

MRD-Diagnostik bei Chronisch lymphatischer Leukämie / CLL – NGS basiert

Medizinischer Hintergrund

Chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämie im Erwachsenenalter. Sie ist charakterisiert durch eine Akkumulation von reifzelligem neoplastischen CD5+Lymphozyten im Blut/Knochenmark und sekundären lymphatischen Organen. Zur Diagnose ist gemäß der *S3 Leitlinie des Leitlinienprogramms Onkologie* die Bestimmung des Immunphänotyps, d.h. das Proteinprofil an der Oberfläche der klonalen B-Zellpopulation, essentiell. Des Weiteren sind zur Diagnosesicherung einer CLL >5000 monoklonale B-Zellen/ μ l nachzuweisen.

Bei Vorliegen einer klonalen B-Zellpopulation ist typischerweise ein IgVH-Rearrangement exprimiert. IGHV ist ein Genlocus auf Chromosom 14 in der Bande q32. Im nativen Zustand besteht dieser aus 62 IGHV, 27 IGHD und 6 IGJ Genen (Scheijen et al. 2019). Ausschließlich in der B-Zelllinie findet zuerst eine Rekombination eines IGHD Genes mit einem IGJ Gen und anschließend mit einem IGHV Gen auf DNA-Ebene statt. Das Ergebnis ist ein VDJ-Rearrangement, welches aufgrund der funktionellen Rekombinationsmöglichkeiten nur bei einer von ca. 6 Millionen B-Zellen vorkommt. Zusammen mit weiteren Mechanismen wie somatischer Hypermutation potenziert sich die Summe der möglichen B-Zellrezeptor-Rekombinationen auf ca. 10^{12} . Somit ist es extrem unwahrscheinlich, dass zwei unabhängig voneinander entstandene B-Zellen das exakt gleiche VDJ-Rearrangement aufweisen, was den IGHV-Locus zum Nachweis einer klonalen B-Zellpopulation prädestiniert. Außerdem ist der IGHV-Mutationsstatus zusammen mit anderen Markern Teil eines prognostischen Scores bei CLL (siehe hierzu Labmed-Letter 130, 11/2019).

Stellenwert der MRD-Diagnostik zum Zeitpunkt der Diagnose

Die S3-Leitlinie empfiehlt, nach gestellter Diagnose bei nicht behandlungsbedürftigen Patienten im ersten Jahr alle 3-6 Monate und ab dem zweiten Jahr alle 3-12 Monate Verlaufskontrollen durchzuführen. Diese beinhalten z.Zt. beispielsweise Blutbild und die Bestimmung des klinischen Stadiums. Sobald eine Progression oder ein Rezidiv mit Therapieindikation vorliegt, umfasst die Diagnostik außerdem z.B. die Erhebung des TP53-Status (SOLL), des IGHV-Mutationsstatus (SOLLTE) und eine Basisuntersuchung/Materialasservierung für die Diagnostik der minimalen Resterkrankung (MRD) (KANN). Die MRD erlaubt das individuelle Monitoring der Progression, der Therapie-Effizienz/des Therapie-Ansprechens sowie möglicher Rezidive, so dass theoretisch gezieltere, individuelle Therapien angewandt werden könnten. Eine Basisuntersuchung für die MRD ist essentiell, da ohne einen Ausgangswert die Beschreibung des Verlaufs der Erkrankung nicht möglich ist. In der Leitlinie herrscht Konsens, dass nach Abschluss einer Therapie eine Untersuchung hinsichtlich der MRD angeboten werden kann.

Methodische Vielfalt zur MRD-Quantifizierung

Zur Bestimmung der MRD existiert eine Vielzahl an Techniken. Zum einen wurde bisher oft eine allelspezifische quantitative real-time PCR durchgeführt, bei der eigens für den Patienten spezifische Primer entworfen wurden (Sensitivität 10^{-6}). Eine weitere Methode beruht auf einer 6-Farben-Durchflusszytometrie, bei der CD19, CD20, CD5, CD43, CD79b, CD81, CD22 und CD3 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden können und somit die klonale CLL-Zellpopulation quantifiziert werden kann (Rawstron et al., 2013) (Sensitivität 10^{-4}). Die dritte und neueste der hier vorgestellten Methoden basiert auf Next Generation Sequencing (NGS). Hierbei wird aus einer Patientenprobe die Gesamtheit der vorliegenden VDJ-Rearrangements sequenziert und quantifiziert. Wenn die Sequenz des zum Diagnosezeitpunkt bestimmten IGHV-Rearrangements bekannt ist, kann der Anteil der Zellen, die dieses Rearrangement tragen, bestimmt werden. Bei dieser Methodik ist eine Sensitivität von bis zu 10^{-6} möglich (abhängig von eingesetzter DNA-Menge und Sequenziertiefe. Oft ist eine Sensitivität von 10^{-4} ausreichend.)

