

Aus der Klinik und Poliklinik der Medizinischen Klinik II
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Real World Next Generation M³P-Panel-Sequenzierung für die
personalisierte Therapie des Multiplen Myeloms**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Katharina Dereser
aus Sennfeld

Würzburg, September 2023

Referent: Prof. Dr. med. Martin Kortüm
Korreferent: Prof. Dr. med. Andreas Buck
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11. März 2024

Die Promovendin ist Ärztin.

Für Benno

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Multiple Myelom.....	1
1.2	Genetik des Multiplen Myelom.....	7
1.3	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	8
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Studienaufbau.....	10
2.2	Materialien.....	10
2.3	M ³ P-Panel und Sequenzierung.....	14
2.4	Datenerhebung der klinischen Parameter.....	26
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Patientencharakteristik.....	33
3.2	Molekulargenetische Analysen.....	42
3.3	Überlebensanalysen.....	50
4	Diskussion.....	57
5	Zusammenfassung.....	69
6	Literaturverzeichnis.....	70
	Anhang.....	
	I Abkürzungsverzeichnis.....	
	II Abbildungsverzeichnis.....	
	III Tabellenverzeichnis.....	
	IV Danksagung.....	

1 Einleitung

1.1 Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems und durch eine unkontrollierte Vermehrung von monoklonalen Plasmazellen im Knochenmark (KM) charakterisiert. In der Folge kommt es zu einer gesteigerten Produktion an Immunglobulinen (Ig) oder einzelnen Bestandteilen wie zum Beispiel den freien Leichtketten (engl. free light chain, FLC) [1]. Ausnahme hierbei bildet das asekretorische Myelom, bei dem kein sogenanntes Paraprotein nachgewiesen werden kann. Nach den Kriterien der World Health Organisation (WHO) wird das MM den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen zugeordnet.

Epidemiologisch ist das MM mit 10-15 % weltweit eine der häufigsten hämatologischen Neoplasien. In Deutschland zählt es zu den 20 häufigsten Tumorerkrankungen und ist nach den Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphomen die dritthäufigste hämatologische Neoplasie. Es macht jährlich etwa 1 % der Krebsneuerkrankungen in Deutschland aus [2]. Die altersadjustierte Inzidenz in Deutschland liegt bei 5,6 pro 100.000 für Männer und 3,6 pro 100.000 für Frauen [3]. Männer erkranken demnach insgesamt deutlich häufiger an einem MM als Frauen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 55 % (54 % für Frauen und 56 % für Männer) [3], [4].

Klinisch ist das MM zu Krankheitsbeginn oftmals asymptomatisch. Bei einem Teil der Patienten bestehen bei Diagnosestellung jedoch bereits Endorganschäden wie Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Knochenmarkinsuffizienz mit Anämie und vermehrter Infekt- und Blutungsneigung sowie Knochenschäden oder -schmerzen. Diese werden in den sogenannten CRAB-Kriterien zusammengefasst (siehe Tabelle 1). Die Plasmazelldyskrasien aus dem MM-Formenkreis werden in drei unterschiedliche Entwicklungsstadien eingeteilt. Die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) gilt dabei als Vorstufe und sogenannte Präkanzerose des MMs. Über die Stufe des asymptomatischen Myeloms („smouldering Myelom“) entsteht bei Auftreten eines der oben genannten CRAB-Kriterien das manifeste und therapiebedürftige MM [5]. Die Krankheitsprogression von den asymptomatischen Vorstufen hin zum manifesten MM entsteht durch klonale Evolution und Akquisition genetischer Veränderungen. Beginnend mit einem initiierenden Ereignis wird die Plasmazelle immortalisiert und dadurch die maligne Transformation eingeläutet [6]. Die Tatsache, dass dieses Ereignis auf viele unterschiedliche Art und Weisen stattfinden kann, trägt zur frühen genetischen Heterogenität des MMs bei. Diese stellt ein bedeutendes Kennzeichen des MMs dar. Bei ca. 50 % der Patienten kommt es hierbei

als primäres Ereignis zu der Entstehung eines hyperdiploiden Chromosomensatzes der Tumorzellen oder zu einer spezifischen Translokation, welche fast immer den Genlocus auf Chromosom 14 miteinschließt, der für die Schwereketten des Immunglobulins codiert. Im Rahmen dieser genetischen Veränderungen wird ein genaktivierendes Element, ein sogenannter „super-enhancer“, vor ein Onkogen auf einem anderen Chromosom geschaltet. Dies führt zu dessen Aktivierung und in letzter Konsequenz zur Dysregulation des Zellzyklus und einer gesteigerten Proliferation der Plasmazellen [7].

Durch den Erwerb weiterer sekundärer genetischer Veränderungen kommt es im Verlauf der sogenannten klonalen Evolution zur Selektion verschiedener Plasmazell-Subklone. Diese Selektion erfolgt dabei nach dem Prinzip der darwinistischen Theorie [8]. Wird die Plasmazelle hierdurch dazu befähigt, die Knochenmarknische zu verlassen und sich im peripheren Blut oder im Weichteilgewebe anderer Organe auszubreiten, entsteht die Plasmazelleukämie oder extramedulläre MM-Manifestation (engl. extramedullary disease, EMD) [9].

Diese große sowohl inter- als auch intraklonale Heterogenität stellt die Grundlage für den interindividuell deutlich unterschiedlichen klinischen Verlauf der Erkrankung dar. Zugleich bietet sie eine Erklärung für die Entwicklung von Therapieresistenzen oder einem verminderten Therapieansprechen auf bestimmte Substanzklassen.

Laut International Myeloma Working Group (IMWG) besteht eine Therapieindikation, sobald eines der CRAB-Kriterien erfüllt ist und somit ein symptomatisches MM vorliegt.

Tabelle 1: CRAB-Kriterien: Definitionskriterien der Endorganschäden im Rahmen eines symptomatischen MMs

Kriterium	Definition
Hyperkalzämie (C)	Kalzium > 2,75 mmol/l oder > 0,25 mmol/l oberhalb des oberen Normwerts
Niereninsuffizienz (R)	Kreatinin > 2,0 mg/dl oder GFR ≤ 40 ml/min
Anämie (A)	Hämoglobin < 10 g/dl oder > 2,0 g/dl unterhalb des unteren Normwerts
Knochenläsionen (B)	Nachweis mindestens einer osteolytischen Knochenläsion in der Bildgebung

Aktuellen Studien zu Folge können jedoch auch bereits asymptomatische Patienten von einer systemischen Behandlung des MMs profitieren, falls diese Risikofaktoren für ein schnelles Voranschreiten der Erkrankung aufzeigen. Diese sind in den

sogenannten SLiM-Kriterien abgebildet. Sie beinhalten eine Knochenmarkinfiltration von $\geq 60\%$, eine Erhöhung der Light Chain Ratio, dem Quotienten der betroffenen zur nicht betroffenen freien Leichtkette im Serum, sowie den Nachweis von mehr als einem fokalen Plasmazellherd in der Magnetresonanztomographie (MRT) [5].

Tabelle 2: SLiM-Kriterien: Biomarker, die unabhängig von vorliegenden Endorganschäden eine ungünstige Prognose bedingen

Kriterium	Definition
Knochenmarkinfiltration (S)	Klonaler Plasmazellgehalt im Knochenmark $\geq 60\%$ (zytologisch und histologisch)
Freie Leichtkette (Li)	Freier Leichtketten Quotient im Serum ≥ 100 (betroffene/nicht betroffene Leichtkette)
Fokale Läsionen im MRT (M)	> 1 fokale Läsion $\geq 0,5$ cm in der MRT-Bildgebung

Die Diagnostik des MM's stützt sich daher grundsätzlich auf vier Säulen: Klinische Symptomatik, Laborchemie, Bildgebung und Knochenmarkdiagnostik.

Klinisch sind die Symptome des MM's meist sehr unspezifisch und treten bei einem Teil der Patienten erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung nach langem asymptomatischem Intervall auf. Am häufigsten werden dabei Knochenschmerzen oder pathologische Frakturen dokumentiert [10]. Weitere Symptome bei Diagnosestellung sind beispielsweise Fatigue als Folge einer Anämie oder eine erhöhte Infektneigung. Beides resultiert aus einer Knochenmarkinsuffizienz und Verdrängung der physiologischen Hämatopoese durch Infiltration mit Plasmazellen.

Die ebenfalls häufig auftretende Niereninsuffizienz beim MM ist hauptsächlich bedingt durch eine Akkumulation und Präzipitation von Leichtketten in Form von Zylindern (CAST-Nephropathie). Außerdem wird von einem direkten nephrotoxischen Effekt der Leichtketten ausgegangen, welcher eine zytokinvermittelte Inflammation induziert. Die CAST-Nephropathie, die auch Myelom-Niere genannt wird, ist die häufigste Form der Niereninsuffizienz beim MM [11]. Auch die Entstehung einer AL-Amyloidose und der mit ihr assoziierten Komplikationen sind möglich [12].

Ergibt sich der klinische Verdacht auf ein MM, sollte den aktuellen Leitlinien der IMWG zufolge neben einer ausführlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung zunächst eine gezielte Labordiagnostik erfolgen [13]. Diese dient primär der Evaluation von Endorganschäden. Darüber hinaus ist sie auch für die Stadieneinteilung nach dem International Staging System (ISS) [14] oder dem Revised-ISS (R-ISS) [15] und somit für die prognostische Abschätzung relevant.

Insbesondere zur Verifizierung der Knochenbeteiligung werden bei Diagnosestellung des MMs ergänzend bildgebende Verfahren angewandt. Hierbei haben in den letzten Jahren Schnittbildgebungstechniken an Bedeutung gewonnen. Ein Grund hierfür ist die Tatsache, dass das konventionelle Röntgen, welches nach „Pariser Schema“ jahrelang als Standardmethode in der diagnostischen Bildgebung des MMs angesehen war, im Vergleich zu neueren Techniken einige klinisch relevante Nachteile aufweist. So detektiert es osteolytische Läsionen beispielsweise erst ab einem Verlust der Knochensubstanz von 30 %. Dies entspricht bereits einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung [16]. In retrospektiven Analysen konnte gezeigt werden, dass neuere Bildgebungstechniken wie Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) oder [18F]-Fluorodesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie in Verbindung mit CT (FDG-PET/CT) deutlich sensitiver sind als das konventionelle Röntgen nach „Pariser Schema“ [17], [16], [18]. Insbesondere bei EMD, für die Beurteilung des axialen Skeletts, schmerzhafter Läsionen und zur Unterscheidung zwischen benignen und malignen osteoporotischen Wirbelkörperfrakturen stellt das MRT den Goldstandard unter den bildgebenden Techniken dar [19]. Hiermit können außerdem Rückenmarks- und Nervenkompressionen sowie Weichteilmanifestationen detektiert werden [19]. Die FDG-PET/CT ermöglicht zusätzlich Aussagen über die Krankheitsaktivität und eine Visualisierung der Tumorlast. Ergebnisse sowohl von MRT als auch FDG-PET/CT sind von prognostischer Bedeutung auf das Gesamtüberleben (engl. overall survival, OS) und progressionsfreie Überleben (engl. progression-free survival, PFS) [20], [21].

Für die definitive Diagnosestellung des MMs bleibt dennoch der Nachweis von monoklonalen Plasmazellen mittels Knochenmarkdiagnostik ausschlaggebend. Diese umfasst in der Regel eine Knochenmarkpunktion (KMP) mit Biopsie aus dem Beckenkamm zur histologischen Diagnosesicherung beziehungsweise -bestätigung. Daneben erfolgen mehrere Aspirationen für Zytomorphologie, Chromosomenanalyse und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Zytogenetische Untersuchungen sind ebenfalls von prognostischer Relevanz. So ist bekannt, dass eine Deletion des kurzen Arms von Chromosom 17 (del17p), eine Translokation zwischen den Chromosomen 4 und 14 (t(4;14)) oder den Chromosomen 14 und 16 (t(14;16)) mit einer ungünstigen Prognose einhergehen [22]; ebenso eine Übertragung von Chromosomensegmenten zwischen Chromosom 14 und 20 (t(14;20)) oder ein Zugewinn des langen Arms von Chromosom 1 auf 3 Kopien (gain1q) beziehungsweise eine Amplifikation auf 4 oder mehr Kopien (amp1q). Hyperdiploidien scheinen dagegen einen eher günstigen Effekt

auf die Prognose zu haben [23]. Aufgrund dieser Erkenntnisse fand die Risikoeinteilung anhand zytogenetischer Merkmale neben laborchemischen Parametern wie dem β 2-Mikroglobulin und der Laktatdehydrogenase (LDH) Einzug in die Stadieneinteilung nach der R-ISS-Klassifikation. Diese definiert drei prognostische Subgruppen [22]. Laut IMWG liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten in Stadium I bei 82 %, in Stadium II bei 62 % und in Stadium III bei 40 % [22].

Tabelle 3: R-ISS-Klassifikation mit 5-Jahres-Überlebensrate

	Definition	5 J-Überlebensrate, %
Stadium I	β 2-Mikroglobulin \leq 3,5 mg/l <u>und</u> Albumin \geq 3,5 g/dl <u>und</u> Standardrisiko-Zytogenetik <u>und</u> LDH \leq oberer Normwert	82
Stadium II	weder Stadium I noch Stadium III	62
Stadium III	β 2-Mikroglobulin \geq 5,5 mg/l <u>und</u> Hochrisiko-Zytogenetik <u>oder</u> LDH $>$ oberer Normwert	40

Trotz der gravierenden Forschungsfortschritte der letzten Jahre in der Therapie des MMs können nur wenige Patienten geheilt werden und der überwiegende Anteil der Patienten verstirbt an den Folgen der Erkrankung [24]. Ziel der MM-Behandlung liegt daher primär im Erreichen einer möglichst langfristigen klinischen Remission. Hierfür stehen zahlreiche verschiedene Varianten an Therapiemöglichkeiten zur Verfügung.

Etabliert ist die autologe Stammzelltransplantation (autoSZT). Sie findet vor allem bei jüngeren und körperlich fitten Patienten in der Erstlinientherapie Einsatz. Nach aktueller Datenlage ist mit ihr eine Erhöhung der Rate kompletter Remissionen (engl. complete remission, CR), eine Verbesserung der Ansprechtiefe und Verlängerung des PFS gegenüber einer ausschließlich medikamentösen Therapie möglich [25], [26], [27]. Der autoSZT geht regelhaft eine Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan voraus [28]. Anschließend werden dem Patienten die zuvor mittels Aphereseverfahren aus dem peripheren Blut entnommenen cluster of differentiation (CD) 34 tragenden Blutstammzellen retransfundiert. Die autoSZT kann innerhalb von 6 Monaten als sogenannte Tandemtransplantation wiederholt werden. Im Vergleich zur einmaligen autoSZT führt diese bei einem Teil der Patienten zu tieferem Ansprechen und einer

Verlängerung des PFS und OS [29], [30]. Das Ziel der autoSZT besteht insgesamt in einer Langzeitremission und frühestmöglicher Symptomkontrolle mit Normalisierung myelomspezifischer Parameter.

Sind Patienten aufgrund von Komorbiditäten nicht für eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender autoSZT geeignet, kommen verschiedene Zwei- oder Dreifachkombinationen von Chemo- und Immuntherapeutika in der Erstlinientherapie zum Einsatz. Die Wahl der Substanzen richtet sich nach den individuellen Begleiterkrankungen sowie dem Allgemeinzustand des Patienten. In Frage kommen grundsätzlich sowohl klassische Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid oder Melphalan, aber auch neuere Agenzien wie immunmodulierende Substanzen (engl. immunomodulatory drugs, IMiDe) oder Proteasom-Inhibitoren (PI) und CD38-gerichtete monoklonale Antikörper.

In der Therapie des rezidierten oder refraktären MMs (RRMM) stehen eine Vielzahl weiterer Substanzen zur Verfügung. Zu nennen sind hier neben den Nächst-Generations-PIs und IMiDen insbesondere die neuen Immuntherapeutika, die als neues Zielmolekül zumeist B-cell maturation antigen (BCMA) targetieren. Hier wurden zuletzt mit einem Immunkonjugat, einem bispezifischen Antikörper und zwei chimären Antigenrezeptor (CAR)-T-Zell-Konstrukten Substanzen mit eindrucksvoller Wirksamkeit auch im späten Erkrankungsverlauf zugelassen [31], [32], [33]. Eine große Anzahl weiterer Substanzen befindet sich in später klinischer Testung, sodass zeitnah mit einer noch größeren Erweiterung des Behandlungsspektrums gerechnet werden kann [34].

Leider entwickeln nahezu alle am MM erkrankten Patienten trotz dieser großen therapeutischen Fortschritte in der Behandlung des MMs ein Rezidiv oder Medikamentenresistenzen. Dies ist nicht zuletzt Auswirkung der oben beschriebenen genetischen Heterogenität der Erkrankung. Da die etablierten Therapieregime - inklusive der neuen Agenzien zielgerichteter Therapieansätze - im Verlauf nur noch begrenztes Ansprechen zeigen, bleibt es Aufgabe der aktuellen Forschung fortwährend neue Behandlungsstrategien zu entwickeln und weitere Angriffspunkte für Substanzen zu identifizieren. Hierfür ist die molekulargenetische Diagnostik ein bedeutendes Instrumentarium.

1.2 Genetik des Multiplen Myelom

Mittels Next-Generation Sequencing (NGS) gelang es in den letzten 10-15 Jahren, eine Reihe an Genen zu identifizieren, welche mit der Krankheitsentwicklung des MMs in Verbindung stehen. Hierdurch war es möglich, zielgerichtete Marker zu finden und entsprechende Therapien zu entwickeln. Damit einhergehend wurde eine positive Entwicklung bezüglich Krankheitsprogression und Überleben erhofft. So stellt beispielsweise der Interferon regulatory factor 4 (*IRF4*) ein für das Überleben der Plasmazelle unverzichtbares Gen dar. Es fungiert als einer der Angriffspunkte der IMiD-Substanzgruppe [35].

Eine weitere wichtige Kaskade ist der Mitogen-activated protein-Kinase (MAPK)-Signalweg, bei dem unter anderem die Gene Kirsten rat sarcoma (*KRAS*) Neuroblastoma rat sarcoma (*NRAS*) und B-rapidly accelerated fibrosarcoma (*BRAF*) von Bedeutung sind. Bis zu 50 % der MM-Patienten weisen hier Mutationen auf, welche zumeist zu einer gesteigerten Aktivität dieses Signalwegs führen [36]. In bisherigen Studien traten eine *KRAS*- Mutation in 21-27 %, eine *NRAS*-Mutation in 19-24 % der Fälle und eine *BRAF*-Mutation in ungefähr 7 % auf [37]. Meist schließen sich diese Veränderungen gegenseitig aus und treten nur selten gleichzeitig auf. Des Weiteren zeigen etwa 17 % der Patienten aktivierende Mutationen in den Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFκB)-Signalweg betreffender Gene wie zum Beispiel Tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 3 (*TRAF3*) und Cylindromatosis (*CYLD*) [37]. Zahlreiche Medikamente wie Thalidomid, Lenalidomid oder Bortezomib entfalten ihre Anti-MM-Wirkung teilweise durch eine Inhibition von NFκB [38]

Auch die in vielen Tumorentitäten auftretende Mutation des für das Tumorprotein p53 codierenden Gens (*TP53*) kann in 3-8 % der MM-Patienten nachgewiesen werden. Sie ist assoziiert mit einer del17p und insbesondere bei Auftreten einer biallelischen Inaktivierung von TP53 mit einer besonders ungünstigen Prognose vergesellschaftet [39].

Die molekulargenetische Diagnostik durch Anwendung von NGS hat unser Wissen und Verständnis über die Pathogenese des MMs erweitert. Es ermöglicht eine genetische Charakterisierung der Erkrankung und die Identifikation ablaufender Mutationsereignisse. Letztlich hat dies wichtige klinische Relevanz für die prognostische Einschätzung des MMs, die Wahl der Therapie sowie die Bewertung des Ansprechens [40]. Außerdem lässt es eine Bestimmung der klonalen Heterogenität zu, welche das MM maßgebend charakterisiert.

1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das MM ist gekennzeichnet durch einen interindividuell sehr unterschiedlichen klinischen Verlauf. Obwohl bei einigen Patienten eine rasche - zum Teil komplette - Remission erreicht werden kann, tritt bei der Mehrzahl der Patienten auch mehrfach ein Krankheitsrezidiv auf. Um die zugrundeliegende Pathogenese des MMs besser verstehen zu können, wurden in klinischen Studien Sequenzierungen von ganzen Exomen beziehungsweise Genomen zahlreicher MM-Patienten durchgeführt [37], [41], [42]. Hierbei bewährte sich die Verwendung des multiple myeloma mutation panel (M³P). Es beinhaltet in der neuesten Generation 88 Gene, die entweder bekanntermaßen wiederholt beim MM mutiert sind, eine Schlüsselrolle in für die Erkrankung relevanten Signalwegen spielen oder Zielstrukturen etablierter Therapieregime darstellen [43], [44]. Mittels NGS können so auf eine kosteneffektive Weise, in einer klinisch relevanten Zeitspanne sowie mit einem Minimum an Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid, DNA) die wichtigsten und für das MM bisher relevantesten Gene untersucht werden [45]. Dies ermöglicht nicht nur Aussagen über die genetische Heterogenität des MMs, sondern lässt uns auch zunehmend verstehen, wie sich Resistenzen bezüglich einzelner Anti-MM-Therapien entwickeln. Die Entdeckung von Cereblon (*CRBN*)-Mutationen beim MM zeigt, dass diese Analytik nicht nur wissenschaftlich, sondern auch klinisch von großer Relevanz ist. *CRBN* spielt eine Schlüsselrolle für die Anti-MM-Wirkung IMiD-basierter Substanzen wie Thalidomid, Lenalidomid und Pomalidomid. Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression von *CRBN* mit einem besseren Therapieansprechen auf IMiDe assoziiert ist [46], [47]. Ein Verlust der *CRBN*-Expression oder eine Mutation in *CRBN* führt zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber immunmodulatorischer Therapien [35], [48]. In Kenntnis solcher Zusammenhänge kann die Behandlung des MMs durch Erweiterung zielgerichteter Therapieansätze immer weiter individualisiert und präzisiert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Bedeutung der Molekulargenetik in der Diagnostik des MMs zu untersuchen. Außerdem sollten mögliche Zusammenhänge zwischen molekulargenetischen Charakteristika und Therapieansprechen oder Überleben und somit deren klinische Relevanz beleuchtet werden.

Fragen, die wir uns im Rahmen dieser Arbeit stellten, waren:

- Wie sieht die genomische Landkarte beim MM in unserer Patientenkohorte aus?
- Sind die Ergebnisse vergleichbar mit Daten anderer Veröffentlichungen?

- Gibt es Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern und Zyto- oder Molekulargenetik?
- Lassen sich prognostische Aussagen in Richtung Überleben (PFS, OS) von den vorliegenden Mutationen ableiten?

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

In der Studie dieser Arbeit wurden 248 an einem MM erkrankte Patienten im Zeitraum von 01.11.2017 bis 10.12.2019 gescreent. Hiervon erfüllten 59 Patienten die unten aufgeführten Einschlusskriterien und konnten in die vorliegende Studie einbezogen werden. Von allen wurden die klinischen Merkmale zur Primärdiagnose (=Erstdiagnose, ED) und Therapie über den entsprechenden Zeitraum erhoben und unter Zuhilfenahme einer Structured Query Language (SQL) gestützten Tumordatenbank prospektiv erfasst. Einzelne Merkmale, insbesondere Daten zur Erstdiagnose, wurden retrospektiv erhoben. Zudem wurde bei diesen Patienten eine Panelsequenzierung anhand des M³P-Panels durchgeführt. Als Material hierfür standen CD138-angereicherte Knochenmarkszellen aus KMPs zur Verfügung. Die Aufreinigung und Sequenzierung erfolgten entsprechend des in der Literatur beschriebenen Procedere [45]. Sämtliche Daten wurden unmittelbar nach Erfassung pseudonymisiert weiterverarbeitet. Alle Patienten haben nach sorgfältiger Aufklärung der Durchführung der Diagnostik gemäß den im Therapiezentrum des Universitätsklinikums Würzburg (UKW) gültigen Richtlinien der Erfassung von Daten zur Krankheitsgeschichte und Therapie sowie deren Datenschutz-konformer Weiterverwendung eingewilligt. Die Ethikkommission in Würzburg hat dieser Untersuchung nach ausführlicher Beratung ohne Einwände zugestimmt (Zeichen 76/13).

2.2 Materialien

Die folgenden Geräte und Materialien wurden verwendet.

