGCCAGGGAATCCTGGTC  
 ACCGTCTCCTCAGCA  
 35 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAArAAGCCTGGGGCCTCAGCGAAACTT  
 TCCTGCAAGGCTTCCGGATACCCTTCAGCAATCACAATATGCATTGGGTGCGACAGGC  
 CCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGAGTAATCAACCCTAGTGGTGGTAGCACTGACT  
 ACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGACTCACCATGACCAGGGACACGTCCAGGAGCAGT  
 CTACATGGAAGTGAACCTGAGATCTGAGGATACGGCCGTCTATTACTGTGCTCGAGA  
 TGGATATTACGAAATTTGGAGTGATTATTCGTCCACCCTCTTGGAGAGGGGTGGTTCC  
 ACCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT  
 36 AGGTGCAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTCAGTGGTTCATGCTATGCACCTGGTCCGCCAGGC  
 TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGACAATTATTTTCATATGATGGAAGCAATAAATACT  
 ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAATTCCAAAACACGCTG  
 TCTCTGCACATGAACGACCTGAAAGCTGACGATACGGCTCTTTATTACTGTGCGAGAGAC  
 CGCTTGCCTTACTGACCGGGGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCAC  
 CGTCTCCTCAG  
 37 AGGTGCAGCTGTGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC  
 CTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTTAGT - ACCTATGGCATGAAT -  
 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAATGGGTCTCA -  
 AGTATCAGTTTTAGTGGTGGTGACACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC -  
 CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACCCTGTATCTCAAATGAACAGCCTGA  
 GAGTCGACGACAGGCCATATATACTGTGCGAAA -GACCGCCTCCGGGTGTCGACG  
 -GTTTGAATCGGTGGGGCCACGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT +LJH  
 38 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGTAGGCTCTGGATTACCTTCAGCACCTATAGTATGAAGTGGGTCCGCCAGGC  
 TCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGGTCTCA TCCATTAGTAGTGGTAGTAGTTACATACT  
 ACGCTGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCAAGT  
 TTTCTGCAAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGACGACACGGCTGTATATTACTGTATTACGCTG

