

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

*Stellenwert des Heavy Light Chain Assays
in Diagnostik und Therapiemonitoring des Multiplen Myeloms
– Vergleich mit konventionellen Analysen und minimaler Resterkrankung*

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Julia Lüthen
aus Düsseldorf

Würzburg, Oktober 2020

Referent: Prof. Dr. med. Stefan Knop
Koreferent: Prof. Dr. med. Ioannis Anagnostopoulos
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.05.2021

Die Promovendin ist Ärztin

Für Wolfgang

Inhaltsverzeichnis

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	
1. EINLEITUNG	1
2. GRUNDLAGEN	2
2.1 Das Immunsystem.....	2
2.1.1 Blut und Immunsystem.....	2
2.1.2 Lymphozyten in der erworbenen Immunabwehr	2
2.1.3 Entwicklung der B-Lymphozyten	3
2.1.4 Aufbau und Klassen von Immunglobulinen.....	5
2.2 Das Multiple Myelom.....	7
2.2.1 Pathophysiologie und Symptome	7
2.2.2 Diagnosekriterien.....	9
2.2.3 Diagnostische Methoden	10
2.2.4 Diagnose-Stadien.....	15
2.2.5 Therapie	18
2.2.6 Response-Kriterien	20
2.2.7 Minimal Residual Disease (MRD)	23
2.3 Das Heavy Light Chain Assay	26
2.3.1 Theorie.....	26
2.3.2 Vor- und Nachteile	27
2.3.3 Referenzbereiche	29
2.3.4 Bisherige Studien.....	30
2.3.5 Beschränkungen der bisherigen Studien.....	39
2.3.6 Fragestellungen dieser Arbeit	40
3. MATERIAL UND METHODEN	41
3.1 Charakteristika der DSMM XIV-Studie	41

3.2 Angewendete Labormethoden	42
3.3 Ein- und Ausschlusskriterien dieser Arbeit	44
3.4 Statistische Methoden	45
4. ERGEBNISSE	47
4.1 Charakteristika der erhobenen Daten.....	47
4.1.1 Beschreibung der Studienpopulation.....	47
4.1.2 Häufigkeit der Datenerhebung mittels Heavy Light Chain Assay	49
4.2 Statistische Auswertung.....	50
4.2.1 Klassifikation der HLC-Ratio im Verlauf der Therapie.....	50
4.2.2 Vergleich von SPE und HLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose.....	52
4.2.3 Vergleich von HLC-Ratio und Diagnose-Stadien	53
4.2.4 Vergleich von HLC-Ratio und FLC-Ratio im Verlauf der Therapie	58
4.2.5 HLC-Ratio im Verlauf der Therapie je nach Responsekategorie.....	61
4.2.6 Vergleich von HLC-Ratio und MRD-Status nach Induktionstherapie.....	64
4.2.7 Isotypensuppression in der HLC-Messung	66
4.2.8 Überlebenszeitanalysen	70
5. DISKUSSION	78
5.1 Übertragbarkeit der Ergebnisse	78
5.2 Zuverlässigkeit der Datenerhebung	79
5.3 Abbildung des klonalen Immunglobulins durch das Heavy Light Chain Assay ..	80
5.4 Heavy Light Chain Assay im Vergleich zu konventionellen Methoden	81
5.4.1 Heavy Light Chain Assay und SPE im Vergleich.....	81
5.4.2 Heavy Light Chain Assay und Diagnose-Stadien im Vergleich	81
5.4.3 Heavy Light Chain Assay und Free Light Chain Assay im Vergleich.....	82
5.4.4 Heavy Light Chain Assay und Responsekategorien im Vergleich.....	84
5.5 Heavy Light Chain Assay und Flow-MRD im Vergleich	85

5.6 Häufigkeit der Isotypensuppression im Heavy Light Chain Assay	87
5.7 Überlebenszeitanalysen verschiedener Aspekte des Heavy Light Chain Assays .	87
5.7.1 Überlebenszeitanalyse gruppiert nach HLC-Ratio	87
5.7.2 1 Überlebenszeitanalyse gruppiert nach Isotypensuppression	88
5.7.3 Überlebenszeitanalyse je nach MRD-Status.....	89
5.8 Vorteile und Limitationen der Arbeit	89
6. ZUSAMMENFASSUNG	91
7. LITERATURVERZEICHNIS	92
9. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	97
DANKSAGUNG.....	

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

ASCT	Autologous Stem Cell Transplantation
alloSCT	Allogene Stem Cell Transplantation
BAFF	B-cell Activating Factor
BCMA	B-cell Maturation Antigen
CR	Complete Response
CT	Computertomographie
DS	Durie-Salmon-Stadium
FLC	Free Light Chain
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HDT	High Dose Therapy
HLC	Heavy Light Chain
Ig	Immunglobulin
IFE/ IFIX	Immunfixationselektrophorese
iFISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in der Interphase des Zellzyklus
IMiDs	Immunmodulatorische Substanzen
IMWG	International Myeloma Working Group
ISS	International Staging System
KM	Knochenmark
LCDD	Light Chain Deposition Disease
LDH	Laktatdehydrogenase
MFC	Multiparametric Flow Cytometry
MM	Multiples Myelom
MRD	Minimal Residual Disease
MRT	Magnetresonanztomographie
MSCD	Myeloide Suppressorzellen
nCR	Near Complete Response
ORR	Overall Response Rate
OS	Overall Survival
PD	Progressive Disease
PET-CT	Positronenemissionstomographie
PFS	Progression Free Survival

PR	Partial Response
RAD	Induktionsprotokoll mit Lenalidomid, Adriamycin und Dexamethason
r-ISS	Revised International Staging System
sCR	Stringent Complete Response
SCT	Stem Cell Transplantation
SD	Stable Disease
SPE/SPEP	Serumproteinelektrophorese
TTP	Time To Progression
VGPR	Very Good Partial Response
VRd	Induktionsprotokoll mit Bortezomib, Lenalidomid und Dexamethason
^x HLC-Ratio	Involvierte/uninvolvierte HLC-Ratio

1. EINLEITUNG

Der Hevylite®-Test der Firma The Binding SiteTM ist seit über zehn Jahren auf dem Markt. Als Weiterentwicklung bestehender Tests war es mit spezifischen Antikörpern erstmals möglich, nicht nur die Klasse des intakten Immunglobulins festzustellen, sondern zwischen den beiden Isotypen zu unterscheiden.

Dies ist in der Behandlung von Patient*innen mit Multiplem Myelom sehr nützlich, um den vom Tumor produzierten Isotyp von den funktionalen Immunglobulinen getrennt und somit genauer zu quantifizieren. Daher erhoffte man sich durch das Heavy Light Chain Assay einen zusätzlichen Nutzen bezüglich der Diagnosestellung, Verlaufskontrolle und Risikostratifizierung des Multiplen Myeloms.

Diese Idee floss bei der Initiierung der multizentrischen, randomisierten Phase 3-Medikamentenstudie mit dem Namen DSMM XIV im Jahr 2012 in das Studienprotokoll ein. Zur damaligen Zeit war die Studienlage zum Heavy Light Chain Assay noch sehr klein. Auf Basis der erhobenen Daten innerhalb der Studie sollte der Frage nachgegangen werden, ob das Heavy Light Chain Assay einen zusätzlichen Nutzen zu bisher üblichen Verfahren und somit einen Platz in der klinischen Routine verdient hat.

In den darauffolgenden Jahren, bis kürzlich die endgültigen Auswertungen der aufwendigen DSMM XIV-Studie vorlagen, wurden etliche kleine und große Studien durchgeführt, die diese und ähnliche Fragestellungen untersuchten. Die Ergebnisse dieser Studien sind oft sehr positiv. Dennoch hat sich das Heavy Light Chain Assay bisher nicht als Routine-Test durchgesetzt.

Wir haben uns daher der Frage nach dem zusätzlichen Nutzens des Heavy Light Chain Assays in der Diagnostik und im Therapiemonitoring im Rahmen meiner Dissertation angenommen. Hierbei ist von Vorteil, dass wir aufgrund Erhebung im Rahmen der Medikamentenstudie eine große und weitgehend einheitlich behandelte Kohorte und Zugang zu modernen Messmethoden haben. Hierdurch wollen wir die bisherige Studienlage ergänzen, die meist kleinere Studienpopulationen und uneinheitliche Therapien umfasst. Zudem vergleichen wir das Heavy Light Chain Assay mit der durchflusszytometrischen Minimal Residual Disease Analyse, wozu es erst wenige Studien gibt. Mit dieser Arbeit wollen wir einen Beitrag leisten, die komplexe Erkrankung besser verstehen und behandeln zu können.

2. GRUNDLAGEN

2.1 Das Immunsystem

2.1.1 Blut und Immunsystem

Das Blut ist eines der wichtigsten Organsysteme des Menschen. Es dient dem Transport von Nähr- und Abfallstoffen, Gasen und Wärme im Körper und erfüllt darüber hinaus weitere wichtige Aufgaben, wie Gerinnung und Immunabwehr. Es besteht zu 56% aus einer wässrigen Elektrolytlösung (Plasma) und zu 44% aus Zellen.

95% der Zellen sind rote Blutzellen (Erythrozyten), die den Sauerstoff transportieren. Mit 5% deutlich seltener sind Blutplättchen (Thrombozyten), die in der Blutgerinnung eine wichtige Rolle spielen. Nur 0,1% machen weiße Blutzellen (Leukozyten) aus, die für die Immunabwehr zuständig sind. Leukozyten wiederum teilen sich in drei verschiedene Zelltypen auf: Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Jedoch sind für das Verständnis des Krankheitsbildes Multiples Myelom besonders die Lymphozyten relevant.

Das Immunsystem des Menschen dient der Erkennung und Abtötung von pathogenen Mikroorganismen, sowie von körperfremden, entarteten oder Virus-infizierten Zellen. Um diese vielfältigen Funktionen ausführen zu können, hat sich ein kompliziertes Zusammenspiel aus unterschiedlichen Mechanismen entwickelt. Diese kann man grob in eine angeborene und eine erworbene Immunabwehr unterteilen, die jeweils aus einer humoralen und einer zellulären Komponente bestehen.

Die angeborene Immunabwehr bietet eine sofortige und unspezifische Reaktion auf Pathogene.

Die erworbene Immunabwehr dagegen reagiert spezifisch auf ein Pathogen, wird jedoch erst im Laufe des Lebens richtig effektiv. Sie wird von den Lymphozyten getragen.

(Lüllmann-Rauch & Paulsen, 2012; S. 280-318)

2.1.2 Lymphozyten in der erworbenen Immunabwehr

Lymphozyten kann man nach ihrer Funktion in drei Zelltypen unterteilen. Zu 75% besteht die Population aus T-Lymphozyten, zu 15% aus B-Lymphozyten und zu 10% aus natürlichen Killerzellen (NK).

Natürliche Killerzellen gehören zur angeborenen Immunabwehr und sollen uns an dieser Stelle nicht weiter beschäftigen.

B-Lymphozyten sind für den humoralen Anteil der erworbenen Immunabwehr zuständig. Sie reifen zu Plasmazellen heran, die sogenannte Antikörper produzieren und sezernieren. Antikörper sind Glykoproteine, daher nennt man sie auch Immunglobuline. Sie binden spezifisch an ein zumeist körperfremdes und pathogenes Molekül, welches man als Antigen bezeichnet. Immunglobuline können gelöst im Plasma oder aber als B-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche einer B-Zelle vorkommen.

Bindet ein Antigen an einen membranständigen Antigen-Rezeptor, werden wiederum die Proliferation und die Ausreifung der B-Zelle zur Plasmazelle stimuliert. Zudem werden B-Gedächtniszellen gebildet, die noch Jahre später eine Immunreaktion auf ein bekanntes Pathogen auslösen können.

T-Lymphozyten stellen den zellulären Anteil der erworbenen Immunabwehr. Sie werden in T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen unterteilt.

Die zytotoxischen T-Zellen erkennen Virus-infizierte Zellen und sezernieren daraufhin Perforine und Granzyme, die die infizierte Zelle in die Apoptose treiben. Die Spezifität wird dadurch gegeben, dass sogenannte Antigen-präsentierende Zellen diejenigen T-Zellen selektiv aktivieren, deren Rezeptor besonders gut auf das von ihnen präsentierte Virus-Antigen passt.

T-Helferzellen werden ebenfalls von Antigen-präsentierenden Zellen selektiv stimuliert und unterstützen durch die Sezernierung von Botenstoffen (Zytokinen) die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen. Dieser Vorgang wird in Kapitel 2.1.3 genauer erklärt.

(Lüllmann-Rauch & Paulsen, 2012; S. 280-318)

2.1.3 Entwicklung der B-Lymphozyten

B- und T-Lymphozyten entwickeln sich aus einer gemeinsamen, lymphatischen Progenitorzelle im Knochenmark.

Während die Vorläufer-T-Zelle schon früh in den Thymus auswandert, läuft die Entwicklung der B-Zelle vollständig im Knochenmark ab. Aus einer Pro-B-Zelle entwickelt sich über eine Prä-B-Zelle die unreife B-Zelle. Danach wandert der naive B-Lymphozyt in die Peripherie, ohne dass der B-Zell-Rezeptor einen Antigen-Kontakt hatte. Im Gegensatz zu den anderen Leukozyten, die den Intravasalraum für immer

verlassen, zirkulieren Lymphozyten ständig zwischen Blut und lymphatischen Organen hin und her.

(Lüllmann-Rauch & Paulsen, 2012; S. 208-326)

Dort können sie auf verschiedene Arten von Antigenen treffen:

Trifft die B-Zelle auf ein Protein-Antigen, benötigt die B-Zelle die Hilfe einer T-Helferzelle, die in der T-Zell-Zone des sekundären Lymphgewebes zu finden sind. Zum sekundären Lymphgewebe gehören Lymphknoten, Milz und Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe.

Die B-Zelle internalisiert das an den B-Zell-Rezeptor gebundene Antigen und präsentiert Teile davon auf ihrer Oberfläche, die die T-Helferzelle mit Hilfe ihrer Rezeptoren erkennt und Aktivierungssignale in Form von Zytokinen ausschüttet. Diese fördern die Proliferation der B-Zelle, die in der B-Zell-Zone des sekundären Lymphgewebes stattfindet. Die daraufhin einsetzende klonale Vermehrung und Differenzierung in antikörpersezernierende Plasmazellen und B-Gedächtniszellen wird von den T-Helferzellen aktiv gesteuert.

In Folge der Aktivierung wird außerdem ein Isotypenwechsel der B-Zelle induziert. Darunter versteht man den Wechsel der Antikörper-Produktion der B-Zelle, in dieser Stufe von Immunglobulinen der Klasse M (IgM) zu Immunglobulinen anderer Klassen. Die verschiedenen Klassen von Immunglobulinen sind im Kapitel 2.1.4 erklärt.

Des Weiteren steuern die T-Helferzellen die Spezifität des sezernierten Antikörpers, indem sie die B-Zellen nach der Affinität ihrer Antikörper zum präsentierten Antigen selektiert und unpassende oder autoreaktive B-Zellen in die Apoptose schickt. Dadurch wird die Spezifität und Selbsttoleranz des humoralen Anteils der erworbenen Immunantwort gewährleistet.

Sind die Antigene dagegen keine Proteine, sondern zum Beispiel bakterielle Polysaccharide, die einigermaßen auf den membranständigen Antikörper passen, wird die B-Zelle T-Zell-unabhängig zur Proliferation angeregt und die Nachkommen differenzieren sich zu Plasmazellen. Diese sezernieren Immunglobuline mit einer relativ niedrigen Affinität zum Antigen und gehen nach kurzer Zeit in die Apoptose. Es findet nur begrenzt ein Isotypenwechsel und keine Bildung von B-Gedächtniszellen statt.

(Janeway, Travers, Walport, & Shlomshik, 2002; S. 387)

Reife Plasmazellen wandern ins Knochenmark, wo sie über Jahre überdauern können und Immunglobuline sezernieren.

(Lüllmann-Rauch & Paulsen, 2012; S. 326)

2.1.4 Aufbau und Klassen von Immunglobulinen

Immunglobuline (Ig) sind antigenerkennende Moleküle, die von Plasmazellen produziert werden.

Durch sie sollen Pathogene spezifisch gebunden werden und somit entweder direkt unschädlich gemacht (Neutralisation) oder für Fresszellen und Komplemente markiert werden (Opsonierung), die das Pathogen daraufhin eliminieren.

Es gibt fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Das Grundgerüst dieser Moleküle besteht aus vier Polypeptidketten, die in Form eines Y angeordnet sind.

Am Beispiel des IgG lässt sich der Aufbau eines Immunglobulins erläutern.

Jedes IgG-Molekül besteht aus zwei leichten (*light*) und zwei schweren (*heavy*) Polypeptidketten, die jeweils untereinander identisch sind. Jede Polypeptidkette hat zwei Regionen:

Eine variable (V-)Region am Aminoende, mit dem sie das Antigen bindet und eine konstante (C-) Region am Carboxyende, die den Isotyp festlegt. Die beiden schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken untereinander verknüpft. An jede schwere Kette ist eine leichte Kette mit einer Disulfidbrücke geknüpft, sodass sich die variablen Regionen aneinanderlagern. Die variablen Regionen der Ketten bilden so zusammen die Arme des Y, dessen Spitze das Antigen binden kann. (siehe Abbildung 1, S. 6)

Die Variabilität der Bindungsstelle ist Voraussetzung für die Fähigkeit verschiedene Antigene zu binden und damit für die Funktionalität der Antikörper. Bei Gesunden werden sie von verschiedenen Plasmazellen gebildet und daher auch als polyklonale Antikörper bezeichnet.

Es gibt zwei Isotypen von Leichtketten, die man als λ - (lambda-) und κ - (kappa-) Kette bezeichnet. Sie unterscheiden sich zwar in ihrer C-Region, jedoch nicht in ihrer Funktion. Ein IgG-Molekül enthält entweder zwei identische κ - oder λ -Ketten. Man bezeichnet das Immunglobulin dann je nach enthaltenen Leichtketten als IgG κ oder

IgG λ . Beim gesunden Menschen kommen diese Typen im Verhältnis κ zu λ von 2:1 vor.

Das konstante Ende der schweren Kette legt die Klasse der Immunglobuline fest. Sie sind je nach Typ mit dem griechischen Buchstaben α (alpha) bei IgA, δ (delta) bei IgD, γ (gamma) bei IgG, ϵ (epsilon) bei IgE und μ (mü) bei IgG bezeichnet. Jeder Isotyp wird von einem Gen codiert, wobei man einen Switch der Genexpression als Isotypenwechsel bezeichnet.

Die verschiedenen Immunglobulin-Klassen unterscheiden sich in ihrer immunologischen Funktion.

Je nach der Sequenz am Ende der C-Region der schweren Kette, kann ein Immunglobulin gebunden oder frei vorliegen. Ist die Sequenz hydrophob, fungiert das Molekül als membranständiger Rezeptor auf der Oberfläche der B-Zelle. Ist sie dagegen hydrophil, kann das Immunglobulin frei sezerniert werden und als Antikörper im Plasma wirken. Mit Ausnahme von IgM, das Pentamere bildet und IgA, das auch als Dimer vorkommen kann, liegen Immunglobuline im Serum als Monomere vor.

(Lüllmann-Rauch & Paulsen, 2012; S. 99-112)

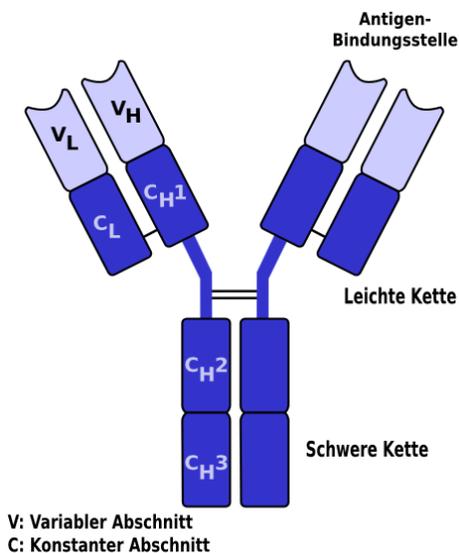


Abbildung 1: Aufbau eines Immunglobulins (IgG)

(© Wikimedia)

2.2 Das Multiple Myelom

2.2.1 Pathophysiologie und Symptome

Das Multiple Myelom ist eine maligne Erkrankung der B-Zell-Reihe und trat im Jahr 2014 unter Männern mit einer jährlichen Inzidenz von 5,8 pro 100.000 Einwohnern und unter Frauen mit 3,7 pro 100.000 Einwohnerinnen auf (Wörmann et al., 2018).

Das mittlere Erkrankungsalter lag mit 72 Jahren für Männer etwas niedriger ist als für Frauen mit 74 Jahren (Robert-Koch-Institut, 2017; S. 124).

Die Pathophysiologie jedes einzelnen Myeloms ist unterschiedlich und noch nicht zur Gänze verstanden. Man geht davon aus, dass der Erkrankung eine Reihe von genetischen und karyotypischen Veränderungen zugrunde liegt. Hierzu gehören Hyperdiploidien, bei denen ein ganzes Chromosom mehr als zweimal vorliegt, sowie IgH-Translokationen, bei denen das Gen für die schwere Kette des Immunglobulins auf ein anderes Chromosom verschoben ist, und die Überaktivierung eines Zellzyklusregulierenden Proteins aus der Cyclin D-Familie. Darauf folgen weitere Ereignisse wie die Translokation, die Verdopplung oder der Verlust von ganzen Chromosomenarmen oder Genregionen. Die so entstehenden Onkogene begünstigen die Proliferation der maligne entarteten Zelle.

(Bergsagel & Kuehl, 2005; S. 6236)

Als begünstigende Faktoren für die Entartung werden ionisierende Strahlung, Lösungsmittel und eine Infektion mit dem humanen Herpesvirus 8 diskutiert (Arastéh et al., 2013; S. 1251-1257).

Die Myelomzellen produzieren typischerweise ein sogenanntes Paraprotein. Nur 1% der Myelome sind asekretorisch. Das Paraprotein wird auch als monoklonales Protein (M-Protein) bezeichnet, da die Myelomzellen auf eine oder wenige maligne B-Zellen zurückgehen und somit ein identisches, nicht funktionales Immunglobulin herstellen.

Dies ist entweder der intakte Antikörper einer Klasse oder eine Leichtkette. Am häufigsten sind mit 53% der Fälle IgG-sezernierende Myelome, wesentlich seltener sind IgA-Myelome mit 25%. Etwa 20% der Myelome produzieren κ - oder λ -Leichtketten. Nur 1% der Fälle sind IgD-Myelome, noch seltener sezernieren sie IgE-Immunglobuline.

(Herold, 2017; S. 83)

Die produzierten Antikörper gehören einem Isotyp an, das heißt sie enthalten neben ihrer Klassen-spezifischen schweren Kette entweder zwei κ - oder zwei λ -Leichtketten. Die Gruppe der IgG-Myelome zum Beispiel lässt sich also genauer in IgG κ - und IgG λ -produzierende Myelome unterteilen. Bei dem IgG κ -Subtyp bezeichnet man die monoklonalen IgG κ -Antikörper dann als involvierten Antikörper-Isotyp und die polyklonalen IgG λ -Antikörper als nicht involvierten Antikörper-Isotyp.

Im Verlauf der Therapie kann sich das produzierte M-Protein verändern, was vor allem nach autologer Stammzelltransplantation beobachtet wird und ein prognostisch günstiges Zeichen sein kann.

(Ye et al., 2019; S. 217f)

Die Erkrankung hat vielfältige Auswirkungen auf den Körper.

Die massive Produktion von klonalen, nicht funktionalen Paraproteinen unterdrückt die Synthese von polyklonalen, funktionalen Immunglobulinen, was einen sekundären Antikörper-Mangel hervorruft, der mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einhergeht.

Diese Infektanfälligkeit wird durch die Granulozytopenie infolge der Verdrängung der Hämatopoese verstärkt. Im Rahmen einer Anämie treten zudem Abgeschlagenheit und Leistungsminderung auf und eine Thrombozytopenie kann die Blutungsneigung verstärken.

Die vom Myelom produzierten Leichtketten werden schnell und in großen Mengen über die Niere ausgeschieden, bevor sie sich im Urin anreichern, wo man sie als Bence-Jones-Protein bezeichnet und dementsprechend von einer Bence-Jones-Proteinurie spricht, die mit schäumendem Urin einhergehen kann.

Die Komplikation der massiven Bence-Jones-Proteinurie bezeichnet man als Myelomniere. Darunter versteht man die Nierenfunktionseinschränkung durch die nephrotoxische Wirkung der produzierten Leichtketten, die in hohen Mengen in den proximalen Tubuli der Nieren anfallen werden. Durch direkte toxische Wirkung werden die proximalen Tubuli geschädigt (tubuläre Nephrose), sodass in den distalen Tubuli mehr Leichtketten anfallen. Diese aggregieren dort zu Zylindern, die den Tubulus verstopfen und das Nephron zerstören (CAST-Nephropathie). Seltener Komplikationen durch den Überschuss freier Leichtkette sind die AL-Amyloidose und die light chain deposition disease (LCDD), die auch andere Organsysteme, wie das Herz und das periphere Nervensystem geschädigt werden.

Paraproteine können außerdem aggregieren und durch Erhöhung der Blutviskosität Mikrozirkulationsstörungen verursachen, die unter anderem eine Minderperfusion der Niere, des Lunge und des zentralen Nervensystems (ZNS) hervorrufen.

Neben Paraproteinen sezernieren Myelomzellen Osteoklasten-aktivierende Faktoren wie RANKL und Osteoblasten-hemmende Faktoren wie DKK1. Dies verursacht bei den betroffenen Patient*innen neben den typischen, umschriebenen Osteolysen eine diffuse Osteoporose und kann sich früh als Knochenschmerz manifestieren. Als Komplikation massiver Osteolysen kann es zu Spontanfrakturen kommen.

Die Freisetzung von Calcium durch den verstärkten katabolen Knochenstoffwechsel lässt sich im Blut als Hyperkalziämie nachweisen und kann wiederum die Niere durch Kalkablagerung schädigen (Nephrokalzinose).

(Arastéh et al., 2013; S.1251-1257)

2.2.2 Diagnosekriterien

Die Diagnose eines symptomatischen, sekretorischen Multiplen Myeloms wird gestellt, wenn neben mindestens einem der den oben genannten Endorganschäden klonale Plasmazellen im Knochenmark nachweisbar sind und sich M-Protein oder Leichtketten im Serum oder Urin zeigen (Kyle et al., 2003; S. 753). (siehe Tabelle 1, S. 10)

Bei Diagnosestellung eines Multiplen Myeloms sollen standardmäßig zum Staging und zur Risikostratifizierung zusätzlich zur SPE, der IFE von Serum oder Urin, der nephelometrischen Quantifizierung der Immunglobuline und dem Free Light Chain (FLC) Assay ein (Differential-)Blutbild, sowie eine Bestimmung von Elektrolyten, β 2-Mikroglobulin, Laktatdehydrogenase (LDH) und Kreatinin im Serum erfolgen. Notwendig sind außerdem eine körperliche Bildgebung und sowohl eine zytogenetische als auch eine immunphänotypische Untersuchung des Knochenmarks.

(Kyle & Rajkumar, 2009; S. 3) und (Dimopoulos et al., 2011; S. 4703)

Die International Myeloma Working Group (IMWG) empfiehlt, die Art der Bildgebung je nach Möglichkeiten des jeweiligen versorgenden Krankenhauses auszusuchen – dazu gehört Computertomographie (CT), Positronenemissionstomographie (PET-CT) und Magnetresonanztomographie (MRT).

(Willrich & Katzmann, 2016; S. 909)

Eine *messbare Erkrankung* ist definiert als ein M-Protein im Serum ≥ 1 g/dl bei IgG-Myelomen, beziehungsweise $\geq 0,5$ g/dl bei IgA-Myelomen, ein M-Protein im 24h-Urin ≥ 200 mg oder eine Konzentration des involvierten FLC ≥ 10 mg/dl bei abnormaler FLC κ/λ -Ratio im Serum (Durie et al., 2006 (2); S. 1469).

Tabelle 1: Diagnosekriterien eines symptomatischen, sekretorischen Multiplen Myeloms

Eines der folgenden Kriterien muss zutreffen:

- Klonale Plasmazellen im Knochenmark $\geq 10\%$
- Dokumentiertes, klonales Plasmozytom

und eines der folgenden Kriterien muss zutreffen:

- Monoklonales Protein im Serum oder Urin nachweisbar (Immunfixation)
- *Falls kein M-Protein nachweisbar:* Abnormale FLC κ/λ -Ratio im Serum

und mindestens eines der folgenden Kriterien muss zutreffen:

- Myelom-assoziierte Endorganschäden
- Niereninsuffizienz: Kreatinin > 2 mg/dl
- Hyperkalziämie: Serumkalzium ≥ 11 mg/dl
- Anämie: Hämoglobin < 10 mg/dl, beziehungsweise > 2 mg/dl unter dem unteren Normwert
- Knochenläsion: Lysen, schwere Osteopenie oder pathologische Frakturen

(nach Durie et al., 2006 (2); Tabelle 3) und (nach Dimopoulos et al., 2011; Tabelle 1)

2.2.3 Diagnostische Methoden

Wenn ein(e) Patient*in klinische Hinweise auf eine B-Zell-Erkrankung wie das Multiple Myelom aufweist, soll ein Screening auf M-Protein mittels einer *Protein-Elektrophorese* des Serums (SPE, engl. SPEP) und des in 24 Stunden gesammelten Urins erfolgen. Eine Wanderung des monoklonalen Proteins auf eine bestimmte Höhe im Agarose-Gel (Bande) wird in der Densitometrie als Gipfel abgebildet. Dieser Gipfel ist der sogenannte M-Gradient. (siehe Abbildung 2, S. 11)

(Kyle et al., 2003; S. 749f)

Bei den IgG-produzierenden Myelomen migriert das produzierte monoklonale Immunglobulin in der SPE standardmäßig in den γ -Globulinbereich und wird als sichtbarer M-Gradient abgebildet.

Aus der Elektrophorese, die den Anteil der Globulinfraktionen am Gesamteiweiß in Prozent angibt und der Gesamteiweiß-Konzentration, lässt sich semiquantitativ die Konzentration des M-Proteins berechnen.

Die Quantifizierung des M-Proteins aus der SPE ist bei Patient*innen mit IgA-Myelom, wenn ein M-Gradient abzugrenzen ist und bei Patient*innen mit IgG-Myelom, wenn der M-Gradient zwischen 10 und 30 g/L beträgt, besonders genau.

Die untere Nachweisgrenze des M-Proteins hängt unter anderem von der Konzentration der polyklonalen Immunglobuline ab, die sich ebenfalls in der γ -Region darstellen und liegt bei 100 mg/dl (= 1 g/L) im Serum. Die monoklonalen Immunglobuline der IgA-Myelome migrieren dagegen häufig in die β -Region, während andere Immunglobuline nur einen sehr schmalen oder keinen Peak in der Elektrophorese zeigen, was die Auswertung erschwert. Auch bei Leichtketten-produzierenden Myelomen kann die Serumelektrophorese unauffällig sein, da diese schnell über die Niere aus dem Blut gefiltert werden.

(Neben, 2011); (Willrich & Katzmann, 2016; S.911f)

Zudem kann die SPE bei niedriger Immunglobulin-Konzentration normal ausfallen (Dimopoulos et al., 2011; S. 4702).