Tabelle 4: Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Ion OneTouch™ 2 System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ion Personal Genom Machine (PGM™) System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ion Torrent Next Generation Sequencer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MC-24 Touch Microcentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Centrifuge 5430R	Eppendorf AG, Hamburg

Ion Chip MiniFuge, 120 VAC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Vortex-Genie 2	Faust Lab Science, Klettgau
Veriti™ 96 Well Thermocycler	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Agencourt AMPure XP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Qubit™ 3.0 Fluorometer	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipetten Eppendorf Research® plus (10 bis 100 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Eppendorf Research® plus (2 bis 20 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Kühl-/Gefrierschrank Mediline	Liebherr-International GmbH, Biberach a.d. Riß
DynaMag™-2 Magnet	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zählkammer Neubauer Improved	Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön
Hand-Stückzähler	Baumer IVO by Baumer Holding AG, Frauenfeld, Schweiz

Tabelle 5: Materialien-Kits

Kit	Hersteller
AllPrep DNA/RNA Micro Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Agencourt AMPure™ XP Kit	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ion PGM™ Hi-Q OT2 Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ion PGM™ Hi-Q Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ion Sphere™ Quality Control Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ion 318™ Chip Kit v2 BC, 8-Pack	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Qubit™ dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Pipettenspitzen, Filter 1000, 200, 10	STARLAB International GmbH, Hamburg
DNA LoBind Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Qubit™ Assay Tubes 500 µl	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
SafeSeal Tubes 1,5 ml	Sarstedt AG&Co KG, Nümbrecht
LeukoSEP™ Tubes	Greiner Bio-One™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MicroAmp™ Fast 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PCR SingleCap 8er SoftStrips 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MicroAmp™ Compression Pad	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid 1,0 N	Sigma Life Science, St. Louis, Missouri, USA
DEPC-vorbehandeltes Wasser	Ambion GmbH, Kaufungen
Ethanol (70 %) in destilliertem Wasser	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Ethanol (96-100 %)	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Terralin Liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Nuklease-freies Wasser	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ficoll 400	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
Ion PGM™ Enrichment Beads	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ion Xpress™ Barcode Adapters	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ion 318™ Chip und 318™ Chip v2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Ion PGM™ Sequencing v2 W2 Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ion PGM™ Sequencing v2 1X W3 Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MilliQ® Wasser (18,2 MΩ/cm)	Merck KGaA, Darmstadt
14,3 M β-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 7: Software und Programme

Software und Programme	Hersteller
Ion Reporter™ Software v1.6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
StepOne™ Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
SIFT	Bioinformatics Institute, Singapur
PROVEAN	J. Craig Venter Institute, La Jolla, Kalifornien, USA
PolyPhen-2	Harvard University
Catalog of Somatic Mutations in Cancer	COSMIC, Wellcome Trust Sanger Institute, UK
Microsoft Excel® 2016	Microsoft, Redmond, Washington, USA
OncoPrint™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Integrative Genomic Viewer (IGV)	Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, USA
GraphPad Prism 9.00	GraphPad Software, San Diego, USA

2.3 M³P-Panel und Sequenzierung

Isolation mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Bearbeitung des Probenmaterials erfolgte spätestens 24 h nach Probengewinnung mittels KMP. Zunächst wurde ein LeukoSEP™-Tube mit 15 ml Ficoll-Lösung befüllt und bei 1200 rpm für 10 s zentrifugiert, bis das Medium unterhalb des Filters war. Anschließend wurde die Knochenmarkprobe sowie phosphatgepufferte Kochsalzlösung nach Dulbecco (DPBS) im Verhältnis 1:2 über einen 100 µm Filter in das LeukoSEP™-Tube gegeben und erneut bei 1900 rpm für 20 min zentrifugiert. Bei Bedarf wurde der Ansatz für diesen Schritt auf mehrere Röhren aufgeteilt. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde die Interphase mit den mononukleären Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, mit DPBS auf ein Volumen von 40 ml aufgefüllt und bei 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen.

Selektion von CD138-positiven Zellen

Das im vorherigen Schritt gewonnene Zellpellet wurde nach Anweisungen des StemCell Protokolls unter Verwendung des EasySep™ Human CD138 Positive Selection Kit II weiterverarbeitet. Hierfür wurde das Zellpellet mit einer Konzentration von 1×10^8 /ml in 0,1-2 ml DPBS gelöst und in das entsprechende 5 ml-Polystyrol-Röhren überführt. Die Zellzählung erfolgte mittels Hand-Stückzähler in der Neubauer-Zählkammer. Anschließend wurden zunächst die Anti-CD138-Antikörper in einer Konzentration von 50 µl/ml hinzugegeben und der Ansatz für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die magnetischen RapidSpheres™ ebenfalls in einer Konzentration von 50 µl/ml ergänzt und der Ansatz erneut für weitere 3 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Im nächsten Schritt wurde der Ansatz mit DPBS auf ein Volumen von 2,5 ml aufgefüllt, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und im Magneten für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Bindung der magnetischen RapidSpheres™ über die Anti-CD138-Antikörper an die CD138-positiven Stammzellen wurden diese im Tube gehalten, der Überstand mit CD138-negativen Zellen konnte durch langsames Drehen des Magneten um 180° verworfen werden. Das Röhren innerhalb des Magneten enthielt nun die isolierten CD138-positiven Zellen, welche als Zellpellet bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet werden konnten.

DNA-Isolation (Qiagen AllPrep DNA/RNA Micro Kit)

Das Zellpellet von 5×10^5 Zellen wurde zunächst bei $300 \times g$ zentrifugiert, um sämtlichen Überstand zu entfernen. Vorbereitend wurde 1 ml des Puffers RLT Plus mit 10 μ l β -Mercaptoethanol gemischt. Anschließend wurden die Zellen durch Hinzugabe von 350 μ l des verdünnten Puffers RLT Plus lysiert. Die Zelllysate wurden in eine QIAshredder Spin-Säule in einem 2 ml-Tube pipettiert und durch Zentrifugation über 2 min bei höchster Geschwindigkeit homogenisiert. Im nächsten Schritt wurden die homogenisierten Lysate in eine AllPrep DNA Spin-Säule in ein 2 ml-Tube überführt und bei $8000 \times g$ für 30 s zentrifugiert. Hierdurch wurde der Ansatz durch die Membran der Spin-Säule gefiltert. Mittels Hinzugabe von 500 μ l Puffer AW1 (Konzentrat gelöst in 96-100 % Ethanol) und Zentrifugation bei $8000 \times g$ für 15 s wurde die Membran gewaschen. Durch Hinzugabe von 500 μ l Puffer AW2 (Konzentrat gelöst in 96-100 % Ethanol) und Zentrifugation für 2 min bei höchster Geschwindigkeit erfolgte der zweite Waschschrift. Anschließend wurde die AllPrep DNA Spin-Säule in einem neuen 1,5 ml-Tube platziert und 50 μ l Puffer EB direkt auf die Membran der Spin-Säule gegeben. Um die DNA zu lösen, wurde der Ansatz bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert und dann für 1 min bei $8000 \times g$ zentrifugiert.

Insgesamt wurden 10 ng dieser aufgereinigten DNA für die Sequenzierung benötigt.

Multiple myeloma mutation panel (M³P)

Für die Sequenzierung wurde das M³P-Panel v3.0 verwendet, welches die in Tabelle 8 aufgeführten 88 Gene beinhaltet. Das Panel wurde anhand vorliegender Daten aus den am häufigsten mutierten Genen beim MM zusammengestellt. Im Verlauf wurden Gene ergänzt, welche Zielstrukturen von etablierten MM-Therapien darstellen oder mit einer Resistenz gegenüber IMiDen (*CRBN*, *CUL4A*, *CUL4B*, *DDB1*, *IRF4*), Pls (*PSMG2*, *PSMB5*) oder einer Glukokortikoid-Therapie (*NR3C1*) assoziiert sind [49], [44].

Tabelle 8: Gene des M³P-Panels

<i>ACTG1</i>	<i>CDK7</i>	<i>GRB2</i>	<i>MAF</i>	<i>PIM2</i>	<i>SP140</i>
<i>AKT1</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>IDH1</i>	<i>MAFB</i>	<i>PIM3</i>	<i>STAT3</i>
<i>AKT2</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>IDH2</i>	<i>MAX</i>	<i>PRDM1</i>	<i>TET2</i>
<i>AKT3</i>	<i>CDKN2C</i>	<i>IDH3A</i>	<i>MYC</i>	<i>PSMA1</i>	<i>TGFBR2</i>
<i>ATM</i>	<i>CRBN</i>	<i>IFNGR2</i>	<i>MYD88</i>	<i>PSMB5</i>	<i>TLR4</i>
<i>B2M</i>	<i>CUL4A</i>	<i>IGF1R</i>	<i>NFκB2</i>	<i>PSMB8</i>	<i>TNFRSF13B</i>
<i>BIRC2</i>	<i>CUL4B</i>	<i>IKZF1</i>	<i>NFκBIA</i>	<i>PSMB9</i>	<i>TNFRSF21</i>
<i>BIRC3</i>	<i>CXCR4</i>	<i>IKZF3</i>	<i>NFκBIB</i>	<i>PSMD1</i>	<i>TP53</i>
<i>BRAF</i>	<i>CYLD</i>	<i>IL6</i>	<i>NR3C1</i>	<i>PSMG2</i>	<i>TRAF2</i>
<i>BTG1</i>	<i>DIS3</i>	<i>IL6R</i>	<i>NRAS</i>	<i>PTPN11</i>	<i>TRAF3</i>
<i>CARD11</i>	<i>DUSP2</i>	<i>IL6ST</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>RASA2</i>	<i>TRAF3IP1</i>
<i>CCND1</i>	<i>EGFR</i>	<i>IRF4</i>	<i>PIK3CG</i>	<i>RB1</i>	<i>WHSC1</i>
<i>CCNT1</i>	<i>EGR1</i>	<i>JAK2</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>RIPK1</i>	<i>XBP1</i>
<i>CD38</i>	<i>FAM46C</i>	<i>KDM6A</i>	<i>PIK3R2</i>	<i>RIPK4</i>	
<i>CDK4</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KRAS</i>	<i>PIM1</i>	<i>SHC1</i>	

Der Ablauf der folgenden Schritte erfolgte anhand des in der Literatur veröffentlichten Procedere [45].

Vorbereitung der DNA-Bibliotheken (IonAmpliSeq™ Library Kit 2.0)

Für jede Probe wurden zwei PCR-Tubes vorbereitet, eines für Primer Pool 1 und eines für Primer Pool 2.

Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Mastermix zur Vorbereitung der DNA-Libraries

Reihenfolge	Reagenzien	Volumen
1	5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	2 µl
2	Ion AmpliSeq™ Primer Pool 1 bzw. 2	5 µl
4	DNA (gewonnen aus KMP)	X µl (10 ng)
3	Nuklease-freies Wasser	X µl
	Insgesamt	10 µl

Diese wurden in einem Röhrchen gemischt, sodass am Ende ein Volumen von 10 µl entstand. Dabei galt es zu beachten, dass für die Vorbereitung von Pool 1 und Pool 2 exakt die gleiche Menge an Proben-DNA verwendet wurde.

Anschließend wurde der angesetzte Mix sorgfältig durch Auf- und Abpipettieren gemischt, zentrifugiert und zuletzt unter Verwendung des Programms „Lib1_ampli“ (siehe Tabelle 10) für 90 min in den Thermocycler gegeben. Zuerst wurde die Polymerase bei 99 °C für 2 min aktiviert. Sie katalysierte später die einzelnen Schritte der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Anschließend wurde der eigentliche PCR-Durchlauf gestartet. Hierbei liefen folgende drei Phasen nacheinander ab: Denaturierung, Primer-Annealing und Extension. Im ersten Schritt wurde die DNA, die normalerweise als Doppelstrang vorliegt, in zwei Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Dies geschah, indem der Probenansatz mit der enthaltenen DNA bei 99 °C für ca. 15 s erhitzt und die DNA dadurch denaturiert wurde. Danach sollte sich der Primer komplementär an die Zielsequenz der DNA anlagern (Primer-Hybridisierung oder engl. Annealing). Um diesen Anlagerungsvorgang zu ermöglichen, wurde die Temperatur auf 60 °C gesenkt. Im dritten und letzten Schritt kopierte das Enzym, eine thermostabile DNA-Polymerase, den jeweiligen Einzelstrang erneut zu einem Doppelstrang (Extension). Beginnend an den Primersequenzen lagerte die Polymerase hierfür Nukleotide komplementär zum Matrizenstrang an. Wurde ein Abbruch-Nukleotid, das ebenfalls im Probenansatz vorhanden war, verbaut, kam es zum Stopp des Verlängerungsvorgangs.

Insgesamt führten wir für das M³P-Panel 17 Läufe durch. Sobald alle Durchläufe beendet waren, wurde die Probe auf ungefähr 10 °C abgekühlt und das Endprodukt bei -20 °C zwischengelagert.

Tabelle 10: Ablauf des PCR-Programms 1 "Lib1_ampli"

Schritt	Temperatur	Zeit
Enzymaktivierung	99 °C	2 min
Denaturierung	99 °C	15 s
Annealing, Extension	60 °C	4 min
-	10 °C	-

Anschließend wurden die Reaktionsansätze von Primer Pool 1 und 2 gemischt, 2 µl FuPa (Exonuklease) zum partiellen Verdau der Primer-Sequenzen hinzugegeben, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und nach Zentrifugation in den Thermocycler

gegeben. Es wurde das Programm „Lib2_FuPa“ gestartet, welches aus drei Phasen bestand und insgesamt 40 min dauerte. Hierbei wurde der Ansatz für jeweils 10 min auf 50 °C, dann auf 55 °C und zuletzt für weitere 20 min auf 60 °C erwärmt. Nach Beendigung des Programms wurde der Ansatz mit den entstandenen Amplikons wiederum auf 10 °C abgekühlt.

Tabelle 11: Ablauf des PCR-Programms 2 "Lib2_FuPa"

Schritt	Temperatur	Zeit
1	50 °C	10 min
2	55 °C	10 min
3	60 °C	20 min
4	10 °C	(bis zu 1 h)

Im nächsten Schritt folgte die Ligation der Adapter sowie der Barcode-Sequenzen zur Identifikation der Proben. Hierfür wurde zunächst der Barcode-Adapter-Mix vorbereitet, indem 2 µl der IonXpress Barcodes mit jeweils 2 µl IonXpress P1 Adapter und 4 µl Nuklease-freies Wasser verdünnt wurden. Zu den mittels PCR erzeugten Amplikons wurde jeweils 4 µl Switch Solution, 2 µl des Barcode-Adapter-Mix und 2 µl Ligase hinzugefügt. Die hiermit beladene Platte wurde unter Verwendung des Programms „Lib3_ligation“ erneut in den Thermocycler gegeben. Hierbei wurde die Lösung zunächst für 30 min auf 22 °C temperiert und über 68 °C auf 72 °C erhitzt. Abschließend wurde das Endprodukt wiederum auf 10 °C abgekühlt und über Nacht bei dieser Temperatur im Gerät oder alternativ bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 12: Verwendete Reagenzien für die Ligation der DNA mit den Barcodes und Adaptern

Reihenfolge	Reagenzien	Volumen
1	Switch Solution	4 µl
2	IonXpress Barcode-Adapter-Mix (1,25 µl IonXpress P1 Adapter, 1,25 µl IonXpress Barcode und 2,5 µl Nuklease-freiem Wasser)	2 µl
3	DNA-Ligase	2 µl

Tabelle 13: Ablauf des PCR-Programms 3 "Lib3_ligation"

Schritt	Temperatur	Zeit
1	22 °C	30 min
2	68 °C	5 min
3	72 °C	5 min
4	10 °C	(bis zu 24 h)

Aufreinigen der DNA-Bibliothek (AMPure™ XP Beads)

Zunächst wurden die Beads und die Proben auf Raumtemperatur gebracht und erstere für ca. 1 min gevortext. Eine 70 %-ige Ethanol-Lösung wurde aus 7 ml reinen Ethanol und 3 ml destilliertem Wasser hergestellt. Anschließend wurden in jedes der beiden Röhren jeweils 45 µl der Beads gegeben, mit der Pipette durch ca. 10-maliges Auf- und Abpipettieren sorgfältig gemischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Hierbei sollten die magnetischen Beads an die DNA binden. Durch Überführen in einen Magnetständer und erneutes Inkubieren für 2 min entstand eine klare Lösung, die von den Beads separiert und als Überstand verworfen werden konnte. Im nächsten Schritt wurde die DNA mit jeweils 150 µl der 70 %-igen Ethanol-Lösung unter Verwendung einer Multikanal-Pipette gewaschen. Dabei wurden die Röhren mit der DNA circa 4- bis 6-mal im Magnetständer um 180° gedreht, wodurch die Beads jeweils mitsamt der daran gebundenen DNA durch das Ethanol wanderten. Es folgte ein zweiter Waschschriff wie oben beschrieben. Danach wurde das Ethanol möglichst ohne Residuen entfernt und die DNA für 5 min luftgetrocknet. Währenddessen wurden neue Röhren vorbereitet, die Röhren mit der gebundenen DNA aus dem Magneten geholt und 50 µl LowTE Puffer hinzugefügt, um die DNA von den Beads abzulösen. Hierfür wurde der Ansatz durch Auf- und Abpipettieren gemischt und erneut für 2 min im Magneten inkubiert. Der Überstand mit der gereinigten DNA wurde in die neuen Röhren überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

Quantifizierung der Genbibliothek mittels qPCR TaqMan™

Als erstes wurde hierfür ein Mastermix vorbereitet, der aus Ion Library qPCR Mix, Ion Library TaqMan™ Quantitation Assay und Nuklease-freiem Wasser bestand, wobei sich die genaue Zusammensetzung dieser Mischung nach der Anzahl der Proben richtete und der Tabelle 14 entnommen werden kann.

Tabelle 14: Mastermix für die qPCR

	Reagenzien	Volumen pro Probe
1	Ion Library qPCR Mix, 2X	5 µl
2	Library TaqMan Quantitation Assay, 20X	0,5 µl
3	Nuklease-freies Wasser	2 µl

Anschließend wurden die Proben verdünnt, jeweils 1:20, 1:200 und 1:2000, weshalb für jede Probe drei zusätzliche Röhrchen benötigt wurden. In diese wurde jeweils Wasser vorgelegt. Um ein Verhältnis von 1:20 herzustellen, wurden 4 µl DNA mit 76 µl Wasser gemischt, für eine Verdünnung 1:200 wurden dementsprechend 4 µl aus der ersten Verdünnung (1:20) mit 36 µl Wasser gemischt und zuletzt für eine Verdünnung von 1:2000 wiederum 4 µl der nun entstandenen 1:200-Verdünnung mit 36 µl Wasser. Die Proben wurden jedes Mal sorgfältig gemischt und bei Raumtemperatur gelagert. Als nächster Schritt wurde noch eine Verdünnungsreihe der Standards (Std) nach dem Schema in Tabelle 15 erstellt.

Tabelle 15: Verdünnungsreihe der Standards für die qPCR

	DNA µl	Wasser µl
Std 1	5	0
Std 2	2,5	22,5
Std 3	5 von Std 2	45
Std 4	5 von Std 3	45
Std 5	5 von Std 4	45
Std 6	5 von Std 5	45
Std 7	5 von Std 6	45
Negativkontrolle	0	45

Im Anschluss daran folgte die Quantifizierung aller erstellten Libraries mittels qPCR. Die Einzelheiten zur Vorbereitung der PCR-Platte sind in Tabelle 16 dargestellt. In den Spalten 1 und 12 wurden hierfür jeweils 15 µl Wasser vorgelegt (diese dienten als Negativkontrollen), in den Spalten 2 bis 11 jeweils 7,5 µl Mastermix. In Spalte 2 und 3 wurden immer in Duplikaten 2,5 µl der entsprechenden Standard-Lösung hinzugefügt und gründlich gemischt. In den Spalten 4 bis 11 wurden je 2,5 µl der jeweiligen Proben-Lösung - ebenfalls in Duplikaten - beigegeben. Um eine Verdunstung zu

vermeiden, wurde die befüllte Platte mit einer selbstklebenden Folie abgedichtet. Die Quantifizierung erfolgte nun automatisch mittels TaqMan™ real time qPCR unter Verwendung der StepOne™ Software des Ion Library TaqMan™ Quantification Kits.

Tabelle 16: Plattenformat der qPCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	S1	S1	1 1:200	1 1:200	2 1:200	2 1:200	3 1:200	3 1:200	4 1:200	4 1:200	H ₂ O
B	H ₂ O	S2	S2	1 1:2000	1 1:2000	2 1:2000	2 1:2000	3 1:2000	3 1:2000	4 1:2000	4 1:2000	H ₂ O
C	H ₂ O	S3	S3	5 1:200	5 1:200	6 1:200	6 1:200	7 1:200	7 1:200	8 1:200	8 1:200	H ₂ O
D	H ₂ O	S4	S4	5 1:2000	5 1:2000	6 1:2000	6 1:2000	7 1:2000	7 1:2000	8 1:2000	8 1:2000	H ₂ O
E	H ₂ O	S5	S5	9 1:200	9 1:200	10 1:200	10 1:200	11 1:200	11 1:200	12 1:200	12 1:200	H ₂ O
F	H ₂ O	S6	S6	9 1:2000	9 1:2000	10 1:2000	10 1:2000	11 1:2000	11 1:2000	12 1:2000	12 1:2000	H ₂ O
G	H ₂ O	S7	S7	13 1:200	13 1:200	14 1:200	14 1:200	15 1:200	15 1:200	16 1:200	16 1:200	H ₂ O
H	H ₂ O	blank	blank	13 1:2000	13 1:2000	14 1:2000	14 1:2000	15 1:2000	15 1:2000	16 1:2000	16 1:2000	H ₂ O

Emulsions-PCR (Ion OneTouch™)

Hierzu wurden je Durchlauf 5 DNA-Proben auf eine Konzentration von 100 pM durch Hinzufügen der entsprechenden Menge an LowTE Puffer verdünnt. Danach wurde ein DNA-Library-Pool erstellt, indem von jeder Probe 10 µl in ein neues 1,5 ml-Röhrchen gegeben wurden, wovon dann wiederum 3 µl mit 22 µl Wasser gemischt wurden. Anschließend wurden erneut 25 µl dieses verdünnten Library-Pools mit ebenfalls 25 µl Nuklease freiem Wasser, 50 µl Ion PGM™ Hi-Q Enzyme Mix und 100 µl Ion PGM™ Hi-Q Ion Sphere Particles (ISPs) zusammen mit Ion PGM™ Hi-Q Reagent Mix gemischt, sodass hieraus ein Amplifikationsansatz von 1 ml Volumen entstand.

Tabelle 17: Amplifikationsansatz der qPCR

Reihenfolge	Reagenzien	Volumen
1	Ion PGM™ Hi-Q Reagent Mix	800 µl
2	Nuklease-freies Wasser	25 µl
3	Ion PGM™ Hi-Q Enzyme Mix	50 µl
4	Verdünnte DNA-Library	25 µl
5	Ion PGM™ Hi-Q ISPs	100 µl
	Insgesamt	1000 µl

Nachdem dieser für 5 s gevortext worden war, war er für 15 min stabil und wurde vorsichtig in den Reaktionsfilter gegeben. Anschließend wurden unter Verwendung einer 1000 µl Pipette zwei Mal 850 µl Reaktionsöl hinzu pipettiert, damit die Lösung vollständig bedeckt war. Der Ion OneTouch™ wurde dann nach den Anweisungen des Geräts mit dem Filter beladen und gestartet. Ein Durchlauf dauerte ungefähr 6,5 h und es sollte spätestens 16 h nach dessen Ende mit der finalen Zentrifugation für 10 min fortgefahren werden. Hierfür wurden die Recovery Tubes aus der Maschine geholt, der Überstand bis auf 50 µl verworfen. Beide Pellets wurden in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert und die Lösung anschließend in ein frisches 1,5 ml-LoBind Tube überführt. Die Recovery Tubes wurden mit 500 µl der OneTouch™ Waschlösung gespült und die entstandene Spüllösung ebenfalls in das LoBind Tube gegeben. Das Produkt konnte bei Bedarf bei 4 °C für 3 Tage gelagert werden.

Im nächsten Schritt wurde die Mischung für 2,5 min bei 15.500 x g zentrifugiert, der Überstand bis auf 100 µl verworfen und die Pellets in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert. Für die ISP-Quantifizierung wurden 2 µl der ISPs in ein zusätzliches 0,2 ml-Röhrchen aliquotiert.