**ACAAAGTCTTTCTCCCTGTCTG**CTGGGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG  
 39 AGGTGCAGCTGGNGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGAAGGCTCTGGATTCACGTTACAGT**GATTCTA****CGTGAGTT**GGATCCGCCAGG  
 CTCCAGGAAAGGGGCTGGAATGG**GTTTCATA****GTTAGTGGTAGTGGTCA**TACCATATACT  
**ACGCAGACTCTGTGAGGGG**CCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCAGTA  
 TATTTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTT**ATTCTGTGCGAGAGCC**  
**CCAAATGAGCTGCCGTACGACTTTGACTTCT**GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC  
 CTC  
 40 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTCAGACT  
 CTCCTGTGAAGGCTCTAGATTCAAT**GTCACTAACGCCTGGATGACT**TGGGTCCGCCAGGT  
 TTCAGGGGAGGGGCTGGAGTGGTTGGCCGTATTA**AAAGCAA**AACTGATGGTGGGACA  
**ACAGACTACGCTACACCCGTGAAAGGC**AGATTACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAAC  
 ACGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGC**CGTTTATTATTGTAGC**  
**ATAGAGGGGGCTG**GATATAGTGGCTACGATGGGGTGGCT**CTACTACC**ACTACTACGG  
 TATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGG  
 41 AGGTGCAGCTGstGGAGTcdGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTC  
 TCCTGTGCGGCCTCTGGATTCATCTTCAGT**ACTACTACATGAGT**TGGATCCGCCAGGCT  
 CCAGGGAGGGGGCTGGAGT**GGGTTTCATA**CATTGCTACTAGT**ACGAGTTACACA**AAAGTA  
**CGCAGACTCTGTGAAGGG**CCGATTCACCATCTCCGGAGACAACGCCAAGAGCTCACTTT  
 TTCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAAGACACGGCCGTCTATTACTG**TCCGAGGGGA**  
**TACACCTATGGTCCAGGCAATCTGTTCTGGGGCCAGG**GAACCCTGGTCACCGTCTCCTC  
 AGGT  
 42 CGGCYSTGTATTATT**ACTGTGCGCGAGATTGGGGCATTGTAGTAGACC****CAGTTGCC****CCC**  
**GACTTTT**GGGGCCAGGGAGCCCT +JH1245  
 43 AGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGCTTTGATT**ATTCTGCCATGCACT**GGGTCCGCCAAGC  
 TCCAGGGAAGGGCC**TGGAGTGGGTCTCATGTATCAGT**TGGAATAGTGGTAGTTT**GACT**  
**ATGGCGACTCTGTGAAGGG**CCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTG  
 TATCTACAAATGAACAATCTGAGACCTGAGGACACGGCCCT**TGTATTCTGTGCAAAA**AGATA  
**AATACCAGCTGATGACATACA**CTTTTGATATGTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCT  
 CTTACGCC +LJH  
 44 AGGTGCAGCTTGAGTcdGGGGGAGGCTT**GATT**CAGCCAGGACGGTCCCTGAGACTCTCC  
 TGACAGGTTCTGGCTTCTCGTTTGG**AGATTATGCCTTGAGCT**GGGTCCGCCAGGCTCCA  
 GGGAGGGGCTGGAGTGGATTAGTTTCATTAGA**AGCAAGGCTTATGGTGGGACAAAAG**  
**AATACGCGCGTCTGTGAAAGGC**AGATTACCATCTCAAGAGATGACTCGAA**AAACATCG**  
**CCTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAAAACCGAGGACACAGG**CGTGTATTACTGCTCTAGAC  
**AGGGCAGTTCGGGGACTTATGTGGAGGC**TACTACTACTCTACGCTATGGACGTCTGG  
 GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCACAGCC +LJH  
 45 AGGTGCAGCTGTGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCGGGGGGGTCCCTGAGACTCT  
 CCTGTGCACCCCTCTGGATTCACCTTCAAT**AGGGATGCCATGAGCT**GGGTCCGCCAGGCT  
 CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA**ACTATTAGTGGGAGGGGTGAAAGGAA**ATACT  
**ACGCAGACTCCGTGAAGGG**CCGGTTCACCATCTCCAGAGACA**ATTCCGAGAACACACTG**  
**TT**TCTGCAAATGAACAGTTT**GAGAGCCGAGGACACGGCCGTG**ATTCTGTGCGAAG –  
**ATTACAGGAGTATCACGA****TTTCTGGAGTGGCGAGATCGGAGG**TTACTACTTTGACCCTG  
 GGGCCGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT +LJH  
 46 AGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTT**AGT**CGCGCCGGGAGGGTCCCTCAGACT  
 CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTTTCAAT**AACGCCTATATGAGT**TGGGTCCGCCAGGC  
 TCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGTTG**GCCGCATTGAAAGCAATTCTGACGGGGAGACT**  
**ACAGACTACGCTGCACCCGTGAGAGGC**AGGTTACCATCTCAAGAGACGACTCAAAAAA  
 CACTCTTTCTGCAAATGCATAACCTGAGAACCAGGACACAGCCGTCTATTACTG**TGC**  
**CACAGGCGTGCATACTGGGAATTACT**ACGAATTTGACTCCTGGGGCCAGGGAGCCCTGG  
 TCGCCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCC  
 NGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCGAAT  
 TCCCAAGGGCGAAT +LJH  
 47 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGCCAGGCCTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
 ATTTGCACTGTCTCTGGTCCATCAGT**AGTTACTACTGGAGCT**GGATCCGGCAGGCC  
 CCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG**AAATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTGCA**  
**ACCCCTCCCTCAGGACT**CGAGTACCATATAAGTAGACACGTCCAATAACCACTTCTCCC  
 TGACGCTGAGCTCTGTGACCCTGCGGACACGGCCGTGATTCTGTGCG**AGA**ACTGCG  
**CTCCGGGGCTCGA**TTTTTGGGGCGGTTATTACC**GAAAG**CACTTCTACGACAACCCTATGG  
 ACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG