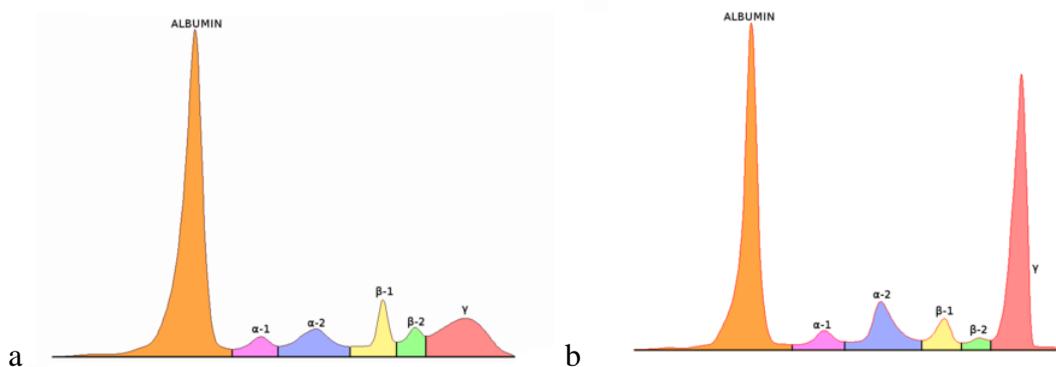


Abbildung 2: Serumelektrophorese (a) normal (b) Paraprotein läuft in der γ -Region

(© Wikimedia)

Bei klinischem Verdacht auf ein Multiples Myelom sollte daher auch bei unauffälliger SPE als Goldstandard immer eine *Immunfixationselektrophorese* (IFE, engl. IFIX) des Serums und 24-h-Urins erfolgen. Durch die IFE kann zwischen poly- und monoklonaler

Gammopathie unterschieden und die leichten und schweren Ketten des produzierten Immunglobulins identifiziert werden. (siehe Abbildung 3, S.12)

(Kyle et al., 2003; S. 749f); (Dimopoulos et al., 2011; S. 4702)

Dabei werden die konstanten Regionen der schweren und leichten Ketten mit spezifischen Antisera und einer Färbung sichtbar gemacht und sind ab einer Konzentration von 10 mg/dl (= 0,1 g/L) nachweisbar.

(Neben, 2011); (Katzmann et al., 2015; S. 912)

Laut Kyle et al. beträgt das Level, ab dem in der IFE ein M-Protein detektiert werden kann, dagegen 0,2 g/l im Serum und 0,04g/l im Urin.

(Kyle et al., 2003; S. 749f)

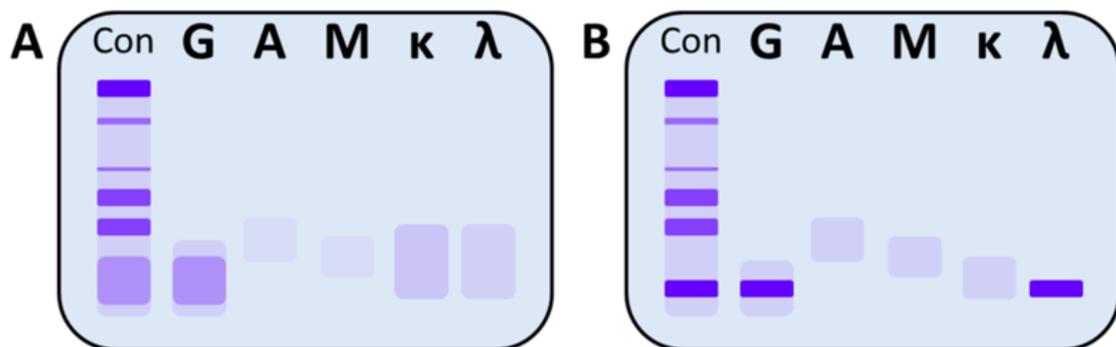


Abbildung 3: Immunfixationselektrophorese (a) normales Serum (b) IgG λ -Myelom

(© Wikimedia)

Bei Patient*innen mit Leichtketten-Myelomen, sowie IgG M-Gradienten über 30g/l in der SPE und bei Patient*innen mit IgA-Myelomen, deren M-Protein in die β -Region migriert, soll eine Quantifizierung des M-Proteins mit Hilfe der *Nephelometrie* erfolgen. Diese kann jedoch nicht zwischen mono- und polyklonalem Protein unterscheiden und der Wert für die IgM-Konzentration wird bis zu doppelt so hoch wie in der SPE gemessen.

(Willrich & Katzmann, 2016; S. 912)

Bei Patient*innen mit Verdacht auf ein Multiples Myelom muss eine *Knochenmarkspunktion* mit Biopsie und Aspiration zur Diagnosestellung erfolgen.

Die Gründe für mögliche Ungenauigkeiten der Methoden beleuchtet die Studie von Lee et al. näher. Die Autor*innen kritisieren an der Knochenmarksuntersuchung, dass die

Bestimmung der Plasmazellen in der Biopsie subjektiv ist. Zudem kann das Aspirat durch peripheres Blut verunreinigt oder wegen einer zu geringen Menge nicht repräsentativ für das gesamte Knochenmark (KM) sein. Drittens können die Plasmazellen im Knochenmark ungleich verteilt und somit in der Biopsie und dem Aspirat mehr oder weniger stark variieren.

Dies führt zu den Beobachtungen, dass von den neu diagnostizierten Patient*innen, bei denen im Aspirat unter 10% Plasmazellen im Knochenmark gefunden wurden, in der Biopsie 75% (55 von 73 untersuchten Patient*innen) über 10% Plasmazellen im Knochenmark hatten.

Daher empfehlen die Autor*innen die beiden Methoden zu kombinieren und den höheren gemessenen Wert zu nutzen.

(Lee et al., 2017; S. 1ff)

Bei allen Patient*innen, bei denen eine myeloproliferative Plasmazellerkrankung mit Hilfe von SPE und IFE neu diagnostiziert wurde, soll ebenfalls ein *Free Light Chain Assay* (Freelite®) im Rahmen des Screenings erfolgen (Dispenzieri et al., 2009; S. 220). Bei diesem Test binden Antikörper spezifisch an die Epitope der im Serum zirkulierenden κ - oder λ -Leichtketten, die bei einer Bindung an eine schwere Kette nicht mehr zugänglich sind. Dann kann die Konzentration der freien Leichtketten (FLC) über die gebundenen Antikörper nephelometrisch oder turbidimetrisch bestimmt werden. Die Sensitivität des FLC Assays liegt bei unter 1 mg/l. Aus der Konzentration der Leichtketten wird ein Quotient berechnet, die sogenannte κ/λ FLC-Ratio. Ist diese abnormal, ist dies ein sensitiver Hinweis auf monoklonale κ - oder λ -FLC im Serum (siehe Tabelle 2, S. 14).

(BindingSite®, 2017); (Dispenzieri et al., 2009; S. 217)

Laut IMWG 2011 ist der FLC Assay ein sehr sensitiver Test für Leichtketten im Serum. Allerdings können durch Niereninsuffizienz und je nach Labor die gemessenen FLC-Konzentrationen variieren (Durie et al., 2006 (2); S. 1469).

Bei Verdacht auf ein Multiples Myelom kann das FLC Assay in Verbindung mit SPE und Immunfixation des Serums das Screening auf ein M-Protein im 24h-Urin ersetzen. Sollte sich aber der Verdacht bestätigen, muss eine Elektrophorese und eine Immunfixation des 24h-Urins nachgeholt werden (Kyle & Rajkumar, 2009; S.3).

Dies liegt daran, dass der Freelite® für Leichtketten-produzierende Myelome eine sehr sensitive Untersuchung ist, die 100% der Erkrankungen detektiert. Von den Myelomen, die ein intaktes M-Protein produzieren, zeigen jedoch 5-10% keine erhöhte FLC-Ratio im Serum, sodass die Kombination des Tests mit SPE und IFE sinnvoll ist.

(Katzmann et al., 2015; S. 913)

Tabelle 2: Referenzbereich des Free Light Chain Assay (Freelite®)

Serum von normalen Erwachsenen	95-Perzentile-Bereich
κ-FLC	3,30–19,40 mg/l
λ-FLC	5,71–26,30 mg/l
κ/λ-FLC-Ratio	0,26–1,65 <i>0,37–3,1 bei Niereninsuffizienz</i>

(nach BindingSite®, 2017)

Für die Beobachtung, dass Myelome, die eigentlich intakte, klonale Proteine produzieren, überhaupt erhöhte Konzentrationen an freien Leichtketten zeigen, kommen mehrere Erklärungsmodelle in Frage.

Zum einen wird auch bei Gesunden von Plasmazellen täglich als Nebenprodukt polyklonaler Immunglobuline etwa 500 mg FLC synthetisiert. Daher ist leicht vorstellbar, dass die Produktion bei starker Immunglobulin-Produktion ebenfalls stark zunimmt.

(Willrich & Katzmann, 2016; S. 912f)

Möglich ist auch, dass mehrere Klone gleichzeitig vorliegen, von denen einige intakte Immunglobuline und andere Leichtketten produzieren. Zudem beeinflussen krankheitsbedingte Immunsuppression und erniedrigte renale Clearance ebenfalls die Höhe der freien Leichtketten im Serum.

Die Höhe der FLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose im Serum ist prognostisch sehr aussagekräftig. Möglicherweise spiegelt die Höhe der FLC-Ratio die Tumorlast wider oder ist vermehrt mit IgH-Translokationen assoziiert.

(Dispenzieri et al., 2009; 216ff)

2.2.4 Diagnose-Stadien

Die Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms zum Diagnosezeitpunkt wird nach zwei verschiedenen Systemen vorgenommen, der Salmon-Durie-Klassifikation und dem International Staging System (ISS).

Die *Salmon-Durie-Klassifikation* wurde 1975 von Durie und Salmon eingeführt und teilt die Erkrankung in drei Stadien ein. Dabei bezieht sie die Konzentration von Hämoglobin, Serumkalzium, Paraprotein und Kreatinin, sowie die sichtbaren Knochenläsionen im Röntgenbild mit ein. Durch die DS-Stadien wird vor allem die Tumormasse abgebildet. (siehe Tabelle 3; S. 15)

(Durie & Salmon, 1975; S. 1975 und 1851f)

2005 wurden die Kriterien um die modernere Bildgebung mit MRT oder PET – die sogenannten Pluskriterien – ergänzt (Arastéh et al., 2013; S. 1256).

Tabelle 3: Stadien des Multiplen Myeloms nach Durie und Salmon (1975)

DS I	Alle Kriterien müssen erfüllt sein: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hämoglobin > 10 g/dl ▪ Serumkalzium normal (≤ 12 mg/dl) ▪ Knochen (Röntgen): normale Struktur oder ein solitärer Herd ▪ M-Protein: IgG < 5 g/dl (Serum); IgA < 3 g/dl (Serum); Bence Jones Protein < 4 g/24 h (Urin) ▪ „Pluskriterium“ (MRT/ PET): <5 fokale Läsionen oder „mild diffuse disease“ 	
DS II	Weder Stadium I noch III <ul style="list-style-type: none"> ▪ „Pluskriterium“ (MRT/ PET): 5-20 fokale Läsionen oder „moderate diffuse disease“ 	
DS III	Eines oder mehrere der Kriterien müssen erfüllt sein: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hämoglobin < 8,5 g/dl ▪ Serumkalzium erhöht (≥ 12 mg/dl) ▪ Knochen (Röntgen): fortgeschrittene Läsionen ▪ M-Protein: IgG > 7 g/dl (Serum); IgA > 5 g/dl (Serum); Bence Jones Protein > 12 g/24 h (Urin) ▪ „Pluskriterium“ (MRT/ PET): >20 fokale Läsionen oder „severe diffuse disease“ 	
	Zusatzbezeichnung A	Zusatzbezeichnung B
Nierenfunktion	normal (Kreatinin ≤ 2 mg/dl)	verschlechtert (Kreatinin >2 mg/dl)

(nach Durie & Salmon, 1975; Tabelle 1) und (nach Arastéh et al., 2013; S. 1246)

Das *International Staging System* (ISS) wurde 2005 auf Basis eines statistischen Modells nach Überlebensdauer der Patient*innen bei Standard- und Hochdosis-Chemotherapie mit Stammzelltransplantation definiert. Es teilt die Erkrankung nach Albumin- und β 2-Mikroglobulin-Konzentration ebenfalls in drei Stadien. (siehe Tabelle 4, S. 16)

(Greipp et al., 2005; S. 3411ff)

Dabei bildet die Höhe der β 2-Mikroglobulin-Konzentration die Tumormasse und die Nierenfunktion ab, während die Albumin-Konzentration durch inflammatorische Zytokine aus der Umgebung der Myeloms-Zellen beeinflusst wird (Palumbo et al., 2015; S. 2864).

Im Vergleich zum DS-Stadium sind die ISS-Stadien jedoch insgesamt objektiver und reproduzierbarer (Hari et al., 2009; S. 2f und 8).

Tabelle 4: ISS-Klassifikation zur Stadien-Einteilung des Multiplen Myeloms (2005)

	ISS I	ISS II		ISS III
β2-Mikroglobulin	< 3,5 mg/dl und	<3,5 mg/dl und	3,5-5,5 mg/dl	< 5,5 mg/dl
Albumin	\geq 3,5 mg/dl	<3,5 mg/dl		

(nach Arastéh et al., 2013; S. 1256)

Durch die Einteilungen kann die Überlebenszeit und damit die Therapieindikation abgeschätzt werden. (siehe Tabelle 5, S. 16)

(Durie, 2006 (1); S. 1540)

Tabelle 5: Medianes Überleben in Monaten nach Diagnosestadien im Vergleich

Stadium		Durie-Salmon-Klassifikation	Salmon-Durie-Plus-Klassifikation	ISS-Klassifikation
I	A	69	72	62
	B	22	20	
II	A	58	61	44
	B	42	28	
III	A	45	40	29
	B	24	19	

(nach Durie, 2006 (1); Tabelle 4)

In der klassischen, numerischen Chromosomenanalyse in der Metaphase zeigen ein Drittel der Patient*innen einen abnormalen Karyotyp, der ein Risikofaktor für ein signifikant kürzeres Überleben darstellt.

(Kyle & Rajkumar, 2009; S. 6); (Dimopoulos et al., 2011; S. 4703)

Eine genauere Methode zur Bestimmung der zytogenetischen Veränderungen wie Translokationen und Deletionen ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in der Interphase des Zellzyklus (iFISH) eines Knochenmarkpunktates.

(Sonneveld et al., 2016; S. 2955f)

Liegen keine zytogenetischen Veränderungen vor, ist dies für die Prognose günstig.

Generell unterscheidet man zwischen zwei Arten von primären zytogenetischen Anomalien: Den Hyperdiploidien, bei denen ein ganzes Chromosom mehr als zweimal vorliegt und IgH-Translokationen, bei denen ein Onkogen in das Gen für die schwere Kette des IgH auf Chromosom 14 gelangt. Dazu gehört t(11;14) als eher günstiger prognostischer Marker, sowie t(4;14) und t(14;16) mit einer sehr ungünstigen Prognose. Sekundär können weitere Anomalien in den Myelom-Zellen hinzukommen. Prognostisch sehr ungünstig sind z.B. Duplikationen wie gain(1q) und Deletionen wie del(17p). Je nachdem in welcher Kombination die Veränderungen vorliegen und welche Therapie durchgeführt wird, variiert die prognostische Aussage und wird laufend neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen angepasst.

(Rajan & Rajkumar, 2015; S. 1-4); (Sonneveld et al., 2016; Tabelle 1)

Entsprechend dem Overall Survival (OS) der Patient*innen kann man verschiedene Risikogruppen bezüglich der Wahrscheinlichkeit eines Progresses bilden. Eine solche Hochrisiko-Zytogenetik ist unter anderem das Vorliegen von t(14;16) oder t(4;14) und/oder del(17p). Patient*innen mit einer oder mehrerer dieser zytogenetischen Anomalien weisen mit einem medianen OS von 24,5 Monaten ein deutlich schlechteres Outcome auf als solche ohne diese zytogenetischen Anomalien, die im Median 50,5 Monate überleben ($P < 0,001$).

(Palumbo et al., 2015; S. 2863)

Die ISS-Kriterien wurden 2015 von der IMWG klinisch angepasst und um die oben genannte Hochrisiko-Zytogenetik und die LDH-Konzentration ergänzt. Diese Klassifikation wird *Revised International Staging System (R-ISS)* genannt. (siehe Tabelle 6, S. 18)

Die Konzentration der LDH im Serum bildet ebenfalls die Tumormasse ab, aber spricht zusätzlich für eine hohe Proliferation und Aggression des Tumors. Eine hohe LDH ist mit einem kürzeren OS vergesellschaftet. Dabei beobachteten Palumbo et al. in ihrer Studie bei Patient*innen mit R-ISS-Stadium I eine 5-Jahres-Überlebensrate von 82%, verglichen mit 62% bei R-ISS II und 40% bei R-ISS III. Im Vergleich zur alten ISS-Klassifikation bescheinigen die Autor*innen dem neuen Staging-System eine bessere prognostische Aussagekraft.

(Palumbo et al., 2015; S. 2864f)

Tabelle 6: Revised ISS-Klassifikation zur Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms (2015)

R-ISS I	ISS-Stadium I und <u>beide</u> folgenden Kriterien müssen zutreffen: <ul style="list-style-type: none"> ▪ normale Serum-LDH (unter dem oberen Normwert) <u>und</u> ▪ Standard-Zytogenetik (FISH)
R-ISS II	weder Stadium I noch III
R-ISS III	ISS-Stadium II und <u>eines</u> der folgenden Kriterien muss zutreffen: <ul style="list-style-type: none"> ▪ hohe Serum-LDH (über dem oberen Normwert) <u>oder</u> ▪ Hochrisiko-Zytogenetik (FISH): t(4;14) oder t(14;16) und/oder del (17p)

(nach Palumbo et al., 2015; Tabelle 1)

2.2.5 Therapie

Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patient*innen mit Multiplem Myelom hat sich in Deutschland über die letzten fünfzehn Jahre von 47,3% (2002-2004) auf 53,8% (2008-2010) verbessert. Die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit lag in Deutschland im Zeitraum 2008 bis 2010 über alle Altersgruppen bei 32,6%.

(Pulte et al., 2015; Tabelle 2 und 3)

Damit ist das Myelom eine immer besser behandelbare, aber noch nicht heilbare Erkrankung. Der Aufwärtstrend der Überlebenswahrscheinlichkeit lässt sich durch verbesserte Therapien erklären:

Vor dem 21. Jahrhundert waren die Therapieoptionen auf Stammzelltransplantationen und konventionelle chemotherapeutische Schemata, wie Melphalan und Prednisolon oder Vincristin, beziehungsweise Dexamethason und Doxorubicin, begrenzt.

Anfang des 21. Jahrhunderts kamen neue Medikamente für die Therapie des Multiplen Myeloms hinzu, unter anderem Thalidomid und Lenalidomid, sogenannte Immunmodulatorische Substanzen (IMiDs), und der Proteasom-Inhibitor Bortezomib. Neue Therapieschemata und die zweite Generation dieser Biologicals, darunter der Proteasom-Inhibitor Carfizomib und die IMiD Pomalidomid, verbessern weiterhin die Überlebenschancen von Myelom-Patient*innen.

(Pulte et al., 2015; S. 193f)

Je nach Alter und Komorbiditäten variieren die aktuellen Empfehlungen zur Therapie des Multiplen Myeloms. Wir beschränken uns hierbei auf die Therapie von Hochdosis-geeigneten Patient*innen, da diese in der in dieser Studie beobachteten Population angewendet wird.

Patient*innen unter 65 bis 70 Jahren, in gutem Allgemeinzustand und ohne relevante Komorbiditäten sind für eine Hochdosis-Therapie geeignet.

Zunächst erfolgt dabei eine Induktions-Therapie mit einer Dreierkombination aus Bortezomib, Dexamethason und einem dritten Medikament, wie Lenalidomid (VRD-Protokoll), Cyclophosphamid (VCD-Protokoll) oder Thalidomid (VTD-Protokoll).

Nach drei bis sechs Zyklen Induktionstherapie erreichen 75-80% eine partial response (PR) oder besser.

(Gerecke et al., 2016; S. 471f)

Zur Chemo-Mobilisation autologer Stammzellen wird der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) eingesetzt, bevor die myeloablative Hochdosistherapie aus ein bis zwei Zyklen Melphalan (HDT) und die autologe Stammzelltransplantation (ASCT) erfolgt (Rasche, Knop, & Einsele, 2015; S.11).

Im Rahmen von Studien wird danach versucht, die Zeit bis zum Rezidiv durch Erhaltungstherapien zu verlängern. Dazu gehört unter anderem die Therapie mit Lenalidomid. (Gerecke et al., 2016; S. 472)

2.2.6 Response-Kriterien

Das Ansprechen (engl. response) auf eine Therapie wird beim Multiplen Myelom in unterschiedliche Response-Kriterien zusammengefasst, deren Definition einem gewissen Wandel unterliegt. In dieser Arbeit beziehen wir uns auf die Definition nach der International Myeloma Working Group, die 2006 aufgestellt wurde, da diese auch unserer Studie zugrundeliegen. (siehe Tabelle 7, S. 21)

Eine Beurteilung der Response - mit Ausnahme von CR - kann nur bei den Patient*innen mit Multiplem Myelom erfolgen, die eine messbare Erkrankung haben. (siehe Kapitel 2.2.2, S. 11)

In die Kriterien fließen die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen ein, die im Rahmen der Ausführungen über die Diagnosestellung des Multiplen Myeloms schon erläutert wurden.

Das FLC Assay ist bei Patient*innen, die zum Diagnosezeitpunkt eine FLC-Konzentration unter 10 mg/dl bei normaler FLC κ/λ -Ratio aufwiesen, in allen Response-Kategorien außer CR zum Response-Assessment im Verlauf anstelle der Bestimmung des M-Proteins nicht empfohlen.

Eine Normalisierung der FLC κ/λ -Ratio ist neben der Abwesenheit klonaler Zellen im Knochenmark ausschlaggebend für die Response-Kategorie sCR.

(Durie et al., 2006 (2); S. 1469)

Die Definition der Progression der Responsekategorie PD wird genutzt, um bei allen Patient*innen die Zeit bis zur Progression (engl. time to progression [TTP]) und das Progressions-freie Überleben (engl. progression free survival [PFS]) zu bestimmen. Als PFS bezeichnet man die Zeit von Beginn der Therapie bis zur Progression der Erkrankung oder zum Tod des Patient*innen, unabhängig von der Todesursache, je nachdem welches Ereignis früher eintritt. Unter der TTP versteht man die Zeit von Beginn der Therapie bis zur Progression der Erkrankung, wobei nicht-progressions-assoziierte Todesfälle zensiert werden. Das Gesamtüberleben (engl. overall survival [OS]) ist demnach die Zeit von Beginn der Therapie bis zum Tod des Patient*innen. Dafür ist ein Beobachtungszeitraum von über 5 Jahren notwendig.

(Durie et al., 2006 (2); S.1468-1472)

Tabelle 7: Response-Kriterien des Multiplen Myeloms nach IMWG (2006)

Stringent complete response (sCR)	Alle folgenden Kriterien müssen zutreffen: <ul style="list-style-type: none">▪ Kriterien der CR▪ Normale FLC-Ratio▪ Abwesenheit klonaler Zellen im Knochenmark (Immunhistochemie/Immunfluoreszenz)
Complete response (CR)	Alle folgenden Kriterien müssen zutreffen: <ul style="list-style-type: none">▪ Negative Immunfixation (Serum und Urin)▪ Kein Nachweis von Weichteilmanifestationen▪ Unter 5% Plasmazellen im Knochenmark
Very good partial response (VGPR)	Eines der folgenden Kriterien muss zutreffen: <ul style="list-style-type: none">▪ M-Protein in der Immunfixation im Serum <u>und</u> Urin nachweisbar, aber nicht in der Elektrophorese (ehemalig definiert als nCR)▪ Reduktion des M-Proteins im Serum um $\geq 90\%$ <u>und</u> auf < 100 mg/24h im Urin
Partial response (PR)	Reduktion der Weichteilmanifestation um $\geq 50\%$, wenn vorhanden <u>und</u> eines der folgenden Kriterien muss zutreffen: <ul style="list-style-type: none">▪ Reduktion des M-Proteins im Serum um $\geq 50\%$ <u>und</u> Reduktion um $\geq 90\%$ im 24h-Urin, bzw. auf < 200mg/ 24h▪ <i>Wenn M-Protein nicht messbar:</i> Reduktion der Differenz aus involviertem und nicht-involviertem FLC um $\geq 50\%$▪ <i>Wenn FLC und M-Protein nicht messbar:</i> Reduktion der Plasmazellen im Knochenmark um $\geq 50\%$ (bei ursprünglich $\geq 30\%$)
Stable disease (SD)	Definitionen von CR, VGPR, PR und PD treffen nicht zu
Progressive disease (PD)	Zunahme um 25% ausgehend vom niedrigsten gemessenen Wert in einem oder mehreren der folgenden Punkte: <ul style="list-style-type: none">▪ M-Protein im Serum (absolut um $\geq 0,5$g/100ml) oder im Urin (absolut um ≥ 200mg/24h)▪ <i>Wenn M-Protein nicht messbar:</i> Differenz aus involviertem und nicht-involviertem FLC (absolut um > 10mg/l)▪ Plasmazellen im Knochenmark (absolut $\geq 10\%$)▪ Neue <u>oder</u> zunehmende Knochen-/Weichteilläsionen▪ Myelom-assoziierte Hyperkalziämie (Serumkalzium $> 11,5$mg/100ml)

(nach Kyle & Rajkumar, 2009; Tab. 5)

An dieser Stelle werden nur Studien bezüglich des Überlebens von HDT/SCT-geeignete Patient*innen betrachtet, da diese Patient*innengruppe in der DSM XIV-Studie eingeschlossen wurden.

Unter der Therapie mit den in den letzten fünfzehn Jahren entwickelten Kombinationstherapien zur Konsolidierung und Erhaltung nach ASCT erreichen fast alle Patient*innen eine Response und in einigen Studien sogar über 50% der Patient*innen eine CR. Dabei besteht wahrscheinlich eine – lang umstrittene – positive Assoziation zwischen Erreichen der CR und der Länge des PFS, sowie des OS.

(Kumar et al., 2016; S.328f)

In einer Metaanalyse von van de Velde et al. zeigten viele, aber nicht alle Studien eine positive Assoziation zwischen Erreichen der CR während oder nach der HDT/SCT und dem OS sowie dem PFS (van de Velde et al., 2007; S. 1401 und 1405).

Auch innerhalb der CR-Kategorie gibt es Unterschiede im PFS. Beispielhaft sei hierzu die prospektive Studie von Kapoor et al. aus dem Jahr 2013 genannt, die zeigt, dass Patient*innen mit sCR als maximale Response nach ASCT ein signifikant längeres PFS aufweisen als Patient*innen in CR und near CR, das später als Teil von VGPR definiert wurde (PFS: sCR 50 Monate; CR 20 Monate; nCR 19 Monate; $P < 0,001$).

(Kapoor et al., 2013; S.4531).

Obwohl sich die Therapiemöglichkeiten des multiplen Myeloms in den letzten Jahren stark weiterentwickelt haben, ist die Response-Analyse nach IMWG über die letzten 15 Jahre nicht stark abgewandelt worden.

Wie gut sie den Langzeitnutzen der Therapie abbildet, ist daher umstritten.

Eine(r) von drei Patient*innen mit CR hat nach 10 Jahren kein Rezidiv und kann somit möglicherweise als geheilt angesehen werden. Andererseits sind auch 10% der Patient*innen, die nur nCR oder schlechter erreichen, nach 10 Jahren frei von einem Rezidiv. Währenddessen erleiden 40% der nicht Hochdosis-geeigneten Patient*innen mit CR innerhalb von 4 Jahren ein Rezidiv und 20% von ihnen versterben – eine Beobachtung, die bei den Hochdosis-geeigneten Patient*innen in ähnlicher Weise zu sehen ist. Zudem unterscheidet sich das Outcome der Patient*innen trotz ähnlicher CR-Raten je nach Therapie-Regime, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Qualität der CR je nach Therapie stark variiert.

(Paiva, van Dongen, & Orfao, 2015; S. 3059f)

Früher oder später kommt es also bei den meisten Patient*innen zu einem Rezidiv. Das lässt darauf schließen, dass die konventionellen Methoden zur Feststellung einer CR oder sCR noch nicht sensitiv genug sind, um eine noch vorhandene Resterkrankung auszuschließen. (Kumar et al., 2016; S. 328f)

2.2.7 Minimal Residual Disease (MRD)

Diese Resterkrankung, die mit den bisherigen Methoden des Response-Assessments nicht detektierbar ist, nennt man minimale Resterkrankung (Kumar et al., 2016; S. 328). Dabei wurde in vorangehenden Studien eine vorhandene minimale Resterkrankung (engl. minimal residual disease [MRD]) als ein Anteil von über $1:10^5$ (0,00001%) klonaler Zellen an der Gesamtpopulation der Plasmazellen definiert.

(Paiva et al., 2015; S. 3060)

Um die Sensitivität zur Erkennung klonaler Plasmazellen zu erhöhen, wurden neue Methoden zur Untersuchung von Knochenmarksaspiraten entwickelt, bei denen mehrere 1.000 Mio. Zellen in kurzer Zeit untersucht werden können: die Durchflusszytometrie (engl. multiparametric flow cytometry [MFC]), die Allelspezifische Oligonukleotid (ASO)-qPCR und die next generation-Sequenzierung von VDJ-Sequenzen.

(Kumar et al., 2016; S. 329)

Ich möchte an dieser Stelle nur die *Durchflusszytometrie* näher betrachten, weil auch unsere Studie mit dieser Methode arbeitet.

Die Durchflusszytometrie ist schon seit Jahren für die Diagnostik des Multiplen Myeloms im Einsatz, gewann aber durch die technologische Weiterentwicklung in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Durch die Markierung verschiedener Oberflächenmarker und intrazellulärer Antigene ist es möglich, in kurzer Zeit große Mengen an Zellen auf ihren Zelltyp und die individuellen Charakteristika innerhalb eines Zelltyps wie Klonalität hin zu untersuchen. Dabei unterscheidet man 4-, 6- und 8-Farben-Durchflusszytometrie.

(Kumar et al., 2016; S. 329)

Für die 8-Farben-Durchflusszytometrie wird eine Sensitivität von $1:10^4$ bis $1:10^6$ angegeben, was bedeutet, dass klonale Zellen mit einem Anteil von 0,0001-0,000001%

an der Gesamtpopulation detektiert werden können. Für diese Genauigkeit müssen mindestens acht Marker untersucht werden.

(Paiva et al., 2015; S. 3062); (Flores-Montero et al., 2017; S. 2)

Sind keine klonalen Zellen mit der Durchflusszytometrie detektierbar, so spricht man von einer Flow MRD-negativen Erkrankung (Kumar et al., 2016; S. 335). Dies wird im Folgenden einfachheitshalber nur als MRD-Negativität bezeichnet.

Im Jahr 2011 definierte die IMWG zusätzlich unter anderem die immunphänotypische CR, bei der zusätzlich zur CR in der Durchflusszytometrie (≥ 4 Farben) keine klonalen Plasmazellen nachweisbar sein dürfen, wobei insgesamt mindestens 1 Millionen Zellen untersucht werden müssen (Rajkumar et al., 2011; S.4694).

Der MFC-basierte MRD-Status ist einer der wichtigsten prognostischen Faktoren für das Outcome nach HDT/ASCT. Das Erreichen einer MRD-Negativität ist mit einem längeren PFS und OS vergesellschaftet.

(Paiva et al., 2015; S. 3063)

In ihrer Studie aus dem Jahr 2017 stellen J. Lahuerta et al. fest, dass die MRD-positiven Patient*innen in CR ein ähnliche langes PFS und OS ausweisen wie die MRD-positiven Patient*innen in nCR und PR. Gleichzeitig zeigen MRD-negative Patient*innen unabhängig von ihrem Response-Stadium ein signifikant längeres PFS und OS als Patient*innen in CR. Das MRD-Assessments erfolgte hierbei nach HDT/ASCT, bzw. bei nicht-transplant geeigneten Patient*innen nach neun Induktions-Zyklen.

Sie postulieren, dass das Erreichen einer MRD-Negativität nach HDT/ASCT ein besserer prognostischer Marker ist als das Erreichen der CR. Das insgesamt bessere Outcome bezüglich des PFS und OS von Patient*innen in CR gegenüber den anderen Response-Kategorien führen die Autor*innen auf den höheren Anteil an MRD-negativen Patient*innen in der CR-Kategorie zurück.

(Lahuerta et al., 2017; S. 3, 6 und 8f)

Auch Paiva et al. zeigten schon in ihrer Studie aus dem Jahr 2008, dass MRD-negative Patient*innen auch innerhalb der CR-Kategorie ein signifikant längeres PFS ausweisen als die MRD-Positiven. Der Zeitpunkt einer erreichten MRD-Negativität wirkt sich ebenfalls auf das auf das Outcome aus: Patient*innen, die vor und nach HDT/ASCT MRD-positiv waren, zeigen ein signifikant kürzeres PFS auf als solche, die nach der Induktionstherapie noch positiv waren, aber im Laufe der HDT/ASCT negativ wurden.

Das längste PFS haben die Patient*innen, die bereits nach der Induktionstherapie keine klonalen Plasmazellen mehr im Knochenmark aufweisen.