Waschen und Anreicherung der ISPs (Ion OneTouch™ ES)

Zur Vorbereitung des 8-Well-Strip wurde die im vorherigen Schritt hergestellte Suspension der ISP-Proben in Well 1 gegeben. Danach wurde die Melt-Off-Lösung aus 40 µl NaOH und 280 µl Tween™ Lösung angesetzt und 300 µl davon in Well 7 überführt. Für Well 2 wurden die Ion PGM Enrichment Beads vorbereitet, indem 13 µl der Streptavidin-gekoppelten Dynabeads in ein 1,5 ml-LoBind™ Tube gegeben und dieses für 2 min in den Magneten gestellt wurde. Anschließend wurde der Überstand entfernt, der Inhalt mit 130 µl MyOne™ Beads Waschlösung versetzt, gevortext und in

Well 2 überführt. Well 3, 4 und 5 wurden mit 300 µl OneTouch™ Waschlösung befüllt, Well 6 und 8 blieben leer. Das 8-Well-Strip wurde in das Gerät Ion OneTouch™ ES eingesetzt und das Enrichment-Programm gestartet. Nach Beendigung waren etwa 230 µl ISPs im PCR-Röhrchen, welche bei 4 °C für 4 Tage gelagert werden konnten.

Tabelle 18: Inhalt des 8-Well-Strip für den Ion OneTouch™ ES

Well-Nummer	Inhalt
Well 1	100 µl Template-positive ISPs
Well 2	130 µl MyOne™ Dynabeads resuspendiert in MyOne™ Beads Waschlösung
Well 3	300 µl OneTouch™ Waschlösung
Well 4	300 µl OneTouch™ Waschlösung
Well 5	300 µl OneTouch™ Waschlösung
Well 6	-
Well 7	300 µl Melt-Off-Lösung
Well 8	-

Quantifizierung der ISPs am Qubit™ Fluorometer

Für die Quantifizierung der ISPs wurden zunächst die während der Vorbereitung zur qPCR zurückgestellten 2 µl der ISP-Proben mit 19 µl Annealing-Puffer und 1 µl Ion Sphere™ Quality Control Kit Ion Sonden versetzt und im Thermocycler inkubiert. Dieser erwärmte den Ansatz im Programm „NGS-Q“ erst für 2 min auf 95 °C, dann für 2 min auf 37 °C und hielt sie dann bei 22 °C. Nachdem die Lösung anschließend drei Mal mit jeweils 100 µl Wasch-Puffer gewaschen, bei 15000 x g für 2 min zentrifugiert und der Überstand jeweils bis auf 15 µl verworfen worden war, wurde die entstandene Lösung in 185 µl Wasch-Puffer resuspendiert und in ein Qubit™ Tube überführt. Als nächstes wurde mit einem mit Wasch-Puffer befüllten Röhrchen eine Leerprobe des Fluorometers durchgeführt, der dann die Messungen der ISPs bei 488 nm und 647 nm folgten. Die Messung bei 488 nm zeigte die Gesamtmenge der beladenen ISPs und die bei 647 nm lediglich die Template-positiven ISPs - wie in Abbildung 1 dargestellt.

Die ISPs sollten für eine gute Qualitätsgarantie 10-30 % Template-positiv, das heißt mit PCR-Produkten beladen, sein.

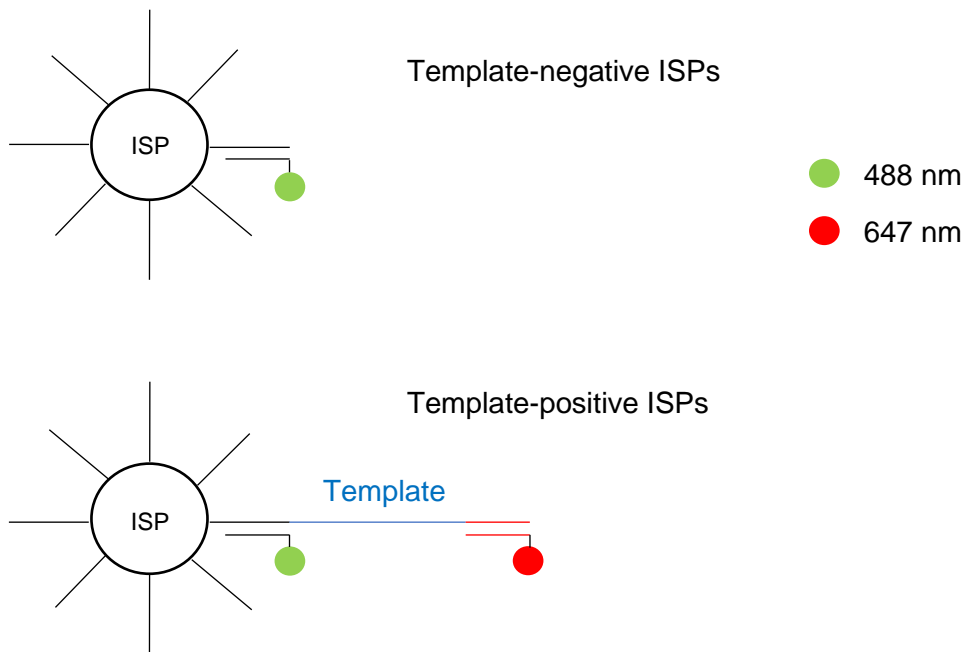


Abbildung 1: Prinzip der ISP-Quantifizierung. Durch Messung der ISP-Proben am Fluorometer konnten die Template-negativen von den Template-tragenden ISPs unterschieden werden. Die Messung bei 488 nm zeigte die Gesamtzahl der beladenen ISPs, während die Messung bei 647 nm nur die Template-positiven ISPs zeigte.

Sequenzierung (Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2)

Der eigentliche Ion Torrent-Lauf wurde mit dem Ion PGM™ durchgeführt. Dieser musste vor Verwendung zunächst gereinigt und initialisiert werden. Einmal pro Woche wurde hierfür eine Chlorit-, und ansonsten vor jedem Durchlauf eine Wasserwaschung durchgeführt. Die Reagenzienbehälter wurden mit 350 µl 100 mmol Natriumhydroxid (NaOH) (Waschflasche 2), 50 ml Sequencing v2 1X W3 Lösung (Waschflasche 3) beziehungsweise 2,5 L MilliQ Wasser, einer Flasche (126,25 ml) der Sequencing v2 W2 Lösung und 93 µl 100 mmol NaOH (Waschflasche 2) befüllt und an den entsprechenden Stellen des Geräts befestigt. Während der pH-Wert mit einem automatischen Programm auf 7,5 festgesetzt wurde und dadurch kleinste Verschiebungen durch Oxidation durch den Luftsauerstoff vermieden werden sollten, konnte der Lauf auf dem Ion Torrent™ Server angelegt werden. Anschließend wurden die vier Tubes mit je 20 µl der entsprechenden desoxy-Nukleosidtriphosphaten (dNTPs) (desoxy-Guanintriphosphat (dGTP), desoxy-Cytosintriphosphat (dCTP),

desoxy-Adenosintriphosphat (dATP), desoxy-Tyrosintriphosphat (dTTP)) befüllt, wobei besonders sorgfältig gearbeitet und eine Verunreinigung unbedingt vermieden werden sollte. Für die Vorbereitung der ISPs wurden 5 µl der angereicherten Template-positiven ISPs zentrifugiert und der Überstand bis auf 15 µl verworfen. Anschließend wurde diese Lösung mit 12 µl Primer versetzt, in den Thermocycler gegeben und zunächst das Programm „NGS-Q“ durchlaufen (2 min 95 °C, 2 min 37 °C, hold 22 °C). Danach wurden noch 3 µl Polymerase zugefügt und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Vor Beladen des Chips musste dieser noch einem Check unter Befolgung der Anweisungen auf dem Geräte-Touchscreen unterzogen und die Flüssigkeit mittels Pipette und Zentrifugation aus dem Chip entfernt werden.

Anschließend konnte die gesamte Menge der vorbereiteten ISPs mit der Pipette vorsichtig unter Vermeidung von Blasenbildung in die vorgesehene Ladeöffnung gegeben werden. Für eine bestmögliche Verteilung der Partikel wurde der Chip erneut mehrmals zentrifugiert, die Probenflüssigkeit mittels Pipette gemischt und der Überstand entfernt. Sobald der Chip vollständig beladen war, wurde dieser in den Ion PGM™ eingesetzt und der Lauf gestartet. Dieser dauerte ungefähr 7,5 h.

Die Sequenzierung mit dem Ion Torrent basierte auf der Methode der Halbleitersequenzierung. Hierbei wurden während des Replikationszyklus freiwerdende Protonen mittels eines Halbleiters detektiert und die hierdurch erzeugte pH-Änderung gemessen. Durch sequenzielle Hinzugabe der vier verschiedenen dNTPs konnte somit auf die DNA-Sequenz geschlossen werden.

Die Daten der Sequenzierungsläufe wurden mithilfe der Ion Reporter Software v5.2 (Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland) verarbeitet und anschließend in den Programmen Microsoft Excel 2010 Version 14.6.0. (Microsoft Corporation, Redmond, USA), OncoPrint™ (Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland) und Integrative Genomic Viewer (Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, USA) analysiert, visualisiert und manuell überprüft.

Weitere genomische Annotationen wurden mit dem Biological Reference Repository¹¹ (BioR, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) [50] durchgeführt. Wir verwendeten PolyPhen2 (Harvard University, Boston, MA, USA) [51], Scale-Invariant Feature Transform (SIFT, Bioinformatics Institute, Singapur) [52], [53] und Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN, J. Craig Venter Institute, La Jolla, CA, USA) [54], [55], um die funktionellen Auswirkungen der einzelnen Mutationen abzuschätzen. Für die Analyse wurden somatische Varianten berücksichtigt, die entweder bekanntermaßen

kanzerogen waren - basierend auf der Auflistung in der Datenbank des Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC, Wellcome Sanger Institute, Hinxton, Cambridgeshire, UK) - oder die mit einer ausreichenden Allelhäufigkeit nachgewiesen wurden.

2.4 Datenerhebung der klinischen Parameter

Einschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Patienten, die im Zeitraum von 2014 bis 2017 am UKW aufgrund eines MMs behandelt wurden. Weitere Einschlusskriterien waren, dass bei den ausgewählten Patienten eine möglichst vollständige Informationserfassung im klinischen Informationssystem des UKW vorlag, diese mindestens 18 Jahre alt waren und im Rahmen der klinischen Routine eine KMP mit Biopsie und Aspirationen durchgeführt wurde. Die Indikation zur KMP war dabei diagnostischen oder therapeutischen Wertes beziehungsweise diente dem Staging vor SZT.

Tabelle 19: Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Histologisch bestätigtes MM	AL-Amyloidose
Patientenalter \geq 18 Jahre	Patientenalter $<$ 18 Jahre
Behandlung am UKW	MGUS
Material aus KMP vorhanden	
Vollständige Informationen im KIS verfügbar	

Klinische Parameter und Definitionen

Von den eingeschlossenen Patienten wurden zuvor festgelegte relevante klinische Parameter erhoben. Laborparameter und Datumsangaben wurden numerisch dokumentiert Für andere wurden vor Beginn der Datensammlung klare Definitionen festgelegt. Dies stellte eine einheitliche Bewertung aller Patienten sicher.

Tabelle 20: Definitionen von Variablen im Rahmen der Datenerhebung

Variable	Definition
Anämie	Hämoglobingehalt im Serum < 10 g/dl
Hyperkalzämie	Kalzium im Serum > 2,75 mmol/l
Niereninsuffizienz	Kreatinin > 2 mg/dl oder GFR < 40 ml/min
LDH>ULN	LDH > 250 U/l
Ig-Typ	IgG, IgA, Leichtkette (Kappa, Lambda)
Early relapse	Rezidiv innerhalb 12 Monate nach Therapieende
Hochrisiko	t(4;14), t(14;16), t(14;20), del1p, del17p, gain1q/amp1q
Ultrahochrisiko	Double-Hit-MM (gleichzeitiges Vorliegen von zwei genetischen Hochrisikomarkern)
gain1q	Zugewinn des langen Arms von Chromosom 1 auf 3 Kopien
amp1q	Amplifikation des langen Arms von Chromosom 1 auf ≥ 4 Kopien
Refraktärität	Progrediente Erkrankung (PD) unter Therapie oder innerhalb von 60 Tagen nach Ende der Therapie
IMiD	Thalidomid, Lenalidomid, Pomalidomid
PI	Bortezomib, Carfilzomib
mAB	Daratumumab, Elotuzumab
SZT	Stammzelltherapie mit Unterscheidung zwischen autoSZT und allogener SZT (alloSZT)
Therapielinie	Zeit bis Progress beziehungsweise Wechsel der Medikation aufgrund Nichtansprechen oder Unverträglichkeit

Tabelle 21: Übersicht der erhobenen MM- und patientenbezogenen Variablen

Variable	Dokumentation
Geburtsdatum	
Geschlecht	männlich/weiblich
Datum ED	
Alter bei ED	
Datum des letzten FU	
Status bei letzten FU	lebend/verstorben

Sterbedatum	
ISS-Stadium	I/II/III
R-ISS-Stadium	I/II/III
MM-Typ	IgG/IgA/LC
LC-Typ	Kappa/Lambda
Zweitneoplasie	ja/nein
Kardiovaskuläre Vorerkrankung	ja/nein
Vorausgehendes MGUS	ja/nein
Zeit bis Übergang in MM in Monaten	
Klinische Parameter bei ED	
M-Gradient in g/l	
Albumin in g/dl	
Hämoglobin in g/dl	
β2-Mikroglobulin in mg/l	
LDH in U/l	
Bence-Jones-Proteinurie	ja/nein
Hyperkalzämie	ja/nein
Chronische Niereninsuffizienz	ja/nein
Anämie	ja/nein
Knochenläsionen	ja/nein
FLC-Quotient > 100	ja/nein
KM-Infiltration in %	
Klinische Parameter bei Sampling	
Hämoglobin in g/dl	
LDH in U/l	
Anämie	ja/nein
KM-Infiltration in %	
EMD	ja/nein
Plasmazelleukämie	ja/nein
NDMM	ja/nein
RRMM	ja/nein
Remissionsstatus	CR/VGPR/PR/SD/PD

Tabelle 22: Übersicht der Therapie-bezogenen Variablen

Variable	Dokumentation
Zeitpunkt vor Sampling	
IMiD	ja/nein
PI	ja/nein
Anti-CD-38	ja/nein
Anti-SLAMF7	ja/nein
SZT	ja/nein
Art der SZT	auto/allo
Letzte Therapie	
Anzahl an Therapielinien	
PD	ja/nein
PD unter IMiD	ja/nein
PD unter PI	ja/nein
IMiD-Refraktärität	ja/nein
PI-Refraktärität	ja/nein
mAB-Refraktärität	ja/nein
Zeitpunkt nach Sampling	
IMiD	ja/nein
PI	ja/nein
Anti-CD38	ja/nein
Anti-SLAMF7	ja/nein
Bestes Ansprechen	CR/VGPR/PR/SD/PD
PD unter IMiD	ja/nein
mAB-Refraktärität	ja/nein
Anzahl an Therapielinien	
Zeitpunkt unabhängig von Sampling	
IMiD	ja/nein
PI	ja/nein
mAB	ja/nein
SZT	ja/nein
Art der SZT	auto/allo

Anzahl an autoSZT	
Tandem-SZT	ja/nein
Bestes Ansprechen SZT	sCR/CR/VGPR/PR/SD/PD
Early relapse nach SZT	ja/nein

Die Laborparameter Hämoglobinwert (Hb), Serumkalzium, Kreatinin, LDH, Albumin, β 2-Mikroglobulin wurden jeweils zum Zeitpunkt der Erstdiagnose erfasst. Auch der histopathologisch nachgewiesene prozentuale Anteil an Knochenmarkinfiltration durch Plasmazellen aus der KMP wurde dokumentiert. An MM-spezifischen Parametern wurde der Typ des pathologisch produzierten Immunglobulins (IgG, IgA oder Leichtkette) und bei Leichtkettenmyelomen der Leichtkettentyp (Kappa, Lambda) erfasst. Zudem wurde dokumentiert, ob vor MM-Diagnosestellung ein MGUS und ob eine EMD des MMs oder eine Plasmazelleukämie vorlag.

Daneben wurden auch das jeweilige ISS-Stadium und R-ISS-Stadium zum Zeitpunkt der Erstdiagnose dokumentiert. Diese Angabe wurde hierbei teilweise zuvor aus den einzelnen erhobenen Parametern berechnet.

Die Zytogenetik zum Zeitpunkt der KMP wurde sowohl detailliert erfasst als auch gruppiert bezüglich des Vorliegens einer Standardrisiko-, Hochrisiko-, oder Ultrahochrisiko-Konstellation.

Außerdem wurden patientenbezogene Daten erhoben: Geschlecht, Datum der Diagnosestellung, Alter bei Diagnosestellung, Datum der Probenentnahme mittels KMP (= Sampling), Datum des letzten Follow-ups (FU) und der Status beim letzten Follow-up, wobei in lebend oder verstorben gruppiert wurde. Bei verstorbenen Patienten entsprach das Datum des letzten Follow-ups dem Sterbedatum des Patienten. Auch das Vorliegen von kardiovaskulären Erkrankungen und Zweitneoplasien wurde erfasst. Dies erfolgte unabhängig vom Diagnose- oder Samplingzeitpunkt.

Daneben wurden weitere Merkmale bezüglich der durchgeführten Therapien und angewandten Therapieregime erhoben: Wir dokumentierten, ob die Patienten eine IMiD-basierte Therapie erhalten hatten oder nicht und wenn ja, welche (Thalidomid/Lenalidomid/Pomalidomid) und über welchen Zeitraum; ob die Patienten einen oder mehrere PIs (Bortezomib/Carfilzomib) erhalten hatten oder nicht und ob die Patienten eine Therapie mit mABs erhalten hatten oder nicht und wenn ja, welche, wobei zwischen Daratumumab und Elotuzomab unterschieden wurde. Diese Angaben wurden sowohl für den Zeitpunkt vor als auch nach Sampling erfasst. Außerdem wurde

erhoben, ob die Patienten eine SZT erhalten hatten oder nicht und wenn ja, welche Art von SZT (autoSZT/alloSZT/beides), ob die SZT als Tandemtransplantation durchgeführt worden war oder nicht und ob es nach SZT zu einem frühen Rezidiv (engl. early relapse) innerhalb von 12 Monaten gekommen war oder nicht. Zu den jeweiligen Therapien nach Sampling wurde jeweils der Zeitpunkt des Therapiebeginns und -endes dokumentiert, sowie die Zeit bis zum Progress unter der jeweiligen Therapie. Außerdem wurde erhoben, ob zum Zeitpunkt des Samplings ein NDMM oder ein RRMM vorlag. Für die RRMM wurde zudem die Anzahl an Therapielinien bis zum Zeitpunkt des Samplings sowie der aktuelle Remissionsstatus erhoben. Des Weiteren wurde erfasst, ob eine Refraktärität auf eine der eingesetzten Therapieklassen (IMiDe, PIs, mABs) vorlag.

Das jeweilige Therapieansprechen wurde entsprechend der Kriterien der IMWG definiert und dokumentiert [56], [57].

Dokumentation und statistische Auswertung

Die Gesundheits- und Krankheitsdaten der eingeschlossenen Patienten wurden aus dem klinischen Informationssystem des UKW entnommen und sequenziell wie folgt verarbeitet: Datenbankanwendung ONKOSTAR in der Version 2.11.1.4. (IT-choice Software GmbH, Karlsruhe, Germany), Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2016 in der Version 2110 (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Die statistische Auswertung und Visualisierung erfolgten mit Hilfe von GraphPad Prism Version 9.0 (GraphPad, San Diego, USA). Hierbei wurden sowohl deskriptive als auch analytische Methoden angewandt und die Ergebnisse durch graphische Darstellung veranschaulicht. Die deskriptive Analyse von kategorialen und ordinalen Parametern wurde mit absoluten und prozentualen Häufigkeiten dargestellt, die von metrischen Variablen mit Median oder Mittelwert und Range (Minimum und Maximum). Das OS und PFS wurden mittels Hazard ratio quantifiziert und in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Vergleiche zwischen Kaplan-Meier-Kurven wurden mit Hilfe des Log-Rank-Tests durchgeführt.

Die Korrelation mehrerer Parameter - ausgenommen OS - wurde mit Hilfe einer Korrelationsmatrix und der nichtparametrischen Spearman-Korrelation analysiert. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test berechnet, Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen mittels One-way ANOVA. Bei sehr kleinen Gruppengrößen und fehlender Normalverteilung

wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Die Resultate wurden mit p-Werten sowie 95 %-Konfidenzintervall (95% CI) angegeben.

Für alle Analysen sollte die Wahrscheinlichkeit, den tatsächlich vorhandenen Unterschied mit dem statistischen Test aufzudecken, 80 % erreichen (Power 0,8). Eine relevante Wahrscheinlichkeit für einen Unterschied wurde ab einem Wert von 5 % ($\alpha = 5\%$) angenommen.

Variablen, bei denen mehr als die Hälfte der Daten nicht zu erheben, fehlerhaft oder unvollständig waren, wurden in die Analyse nicht einbezogen.

Klinische Endpunkte

Der Tag der Erstdiagnose wurde als Tag 0 festgelegt, sodass das OS als Zeitraum zwischen Tag der Erstdiagnose und Todestag beziehungsweise letztem Tag des Follow-up bei Überlebenden definiert werden konnte.

Das PFS definiert das Intervall zwischen dem Tag der Erstdiagnose bis zum Progress, Tod oder letztem Tag des Follow-up.

Die Überlebenszeit nach der Probengewinnung (engl. survival after sampling, Sas) stellt die Zeitspanne von der Materialgewinnung mittels KMP bis zum Tod oder letzten Tag des Follow-up dar. Analog hierzu bezeichnet das progressionsfreie Überleben nach Probengewinnung (engl. progressionfree survival after sampling, PFSas) das Intervall zwischen Tag der Probenentnahme und nachfolgend erstem Progress.

Alle Daten wurden bis zum Datenaufnahmeschluss (10. Dezember 2019) erfasst.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristik

Die Kohorte ist in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Patientencharakteristik des Gesamtkollektivs

Charakteristika		Median	Range
Alter bei ED		58	34-82
Alter bei KMP		62	39-82
Alter bei Tod		63	41-82
Therapielinie		4	1-13
		Anzahl n	Häufigkeit, %
Geschlecht			
	männlich	37	(63)
	weiblich	22	(37)
MM-Subtyp			
	IgG	29	(49)
	IgA	16	(27)
	Leichtketten	14	(24)
	Kappa	11	(79)
	Lambda	3	(21)
ISS bei ED			
	I	27	(46)
	II	19	(32)
	III	10	(17)
	unbekannt	3	(5)
R-ISS bei ED			
	I	13	(22)
	II	35	(59)
	III	8	(14)
	unbekannt	3	(5)
CRAB bei ED			
	Hyperkalzämie	10	(17)
	Niereninsuffizienz	7	(12)
	Anämie	21	(36)
	Knochenläsionen	42	(71)
Krankheitsstadium bei KMP			
	NDMM	4	(7)
	RRMM	55	(93)
Zytogenetik bei KMP			
	Hyperdiploidie	30	(53)
	del13q	27	(47)
	gain1q	10	(18)
	amp1q	7	(12)
	del17p	10	(18)
	t(4;14)	10	(18)

t(11;14)	5	(9)
del14q	3	(5)
Genetisches Risiko bei KMP		
Standardrisiko	27	(46)
Hochrisiko	20	(34)
Ultrahochrisiko	10	(17)
unbekannt	2	(3)
Remissionsstatus bei KMP		
PD	38	(64)
SD	9	(15)
PR	6	(10)
VGPR	2	(3)
ED	4	(7)
Behandlung im gesamten Therapieverlauf		
IMiD	53	(90)
PI	57	(97)
mAB	30	(51)
SZT	52	(88)
autoSZT	45	(87)
single autoSZT	16	(31)
tandem autoSZT	34	(65)
auto-alloSZT	7	(12)
Bestes Ansprechen SZT		
sCR	4	(8)
CR	14	(27)
VGPR	18	(35)
PR	12	(23)
SD	2	(4)
PD	1	(2)
unbekannt	1	(2)
Early relapse SZT		
autoSZT	13	(29)
alloSZT	5	(71)
Vorerkrankungen		
Zweitneoplasie	12	(20)
Kardiovaskulär	37	(63)

Unter Anwendung der Ein- und Ausschlusskriterien konnten insgesamt 59 Patienten eingeschlossen werden. Hierunter befanden sich 22 Frauen (37 %) und 37 Männer (63 %). Die Mehrheit der eingeschlossenen Patienten gehörte in die Gruppe der RRMM. Lediglich 4 Patienten waren neudiagnostizierte MM-Patienten (NDMM). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren die Patienten im Median 58 Jahre (Range: 34-82) alt. Das mediane Patientenalter zum Zeitpunkt des Samplings lag bei 62 Jahren (Range: 39-82). Die Probenentnahme erfolgte im Mittel 48 Monate (Range: 0-237) nach Primärdiagnose. Die mittlere Beobachtungszeit nach KMP betrug 71 Monate (4-280), in denen 24 Todesfälle und insgesamt 261 Progressionsereignisse auftraten. Bei

8 der untersuchten 59 Patienten (13 %) war vor der MM-Diagnose eine MGUS bekannt gewesen. Die Zeit bis zum Auftreten eines symptomatischen MMs betrug im Median 47 Monate (Range: 15-155) nach MGUS-Diagnose. Eine EMD wiesen zum Zeitpunkt der KMP 15 von 59 Patienten (25 %) auf. Bei 3 Patienten (5 %) hatte sich im Krankheitsverlauf eine Plasmazelleukämie entwickelt. In der Mehrzahl der Fälle konnte das MM den Subtypen des IgG (29 Patienten, 49 %) oder IgA sekretierenden MMs (16 Patienten, 27 %) zugeordnet werden. Bei 14 Patienten (24 %) handelte es sich um ein sogenanntes Leichtketten-MM. Unter dieser Subgruppe konnte bei 11 Patienten (79 %) eine Kappa- und bei 3 Patienten (21 %) eine Lambda-Leichtketten-Produktion dokumentiert werden.