48 AGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAACATT  
CCCTGCAAGGTGTCTGGATACACCTTACCAGTTACCATTTCGACTGGGTGCGACAGGC  
CCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG**AGTTATTAATCCTGGCGGTGACTCCTGACCT**  
**ACGCAGACAAGTTTCAGGGCAGACTCACCTTAGCACTGACACGTCTCGAGCACGGTC**  
TACATGGAGCTGACCAGTCTGAGATCTGACGACACG**GCCACTTATTTCTGTGCGAGAGAG**  
**ACAGCAGCTGGCCAAAATTGGGG**CCGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT

49 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCCAGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTTTCTGGTGG**CTCCATCAGTCTTACTACTGGAGCT**GGGTCCGGCAGACC  
CCAGGGAAGGGACTGGAGTGCATTGGATATATCTCTTACACTGGAAACACAAGTACAA  
**CCCTCCCTCAAGAGT**CGAGTCACCATATCAATAGACACGTCCAAGATCCAGTTCTCCCT  
GAAACTGACCTCTGTGACCGCTGCGGACACG**GCCTTGTACTGTGCGAGAGCGATCG**  
**GGTCCCTGTAGTGAACCAGCTGCTAGTGCTTTT**GATCTCTGGGGCCAAGGGACAATG  
GTCACCGTCTCTT

50 AGGTGCAGCTTGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACC  
TGCAGTGTCTCTGGTACTCCGTCAGCAGTAGCAGTAGTGACTACTGGGGCTGGATCCG  
CCAGCCCCCGGGAGGGGGCTGGACTGGATTGGCACTTTCTATTACA**GTGGGAGGGCC**  
**TCCTACAGCCCGTCCCTCAAGAGT**CGAGTCTCCATATCCGTGGACACGTGGAAGAACGA  
ATTCTCTCTGGAGCTGACCTCTGTGACCGCCGACACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAG  
**ACTCCCGGCCGGAACCGAATGA**TTTTTACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG  
TCTCCTCAGGT **+LJH**

51 AGGTGCAGCTG<sub>sw</sub>GsAGTCdGGGGGAGGCTCGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAAGAACTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGT**CTCAAGTGTTAGTGATAGTGGTGATAAAACATACTA**  
**CGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACACGTTGT**  
ATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGACGACACGGCCGTATATTACTGTGCG**AAGGAC**  
**CGGGCGGAAGTGACTACGTTTTATTGTGGTCTCGT**GGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC  
CGTCTCCTCAGG

52 AGGTGCAGCTGGAGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAGGCCTGGGTCCCTCGGCGAAAGT  
CTCCTGCAGGGCTTCTGGAGGC**AGCTTCAGCACCTACACCATCACT**GGGTGCGACAGG  
CCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGCTGGGA**AGGGTCATCCCTATGGCTGGGATACCA**  
**CTACGCACAGAAGTTTAAGGAC**AGAGTCACAATTACCACGGACGAGACCATGACCACAG  
ICTAC**ATGGAGCTGAGCAGGCTGACATCTGA**GACACGGCCGTCTATTACTGTGCGCGG  
**ATCTCGGGATGGTTCCGGGAGGCGCGAATGACTGCTGGGGCCAG**GGAACCCTGGTCA  
CCGTCTCCTCAGCC

53 AGGTGCAGCTTGAGTCCdGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC  
**TGTGTACCCTCTGGATTI**ATGTTTAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA  
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCC**ACCATAAAGCAAGATGGA**ACTGAGACTCACTATG  
**TGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCA**TCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATC  
TGCAAATGAACAGTTTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGA**TTATCCA**  
**TGACTCTGGTGGTAATGAAGGGT**CTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGT  
CTCCTCAGCC **+LJH**

54 AGGTGCAGCTGTGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAAAATTTCT  
CTGT**GTAGCCTCTGGATTCAATTTCACTACCTATGGCATGCAC**TGGGTCCGCCAGGCTCC  
AGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCT**GTTATCTCATATGATGGAAGAATAAGAAATATG**  
**CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA**CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACATAGTGGATC  
TGCAAATGAACAGTCTGAGACTGAGGACACGGCTGTCTTTTACTGTGCGAAAG**GAACCTT**  
**TCCTCCCAGCAACTGGTACAGTTTTG**ACTATTATTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAG  
GGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCATCCCCGACCAGCCCCAAGGTCTTCCCGCTGAGC  
CTCTGCAGCACCCAGCCAGATGGGAACGTGGTCATCGCCTGCCTGGTCCAGGGCTTCTG  
AATCCCAAGGGCG **+LJH**

55 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTTAAGCCTGGAGGGTCCCTTAGACTC  
TC**CTGTGCAGCCTCTGGATTCA**CTTTCCGCCAGCGCCTGGATGACCTGGGTCCGCCAGAC  
TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCC**CGCATCAAGAGCGAAGCTGACGGTGGCAC**  
**AGCAGACTTGCCTGCACCCGCAAAGGC**AGATTCTCATCTCAAGAGATGATTACAAAAA  
TACTGTATCTACAAATGACGAGCCTGAAGACCGAAGACACAGGCGTGTATTATTGTGTC  
**ACAGCTCCAGGGCCTCCGTGACAACCTTA**GATGCTTTTATGATGTGTGGGGCCAAGGGAC  
AAGGTCACCGTCTCTCTGCC **+LJH**

Ermittelte Nukleotid- und Peptidsequenzen der Tumor-spezifischen CDR3-Regionen von 55 Patienten mit Multiplem Myelom. Die Keimbahnsequenzen der VH-, D- und JH-Gensegmente sind unter Anwendung der *IgBlast* Software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) ermittelt worden. Nukleotide der CDR2- und CDR3-Region sind fett gedruckt, Abweichungen von der Keimbahnsequenz inklusive CDR3-Region sind unterstrichen. Die Bindungsstellen der ASO-*Taqman*-Sonden sind grün und die der ASO-Primer blau gekennzeichnet.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Nina Sehnke

Geboren am 09.12.1982 in Wuppertal

Eltern: Petra und Karl-Heinz Sehnke

### Schulbildung

1989 - 1993

Walter-Hartmann-Grundschule in  
Remscheid

1993 – 2002

Gertrud-Bäumer-Gymnasium in  
Remscheid

2002

Abitur

### Hochschulausbildung

10/ 2002 – 12/2008

Studium der Humanmedizin an der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Medizinische Doktorandin in der  
Hämatologie und Onkologie der  
Universitätsklinik Düsseldorf

seit 02/ 2005

12/2008  
Ärztliche Prüfung und Approbation als  
Ärztin

Seit 01/2009

Assistenzärztin in der Klinik für  
Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und  
Gefäßchirurgie des Lukas-  
krankenhauses, Neuss

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich zunächst allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders möchte ich Herrn Professor Dr. Rainer Haas, Direktor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinischer Immunologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, für die Möglichkeit der Forschungstätigkeit in seinem Institut danken.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Roland Fenk für die kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung während meiner Arbeit und die unermüdliche Beratung, Hilfestellung und Diskussion.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Mark Korthals für die Einführung in die Methoden und die Begleitung während der Arbeit bedanken.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern des Forschungslabors für die freundliche Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Erfahrungsaustausch.

## **Erklärung**

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