(Paiva et al., 2008; S. 4019f)

Sowohl Lahuerta et al., als auch Paiva et al. identifizieren unter anderem den MRD-Status als unabhängigen prognostischen Risikofaktor für das PFS und OS.

(Paiva et al., 2008; S. 4019) und (Lahuerta et al., 2017; S. 6)

Da die untersuchte Probe des Knochenmarks - wie bereits erläutert - nicht unbedingt repräsentativ sein muss, empfehlen Paiva et al. sich eher auf die MRD-Positivität, als auf ihre Negativität zu verlassen. Dieser Umstand kann neben einer verlängerten Halbwertszeit der Immunglobuline eine positive Immunfixation bei negativem MRD-Status bedingen.

Zudem sollte sich die Methode, bevor sie in die klinische Routine aufgenommen wird, bezüglich der Sensitivität, der Kosteneffektivität, der Verfügbarkeit und der Standardisierung weiter verbessert werden (Paiva et al., 2015; S. 3065).

In der Studie aus dem Jahr 2008 empfehlen Paiva et al. die MRD-Analyse unter anderem aus Kostengründen nur für Patient*innen in CR oder nCR, da die Patient*innen mit einer niedrigeren Response-Kategorie ohnehin zum Großteil MRD-positiv sind. Als weiteren Nachteil führen sie auf, dass extramedulläre Plasmozytome in der MRD-Analyse nicht abgebildet werden und betonen daher die Wichtigkeit einer zusätzlichen Bildgebung.

(Paiva et al., 2008; S. 4021f)

2.3 Das Heavy Light Chain Assay

2.3.1 Theorie

Basis des Heavy Light Chain Assay (Hevylite®; The Binding Site, Ltd.; Birmingham, UK), das 2009 auf den Markt kam, sind spezifische Antikörper gegen Epitope der Bindungsstelle zwischen leichten und schweren Ketten der intakten Immunglobuline. Dadurch kann nicht nur die Klasse des Immunglobulins festgestellt werden, sondern erstmals zwischen λ - und κ -Isotyp unterschieden werden. Dies ermöglicht eine exakte, nephelometrische Quantifizierung des involvierten und des nicht-involvierten Heavy-Light Chains (HLC) eines Myeloms.

(Kumar et al., 2016; S. 341); (Scudla et al., 2016; S.85)

Die gemessenen Konzentrationen der HLC der einzelnen Immunglobulin-Klassen im Serum können einzeln betrachtet, aber auch in ein Verhältnis gesetzt werden: die sogenannte Heavy-Light-Chain Ratio (HLC-Ratio). Typischerweise errechnen die meisten Autor*innen die HLC-Ratio als κ -HLC zu λ -HLC, für IgG bedeutet das z.B. $\text{IgG}\kappa/\text{IgG}\lambda$.

Alternativ berechnen einige Autor*innen eine Ratio, bei der die involvierte HLC immer im Zähler steht und die nicht-involvierte HLC im Nenner, also HLC κ/λ -Ratio für Ig κ -Myelome und HLC λ/κ -Ratio für Ig λ -Myelome. Diese Besonderheit wird im Folgenden wie im Original von Scudla et al. mit einem hochgestellten x markiert (^xHLC-Ratio).

(Scudla et al., 2016; S.85 und 91)

2.3.2 Vor- und Nachteile

Als offensichtlichster Vorteil des Heavy Light Chain Assay sei genannt, dass es - auch bei niedriger Konzentration des M-Proteins, wie bei einem oligosekretorischen Myelom - die vom Tumor produzierten, klonalen Immunglobuline vom polyklonalen Isotyp unterscheiden und quantifizieren kann. Das ist der klassischen Nephelometrie und auch der SPE nicht möglich.

(Ludwig et al., 2013; S.217)

Bradwell et al. postulieren daher, dass die HLC κ/λ -Ratio des involvierten Immunglobulins ein besserer prognostischer Marker sei als der M-Gradient oder die Konzentration des involvierten Gesamt-Immunglobulins im Serum.

(Bradwell et al., 2013; S. 206)

Laut Hersteller des Heavy Light Chain Assay geht damit auch die Möglichkeit einher, mithilfe von Freelite® und Hevylite® frühzeitig Rezidive unter Therapie zu erkennen, auch solche, die ein anderes als das ursprüngliche Paraprotein produzieren. (BindingSite®, 2017)

Als Vorteil gegenüber dem Freelite® sei zudem genannt, dass im Gegensatz zur FLC-Messung die HLC-Messung nicht durch die Nierenfunktion beeinträchtigt wird, da intakte Immunglobuline nicht über die Niere ausgeschieden werden (Tovar et al., 2012; S. 1078).

Die Berechnung einer Ratio bietet aber laut Bradwell et al. zusätzlich weitere Vorteile: Durch die Berechnung eines Verhältnisses aus der Konzentration von mono- und polyklonalem Immunglobulin werden Störfaktoren ausgeschaltet, die beide Isotypen gleichermaßen betreffen. Das sind zum einen Änderungen des Hämatokrits und des Plasmavolumens, durch die die Konzentration eines Immunglobulins um mehr als 50% variieren kann.

Aber auch ein Blick auf den Metabolismus der Immunglobuline kann - von der Tumorsyntheserate unabhängige - Konzentrationsschwankungen erklären:

Durch Bindung an zelluläre Fc-Rezeptoren wird IgG „recycelt“ und zeigt eine verlängerte Halbwertszeit. Dagegen werden ungebundene IgGs innerhalb weniger Tagen abgebaut. Diese Recyclingprozesse sind abhängig von der Konzentration von IgG im Serum.

(Bradwell et al., 2013; S. 206)

Bei niedrigen IgG-Konzentrationen – zum Beispiel bei einer geringen Tumormasse oder bei Immunsuppression – kann sich laut Scudla et al. seine normale Halbwertszeit von 21 Tagen auf mehrere Wochen verlängern und die Bestimmung der Konzentration fällt zu hoch aus. Bei hohen IgG-Konzentrationen – wie bei einer hohen Tumorlast – kann die Halbwertszeit auf wenige Tage verkürzt sein, wodurch die Konzentration von IgG zu niedrig gemessen wird.

Für IgA sind solche Schwankungen weit weniger extrem. Die Halbwertszeit von IgA kann sich von zwei auf fünf Tage verlängern.

(Scudla et al., 2016; S. 91)

Dies führt uns zu den Nachteilen des Heavy Light Chain Assays:

Die von der Sättigung der Fc-Rezeptoren abhängigen Schwankungen der IgG-Konzentration im Serum sind ein Grund, warum beim Heavy Light Chain Assay die Höhe des involvierten Immunglobulins alleine nicht exakt die Tumormasse, bzw. die Reduktion derselben abbilden kann (Scudla et al., 2016; S. 91).

Nachteilig können ebenfalls Schwankungen der gemessenen HLC sein, die im Rahmen von Gewinnung, Lagerung, Transport oder (Nach-)Messungen der Proben auftreten: Laut Katzmann et al. reduziert sich die gemessene HLC im Median um 2,5-4,7% nach 7 Tagen Lagerung des Serums bei Raumtemperatur, um 2,2-4,9% nach 7 Tagen bei 4°C und um 3,4-6,7% nach 3 Zyklen Auftauen und Einfrieren.

(Katzmann et al., 2015; S. 361f)

Desweiteren seien laut Tovar et al. noch keine Studien erfolgt, die die Auswirkung von Infektionen, Medikamenten oder intravenösen Immunglobulin-Gaben auf die HLC-Ratio untersuchen (Tovar et al., 2012; S. 1078).

2.3.3 Referenzbereiche

Die folgenden Referenzbereiche sind der Webseite des Herstellers entnommen.

Tabelle 8: Referenzbereiche des Heavy Light Chain Assay (Hevylite®)	
	95-Perzentile-Bereich (SPA_{plus})
IgG κ	3,84 -12,07 g/L
IgG λ	1,91-6,74 g/L
IgG κ/λ HLC-Ratio	1,12-3,21
IgA κ	0,57-2,08 g/L
IgA λ	0,44-2,04 g/L
IgA κ/λ HLC-Ratio	0,78-1,94
IgM κ	0,19-1,63 g/L
IgMλ	0,12-1,01 g/L
IgM κ/λ HLC-Ratio	1,18-2,74

(nach BindingSite®, 2017)

2.3.4 Bisherige Studien

2.3.4.1 Bedeutung der HLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose

Ob stets eine abnormale HLC-Ratio zum Diagnosezeitpunkt vorliegt, dazu gibt es je nach Studie unterschiedliche Ergebnisse.

In einer Studie aus dem Jahr 2013 von Bradwell et al. liegt die HLC κ/λ -Ratio des involvierten Immunglobulins bei den untersuchten Patient*innen mit IgG- und IgA-Myelomen zum Diagnosezeitpunkt jeweils außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls der Normalwerte, die anhand von Proben aus Blutspenden erhoben wurden.

(Bradwell et al., 2013; S. 203)

Dies ist konsistent mit den Ergebnissen einer retrospektiven Studie von Ludwig et al. aus dem Jahr 2013 in der alle Patient*innen zum Zeitpunkt der Diagnose eine HLC κ/λ -Ratio des involvierten Immunglobulins außerhalb der von Binding Site definierten Normwerte aufweisen. Allerdings liegen auch 5% der Kontrollseren gesunder Probanden außerhalb der normalen Grenzen, wenn auch nur gering.

(Ludwig et al., 2013; S. 214)

Im Unterschied dazu finden Scudla et al. in einer prospektiven Studie aus dem Jahr 2016 je nach Myelom-Subtyp in 0-8% der Fälle bei Diagnosestellung eine normale HLC-Ratio. Daraus schlussfolgern sie, dass nur Anhand des Heavy Light Chain Assay noch keine Diagnose eines Multiplen Myeloms gestellt werden kann.

(Scudla et al., 2016; S. 86ff)

Ein je nach Studie mehr oder weniger häufiges Problem war eine Co-Migration von Proteinen in der SPE, die die Diagnosestellung besonders unter den IgA-Myelomen erschwerte.

In der oben genannten Studie von Ludwig et al. aus dem Jahr 2013 war bei 46% der IgA-Patient*innen und 4% der IgG-Patient*innen die SPE zum Diagnosezeitpunkt nicht eindeutig, da andere Proteine das M-Protein überlagern, in den meisten Fällen als Co-Migration in die die β -Fraktion (Ludwig et al., 2013; S. 214).

Zu weniger extremen Ergebnissen kommen Boyle et al. in ihrer Studie aus dem Jahr, in der bei 20,6% der Patient*innen mit IgA-Myelom co-migrierender Banden auftraten. Die HLC κ/λ -Ratio zum Diagnosezeitpunkt ist auch bei diesen Patient*innen außerhalb der von Binding SiteTM definierten Normwerte. Die Autor*innen schlussfolgern daraus,

dass der Heavy Light Chain Assay eine sensitive Methode ist, um ein IgA-Myelom zu erkennen.

(Boyle et al., 2014; S. 3953-3956)

In der oben genannten Studie von Scudla et al. aus dem Jahr 2016 untersuchen die Autor*innen zudem den Zusammenhang zwischen Ergebnissen des Heavy Light Chain Assay und der Diagnose-Stadien des Multiplen Myeloms:

Für IgG-Myelome finden sie einen signifikanten Unterschied zwischen der medianen κ/λ -Ratio in den DS-Stadien 1 bis 3 und A/B, sowie den ISS-Stadien I bis III.

Für IgA-Myelome finden sie nur zwischen DS-Stadium 1 und 2 einen signifikanten Unterschied der medianen κ/λ -Ratio.

(Scudla et al., 2016; S.91)

Scudla et al. beobachten in ihrer Studie einen schwachen Zusammenhang zwischen erhöhter κ/λ - und FLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose unter den IgG-Myelomen, den sie für die IgA-Myelome nicht finden, was sie auf die geringere Fallzahl für IgA-Myelome zurückführen. (Scudla et al., 2016; S.86ff)

Auch Koulieris et al. zeigen in ihrer Studie aus dem Jahr 2012 einen signifikanten Zusammenhang zwischen κ/λ -Ratio über dem Median und FLC κ/λ -Ratio über dem Median zum Diagnosezeitpunkt. Insgesamt korrelierten die Ergebnisse der κ/λ - und FLC- Ratio stark miteinander, sodass sie dieselbe prognostische Aussagekraft hätten, so die Autor*innen. (Koulieris et al., 2012; S.3f)

Mehrere Studien legen einen Zusammenhang zwischen einer HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins außerhalb der definierten Normwerte zum Zeitpunkt der Diagnose und einem kürzeres PFS und OS nahe. Hier werden stellvertretend drei davon vorgestellt.

In der oben genannten Studie von Bradwell et al. aus dem Jahr 2013 zeigen die Autor*innen für Patient*innen mit IgG-Myelom, dass eine starke Abweichung von den Normwerten der IgG κ/λ HLC-Ratio zum Diagnosezeitpunkt mit einem kürzeren PFS assoziiert ist. Das trifft aber für IgA-Patient*innen und die IgA κ/λ HLC-Ratio in der Studie nicht zu, was die Autor*innen auf die geringere Zahl von IgA-Patient*innen in der Studie zurückführen.

(Bradwell et al., 2013; S. 204f)

Dies wiederum ist konsistent zu den Ergebnissen von Ludwig et al. aus dem Jahr 2013. Dort beobachten die Autor*innen, dass Patient*innen mit abnormaler HLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose signifikant länger überleben als diejenigen mit hoch abnormaler HLC-Ratio: Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patient*innen mit abnormaler HLC κ/λ -Ratio des involvierten Immunglobulins zum Zeitpunkt der Diagnose beträgt 58,9%, bei hoch abnormaler HLC κ/λ -Ratio dagegen 33,4%.

Insgesamt zeigt sich die hoch abnormale HLC κ/λ -Ratio des involvierten Immunglobulins zum Diagnosezeitpunkt als unabhängiger Risikofaktor für ein kürzeres Überleben.

(Ludwig et al., 2013; S. 215)

Damit vereinbar sind die Ergebnisse der Studie von Koulieris et al. aus dem Jahr 2012. Eine x HLC –Ratio über dem Median zum Diagnosezeitpunkt zeigt sich als Risikofaktor für eine kürzere Zeit bis zur Therapie und für ein kürzeres Überleben nach konventioneller Therapie (Koulieris et al., 2012; S. 4 und 6).

2.3.4.2 Bedeutung der HLC-Ratio im Verlauf der Therapie

Im Median scheint die Höhe des involvierten HLC und der HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins die Response-Kategorie widerzuspiegeln.

Ludwig et al. weisen auf einen signifikanten Unterschied in der Höhe der x HLC-Ratio sortiert nach bester Response-Kategorie hin, der sich zum Zeitpunkt der Diagnose noch nicht manifestiert.

(Ludwig et al., 2013; S. 214f)

Passend dazu finden Harutyunyan et al. in ihrer Studie aus dem Jahr 2016 eine signifikante Erhöhung der Konzentration von involviertem HLC zum Zeitpunkt des Response-Assessments in Patient*innen mit PD und PR, verglichen mit denen mit CR. Auch die Höhe der x HLC-Ratio zum Zeitpunkt des Response-Assessments unterscheidet sich signifikant zwischen den Patient*innen mit PD, PR und CR jeweils im Vergleich.

(Harutyunyan et al., 2016; S. 84f)

Jedoch haben nicht alle Patient*innen in einer niedrigen Response-Kategorie auch eine hohe HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins.

In Studie von Ludwig et al. zeigen 12 von den 35 Patient*innen, die durch die Therapie nCR oder VGPR erreichen, eine normalisierte HLC κ/λ -Ratio des involvierten Immunglobulins, obwohl die IFE definitionsgemäß positiv bleibt. Dies, so die Autor*innen, könne daran liegen, dass bei einer Erhöhung des involvierten HLC – sei es durch ein verlängerte Halbwertszeit des Immunglobulins oder durch einen noch vorhandenen produzierenden Tumorrest – ein durch Therapieansprechen ebenfalls erhöhtes polyklonales HLC die HLC κ/λ -Ratio normalisieren könnte. Dass ein noch vorhandener Tumorrest für das erhöhte involvierte HLC verantwortlich ist, sei laut Autor*innen unwahrscheinlich, da eine normalisierte HLC κ/λ -Ratio in ihrer Studie unabhängig von der IFE mit einem signifikant längeren Überleben ab dem Zeitpunkt der besten Response zusammenhängt.

Umgekehrt ist es genauso: Von den 31 Patient*innen, die durch die Therapie (IFE-negatives) CR erreichen, haben acht noch eine abnormale HLC κ/λ -Ratio des involvierten Immunglobulins, wovon wiederum vier eine normale FLC κ/λ -Ratio zeigen. Da in ihrer Studie eine abnormale HLC κ/λ -Ratio mit einem kürzeren Überleben assoziiert ist, vermuten die Autor*innen für den Hevylite® eine höhere Sensitivität gegenüber noch vorhandenen, vom Tumor produzierten Immunglobulinen als es IFE und Freelite® haben. Daher schlagen sie vor, dass sich die FLC κ/λ - und die HLC κ/λ -Ratio für das Response-Assesment ergänzen können.

(Ludwig et al., 2013; S. 217)

Die führen Michallet et al. in ihrer Studie aus dem Jahr 2018 fort und vergleichen das Standard-Response-Assesment entsprechend der IMWG-Kriterien mit einem Response-System, das auf der Differenz zwischen involvierter und nicht involvierter HLC basiert. Sie finden keinen Unterschied im PFS der jeweiligen CR-Kategorien, aber zeigen erstmals, dass Patient*innen in Standard-VGPR mit normalisierter HLC-Ratio ein geringeres Progressionsrisiko haben als solche mit abnormaler HLC-Ratio.

(Michallet et al., 2018; S. 377ff)

Der Zusammenhang zwischen HLC-Ratio und MRD-Status wurde bereits in einigen Studien untersucht, von denen ich hier zwei beispielhaft vorstellen möchte:

Laut einer Studie von Suehara et al. aus dem Jahr 2014 zeigte sich unter den Patient*innen mit VGPR oder besser nach Induktionstherapie ein nicht signifikanter Trend zu einer geringeren Anzahl an MM-PCs in der Durchflusszytometrie bei diejenigen Patient*innen mit normaler HLC-Ratio als bei denen mit abnormaler HLC-Ratio (Suehara et al., 2014).

Campbell et al. zeigen in ihrer Studie aus dem Jahr 2016, dass eine Normalisierung der FLC-Ratio und der HLC-Ratio mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 82% für eine MRD-Negativität sprechen (Campbell et al., 2016).

Die HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins im Verlauf scheint eine gute prognostische Aussagekraft für das Outcome der Patient*innen zu haben.

Unter den Patient*innen, die in der Studie von Ludwig et al. aus dem Jahr 2013 PR oder besser erreichen, zeigen diejenigen, deren HLC κ/λ -Ratio des involvierten Immunglobulins sich zum Zeitpunkt der besten Response normalisiert, ein signifikant längeres Überleben ab dem Zeitpunkt der maximalen Response als solche, die eine abnormale HLC κ/λ -Ratio behalten. Eine statistisch nicht signifikante Tendenz in diese Richtung ist auch bei den Patient*innen mit VGPR oder besser zu sehen.

(Ludwig et al., 2013; S. 215)

Konsistent dazu sind die Überlebensrate der Patient*innen in einer Studie von Ludwig et al aus dem Jahr 2016. Dabei haben diejenigen mit einer hoch abnormalen HLC κ/λ - Ratio des involvierten Immunglobulins zu Beginn der Studie ein signifikant kürzeres OS als die Patient*innen mit (ab-)normaler HLC. (Ludwig et al., 2016; S. 298)

Bisher sind wir davon ausgegangen, dass die Höhe der HLC-Ratio vor allem durch die Konzentration des vom Tumor produzierten Immunglobulins bestimmt wird und daher eine prognostische Aussage bezüglich des Outcomes hat.

Bradwell et al. beobachten in ihrer Studie aus dem Jahr 2013 bei Patient*innen mit IgG- bzw. IgA-Myelom erstmals einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem kürzeren PFS und einer niedrigen Konzentration der nicht-involvierten HLC zum Diagnosezeitpunkt, der für die Konzentration des involvierten HLC zum

Diagnosezeitpunkt nicht so stark ausgeprägt ist. Daraus schließen die Autor*innen, dass eine Erniedrigung des nicht-involvierten HLC den Hauptgrund für die Assoziation zwischen HLC κ/λ -Ratio des involvierten Immunglobulins und kürzerem PFS ausmacht. (Bradwell et al., 2013; S. 204f)

Die Beobachtungen von Bradwell et al. legen nahe, den prognostischen Wert der Konzentration des polyklonalen HLC der involvierten Immunglobulin-Klasse näher zu beleuchten.

2.3.4.3 Isotypensuppression der nicht involvierten HLC

Ludwig et al. definieren in ihrer Studie aus dem Jahr 2016 folgende Begrifflichkeiten:

Eine „leichte Isotypensuppression“ ist eine Erniedrigung des nicht-involvierten HLC auf bis zu 50% und eine „schwere Isotypensuppression“ ist eine Reduktion unter 50% des unteren Normalwertes (IgG κ < 1.92 g/L; IgG λ < 0.95 g/l; IgA κ < 0.28 g/l; IgA λ < 0.22 g/l).

Mit 56% versus 48% finden sie zu Beginn ihrer Studie in ihrem Studienkollektiv eine tendenziell, aber nicht signifikant erhöhte Häufigkeit der starken Isotypensuppression bei Patient*innen mit IgG-Myelom als bei denjenigen mit IgA-Myelom.

(Ludwig et al., 2016; S. 296-300)

Zwischen Tiefe der Response im Verlauf und Level des nicht-involvierten HLC zum Diagnosezeitpunkt können Ludwig et al. keinen signifikanten Zusammenhang finden.

Aber zum Zeitpunkt der besten Response zeigen die Patient*innen, die eine VGPR oder besser erreichen, signifikant seltener eine Isotypensuppression verglichen mit dem Diagnosezeitpunkt. (Ludwig et al., 2016; S. 296-300)

In ihrer Studie aus dem Jahr 2016 kommen Harutyunyan et al. zu ähnlichen Ergebnissen. Die Autor*innen beobachten eine statistisch signifikante niedrigere Konzentration der nicht-involvierten HLC in Patient*innen mit PR und PD im Vergleich zu denjenigen mit CR zu einem nicht näher definierten Zeitpunkt.

Je besser die Response ist, desto größer ist der Anteil der Patient*innen mit einer nicht-involvierten HLC-Konzentration größer oder gleich dem Normwert.

(Harutyunyan et al., 2016; S. 84f)

Bradwell et al. beschreiben in ihrer Studie aus dem Jahr 2013 einen signifikanten Zusammenhang bei Patient*innen mit IgG- bzw. IgA-Myelom zwischen einer niedrigen Konzentration der nicht-involvierten HLC zum Diagnosezeitpunkt und einem kürzeren PFS, der für die Konzentration des involvierten HLC zum Diagnosezeitpunkt nicht so stark ist (Bradwell et al., 2013; S. 204f).

Auch in der Studie von Ludwig et al. aus dem Jahr 2016 zeigen Patient*innen mit neu diagnostiziertem Myelom und schwerer Isotypensuppression zum Zeitpunkt der Diagnose zeigen ein signifikant kürzeres OS als solche ohne oder mit leichter Isotypensuppression.

Aufgeschlüsselt nach Myelom-Subtyp beobachten die Autor*innen ein signifikant kürzeres Überleben der erstgenannten Kohorte nur bei den IgG- und nicht bei den IgA-Myelomen.

Die Autor*innen bestätigen die schwere Isotypensuppression als unabhängigen Risikofaktor für ein kürzeres OS. In ihrer Studie ist die Schwere der Isotypensuppression relevanter für das Outcome als die Tiefe der Response oder die Höhe der HLC-Ratio.

(Ludwig et al., 2016;S.296-300)

Auch im Verlauf bescheinigen die Studien der Konzentration von nicht-involviertem HLC eine prognostische Aussagekraft:

Harutyunyan et al. beobachten ein signifikant längeres PFS bei Patient*innen mit normaler Konzentration der nicht-involvierten HLC im Verlauf der Therapie als bei Patient*innen mit erniedrigter nicht-involvierter HLC (Harutyunyan et al., 2016; S.85).

In der oben genannten Studie von Ludwig et al. aus dem Jahr 2016 zeigen die Patient*innen, die zum Zeitpunkt der besten Response eine schwere Isotypensuppression zeigen, ein signifikant kürzeres OS als die Patient*innen ohne schwere Isotypensuppression.

(Ludwig et al., 2016;S. 296-300)

Um den Einfluss der Isotypensuppression auf das Überleben zu erklären, schlagen die Autor*innen verschiedene Modelle vor:

Bei einer hohen Tumorlast und einer dadurch erhöhten Sekretion besonders von IgG-Immunglobulinen, so Ludwig et al., verkürze sich über das oben erklärte, konzentrationsabhängige Recycling die Halbwertszeit der Immunglobuline, sodass die gemessene HLC-Konzentration im Serum zu niedrig ausfalle. So kann eine hohe Tumorlast mit schlechter Prognose eine Isotypensuppression vortäuschen.

Andererseits sei die wahrscheinlichere Erklärung laut Ludwig et al. einen in der Literatur beschriebenen Effekt der regulatorischen T-Zellen.

(Ludwig et al., 2016; S. 299f)

Wie vorangegangene Studien bereits zeigten, so Muthu Raja et al., haben Patient*innen mit Multiplem Myelom eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut. Sie beobachten in ihrer Studie aus dem Jahr 2012, dass eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen ($\geq 5\%$) mit einer kürzeren TTP einhergeht. Zudem beschreiben sie eine Assoziation von vermehrten regulatorischen T-Zellen mit erniedrigten polyklonalen Plasmazellen und schlechten klinischen Merkmalen, wie Hyperkalziämie.

(Muthu Raja et al., 2012; S. 2 und 8f)

In der Studie von Giannopoulos et al. aus dem Jahr 2012 zeigen sich erhöhte regulatorische T-Zellen in nicht-transplantierten Patient*innen als Risikofaktor für ein kürzeres Überleben und sind in Patient*innen, die an Komplikationen durch Infektionen versterben, häufiger zu beobachten.

(Giannopoulos, Kaminska, Hus, & Dmoszynska, 2012; S. 551)

Ludwig et al. vermuten daher, dass die regulatorischen T-Zellen isotypenspezifisch die Produktion der polyklonalen Immunglobuline durch gesunde Plasmazellen unterdrücken, aber nicht die malignen Plasmazellen des Multiplen Myeloms beeinflussen (Ludwig et al., 2016; S. 299f).

Harutyunyan et al. beziehen sich auf eine Studie von Novak et al. aus dem Jahr 2004, die beschreiben, dass der *B-cell activating factor* (BAFF), der normalerweise von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Neutrophilen, aber auch auf malignen Plasmazellklonen exprimiert wird. BAFF ist unter anderem Ligand des *B-cell maturation antigen* (BCMA), das auf allen B-Zellen vorkommt und deren Entwicklung

und Überleben beteiligt ist. Novak et al. nehmen an, dass dies maßgeblich zur Zytokin-abhängigen Proliferation von malignen Plasmazellen beiträgt.

(Novak et al., 2004; S. 689f)

Sanchez et al. beobachten in ihrer Studie aus dem Jahr 2012, dass die Konzentration von BCMA in den Patient*innen mit MM mit dem OS korreliert und bei Patient*innen mit PD erhöht ist (Sanchez et al., 2012; S. 734ff).

Zwei Jahre später veröffentlichen Sanchez et al. eine Studie, in der sie zeigen, dass BCMA und BAFF im peripheren Blut von MM-Patient*innen Komplexe bildet. Desweiteren sind erhöhte BCMA-Konzentrationen signifikant mit einer unter den Normwert erniedrigten Konzentration des nicht-involvierten Immunglobulins in der Nephelometrie assoziiert. Ähnliches gilt für den Heavy Light Chain Assay.

(Sanchez et al., 2014)

Harutyunyan et al. postulieren anhand dieser Ergebnisse, dass von malignen Plasmazellen produziertes, zirkulierendes BCMA an BAFF von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Neutrophilen bindet und dadurch eine Stimulation gesunder Plasmazellen über oberflächlich-gebundenes BMCA verhindert, wodurch zirkulierendes BMCA einen suppressiven Effekt auf die gesunden Plasmazellen hat. (Harutyunyan et al., 2016; S. 85)

Kastritis et al. erwähnen verschiedene mögliche Erklärungen für die beobachtete Immunoparese. Davon seien hier nur einige Wichtige genannt:

Die Autor*innen zitieren eine etwas ältere Studie von Tsujimoto et al. aus dem Jahr 1996. Dort dokumentieren die Autor*innen, dass Stromazellen, die mit Myelom-Zellen in vitro kultiviert werden, eine verminderte Expression von Faktoren zeigen, die das Überleben von prä-B-Zellen fördern (wie IL-7) und dafür vermehrt Inhibitoren (wie TGF- β 1 und MIP-1 α) exprimieren. Dadurch können maligne Plasmazellen indirekt die Reifung gesunder B-Zellen reduzieren.

(Tsujimoto, Lisukov, Huang, Mahmoud, & Kawano, 1996; S. 3375)

Desweiteren nennen Kastritis et al. eine Studie von Gorgün et al. aus dem Jahr 2013, in der die Autor*innen beobachten, dass die sogenannten myeloiden Suppressorzellen (MSCD) bei Patient*innen mit Multiplem Myelom im peripheren Blut und im Knochenmark im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht sind. Diese sind eine heterogene Gruppe unreifer, myeloischer Zellen, die in gegenseitiger

Wechselwirkung mit den Zellen des Myeloms die T-Zell-abhängige Immunantwort unterdrücken und das Wachstum des Tumors fördern. (Gorgun et al., 2013; S. 2975-2985)

Nicht zuletzt beziehen sich Kastritis et al. auf Beobachtungen von Radbruch et al., dass Plasmazellen an Stress des endoplasmatischen Retikulums versterben, der durch die Produktion von Antikörpern verursacht wird, wenn sie nicht durch externe Signale bei der Synthese von Proteinen inhibiert, im Zellzyklus arretiert und an der Apoptose gehindert werden. Diese externen Signale erhalten sie in ihrer Nische in sekundären lymphatischen Organen oder im Knochenmark. (Radbruch et al., 2006; S. 741f)

Allerdings können durch die massive Konkurrenz von malignen Plasmazellklonen diese Nischen besetzt werden, sodass die gesunden Plasmazellen keine schützenden Signale erhalten und versterben (Kastritis et al., 2014; S.2079).

2.3.5 Beschränkungen der bisherigen Studien

Seit Initiierung der DSMM XIV-Studie hat sich die Datenlage zum Heavy Light Chain Assay deutlich erweitert. Dennoch weisen diese Beschränkungen auf:

Zu nennen sind die teilweise kleinen Fallzahlen der eingeschlossenen Patient*innen. Darunter verstehen wir unter 100 IgG-Myelome und unter 50 IgA-Myelome in der Studienpopulation. Dies trifft beispielsweise auf die Studie von Scudla et al. aus dem Jahr 2016, auf die von Koulieris et al. aus dem Jahr 2012 und besonders auf die Studie von Tovar et al. aus demselben Jahr zu.

Eine Einschränkung der Aussagekraft bezüglich der IgA-Myelome durch geringe Anzahl eingeschlossener Patient*innen mit IgA-Myelom beklagen zudem Bradwell et al. und Ludwig et al. in ihren Studien aus dem Jahr 2013.

Zudem wurde in den meisten Studien nur ein Zeitpunkt entweder vor oder nach der HDT/ASCT zur Response-Erhebung betrachtet oder der Zeitpunkt der Response-Analyse bleibt unklar, wie in der Studie von Harutyunyan et al. aus dem Jahr 2016.

Ludwig et al. beziehen sich in ihren Studien vornehmlich auf den Zeitpunkt der besten Response. Dieses Konzept erscheint uns in seiner klinischen Relevanz sehr fragwürdig, da es nur im Nachhinein bestimmt werden kann.

Zudem wurden viele der Studienkollektive nicht einheitlich behandelt. Hier zu nennen ist beispielsweise die Studienpopulation von Tovar et al. aus dem Jahr 2012, sowie die Studien von Harutyunyan et al. und Ludwig et al. aus dem Jahr 2016.