Nach ISS konnten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 27 Patienten (46 %) in Stadium I, 19 Patienten (32 %) in Stadium II und 10 Patienten (17 %) in Stadium III klassifiziert werden. Bezogen auf die R-ISS-Klassifikation lag bei 13 Patienten (22 %) Stadium I, bei 35 Patienten (59 %) Stadium II und bei 8 Patienten (14 %) Stadium III vor. Bei 3 Patienten (5 %) konnte aufgrund fehlender Daten das ISS- und R-ISS-Stadium nicht erhoben werden. Hinsichtlich der CRAB-Kriterien hatten bei Diagnosestellung 10 Patienten (17 %) eine Hyperkalzämie, 7 Patienten (12 %) eine Niereninsuffizienz. Bei 21 Patienten (36 %) konnte eine Anämie mit einem Hämoglobinwert unterhalb des jeweiligen unteren Grenzwerts dokumentiert werden. Der mittlere Hämoglobingehalt der Kohorte lag bei 10,8 g/dl (Range: 6,5-15,3). Knochenläsionen in Form von Osteolysen in der Bildgebung wurden bei 42 Patienten (71 %) nachgewiesen werden.

Des Weiteren waren von 57 der 59 Patienten (97 %) zu mindestens einem Zeitpunkt innerhalb des Krankheitsverlaufs zytogenetische Untersuchungen mittels FISH oder konventioneller Chromosomenanalyse verfügbar. Am häufigsten wurde hier bei 53 % der Patienten (n = 30) ein hyperdiploider Chromosomensatz gefunden. Eine del13q lag bei 27 Patienten (47 %) vor. Ein Zugewinn von 1q wurde bei insgesamt 17 Patienten (30 %) detektiert, worunter 10 Patienten (18 %) einen gain1q mit 3 Kopien und 7 Patienten (12 %) eine amp1q mit 4 und mehr Kopien hatten. Jeweils 10 der 57 Patienten (18 %) wiesen eine t(4;14) und eine del17p mit einer mittleren CCF von 55 % (Range: 16-92) auf. Weniger häufig wurde eine t(11;14) bei 5 Patienten (9 %) sowie eine del14q bei 3 Patienten (5 %) beobachtet. Auffällig war hierbei, dass alle Patienten mit t(4;14) gleichzeitig auch eine del13q hatten. Unter den Patienten ohne eine t(4;14) fanden wir hingegen nur bei 36 % (17 von 47 Patienten) eine del13q. Patienten mit

t(4;14) zeigten somit signifikant häufiger eine del13q als die Patienten ohne diese Translokation ($p = 0,001$. 95% CI -1,010 bis -0,2669).

Gemäß der Definitionskriterien nach Walker et al. [39] lag zum Zeitpunkt der KMP - und somit im Vergleich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose deutlich später im Krankheitsverlauf - in 27 Fällen (46 %) ein Standard-Risikoprofil vor, wohingegen 20 Patienten (34 %) zur Hochrisiko- und 10 Patienten (17 %) zur Ultrahochrisiko-Gruppe der Double-Hit-MM mit gleichzeitigem Vorliegen von zwei genetischen Hochrisikomarkern gehörten. Auffällig hierbei war, dass in der zytogenetischen Risikostratifizierung zum Zeitpunkt des Samplings ein großer Anteil der Patienten (30 Patienten, 51 %) in die Hochrisiko-Gruppe eingestuft wurde, während zum Zeitpunkt der Primärdiagnose - und damit auch früher im Krankheitsverlauf - der Anteil an ISS- und R-ISS-Stadium III eher gering war (17 % und 14 %). Dies ist Ausdruck der klonalen Evolution des MMs.

Nach den Kriterien der IMWG [56], [57] befand sich die Mehrheit der Patienten (38 Patienten, 64 %) zum Zeitpunkt der KMP im Stadium der progressiven Erkrankung (engl. progressive disease, PD), 9 Patienten (15 %) in einer stabilen Phase der Grunderkrankung (engl. stable disease, SD). In 6 Fällen (10 %) konnte eine partielle Remission (engl. partial remission, PR) und in 2 Fällen (3 %) eine sehr gute partielle Remission (engl. very good partial remission, VGPR) dokumentiert werden. Bei 4 Patienten (7 %) wurde durch die Probenentnahme im Rahmen der Studie die Erstdiagnose MM gestellt.

An Vorerkrankungen wiesen 37 Patienten (63 %) kardiovaskuläre Risikofaktoren und 12 Patienten (20 %) eine Zweitneoplasie auf. Unter letzteren hatten jeweils zwei dieser Patienten (jeweils 18 %) zusätzlich zum MM ein Urothelkarzinom beziehungsweise Mammakarzinom. Die weiteren Tumorentitäten der Patienten mit Zweitneoplasie waren bei je einem Patienten ein Ösophaguskarzinom, Rektumkarzinom, Prostatakarzinom, Endometriumkarzinom, Schilddrüsenkarzinom und malignes Melanom. Bei einem Patienten war das MM im Krankheitsverlauf in eine sekundäre akute myeloische Leukämie übergegangen. Bei einem weiteren Patienten war neben dem MM eine Haarzelleukämie bekannt.

Unter Betrachtung des gesamten Therapieverlaufs bis zum Ende des Beobachtungszeitraums erhielten insgesamt 53 der 59 Patienten (90 %) mindestens ein Medikament der IMiD-Substanzgruppe, 57 Patienten (97 %) mindestens einen PI und 30 Patienten (51 %) einen oder mehrere mAB. Bei 52 Patienten (88 %) wurde zu

einem Zeitpunkt des Behandlungsverlaufs unabhängig vom Sampling eine SZT durchgeführt. In 45 dieser 52 Fälle (87 %) handelte es sich hierbei ausschließlich um eine autoSZT, 7 Patienten (13 %) erhielten neben einer autoSZT auch eine allogene Stammzelltransplantation (alloSZT). Unter den Patienten mit autoSZT wurde bei 16 von 52 Patienten (31 %) eine single autoSZT durchgeführt. Bei 34 Patienten (65 %) wurde die autoSZT als tandem autoSZT innerhalb von 6 Monaten wiederholt. Durch die Behandlung mittels SZT konnten 4 Patienten (8 %) eine stringente CR (sCR) und 14 Patienten (27 %) eine CR erreichen. 18 Patienten (35 %) befanden sich nach Therapieende in einer VGPR und 12 Patienten (23 %) in einer PR. Bei 2 Patienten (4 %) lag das beste Ansprechen der SZT in einer SD, in einem Fall (2 %) in einer PD und in einem weiteren Fall (2 %) war es unbekannt. Im weiteren Therapieverlauf kam es bei 13 der 45 Patienten (29 %) mit autoSZT zu einem frühen Rezidiv innerhalb von 12 Monaten nach Transplantation, ebenfalls bei 5 von 7 Patienten (71 %), die im Vorfeld eine alloSZT erhalten hatten.

Tabelle 24: Therapiecharakteristika der Gruppe der RRMM-Patienten

RRMM		Anzahl n	Häufigkeit, %
Vorthérapien	SZT	49	(89)
	auto	42	(76)
	allo	7	(13)
IMiD		39	(71)
	Thal	6	(15)
	Len	38	(97)
	Pom	20	(51)
PI		46	(84)
	Bort	45	(98)
	Carf	12	(22)
mAB		12	(22)
	Dara	7	(13)
	Elo	7	(13)
Progress bis KMP	IMiD	28	(72)
	PI	21	(46)
	mAB	7	(58)
Refraktaritat bis KMP	IMiD	27	(69)
	PI	17	(37)
	mAB	5	(42)

Die Gruppe der RRMM-Patienten war stark vorbehandelt. Die 55 RRMM-Patienten wurden im Median in der vierten Therapielinie (Range: 1-13) sequenziert, was einem Zeitraum von 52 Monaten (Range: 2-240) nach Primärdiagnose entsprach. Im Rahmen der Vortherapien hatten 39 von 55 Patienten (71 %) bereits mindestens ein Medikament aus der IMiD-Substanzklasse wie Thalidomid, Lenalidomid oder Pomalidomid erhalten. Die mittlere Behandlungsdauer mit IMiDen lag bei 11 Monaten (Range: 4-47), worunter es bei 28 Patienten (72 %) dieser Patienten zu einer Krankheitsprogression kam. Zudem entwickelten 27 Patienten (69 %) im Therapieverlauf bis zum Sampling eine Refraktärität gegenüber dieser Medikamentenklasse.

46 Patienten (84 %) waren vor der Probenentnahme mit mindestens einem PI wie Bortezomib und/oder Carfilzomib behandelt worden. Von ihnen entwickelten 21 Patienten (46 %) in diesem Zeitraum einen Progress unter PI und 17 Patienten (37 %) wiesen zum Zeitpunkt des Samplings bereits eine Refraktärität gegenüber PI auf.

Eine Immuntherapie basierend auf mAB wie Daratumumab oder Elotuzumab hatten zu diesem Zeitpunkt 12 der 55 RRMM-Patienten (22 %) erhalten. Unter ihnen zeigten 5 Patienten (42 %) zum Zeitpunkt der KMP und insgesamt 10 Patienten (71 %) im weiteren Behandlungsverlauf bis Ende des Beobachtungszeitraums kein Ansprechen mehr auf die mAB-Substanzklasse.

Tabelle 25: Mittels M³P-Panel-Sequenzierung nachgewiesene Mutationen des Patientenkollektivs

Mutation	Anzahl n	Häufigkeit, %
Keine	12	(20)
KRAS	9	(15)
NRAS	7	(12)
DIS3	7	(12)
ATM	7	(12)
TP53	5	(8)
BRAF	5	(8)
FAM46C	5	(8)
IRF4	4	(7)
CRBN	3	(5)
FGFR3	3	(5)
MAX	3	(5)
WHSC1	3	(5)
CCND1	2	(3)
IDH1	2	(3)
IL6ST	2	(3)
PSMD1	2	(3)
RIPK4	2	(3)
SP140	2	(3)
TLR4	2	(3)
ACTG1	1	(2)
BIRC3	1	(2)
CARD11	1	(2)
CUL4B	1	(2)
CYLD	1	(2)
DUSP2	1	(2)
EGFR	1	(2)
EGR1	1	(2)
IFNGR2	1	(2)

IGF1R	1	(2)
IKZF1	1	(2)
IL6R	1	(2)
JAK2	1	(2)
KDM6A	1	(2)
MYC	1	(2)
NFkBIA	1	(2)
PIK3CA	1	(2)
PIK3R2	1	(2)
PIM1	1	(2)
PSMB5	1	(2)
PSMB8	1	(2)
PTPN11	1	(2)
RASA2	1	(2)
TET2	1	(2)
TRAF2	1	(2)
TRAF3	1	(2)

Im Hinblick auf die genetische Variabilität des MMs konnte bei insgesamt 15 Patienten (25 %) eine *RAS*-Mutation detektiert werden. Hierunter wiesen 9 Patienten (15 %) eine *KRAS*-Mutation und 7 Patienten (12 %) eine *NRAS*-Mutation auf, ein Patient zeigte sowohl eine *KRAS*- als auch *NRAS*-Mutation. Ebenfalls in jeweils 7 von 59 Patienten (12 %) konnten eine *DIS3*- und *ATM*-Mutation gefunden werden. Jeweils 5 Patienten (8 %) wiesen eine Mutation von *TP53*, *BRAF*, *FAM46C* auf, 4 Patienten (7 %) eine *IRF4*-Mutation und jeweils 3 Patienten (jeweils 5 %) eine Mutation in *CRBN*, *FGFR3*, *MAX*, *WHSC1*. Die Mutationen *ACTG1*, *BIRC3*, *CARD11*, *CUL4B*, *CYLD*, *DUSP2*, *EGFR*, *EGR1*, *IFNGR2*, *IGF1R*, *IKZF1*, *IL6R*, *JAK2*, *KDM6A*, *MYC*, *NFkBIA*, *PIK3CA*, *PIK3R2*, *PIM1*, *PSMB5*, *PSMB8*, *PTPN11*, *RASA2*, *TET2*, *TRAF2*, und *TRAF3* fanden wir jeweils nur in einem der Patienten (jeweils 2 %). In 12 Fällen (20 %) war keine Mutation in keinem der untersuchten Panel-Gene nachzuweisen.

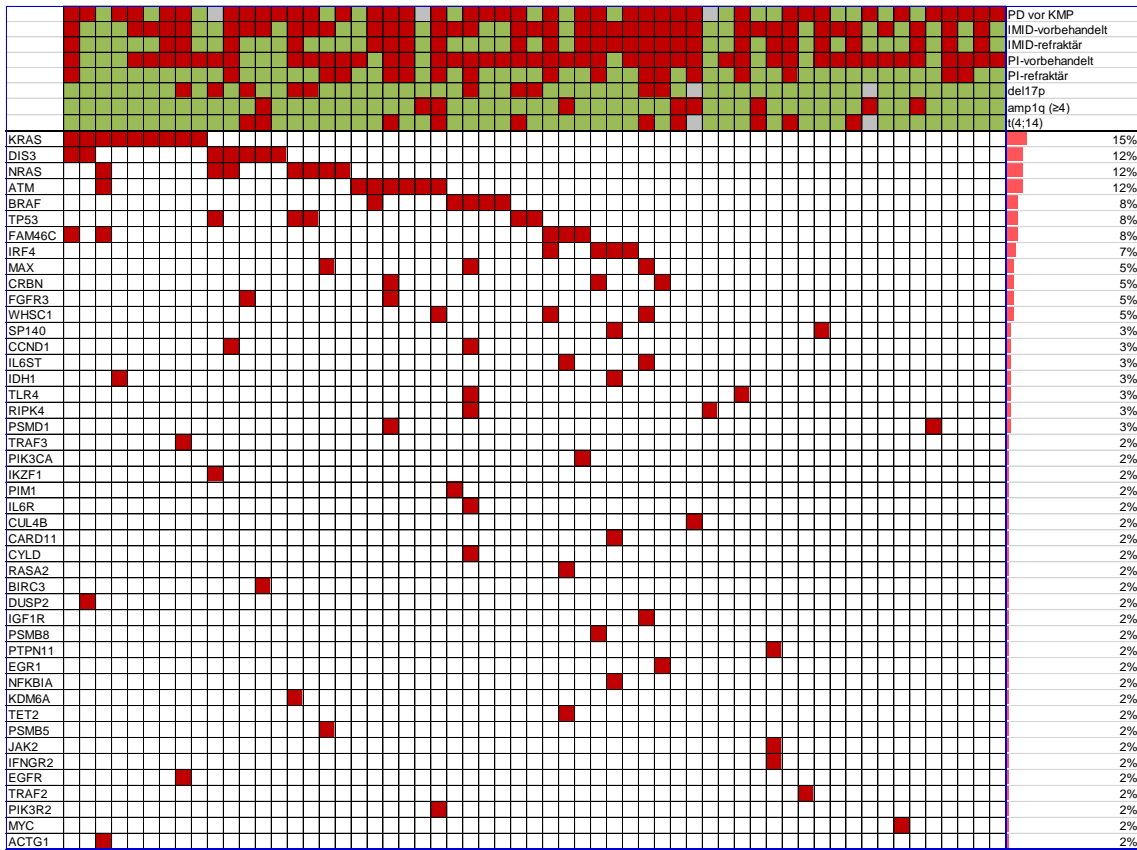


Abbildung 2: Übersicht der untersuchten Patientenkohorte hinsichtlich Zytogenetik und Molekulargenetik. Dargestellt ist ein zyto- und molekulargenetisches Profil der untersuchten Patientenkohorte, wobei jede vertikale Spalte einen der insgesamt 59 Patienten abbildet. Im oberen Teil sind auf der rechten Seite bedeutende Charakteristika genannt. Trifft für einen Patienten das genannte Merkmal zu, ist dies mit einem roten Feld gekennzeichnet, während bei einem grünen Feld das entsprechende Merkmal nicht zutrifft. Bei grau hinterlegten Feldern war die jeweilige Information nicht bekannt. Im unteren Teil sind linksseitig die untersuchten Gene aufgelistet, ein Vorliegen der entsprechenden Mutation ist mit einem roten Feld gekennzeichnet, der Wildtyp mit einem weißen Feld. In der rechten Spalte sind mittels Balkendiagramm zudem die Häufigkeit der jeweiligen Mutation in % dargestellt.

3.2 Molekulargenetische Analysen

Die MM-Proben wurden mit einer durchschnittlichen Tiefe von 582x sequenziert. Die mittlere Leselänge betrug 228 Basenpaare.

Insgesamt identifizierten wir 108 somatische Varianten, darunter 1 (<1 %) Frameshift-Deletion, 10 (9 %) Nonsense-, 96 (89 %) Missense-Mutationen und 1 (<1 %) Variante in Spleiß-Donor- oder -Empfängerstellen. Die mittlere Varianten-Allelfrequenz (VAF) - bei methodisch fehlender Korrektur für mögliche chromosomale Kopienzahlveränderung - lag für alle identifizierten Mutationen bei 27 % (Range: 2-97). Die VAF für Frameshift-Deletion betrug 47 %, für Nonsense-Mutationen 18 % (Range: 2-44) und für Missense-Mutationen 29 % (Range: 2-97). Bei 5 Patienten (8 %) wurden Mehrfachmutationen innerhalb desselben Gens festgestellt. Die häufigsten mit 4 Varianten wurden im *PSMB5*-Gen bei einem Patienten gefunden. Andere Gene mit mehr als einer Mutation waren *BRAF*, *ATM*, *TP53* und *FGFR3*.

Insgesamt wurden Vorhersagen über die biologischen Auswirkungen für 31 der Punktmutationen errechnet. Bei 12 % der Mutationen wurde eine aktivierende Wirkung auf Zellzyklus und Proliferation vorausgesagt. 9 % der Mutationen betrafen ein Tumorsuppressorprotein. Bei 4 % war ein Protein des PI-Signalwegs und bei 14 % eines aus dem IMiD-Signalweg betroffen. Die mittlere VAF der als aktivierend eingeschätzten Punktmutationen betrug 39 % (Range: 3-92). Die VAF für die betroffenen Tumorsuppressorproteine lag bei 29 % (Range: 3-76), für PI-Signalweg-Proteine bei niedrigen 4 % (Range: 2-33) und für IMiD-Signalwegproteine bei 26 % (Range: 2-63).

Die Anzahl der Mutationen pro Patient lag im Mittel bei 1,9 Mutationen und reichte von 0 bis 7 Mutationen. Unter den Patienten in R-ISS-Stadium I fanden wir durchschnittlich 1,1 Mutationen pro Patient, unter denen in R-ISS-Stadium II 1,8 Mutationen pro Patient. Patienten in R-ISS-Stadium III wiesen hingegen im Mittel 3,6 Mutationen pro Patient auf und somit signifikant mehr als Patienten in R-ISS-Stadium II ($p = 0,013$. Differenz $-1,796 \pm 0,609$. 95% CI $-3,267$ bis $-0,326$) und Patienten in R-ISS-Stadium I ($p = 0,002$. Differenz $-2,542 \pm 0,710$. 95% CI $-4,254$ bis $-0,829$).

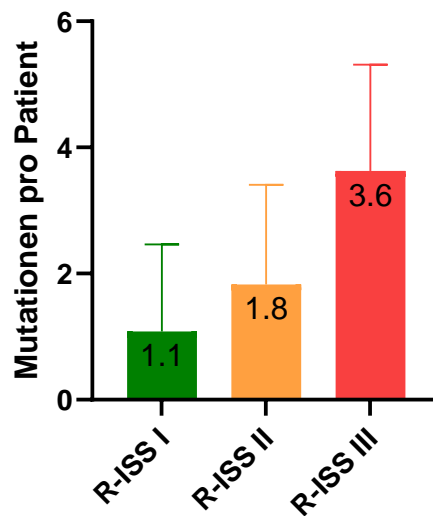


Abbildung 3: Anzahl an nachgewiesenen Mutationen pro Patient in Abhängigkeit des R-ISS-Stadiums. Es wurden die Subgruppen an Patienten nach Einteilung anhand der R-ISS-Klassifikation auf die jeweilige Anzahl an nachgewiesenen Mutationen verglichen. Patienten in R-ISS-Stadium I wiesen im Mittel 1,1 Mutationen pro Patient auf, Patienten in R-ISS-Stadium II 1,8 Mutationen und Patienten in R-ISS-Stadium III 3,6 Mutationen pro Patient auf. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung nach oben.

Daneben korrelierte die Zahl der Therapielinien vor Sampling (durchschnittlich 4 Therapielinien) signifikant mit der Anzahl an nachweisbaren Mutationen pro Patient ($r = 0.547$, $p < 0.001$, 95% CI 0.327 bis 0.711), das heißt je mehr Therapielinien der Probengewinnung mittels KMP vorausgingen, desto mehr Mutationen konnten in der Knochenmarkprobe nachgewiesen werden. Dies ist Ausdruck der zunehmenden Akquisition von Mutationen mit fortschreitender Erkrankung und somit der klonalen Evolution des MMs. Mindestens eine Mutation wurde bei 80 % ($n = 47$) der Patienten und 51 % ($n = 45$) der 88 Panel-Gene festgestellt. Bei 12 Patienten (20 %) wurde keine Mutation gefunden. Möglicherweise waren allerdings bei Patienten in guter Remission und ohne nachweisbare Mutationen keine malignen Plasmazellen im Knochenmarkaspirat enthalten. Wir verglichen auch die Anzahl der mutierten Gene anhand des zytogenetischen Risikos. Patienten mit Standardrisiko wiesen im Mittel 1,3 Mutationen pro Patient auf, Patienten mit Hochrisiko 2,0 Mutationen und Patienten mit Ultrahochrisiko 3,5 Mutationen pro Patient. Somit fanden wir bei Patienten mit Ultrahochrisiko-Zytogenetik signifikant mehr Mutationen pro Patient als bei Patienten mit Standardrisiko-Zytogenetik ($p = 0,001$. Differenz $-2,167 \pm 0,567$. 95% CI $-3,532$ bis

-0,801) und Hochrisiko-Zytogenetik ($p = 0,038$. Differenz $-1,5 \pm 0,593$. 95% CI $-2,929$ bis $-0,071$).

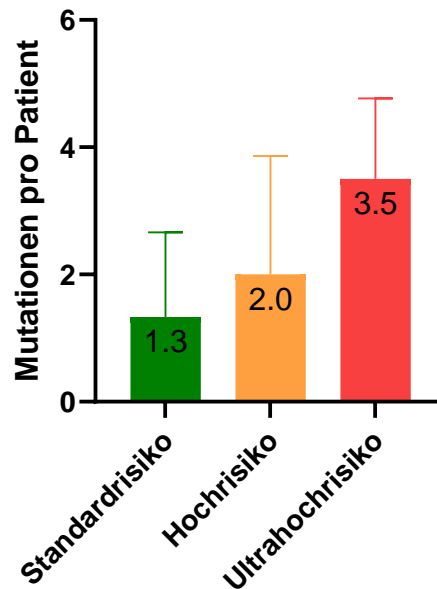


Abbildung 4: Anzahl an nachgewiesenen Mutationen pro Patient in Abhängigkeit des zytogenetischen Risikos. Es wurden die Subgruppen an Patienten nach Einteilung anhand des zytogenetischen Risikos auf die jeweilige Anzahl an nachgewiesenen Mutationen verglichen. Während Patienten mit Standardrisiko-Zytogenetik 1,3 Mutationen pro Patient aufwiesen, fanden wir bei Patienten mit Hochrisiko-Zytogenetik 2,0 Mutationen und bei Patienten mit Ultrahochrisiko-Zytogenetik 3,5 Mutationen pro Patient. Patienten mit Ultrahochrisiko-Zytogenetik zeigten somit signifikant mehr Mutationen pro Patient als Patienten mit Standardrisiko-Zytogenetik ($p = 0,001$) und Hochrisiko-Zytogenetik ($p = 0,038$). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung nach oben.

Außerdem wurde die Anzahl der mutierten Gene bei Patienten mit Hochrisikozytogenetik durch $del17p$, $t(4;14)$, $t(14;16)$, $amp1q$ mit mehr als 3 Kopien jeweils im Vergleich zu Patienten ohne diese Hochrisikomarker untersucht. Die Gruppe mit $del17p$ wies hierbei eine signifikant höhere Anzahl (Mittelwert 3,2 vs. 1,7) mutierter Gene auf als die Patientengruppe ohne $del17p$ ($p = 0,009$, Differenz $-1,519 \pm 0,559$. 95% CI $-2,640$ bis $-0,399$).

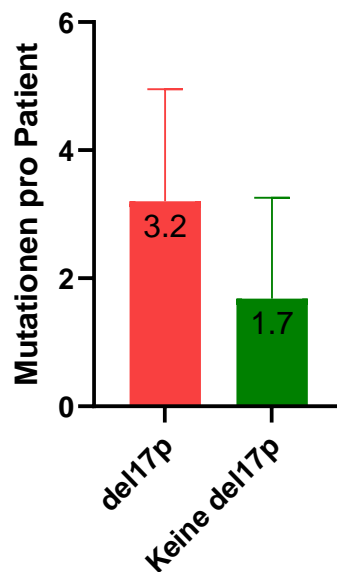


Abbildung 5: Anzahl an nachgewiesenen Mutationen pro Patient in Abhängigkeit vom Vorliegen einer del17p. Es wurden die Subgruppen an Patienten mit und ohne del17p auf die jeweilige Anzahl an nachgewiesenen Mutationen verglichen. Patienten mit entsprechender Deletion wiesen im Mittel insgesamt 3,2 Mutationen auf, während in der Gruppe an Patienten ohne del17p pro Patient insgesamt 1,7 Mutationen auftraten. Der Unterschied zwischen den Gruppen war statistisch signifikant ($p = 0,009$). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung nach oben.

Zu den am häufigsten mutierten Genen in der gesamten Patientenkohorte gehörten *KRAS* (15 %), *NRAS* (12 %), *DIS3* (12 %), *ATM* (12 %), *BRAF* (8 %), *TP53* (8 %), *FAM46C* (8 %), *IRF4* (7 %), *MAX* (5 %), *CRBN* (5 %) und *FGFR3* (5 %).

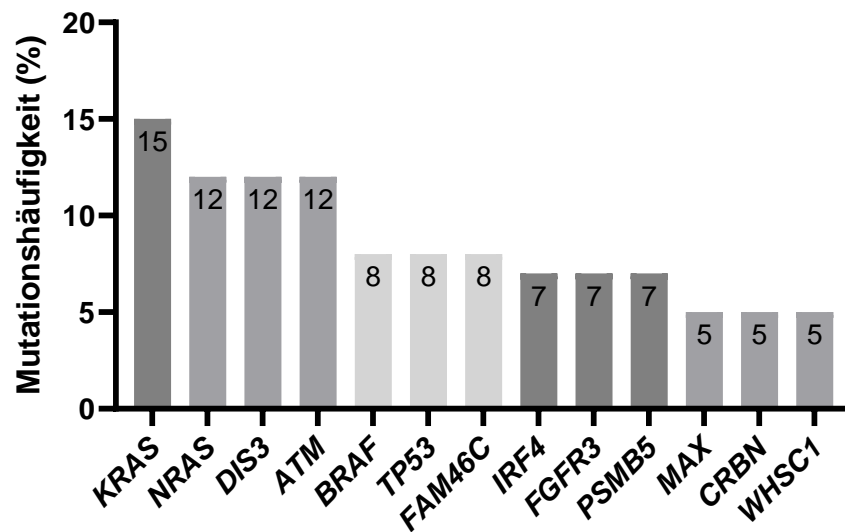


Abbildung 6: Häufigkeiten der in der Patientenkohorte am häufigsten mutierten Gene. Dargestellt sind jeweils die Häufigkeiten in Prozent der am häufigsten aufgetretenen Mutationen innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs. *KRAS*-Mutationen wurden in 15 % der Patienten gefunden. *NRAS*, *DIS3* und *ATM* war jeweils in 12 % der Patienten mutiert, *BRAF*, *TP53* und *FAM46C* jeweils in 8 % der Patienten. Eine *IRF4*, *FGFR3*- und *PSMB5*-Mutation lag jeweils bei 7 %, eine *MAX*-, *CRBN*- und *WHSC1*-Mutation in jeweils 5 % der Patienten vor.

Mutationen, die den Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Stoffwechselweg (*NRAS*, *KRAS*, *BRAF*) betreffen, wurden in 35 % (n = 21) gefunden. Alle Mutationen in *NRAS*, *KRAS* und *BRAF* waren Missense-Mutationen. 43 % der *NRAS*- und *KRAS*-Mutationen wurden an bekannten Hotspots gefunden und in ihrer Funktion als aktivierend eingestuft. Besonders erwähnenswert ist, dass ein Patient gleichzeitig eine *NRAS*- und *KRAS*-Mutation aufwies. Die Mutationsfrequenz war bei Patienten mit *KRAS*-Mutation im Vergleich zur nicht *KRAS*-mutierten Vergleichskohorte nicht signifikant verändert (2,2 vs. 1,8 Mutationen). Die Gruppe mit nachgewiesener *NRAS*-Mutation hatte dahingegen insgesamt eine signifikant höhere Anzahl (Mittelwert 3,6 vs. 1,7) an Punktmutationen (p = 0,005. Differenz -1,879 ± 0,637. 95%CI -3,155 bis -0,603).

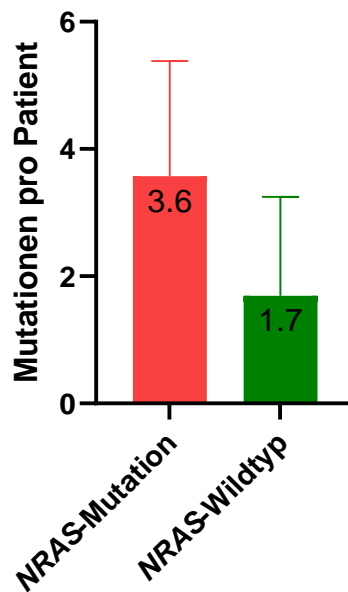


Abbildung 7: Anzahl an nachgewiesenen Mutationen pro Patient in Abhängigkeit vom Vorliegen einer NRAS-Mutation. Es wurden die Subgruppen an Patienten mit und ohne NRAS-Mutation auf die jeweilige Anzahl an nachgewiesenen Mutationen pro Patient verglichen. Patienten mit NRAS-Mutation wiesen insgesamt im Mittel 3,6 Mutationen pro Patient auf, während in der Gruppe mit NRAS-Wildtyp pro Patient 1,7 Mutationen auftraten. Der Unterschied zwischen den Gruppen war statistisch signifikant ($p = 0,005$). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung nach oben.

In der untersuchten Kohorte fanden wir 6 *BRAF*-Mutationen in 8 % ($n = 5$) der Patienten. Die Anzahl der mutierten Gene bei Patienten mit *BRAF*-Mutation war nicht signifikant unterschiedlich zu denen ohne *BRAF*-Mutation (Mittelwert 2,8 vs. 1,7 Mutationen pro Patient). Insgesamt wurden in der Gruppe von Patienten, welche eine *BRAF*-Mutation aufwiesen, im Mittel 2,8 Mutationen pro Patient und im Mittel 2,6 unterschiedliche Mutationen pro Patient gefunden. Dem stehen 1,7 Mutationen pro Patient in der Gruppe ohne *BRAF*-Mutation, sowohl in Bezug auf die Gesamtzahl an dokumentierten Mutationen pro Patient als auch in Bezug auf die Anzahl unterschiedlicher Mutationen pro Patient. 60 % aller *BRAF*-Mutationen waren klinisch relevante *BRAF*-V600E-Mutationen. Diese Patienten waren alle RRMM-Patienten, die sich im Durchschnitt in der 4. Therapielinie befanden. 100 % waren PI-vorbehandelt, 33 % PI-refraktär, 66 % IMiD-vorbehandelt, davon keiner IMiD-refraktär und 33 % mit einer Immuntherapie vorbehandelt. 67 % der Patienten mit *BRAF*-V600E-Mutation hatten eine Hochrisikozytogenetik und ebenfalls 67 % eine EMD. Damit lag der Anteil

an Patienten mit EMD deutlich höher als in der Gruppe an Patienten ohne *BRAF-V600E*-Mutation. Hier wiesen nur 25 % eine EMD auf. Auch wenn dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war ($p = 0,118$. Differenz $-0,417 \pm 0,262$. 95%CI $-0,942$ bis $0,109$), lässt sich dennoch eine Tendenz ableiten. Diese *BRAF-V600E*-mutierten MM-Patienten hatten eine mediane Überlebenszeit nach der Sequenzierung von nur 6 Monaten (Range: 4-31). Sie wurden im Durchschnitt 38 Monate (Range: 8-83) nach Diagnosestellung sequenziert. Das mittlere OS in dieser Untergruppe betrug 52 Monate (Range: 28-87). Hervorzuheben ist, dass ein Patient mit *BRAF-V600E*-Mutation sechs weitere Mutationen gleichzeitig aufwies (*MAX*, *CCND1*, *TLR4*, *RIPK4*, *IL6R*, *CYLD*). Dieser Patient befand sich in der 12. Therapielinie.

Bei 8 % ($n = 5$) der Patienten wurde eine *TP53*-Mutation festgestellt. Die Anzahl der mutierten Gene war bei Patienten mit *TP53*-Mutation nicht signifikant unterschiedlich. Alle Patienten mit *TP53*-Mutation hatten gleichzeitig eine *del17p*. Die Mutationen in *TP53* waren bei diesen *del17p* Patienten klonal mit einer medianen CCF von 39 % (Range: 16-55). Diese Double-Hit-MM-Patienten hatten eine mediane Überlebenszeit nach der Sequenzierung von nur 1 Monat (Range: 1-11). Die Sequenzierung wurde im Mittel 40 Monate (Range: 3-83) nach der Diagnose durchgeführt. Das OS in dieser Gruppe betrug 53 Monate (Range: 11-84). Umgekehrt hatten 50 % der Patienten mit *del17p* gleichzeitig eine *TP53*-Mutation. Unter den Patienten ohne *del17p* fanden wir keine einzige *TP53*-Mutation. Somit hatten die Patienten mit *del17p* statistisch höchstsignifikant häufiger eine *TP53*-Mutation als Patienten ohne diese Deletion ($p < 0,001$).

Im *CRBN*-Signalweg fanden wir bei 14 % ($n = 8$) der Patienten Mutationen, darunter 7 % *CRBN*, 2 % *CUL4B*, 8 % *IRF4*, 2 % *IKZF1* und keine Mutationen in *IKZF3*. Von diesen Patienten waren 87 % IMiD-vorbehandelt mit einer kumulativen Zeit von 22 Monaten (Range: 5-47). Anzumerken ist, dass alle Patienten mit nachgewiesener Mutation im *CRBN*-Signalweg und vorheriger IMiD-Behandlung IMiD-refraktär waren. Ein Patient hatte eine *IKZF1*-Mutation, wurde aber weder vor noch nach der Sequenzierung mit IMiDn behandelt. Das OS in dieser Patientensubgruppe betrug 94 Monate (Range: 4-280), die Überlebenszeit nach der Sequenzierung 20 Monate (Range: 1-43). Die Sequenzierung erfolgte im Durchschnitt nach 73 Monaten (Range: 2-237).

Mutationen in proteasomalen Untereinheiten (zum Beispiel *XBP1*) oder PI-Untereinheiten (*PSMB8*, *PSMB9* und *PSMD1*), wurden in 7 % ($n = 4$) der Patienten

unserer Kohorte gefunden. Einer dieser Patienten hatte parallel eine t(4;14)-Translokation und einer einen gain1q mit 3 Kopien. Alle Patienten dieser Gruppe waren mit durchschnittlich 6 Therapielinien stark vorbehandelt. 75 % waren mit PI vorbehandelt, alle davon PI-refraktär. 2 Patienten hatten eine EMD. Die Vorbehandlung mit PI zeigte eine negative Korrelation zum PFS ($r = -0,662$, $p < 0,001$, 95% CI -0,819 bis -0,413). Das PFSas betrug im Median nur 2 Monate. Die Sequenzierung wurde im Durchschnitt nach 78 Monaten (Range: 54-105) durchgeführt. Das OS lag in dieser Gruppe bei 97 Monaten (Range: 80-132).

Bei 5 % der Patienten wurde mindestens eine Mutation in einem Gen des Interleukin-6 (IL6)-Signalweges gefunden. Mutationen im NF κ B-Signalweg wurden bei 2 % aller Patienten gefunden. Eine Mutation im Steroidrezeptor-Gen (*NR3C1*) konnte bei keinem Patienten unserer Kohorte festgestellt werden. *FAM46C* ($r = 0,443$. $p > 0,001$. 95% CI 0,211 bis 0,628) und *IRF4* ($r = 0,417$. $p = 0,001$. 95% CI 0,180 bis 0,608) schienen schwach mit einem besseren OS zu korrelieren.

Neben dem RAS-Signalweg und *BRAF* fanden wir weitere klinisch relevante Mutationen. Bei 5 % ($n = 3$) der Patienten identifizierten wir eine *FGFR3*-Mutation. Auffällig war, dass alle diese Patienten zugleich eine Translokation t(4;14) aufwiesen. Unter den Patienten ohne *FGFR3*-Mutation hatten nur 12 % diese Translokation. Patienten mit *FGFR3*-Mutation hatten somit höchstsignifikant häufiger eine t(4;14) als Patienten ohne diese Mutation ($p < 0,001$. Differenz $-0,870 \pm 0,197$. 95% CI -1,266 bis 0,475). Aufgrund der nur geringen Anzahl an *FGFR3*-mutierten Patienten sollte das Ergebnis in größeren Studien validiert werden. Das mittlere Sas dieser Subgruppe lag bei 33 Monaten; das PFSas bei nur 5 Monaten. Eine *CCND1*-Mutation wurde bei 3,4 % ($n = 2$) gefunden, von denen 50 % eine Translokation t(11;14) hatten. 3,4 % ($n = 2$) der Patienten hatten eine *IDH1*-Mutation. Bei 1,7 % der Patienten (jeweils $n = 1$) fanden wir eine *PIK3CA*-Mutation sowie eine *JAK2*-Mutation und eine *EGFR*-Mutation.

Aufgrund der geringen Gruppengröße war eine statistische Aussage über den Einfluss der einzelnen mutierten Gene auf das OS nicht möglich.

3.3 Überlebensanalysen

Das mediane OS des untersuchten Patientenkollektivs lag bei 137 Monaten und reichte von minimal 4 bis maximal 280 Monaten. Das mittlere Sas betrug 23 Monate (Range: 0-44), das PFSas 12 Monate (Range: 0-42).

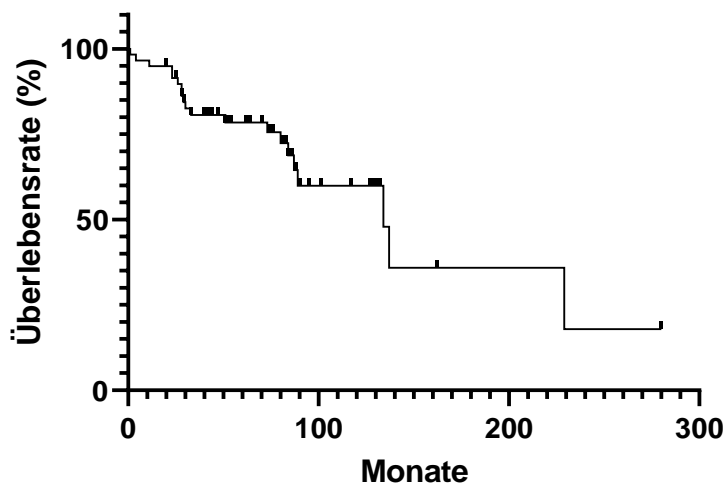


Abbildung 8: Gesamtüberleben der untersuchten Patientenkohorte. Dargestellt ist die Überlebenskurve der untersuchten Patientenkohorte nach Kaplan-Meier. Das Gesamtüberleben von Diagnose bis Tod oder letztem Follow-up innerhalb des Beobachtungszeitraums betrug im Mittel 72 Monate. Es reichte von minimal 4 bis maximal 280 Monate.

Bezüglich des OS wurden Gruppen anhand ihres ISS- und R-ISS-Stadiums verglichen. Insgesamt ließ sich für beide Variablen sagen, dass je höher das ISS-beziehungswise R-ISS-Stadium lag, umso kürzer das OS ausfiel. Bezogen auf das ISS-Stadium war im Stadium I das OS im Mittel bei 127 Monaten (Range: 11-280), im Stadium II bei 84 Monaten (Range: 4-137) und im Stadium III bei 62 Monaten (Range: 1-89).

Im Vergleich der einzelnen Stadien anhand der R-ISS-Klassifikation ergaben sich folgende Verhältnisse: Im Stadium I lag das mediane OS bei 134 Monaten (Range: 11-280), im Stadium II bei 89 Monaten (Range: 4-137) und im Stadium II bei 56 Monaten (Range: 1-89). Der Unterschied zwischen den einzelnen Subgruppen war statistisch nicht signifikant ($p = 0,415$).

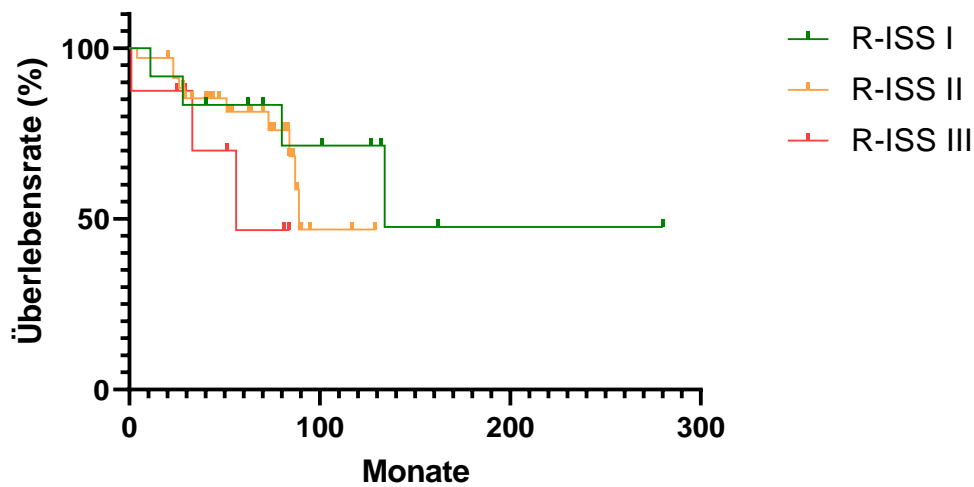


Abbildung 9: Gesamtüberleben in Abhängigkeit des R-ISS-Stadiums. Dargestellt sind die Überlebenskurven der Subgruppen an Patienten nach Einteilung anhand der R-ISS-Klassifikation. Patienten im Stadium I zeigten ein medianes OS von 134 Monaten, Patienten in Stadium II von 89 Monaten und Patienten in Stadium III von 56 Monaten. Der Unterschied zwischen den Gruppen war statistisch nicht signifikant ($p = 0,415$).

Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen OS und Zytogenetik untersucht. In der Gruppe mit Standardrisiko-Zytogenetik lag das mediane OS bei 137 Monaten (Range: 11-280), in der Gruppe mit Hochrisiko-Zytogenetik bei 89 Monaten (Range: 22-129) Monaten und in der Gruppe mit Ultrahochrisiko-Konstellation bei nur 51 Monaten (Range: 1-74). Der Unterschied zwischen den Gruppen war statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$).

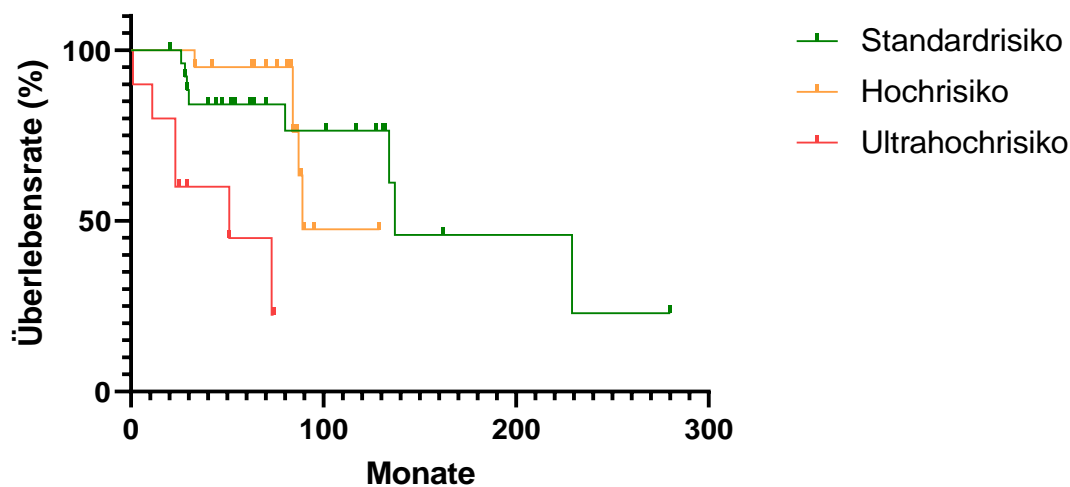


Abbildung 10: Gesamtüberleben in Abhängigkeit des zytogenetischen Risikos. Dargestellt sind die Überlebenskurven der Subgruppen an Patienten nach Einteilung anhand des zytogenetischen Risikos. Patienten mit Standardrisiko-Zytogenetik lebten im Median 137 Monate, die Gruppe mit Hochrisiko-Zytogenetik 89 Monate und mit Ultrahochrisiko-Zytogenetik 51 Monate. Der Unterschied zwischen den Gruppen war hochsignifikant ($p < 0,001$).

Die Subgruppe der Patienten mit nachgewiesenem Zugewinn von 1q wurde hinsichtlich der Anzahl der Genkopien genauer untersucht. Hierbei fiel auf, dass die Kopienanzahl invers mit dem OS der Patienten korrelierte, das heißt je mehr Kopien des Gens vorhanden waren, umso kürzer war das OS der betroffenen Patienten ($r = -0,939$ für 2 vs. 3 Genkopien, $r = -0,978$ für 2 vs. ≥ 4 Genkopien). Der Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen war nicht signifikant ($p = 0,223$ und $p = 0,134$).

Wir analysierten beispielhaft das OS abhängig vom Vorliegen bestimmter zyto- und molekulargenetischer Merkmale. Unter den Patienten mit del17p lag das mediane OS bei 73 Monaten (Range:11-87). Patienten ohne diese Deletion lebten dagegen 137 Monate (Range: 11-280). Das OS ohne del17p war somit 64 Monate länger als bei Vorliegen dieses zytogenetischen Hochrisiko-Merkmals. Der Unterschied zwischen den Gruppen war statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$). In der Subgruppe mit *TP53*-Mutation betrug das mediane OS ebenfalls 73 Monate und lag damit statistisch signifikant unter dem der Patienten ohne *TP53*-Mutation ($p = 0,002$). Diese lebten im Mittel 137 Monate. Aufgrund der nur geringen Gruppengröße sollten diese Ergebnisse in größeren Studien validiert werden. Eine Tendenz lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen dennoch ableiten.