Zuletzt sei genannt, dass laut Michallet et al. die Studienlage bezüglich verschiedenster Techniken der MRD-Analyse und dem Heavy Light Chain Assay noch nicht eindeutig geklärt ist (Michallet et al., 2018; S. 381).

2.3.6 Fragestellungen dieser Arbeit

Folgende Fragestellungen wollen wir in dieser Arbeit beantworten:

- Ist die Stellung der Diagnose „Multiples Myelom“ durch das HLC Assay allein möglich? Ist das das HLC Assay eine sensitivere Methode als das SPE zur Diagnosestellung insbesondere bei Patient*innen mit IgA-Myelom?
- Unterscheidet sich die Höhe der HLC-Ratio je nach (r)-ISS- und DS-Stadium zum Zeitpunkt der Diagnose? Ergibt sich durch das das HLC Assay eine zusätzliche prognostische Aussage in den verschiedenen Diagnosestadien?
- Stimmen FLC-Ratio und HLC-Ratio sowie ihre prognostische Relevanz überein?
- Unterscheidet sich die Höhe der HLC-Ratio je Response-Stadium nach Induktionstherapie und nach HDT/ASCT? Ergibt sich durch das das HLC Assay eine zusätzliche prognostische Aussage in den verschiedenen Response-Kategorien?
- Kann die HLC-Ratio den MRD-Status vorhersagen? Ergibt sich durch das HLC-Assay eine zusätzliche prognostische Aussage je nach MRD-Status?
- Unterscheidet sich das PFS je nach HLC-Ratio zu den verschiedenen Zeitpunkten?
- Wie häufig und wie schwer ist die Isotypensuppression im HLC Assay? Unterscheidet sich das PFS beim Vorhandensein von Isotypensuppression?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Charakteristika der DSMM XIV-Studie

Die Daten, die für diese Arbeit verwendet wurden, wurden im Rahmen der prospektiven, multizentrischen und randomisierten Phase 3-Studie „Lenalidomide, Adriamycin, Dexamethasone (RAD) Versus Lenalidomide, Bortezomib, Dexamethasone (VRD) for Induction in Newly Diagnosed Multiple Myeloma followed by Response-adapted Consolidation and Lenalidomide Maintenance - A Randomized Multicenter Phase III Trial by Deutsche Studiengruppe Multiples Myelom (DSMM XIV)“ erhoben (NCT-Nummer: NCT01685814; EudraCT-Nummer: 2009-016616-21). Beginn der Rekrutierung war der 20. Juli 2012. Am 09. Juni 2016 wurde die Rekrutierung abgeschlossen.

Ziel dieser Studie ist es, die Effektivität der beiden Induktions-Schemata zu vergleichen. Dazu wurde das Kollektiv der Patient*innen nach ihrem ISS-Stadium (I vs. II und II) geschichtet und danach in zwei Gruppen randomisiert, von denen die eine bRAD und die andere VRd als Induktions-Therapie von jeweils drei Zyklen erhielten. Im Anschluss erhalten alle Patient*innen eine Chemomobilisation, sowie eine HDT mit Melphalan und eine ASCT. Alle Patient*innen mit einer schlechteren Response als VGPR nach dieser Behandlung werden wiederum in zwei Gruppen randomisiert, von denen die eine erneut eine HDT mit Melphalan und ASCT gefolgt von einer dreijährigen Lenalidomid-haltigen Erhaltungstherapie behandelt wird (Arm C), während die andere Gruppe eine alloSCT und eine einjährige Erhaltungstherapie mit Lenalidomid erhalten (Arm D). Alle Patient*innen, die nach der ersten HDT/ASCT eine Response von VGPR oder besser erreichen, werden ebenfalls in zwei Gruppen randomisiert. Von diesen erhält die eine Gruppe dieselbe Therapie wie die im Arm C (Arm B) und die zweite Gruppe wird mit einer alleinigen dreijährigen Lenalidomid-haltigen Erhaltungstherapie behandelt (Arm A).

Dazu wurden zwei Endpunkte definiert:

Der erste Endpunkt beinhaltet die CR-Rate nach Induktion in den beiden Gruppen im Vergleich, sowie für die Patient*innen mit einer Response auf die Konsolidierungstherapie, die schlechter als VGPR ist, das PFS drei Jahre nach der ersten ASCT. Für Patient*innen mit einer besseren Response, soll vor allem die

Häufigkeit und Dauer von Krankenhausaufenthalten als Maß für die Lebensqualität betrachtet werden.

Als zweiter Endpunkt ist unter anderem die ORR (overall response rate) nach Induktionstherapie, sowie die ORR, die CR-Rate und das OS nach Abschluss der Konsolidierungstherapie geplant.

Eingeschlossen in die DSM XIV-Studie wurden dem Studienprotokoll folgend 469 Patient*innen zwischen 18 und 65 Jahren, die an einem neu diagnostizierten, sekretorischen Multiplem Myelom erkrankt sind, das vorher nicht anderweitig behandelt wurde. Desweiteren müssen sie für eine ASCT und/oder alloSCT geeignet und mit der Durchführung derselben einverstanden sein.

(Einsele & Knop, 2015; Studienprotokoll)

Die vollständige Auflistung der Ein- und Ausschlusskriterien ist online auf der Internetseite des Comprehensive Cancer Center Mainfranken einzusehen.

(Einsele & Knop, 2012; Studienübersicht DSMM XIV)

Alle rekrutierten Patient*innen wurden über ihre Teilnahme an der Studie aufgeklärt und haben eine Einverständniserklärung unterschrieben, die sie jederzeit widerrufen konnten. Ein Ethikvotum liegt vor.

Von den teilnehmenden 51 Kliniken in ganz Deutschland haben bis zum Ende unserer Datenannahme 49 Zentren Proben ihrer Patient*innen für den Heavy Light Chain-Assay nach Würzburg geschickt.

Sponsor der Studie ist das Uniklinikum Würzburg.

(Einsele & Knop, 2015; Studienprotokoll)

3.2 Angewendete Labormethoden

Entsprechend des Studienprotokolls wurde das Heavy Light Chain Assay im Labor der Universität Würzburg durchgeführt. Die Probengewinnung erfolgte zeitgleich mit der Gewinnung von Urin- und Blutproben für die IFE, sowie der Durchführung der KM-Punktion und der MRD-Analyse. Die sechs Zeitpunkte der Probengewinnung sind für alle Patient*innen zur Diagnosestellung, zum ersten Tag des zweiten Induktions-Zyklus, innerhalb von acht Tagen nach Ende des letzten Zyklus der Induktionstherapie (1. Restaging), innerhalb von 4-6 Wochen nach Ende der ersten Hochdosis-Melphalan-

Therapie (2. Restaging) und ein Jahr nach Beginn der Erhaltungstherapie. Zusätzlich wurde im Arm B, C und D eine weitere Bestimmung der HLC-Ratio vor Beginn der Erhaltungstherapie durchgeführt (3. Restaging), das im Arm A dem zweiten Restaging entspricht.

Das Material für die Durchführung des Hevylite® ist Blutserum, das durch Zentrifugieren aus venösem Blut gewonnen wird.

Eine Lagerung von maximal 21 Tagen bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei 2-8°C. Bei längerer Lagerung wurden die Proben bei -20°C eingefroren, wobei mehrmaliges Auftauen vermieden wurde. Die Proben der externen Zentren wurden in gefrorenem Zustand in das Labor der Uniklinik Würzburg transportiert.

Die Bestimmung der HLC-Ratio erfolgte mittels turbidimetrischem Analysegeräts SPA_{PLUS}® der Firma The Binding Site GmbH entsprechend der Anleitung des Herstellers. Routinemäßig wurden die Proben jeweils als Duplikate gemessen und für die weiteren Analysen der Mittelwert der Messungen berechnet. Bei unplausiblen Ergebnissen erfolgte gegebenenfalls eine weitere Messung. Die Proben, bei denen ein gemessener Wert oberhalb des messbaren Bereichs lag, wurden verdünnt und die Messungen wiederholt. Bei Proben, bei denen ein gemessener Wert unterhalb des messbaren Bereichs lag, wurde das untere Ende des Messbereichs als Fixwert verwendet.

Die übrigen Messwerte wurden in der Routine im jeweiligen Studienzentrum mit den gängigen Labormethoden erhoben. Das Response-Assessment erfolgte nach den Kriterien der IMWG 2006. Für die MRD-Analyse wurde eine 8-Farben-Durchflusszytometrie genutzt.

Die Ergebnisse wurden anonymisiert in einer elektronischen Studienakte abgelegt und nach einer Plausibilitätsprüfung für die Studienzwecke freigegeben.

(Einsele & Knop, 2015; Studienprotokoll)

3.3 Ein- und Ausschlusskriterien dieser Arbeit

Für diese Arbeit haben wir uns drei Beobachtungszeitpunkte ausgesucht, von denen wir uns aufgrund der Probenzahl und Zeitpunkt in der Therapie die größte Aussagekraft versprechen. Dies sind der Zeitpunkt der Diagnose, sowie das erste Restaging nach Abschluss der Induktionstherapie und das zweite Restaging nach HDT/ASCT. Ausgeschlossen haben wir den Zeitpunkt zu Beginn des zweiten Induktions-Zyklus, da wir zu so einem frühen Zeitpunkt der Therapie noch keinen Unterschied zum Zeitpunkt der Diagnose erwarten. Das dritte Restaging und den Zeitpunkt ein Jahr nach Beginn der Erhaltungstherapie haben wir ausgeschlossen, da zum Ende unserer Datenannahme im April 2018 die Anzahl der Patient*innen in diesem Stadium der Therapie noch sehr klein war.

Verwendet haben wir in unseren Analysen die HLC-Messungen von IgG und IgA. Die IgM HLC-Messungen wurden aufgrund ihrer niedrigen Zahl nicht eingeschlossen.

Insgesamt wurden von den 496 Patient*innen der DSMM XIV-Studienpopulation 293 Patient*innen mit eindeutig bestimmtem IgA- oder IgG-Myelom in unsere Analyse eingeschlossen, von denen zu mindestens einem der drei ausgewählten Zeitpunkte eine HLC-Messung vorliegt. Letztere sind gemeint, wenn im Folgenden vom Patient*innenkollektiv gesprochen wird.

Wurde zu keinem Zeitpunkt ein HLC-Wert gemessen oder war der Myelom-Typ nicht bekannt, konnten die Patient*innen nicht in die Auswertungen aufgenommen werden. Desweiteren wurden Patient*innen mit ausschließlich Leichtketten-produzierenden Myelomen ausgeschlossen, da bei diesen eine Messung der vollständigen Immunglobuline zum Monitoring nur eine sehr geringe Aussagekraft besitzt. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Patient*innen mit biklonalem Myelom, um Unklarheiten beim Monitoring mittels HLC-Messungen zu vermeiden und Patient*innen mit IgM- oder IgD-Myelom aufgrund der niedrigen Fallzahlen.

Zusammenfassend lässt sich von einer systematischen Stichprobenauswahl aus der DSMXIV-Studienpopulation sprechen.

Die Auswahlkriterien haben wir zur besseren Nachvollziehbarkeit als Consort Diagramm (siehe Abbildung 4, S. 45) dargestellt.

Die im Rahmen der Studie erhobenen Daten des Hevylite®-Tests wurden bisher ausschließlich von uns im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet.

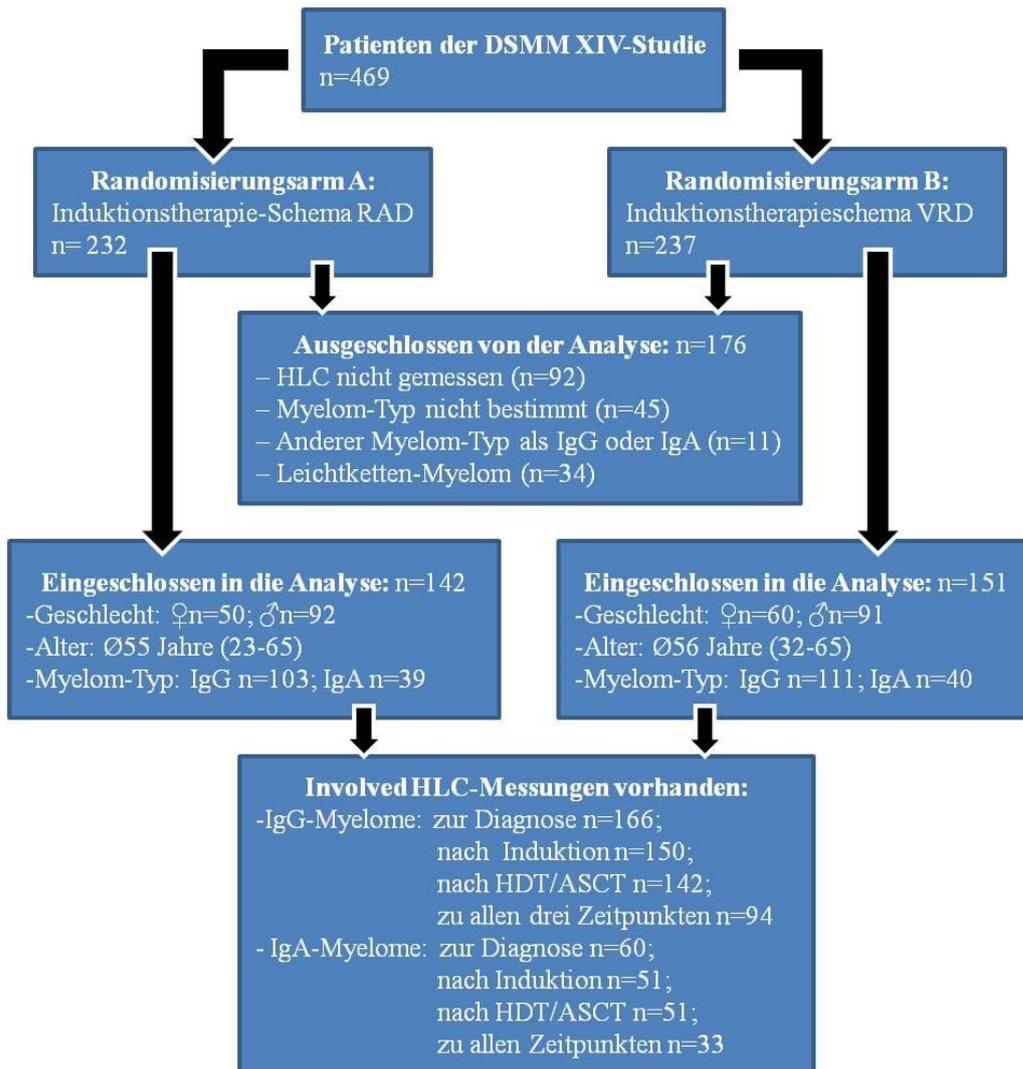


Abbildung 4: Übersicht der ein- und ausgeschlossenen Patient*innen

3.4 Statistische Methoden

Die statistische Analyse erfolgte mit IBM SPSS Statistics 24.

Zunächst erfolgte eine Überprüfung auf *Normalverteilung* aller intervallskalierten Messwerte, die sich als nicht zutreffend herausstellte.

Unterschiede einer intervallskalierten Variablen zwischen zwei Gruppen wurden mit dem *Man-Whitney-U-Test* untersucht. Bei einer Größe der untersuchten Stichprobe von über 30 Patient*innen konnte die asymptotische Signifikanz berechnet werden, ansonsten wurde die exakte Signifikanz berichtet.

Unterschiede einer intervallskalierten Variablen zwischen mehr als zwei Gruppen wurden mit dem *Kruskal-Wallis-Test* überprüft. Wenn drei Gruppen mit jeweils mindestens 9 Probanden oder vier Gruppen mit jeweils mindestens 5 Probanden oder mehr als fünf Gruppen vorlagen, konnte die asymptotische Signifikanz berechnet werden, ansonsten wurde die exakte Signifikanz angegeben.

Hierbei wurden paarweise Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit dem *Dun-Bonferroni-Test* weiteruntersucht.

Zum Vergleich der Gruppen wurde jeweils der Median der abhängigen Variablen mit angegeben, sofern sich der Unterschied als signifikant herausstellte.

Für die Angabe der *Effektstärke* wurde der Korrelationskoeffizient nach Cohen errechnet ($r = \left| \frac{z}{\sqrt{n}} \right|$). Dabei entspricht $0,10 \leq r < 0,3$ einem schwachen, $0,3 \leq r < 0,5$ einem mittleren und $0,5 \leq r$ einem starken Effekt.

Bei der Untersuchung von Zusammenhängen zwischen kategorialen Variablen wurde auf den *Pearson χ^2 -Test* zurückgegriffen. Lag die erwartete Zellhäufigkeiten unter 5 oder die Größe der Stichprobe unter 20, wurde ein exakter Test nach Fisher durchgeführt. Die Stärke des Zusammenhangs wurde mit Cramers V bestimmt, wobei bei Cramers $V > 0,3$ von einem starken Zusammenhang ausgegangen wurde.

Zur Analyse des PFS wurde eine *Kaplan-Meier-Analyse* durchgeführt. Ein Vergleich der progressionsfreien Überlebenszeiten mehrerer Gruppen erfolgte mit dem *Log-rank-Test*. Zur Veranschaulichung wurde das mediane PFS der Gruppen angegeben. Eine Gruppe wurde als zu klein für eine verwertbare statistische Aussage eingestuft, wenn die Fallzahl weniger als zwanzig Patient*innen umfasste.

Der Einfluss mehrerer Variablen auf das PFS wurde mithilfe der *Cox-Regressionsanalyse* überprüft. Die Proportionalität der Hazards wurde orientierend visuell anhand von Kaplan-Meier-Kurven überprüft.

Es wurde für alle statistischen Tests ein fünfprozentiges *Signifikanzniveau* angenommen ($p \leq 0,05$).

4. ERGEBNISSE

4.1 Charakteristika der erhobenen Daten

4.1.1 Beschreibung der Studienpopulation

Es befinden sich 48,5% der Patient*innen (142/293) zu Beginn der Behandlung im Behandlungsarm A und 51,5% (142/293) im Behandlungsarm B der Induktionstherapie. Desweiteren sind 37,5% (110/293) weiblichen und 62,5% (183/293) männlichen Geschlechts. Insgesamt lag das Alter des Patient*innenkollektivs zum Zeitpunkt der Erstdiagnose im Mittel bei 54,72 Jahren (Bereich: 23-65 Jahre; SD: 6,99).

Von den 293 Patient*innen haben 73,0% (214/293) ein IgG-Myelom und 27,0% (79/293) ein IgA-Myelom. Unter den Patient*innen mit IgG-Myelom sind 68,2% (146/214) als IgG κ und 31,8% (68/214) als IgG λ klassifiziert. Ein IgA κ -Myelom kommt bei 62,0% (49/79) Patient*innen mit IgA-Myelom vor, während 38,0% (30/79) ein IgA λ -Myelom aufweisen.

Die häufigsten zytogenetischen Anomalien, die im betroffenen Kollektiv vorkommen, sind gain(9q34) mit 59,2% (155/262), gefolgt von tIgH mit 53,5% (130/243) und del(13p4) mit 45,1% (120/164). Ein gain(1q21) weisen 34,8% (93/267) Myelome auf. Deutlich seltener ist del(17p13) mit 10,1% (27/268). Nur 7,8% (15/193) zeigen eine del(1q23).

Unter den IgH-Tranlokationen ist die t(11;14) mit 17,7% (46/260) die häufigste, dicht gefolgt von t(4;14) mit 15,8% (42/266). Bei 12,0% (29/241) der Myelome ist das involvierte Partnergen unbekannt. Nur 4,6% (12/259) der Myelome weisen eine t(14;16) auf.

Bezüglich der Hochrisiko-Genetik haben 23,6% (61/259) Patient*innen eine der Anomalien del(17p13), t(4;14) und t(14;16). 3,5% (9/259) der Patient*innen weisen del(17p13) und t(4;14) gleichzeitig auf, während del(17p13) und t(14;16) nie gleichzeitig vorkommt.

Eine Information über das ISS-Stadium zu Beginn der Behandlung ist für alle Patient*innen verfügbar: 41,6% Patient*innen (122/293) befinden sich im Stadium I, 42,3% (124/293) im Stadium II und 16,1% (47/293) im Stadium III.

Von den Patient*innen, deren rISS-Stadium verfügbar ist, befinden sich 31,3% (78/249) im Stadium I, 59,8% (149/249) im Stadium II und 8,8% (22/249) im Stadium III.

Für 4 Patient*innen fehlt die Information über das Durie-Salmon-Stadium. Die übrigen 289 Patient*innen sind folgendermaßen auf die DS-Stadien aufgeteilt: I 5,2% (15/289), IIA 11,1% (32/289), IIB 0,3% (1/289), IIIA 79,6% (230/289), IIIB 3,8% (11/289).

Tabelle 9: Übersicht über die Charakteristika des Studienkollektivs

293 Patient*innen

Behandlungsarm 1: Arm A 142 (48%); Arm B 151 (51,5%)

Geschlecht: Weiblich 110 (37,5%); Männlich 182 (62,5%)

Alter: Median 56 Jahre (23-65 Jahre)

Myelom-Typ: IgGκ 146 (49,8%); IgGλ 68 (21,5%); IgG insgesamt 214 (73,0%)

IgAκ 49 (16,7%); IgAλ 30 (10,2%); IgA insgesamt 79 (27,0%)

Follow up: Median 19,75 Monate (0-65,35 Monate)

Progress: 209 (71,3%); medianes PFS 46 Monate

Zytogen. Hochrisiko-Anomalien:

weder del(17p13), noch t(4/14) oder t(14/16) 189 (73,0%)

del(17p13) oder t(4/14) oder t(14/16) 61 (23,6%)

del(17p13) und t(4/14) 9 (3,5%)

del(17p13) und t(14/16) 0 (0,0%)

ISS-Stadium: I 122 (41,6%); II 124 (42,3%); III 47 (16,1%)

Revised ISS-Stadium: I 78 (31,3%); II 149 (59,8%); III 22 (8,8%)

DS-Stadium: I 7 (5,2%); IIA 32 (11,1%); IIB 1 (0,3%);

IIIA 230 79,6%; IIIB 11 (3,8%)

Bis zum letzten Kontakt nach 19,75 Monaten im Median (Bereich: 0,00-65,53; SD: 15,91) erlitten 26,6% (78/287) der Patient*innen einen Progress oder verstarben.

Die 5-Jahres-Überlebensrate ohne Progress beträgt 41% und die mittlere Überlebenszeit ohne Progress liegt bei 46 Monaten (3,8 Jahren) ab Zeitpunkt der ersten Randomisierung. (siehe Abbildung 5, S. 49)

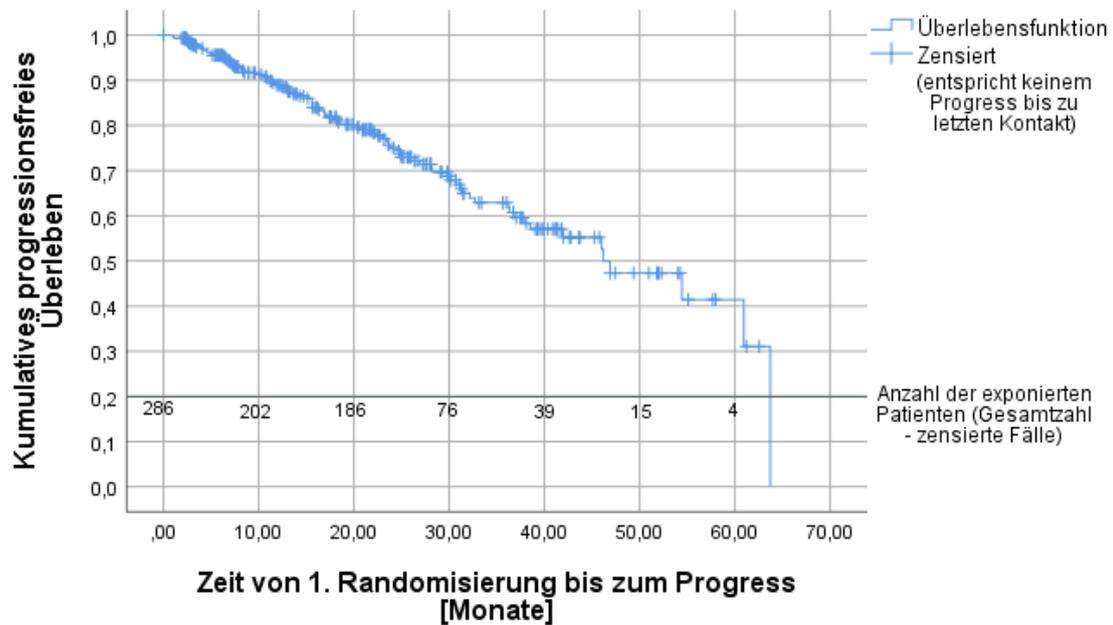


Abbildung 5: Kumulative progressionsfreie Überlebensrate des Studienkollektivs

4.1.2 Häufigkeit der Datenerhebung mittels Heavy Light Chain Assay

Eine Messung der IgG HLCs zum Zeitpunkt der Diagnose liegt bei 77,6% (166/214) der Patient*innen mit IgG-Myelom vor. Nach Induktionstherapie wurde die IgG HLC bei 70,1% (150/214) und nach HDT/ASCT bei 66,4% (142/214) der Patient*innen mit IgG-Myelom gemessen. Die Bestimmung der IgA HLC erfolgte bei Patient*innen mit IgG-Myelom zum Zeitpunkt der Diagnose bei 21,5% (46/214), nach Induktionstherapie bei 13,6% (29/214) und nach HDT/ASCT bei 12,6% (27/214). Die IgM HLC wurde zum Zeitpunkt der Diagnose bei 14,5% (31/214), nach Induktionstherapie und HDT/ASCT bei jeweils 7,5% (16/214) der Patient*innen mit IgG-Myelom gemessen.

Bei den Patient*innen mit IgA-Myelom wurde zum Zeitpunkt der Diagnose bei 75,9% (60/79) und nach Induktionstherapie, sowie HDT/ASCT bei 64,6% (51/79) die IgA HLCs bestimmt. Unter den Patient*innen mit IgA-Myelom wurde die IgG HLC zum Zeitpunkt der Diagnose bei 21,5% (17/79) bestimmt, nach Induktionstherapie bei 17,7% (14/79) und nach HDT/ASCT bei 16,5% (13/79).

Bei Patient*innen mit IgA-Myelom wurde zum Zeitpunkt der Diagnose die IgM HLC bei 12,7% (10/79), nach Induktionstherapie bei 6,3% (5/79) und nach HDT/ASCT bei 7,6% (6/79) bestimmt.

Dabei erfolgte eine Messung der HLCs des involvierten Immunglobulins zu allen drei Zeitpunkten bei 43,9% (94/214) der Patient*innen mit IgG-Myelom und bei 41,8% (33/79) der Patient*innen mit IgA-Myelom.

4.2 Statistische Auswertung

4.2.1 Klassifikation der HLC-Ratio im Verlauf der Therapie

Von den Patient*innen mit IgG-Myelom, deren IgG κ/λ HLC-Ratio verfügbar ist, zeigen zum Zeitpunkt der Diagnose 96,4% (160/166) eine abnormale oder hoch abnormale HLC-Ratio. In 3,6% (6/166) ist diese dagegen zur Diagnosestellung im Normbereich. Der Anteil der Patient*innen mit IgG-Myelom, die eine normale IgG κ/λ HLC-Ratio aufweisen, erhöht sich im Verlauf der Therapie und beträgt nach Ende der Induktionstherapie 27,3% (41/150) und nach Ende der HDT/ASCT 42,3% (60/142).

Im Verlauf der Therapie sinkt der Anteil der Patient*innen mit einer hoch abnormalen IgG κ/λ HLC-Ratio von 56,6% (94/166) zur Diagnosestellung auf 18,0% (27/150) nach Induktionstherapie und weiter auf 5,6% (8/142) nach HDT/ASCT. Der Anteil der Patient*innen mit abnormaler IgG κ/λ HLC-Ratio steigt von 39,8% (66/166) zum Zeitpunkt der Diagnose zunächst auf 54,7% (82/150) nach Induktionstherapie und sinkt dann leicht auf 52,1% (74/142) nach HDT/ASCT. (siehe Abbildung 6, S. 51)

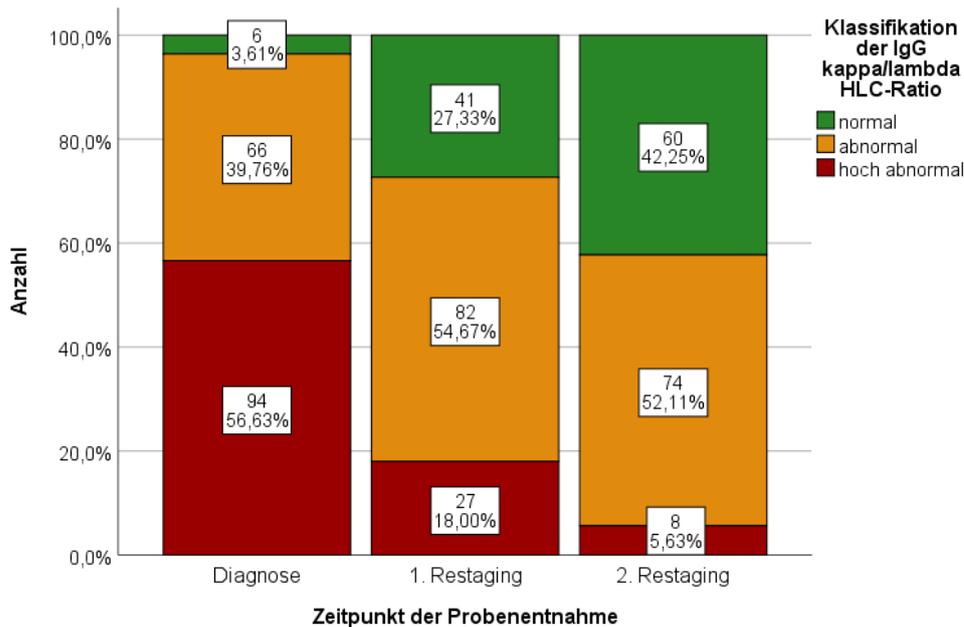


Abbildung 6: Häufigkeit der Klassifikation der IgG kappa/lambda-Ratio im Verlauf der Therapie bei IgG-Myelomen

Unter den Patient*innen mit IgA-Myelom, deren IgA κ/λ HLC-Ratio verfügbar war, haben 98,3% (59/60) Patient*innen eine abnormale oder hoch abnormale deren IgA κ/λ HLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose. Nur ein(e) Patient*in weist zu diesem Zeitpunkt eine IgA κ/λ HLC-Ratio im Normbereich auf.

Im Verlauf der Therapie steigt der Anteil der Patient*innen mit normaler IgA κ/λ HLC-Ratio auf 35,3% (18/51) nach Induktionstherapie und weiter auf 58,8% (30/51) nach HDT/ASCT.

Der Anteil der Patient*innen mit IgA-Myelom, die eine hoch abnormale IgA κ/λ HLC-Ratio aufweisen, sinkt im Verlauf der Therapie von anfänglichen 68,3% (41/60) auf 17,6% (9/51) nach Induktionstherapie und 2,0% (1/51) nach Ende der HDT/ASCT.

Dagegen zeigt der Anteil der Patient*innen mit abnormaler IgA κ/λ HLC-Ratio dieselben Schwankungen wie bei den IgA-Myelomen und der IgG κ/λ HLC-Ratio: Zunächst steigt der Anteil von 30,0% (18/60) zum Zeitpunkt der Diagnose auf 47,1% (24/51) nach Induktionstherapie und sinkt dann leicht auf 39,2% (20/51) nach Abschluss der HDT/ASCT. (siehe Abbildung 7, S. 52)

Betrachtet man die HLC-Ratio der nicht involvierten Immunglobuline bei den IgG- und IgA-Myelomen fällt auf, dass diese nur in zwei Fällen zu einem der drei Zeitpunkt hoch abnormal ist. Allerdings die Aussagekraft im Verlauf angesichts der niedrigen Fallzahlen eingeschränkt.

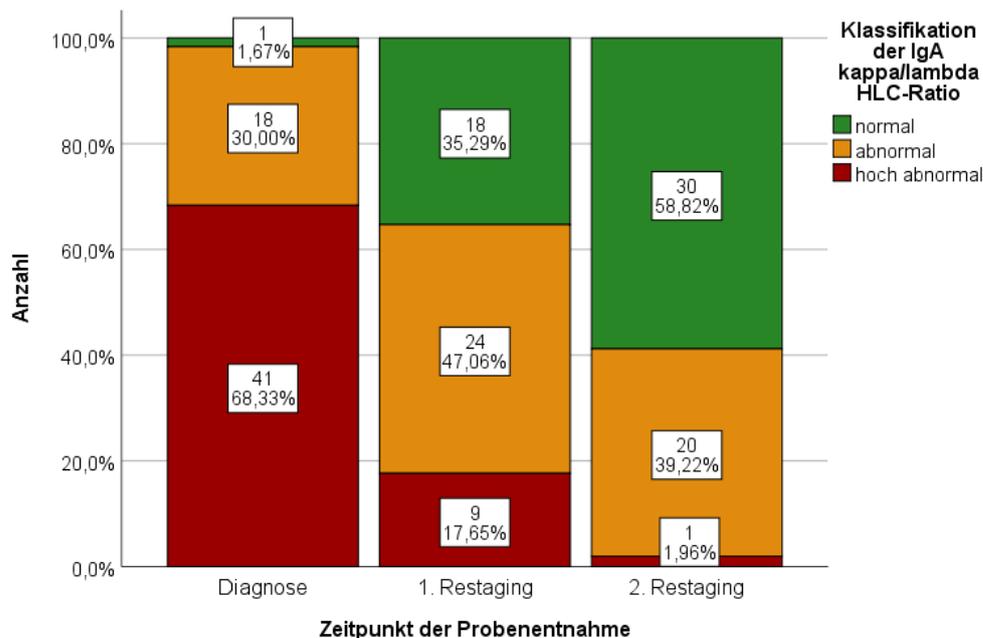


Abbildung 7: Häufigkeit der Klassifikation der IgA kappa/lambda-Ratio im Verlauf der Therapie bei IgA-Myelomen

4.2.2 Vergleich von SPE und HLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose

Zum Zeitpunkt der Diagnose findet sich trotz sekretorischem Myelom bei 1,9% (4/203) der Patient*innen mit IgG-Myelom und 10,3% (9/87) der Patient*innen mit IgA-Myelom ein negatives M-Protein in der SPE.

Nicht bei allen dieser Patient*innen wurde zeitgleich die iHLC bestimmt. Unter den Patient*innen, deren iHLC bestimmt wurden finden sich 1,9% (3/157) mit IgG-Myelom und 15,6% (9/59) mit IgA-Myelom, deren SPE zum Zeitpunkt der Diagnose negativ ist. Hiervon weisen 66,6% (2/3) mit IgG-Myelom und 11,1% (1/9) mit IgA-Myelom eine normale iHLC auf. Umgekehrt gibt es 10,2% (16/157) Patient*innen mit IgG-Myelom und 3,4% (2/59) mit IgA-Myelom, deren iHLC trotz positiver SPE normwertig ist.

Von den Patient*innen mit IgG-Myelom und negativer SPE bei normaler iHLC hat nur eine*r auch eine normale IgG κ/λ -Ratio. Der*die Patient*in mit IgA-Myelom und negativer SPE bei normaler iHLC hat dagegen eine abnormale IgA κ/λ HLC-Ratio.

Im Gegensatz dazu ist die Serum-IFE bei allen der Patient*innen positiv.

Unter den Patient*innen mit IgG-Myelom bedeutet dies eine Sensitivität von 0,98 (199/203) für die SPE, 0,89 (139/157) für die iHLC und 0,97 (152/157) für die IgG κ/λ HLC-Ratio. Unter denen mit IgA-Myelomen errechnet sich eine Sensitivität 0,77 (67/87) für die SPE, 0,94 (54/57) für die iHLC und 0,98 (58/59) für die IgA κ/λ HLC-Ratio. Eine Spezifität zu errechnen ist nicht möglich, da wir nicht wissen, wie viele Patient*innen falsch positiv gemessen wurden.

4.2.3 Vergleich von HLC-Ratio und Diagnose-Stadien

4.2.3.1 HLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose je nach ISS-Stadium

Unter den IgG-Myelomen ist die Höhe der κ/λ -Ratio zum Zeitpunkt der Diagnosestellung signifikant unterschiedlich in den ISS-Stadien verteilt (Kruskal-Wallis-Test: Chi-Quadrat(2)=19,658; $p=0,000$). Vergleicht man die ISS-Stadien untereinander mithilfe eines Post-Hoc Tests, ist ein signifikanter Unterschied in der Höhe der κ/λ -Ratio nur zwischen ISS-Stadium I im Vergleich zu Stadium II und III zu sehen (Median: I 30,03 vs. II 175,25, bzw. III 206,54; Dun-Bonferroni-Test: I vs. II $p=0,000$; I vs. III $p=0,022$), wobei die Effektstärke schwach bis mittelhoch ist (Effektstärke nach Cohen: I vs. II $r=0,28$; I vs. III $r=0,35$).

Auch unter den Patient*innen mit IgA-Myelom ist die Höhe der κ/λ -Ratio je nach ISS-Stadium signifikant unterschiedlich verteilt (Kruskal-Wallis-Test: Chi-Quadrat(2)=19,658; $p=0,000$). Im Vergleich der ISS-Stadien untereinander zeigt sich dieser Unterschied ebenfalls nur zwischen Stadium I und den beiden anderen Stadien (Median: I 21,06 vs. II 679,89, bzw. III 2767,21; I vs. II $p=0,003$; I vs. III $p=0,002$) mit einer mittleren bis starken Effektstärke (Effektstärke nach Cohen: I vs. II $r=0,46$; I vs. III $r=0,59$).

(siehe Tabelle 10, S. 54)

Tabelle 10: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach ISS Stadium

		p	SD	d	ISS	N	Median	SF
IgG	I-II	0,022	11,57	0,28	I	69	30,03	23,83
	I-III	0,000	8,044	0,35	II	74	175,25	49,11
	II-III	1,00	11,47	-	III	23	206,54	108,12
	insg.	0,000			insg.	166		
IgA	I-II	0,003	4,99	0,46	I	23	21,06	151,92
	I-III	0,002	6,40	0,59	II	26	679,89	238,11
	II-III	1,00	6,28	-	III	11	2767,2	697,14
	insg.	0,000			insg.	60		

Unter den Patient*innen mit IgG-Myelom hat die Mehrheit im ISS-Stadium I mit 52,2% (36/69) eine abnormale IgG κ/λ HLC-Ratio, aber immerhin 43,5% (30/69) zeigen eine hoch abnormale Ratio. Der Großteil der Patient*innen im Stadium II weisen mit 67,6% (50/74) und im Stadium III mit 60,9% (14/23) eine hoch abnormale IgG κ/λ Ratio auf. Dennoch gibt es im Stadium II einen Fall und im Stadium III zwei Fälle mit normaler IgG κ/λ HLC-Ratio. (siehe Abbildung 8, S. 54)

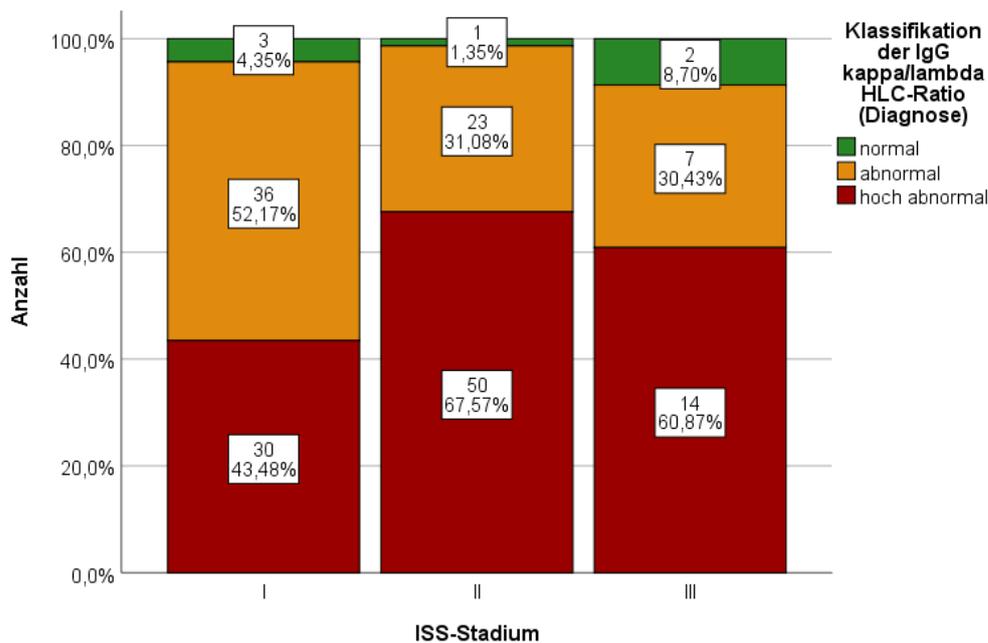


Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der Klassifikation der IgG kappa/lambda HLC-Ratio auf die ISS-Stadien bei IgG-Myelomen

Unter den Patient*innen mit IgA-Myelom hat nur eine*r eine normale IgA κ/λ HLC-Ratio und diese*r befindet sich im ISS-Stadium I. Mit 65,2% (15/23) hat die Mehrzahl der Patient*innen in diesem Stadium eine abnormale IgA κ/λ HLC-Ratio. Dennoch weisen 30,4% (7/23) eine hoch abnormale Ratio auf. Im ISS-Stadium II haben mit 92,3% (24/26) und im Stadium III mit 90,9% (10/11) die meisten Patient*innen eine hoch abnormale Ratio. (siehe Abbildung 9, S. 55)

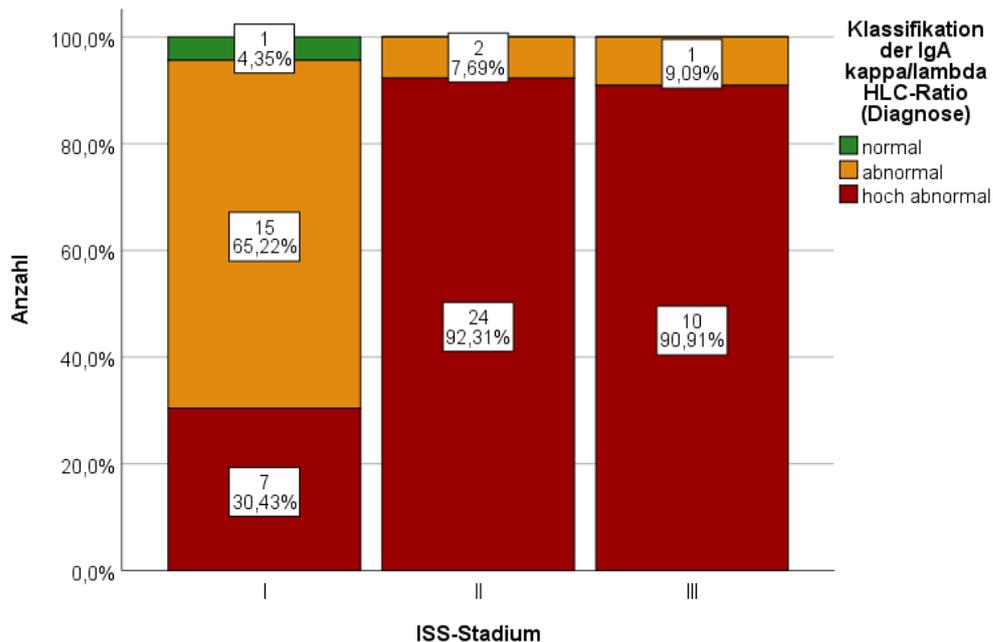


Abbildung 9: Prozentuale Verteilung der Klassifikation der IgA kappa/lambda HLC-Ratio auf die ISS-Stadien bei IgA-Myelomen

4.2.3.2 HLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose je nach DS-Stadium

Die Verteilung der χ^2 HLC-Ratio bei Patient*innen mit IgG- oder IgA-Myelom zeigt über die DS-Stadien keinen statistisch signifikanten Unterschied (Kruskal-Wallis-Test: Chi-Quadrat(3)=5.088; p=0,165).

4.3.3.3 HLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose je nach r-ISS-Stadium

Unter den Patient*innen mit IgG-Myelom zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Höhe der ^xHLC-Ratio je nach r-ISS-Stadium (Kruskal-Wallis-Test: Chi-Quadrat(2) = 12,62; p = 0,002). Im anschließend durchgeführten Post-hoc-Test zeigt sich dieser Unterschied ausschließlich signifikant zwischen r-ISS-Stadium I und III mit einer mittleren Effektstärke (Median: I 26,89 vs. II 176,30 bzw. III 203,88; Dun-Bonferroni-Test: I vs. III p=0,001; z=-3,51; p=0,001; r=0,47). (siehe Tabelle 11, S. 56)

Auch bei Patient*innen mit IgA-Myelom zeigen sich ein signifikanter Unterschied in der Höhe der ^xHLC-Ratio je nach r-ISS-Stadium (Kruskal-Wallis-Test: Chi-Quadrat(2) = 9,78; p=0,008). Im anschließend durchgeführten Post-hoc-Test zeigt sich dieser Unterschied ebenfalls ausschließlich zwischen r-ISS-Stadium I und III signifikant, allerdings mit einer hohen Effektstärke (Median: I 23,40 vs. II 218,76 bzw. III 4163,53; Dun-Bonferroni-Test: I vs. III z=-3,13; p=0,005; r=0,74).

(siehe Tabelle 11, S.56)

Tabelle 11: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach r-ISS Stadium

		p	SD	d	r-ISS	N	Median	SF
IgG	I-II	0,311	14,02	-	I	47	26,89	218,7
	I-III	0,001	7,13	0,47	II	77	176,30	407,7
	II-III	1,00	13,58	-	III	9	203,88	725,6
	insg.	0,002			insg.	133		
IgA	I-II	0,32	5,40	-	I	12	23,40	764,2
	I-III	0,005	8,16	0,74	II	38	218,76	1173,6
	II-III	0,058	7,17	-	III	6	4163,53	2497,0
	insg.	0,008			insg.	56		

Im ISS-Stadium I zeigen 48,9% (23/47) der Patient*innen mit IgG-Myelom eine abnormale und 44,7% (21/47) eine hoch abnormale IgG κ/λ HLC-Ratio. Mit 64,9% (50/77) im Stadium II und 66,7% (6/9) im Stadium III weist der Großteil der Patient*innen eine hoch abnormale IgG κ/λ Ratio auf. Dennoch gibt es im Stadium II und III jeweils einen Fall mit normaler IgG κ/λ HLC-Ratio (siehe Abbildung 10, S. 57).

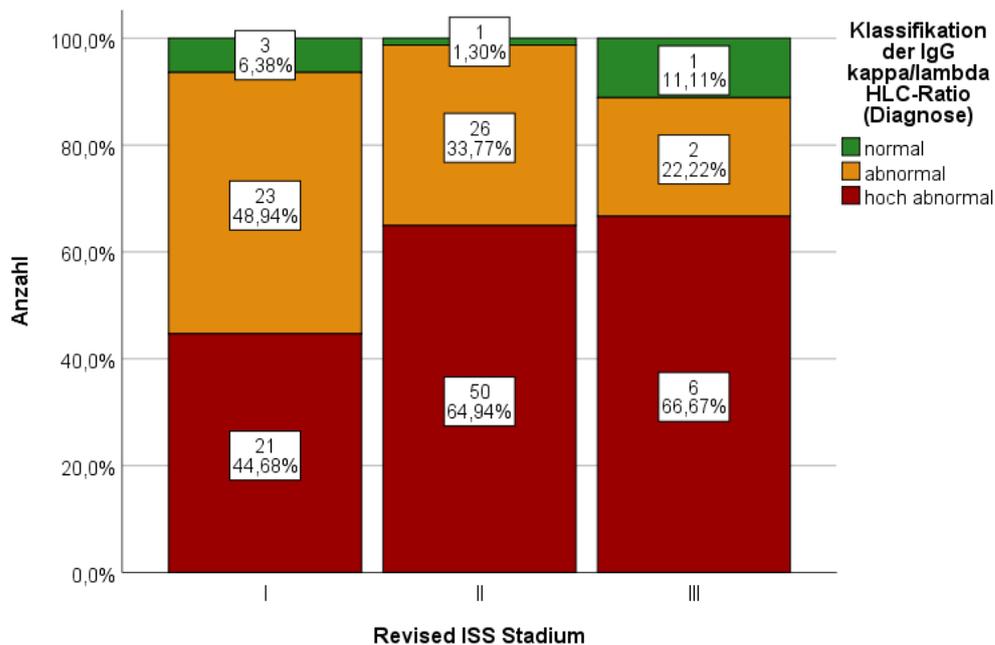


Abbildung 10: Prozentuale Verteilung der Klassifikation der IgG kappa/lambda HLC-Ratio auf die r-ISS-Stadien bei IgG-Myelomen

Es gibt nur eine*n Patient*in mit IgA-Myelom und normaler IgA κ/λ HLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose, welche*r sich im r-ISS-Stadium II befindet. Mit 66,7% (8/12) hat die Mehrheit der Patient*innen im ISS-Stadium I eine abnormale IgA κ/λ HLC-Ratio und 33,3% (4/12) eine hoch abnormale Ratio. Mit 73,7% (28/38) im Stadium II weist der Großteil der Patient*innen eine hoch abnormale IgA κ/λ Ratio auf. Im Stadium III zeigen 100% (6/6) eine hoch abnormale IgA κ/λ Ratio. (siehe Abbildung 11, S. 58)

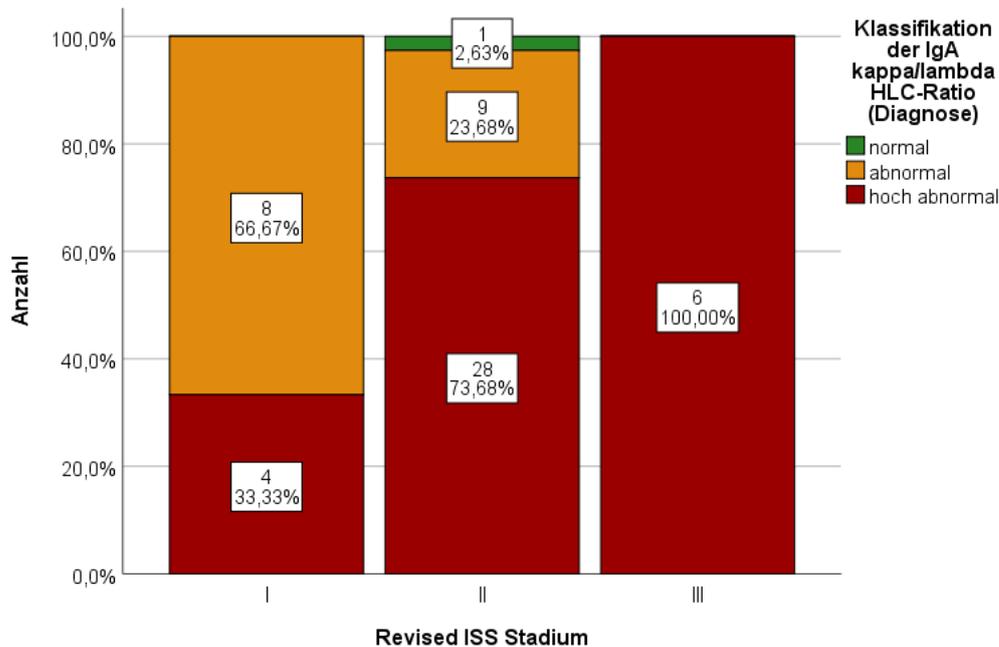


Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der Klassifikation der IgA kappa/lambda HLC-Ratio auf die r-ISS-Stadien bei IgA-Myelomen

4.2.4 Vergleich von HLC-Ratio und FLC-Ratio im Verlauf der Therapie

Von den 214 Patient*innen mit IgG-Myelom sind FLC und IgG HLC zum Zeitpunkt der Diagnose bei 161, nach Ende der Induktionstherapie bei 143 und nach Ende der HDT/ASCT bei 114 Patient*innen verfügbar.

Insgesamt weisen 93,8% (151/161) der Patient*innen mit IgG-Myelom zum Zeitpunkt der Diagnose, 51,7% (74/143) nach Induktionstherapie und 38,6% (44/114) nach HDT/ASCT eine abnormale FLC-Ratio auf.

Unter den Patient*innen mit normaler FLC-Ratio zeigt zum Zeitpunkt der Diagnose nur ein*e Patient*in eine normale IgG κ/λ HLC-Ratio (1/10). Nach Ende der Induktionstherapie haben 34,8% der Patient*innen (24/69) sowohl eine normale FLC-Ratio als auch eine normale IgG κ/λ HLC-Ratio. Dieser Anteil steigt bis zum Ende der HDT/ASCT auf 52,9% (37/70).

In 3,3% (5/151) der Fälle liegt die IgG κ/λ HLC-Ratio trotz abnormaler FLC zum Zeitpunkt der Diagnose innerhalb des Normbereichs. Dieser Anteil steigt im Verlauf leicht an. Er liegt nach Induktionstherapie bei 21,6% (16/74) und nach Ende der HDT/ASCT bei 20,5% (9/44).

Umgekehrt liegt in 90% der Fälle (9/10) zum Zeitpunkt der Diagnose die FLC-Ratio trotz abnormaler oder hoch abnormaler IgG κ/λ HLC-Ratio innerhalb des Normbereichs. Nach Ende der Induktionstherapie trifft dies auf 65,2% der Fälle (45/69) zu und nach HDT/ASCT auf 47,1% (33/70).

Untersucht man die Verteilung der IgG κ/λ HLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose unter den Patient*innen mit IgG-Myelom, je nachdem ob die FLC-Ratio im Normalbereich liegt oder nicht (definiert als Bereich zwischen 0,26 und 3,1), so findet sich in der ersten Gruppe eine signifikant niedrigere κ/λ HLC-Ratio (Mann-Whitney-U-Test: $Z=-2,774$; $p=0,006$; Median: normal 121,31 vs. abnormal 71,80). Der Effekt ist allerdings schwach (Effektstärke nach Cohen: $r=0,22$).

Dieser Unterschied wird nach Induktionstherapie signifikanter (Mann-Whitney-U-Test: $Z=-4,812$; $p=0,000$; Median: normal 2,34 vs. abnormal 13,76) und besteht auch nach HDT/ASCT (Mann-Whitney-U-Test: $Z=-5,530$; $p=0,000$; Median: normal 1,91 vs. abnormal 8,56). Der Effekt nimmt im Verlauf zu (Effektstärke nach Cohen $r=0,40$; bzw. $r=0,52$). (siehe Tabelle 12, S. 59)

Tabelle 12: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach FLC-Ratio bei IgG-Myelomen

Zeitpunkt	Sign.	U	d	FLC-Ratio	N	Median	SF
zur Diagnose	0,006	359,0	0,22	normal	10	21,31	5,98
				abnormal	151	71,80	32,02
				insg.	161		
nach Induktion	0,000	1362,0	0,40	normal	69	2,78	7,87
				abnormal	74	13,76	19,63
				insg.	143		
nach HDT/ASCT	0,000	590,0	0,52	normal	70	1,91	8,22
				abnormal	44	8,56	5,09
				insg.	114		

Von den 79 Patient*innen mit IgA-Myelom sind FLC und IgA HLC bei 59 zum Zeitpunkt der Diagnose, bei 49 nach Ende der Induktionstherapie und bei 38 nach Ende der HDT/ASCT verfügbar.

Es haben 89,8% (53/59) der Patient*innen mit IgA-Myelom eine abnormale FLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose, 36,7% (18/49) nach Induktionstherapie und 13,8% (8/38) nach HDT/ASCT.

Zum Zeitpunkt der Diagnose zeigt keine*r der Patient*innen mit normaler FLC-Ratio eine normale IgA κ/λ HLC-Ratio (0/6). Nach Induktionstherapie haben 51,6% (16/31) und nach HDT/ASCT 70,0% (21/30) der Patient*innen eine normale FLC-Ratio und eine normale IgA κ/λ HLC-Ratio.

Bei 1,9% (1/53) liegt die IgA κ/λ HLC-Ratio trotz abnormaler FLC-Ratio im Normbereich. Nach Induktionstherapie und nach HDT/ASCT gibt es ebenfalls jeweils einen Fall mit 5,6% (1/18), respektive 12,5% (1/8), auf den das zutrifft.

Umgekehrt ist die FLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose bei 50,0% (3/6) normal während die IgA κ/λ HLC-Ratio abnormal oder hoch abnormal ist.

Sowohl nach Ende der HDT/ASCT als auch schon nach Ende der Induktionstherapie zeigt keine*r der Patient*innen, bei denen die FLC-Ratio im Normbereich liegt, noch eine hoch abnormale IgA κ/λ HLC-Ratio. Allerdings ist die IgA κ/λ HLC-Ratio trotz normaler FLC-Ratio in 48,4% der Fälle (15/31) nach Ende der Induktionstherapie und in 30,0% der Fälle (9/30) nach Ende der HDT/ASCT im abnormalen Bereich.

Unter den Patient*innen mit IgA-Myelom unterscheidet sich die Verteilung der IgA κ/λ HLC-Ratio je nach FLC-Ratio im Normbereich erst nach Induktionstherapie signifikant (Man-Whitney-U-Test: $Z=-3,982$; $p=0,000$; Median: normal 1,82 vs. abnormal 31,54). Dieser Unterschied lässt sich auch nach HDT/ASCT wiederfinden (Exakter Man-Whitney-U-Test: $U=43$; $p=0,004$; Median: normal 1,27 vs. abnormal 3,90). Der Effekt ist nach Induktionstherapie stark, nach HDT/ASCT mittel ausgeprägt (Effektstärk nach Cohen: $r=0,57$, bzw. $r=0,45$).

(siehe Tabelle 13, S. 61)

Tabelle 13: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach FLC-Ratio bei IgA-Myelomen

Zeitpunkt	Sign.	U	d	FLC-Ratio	N	Median	SF
zur Diagnose	0,616	138,0	-	normal	6	285,68	442,46
				abnormal	53	162,48	204,47
				insg.	59		
nach Induktion	0,000	87,0	0,57	normal	31	1,82	0,61
				abnormal	18	31,54	73,95
				insg.	49		
nach HDT/ASCT	0,004	43,0	0,45	normal	30	1,27	0,28
				abnormal	8	3,90	41,23
				insg.	38		

4.2.5 HLC-Ratio im Verlauf der Therapie je nach Responsekategorie

Unter den Patient*innen mit IgG-Myelom zeigt etwas über die Hälfte in den Responsekategorien VGPR und <VGPR nach Induktionstherapie eine abnormale IgG κ/λ HLC-Ratio (VGPR: 56,9% (29/51); <VGPR 53,3% (48/90)).

Zu dem Zeitpunkt haben 60,0% (3/5) in der Responsekategorie sCR/CR eine normale IgG κ/λ HLC-Ratio. Es haben weniger Patient*innen mit einer Response <VGPR nach Induktionstherapie eine normale Ratio als in den beiden anderen Stadien (VGPR: 39,1% (20/51); <VGPR: 18,9% (17/90)). In den Responsekategorien sCR/CR nach Induktionstherapie weist kein*e Patient*in eine hoch abnormale Ratio auf.

Nach HDT/ASCT weisen weder Patient*innen mit sCR/CR noch mit VGPR hoch abnormale IgG κ/λ HLC-Ratio auf. Dagegen zeigt die Mehrheit in beiden Responsekategorien eine normale Ratio (sCR/CR: 61,5% (8/13); VGPR: 55,8% (24/43). Patient*innen mit einer schlechteren Response als VGPR weisen dagegen mit 68,6% (35/51) mehrheitlich weiterhin eine abnormale Ratio auf. Dennoch haben 17,6% (9/51) trotz niedriger Response eine normale IgG κ/λ HLC-Ratio.

Unter den Patient*innen mit IgA-Myelom sind die Ergebnisse sehr ähnlich: Etwas über die Hälfte der Patient*innen in den Responsekategorien VGPR und schlechter als VGPR nach Induktionstherapie weisen eine abnormale IgG κ/λ HLC-Ratio auf (VGPR: 57,9% (11/19); <VGPR 52,6% (10/19)).

Zu dem Zeitpunkt haben 81,8% (9/11) der Patient*innen in den Responsekategorien sCR/CR eine normale IgA κ/λ HLC-Ratio. Es haben weniger Patient*innen mit einer Response <VGPR nach Induktionstherapie eine normale Ratio als in den beiden anderen Stadien (VGPR: 5,3% (1/19); <VGPR: 36,8% (7/19).

In den Responsekategorien sCR/CR nach Induktionstherapie weist kein*e Patient*in eine hoch abnormale Ratio auf.

Nach HDT/ASCT weisen ebenfalls weder Patient*innen mit sCR/CR noch mit VGPR hoch abnormale IgA κ/λ HLC-Ratio auf. Auch zeigt mit 85,7% (18/21) die Mehrheit der Patient*innen mit sCR/CR eine normale Ratio. Dagegen haben 61,1% (11/18) der Patient*innen mit VGPR und 50,0% (1/2) der Patient*innen mit einer Response <VGPR weiterhin eine abnormale IgA κ/λ HLC-Ratio. Kein*e Patient*in mit einer Response <VGPR nach HDT/ASCT zeigt hingegen eine normale IgA κ/λ HLC-Ratio. Unter den Patient*innen mit VGPR nach HDT/ASCT sind dies hingegen 38,9% (7/18).

Unter den IgG-Myelomen unterscheidet sich die Höhe der ^xHLC-Ratio signifikant nach Responsekategorien nach Induktionstherapie (Kruskal-Wallis-Test: Chi-Quadrat(2)=31,65; p=0,000; Median sCR/CR 1,27 vs. VGPR 2,55 vs. <VGPR 10,50). Im anschließend durchgeführten Post-hoc-Test zeigt sich dieser Unterschied ausschließlich signifikant zwischen den Patient*innen mit einer sCR/CR im Vergleich zu denen mit einer Response <VGPR (Dun-Bonferroni-Test: z=-3,29; p=0,003; r=0,33), sowie zwischen den Patient*innen mit einer VGPR im Vergleich zu denen mit einer Response <VGPR (Dun-Bonferroni-Test: z=-4,97; p=0,000; r=0,42). Der Effekt ist jeweils mittelstark.

Dasselbe lässt sich unter den IgG-Myelomen auch nach HDT/ASCT beobachten (Kruskal-Wallis-Test: Chi-Quadrat(2)=35,87; p=0,000; Median sCR/CR 1,40 vs. VGPR 2,36 vs. <VGPR 7,13). Auch hier zeigt sich im anschließend durchgeführten Post-hoc-Test sich dieser Unterschied ausschließlich signifikant zwischen den Patient*innen mit einer sCR/CR im Vergleich zu denen mit einer Response <VGPR (Dun-Bonferroni-Test: z=-4,91; p=0,000; r=0,67), sowie zwischen den Patient*innen mit einer VGPR im Vergleich zu denen mit einer schlechteren Response (Dun-Bonferroni-Test: z=-4,77; p=0,000; r=0,49). Der beobachtete Effekt ist stark. (siehe Tabelle 14, S. 63)

Tabelle 14: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach Response für IgG-Myelome

	p	SF	d	Response	N	Median	SD
nach Induktionstherapie							
sCR/CR vs. VGPR	0,514	19,82	-	sCR/CR	5	1,27	1,58
sCR/CR vs. <VGPR	0,003	19,43	0,33	VGPR	51	2,55	9,82
VGPR vs. <VGPR	0,000	7,41	0,42	< VGPR	90	10,50	163,50
insg.	0,000			insg.	146		
nach HDT/ASCT							
sCR/CR vs. VGPR	0,270	9,82	-	sCR/CR	13	1,40	0,88
sCR/CR vs. <VGPR	0,000	9,64	0,67	VGPR	43	2,36	3,58
VGPR vs. <VGPR	0,000	6,42	0,49	< VGPR	51	7,13	83,42
insg.	0,000			insg.	107		

Auch unter den Patient*innen mit IgA-Myelom unterscheidet sich die Höhe der ^xHLC-Ratio signifikant nach Responsekategorien nach Induktionstherapie (Kruskal-Wallis-Test: Chi-Quadrat(2)=25,44; p=0,00; Median sCR/CR 0,97 vs. VGPR 1,91 vs. <VGPR 10,06). Im anschließend durchgeführten Post-hoc-Test zeigt sich dieser Unterschied ausschließlich signifikant zwischen den Patient*innen mit einer sCR/CR im Vergleich zu denen mit einer Response <VGPR (Dun-Bonferroni-Test: z=-4,72; p=0,000; r=0,86), sowie zwischen den Patient*innen mit einer VGPR im Vergleich zu denen mit einer schlechteren Response (Dun-Bonferroni-Test: z=-3,63; p=0,001; r=0,59). Der Effekt ist jeweils stark.