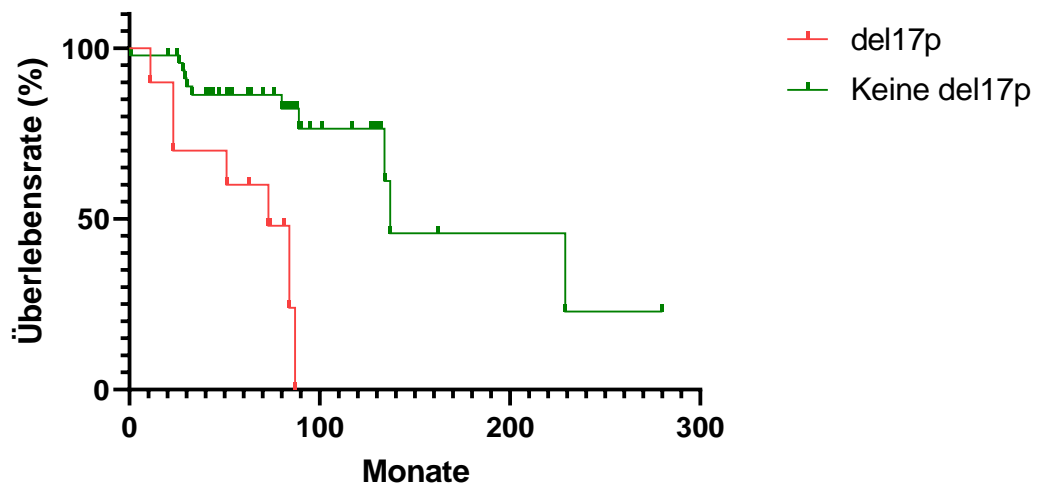


Abbildung 11: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Vorliegen einer del17p. Dargestellt sind die Überlebenskurven der Subgruppen an Patienten mit und ohne del17p. Patienten mit del17p lebten mit 73 Monaten höchstsignifikant kürzer als die Patienten ohne del17p, welche 137 Monaten lebten ($p < 0,001$).

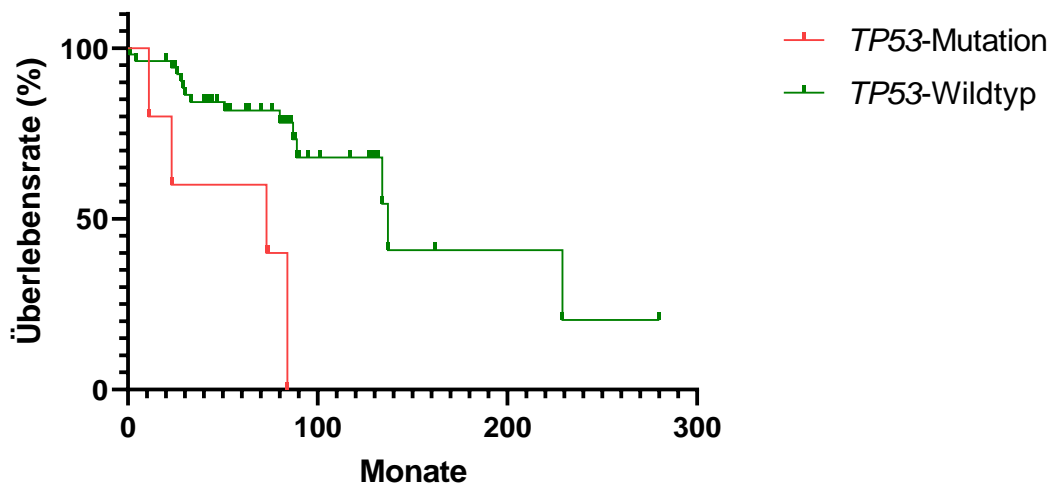


Abbildung 12: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Vorliegen einer *TP53*-Mutation. Dargestellt sind die Überlebenskurven der Subgruppen an Patienten mit und ohne *TP53*-Mutation. Patienten mit *TP53*-Mutation lebten 64 Monate kürzer als diejenigen ohne *TP53*-Mutation (73 vs. 137 Monate). Dieser Unterschied zwischen den Gruppen war statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$).

Andere Hochrisikomarker wirkten sich weniger stark auf das Überleben aus. Patienten ohne t(4;14) lebten im Mittel 137 Monate (Range: 11-280) und damit 48 Monate länger als Patienten mit t(4;14), welche nur 89 Monate (Range: 1-89) lebten. Der Unterschied zwischen den Gruppen war nicht signifikant ($p = 0,729$). Das mediane PFSas von Patienten mit t(4;14) betrug 5,5 Monate, das PFSas der Patienten ohne diese Translokation hingegen 13 Monate. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich PFSas war signifikant ($p = 0,018$). Auch Patienten ohne nachgewiesene del1q lebten im Mittel 88 Monate länger als Patienten mit del1q (131 Monate vs. 43 Monate). Der Unterschied zwischen den Gruppen war statistisch nicht signifikant ($p = 0,098$).

Wir konnten zeigen, dass das Vorliegen einer EMD mit einem signifikant kürzeren OS einhergeht ($p = 0,004$). Patienten mit EMD lebten im Median 57 Monate kürzer als Patienten ohne EMD (80 vs. 137 Monate).

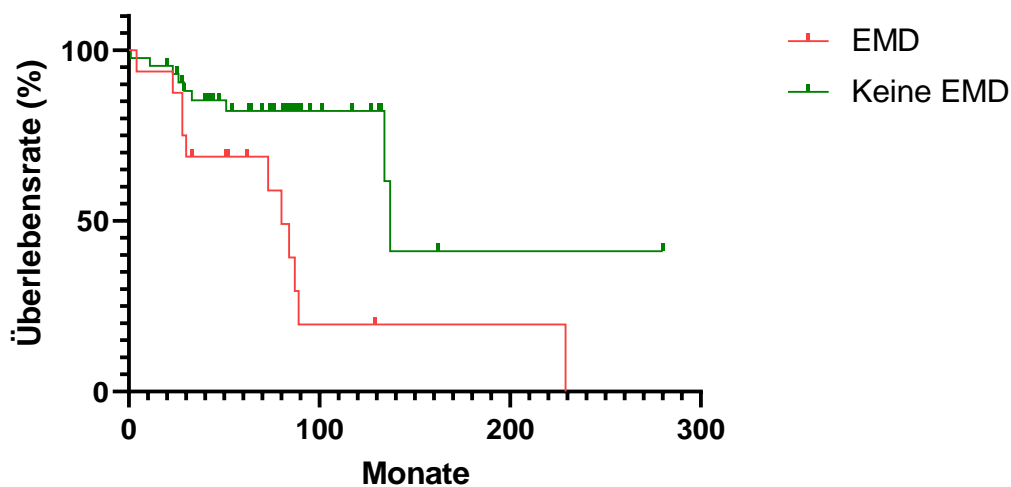


Abbildung 13: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Vorliegen einer EMD. Dargestellt sind die Überlebenskurven der Subgruppen an Patienten mit und ohne EMD. Patienten mit EMD lebten im Median 80 Monate, Patienten ohne EMD hingegen 137 Monate. Somit lebten Patienten mit EMD 57 Monate kürzer als Patienten ohne EMD. Der Unterschied zwischen den Gruppen war statistisch signifikant ($p = 0,004$).

Das mediane PFSas lag bei 12 Monaten (Range: 0-42). Untersucht wurde zudem das PFSas in den Untergruppen bezogen auf das ISS-Stadium, das R-ISS-Stadium und die Zytogenetik. Auffällig war hier, dass das PFSas in allen Stadien der ISS- und R-ISS-Klassifikation vergleichbar hoch war. Es betrug 15 Monate (Range: 0-41) im ISS-Stadium I, 14 Monate (Range: 0-42) Monate im Stadium II und 10 Monate (Range: 1-41) im Stadium III. In der R-ISS-Klassifikation waren es 14 Monate sowohl in Stadium I (Range: 1-41) als auch Stadium II (Range: 0-42) und 13 Monate (Range: 2-41) im Stadium III. An dieser Stelle muss nochmals betont werden, dass die Stadieneinteilung anhand ISS- und R-ISS-Klassifikation zum Zeitpunkt der Erstdiagnose erfolgte und nicht zum Zeitpunkt des Samplings.

Auch die Zytogenetik schien in dem untersuchten Patientenkollektiv nur wenig Einfluss auf das PFSas zu haben. Es lag sowohl in der Gruppe mit Standardrisiko- als auch in der Gruppe mit Hochrisikozytogenetik bei 14 Monaten (Range: 0-42 und 2-41). Unter den Patienten mit Ultrahochrisikozytogenetik konnte ein mittleres PFSas von nur 5 Monaten (Range: 0-24) dokumentiert werden.

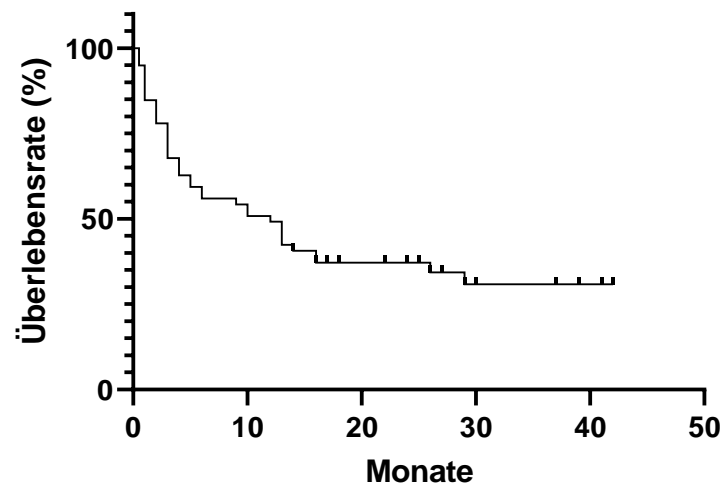


Abbildung 14: Progressionsfreies Überleben nach Sampling. Dargestellt ist die Überlebenskurve des PFSas der untersuchten Patientenkohorte. Dieses lag im Median bei 12 Monaten und reichte von 0 bis 42 Monaten.

4 Diskussion

Diese Arbeit beschreibt 59 Erkrankungsverläufe aus einem aus 248 an MM erkrankten Patienten bestehenden Kollektiv, welches im Zeitraum von 01.11.2017 bis 10.12.2019 an der Universitätsklinik Würzburg behandelt wurde. Ein Schwerpunkt lag auf der molekulargenetischen Charakterisierung, insbesondere wurden die Frequenz und die biologischen Auswirkungen von Punktmutationen erfasst und interpretiert. Das MM ist eine heterogene Erkrankung und wird im Wesentlichen durch bestimmte Gene charakterisiert, die bei MM-Patienten wiederholt mutiert sind [37], [41], [42], [58]. Obwohl bereits eine große Anzahl von MM-Genomen sequenziert wurden, ist die Mutationslandschaft in einer realen Behandlungskohorte aus dem klinischen Alltag bisher kaum veröffentlicht worden. Insbesondere liegen für die publizierten genomischen Daten beim MM zumeist keine klinischen Korrelationen vor. Diese sind jedoch Voraussetzung für ein besseres Verständnis von arzneimittelrefraktärer MM-Erkrankung, sowie die präzisere Erfassung genetisch determinierten Hochrisikos. Die Arbeit stellt somit in der genomischen Erforschung des MMs einen wichtigen Erkenntnisgewinn dar.

Das Mutationsscreening erfolgte sensitiv mittels des etablierten und krankheitsspezifischen MM-Gen-Panels M³P in der Version v3.0. Unsere Genauigkeit in Bezug auf Ziel und Sequenzierungstiefe von 582x ermöglichte die Detektion kleiner subklonaler Veränderungen und übertraf vergleichbare frühere M³P-basierte Sequenzierungen [44], [49]. So lag in einer Studie von Kortüm et al. aus dem Jahr 2015, in der die erste Version des M³P-Panels mit 47 Genen angewandt wurde, die Sequenzierungstiefe nur bei 298x [49]. Die Mutationsinzidenz in unserer Real-World-Kohorte bestätigte eine weitere an der Mayo Clinic in Arizona durchgeführte Untersuchung [48]. In dieser Studie war ebenso das M³P-Panel in der dritten Version (M³P v3.0) für die Sequenzierung verwendet worden. Insgesamt waren die Patienten unserer Kohorte mit 4 vorangegangenen Therapielinien ähnlich vorbehandelt wie in der Gruppe der Mayo Clinic. Jene waren durchschnittlich mit 5 Linien vortherapiert. Die Gesamtzahl der identifizierten Mutationen war vergleichbar. Während wir insgesamt 108 Mutationen fanden, wurden in der Analyse der Mayo Clinic 136 Mutationen festgestellt. Insgesamt fanden jene Autoren also etwas mehr Mutationereignisse als wir. Auch beobachteten wir in unserer Analyse insgesamt etwas weniger Mutationen pro Patient. Hier waren es 1,9 Mutationen in unserer Analyse gegenüber 2,7 in der Kohorte der Mayo Clinic [48].

Wir fanden eine ähnlich hohe Rate an Missense- (89 % vs. 84 %) und Nonsense-Mutationen (9 % vs. 7 %) wie in der Studie der Mayo Clinic. Im von uns untersuchten Patientenkollektiv lag mindestens eine Mutation bei 80 % (n = 47) der Patienten vor, in der Analyse der Mayo Clinic waren es 98 % (n = 47) der Patienten. Insgesamt fanden wir also etwas weniger betroffene Gene bei allen Patienten (80 % vs. 98 %). Dies lässt sich möglicherweise auf die Tatsache zurückführen, dass in der Patientenkohorte der Mayo Clinic lediglich RRMM-Patienten eingeschlossen wurden, sich in unserem Kollektiv allerdings auch NDMM-Patienten ohne bisherige Vortherapien befanden. Ähnlich hoch war die Anzahl von betroffenen Genen des verwendeten Panels. Hierbei wurden in unserer Untersuchung insgesamt 45 der 88 (51 %) im M³P-Panel enthaltenen Genen gefunden, in der Studie der Mayo Clinic 47 von 88 Genen (53 %). Bezogen auf die einzelnen Mutationen fanden wir eine geringere Inzidenz in *KRAS* (15 % vs. 32 %), *NRAS* (12 % vs. 26 %), *TP53* (8 % vs. 26 %), *BRAF* (8 % vs. 18 %), *CRBN* (8 % vs. 12 %), *FAM46C* (8 % vs. 12 %), *TRAF3* (2 % vs. 8 %). Eine vergleichbare Inzidenz zur Mayo Clinic-Studie wurde bei *ATM* (12 % vs. 10 %) festgestellt. Bei *DIS3* (14 % vs. 9 %), *IRF4* (7 % vs. 4 %) und *MAX* (5 % vs. 2 %) hingegen fanden wir eine etwas höhere Inzidenz. Alle anderen Mutationen lagen vergleichbar im niedrigen einstelligen Prozentbereich [44].

Das auffälligste Ergebnis in unserer Kohorte ist die Identifizierung von direkten Mutationen im *CRBN*-Gen bei 5 % der Patienten und von Mutationen im CRBN-Signalweg bei 14 % des gesamten Kollektivs. Das CRBN-Protein ist der zentrale Vermittler der IMiD-Wirkung und seine Rolle für die anti-MM-Wirkung der IMiDe wesentlich [35], [46], [48]. Zu betonen ist, dass alle Patienten mit Mutationen in diesem Signalweg und IMiD-Behandlung nicht auf die IMiD-Behandlung ansprachen und refraktär waren. In den Daten der Mayo Clinic wurden ähnlich hohe Raten von Mutationen im CRBN-Signalweg (22 %) mit einer damit verbundenen IMiD-Resistenz festgestellt [48]. Der etwas höhere Anteil an Mutationen im *CRBN*-Gen ist möglicherweise durch die Tatsache erklärbar, dass in der Analyse der Mayo Clinic ausschließlich RRMM-Patienten einbezogen wurden und alle IMiD-vorbehandelt waren. Ein Patient in unserer Kohorte hatte eine Mutation im CRBN-Signalweg, wurde aber vor der Probenentnahme nicht mit einem IMiD behandelt. Aufgrund unserer Daten kann davon ausgegangen werden, dass dieser Patient wahrscheinlich auch primär IMiD-refraktär war. Bisherigen Studien zufolge wurden in NDMM-Patienten kaum *CRBN*-Mutationen gefunden. Beispielsweise fand eine Untersuchung der Multiple Myeloma Research Foundation lediglich eine *CRBN*-Mutation in 511 Patienten [48].

Auch in Daten der Mayo Clinic wurde nur bei einem von 349 unbehandelten Patienten eine *CRBN*-Mutation gefunden. Dieser eine Patient sprach während des Krankheitsverlaufs nicht auf eine IMiD-Therapie an, weder auf Lenalidomid noch Pomalidomid [48]. Weitere Daten mit sequenziellen Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf zeigten, dass Mutationen im *CRBN*-Gen erst nach einer Exposition mit IMiDen auftraten [59]. In anderen Einzelfallberichten wurde umgekehrt bei IMiD-refraktären Patienten ebenfalls eine *CRBN*-Mutation gefunden [60].

Hierdurch kommt die bedeutende Relevanz einer Panel-basierten Molekulardiagnostik für den klinischen Alltag zum Ausdruck. So können bei Vorliegen bestimmter genetischer Veränderungen einige Substanzgruppen in der individualisierten Therapie von vornherein ausgeschlossen und andere favorisiert herangezogen werden.

Neuere Daten bringen bestimmte Gene mit einem schlechten oder fehlenden Ansprechen auf PI wie Bortezomib, Carfilzomib oder Ixazomib in Verbindung [61], [62]. In unserer Kohorte fanden wir bei 7 % der Patienten ein mutiertes Gen in einer proteasomalen (*XBP1*) oder PI-Untereinheit (*PSMB8*, *PSMB9* und *PSMD1*). 75 % der Patienten wurden mit PIs vorbehandelt und alle vorbehandelten Patienten waren PI-refraktär. Von diesen hatten 50 % eine EMD. Aufgrund der geringen Größe unserer Gruppe sollten die Zahlen in größeren realen PI-refraktären Kohorten validiert werden, um den Einfluss von Mutationen in bestimmten Genen auf das Therapieansprechen von PIs genauer zu untersuchen. Barrio et al. konnten bereits einige *PSMB5*-Missense-Mutationen mit einer Refraktärität auf unterschiedliche Medikamente der PI-Substanzklasse in Verbindung bringen [63].

Einzelnen Genen wird auch ein Zusammenhang mit dem Überleben von MM-Patienten zugesprochen (*CCND1*, *TP53*, *ATM*, *ATR*, *ZFX4*, *NCKAP5*, *IRF4*, *EGR1*) [37]. In unserer Kohorte sahen wir, wie erwartet, einen starken negativen Effekt von *TP53*-Mutationen. Patienten mit *TP53*-Mutationen in unserer Kohorte (alle Doppel-Treffer-Myelome) hatten eine mediane Überlebenszeit nach der Sequenzierung von nur 1 (Range: 1-11) Monat. Aufgrund der geringen Gruppengröße müssen diese Zahlen jedoch in größeren Kohorten aus der Praxis validiert werden. Einer Studie von Luo et al. zufolge zeigten Double-Hit-MM-Patienten mit gleichzeitigem Vorliegen einer del17p und *TP53*-Mutation mit 8,4 (vs. 14,2) Monaten und 22,2 (vs. 39,2) Monaten ein signifikant kürzeres PFS und OS im Vergleich zur Gruppe ohne entsprechende

Double-Hit-Konstellation [64]. Auch Walker et al. erzielten vergleichbare Ergebnisse [39].

Wir erwarten, dass die Zahl der identifizierten Gene, die das Überleben bei bestimmten Behandlungen oder in bestimmten MM-Kohorten beeinflussen, mit den laufenden umfangreichen Sequenzierungsbemühungen bei MM-Patienten weiter zunehmen wird. Bedauerlicherweise standen keine sequenziellen Proben für unsere Analysen zur Verfügung, sodass eine Aussage über klonale Evolution durch das Nachverfolgen neuer Klone im Rezidiv nicht möglich war. Einzelne Publikationen hierzu sind bereits erschienen [48]. Dennoch lassen einige unserer Ergebnisse Rückschlüsse auf die klonale Evolution des MM im Krankheitsverlauf zu. Beispielsweise fanden wir bei Patienten mit mehr Vortherapien vor Sampling entsprechend auch mehr Mutationen pro Patient.

In der modernen Behandlung des MM stehen vielfältige Therapieprinzipien und -optionen zur Verfügung. Der individuelle Krankheitsverlauf ab Diagnosestellung ist sehr unterschiedlich und von verschiedenen Prognosefaktoren abhängig. Bisher erfolgt die Therapiesteuerung beim MM-Patienten im Wesentlichen durch die klinische Fitness. Eine Risiko- und Biomarker-getriggerte Therapie ist beim MM trotz ausgeprägter genetischer Heterogenität bislang nicht etabliert. Die heute verfügbaren NGS-Technologien erlauben mittels erkrankungsspezifischer Paneluntersuchung (wie dem hier verwendeten M³P) die Detektion genetischer Veränderungen in klinisch relevanten Zeiträumen. Diese Information kann von dem behandelnden Arzt für die Auswahl der individuell bestwirksamen Therapie genutzt werden. Auch können Medikamente mit reduzierter oder aufgehobener Wirksamkeit identifiziert und somit potenzielle Nebenwirkungen für den Patienten vermieden werden. Mutationen in potenziell behandelbaren Genen (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *CCND1*, *FGFR3*, *IDH1*, *JAK2*, *PIK3CA* und *EGFR*) [37] waren in 51 % aller Mutationen und in 42 % der Patienten in unserer Kohorte nachweisbar. Beispielsweise lagen Mutationen im MAPK-Signalweg (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*) vor. Diese werden bei anderen Tumorentitäten bereits therapeutisch eingesetzt und stellen auch beim MM ein wichtiges potenzielles Target bei RRMM-Patienten dar. Insbesondere die *BRAF*-V600E-Mutation kann sich schon heute therapeutisch zu Nutze gemacht werden: Für die Behandlung des Malignen Melanoms ist für Patienten mit *BRAF*-V600E-Mutation die Behandlung mit Vemurafenib zugelassen und zeigt dort eine Verlängerung des Überlebens [65]. *BRAF*-

oder MEK-Inhibitoren befinden sich auch beim MM bereits in teilweise fortgeschrittenen klinischen Studien [66], [67], [68], [69].

In einer kürzlich hochrangig publizierten Arbeit zeigte die Kombination eines BRAF- und eines MEK-Inhibitors unter Einschluss von Würzburger Studienpatienten sehr gute Ansprechraten und induzierte tiefe und anhaltende Remission [70]. Patienten mit einer *BRAF-V600E*-Mutation sprechen im frühen Stadium auch gut auf die Standardtherapien an, wie beispielsweise Alkylanzien, IMiDe und PI. Die Detektion einer *BRAF-V600E*-Mutation erweitert das therapeutische Spektrum für betroffene Patienten und stellt somit ein gutes Beispiel für eine personalisierte Therapieentscheidung beim MM dar. Leider kommt es auch bei diesen personalisierten Therapien zu Erkrankungsrezidiven. Auch hier bewirkt die ausgeprägte Heterogenität der Erkrankung, dass unter dem medikamentösen Therapiedruck neue medikamentenresistente Subklone selektioniert werden. Bei zielgerichteter Therapie wird im Einzelfall auch ein unterschiedliches Ansprechen in unterschiedlichen Tumoranteilen beobachtet („mixed responses“), da beispielsweise nicht alle Myelomzellen eine *BRAF-V600E*-Mutation oder andere targetierbare genetische Veränderungen in sich tragen.

Nach aktueller Datenlage ist das Vorliegen einer *BRAF-V600E*-Mutation im Vergleich zu Kontrollgruppen mit einer aggressiveren klinischen Verlaufsform mit überdurchschnittlich häufig auftretender EMD des MMs sowie einem verkürzten OS assoziiert [67]. Auch in unserer Analyse lag der Anteil an Patienten mit EMD unter denen mit *BRAF-V600E*-Mutation deutlich über dem der Patienten ohne *BRAF-V600E*-Mutation (67 % vs. 25 %). Die mediane Überlebenszeit nach Sequenzierung dieser Patienten mit *BRAF-V600E*-Mutation lag bei nur 6 Monaten. Bei keinem der Patienten war eine BRAF-gerichtete Therapie eingeleitet worden. Die Überlebenszeit der Vergleichsgruppe ohne entsprechende genetische Veränderung betrug 25 Monate. Insgesamt können die bisher veröffentlichten Daten somit sowohl in Bezug auf das Auftreten einer EMD als auch auf das Überleben bestätigt werden [67].