Nach HDT/ASCT unterscheidet sich die Höhe der ^xHLC-Ratio weiterhin signifikant nach Responsekategorien (Kruskal-Wallis-Test: Chi-Quadrat(2)=8,57; p=0,014; Median sCR/CR 1,16 vs. VGPR 2,12 vs. <VGPR 171,20). Jedoch zeigt sich im anschließend durchgeführten Post-hoc-Test dieser Unterschied ausschließlich signifikant zwischen den Patient*innen mit einer sCR/CR im Vergleich zu denen mit einer Response <VGPR

(Dun-Bonferroni-Test: $z=-2,62$; $p=0,027$; $r=0,55$). Der hier beobachtete Effekt ist ebenfalls stark. (siehe Tabelle 15, S. 64)

Tabelle 15: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach Response für IgA-Myelome

	p	SF	d	Response	N	Median	SD
nach Induktionstherapie							
sCR/CR vs. VGPR	0,325	5,41	-	sCR/CR	11	0,97	0,58
sCR/CR vs. <VGPR	0,000	5,41	0,86	VGPR	19	1,91	75,93
VGPR vs. <VGPR	0,001	4,64	0,59	< VGPR	19	10,06	311,8
insg.	0,000			insg.	49		
nach HDT/ASCT							
sCR/CR vs. VGPR	0,210	3,85	-	sCR/CR	21	1,16	0,57
sCR/CR vs. <VGPR	0,027	8,87	0,55	VGPR	18	2,12	4,81
VGPR vs. <VGPR	0,208	8,93	-	< VGPR	2	171,20	231,8
insg.	0,014			insg.	41		

4.2.6 Vergleich von HLC-Ratio und MRD-Status nach Induktionstherapie

Der MRD-Status ist zum Zeitpunkt unserer Datenerhebung nur nach Induktionstherapie und nicht nach HDT/ASCT verfügbar.

Unter den Patient*innen mit negativem MRD-Status nach Induktionstherapie weisen 58,1% (18/31) eine abnormale IgG κ/λ HLC-Ratio und niemand eine hoch abnormale Ratio auf. Die MRD-positiven Patient*innen haben zu 22,1% (27/122) eine hoch abnormale und zu 51,6% (63/122) eine abnormale IgG κ/λ HLC-Ratio. Die Klassifikation der Ig κ/λ HLC-Ratio steht in signifikantem und aber schwachem Zusammenhang mit dem MRD-Status nach Induktionstherapie (Pearson χ^2 : χ^2 Quadrat(2)=9,127; $p=0,01$; Cramers $V=0,244$ mit $p=0,01$).

Nach Response zum selben Zeitpunkt analysiert, finden sich zwei Patient*innen in VGPR oder besser, die eine hoch abnormale HLC-Ratio haben. Diese sind beide in der Response-Kategorie VGPR und MRD-positiv (52/35). Die übrigen MRD-positiven Patient*innen mit hoch abnormaler HLC-Ratio sind in einer schlechteren Response-Kategorie als VGPR (25/78). (siehe Abbildung 12, S. 65)

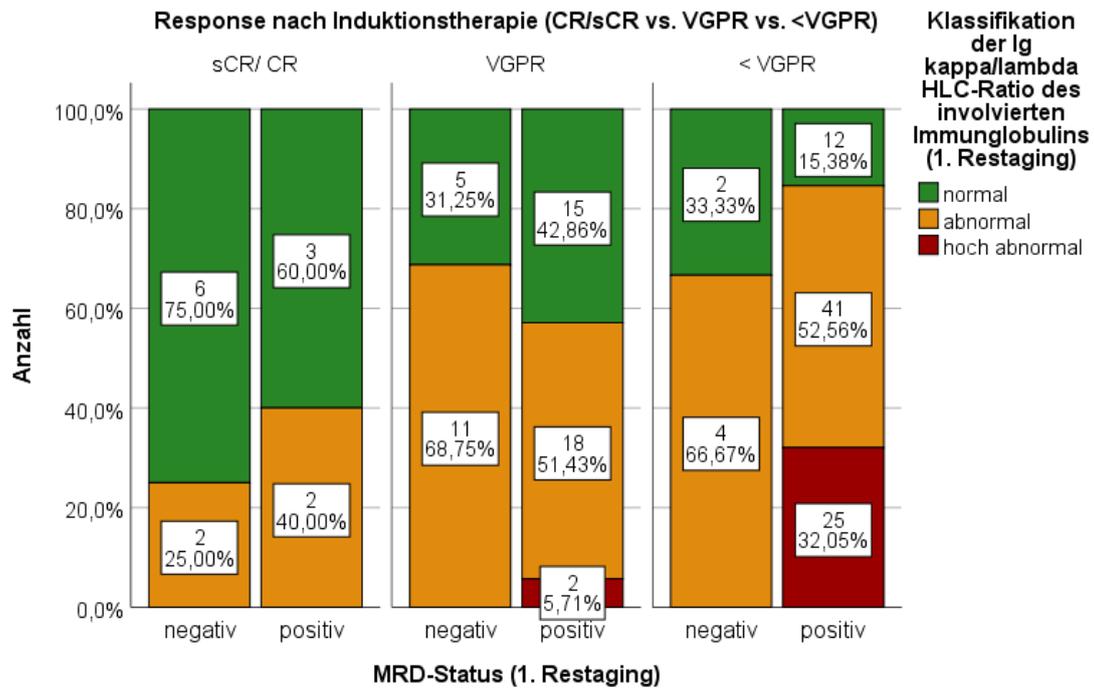


Abbildung 12: Anzahl der Fälle mit positivem und negativem MRD-Status je nach Klassifikation der Ig kappa/lambda HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins und Response-Status

Gruppiert nach dem MRD-Status nach Induktionstherapie findet sich unter den Patient*innen mit IgG-Myelom ein signifikanter Unterschied in der Verteilung ^xHLC-Ratio zum selben Zeitpunkt (Man-Whitney-U-Test: Z= -4,41; p=0,000; Median 1,82 vs. 8,20). Unter den Patient*innen mit IgA-Myelom gruppiert nach dem MRD-Status nach Induktionstherapie findet sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der ^xHLC-Ratio zum selben Zeitpunkt (Man-Whitney-U-Test: Z= -2,61; p=0,009; Median 1,46 vs. 4,72). (siehe Tabelle 16, S. 66)

Tabelle 16: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach MRD-Status nach Induktionstherapie

	p	U	d	MRD	N	Median	SF
IgG	0,000	393,0	0,41	negativ	22	1,89	0,35
				positiv	91	8,20	17,06
				insg.	113		
IgA	0,009	59,00	0,41	negativ	9	1,46	0,19
				positiv	31	4,72	32,76
				insg.	40		

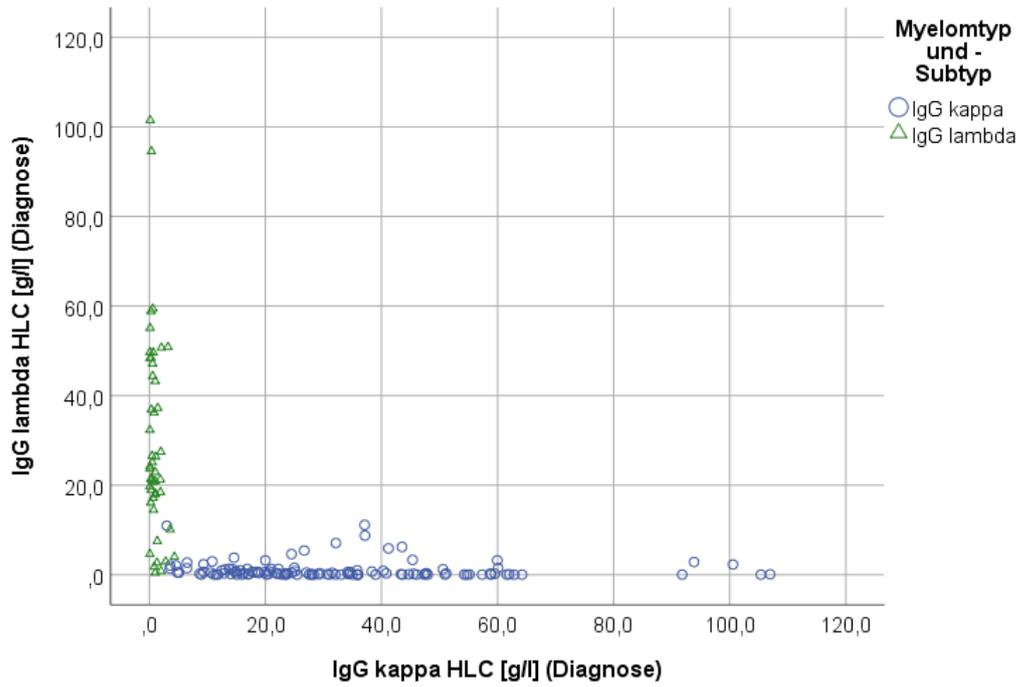
4.2.7 Isotypensuppression in der HLC-Messung

Entsprechend der Normwerte von The Binding Site™ und der Definition der Isotypensuppression von Ludwig et al. (siehe Kapitel 2.3.4.2) haben wir die Myelom-Typen auf die Suppression nicht involvierter HLC untersucht.

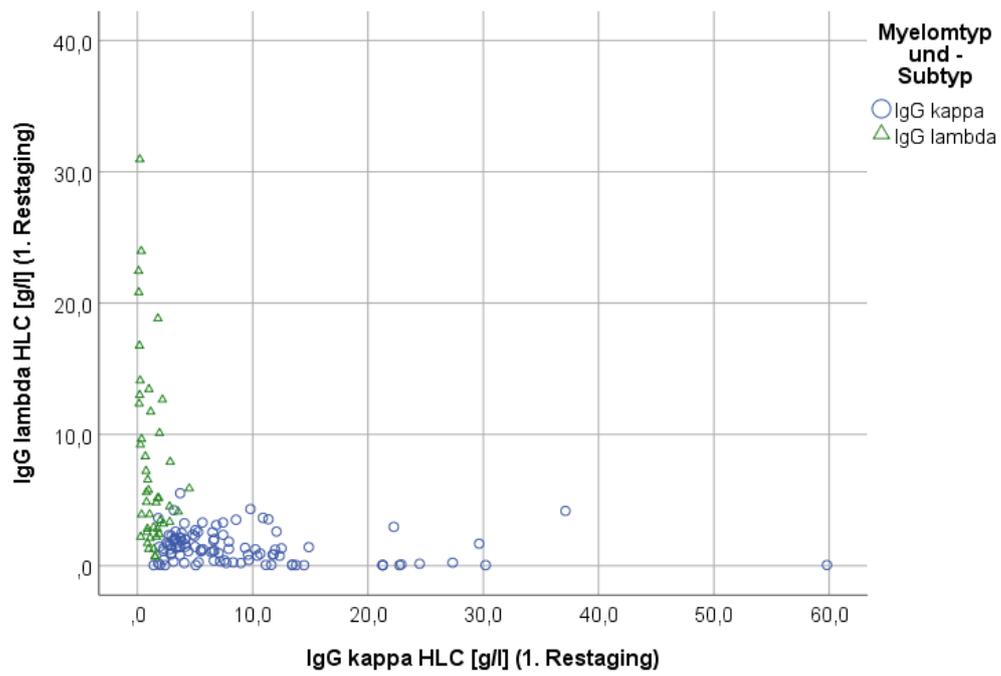
Unter den IgGκ-Myelomen weisen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 72,0% (85/118) mehrheitlich eine stark supprimierte IgGλ HLC auf. Dieser Anteil verringert sich nach HDT/ASCT auf 22,7% (22/47). Dagegen steigt der Anteil mit leicht supprimierter IgGλ HLC mit 11,9% (14/118) auf 23,7% (23/47) nach HDT/ASCT. Der Anteil an Patient*innen mit normaler IgGλ steigt von 12,7% (15/118) und auf 48,5% (47/97) nach HDT/ASCT.

Unter den IgGλ-Myelomen ist die IgGκ HLC ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit 87,0% (40/46) mehrheitlich stark supprimiert. Dieser Anteil verringert sich nach HDT/ASCT auf 25,0% (11/44). Dagegen steigt der Anteil mit leicht supprimierter IgGκ HLC von 10,9% (5/46) auf 31,8% (14/44) nach HDT/ASCT. Normal ist die IgGκ HLC bei 2,2% (1/46) zum Zeitpunkt der Diagnose und 43,2% (19/44) nach HDT/ASCT.

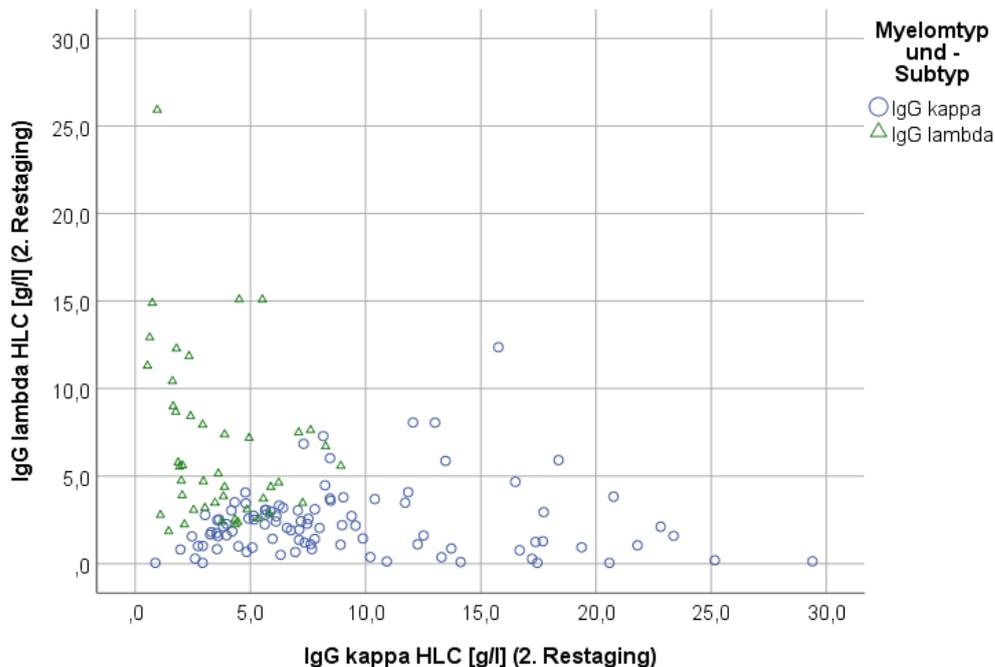
Die Höhe der IgGκ und IgGλ HLC für IgG-Myelome lässt sich in den Punktediagrammen nachvollziehen. Die zunächst erhöhte involvierte HLC bei supprimierter nicht-involvierter HLC normalisieren sich zusehends im Verlauf der Therapie, sodass aus zwei recht strikt getrennten, annähernden Geraden zwei sich überlagernde Punktwolken entstehen. (siehe Abbildung 13a-c, S. 67f)



a.



b.



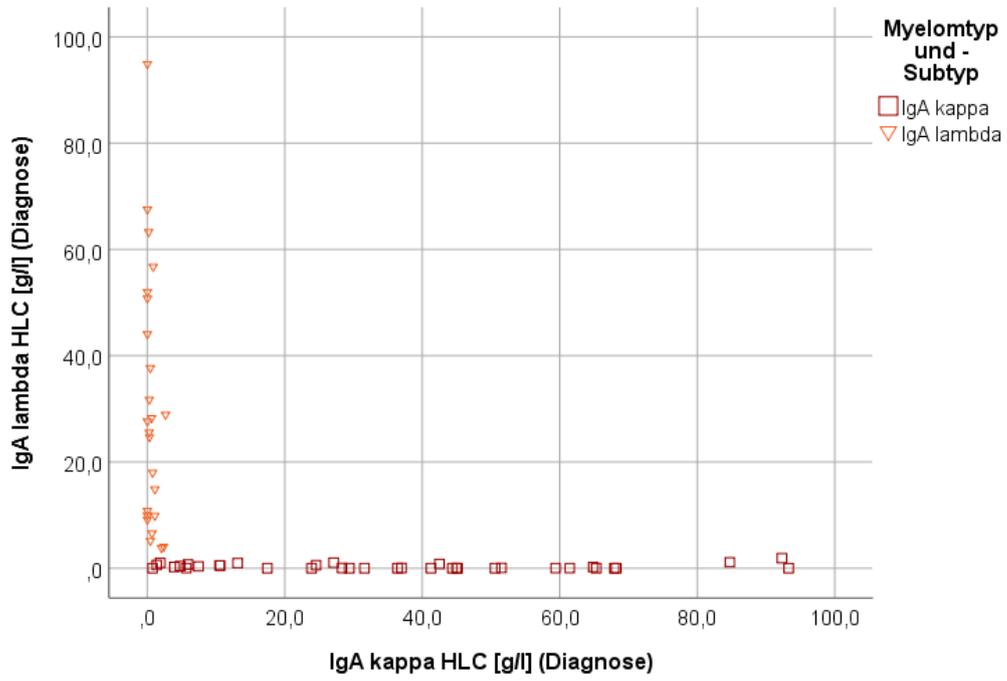
c.

Abbildung 13: Höhe der IgG kappa HLC und IgG lambda HLC der IgG-Myelome (a) zum Zeitpunkt der Diagnose (b) nach Induktionstherapie (c) nach HDT/ASCT

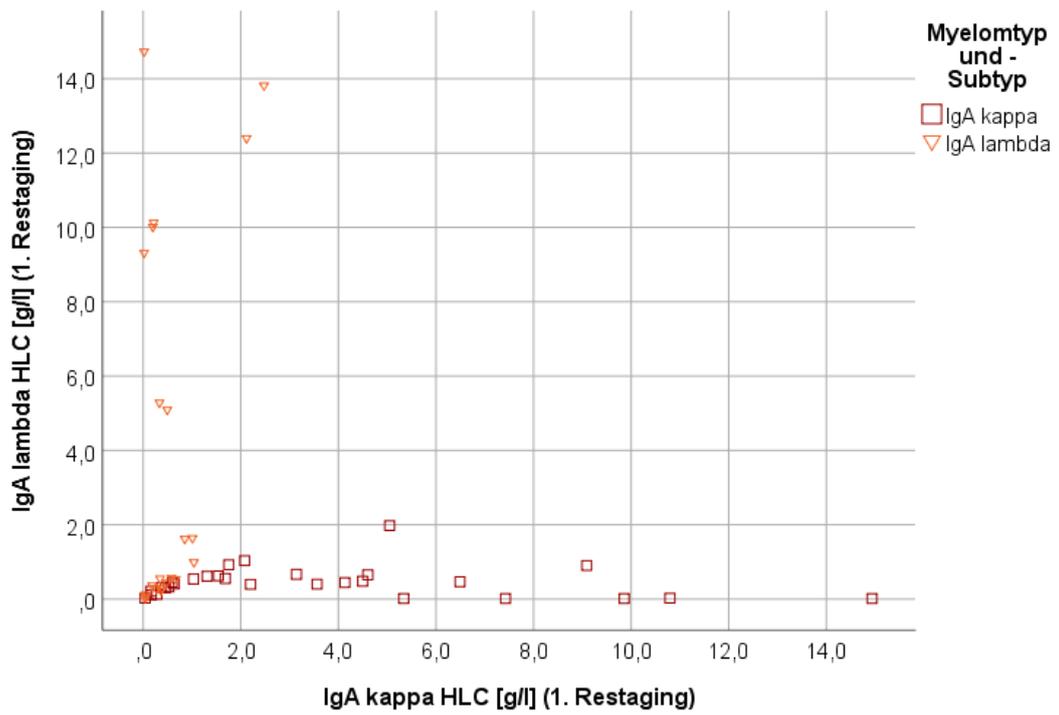
Unter den IgA κ -Myelomen ist die IgA λ HLC zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit 62,8% (21/34) mehrheitlich stark supprimiert. Dieser Anteil verringert sich nach HDT/ASCT auf 25,0% (7/28). Dagegen steigt der Anteil mit leicht supprimierter IgA λ HLC von 11,8% (4/34) auf 28,6% (8/28) nach HDT/ASCT. Normal ist die IgA λ HLC bei 26,5% (9/34) zum Zeitpunkt der Diagnose und 46,4% (13/28) nach HDT/ASCT.

Unter den IgA λ -Myelomen ist die IgA κ HLC ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei 47,8% (11/23) stark und bei 17,4% (4/23) leicht supprimiert. Dieser Anteil verringert sich nach HDT/ASCT auf 31,8% (7/22), respektive 13,6% (3/22). Normal ist die IgA κ HLC bei 30,4% (7/23) zum Zeitpunkt der Diagnose und 50,0% (11/22) nach HDT/ASCT.

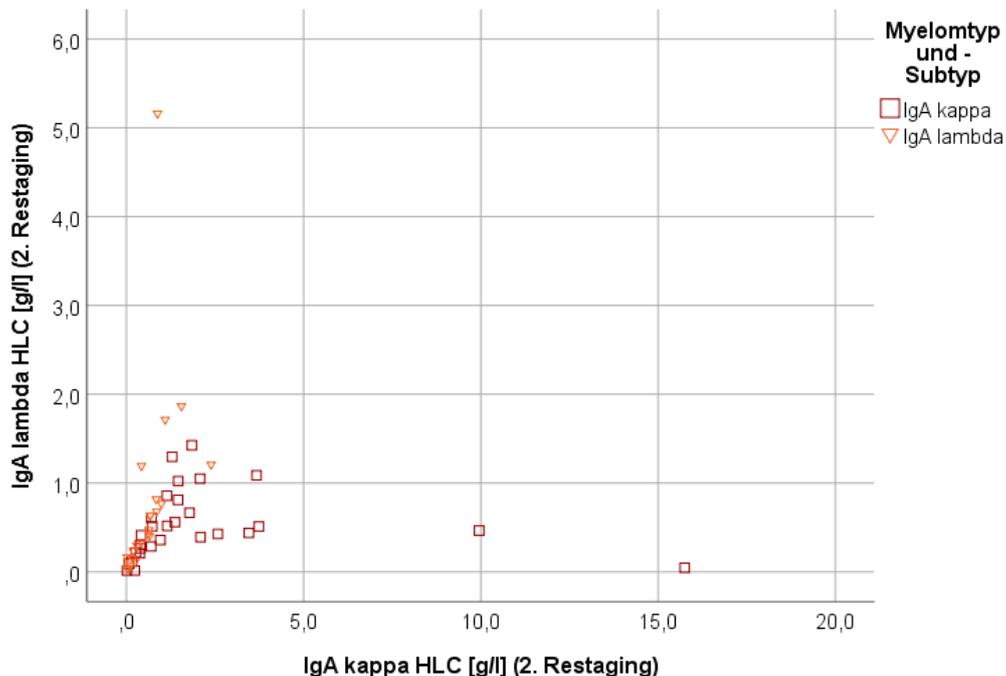
Die Höhe der IgA κ und IgA λ HLC für IgA-Myelome lässt sich in den Punktediagrammen nachvollziehen (siehe Abbildung 14a-c, S. 69f). Die zunächst erhöhte involvierte HLC bei supprimierter nicht-involvierter HLC normalisieren sich zusehends und stärker als bei den IgG-Myelomen die IgG HLC im Verlauf der Therapie, sodass aus zwei strikt getrennten Geraden eine sich überlagernde Punktwolken mit ein paar Ausreißern entsteht.



a.



b.



c.

Abbildung 14: Höhe der IgA kappa HLC und IgA lambda HLC der IgA-Myelome (a) zum Zeitpunkt der Diagnose (b) nach Induktionstherapie (c) nach HDT/ASCT

4.2.8 Überlebenszeitanalysen

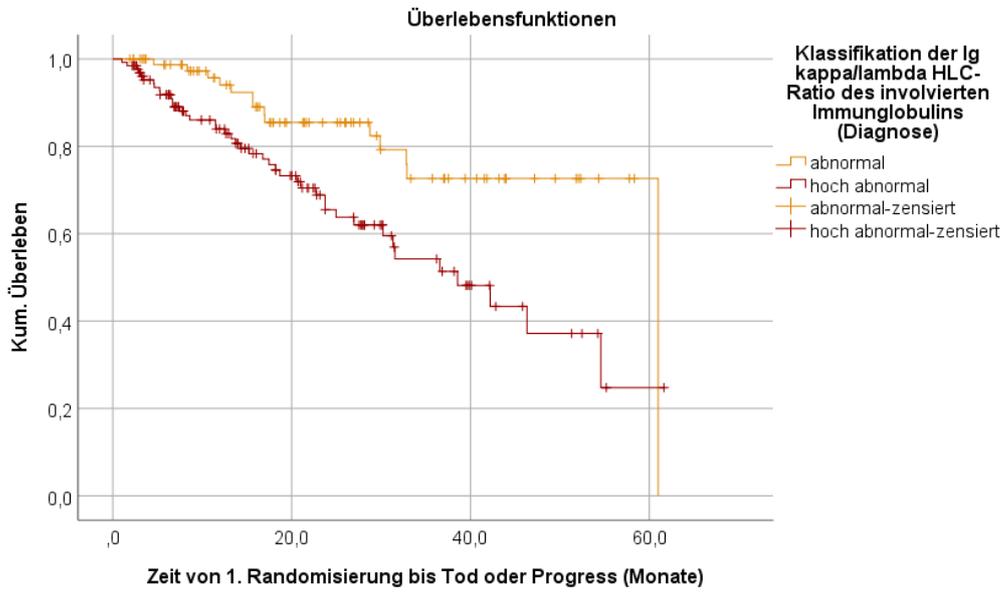
4.2.8.1 PFS je nach Klassifikation der HLC-Ratio

Für die Unterschiede im PFS zwischen Patient*innen mit normaler, abnormaler und hoch abnormaler HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins zu den drei Zeitpunkten mit einer Kaplan-Meier-Analyse haben wir die Patient*innen mit IgG- und IgA-Myelom gemeinsam betrachtet

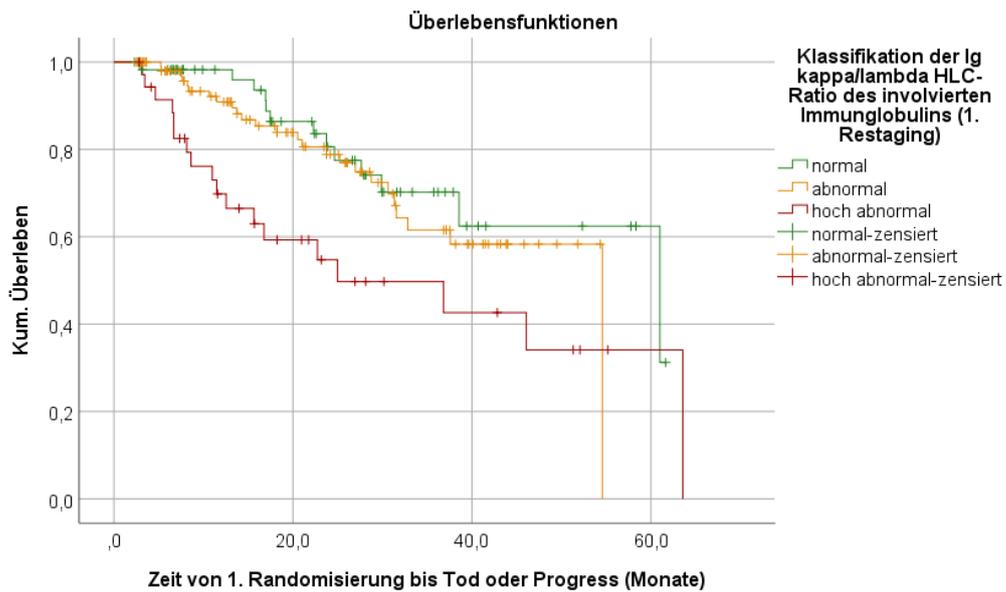
Es findet sich zum Zeitpunkt der Diagnose ein signifikanter Unterschied, wobei die Gruppe mit normaler HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins aufgrund der niedrigen Fallzahl (n=7) nicht verwertbar ist (Log Rank-Test: $\text{Chi}(2)=10,42$; $p=0,005$). Damit hat die Gruppe mit abnormaler HLC-Ratio ein signifikant längeres Überleben als jene mit hoch abnormaler HLC-Ratio (Medianes PFS 61,0 Monate vs. 54,6 Monate vs. 25,0 Monate). (siehe Abbildung 15a, S.71)

Nach Induktionstherapie ist der Unterschied im PFS zwischen den drei Gruppen ebenfalls signifikant (Log Rank-Test: $\text{Chi}(2)=8,64$; $p=0,013$; Medianes PFS 60,95 vs. 54,44 vs. 46,0 Monate). (siehe Abbildung 15b, S.71)

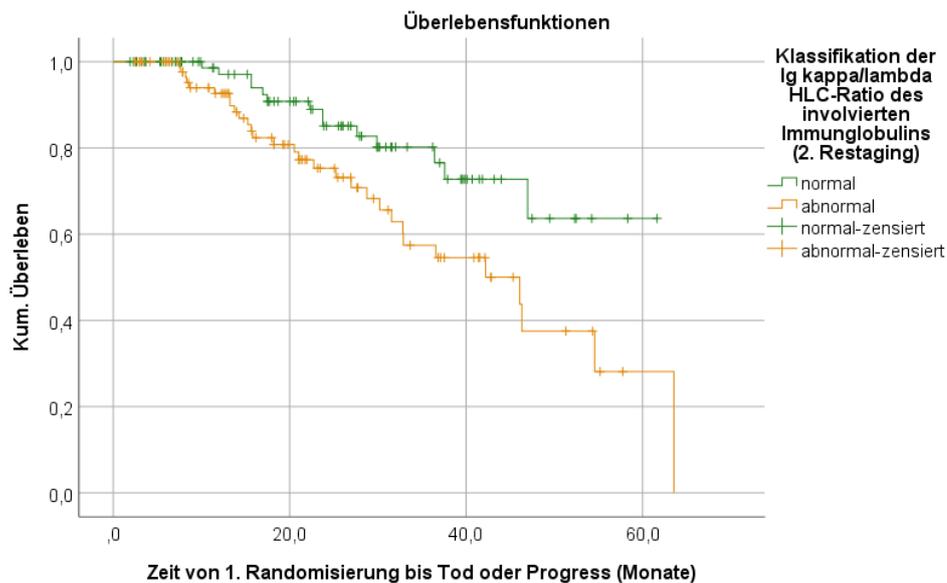
Dasselbe gilt für das mediane PFS der drei Gruppen nach HDT/ASCT, wobei hier die Gruppe mit hoch abnormaler IgG HLC-Ratio aufgrund der niedrigen Fallzahl (n=9) nicht verwertbar ist (Log Rank-Test: $\text{Chi}(2)=10,27$; $p=0,006$; Medianes PFS nicht erreicht vs. 46,1 Monate). (siehe Abbildung 15c, S. 72)



a.



b.



c.

Abbildung 15: Überlebensverteilungen für die Klassifikation der Ig kappa/lambda HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins

(a) zum Zeitpunkt der Diagnose (Medianes PFS 61,0 Monate vs. 38,6 Monate; Log Rank-Test: $\text{Chi}(2)=10,42$; $p=0,005$)

(b) nach Induktionstherapie (Medianes PFS 61,0 Monate vs. 54,6 Monate vs. 25,0 Monate; Log Rank-Test: $\text{Chi}(2)=8,64$; $p=0,013$)

(c) nach HDT/ASCT (Medianes PFS nicht erreicht vs. 46,1 Monate; Log Rank-Test: $\text{Chi}(2)=10,27$; $p=0,006$)

4.2.8.2 PFS je nach ^xHLC-Ratio über/ unter dem Median

Zunächst bestimmen wir den Median der involved/uninvolved HLC-Ratio jeweils für die Patient*innen mit IgG- und IgA-Myelom zu den drei Zeitpunkten und teilen die Patient*innen in je zwei Gruppen mit der involved/uninvolved HLC-Ratio kleiner, beziehungsweise größer/gleich dem errechneten Median.

Anschließend untersuchen wir die Unterschiede im PFS dieser Gruppen für Patient*innen mit IgG- und IgA-Myelom gemeinsam mit einer Kaplan-Meier-Analyse. Zum Zeitpunkt der Diagnose ein signifikanter Unterschied im PFS zwischen beiden Gruppen (Log Rank-Test: $\text{Chi}(1)=8,32$; $p=0,004$). So zeigen Patient*innen mit ^xHLC-Ratio unter dem Median ein signifikant längeres medianes PFS als solche mit einer

^xHLC-Ratio größer oder gleich dem Median (Medianes PFS 61,0 Monate vs. 38,5 Monate).

Dieser signifikante Unterschied besteht auch noch nach Induktionstherapie (Log Rank-Test: $\text{Chi}(1)=4,95$; $p=0,032$). Auch hier zeigt die Gruppe mit ^xHLC-Ratio unter dem Median ein signifikant längeres medianes PFS (Medianes PFS 61,0 Monate vs. 37,6 Monate).

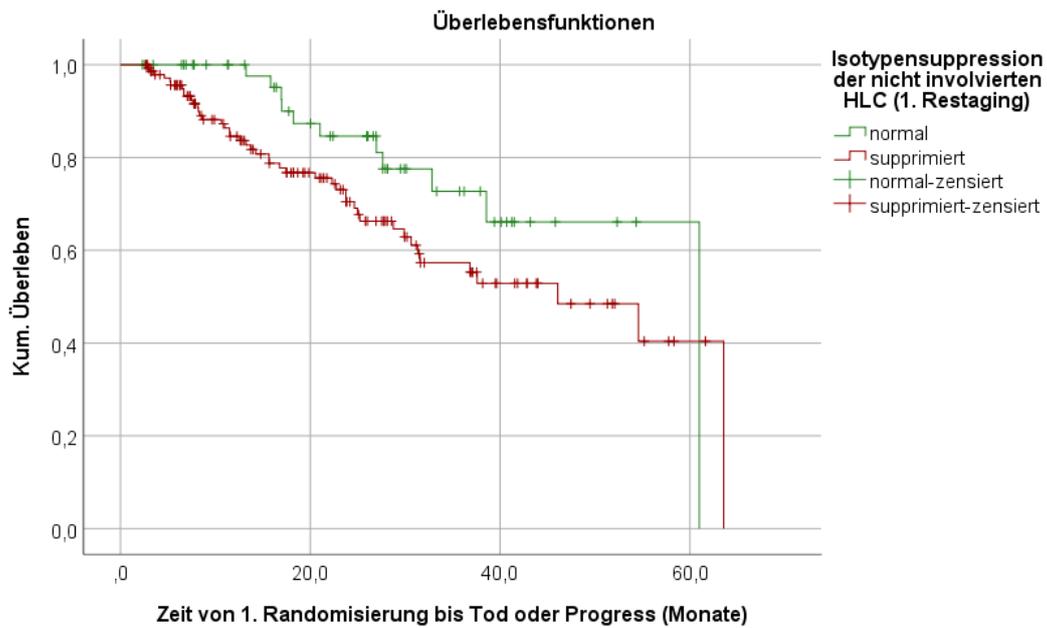
Auch nach HDT/ASCT zeigt die Gruppe mit ^xHLC-Ratio unter dem Median ein signifikant längeres medianes PFS (Log Rank-Test: $\text{Chi}(1)=5,20$; $p=0,023$; Medianes PFS 54,6 Monate vs. 46,1 Monate).

4.2.8.3 PFS je nach Isotypensuppression der nicht involvierten HLC

Wir untersuchen die Unterschiede im PFS zwischen den Patient*innen, eingeteilt nach supprimierter oder normaler nicht involvierter HLC des involvierten Immunglobulins mit einer Kaplan-Meier-Analyse.

Nach Induktionstherapie zeigt die Gruppe mit normaler uHLC ein längeres medianes PFS als die Gruppe mit supprimierter uHLC (Medianes PFS 61,0 Monate vs. 46,1 Monate), wobei der Unterschied nicht signifikant ist (Log Rank-Test: $\text{Chi}(1)=3,26$; $p=0,071$). (siehe Abbildung 16a, S. 74)

Nach HDT/ASCT ist der Unterschied im PFS signifikant (Log Rank-Test: $\text{Chi}(1)=6,15$; $p=0,013$) Auch hier zeigt die Gruppe mit normaler uHLC ein längeres medianes PFS als die Gruppe mit supprimierter uHLC (Medianes PFS 54,6 Monate vs. 46,1 Monate). (siehe Abbildung 16b, S. 74)



a.

b.

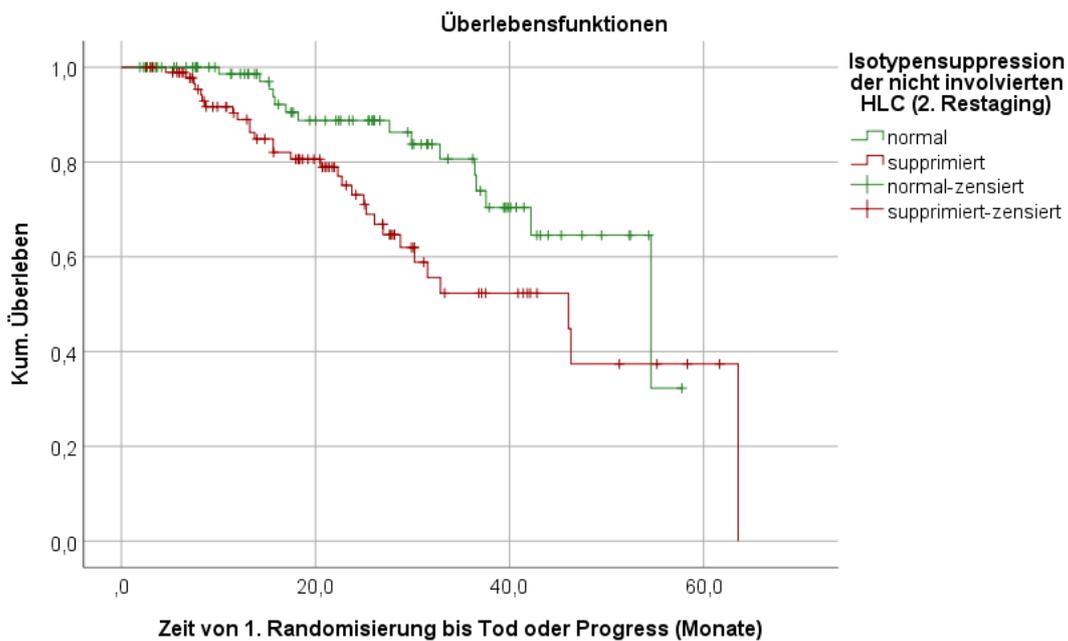


Abbildung 16: Überlebensverteilungen nach Isotypensuppression der nicht involvierten HLC

(a) nach Induktionstherapie (Medianes PFS 61,0 Monate vs. 46,1 Monate; Log Rank-Test: $\text{Chi}(1)=3,26$; $p=0,071$)

(b) nach HDT/ASCT (Medianes PFS 54,6 Monate vs. 46,1 Monate; Log Rank-Test: $\text{Chi}(1)=6,15$; $p=0,013$)

4.2.17 Überlebenszeitanalysen nach Klassifikation der HLC-Ratio je nach MRD-Status

Unter den MRD-positiven Patient*innen mit IgG- und IgA-Myelom zeigt sich nach Induktionstherapie ein nicht signifikanter Trend hin zu einem längeren PFS bei normaler Klassifikation der kappa/lambda HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins im Vergleich zur abnormalen und hoch abnormalen Klassifikation (Log Rank-Test: $\text{Chi}(2)=4,81$; $p=0,090$; Medianes PFS 61 Monate vs. nicht erreicht vs. nicht erreicht).

Unter den MRD-negativen Patient*innen mit IgG- und IgA-Myelom nach Induktionstherapie ist ein solcher Trend bei sehr niedrigen Fallzahlen nicht zu sehen ($n=13/18/0$; Log Rank-Test: $\text{Chi}(1)=1,82$; $p=0,178$).

4.2.8.4 Überlebenszeitanalysen verschiedener Risikofaktoren im Vergleich

In der beobachteten Studienpopulation zeigen unter den Patient*innen mit IgG-Myelom und IgA-Myelom bei der univariaten Cox-Regressionsanalyse folgende Risikofaktoren einen Einfluss auf das PFS:

Zum Zeitpunkt der Diagnose hat mit einem 3,34-fach erhöhtem Risiko für einen Progress ein r-ISS-Stadium II oder III im Vergleich zum Stadium I die größte Auswirkung (Cox-Regression: HR 3,34; 95%KI 1,74-6,36; p=0,000), gefolgt von einer erhöhten LDH zum Zeitpunkt der Diagnose (Cox-Regression: HR 3,10; 95%KI 1,81-5,27; p=0,000). Das Vorliegen einer Hoch-Risiko-Zytogenetik erhöht das Risiko für einen Progress um das 2,90-fache (Cox-Regression: HR 2,90; 95%KI 1,77-4,77; p=0,000). Mit einer Erhöhung des Progressionsrisikos um das 2,34-fache schließt sich ein ISS-Stadium II oder II im Vergleich zum Stadium I an (Cox-Regression: HR 2,34; 95%KI 1,43-3,83; p=0,001). Patient*innen mit normaler und abnormaler FLC κ/λ -Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose weisen keine Differenz im PFS auf.

Eine hoch abnormale Ig κ/λ HLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose erhöht das Risiko für einen Progress um das 2,16-fache im Vergleich zu einer normaler oder abnormalen Ratio (Cox-Regression: HR 2,16; 95%KI 1,23-3,80; p=0,007). Dasselbe gilt für eine involved/uninvolved Ratio größer oder gleich dem Median (Cox-Regression: HR 2,16; 95%KI 1,26-3,70; p=0,005).

Nach Induktionstherapie hat der MRD-Status keinen Einfluss auf das Progressionsrisiko. Eine abnormale FLC κ/λ -Ratio nach Induktionstherapie erhöht das Progressionsrisiko an stärksten um das 2,40-fache (Cox-Regression: HR 2,40; 95%KI 2,47-3,94; p=0,001). Mit einem 2,26-fach erhöhten Progressionsrisiko folgt eine hoch abnormale Ig κ/λ HLC-Ratio im Vergleich zur normalen oder abnormalen Ratio (Cox-Regression: HR 2,26; 95%KI 1,27-4,02; p=0,005), während eine PR oder schlechter zum selben Zeitpunkt das Risiko für einen Progress um das 1,86-fache erhöht (Cox-Regression: HR 1,86; 95%KI 1,15-2,99; p=0,011). Die Risikoerhöhung durch eine involved/uninvolved Ratio größer oder gleich dem Median liegt zu diesem Zeitpunkt bei 1,81 (Cox-Regression: HR 1,81; 95%KI 1,06-3,11; p=0,031). Eine abnormale uninvolved HLC zeigt keine signifikante Risikoerhöhung im Vergleich zu einer normalen uHLC.

Nach HDT/ASCT zeigt sich unter Patient*innen mit PR oder schlechter im Vergleich zu denjenigen mit VGPR oder besser keine signifikante Erhöhung des Progressionsrisikos. Ebenso weisen zu diesem Zeitpunkt Patient*innen mit normaler und abnormaler FLC κ/λ -Ratio keine Differenz im PFS auf. Eine hoch abnormale oder abnormale Ig κ/λ HLC-Ratio weist im Vergleich zur normalen Ratio das höchste Risiko für einen Progress auf (Cox-Regression: HR 2,32; 95%KI 1,24-4,34; $p=0,008$). Eine abnormale uHLC nach HDT/ASCT erhöht das Risiko für einen Progress um das 2,13-fache (Cox-Regression: HR 2,13; 95%KI 1,15-3,93; $p=0,016$). Die Risikoerhöhung durch eine involved/uninvolved Ratio größer oder gleich dem Median liegt zu diesem Zeitpunkt bei 1,94 (Cox-Regression: HR 1,94; 95%KI 1,08-3,48; $p=0,027$).

5. DISKUSSION

5.1 Übertragbarkeit der Ergebnisse

Die Häufigkeit der IgG- und IgA-Myelome und ihrer Subtypen im hier beobachteten Kollektiv stimmt sehr gut mit der typischen Verteilung überein, die beispielsweise von Bradwell et al. in ihrer Studie aus dem Jahr 2013 beschrieben wird.

(Bradwell et al., 2013; Tabelle 1)

Andere Myelom-Typen wurden nicht eingeschlossen.

Das beobachtete Kollektiv besteht zu gleichen Teilen aus Patient*innen beider Behandlungsarme, sodass wir davon ausgehen, dass der Einfluss der unterschiedlichen Induktionstherapie-Schemata auf das Outcome ausgeglichen wird und die Therapie in den folgenden Analysen nicht weiter beachtet wird.

Das mittlere Alter bei Erstdiagnose liegt bei dem beobachteten Patient*innenkollektiv aufgrund der Einschlusskriterien der DSMM XIV-Studie mit etwa 55 Jahren fast 20 Jahre niedriger als in der Gesamtpopulation der Erkrankten, die das Robert-Koch-Institut beschreibt. Zudem besteht eine leichte Unausgewogenheit zu Gunsten der männlichen Patienten im Vergleich mit den Daten des Robert-Koch-Institutes.

(Robert-Koch-Institut, 2017; S. 124)

Letzteres ist vermutlich auf eine zufällige Stichprobenverzerrung zurückzuführen oder aber es gab in der Studienpopulation bereits ursprünglich mehr männliche Patienten. Da es sich allerdings nur um eine Abweichung von 8% handelt, sehen wir keine Einschränkung der Übertragbarkeit.

In einer vergleichbaren Studie von Ludwig et al. aus dem Jahr 2013 liegt die Verteilung der Patient*innen auf die ISS-Stadien in einem ähnlichen Bereich wie im hier beobachteten Kollektiv, wobei sich in ihrer Studie etwas mehr Patient*innen im ISS-Stadium III befinden.

(Ludwig et al., 2013; Tabelle 1)

Die Verteilung der rISS-Stadien laut der Publikation von Palumbo et al. aus dem Jahr 2015 stimmt gut mit der bei unserem Kollektiv beobachteten Verteilung überein.

(Palumbo et al., 2015; S.2865)

Die prozentuale Verteilung der Patient*innen auf die verschiedenen Diagnosestadien ist in der Literatur sehr variabel, was sich vorrangig mit den unterschiedlichen

Einschlusskriterien der Studien erklären lässt. Daher sehen wir hierdurch keine zusätzliche Einschränkung der Übertragbarkeit gegeben.

Die Häufigkeit von zytogenetischen Anomalien im untersuchten Kollektiv entspricht in etwa der, die auch Sonneveld et al. in ihrer Studienpopulation beobachten. Besonders die Häufigkeit von Hochrisiko-Zytogenetik stimmt gut überein (t(14/16) 4,6 vs. 4%; t(14/20) 15,8% vs. 15%; del(17p) 10,1% vs. 7%). Allerdings ist die Häufigkeit einer IgH-Translokation in unserem Kollektiv mit 53,5% höher als die 40% aus der vergleichbaren Studie.

(Sonneveld et al., 2016; Tabelle 1)

Auch hierfür kommt erklärend sowohl eine zufällige Stichprobenverzerrung als auch ein bereits vorbestehender höherer Anteil von Patient*innen mit zytogenetischen Anomalien in der Studienpopulation in Frage. Hierfür möchten wir auf die ausstehenden Ergebnisse der DSMM XIV-Studie verweisen.

Ein höherer Anteil an Hochrisiko-Zytogenetik könnte sich in einer verkürzten Lebenserwartung der Patient*innen widerspiegeln, was aber nicht der Fall ist:

In einer vergleichbaren Studie von Attal et al. aus dem Jahr 2017 zeigten Patient*innen nach drei Zyklen RVD und HDT/ASCT und Erhaltungstherapie mit 50 Monaten ein ganz ähnliches medianes PFS wie unser Studienkollektiv (Attal et al., 2017; S.6).

Für aussagekräftigere Überlebenszeitanalysen insbesondere bezogen auf die Therapie möchten wir auf die ausstehenden Ergebnisse der DSMM XIV-Studie verweisen, da dies nicht Teil unserer Fragestellung ist. An dieser Stelle soll die Kaplan-Meier-Analyse der Beschreibung der Kohorte und der Plausibilitätskontrolle der Daten dienen, die wir unter Beachtung der oben genannten Einschränkungen als gegeben ansehen.

Zusammenfassend lassen sich unsere Ergebnisse auf jüngere, transplantations-geeignete Patient*innen mit IgG- oder IgA-Myelom übertragen.

5.2 Zuverlässigkeit der Datenerhebung

Die Bestimmung der HLC des jeweils involvierten Immunglobulins erfolgte bei einem sehr guten Anteil von über 60% der eingeschlossenen Patient*innen zu mindestens einem Zeitpunkt und bei knapp über 40% sogar zu allen drei Zeitpunkten.

Unter den eingeschlossenen Patient*innen mit IgG-Myelomen wurde die IgA HLC und denen mit IgA-Myelomen die IgG HLC bei einem niedrigen, aber tolerablen Anteil von

jeweils circa 12-22% gemessen. Die IgM HLC wurde mit circa 6-12% noch seltener bestimmt und daher nicht verwendet. Mit zunehmender Zeit nimmt der Anteil der gemessenen HLCs jeweils ab.

Die Gründe, warum bei einigen Patient*innen keine Probenentnahme erfolgte oder nicht alle HLCs bestimmt wurden, sind nicht dokumentiert und somit für uns nicht nachvollziehbar. Die fehlenden Messungen lassen sich durch die zusätzliche Arbeit der Probenentnahme, Versendung und Weiterverarbeitung in der zeitlich knapp bemessenen, klinischen Routine ohne damaligen zusätzlichen Nutzen erklären. Möglich wäre jedoch auch eine Verzerrung der Stichprobe, wenn beispielsweise nur besonders Gesunde oder Kranke die zusätzliche Blutabnahme erhielten. Wir gehen jedoch davon aus, dass die Testung rein zufällig erfolgte.

5.3 Abbildung des klonalen Immunglobulins durch das Heavy Light Chain Assay

Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen 3,6% (6/166) der Patient*innen mit IgG-Myelom und 0,6% (1/60) der Patient*innen mit IgA-Myelom eine normale Ig κ/λ HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins auf. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Scudla et al. überein, bei denen sogar bei bis zu 8% der Patient*innen eine normale HLC-Ratio bei Diagnosestellung vorlag (Scudla et al., 2016; S. 86ff).

Damit ist eine Diagnosestellung aufgrund der Ergebnisse des Heavy Light Chain Assays allein nicht möglich.

Es gibt jedoch Studien, die gegenteilige Beobachtungen gemacht haben, die wir in Kapitel 2.3.4.1 vorstellen.

Im Verlauf der Therapie nimmt entsprechend unserer Erwartungen der Anteil der Patient*innen mit hoch abnormaler κ/λ HLC-Ratio stark ab, während sich der Anteil mit normaler und abnormaler κ/λ HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins erhöht. Unter den Patient*innen mit IgA-Myelom haben mehr eine hoch abnormale IgA HLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose und mehr eine normale IgA HLC-Ratio nach HDT/ASCT als Patient*innen mit IgG-Myelom zu denselben Zeitpunkten.

Es kann als Zeichen des Therapieansprechens gedeutet werden, wenn weniger klonale Immunglobuline oder vermehrt polyklonale Immunglobuline gebildet werden. Das sollte jedoch anhand der Response und des PFS überprüft werden, was wir im Folgenden tun.

5.4 Heavy Light Chain Assay im Vergleich zu konventionellen Methoden

5.4.1 Heavy Light Chain Assay und SPE im Vergleich

Es gibt Patient*innen mit sekretorischem Myelom, das sich in der Serum-IFE darstellt, aber in der SPE unentdeckt bleibt. Dies kommt unter den IgA-Myelomen häufiger vor als unter den IgG-Myelomen, was sich auch in unserer Kohorte bestätigt (10,3% vs. 1,9%).

Ein Vergleich mit der IFE ist in unserer Kohorte leider nicht möglich. Die IFE ist zum Zeitpunkt der Diagnose bei allen unsere Patient*innen positiv, was daran liegt, dass wir nur sekretorische Myelome mit eindeutig bestimmtem IgA- oder IgG-Myelom eingeschlossen haben. Daher unterliegen unsere Ergebnisse diesbezüglich einer Einschränkung der Übertragbarkeit.

Vor dem Hintergrund dieser Einschränkungen können wir die Annahme von Boyle et al. unterstützen.

(Boyle et al., 2014; S. 3953-3956)

Laut unseren Ergebnissen ist das Heavy Light Chain Assay mit einer Sensitivität von 0,98 die sensitivere Methode ist ein IgA-Myelom zu diagnostizieren als die SPE mit einer Sensitivität von 0,77. Die Bestimmung der κ/λ HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins ist der alleinigen Bestimmung der iHLC in der Sensitivität bei der Diagnostik überlegen.

5.4.2 Heavy Light Chain Assay und Diagnose-Stadien im Vergleich

In unserer Studie haben Patient*innen mit IgA-Myelom oder IgG-Myelom im ISS-Stadium I eine signifikant niedrigere x HLC-Ratio als solche im Stadium II und III.

Im erweiterten r-ISS Staging-System, das die Höhe der LDH und die Zytogenetik mit einschließt, lässt sich für beide Myelom-Typen eine signifikant niedrigere x HLC-Ratio im Stadium I im Vergleich zum Stadium III finden. Die Stärke dieses Effektes ist bei Patient*innen mit IgA-Myelomen mittel bis stark und solchen mit IgG-Myelomen eher schwach bis mittel stark ausgeprägt.

Dieser Unterschied zeigt sich auch in der Anzahl an Patient*innen mit normalen, abnormalen und hoch abnormalen κ/λ HLC-Ratios des jeweils involvierten Immunglobulins. Hier ist mindestens die Hälfte der Patient*innen mit normaler x HLC-

Ratio im (r-)ISS-Stadium I. Zudem haben die Patient*innen im (r-)ISS-Stadium I mehrheitlich eine normale oder abnormale Ig κ/λ HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins, während solche im Stadium II oder III mehrheitlich eine hoch abnormale Ratio aufweisen. Diesen Effekt sieht man, wie entsprechend der beobachteten Unterschiede bezüglich der κ/λ HLC-Ratio erwartet, bei IgA-Myelomen stärker als bei IgG-Myelomen.

Eine Erklärung hierfür wäre, dass fortgeschrittene oder besonders aggressive Myelome vermehrt klonales Immunglobulin sezernieren. Andere Aspekte der Erkrankung, die zusätzlich zur Bestimmung des M-Proteins als Größen wie Albumin, β_2 -Mikroglobulin und LDH in die Diagnose-Stadien einfließenden, sind durch die genauere Bestimmung des klonalen Immunglobulins mittels Heavy Light Chain Assay und die Einberechnung des polyklonalen Anteils als Ratio wie zu erwarten nicht erfasst. Daher ist die Trennschärfe der HLC-Ratio für sich genommen nicht ausreichend, um eine eindeutige Zuordnung zum den Diagnose-Stadien vorzunehmen.

Wir beobachten zudem wie erwartet, dass das Risiko für einen Progress bei einem (r-) ISS-Stadium II oder III im Vergleich zum Stadium I deutlich höher ist als zwischen den durch den Heavy Light Chain Assay gebildeten Risikogruppen zu demselben Zeitpunkt. Hier wäre es interessant zu überprüfen, ob in unserer Kohorte die HLC-Ratio die (r-) ISS bezüglich ihrer prognostischen Aussagekraft bezüglich PFS übertrifft, worauf wir aufgrund der niedrigen Fallzahlen in den einzelnen Gruppen verzichtet haben.

5.4.3 Heavy Light Chain Assay und Free Light Chain Assay im Vergleich

Die Häufigkeit einer normalen FLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose bei unserem Kollektiv stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit für Myelome mit intaktem M-Protein überein.

Zugleich zeigt nicht jede*r Patient*in mit abnormaler κ/λ HLC-Ratio des jeweils involvierten Immunglobulins auch eine abnormale κ/λ FLC-Ratio oder umgekehrt, auch wenn sich eine ähnliche Tendenz zeigt:

Zum Zeitpunkt der Diagnose zeigt der Großteil der Patient*innen sowohl eine abnormale FLC Ratio als auch eine (hoch) abnormale κ/λ HLC-Ratio. Im Laufe der Therapie erhöht sich der Anteil der Patient*innen mit normaler κ/λ FLC-Ratio, wobei

nach HDT/ASCT davon über die Hälfte der Patient*innen ebenfalls eine normale κ/λ HLC-Ratio aufweisen.

Es besteht eine signifikant niedrigere κ/λ HLC-Ratio bei Patient*innen mit normaler FLC-Ratio als bei solchen mit abnormaler FLC-Ratio. Dies gilt für Patient*innen mit IgG-Myelom zu allen Zeitpunkten und bei solchen mit IgA-Myelom nach Induktionstherapie, sowie nach HDT/ASCT.

Auch Scudla et al. beschreiben einen statistisch signifikanten, wenn auch schwachen Zusammenhang zwischen erhöhter κ/λ HLC- und abnormaler κ/λ FLC-Ratio zum Zeitpunkt der Diagnose nur unter den IgG-Myelomen (Scudla et al., 2016; S.86ff).

Als Erklärung für den signifikanten Unterschied, den wir in unserer Kohorte auch unter IgA-Myelomen feststellen, kommt erneut die höhere Patient*innenzahl in Frage.

Der Zusammenhang zwischen FLC und HLC lässt sich - wie im Kapitel 2.2.2 diskutiert – mit der erhöhten Produktion von Leichtketten durch Myelome mit einer hohen Sekretion des klonalen Immunglobulins erklären (Willrich & Katzmann, 2016; S. 912f). Dennoch bestätigen unsere Ergebnisse, dass das Free Light Chain Assay und das Heavy Light Chain Assay nicht denselben Aspekt abbilden und legen nahe, dass die HLC-Ratio als Prognosefaktor eine sinnvolle Ergänzung nicht anstelle, sondern zusätzlich zur FLC-Ratio bei der Response-Analyse sein könnte.

Nach Induktionstherapie erhöht eine abnormale FLC κ/λ HLC-Ratio das Risiko für einen Progress stärker als eine hoch abnormale Ig κ/λ HLC-Ratio, insofern ist zu diesem Zeitpunkt eine Überlegenheit der Free-Light-Chain-Messung möglich.

Nach HDT/ASCT zeigt nur die Heavy-Light-Chain-Messung einen Einfluss auf das Progressionsrisiko, das Free Light Chain Assay nicht mehr. Dies sollte unbedingt in der Diskussion, ob das Heavy Light Chain Assay die Response-Kategorien ergänzen kann, Eingang finden.

Eine gewisse Limitation ist die fehlende Information über die Nierenfunktion zum jeweiligen Zeitpunkt, weswegen wir einen etwas größeren Bereich als normale κ/λ FLC-Ratio verwendet haben (0,26-3,10 statt 0,36-1,66). Dies führt zu ungenauen Ergebnissen geführt haben, da Patient*innen ohne Niereninsuffizienz mit einer FLC-Ratio zwischen 0,26 und 0,36 und Patient*innen ohne Niereninsuffizienz mit einer FLC-Ratio zwischen 1,66 und 3,10 als fälschlicherweise als normal klassifiziert wurden.

5.4.4 Heavy Light Chain Assay und Responsekategorien im Vergleich

Die Häufigkeiten von normaler, abnormaler und hoch abnormaler κ/λ HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins je nach Response nach Induktionstherapie und HDT/ASCT entspricht unseren Erwartungen unter der Annahme, dass das Heavy Light Chain Assay die Tumorlast abbildet. So ist deutlich zu sehen, dass schlechtere Response-Kategorien einen niedrigeren Anteil an Patient*innen mit normaler HLC-Ratio aufweisen und sich der Anteil an Patient*innen mit normaler HLC-Ratio unter denen mit VGPR oder besser im Verlauf der Therapie erhöht.

Insbesondere möchten wir darauf hinweisen, dass unter den IgG- und IgA-Myelomen keine*r der Patient*innen mit sCR/CR nach Induktionstherapie, sowie mit sCR/CR oder VGPR nach HDT/ASCT noch eine hoch abnormale HLC-Ratio zeigen.

Dennoch zeigt auch ein nicht zu vernachlässigender Anteil an Patient*innen mit VGPR oder schlechter ebenfalls eine normale HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins.

Der Median der x HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins ist unter den Patient*innen mit VGPR oder besser signifikant niedriger als bei Patient*innen mit einer schlechteren Response. Dies trifft für IgG-Myelome nach Induktionstherapie und nach HDT/ASCT zu, wobei der Effekt im Verlauf stärker wird.

Für IgA-Myelome trifft dies nur nach Induktionstherapie zu. Nach HDT/ASCT ist der Unterschied zwischen VGPR und niedrigerer Response bei Patient*innen mit IgA-Myelom nicht mehr signifikant, was vermutlich an der kleinen Fallzahl an Patient*innen mit einer Response <VGPR liegt.

Passend zu unseren Ergebnissen beschreiben Harutyunyan et al. signifikante Unterschiede in der Höhe der x HLC-Ratio zum Zeitpunkt des Response-Assessment, jedoch zwischen den Patient*innen mit PD, PR und CR jeweils im Vergleich.

(Harutyunyan et al., 2016; S. 84f)

Ludwig et al. finden einen signifikanten Unterschied der Höhe der x HLC-Ratio sortiert nach bester Responsekategorie, der sich zum Zeitpunkt der Diagnose noch nicht manifestiert. (Ludwig et al., 2013; S. 214f)

Die Betrachtung von Ludwig et al. sind wichtig, aber in der klinischen Praxis wenig praktikabel, da in der Therapie von Patient*innen der Zeitpunkt der besten Response erst im Nachhinein bestimmt werden kann.

Auf Basis unserer Beobachtungen stellt sich uns die Frage, ob das Heavy Light Chain Assay innerhalb der Response-Kategorien eine prognostische Aussagekraft bezüglich des PFS hat. Auf diese Untersuchung haben wir aufgrund der niedrigen Fallzahlen in den jeweiligen Gruppen verzichtet. Michallet et al. haben für Patient*innen mit VGPR bereits gezeigt, dass das Heavy Light Chain Assay das bisher übliche Response-Assessment prognostisch ergänzen kann (Michallet et al., 2018; S. 377ff).

Eine hoch abnormale Ig κ/λ HLC-Ratio nach Induktionstherapie erhöht das Risiko für einen Progress im Vergleich zur normalen oder abnormalen Ratio stärker als eine PR oder schlechter im Vergleich zur VGPR oder besser zum selben Zeitpunkt. Dies sollte ebenfalls Anstoß zu einer Ergänzung der Responsekategorien um das Heavy Light Chain Assay als Prognosefaktor geben. Wir empfehlen, dieser Fragestellung weiter nachzugehen.

Dass die Response nach HDT/ASCT keinen Einfluss auf das Progressionsrisiko zu haben scheint, führen wir auf eine zu grobe Zusammenfassung der Gruppen zurück, ein Vergleich (s)CR versus VGPR versus PR oder schlechter wäre zu diesem Zeitpunkt vermutlich zielführender gewesen.

5.5 Heavy Light Chain Assay und Flow-MRD im Vergleich

Entsprechend unserer Annahme, dass eine Resterkrankung auch vermehrt klonale Immunglobuline produziert und die Produktion polyklonaler Immunglobuline unterdrückt, ist der Anteil an Patient*innen mit (hoch) abnormaler HLC κ/λ -Ratio unter den MRD-positiven Patient*innen mit IgG- und IgA-Myelom nach Induktionstherapie deutlich höher als der Anteil mit normaler HLC κ/λ -Ratio zum selben Zeitpunkt.

Der Zusammenhang zwischen κ/λ HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins und MRD-Status nach Induktionstherapie ist jedoch in unserer Studienpopulation nur bei IgG-Myelomen signifikant, aber auch dort schwach. Zudem weisen nach Induktionstherapie MRD-positive Patient*innen mit IgG- und IgA-Myelom eine signifikant höhere κ/λ -Ratio des involvierten Immunglobulins bei MRD-Positivität nach Induktionstherapie als MRD-Negative.

Dies passt zu den Ergebnissen der Studie von Suehara et al. (2014), dass unter den Patient*innen mit VGPR oder besser nach Induktionstherapie diejenigen mit normaler HLC-Ratio eine geringere Anzahl an klonalen Plasmazellen in der

Durchflusszytometrie zeigen als bei diejenigen mit abnormaler HLC-Ratio, auch wenn der Trend nicht signifikant ist (Suehara et al., 2014).