EGR1-Mutationen sind aktuellen Studien zufolge vermehrt mit einer Hyperdiploidie assoziiert [37]. Diesbezüglich konnte in unserer Analyse keine valide Aussage getroffen werden. Wir fanden eine entsprechende Mutation nur in einem Patienten. Dieser wies keine parallel vorliegende Vervielfachung des Chromosomensatzes auf.

Eine *FGFR3*-Mutation konnten wir in 5 % der Patienten nachweisen. Alle diese Patienten wiesen gleichzeitig eine t(4;14) auf. Somit zeigten die Patienten mit *FGFR3*-

Mutation statistisch höchstsignifikant häufiger eine t(4;14) als die Patienten ohne diese Mutation. Auch Walker et al. beschrieben in ihrer Analyse von 463 MM-Patienten eine deutliche Assoziation zwischen diesen molekular- und zytogenetischen Veränderungen [37]. Zudem ist diese Veränderung mittlerweile targetierbar mit dem neuen small molecule Erdafitinib, welches an FGFR1-4 bindet, dessen Kinase-Aktivität inhibiert und somit die Proliferation von Tumorzellen hemmt [71].

Der retrospektive Ansatz dieser Arbeit birgt einige Limitierungen, was sich nicht zuletzt in einer begrenzten Aussagekraft der hier zusammengestellten Erkenntnisse im Vergleich zu prospektiven Studien niederschlägt. So waren die erhobenen Patientendaten teilweise unvollständig. Dies betraf insbesondere die krankheitsbezogenen Parameter derjenigen Patienten, deren Primärdiagnose zeitlich weit zurücklag oder nicht am UKW gestellt wurde. Grund für die unvollständige Dokumentation war zum einen die große Spannbreite der Zeitpunkte, zu denen die Erstdiagnose der einzelnen Patienten gestellt wurde (1996-2017). Hier vollzog sich zum Beispiel ein Wechsel der Klassifikationssysteme von Salmon und Durie [56] hin zur ISS-Klassifikation [14]. Für die Stadieneinteilung nach Salmon und Durie spielten hauptsächlich der Hämoglobin- und Kalziumgehalt im Serum, die Anzahl der Osteolysen und die Nierenfunktion eine Rolle. Im Gegensatz dazu berücksichtigt die ISS-Klassifikation vor allem das β 2-Mikroglobulin und Albumin im Serum. Aus diesem Grund wurden bei einer Diagnosestellung vor 2005 andere Schwerpunkte in Diagnostik und Dokumentation gelegt als bei einer Primärdiagnose zu späteren Zeitpunkten. Dementsprechend unterschiedlich waren die jeweils dokumentierten Parameter, vor allem bezüglich der Laborwerte. Zum anderen wurden einige Patienten nicht von Krankheitsbeginn an oder nicht über den gesamten Erkrankungsverlauf hinweg am UKW behandelt. Auch in diesen Fällen gelang es teilweise nicht, alle Daten gleichermaßen zu Primärdiagnose oder Erkrankungsverlauf vollständig zu erheben.

Um dennoch eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu gewährleisten, wurden für sämtliche Definitionen die allgemein gültigen Standards berücksichtigt. Hinsichtlich der Risikostratifizierung nahmen wir Bezug auf die neuesten Erkenntnisse und unterteilten das Patientenkollektiv anhand der genetischen Untersuchung in drei Subgruppen (Standardrisiko, Hochrisiko und Ultrahochrisiko) [39]. Unsere Kohorte zeigte hinsichtlich dieser Risikoeinteilung zum Zeitpunkt der KMP in 46 % der Fälle eine Standardrisiko-, in 34 % eine Hochrisiko- und 17 % eine Ultrahochrisikokonstellation. In Bezug auf die einzelnen zytogenetischen Veränderungen mit erhöhtem Risiko für eine

rasche Krankheitsprogression fanden wir bei 30 % des Gesamtkollektivs einen gain1q (mit ≥ 3 Kopien) und bei jeweils 18 % eine del17p und t(4;14). Dieser Anteil lag in der oben genannten Analyse der Mayo Clinic insgesamt höher. Hier wiesen 62 % des Anteils am Gesamt-Patientenkollektiv, bei dem Ergebnisse aus zytogenetischen Untersuchungen vorlagen, einen gain1q auf, 33 % eine del17p und 8 % eine t(14;16) auf. Letztere wurde bei unserer Analyse gar nicht nachgewiesen. Lediglich die Inzidenz einer t(4;14) lag mit 13 % unter derjenigen in unserer Kohorte.

Insgesamt war die Verteilung hinsichtlich zytogenetischer Veränderungen mehr oder weniger mit derjenigen von Castaneda et al. vergleichbar [72]. Bezüglich der einzelnen Veränderungen fanden wir eine höhere Inzidenz von Hyperdiploidien beziehungsweise Trisomien (53 % vs. 45 %), del13q (47 % vs. 40 %), t(4;14) (18 % vs. 15 %) und del17p (18 % vs. 10 %). Eine niedrigere Inzidenz beobachteten wir bei gain1q (30 vs. 40 %), t(11;14) (9 % vs. 15 %) und del 14q (5 % vs. 10 %).

Auch wenn diese Risikostratifizierungsmodelle den aktuell gültigen Standard repräsentieren, muss angemerkt werden, dass sie lediglich den Nachweis bestimmter Aberrationen, nicht aber deren Zusammenspiel berücksichtigen. Ein kürzlich entwickelter gewichteter Index unter Einbezug von sechs prognostisch relevanten Veränderungen (t(4;14), del17p, Trisomie 5, Trisomie 21, gain1q, del1p32) wies eine höhere Vorhersage-Genauigkeit als die ISS-Klassifikation auf [73] und zeigt somit Verbesserungspotential der bisherigen Modelle auf. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Risikoeinteilung wie oben beschrieben anhand der ISS- und R-ISS-Klassifikation.

Die Geschlechterverteilung mit einem Männeranteil von 63 % und einem Frauenanteil von 37 % spiegelte die in der Literatur zu findende Verteilung wider [3], [4]. Das mediane Alter bei Erstdiagnose lag in unserer Kohorte mit 58 Jahren etwas unter den veröffentlichten Daten, bei denen meist ein Alter von 65-75 Jahren beschrieben war [4]. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass sich jüngere und mobile Patienten eher an große universitäre Behandlungszentren wenden als ältere, komorbide oder geriatrische Patienten mit MM-Erkrankung. Dementsprechend waren auch in unserer Analyse 4 Patienten im Alter unter 40 Jahren (34-36 Jahren), einem Alter, in dem die MM-Erkrankung eine Rarität darstellt. Laut einer Statistik der SEER aus den Jahren 2014-2018 liegt der Anteil an Neuerkrankung im Alter von 34-44 Jahren lediglich bei 2,7 % [4]. Auch das Robert Koch-Institut veröffentlichte ähnliche Daten aus Deutschland [3]. Das mediane Alter zum Todeszeitpunkt betrug in unserer Kohorte 63 Jahre und lag somit auch deutlich unter dem Durchschnittsalter von 75

Jahren entsprechend der aktuellen Datenlage [4], was die erhöhte Rate an Hochrisikopatienten unserer Kohorte widerspiegelt. In unserer Kohorte verstarben drei Patienten im Alter von 41 beziehungsweise 42 Jahren. In der Literatur wird der Anteil der Todesfälle in der Altersgruppe von 35 bis 44 lediglich bei 0,8 % gelistet [4].

Interessante Erkenntnisse lieferte unserer Datenbankanalyse auch hinsichtlich der Erfüllung der CRAB-Kriterien bei Erstdiagnose. Eine Knochenbeteiligung zeigte hierbei mit 71 % der größte Anteil an Patienten. Dies entspricht in etwa den bereits veröffentlichten Daten. Laut einer Studie von Kyle et al. mit 1027 NDMM-Patienten wiesen 79 % der Patienten Auffälligkeiten in der konventionell radiologischen Bildgebung auf [74]. Eine Anämie mit einem Hämoglobinwert von 10 g/dl oder weniger fanden wir in nur 36 % der Patienten. In der Studie von Kyle et al. wurde eine Anämie in 73 % der Fälle beschrieben. Auch Rajkumar et al. sprachen von einer Anämie in 75 % der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung [75]. Eine andere Analyse von Kariyawan et al. beobachtete eine Anämie in 53 % der Patienten [10]. Insgesamt sind die Daten hierzu in der veröffentlichten Literatur sehr unterschiedlich. Dennoch lässt sich festhalten, dass der Anteil an anämischen Patienten in unserer Kohorte im Vergleich mit anderen Analysen eher niedrig war, was möglicherweise für eine bessere Früherkennung in Deutschland spricht. Außerdem könnte auch das niedrige Lebensalter unseres Patientenkollektivs ursächlich sein. Eine weitere Erklärung für die abweichenden Ergebnisse kann in der Anwendung unterschiedlicher Definitionskriterien liegen. Laut WHO spricht man bereits ab einem Hämoglobingehalt von ≤ 12 g/dl bei Frauen und ≤ 13 g/dl bei Männern von einer Anämie. Unter Anwendung dieser Kriterien wiesen 78 % der Patienten unserer Kohorte eine Anämie auf. Dies entspricht in etwa den Daten von Kyle et al. und Rajkumar et al. Auch in Bezug auf die CRAB-Kriterien Hyperkalzämie und Niereninsuffizienz fanden wir vergleichbare Werte zu den genannten Analysen. Einen Serumkalziumspiegel von mehr als 2,75 mmol/l zeigten 17 % der von uns untersuchten Patienten. Kyle et al. fanden eine Hyperkalzämie in 13 % der Patienten [74], Rajkumar et al. in 15 % der Fälle [75]. Eine Verschlechterung der Nierenfunktion wiesen 12 % unserer Patienten auf. Bei Kyle et al. waren es 19 % der Fälle [74], bei Rajkumar et al. 20 % [75]. In der genannten Studie von Kariyawan ist eine Niereninsuffizienz mit 36 % insgesamt häufiger beschrieben [10].

Durch die detaillierte Erfassung von Patientencharakteristika war es möglich, deren Einfluss auf die Langzeitergebnisse zu untersuchen. Hierbei muss jedoch bedacht

werden, dass viele der Patienten bereits mehrfach vortherapiert waren oder erst bei Auftreten eines Rezidivs im UKW vorstellig wurden, sodass das ausgewählte Kollektiv in einigen Aspekten nicht gänzlich repräsentativ für die MM-Patienten im Allgemeinen ist. Zusätzlich setzt sich das Patientenkollektiv des UKW als Forschungszentrum für das MM tendenziell eher aus Patienten mit weiter fortgeschrittener Erkrankung oder einer höheren Anzahl an Vortherapien zusammen.

Bedingt durch den retrospektiven Ansatz der Datenerhebung dieser Arbeit bestehen zudem insbesondere im Hinblick auf den Endpunkt OS wesentliche Einschränkungen in den Analysemöglichkeiten. So war aufgrund der geringen Gruppengröße eine statistische Aussage über den Einfluss der einzelnen mutierten Gene auf das OS nicht möglich. Wir führten dennoch eine beispielhafte Überlebensanalyse in Abhängigkeit bestimmter zyto- und molekulargenetischer Merkmale durch. In Bezug auf das Vorliegen einer del17p und *TP53*-Mutation konnten die Ergebnisse aus bisherigen Studien belegt werden. Die Subgruppe mit del17p beziehungsweise *TP53*-Mutation lebte statistisch höchst- beziehungsweise hochsignifikant kürzer als die Vergleichsgruppe ohne entsprechenden Hochrisikomarker. Ähnliche Ergebnisse beschreiben auch Walker et al. [37]. Sie fanden jedoch auch einen signifikanten Einfluss von t(4;14) auf das Überleben. Diesen Zusammenhang konnten wir in unserer Analyse nicht beobachten. Möglicherweise können die ungünstigen Auswirkungen der t(4;14) durch den Einsatz von PI auch überwunden werden. Insbesondere für Bortezomib gibt es diesbezüglich bereits valide Daten [76], [77]. Auch in unserer Arbeit waren 46 der 55 RRMM-Patienten (84 %) mit PI wie Bortezomib vorbehandelt. Das mediane Überleben der Patienten unserer Kohorte mit t(4;14) war zwar im Mittel 48 Monate kürzer als das der Patienten ohne t(4;14). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte sich allerdings nicht statistisch signifikant.

Aufgrund uneinheitlicher Informationen bezüglich eines Krankheitsprogresses vor Zeitpunkt des Samplings konnte in dieser Arbeit keine Aussage über das PFS gemacht werden. Es ließ sich lediglich das PFSas bestimmen.

Fazit und Ausblick

Durch den Einsatz eines MM-spezifischen Gen-Panels ist es gelungen, mit vertretbarem Kosten- und Materialaufwand die untersuchte Patientenkohorte molekularbiologisch zu charakterisieren. Wie in bereits publizierten Daten war hierbei eine Mutation innerhalb des RAS-Signalwegs am häufigsten zu beobachten.

Das für die Sequenzierung verwendete M³P-Panel enthielt 88 MM-spezifische Gene. Beginnend mit 47 Genen in Version 1 wurde das Panel anhand fortschreitender Erkenntnisse über die genetische Heterogenität des MMs weiterentwickelt und im Verlauf um weitere Gene aktualisiert, sodass über Variante 2 mit 77 Genen die aktuelle dritte Version mit 88 Genen entstand, welche auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung fand. Es ist davon auszugehen, dass diese Entwicklung auch in Zukunft voranschreiten wird. So könnten künftige Versionen eines kosteneffizienten M³P-Gen-Panels auch Gene für Tropomyosin-Rezeptor-Kinase-Proteine (TRK-Protein, *NTRK*-Gen) oder für Zell-Zell-Interaktionen (beispielsweise Junction adhesion molecule A, JAM-A) enthalten. Das Auftreten von *NTRK*-Fusionen wurde beim MM bereits nachgewiesen [78], [79]. Die Food and Drug Administration hat beispielsweise Larotrectinib und Entrectinib als TRK-Inhibitoren gewebeagnostisch als zielgerichtete Therapie zugelassen, allerdings bisher nur bei soliden Neoplasien. JAM-A scheint ebenfalls eine prognostische Rolle beim MM zu spielen [80]. Eine Studie diesbezüglich von Solimando et al. zeigte, dass eine erhöhte Expression von JAM-A mit einer schlechteren Prognose korreliert. In *in vitro*-Versuchen beeinträchtigte eine JAM-A-Inhibition die MM-Migration, Formation von Kolonien, Chemotaxis, Proliferation und Überlebensfähigkeit. Die *in vivo*-Behandlung mit einem monoklonalen Anti-JAM-A-Antikörper hemmte die Tumorprogression in einem MM-Xenograft-Modell der Maus. Diese Ergebnisse machen den Einsatz neuer zielgerichteter Substanzen oder neuer Prognosemarker denkbar.

Auch die Hinzunahme weiterer Gene aus bereits bekannten Signalwegen wäre möglich. Kürzlich wurde ein weiteres Protein - das B-cell lymphoma 2 (BCL-2) related protein A1 (BFL-1), kodiert durch das *BCL2A1*-Gen - aus dem NFκB-Signalweg mit der Entwicklung von Therapieresistenzen des RRMMs in Verbindung gebracht [81]. Spaan et al. propagierten BFL-1-Induktion innerhalb des NFκB-Signalwegs als weiteren möglichen Mechanismus, durch den sich die MM-Plasmazelle vor einer therapie-induzierten Apoptose schützt, was klinisch in einer Krankheitsprogression oder einem Rückfall in Erscheinung tritt. Somit könnte die direkte oder indirekte Blockade von

BFL-1 einen weiteren Ansatzpunkt darstellen, um die Entstehung von Therapieresistenzen bei RRMM-Patienten zu vermeiden oder zu reduzieren.

Neue Erkenntnisse liegen auch aus der Resistenzforschung gegenüber CD38-gerichteten monoklonalen Antikörpern vor. Hier sind zwei Vertreter, Daratumumab und Isatuximab, zugelassen. In resistenten Patienten wurden nun erstmalig Splice site-Varianten entdeckt, die die Bindungsepitope von CD38 auf der Tumorzelle in der Art verändern, dass der Antikörper nicht mehr binden kann [82]. Inwieweit diese Veränderungen spezifisch nur einen oder beide monoklonale Antikörper betreffen, ist Gegenstand aktueller Forschung. Die molekulare Charakterisierung von CD38 in Daratumumab oder Isatuximab resistenten Patienten erscheint jedoch vielversprechend, ebenso wie die Neuentwicklung von CD38-gerichteten Antikörpern, die an anderen Epitopen des Antigens binden und daher von den nun identifizierten Splice site-Varianten nicht betroffen wären.

Neu zugelassen in der Behandlung des MMs sind BCMA-gerichtete Therapien: der bispezifische Antikörper Teclistamab und die beiden CAR-T-Zell-Therapien IDE-CEL und CILTA-CEL. Hier wird das patienteneigene Immunsystem als Instrument für die Behandlung gegen die Tumorzelle benutzt. Diese Therapien zeigen beachtliche Wirksamkeit [32], [83], [33]. Neben BCMA sind auch andere Oberflächenantigene mit Expression auf malignen Plasmazellen als Zielstrukturen für Immuntherapien beim MM in weit fortgeschrittener klinischer Testung, wie G-Protein-coupled receptor family C group 5 member D (GPCR5D) oder Fc receptor homolog 5 (FcRH5) [34], [84], [85], [86]. Patienten, die besonders für diese Therapien geeignet sind, sind noch nicht charakterisiert, auch sind molekulare Resistenzmechanismen weitestgehend unbekannt.

Neben weiterentwickelten Immuntherapien wird auch an molekularen Strahlentherapien geforscht. Solche „theranostische“ Therapieansätze beispielsweise gegen den C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4) werden aktuell getestet [87], [88], [89]. Da das MM sehr strahlensensibel ist, besteht hier ein hohes therapeutisches Potential. Die molekulare Charakterisierung geeigneter Patienten sowie ein verbessertes Verständnis der Rezeptorexpression sind Voraussetzungen für eine erfolgreiche Weiterentwicklung dieser weiteren vielversprechenden Behandlungsmöglichkeit für das MM.

Anhand der genannten Beispiele wird deutlich, wie intensiv an zielgerichteten Therapien geforscht wird. Mit dieser fortschreitenden Entwicklung zielgerichteter

Agenzien ist von der molekulargenetischen Diagnostik in Zukunft auch zunehmend ein therapeutischer Nutzen zu erwarten [40], [90]. Bei einer Vielzahl an Tumorentitäten wie dem Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (histologisch Adenokarzinom) sind molekulargenetische Untersuchungen aus dem diagnostischen Workflow nicht mehr wegzudenken [91], [92], [93]. Dies wird zukünftig auch für das MM etabliert werden müssen, ein Paradigmenwechsel von der rein klinischen Einschätzung („fit“ vs. „frail“) zur risiko- und biomarkeradaptierten Therapieentscheidung beim MM ist zu erwarten.

Dank des technischen Fortschrittes werden zukünftig umfassendere Genomsequenzierungstechnologien zu vertretbaren Kosten und ausreichend schnellen Analysezeiten zur Verfügung stehen. Ganzgenomsequenzierungen erlauben beispielsweise die Erfassung von Kopienzahlveränderungen und Translokationen, sodass möglicherweise die FISH-Diagnostik durch NGS-Techniken abgelöst werden kann [94], [95].

Auch ist zu erwarten, dass die Erfassung des Hochrisiko-MM weiter verbessert wird [96]. Aktuell basiert die Risikostratifizierung noch auf zytogenetischen und laborchemischen Kriterien.

5 Zusammenfassung

Obwohl es in den letzten 10-15 Jahren gelang, multiple MM-Genome mittels NGS auf eine kosteneffiziente Art und mit geringem Zeit- und Materialaufwand zu sequenzieren und hierdurch zum Teil bahnbrechende Erkenntnisse gewonnen werden konnten, sind molekulargenetische Untersuchungen im diagnostischen Workflow des MMs bisher nicht ausreichend implementiert, um eine personalisierte Therapieentscheidung zu ermöglichen.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit eine Gruppe an Patienten mit NDMM und RRMM anhand klinischer Parameter charakterisiert und durch Verwendung des M³P-Panels auf das Vorliegen bestimmter molekulargenetischer Veränderungen untersucht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Analyse die bisher veröffentlichte M³P-Prävalenz in MM-Tumorproben bestätigt. Zu den am häufigsten mutierten Genen gehörten *KRAS*, *NRAS*, *DIS3*, *ATM* und *BRAF*. In der Gruppe der Patienten mit *NRAS*-Mutation oder del17p war die Zahl der relevanten Mutationen deutlich höher als ohne Vorliegen der entsprechenden Veränderung. Der Nachweis eines Double-Hit-Myeloms war erwartungsgemäß der stärkste ungünstige Faktor in unserer Kohorte. Unter den Patienten mit *CRBN*-Mutation waren alle IMiD-vorbehandelt und zeigten im Verlauf eine Refraktärität gegenüber dieser Substanzgruppe auf. Bezüglich der Überlebensanalysen bestätigten unsere Ergebnisse bereits bekannte prognostische Risikofaktoren wie Hochrisikozytogenetik, insbesondere del17p und gain1q, eine *TP53*-Mutation sowie ISS- und R-ISS-Stadium III.

Die Ergebnisse der Mutationsanalysen dieser Arbeit verdeutlichen den großen wissenschaftlichen und therapeutischen Nutzen, der von molekulargenetischen Untersuchungen ausgeht. Zukünftig werden auch beim MM Therapieentscheidungen auf Grundlage genetischer Diagnostik getroffen werden, mit dem Ziel die Behandlung für MM-Patienten weiter zu verbessern.