Schließt man die Response-Stadien in die Betrachtungen mit ein, so haben wie erwartet der größte Teil der MRD-positiven Patient*innen eine schlechtere Response als VGPR und hätten somit in der klinischen Routine keine MRD-Bestimmung erhalten.

Campbell et al. (2016) beschrieben in ihrer Studie, dass eine Normalisierung der FLC-Ratio und der HLC-Ratio mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 82% für eine MRD-Negativität sprechen (Campbell et al., 2016).

Bemerkenswert finden wir, dass in unserer Kohorte sowohl unter den Patient*innen mit IgG-, als auch denen mit IgA-Myelom, kein*e Patient*in mit negativem MRD-Status nach Induktionstherapie noch eine hoch abnormale HLC κ/λ -Ratio aufweist. Im Umkehrschluss kann dies für die klinische Routine bedeuten, dass man sich bei Patient*innen mit hoch abnormale HLC κ/λ -Ratio möglicherweise eine zeit-, personal- und kostenaufwendige MRD-Diagnostik sparen kann. Im Stadium VGPR sind dies immerhin zwei Patient*innen.

Dies sollte unbedingt in weiteren Studien und zu anderen Zeitpunkten, wie nach HDT/ASCT überprüft werden.

Wie im Kapitel 2.2.6 besprochen, beschreiben sowohl Lahuerta et al. (2017) und Paiva et al. (2008) den MRD-Status in ihren Studien als unabhängigen prognostischen Risikofaktor für das PFS und OS.

Einschränkend ist zu nennen, dass in unserer Kohorte eine solche Risikoerhöhung durch einen positiven MRD-Status nach Induktionstherapie nicht zu beobachten ist. Dies führen wir auf die relativ kleine Zahl von innen MRD-negativen Patient*innen zurück.

Zudem lag uns für unsere Untersuchungen der MRD-Status nur nach Induktionstherapie und nicht zusätzlich zu einem anderen Zeitpunkt vor. Dieser Zeitpunkt befindet sich relativ nah am Ende der Induktionstherapie, sodass die Erfolge derselben gegebenenfalls noch nicht vollständig eingetreten sind.

Ob eine (hoch) abnormale κ/λ HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins, sich im PFS je nach MRD-Status niederschlägt, untersuchen wir im Folgenden.

5.6 Häufigkeit der Isotypensuppression im Heavy Light Chain Assay

Die Höhe der HLCs im Verlauf der Therapie entspricht unseren Erwartungen unter der Annahme, dass das Heavy Light Chain Assay mit einer Supprimierung der nicht involvierten HLC des involvierten Immunglobulins die Tumorlast abbildet.

Die nicht involvierte HLC ist bei der Mehrheit der Patient*innen, beziehungsweise dem größten Anteil der Patient*innen mit IgA λ -Myelom zum Zeitpunkt der Diagnose stark supprimiert. Dieser Anteil sinkt im Verlauf der Therapie unterschiedlich stark, bis circa die Hälfte jeweils eine normale HLC aufweist. Insgesamt ist der Anteil mit supprimierter HLC unter den Patient*innen mit IgG-Myelom höher als unter denen mit IgA-Myelom. Dies stimmt mit den Beobachtungen der in Kapitel 2.3.4.2 besprochenen Studie von Ludwig et al. überein, wobei dort beschriebene Häufigkeit von starker Isotypensuppression (IgG 56% vs. IgA 48%) unter der von uns gefundenen liegt.

(Ludwig et al., 2016; S. 296-300)

Ob die hier beschriebenen Beobachtungen eine prognostische Relevanz haben, werden wir weitergehend untersuchen.

Mögliche Ursachen für die Isotypensuppression haben wir im Kapitel 2.3.4.3 diskutiert. Eine interessante Frage ist, was in der Tumorbilogie der IgG-Myelome zu einer stärkeren Isotypensuppression führt.

Wir empfehlen, den kausalen Zusammenhang zwischen PFS und Isotypensuppression weitergehend zu untersuchen. Denkbar wäre beispielsweise ein erhöhtes Risiko von Infektionen und Hospitalisierungen.

5.7 Überlebenszeitanalysen verschiedener Aspekte des Heavy Light Chain Assays

5.7.1 Überlebenszeitanalyse gruppiert nach HLC-Ratio

Zu allen drei untersuchten Zeitpunkten, zeigt sich bei solchen Patient*innen mit niedrigerer Klassifikation der κ/λ HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins ein längeres PFS. Unterteilt nach Höhe ^xHLC-Ratio findet sich bei den Patient*innen mit ^xHLC-Ratio unter dem Median zu allen drei Zeitpunkten ein signifikant längeres PFS als bei denen mit ^xHLC-Ratio größer oder gleich dem Median.

Unsere Beobachtungen passen zu den Ergebnissen der in Kapitel 2.3.4 vorgestellten Studien von Bradwell et al. (2013), Ludwig et al. (2013) und Koulieris et al. (2012),

dass das Heavy Light Chain Assay alleine eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit eines Progress ermöglicht. Durch die Erhebung der Daten zu festgelegten Zeitpunkten innerhalb der Therapie bestätigen aber auch die klinische Relevanz dieser Beobachtungen. Ob dies sich auch zu späteren Zeitpunkten in der Therapie noch darstellt, ist weitergehend zu prüfen.

Eine Überlegenheit einer der beiden Berechnungsmöglichkeiten der HLC-Ratio für diese Fragestellung lässt sich aus den Ergebnissen nicht ableiten.

Jedoch ist das Risiko für einen Progress einer abnormalen κ/λ HLC-Ratio im Vergleich zur (ab)normalen Ratio stets höher, als bei einer x HLC-Ratio größer oder gleich dem Median im Vergleich zur x HLC-Ratio unter dem Median, was auf eine leichte Überlegenheit der κ/λ Klassifikation hindeutet.

5.7.2 1 Überlebenszeitanalyse gruppiert nach Isotypensuppression

Eingeteilt nach Vorhandensein von Isotypensuppression der nicht involvierten HLC findet sich nach Induktionstherapie ein nicht signifikanter Unterschied und nach HDT/ASCT ein signifikanter Unterschied im PFS zwischen Patient*innen mit normaler und solchen mit supprimierter nicht involvierter HLC des involvierten Immunglobulins. Passend hierzu erhöht eine abnormale uHLC nach HDT/ASCT, aber nicht nach Induktionstherapie, das Risiko für einen Progress signifikant.

Wie in Kapitel 2.3.4 besprochen, fanden Ludwig et al. (2016) und Harutyunyan et al. (2016) bereits signifikante Unterschiede im PFS, bzw. OS je nach Isotypensuppression. Unsere Beobachtung legt jedoch nahe, dass sich die Relevanz der Isotypensuppression des nicht involvierten HLC zu verschiedenen Zeitpunkten unterscheidet. Als Erklärung für die fehlende Signifikanz nach Induktionstherapie kommt erneut die Nähe zum Ende der letzten Therapie in Frage, innerhalb derer sich das Immunsystem noch nicht reaktiviert hat. Wie sich der Unterschied im PFS je nach Vorhandensein von Isotypensuppression zu späteren Zeitpunkten der Therapie verhält, sollte weitergehend geprüft werden.

5.7.3 Überlebenszeitanalyse je nach MRD-Status

Unter den MRD-positiven Patient*innen nach Induktionstherapie besteht ein längeres PFS je niedrigerer die κ/λ HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins zum selben Zeitpunkt ist. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Unter den MRD-positiven Patient*innen stellen wir keinen Unterschied im PFS zwischen den Gruppen fest, wobei hier die geringe Fallzahl der Gruppen als Erklärung in Frage kommt.

Die oben gestellte Frage, ob das Heavy Light Chain Assay den MRD-Status prognostisch ergänzen kann, ist also eher negativ zu beantworten. Dies sollte weitergehend zu anderen Zeitpunkten wie nach HDT/ASCT geprüft werden.

5.8 Vorteile und Limitationen der Arbeit

Folgende Limitationen unserer Studie sind zu nennen:

1. Durch die Einschluss- und Ausschlusskriterien der DSM XIV-Studie sind die Ergebnisse nur auf ASCT-geeignete Patient*innen aller Geschlechter zwischen 18 und 65 Jahren mit sekretorischen IgG- oder IgA-Myelom in First-Line-Therapie übertragbar.
2. Die Auswahl der untersuchten Patient*innen erfolgte im Sinne einer systematischen Stichprobenwahl nach Vorhandensein der HLC-Messung zu mindestens einem Zeitpunkt, was zu einer Stichprobenverzerrung führen kann. Dennoch repräsentiert unser Kollektiv die Gesamtheit der Erkrankten bezüglich der verglichenen Eigenschaften. Einschränkend sei allenfalls die leichte Überrepräsentation von Männern und Patient*innen mit zytogenetischen Anomalien genannt.
3. Weiterhin ist eine Ergebnisverzerrung innerhalb unseres Kollektivs möglich, da aufgrund klinischer Limitationen nicht von allen Patient*innen zu allen Zeitpunkten eine HLC-Messung durchgeführt wurde. Es wäre also denkbar, dass die Testung nur bei besonders gesunden oder kranken Patient*innen durchgeführt wurde, was die Übertragbarkeit einschränken würde. Da jedoch von circa zwei Drittel der Patient*innen eine Messung zu mindestens einem Zeitpunkt vorliegt, sehen wir die Daten dennoch als repräsentativ an. Dennoch liegt die wahre Anzahl der

untersuchten Patient*innen zu den einzelnen Zeitpunkten unter der Gesamtzahl im untersuchten Kollektiv, was bei der Auswertung Beachtung fand.

4. Die klinische Limitation macht sich auch in der Verlaufsbeobachtung bemerkbar, da besonders gegen Ende des Beobachtungszeitraums die Kohorte sehr klein wird, da gegen Ende zunehmend mehr Zensierungen durch ausgeschiedene Patient*innen vorlagen, was die Aussagekraft einschränkt.

Als Vorteile unserer Arbeit sind zu nennen:

1. Als Teil einer prospektiven, multizentrischen, randomisierten DSMM XIV-Studie erfolgte die Datenerhebung innerhalb eines sehr großen Kollektivs, das entsprechend aktuellster Therapie-Schemata behandelt und über einen langen Zeitraum hinweg beobachtet wurde.
2. Die Anzahl der beobachteten Patient*innen ist deutlich größer als in vorangegangenen, vergleichbaren Studien. Insbesondere die hohe Zahl der beobachteten Patient*innen mit IgA-Myelom ermöglichte, dass wir auch getrennte Untersuchungen für IgG- und IgA-Myelome durchführen konnten.
3. Die definierten Ein- und Ausschlusskriterien geben klar vor, auf welches Kollektiv die Ergebnisse unserer Arbeit übertragbar sind.
4. Die Induktionstherapie der Patient*innen erfolgte in zwei vergleichbaren Therapiearmen, auf die bei allen Patient*innen eine HDT/ASCT folgte. Dies schließt eine Verzerrung durch unterschiedliche Therapieschemata weitgehend aus.
5. In diesem Rahmen der DSM XIV-Studie wurden weitere Parameter wie beispielsweise der MRD-Status mittels aktueller Messtechniken bestimmt, die wir in unsere Arbeit einfließen lassen konnten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Anhand unserer Ergebnisse empfehlen wir, dass der Hevylite®-Test einen Platz in der klinischen Routine erhält und als prognostischer Faktor zusätzlich zum Free Light Chain Assay in die Response-Kriterien integriert wird. Dabei scheint der Zeitpunkt des Response-Assessments für den zu verwendenden Test entscheidend zu sein. Dieser Vorschlag stützt sich darauf, dass in unserer Kohorte das Risiko für einen Progress nach HDT/ASCT nur bei einer (hoch) abnormalen HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins, nicht aber bei einer abnormalen FLC-Ratio signifikant erhöht wird. Für eine Ergänzung der bisherigen Kriterien spricht auch, dass das Heavy Light Chain Assay nach Induktionstherapie ein höheres Risiko für einen Progress vorhersagt, als das Response-Stadium zum selben Zeitpunkt.

Falls es sich in weiteren Studien und zu weiteren Zeitpunkten der Therapie bestätigt, dass alle Patient*innen mit hoch abnormaler κ/λ HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins einen positiven Status in der Flow-MRD-Analyse haben, könnte man durch den Hevylite®-Test bei einigen Patient*innen auf die meist schmerzhafteste Knochenmarkaspiration und die aufwendige MRD-Diagnostik verzichten.

Eine ergänzende Diagnostik mit dem Heavy Light Chain Assay im Fall, dass die SPE zur Diagnosestellung negativ ist, erscheint uns vor dem Hintergrund unserer Beobachtungen im klinischen Kontext sinnvoll. Entgegen anderer Studien lassen unsere Ergebnisse jedoch keine Diagnosestellung mithilfe des Heavy Light Chain Assays allein zu, da einige Patient*innen zum Zeitpunkt der Diagnose eine normale HLC κ/λ -Ratio des involvierten Immunglobulins aufweisen.

Desweiteren konnten wir den Unterschied im PFS je nach Höhe der κ/λ HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins, sowie nach Suppression der nicht involvierten HLC in unserer Kohorte bestätigen. Die Relevanz der Isotypensuppression legt nahe, dass die Tumorlast und die Schwere der Erkrankung im Heavy Light Chain Assay weniger durch die Höhe des monoklonalen Immunglobulin dargestellt wird, als vielmehr durch das Zusammenspiel aus diesem und der Wirkung des Myeloms auf das gesamte Immunsystem.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Arastéh, K., Baenkler, H., Bieber, C., Brandt, R., Chatterjee, T., Dill, T., . . . Zipfel, S. (2013). *Innere Medizin* (3th ed.): Thieme.
- Attal, M., Lauwers-Cances, V., Hulin, C., Leleu, X., Caillot, D., Escoffre, M., . . . Study, I. F. M. (2017). Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med*, *376*(14), 1311-1320. doi:10.1056/NEJMoa1611750
- Bergsagel, P. L., & Kuehl, W. M. (2005). Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol*, *23*(26), 6333-6338. doi:10.1200/JCO.2005.05.021
- BindingSite®. (2017). Freelite®and Hevylite®. Retrieved 25.05.2017, from The Binding Site Group Ltd. <https://www.bindingsite.com/de-de/our-products/freelite-and-hevylite>
- Boyle, E. M., Fouquet, G., Guidez, S., Bonnet, S., Demarquette, H., Dulery, R., . . . Leleu, X. (2014). IgA kappa/IgA lambda heavy/light chain assessment in the management of patients with IgA myeloma. *Cancer*, *120*(24), 3952-3957. doi:10.1002/cncr.28946
- Bradwell, A., Harding, S., Fourrier, N., Mathiot, C., Attal, M., Moreau, P., . . . Avet-Loiseau, H. (2013). Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig'kappa/Ig'lambda ratios in multiple myeloma patients. *Leukemia*, *27*(1), 202-207. doi:10.1038/leu.2012.159
- Campbell, L., Panitsas, F., Basu, S., Anyanu, F., Lee, S., Ferry, B., & Ramasamy, K. (2016). Hevylite and Freelite Normalisation Is a Surrogate Marker for MRD Negativity Post-ASCT *Blood*, *128*(22). doi:10.1182/blood.V128.22.4633.4633
- Dimopoulos, M., Kyle, R., Fermand, J. P., Rajkumar, S. V., San Miguel, J., Chanan-Khan, A., . . . Jagannath, S. (2011). Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*, *117*(18), 4701-4705. doi:10.1182/blood-2010-10-299529
- Dispenzieri, A., Kyle, R., Merlini, G., Miguel, J. S., Ludwig, H., Hajek, R., . . . Durie, B. G. (2009). International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*, *23*(2), 215-224. doi:10.1038/leu.2008.307
- Durie, B. G. (2006 (1)). The role of anatomic and functional staging in myeloma: description of Durie/Salmon plus staging system. *Eur J Cancer*, *42*(11), 1539-1543. doi:10.1016/j.ejca.2005.11.037
- Durie, B. G., Harousseau, J. L., Miguel, J. S., Blade, J., Barlogie, B., Anderson, K., . . . Rajkumar, S. V. (2006 (2)). International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, *20*(9), 1467-1473. doi:10.1038/sj.leu.2404284
- Durie, B. G., & Salmon, S. E. (1975). A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*, *36*(3), 842-854.
- Einsele, H., & Knop, S. (2012). Studiendatenbank des CCC Mainfranken. Retrieved 05.08.2019, from Comprehensive Cancer Center Mainfranken ccstudienuebersicht.ukwuerzburg.de/external/studydetails?studyId=414&indicationId=5&page=20&appKey=
- Einsele, H., & Knop, S. (2015). *Study Protocoll DSMM XIV - Version 7.0 (confidential)*.
- Flores-Montero, J., Sanoja-Flores, L., Paiva, B., Puig, N., Garcia-Sanchez, O., Bottcher, S., . . . Orfao, A. (2017). Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*, *31*(10), 2094-2103. doi:10.1038/leu.2017.29
- Gerecke, C., Fuhrmann, S., Striffler, S., Schmidt-Hieber, M., Einsele, H., & Knop, S. (2016). Diagnostik und Therapie des Multiplen Myeloms. *Deutsches Ärzteblatt*, *113*, 470-476.

- Giannopoulos, K., Kaminska, W., Hus, I., & Dmoszynska, A. (2012). The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: detailed characterisation of immune status in multiple myeloma. *Br J Cancer*, *106*(3), 546-552. doi:10.1038/bjc.2011.575
- Gorgun, G. T., Whitehill, G., Anderson, J. L., Hideshima, T., Maguire, C., Laubach, J., . . . Anderson, K. C. (2013). Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood*, *121*(15), 2975-2987. doi:10.1182/blood-2012-08-448548
- Greipp, P. R., San Miguel, J., Durie, B. G., Crowley, J. J., Barlogie, B., Blade, J., . . . Westin, J. (2005). International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, *23*(15), 3412-3420. doi:10.1200/jco.2005.04.242
- Hari, P. N., Zhang, M. J., Roy, V., Perez, W. S., Bashey, A., To, L. B., . . . Vesole, D. (2009). Is the International Staging System superior to the Durie-Salmon staging system? A comparison in multiple myeloma patients undergoing autologous transplant. *Leukemia*, *23*(8), 1528-1534. doi:10.1038/leu.2009.61
- Harutyunyan, N. M., Vardanyan, S., Ghermezi, M., Gottlieb, J., Berenson, A., Andreu-Vieyra, C., & Berenson, J. R. (2016). Levels of uninvolved immunoglobulins predict clinical status and progression-free survival for multiple myeloma patients. *Br J Haematol*, *174*(1), 81-87. doi:10.1111/bjh.14026
- Herold, G. (2017). *Innere Medizin*.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., & Shlomshik, M. (2002). *Immunologie* (5th ed.): Spektrum.
- Kapoor, P., Kumar, S. K., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Buadi, F., Dingli, D., . . . Gertz, M. A. (2013). Importance of achieving stringent complete response after autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma. *J Clin Oncol*, *31*(36), 4529-4535. doi:10.1200/jco.2013.49.0086
- Kastritis, E., Zagouri, F., Symeonidis, A., Roussou, M., Sioni, A., Pouli, A., . . . Dimopoulos, M. A. (2014). Preserved levels of uninvolved immunoglobulins are independently associated with favorable outcome in patients with symptomatic multiple myeloma. *Leukemia*, *28*(10), 2075-2079. doi:10.1038/leu.2014.110
- Katzmann, J. A., Willrich, M. A., Kohlhagen, M. C., Kyle, R. A., Murray, D. L., Snyder, M. R., . . . Dispenzieri, A. (2015). Monitoring IgA multiple myeloma: immunoglobulin heavy/light chain assays. *Clin Chem*, *61*(2), 360-367. doi:10.1373/clinchem.2014.231985
- Koulieris, E., Panayiotidis, P., Harding, S. J., Kafasi, N., Maltezas, D., Bartzis, V., . . . Kyrtonis, M. C. (2012). Ratio of involved/uninvolved immunoglobulin quantification by Hevylite assay: clinical and prognostic impact in multiple myeloma. *Exp Hematol Oncol*, *1*(1), 9. doi:10.1186/2162-3619-1-9
- Kumar, S., Paiva, B., Anderson, K. C., Durie, B., Landgren, O., Moreau, P., . . . Avet-Loiseau, H. (2016). International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, *17*(8), e328-e346. doi:10.1016/S1470-2045(16)30206-6
- Kyle, R. A., Child, J. A., Anderson, K., Barlogie, B., Bataille, R., Bensinger, W., . . . Keith Wheatley, U. o. B. (2003). Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*, *121*(5), 749-757.
- Kyle, R. A., & Rajkumar, S. V. (2009). Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, *23*(1), 3-9. doi:10.1038/leu.2008.291
- Lahuerta, J. J., Paiva, B., Vidriales, M. B., Cordon, L., Cedena, M. T., Puig, N., . . . San-Miguel, J. F. (2017). Depth of Response in Multiple Myeloma: A Pooled Analysis of Three

- PETHEMA/GEM Clinical Trials. *J Clin Oncol*, 35(25), 2900-2910. doi:10.1200/jco.2016.69.2517
- Lee, N., Moon, S. Y., Lee, J. H., Park, H. K., Kong, S. Y., Bang, S. M., . . . Lee, D. S. (2017). Discrepancies between the percentage of plasma cells in bone marrow aspiration and BM biopsy: Impact on the revised IMWG diagnostic criteria of multiple myeloma. *Blood Cancer J*, 7(2), e530. doi:10.1038/bcj.2017.14
- Ludwig, H., Milosavljevic, D., Berlanga, O., Zojer, N., Hubl, W., Fritz, V., & Harding, S. (2016). Suppression of the noninvolved pair of the myeloma isotype correlates with poor survival in newly diagnosed and relapsed/refractory patients with myeloma. *Am J Hematol*, 91(3), 295-301. doi:10.1002/ajh.24268
- Ludwig, H., Milosavljevic, D., Zojer, N., Faint, J. M., Bradwell, A. R., Hubl, W., & Harding, S. J. (2013). Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients. *Leukemia*, 27(1), 213-219. doi:10.1038/leu.2012.197
- Lüllmann-Rauch, R., & Paulsen, F. (2012). *Histologie* (4th ed.): Thieme.
- Michallet, M., Chapuis-Cellier, C., Dejoie, T., Lombard, C., Caillon, H., Sobh, M., . . . Avet-Loiseau, H. (2018). Heavy+light chain monitoring correlates with clinical outcome in multiple myeloma patients. *Leukemia*, 32(2), 376-382. doi:10.1038/leu.2017.209
- Muthu Raja, K. R., Rihova, L., Zahradova, L., Klinecova, M., Penka, M., & Hajek, R. (2012). Increased T regulatory cells are associated with adverse clinical features and predict progression in multiple myeloma. *PLoS ONE*, 7(10), e47077. doi:10.1371/journal.pone.0047077
- Neben, K. (2011). Labordiagnostik: Serumprotein-Elektrophorese (SPE) und Labordiagnostik: Immunfixations-Elektrophorese (IFE). Retrieved 24.05.2017 <http://www.onkodin.de/e2/e80834/e80980/e80981/e80994/> and <http://www.onkodin.de/e2/e80834/e80980/e80981/e81007/>
- Novak, A. J., Darce, J. R., Arendt, B. K., Harder, B., Henderson, K., Kindsvogel, W., . . . Jelinek, D. F. (2004). Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood*, 103(2), 689-694. doi:10.1182/blood-2003-06-2043
- Paiva, B., van Dongen, J. J., & Orfao, A. (2015). New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood*, 125(20), 3059-3068. doi:10.1182/blood-2014-11-568907
- Paiva, B., Vidriales, M. B., Cervero, J., Mateo, G., Perez, J. J., Montalban, M. A., . . . San Miguel, J. F. (2008). Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*, 112(10), 4017-4023. doi:10.1182/blood-2008-05-159624
- Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., Lokhorst, H. M., Goldschmidt, H., Rosinol, L., . . . Moreau, P. (2015). Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*, 33(26), 2863-2869. doi:10.1200/jco.2015.61.2267
- Pulte, D., Jansen, L., Castro, F. A., Emrich, K., Katalinic, A., Holleczek, B., & H., B. (2015). Trends in survival of multiple myeloma patients in Germany and the United States in the first decade of the 21st century. *Br J Haematol*, 171, 189-196.
- Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E. O., Inamine, A., Smith, K. G., Dorner, T., & Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol*, 6(10), 741-750. doi:10.1038/nri1886
- Rajan, A. M., & Rajkumar, S. V. (2015). Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J*, 5, e365. doi:10.1038/bcj.2015.92
- Rajkumar, S. V., Harousseau, J. L., Durie, B., Anderson, K. C., Dimopoulos, M., Kyle, R., . . . San Miguel, J. (2011). Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical

- trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*, 117(18), 4691-4695. doi:10.1182/blood-2010-10-299487
- Rasche, L., Knop, S., & Einsele, H. (2015). State of the Art: Diagnose und Therapie des Multiplen Myeloms. *Onkologie heute*, 9-11.
- Robert-Koch-Institut. (2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014. Retrieved 05.05.2018 https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf
- Sanchez, E., Gillespie, A., Harutyunyan, N. M., Tang, G., Gottlieb, J., Vardanyan, S., . . . Berenson, J. R. (2014). Circulating Bcma Binding to Its Ligand BAFF Prevents Normal Antibody Production in Multiple Myeloma Patients. *Blood*, 124(21), 4713-4713.
- Sanchez, E., Li, M., Kitto, A., Li, J., Wang, C. S., Kirk, D. T., . . . Berenson, J. R. (2012). Serum B-cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival. *Br J Haematol*, 158(6), 727-738. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09241.x
- Scudla, V., Lochman, P., Pika, T., Minarik, J., Zapletalova, J., & Bacovsky, J. (2016). Relationship of differences in immunoglobulin heavy/light chain pairs (Hevylite), selected laboratory parameters and stratification systems in different immunochemical types of multiple myeloma. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 160(1), 84-93. doi:10.5507/bp.2015.032
- Sonneveld, P., Avet-Loiseau, H., Lonial, S., Usmani, S., Siegel, D., Anderson, K. C., . . . Orłowski, R. (2016). Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*, 127(24), 2955-2962. doi:10.1182/blood-2016-01-631200
- Suehara, Y., Seike, K., Fukumoto, K., Fujisawa, M., Fukaya, M., Sugihara, H., . . . Matsue, K. (2014). Immunoglobulin heavy/light chain immunoassays for response evaluation in multiple myeloma: comparison with immunofixation, serum free light chain, and multicolor flow-cytometry. *Blood*, 124(21). doi:10.1182/blood.V124.21.3366.3366
- Tovar, N., Fernandez de Larrea, C., Elena, M., Cibeira, M. T., Arostegui, J. I., Rosinol, L., . . . Blade, J. (2012). Prognostic impact of serum immunoglobulin heavy/light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission after autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 18(7), 1076-1079. doi:10.1016/j.bbmt.2012.03.004
- Tsujimoto, T., Lisukov, I. A., Huang, N., Mahmoud, M. S., & Kawano, M. M. (1996). Plasma cells induce apoptosis of pre-B cells by interacting with bone marrow stromal cells. *Blood*, 87(8), 3375-3383.
- van de Velde, H. J., Liu, X., Chen, G., Cakana, A., Deraedt, W., & Bayssas, M. (2007). Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma. *Haematologica*, 92(10), 1399-1406. doi:10.3324/haematol.11534
- Wikimedia. Retrieved 04.05.2020 <https://commons.wikimedia.org> (Abbildungen unter Creative-Commons-Lizenz)
- Willrich, M. A., & Katzmann, J. A. (2016). Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Clin Chem Lab Med*, 54(6), 907-919. doi:10.1515/cclm-2015-0580
- Wörmann, B., Driessen, C., Einsele, H., Goldschmidt, H., Gunsilius, E., Kortüm, M., . . . F., W. (2018). Multiples Myelom. Retrieved 04.05.2020 <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@guideline/html/index.html>
- Ye, R., Kundrapu, S., Gerson, S. L., Driscoll, J. J., Beck, R., Ali, N., . . . Malek, E. (2019). Immune Signatures Associated With Clonal Isotype Switch After Autologous Stem Cell

Transplantation for Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 19(5), e213-
e220. doi:10.1016/j.clml.2018.12.022

9. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau eines Immunglobulins (IgG)	6
Abbildung 2: Serumelektrophorese (a) normal (b) Paraprotein läuft in der γ -Region..	11
Abbildung 3: Immunfixationselektrophorese (a) normales Serum (b) IgG λ -Myelom .	12
Abbildung 4: Übersicht der ein- und ausgeschlossenen Patient*innen	45
Abbildung 5: Kumulative progressionsfreie Überlebensrate des Studienkollektivs.....	49
Abbildung 6: Häufigkeit der Klassifikation der IgG kappa/lambda-Ratio im Verlauf der Therapie bei IgG-Myelomen	51
Abbildung 7: Häufigkeit der Klassifikation der IgA kappa/lambda-Ratio im Verlauf der Therapie bei IgA-Myelomen	52
Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der Klassifikation der IgG kappa/lambda HLC-Ratio auf die ISS-Stadien bei IgG-Myelomen.....	54
Abbildung 9: Prozentuale Verteilung der Klassifikation der IgA kappa/lambda HLC-Ratio auf die ISS-Stadien bei IgA-Myelomen.....	55
Abbildung 10: Prozentuale Verteilung der Klassifikation der IgG kappa/lambda HLC-Ratio auf die r-ISS-Stadien bei IgG-Myelomen	57
Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der Klassifikation der IgA kappa/lambda HLC-Ratio auf die r-ISS-Stadien bei IgA-Myelomen	58
Abbildung 12: Anzahl der Fälle mit positivem und negativem MRD-Status je nach Klassifikation der Ig kappa/lambda HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins und Response-Status.....	65
Abbildung 13: Höhe der IgG kappa HLC und IgG lambda HLC der IgG-Myelome ...	68
Abbildung 14: Höhe der IgA kappa HLC und IgA lambda HLC der IgA-Myelome ...	70
Abbildung 15: Überlebensverteilungen für die Klassifikation der Ig kappa/lambda HLC-Ratio des involvierten Immunglobulins	72
Abbildung 16: Überlebensverteilungen nach Isotypensuppression der nicht involvierten HLC	74

Tabelle 1: Diagnosekriterien eines symptomatischen, sekretorischen Multiplen Myeloms	10
Tabelle 2: Referenzbereich des Free Light Chain Assay (Freelite®).....	14
Tabelle 3: Stadien des Multiplen Myeloms nach Durie und Salmon (1975)	15
Tabelle 4: ISS-Klassifikation zur Stadien-Einteilung des Multiplen Myeloms (2005). 16	
Tabelle 5: Medianes Überleben in Monaten nach Diagnosestadien im Vergleich.....	16
Tabelle 6: Revised ISS-Klassifikation zur Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms (2015)	18
Tabelle 7: Response-Kriterien des Multiplen Myeloms nach IMWG (2006)	21
Tabelle 8: Referenzbereiche des Heavy Light Chain Assay (Hevylite®).....	29
Tabelle 9: Übersicht über die Charakteristika des Studienkollektivs.....	48
Tabelle 10: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach ISS Stadium	54
Tabelle 11: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach r-ISS Stadium....	56
Tabelle 12: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach FLC-Ratio bei IgG-Myelomen.....	59
Tabelle 13: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach FLC-Ratio bei IgA-Myelomen.....	61
Tabelle 14: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach Response für IgG-Myelome.....	63
Tabelle 15: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach Response für IgA-Myelome.....	64
Tabelle 16: Unterschiede der involved/uninvolved HLC-Ratio nach MRD-Status nach Induktionstherapie	66

DANKSAGUNG

Auf dem Weg von der Idee bis zur Fertigstellung dieser Arbeit habe ich vielfältige Unterstützung erhalten, für die ich sehr dankbar bin.

Herrn Prof. Dr. Knop danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die fachliche Unterstützung.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Herrn Dr. Martin Schreder für die hervorragende Betreuung trotz der räumlichen Entfernung.

Dank gilt weiterhin dem gesamten Team der DSMM XIV-Studie insbesondere Frau Rothenbacher und dem Laborteam der Universität Würzburg für die freundliche Bereitstellung der Daten.

Nicht zuletzt bedanke mich bei meiner Familie und meinem Freund, die besonders in schwierigen Phasen stets für mich da waren, sodass ich mein Ziel nicht aus den Augen verlor.