6 Literaturverzeichnis

1. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Multiple myeloma*. N Engl J Med, 2004. **351**(18): p. 1860-73.
2. Bataille, R. and J.L. Harousseau, *Multiple myeloma*. N Engl J Med, 1997. **336**(23): p. 1657-64.
3. Robert Koch-Institut, *Zentrum für Krebsregisterdaten, Multiples Myelom*. 2019 [Zugriffsdatum: 25.09.2023]; URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Multiples%20Myelom/multiples_myelom_node.html.
4. National Cancer Institute, *Cancer Stat Facts: Myeloma*. 2018 [Zugriffsdatum: 25.09.2023]; URL: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html>.
5. Rajkumar, S.V., et al., *International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma*. Lancet Oncol, 2014. **15**(12): p. e538-48.
6. Morgan, G.J., B.A. Walker, and F.E. Davies, *The genetic architecture of multiple myeloma*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(5): p. 335-48.
7. Bergsagel, P.L. and W.M. Kuehl, *Chromosome translocations in multiple myeloma*. Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5611-22.
8. de Mel, S., et al., *Implications of heterogeneity in multiple myeloma*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 232546.
9. Usmani, S.Z., et al., *Extramedullary disease portends poor prognosis in multiple myeloma and is over-represented in high-risk disease even in the era of novel agents*. Haematologica, 2012. **97**(11): p. 1761-7.
10. Kariyawan, C.C., et al., *Multiple myeloma: causes and consequences of delay in diagnosis*. QJM, 2007. **100**(10): p. 635-40.
11. Dimopoulos, M.A., et al., *Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma*. Leukemia, 2008. **22**(8): p. 1485-93.
12. Suzuki, K., *Diagnosis and treatment of multiple myeloma and AL amyloidosis with focus on improvement of renal lesion*. Clin Exp Nephrol, 2012. **16**(5): p. 659-71.
13. Dimopoulos, M., et al., *Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3*. Blood, 2011. **117**(18): p. 4701-5.
14. Greipp, P.R., et al., *International staging system for multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3412-20.
15. Bila, J., et al., *The Revised International Staging System Compared to the Classical International Staging System Better Discriminates Risk Groups*

- among Transplant-Ineligible Multiple Myeloma Patients. Oncol Res Treat, 2017. 40(10): p. 616-620.*
16. Regelink, J.C., et al., *Comparison of modern and conventional imaging techniques in establishing multiple myeloma-related bone disease: a systematic review. Br J Haematol, 2013. 162(1): p. 50-61.*
 17. Dimopoulos, M., et al., *International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma. Leukemia, 2009. 23(9): p. 1545-56.*
 18. Hillengass, J., et al., *Whole-body computed tomography versus conventional skeletal survey in patients with multiple myeloma: a study of the International Myeloma Working Group. Blood Cancer J, 2017. 7(8): p. e599.*
 19. Dimopoulos, M.A., et al., *Role of magnetic resonance imaging in the management of patients with multiple myeloma: a consensus statement. J Clin Oncol, 2015. 33(6): p. 657-64.*
 20. Caers, J., et al., *The role of positron emission tomography-computed tomography and magnetic resonance imaging in diagnosis and follow up of multiple myeloma. Haematologica, 2014. 99(4): p. 629-37.*
 21. Cavo, M., et al., *Role of (18)F-FDG PET/CT in the diagnosis and management of multiple myeloma and other plasma cell disorders: a consensus statement by the International Myeloma Working Group. Lancet Oncol, 2017. 18(4): p. e206-e217.*
 22. Palumbo, A., et al., *Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. J Clin Oncol, 2015. 33(26): p. 2863-9.*
 23. Bergsagel, P.L. and M. Chesi, V. *Molecular classification and risk stratification of myeloma. Hematol Oncol, 2013. 31 Suppl 1: p. 38-41.*
 24. Ocio, E.M., et al., *New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). Leukemia, 2014. 28(3): p. 525-42.*
 25. Palumbo, A., et al., *Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. N Engl J Med, 2014. 371(10): p. 895-905.*
 26. Gay, F., et al., *Chemotherapy plus lenalidomide versus autologous transplantation, followed by lenalidomide plus prednisone versus lenalidomide maintenance, in patients with multiple myeloma: a randomised, multicentre, phase 3 trial. Lancet Oncol, 2015. 16(16): p. 1617-29.*
 27. Attal, M., et al., *Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. N Engl J Med, 2017. 376(14): p. 1311-1320.*
 28. Giral, S., *200 mg/m(2) melphalan--the gold standard for multiple myeloma. Nat Rev Clin Oncol, 2010. 7(9): p. 490-1.*

29. Barlogie, B., et al., *Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma*. *Blood*, 1997. **89**(3): p. 789-93.
30. Barlogie, B., et al., *Long-term outcome results of the first tandem autotransplant trial for multiple myeloma*. *Br J Haematol*, 2006. **135**(2): p. 158-64.
31. Usmani, S.Z., et al., *Teclistamab, a B-cell maturation antigen × CD3 bispecific antibody, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (MajesTEC-1): a multicentre, open-label, single-arm, phase 1 study*. *Lancet*, 2021. **398**(10301): p. 665-674.
32. Li, C., et al., *Clinical responses and pharmacokinetics of fully human BCMA targeting CAR T-cell therapy in relapsed/refractory multiple myeloma*. *Journal of Clinical Oncology*, 2019. **37**(15_suppl): p. 8013-8013.
33. Berdeja, J.G., et al., *Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study*. *Lancet*, 2021. **398**(10297): p. 314-324.
34. Cho, S.F., et al., *Promising Antigens for the New Frontier of Targeted Immunotherapy in Multiple Myeloma*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(23).
35. Zhu, Y.X., et al., *Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide*. *Blood*, 2011. **118**(18): p. 4771-9.
36. Morgan, G.J., et al., *Kinase domain activation through gene rearrangement in multiple myeloma*. *Leukemia*, 2018. **32**(11): p. 2435-2444.
37. Walker, B.A., et al., *Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma*. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(33): p. 3911-20.
38. Vrabel, D., L. Pour, and S. Ševčíková, *The impact of NF-κB signaling on pathogenesis and current treatment strategies in multiple myeloma*. *Blood Rev*, 2019. **34**: p. 56-66.
39. Walker, B.A., et al., *A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis*. *Leukemia*, 2019. **33**(1): p. 159-170.
40. Lionetti, M. and A. Neri, *Utilizing next-generation sequencing in the management of multiple myeloma*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017. **17**(7): p. 653-663.
41. Bolli, N., et al., *Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 2997.
42. Lohr, J.G., et al., *Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy*. *Cancer Cell*, 2014. **25**(1): p. 91-101.

43. Kortuem, K.M., et al., *Panel sequencing for clinically oriented variant screening and copy number detection in 142 untreated multiple myeloma patients*. Blood Cancer J, 2016. **6**(2): p. e397.
44. Kortüm, K.M., et al., *Longitudinal analysis of 25 sequential sample-pairs using a custom multiple myeloma mutation sequencing panel (M(3)P)*. Ann Hematol, 2015. **94**(7): p. 1205-11.
45. Barrio, S., et al., *Protocol for M(3)P: A Comprehensive and Clinical Oriented Targeted Sequencing Panel for Routine Molecular Analysis in Multiple Myeloma*. Methods Mol Biol, 2018. **1792**: p. 117-128.
46. Zhu, Y.X., K.M. Kortuem, and A.K. Stewart, *Molecular mechanism of action of immune-modulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma*. Leuk Lymphoma, 2013. **54**(4): p. 683-7.
47. Zhu, Y.X., et al., *Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma*. Blood, 2014. **124**(4): p. 536-45.
48. Kortüm, K.M., et al., *Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in CRBN and Ras pathway genes*. Blood, 2016. **128**(9): p. 1226-1233.
49. Kortüm, K.M., et al., *Targeted sequencing using a 47 gene multiple myeloma mutation panel (M(3) P) in -17p high risk disease*. Br J Haematol, 2015. **168**(4): p. 507-10.
50. Kocher, J.P., et al., *The Biological Reference Repository (BioR): a rapid and flexible system for genomics annotation*. Bioinformatics, 2014. **30**(13): p. 1920-2.
51. Adzhubei, I.A., et al., *A method and server for predicting damaging missense mutations*. Nat Methods, 2010. **7**(4): p. 248-9.
52. Kumar, P., S. Henikoff, and P.C. Ng, *Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm*. Nat Protoc, 2009. **4**(7): p. 1073-81.
53. Sim, N.L., et al., *SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Web Server issue): p. W452-7.
54. Choi, Y., et al., *Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46688.
55. Choi, Y. and A.P. Chan, *PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels*. Bioinformatics, 2015. **31**(16): p. 2745-7.
56. Durie, B.G., et al., *International uniform response criteria for multiple myeloma*. Leukemia, 2006. **20**(9): p. 1467-73.

57. Kumar, S., et al., *International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma*. *Lancet Oncol*, 2016. **17**(8): p. e328-e346.
58. Grossmann, V., et al., *Molecular analysis of RAS-RAF tyrosine-kinase signaling pathway alterations in patients with plasma cell myeloma*. *Blood Cancer J*, 2012. **2**(8): p. e85.
59. Barrio, S., et al., *IKZF1/3 and CRL4(CRBN) E3 ubiquitin ligase mutations and resistance to immunomodulatory drugs in multiple myeloma*. *Haematologica*, 2020. **105**(5): p. e237-e241.
60. Egan JB, K.K., Kurdoglu A, Izatt T, Aldrich J, Reiman R, Phillips L, Baker A, Shi CX, Schmidt J, Liang WS, Craig DW, Carpten JD, Stewart AK, *Extramedullary myeloma whole genome sequencing reveals novel mutations in Cereblon, proteasome subunit G2 and the glucocorticoid receptor in multi drug resistant disease*. *Br J Haematol*, 2013.
61. Haertle, L., et al., *Mechanisms of Proteasome Inhibitor Resistance Selected By Clonal Evolution in Multiple Myeloma*. *Blood*, 2019. **134**(Supplement_1): p. 4349-4349.
62. Barrio, S., et al., *Mutations in 19S proteasome subunits represent a novel mechanism of acquired resistance to proteasome inhibitors in multiple myeloma patients*. 2018.
63. Barrio, S., et al., *Spectrum and functional validation of PSMB5 mutations in multiple myeloma*. *Leukemia*, 2019. **33**(2): p. 447-456.
64. Luo, T.C., et al., *[Clinical prognosis analysis of patients with "double hit" multiple myeloma]*. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2019. **40**(11): p. 918-923.
65. McArthur, G.A., et al., *Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(3): p. 323-32.
66. Rustad, E.H., et al., *BRAF V600E mutation in early-stage multiple myeloma: good response to broad acting drugs and no relation to prognosis*. *Blood Cancer J*, 2015. **5**: p. e299.
67. Andrulis, M., et al., *Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(8): p. 862-9.
68. Heuck, C.J., et al., *Inhibiting MEK in MAPK pathway-activated myeloma*. *Leukemia*, 2016. **30**(4): p. 976-80.
69. Steinbrunn, T., et al., *Combined targeting of MEK/MAPK and PI3K/Akt signalling in multiple myeloma*. *Br J Haematol*, 2012. **159**(4): p. 430-40.
70. Giesen, N., et al., *A phase II clinical trial of combined BRAF/MEK inhibition for BRAFV600E-mutated multiple myeloma*. *Blood*, 2023.

71. Perera, T.P.S., et al., *Discovery and Pharmacological Characterization of JNJ-42756493 (Erdafitinib), a Functionally Selective Small-Molecule FGFR Family Inhibitor*. *Mol Cancer Ther*, 2017. **16**(6): p. 1010-1020.
72. Castaneda, O. and R. Baz, *Multiple Myeloma Genomics - A Concise Review*. *Acta Med Acad*, 2019. **48**(1): p. 57-67.
73. Perrot, A., et al., *Development and Validation of a Cytogenetic Prognostic Index Predicting Survival in Multiple Myeloma*. *Journal of Clinical Oncology*, 2019. **37**(19): p. 1657-1665.
74. Kyle, R.A., et al., *Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma*. *Mayo Clin Proc*, 2003. **78**(1): p. 21-33.
75. Rajkumar, S.V. and S. Kumar, *Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment*. *Mayo Clin Proc*, 2016. **91**(1): p. 101-19.
76. Avet-Loiseau, H., et al., *Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p)*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(30): p. 4630-4.
77. El-Ghannaz, A.M. and E. Abdelwahed, *Bortezomib-based induction improves progression-free survival of myeloma patients harboring 17p deletion and/or t(4;14) and overcomes their adverse prognosis*. *Ann Hematol*, 2016. **95**(8): p. 1315-21.
78. Taylor, J., et al., *Oncogenic TRK fusions are amenable to inhibition in hematologic malignancies*. *J Clin Invest*, 2018. **128**(9): p. 3819-3825.
79. Taylor, J., W. Xiao, and O. Abdel-Wahab, *Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics*. *Blood*, 2017. **130**(4): p. 410-423.
80. Solimando, A.G., et al., *JAM-A as a prognostic factor and new therapeutic target in multiple myeloma*. *Leukemia*, 2018. **32**(3): p. 736-743.
81. Spaan, I., et al., *Multiple Myeloma Relapse Is Associated with Increased NFκB Pathway Activity and Upregulation of the Pro-Survival BCL-2 Protein BFL-1*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(18).
82. Adamia, S., et al., *Identification a Novel Molecular Mechanism Underlying the Anti-CD38-Based Treatment Resistance in Multiple Myeloma Patients*. *Blood*, 2022. **140**(Supplement 1): p. 2081-2082.
83. Jagannath, S., et al., *KarMMa-RW: comparison of idecabtagene vicleucel with real-world outcomes in relapsed and refractory multiple myeloma*. *Blood Cancer J*, 2021. **11**(6): p. 116.
84. Kodama, T., et al., *Anti-GPRC5D/CD3 Bispecific T-Cell-Redirecting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma*. *Mol Cancer Ther*, 2019. **18**(9): p. 1555-1564.

85. Pillarisetti, K., et al., *A T-cell-redirecting bispecific G-protein-coupled receptor class 5 member D x CD3 antibody to treat multiple myeloma*. *Blood*, 2020. **135**(15): p. 1232-1243.
86. Li, J., et al., *Membrane-Proximal Epitope Facilitates Efficient T Cell Synapse Formation by Anti-FcRH5/CD3 and Is a Requirement for Myeloma Cell Killing*. *Cancer Cell*, 2017. **31**(3): p. 383-395.
87. Buck, A.K., et al., *CXCR4-targeted theranostics in oncology*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2022. **49**(12): p. 4133-4144.
88. Lapa, C., et al., *CXCR4-directed endoradiotherapy induces high response rates in extramedullary relapsed Multiple Myeloma*. *Theranostics*, 2017. **7**(6): p. 1589-1597.
89. Herrmann, K., et al., *First-in-Human Experience of CXCR4-Directed Endoradiotherapy with ¹⁷⁷Lu- and ⁹⁰Y-Labeled Pentixather in Advanced-Stage Multiple Myeloma with Extensive Intra- and Extramedullary Disease*. *J Nucl Med*, 2016. **57**(2): p. 248-51.
90. Pawlyn, C. and F.E. Davies, *Toward personalized treatment in multiple myeloma based on molecular characteristics*. *Blood*, 2019. **133**(7): p. 660-675.
91. Mielgo-Rubio, X., et al., *Immunotherapy in non-small cell lung cancer: Update and new insights*. *J Clin Transl Res*, 2021. **7**(1): p. 1-21.
92. Fujimoto, J. and I.I. Wistuba, *Current concepts on the molecular pathology of non-small cell lung carcinoma*. *Seminars in diagnostic pathology*, 2014. **31**(4): p. 306-313.
93. Daniels, M., et al., *Whole genome sequencing for lung cancer*. *J Thorac Dis*, 2012. **4**(2): p. 155-63.
94. Egan, J.B., et al., *Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides*. *Blood*, 2012. **120**(5): p. 1060-6.
95. Maura, F., et al., *Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 3835.
96. Bolli, N., et al., *Next-Generation Sequencing for Clinical Management of Multiple Myeloma: Ready for Prime Time?* *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 189.

Anhang

I Abkürzungsverzeichnis

ACTG1	Actin gamma1
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AKT2	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
AKT3	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3
amp	Amplifikation
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
autoSZT	autologe Stammzelltransplantation
alloSZT	allogene Stammzelltransplantation
BCMA	B-cell maturation antigen
BFL-1	B-cell lymphoma 2 related protein A1
BIRC2	Baculoviral IAP repeat containing 2
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3
B2M	Beta-2-Microglobulin
Bort	Bortezomib
BRAF	B-rapidly accelerated fibrosarcoma
BTG1	B-cell translocation gene 1
ca.	circa
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CARD11	Caspase recruitment domain family member 11
Carf	Carfilzomib
CCF	Tumorzellanteil, engl. cancer cell fraction
CCND1	Cyclin D1
CCNT1	Cyclin T1
CD	Oberflächenmerkmal, engl. cluster of differentiation
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDK7	Cyclin-dependent kinase 7
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CDKN2C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C
CR	komplette Remission, engl. complete remission
CRAB	Calcium, Renal insufficiency, Anaemia, Bone lesions
CRBN	Cereblon
CT	Computertomographie
CUL4A	Cullin 4A
CUL4B	Cullin 4B
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4
CYLD	Cylindromatosis
Dara	Daratumumab
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytosintriphosphat
del	Deletion
dGTP	desoxy-Guanintriphosphat
DIS3	homolog, exosome endoribonuclease and 3' to 5' exoribonuclease
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
dTTP	desoxy-Tyrosintriphosphat
DUSP2	Dual specificity phosphatase 2
ED	Erstdiagnose
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGR1	Early growth response 1
Elo	Elotuzumab
EMD	extramedulläre MM-Manifestation, engl. extramedullary disease
et al.	et alteri, und andere
FAM46C	Family with sequence similarity 46 member C
FcRH5	Fc receptor homolog 5
FDG	Fluordesoxyglukose
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLC	freie Leichtkette, engl. free light chain

g	Gramm
<i>g</i>	Beschleunigungszahl, $g = 9,80665\text{m/s}^2$
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPRC5D	G-protein-coupled receptor family C group 5 member D
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2
h	Stunde, engl. hour
Hb	Hämoglobin
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1
IDH2	Isocitrate dehydrogenase 2
IDH3A	Isocitrate dehydrogenase 3 catalytic subunit alpha
IFNGR2	Interferone gamma receptor 2
Ig	Immunglobulin
IGF1R	Insuline like growth factor 1 receptor
IKZF1	Ikaros family zinc finger 1
IKZF3	Ikaros family zinc finger 3
IL6	Interleukin 6
IL6R	Interleukin 6-Rezeptor
IL6ST	Interleukin 6 cytokine family signal transducer
IMiDe	Immunmodulierende Substanzen, engl. immunomodulatory drugs
IMWG	International Myeloma Working Group
IRF4	Interferon regulatory factor 4
ISP	Ion Sphere Particle
ISS	International Staging System
JAK2	Janus Kinase 2
JAM-A	Junction adhesion molecule A
KDM6A	Lysine demethylase 6A
KMP	Knochenmarkpunktion
KRAS	Kirsten rat sarcoma
l	Liter
LC	Leichtkette
LDH	Laktatdehydrogenase
Len	Lenalidomid

mAB	monoklonaler Antikörper, engl. monoclonal antibody
MAF	Musculoapaneurotic fibrosarcoma oncogene
MAFB	MAF bZIP transcription factor B
MAX	MYC associated factor X
MEK	Mitogen/extracellular-signal regulated kinase
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
µl	Microliter
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MM	Multiples Myelom
MRT	Magnetresonanztomographie
MYC	Myelocytomatosis viral oncogene
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
n	Anzahl, engl. number
NaOH	Natriumhydroxid
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NFκB2	Nuclear factor kappa B subunit 2
NFκBIA	Nuclear factor kappa B inhibitor alpha
NFκBIB	Nuclear factor kappa B inhibitor beta
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NR3C1	Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1
NRAS	Neuroblastoma rat sarcoma
NTRK	Neurotrophic tropomyosin receptor kinase
OS	Gesamtüberleben, engl. overall survival
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. Polymerase chain reaction
PET-CT	Positronenemissionstomographie, kombiniert mit Computertomographie
PFS	progressionsfreies Überleben, engl. progression free survival
PFSas	progressionsfreies Überleben nach Biopsie, engl. progression free survival after sampling
PI	Proteasom-Inhibitor

PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PIK3CG	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma
PIK3R1	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1
PIK3R2	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 2
PIM1	Proviral integrations of Moloney virus 1
PIM2	Proviral integrations of Moloney virus 2
PIM3	Proviral integrations of Moloney virus 3
Pom	Pomalidomid
PR	partielle Remission, engl. partial remission
PRDM1	PR/SET domain 1
PSMA1	Proteasome 20S subunit alpha 1
PSMB5	Proteasome 20S subunit beta 5
PSMB8	Proteasome 20S subunit beta 8
PSMB9	Proteasome 20S subunit beta 9
PSMD1	Proteasome 26S subunit, Non-ATPase 1
PSMG2	Proteasome assembly chaperone 2
PTPN11	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11
RASA2	RAS p21 protein activator 2
RB1	Retinoblastoma 1
RIPK1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RIPK4	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 4
R-ISS	Revised-International Staging System
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. revolutions per minute
s	Sekunde
Sas	Überleben nach Biopsie, engl. survival after sampling
sCR	stringente komplette Remission, engl. stringent complete remission
SD	stabile Erkrankung, engl. stable disease
SHC1	Src homology 2 domain-containing transforming protein C1
SLAMF7	Signaling lymphocytic activation molecule F7
SLiM	Sixty, Light chain, MRI
SM	schwelendes Myelom, engl. smouldering myeloma

SP140	Nuclear body protein SP140
SQL	Structured Query Language
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
Std	Standard
SZT	Stammzelltransplantation
t	Translokation
TET2	Ten-elven translocation family member 2
TGF	Transforming growth factor
TGFBR2	Transforming growth factor beta receptor 2
Thal	Thalidomid
TLR3	Toll-like receptor 3
TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21
TP53	Tumor protein p53
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
TRAF3IP1	TRAF3 interacting Protein 1
UKW	Universitätsklinikum Würzburg
VAF	Varianten-Allelfrequenz, engl. variant allele frequency
VGPR	sehr gute partielle Remission, engl. very good partial remission
vs.	gegenüber, engl. versus
WHSC1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate1
XBP1	X-Box binding protein 1

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der ISP-Quantifizierung	24
Abbildung 2: Übersicht der untersuchten Patientenkohorte hinsichtlich Zytogenetik und Molekulargenetik.....	41
Abbildung 3: Anzahl an nachgewiesenen Mutationen pro Patient in Abhängigkeit des R-ISS-Stadiums	43
Abbildung 4: Anzahl an nachgewiesenen Mutationen pro Patient in Abhängigkeit des zytogenetischen Risikos	44
Abbildung 5: Anzahl an nachgewiesenen Mutationen pro Patient in Abhängigkeit vom Vorliegen einer del17p.....	45
Abbildung 6: Häufigkeiten der in der Patientenkohorte am häufigsten mutierten Gene.....	46
Abbildung 7: Anzahl an nachgewiesenen Mutationen pro Patient in Abhängigkeit vom Vorliegen einer <i>NRAS</i> -Mutation.	47
Abbildung 8: Gesamtüberleben der untersuchten Patientenkohorte.....	50
Abbildung 9: Gesamtüberleben in Abhängigkeit des R-ISS-Stadiums.....	51
Abbildung 10: Gesamtüberleben in Abhängigkeit des zytogenetischen Risikos.	52
Abbildung 11: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Vorliegen einer del17p.....	53
Abbildung 12: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Vorliegen einer <i>TP53</i> -Mutation.....	54
Abbildung 13: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Vorliegen einer EMD	55
Abbildung 14: Progressionsfreies Überleben nach Sampling	56

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CRAB-Kriterien.....	2
Tabelle 2: SLiM-Kriterien	3
Tabelle 3: R-ISS-Klassifikation mit 5-Jahres-Überlebensrate	5
Tabelle 4: Laborgeräte.....	10
Tabelle 5: Materialien-Kits	11
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien.....	12
Tabelle 7: Software und Programme.....	13
Tabelle 8: Gene des M ³ P-Panels	16
Tabelle 9: Mastermix zur Vorbereitung der DNA-Libraries	16
Tabelle 10: Ablauf des PCR-Programms 1 "Lib1_ampli"	17
Tabelle 11: Ablauf des PCR-Programms 2 "Lib2_FuPa"	18
Tabelle 12: Verwendete Reagenzien für die Ligation der DNA mit den Barcodes und Adapttern.....	18
Tabelle 13: Ablauf des PCR-Programms 3 "Lib3_ligation"	19
Tabelle 14: Mastermix für die qPCR	20
Tabelle 15: Verdünnungsreihe der Standards für die qPCR.....	20
Tabelle 16: Plattenformat der qPCR	21
Tabelle 17: Amplifikationsansatz der qPCR	22
Tabelle 18: Inhalt des 8-Well-Strip für den Ion OneTouch™ ES.....	23
Tabelle 19: Ein- und Ausschlusskriterien	26
Tabelle 20: Definitionen von Variablen im Rahmen der Datenerhebung	27
Tabelle 21: Übersicht der erhobenen MM- und patientenbezogenen Variablen	27
Tabelle 22: Übersicht der Therapie-bezogenen Variablen	29
Tabelle 23: Patientencharakteristik des Gesamtkollektivs	33
Tabelle 24: Therapiecharakteristika der Gruppe der RRMM-Patienten	37
Tabelle 25: Mittels M ³ P-Panel-Sequenzierung nachgewiesene Mutationen des Patientenkollektivs	39

IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank all denjenigen aussprechen, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Einsele bedanken für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Klinik anfertigen zu können.

Mit Herrn Prof. Dr. Martin Kortüm hatte ich nicht nur einen äußerst kompetenten und erfahrenen Internisten und Hämatonkologen, sondern auch einen engagierten Doktorvater an meiner Seite. Als Leiter des Lehrstuhls für Translationale Myelomforschung wusste ich mich bei ihm in den besten Händen. Mit ihm bin ich auf der Suche nach konkreten Fragestellungen dieser Arbeit immer tiefer in das Thema „Multiples Myelom“ eingetaucht. Seine Leidenschaft und Begeisterung für die Forschung in diesem Bereich konnte ich bei jedem Treffen spüren. Herzlichen Dank für die gute Betreuung und die Hilfestellungen im Rahmen der Erstellung dieser Arbeit.

Daneben gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Max Bittrich, der mich als erster Ansprechpartner während des Entstehungsprozesses dieser Arbeit begleitet hat. Er stand mir jederzeit für Fragen zur Verfügung, hat sich stets Zeit für Treffen eingeräumt und mich immer wieder motiviert. Vielen Dank für die Unterstützung, die Geduld, die konstruktive Kritik und die entgegengebrachte Ermutigung.

Herrn Dr. Santiago Barrio danke ich für die Einführung in das Verständnis bezüglich der Laborarbeiten.

Auch bei Herrn Matteo Da-Viá möchte ich mich für die hilfreichen und klärenden Gespräche im Rahmen der Datenerhebung bedanken.

Zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie für die Unterstützung im Rahmen dieser Doktorarbeit, aber auch während der gesamten Zeit des Medizinstudiums und darüber hinaus bedanken. Ich danke vor allem meiner Mutter und meiner Schwester für die immer wieder aufbauenden Worte, die liebevolle Unterstützung und die unermüdliche Fürsorge auch in den anstrengendsten Zeiten.