MRD als unabhängiger prognostischer Faktor bei CLL

Laut der European Research Initiative on CLL (ERIC) wurden schon mehr als 20 Studien mit MRD-Analyse durchgeführt. Allen gemein war, dass das progressionsfreie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) der Patienten signifikant erhöht sind, wenn eine MRD unterhalb von 10^{-4} (MRD negativ) nachweisbaren klonalen CLL-Zellen in der Gesamtheit der Leukozyten erreicht wurde.

Böttcher et al. konnten zeigen, dass das MRD-Level einen prognostischen Faktor nach Erstlinientherapie (entweder Fludarabin-Cyclophosphamid (FC) oder FC-Rituximab (FCR)) darstellt. War die MRD zwei Monate nach Ende der Behandlung $<10^{-4}$, so betrug das mediane PFS 68,7 Monate und war damit signifikant höher im Vergleich zu den Gruppen MRD zwischen 10^{-2} und 10^{-4} bzw. $>10^{-2}$ (40,5 bzw. 15,4 Monate PFS). Das mediane OS für die Gruppe MRD $>10^{-2}$ betrug 48,4 Monate, wohingegen für die anderen beiden Gruppen aufgrund der Studienlaufzeit kein mediane OS bestimmbar war. Neben diesen Daten, die eine niedrige MRD ($<10^{-4}$) mit einer besseren Prognose assoziieren, konnte die Studie auch zeigen, dass die Bestimmung der MRD zur Einordnung der Therapie-Effizienz verwendet werden kann: Beide Studienarme (FC und FCR) hatten initial eine quasi identische Tumorlast ($7,6 \times 10^{-1}$ vs. $7,5 \times 10^{-1}$). Nach drei Therapiezyklen betrug der Unterschied bereits eine Log-Stufe ($7,3 \times 10^{-3}$ vs. $7,0 \times 10^{-4}$). Beim finalen Restaging hatten 35% der FC-behandelten Patienten eine MRD $<10^{-4}$, wohingegen 63% der FCR-behandelten Patienten unterhalb dieser Grenze lagen. Rawstron et al. berichten hierzu, dass sich das Risiko einer Progression pro Log-Reduktion der MRD um 33% verringert (Marker: PFS, MRD-Kategorisierung 3 Monate nach Therapieende) (iwCLL Meeting 2015).

Auch bei Kombinationstherapien wie Venetoclax/Rituximab und Bendamustin/Rituximab oder unter Venetoclax bei relapsed/refractory CLL kann die MRD nach Therapieende als prognostischer Faktor für das PFS herangezogen werden (Kater et al., 2018; Stilgenbauer et al., 2017).

Therapiesteuerung anhand der MRD

Das frühe Erreichen einer tiefen MRD kann ebenfalls einen Einfluss auf das Therapie-Regime haben: So konnten Strati et al. zeigen, dass Patienten, die schon nach drei Zyklen FCR MRD-negativ waren, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich PFS und OS im Vergleich zu Patienten haben, die anschließend noch drei Zyklen bekamen und MRD-negativ waren. Patienten, die nach drei Zyklen noch MRD-positiv, nach 6 Zyklen MRD-negativ waren, hatten signifikant schlechtere PFS und OS. Somit kann die MRD-Diagnostik schon früh innerhalb der Therapie als prognostischer Faktor für den Krankheitsverlauf und als Marker für individuellere Therapieverläufe fungieren, unabhängig beispielsweise vom IGHV-Mutationsstatus, zytogenetischen Aberrationen oder dem TP53-Mutationsstatus.

Wahl des Materials zur MRD-Bestimmung

Bei der Bestimmung der MRD als prognostischen Faktor sollte je nach Therapie wegen des Kompartiment-Effekts auf das verwendete Material geachtet werden: Ist z.B. nach einer FCR-basierten Therapie der MRD-Status im peripheren Blut (pB) negativ, im Knochenmark (KM) hingegen positiv, ist das PFS ähnlich zu der Kombination pB negativ/ KM negativ. Wird allerdings Alemtuzumab verwendet, ist das PFS bei pB negativ / KM positiv vergleichbar schlecht wie bei der Kombination pB positiv/ KM positiv (Rawstron et al., Haematologica 2015).

MRD als prognostischer Marker bei B-ALL

Ebenso kann die IGHV-MRD-Diagnostik bei weiteren Neoplasien, die mit klonalen B-Zellpopulationen einhergehen, verwendet werden. (Analog ist dies auch bei T-ALL mit der Quantifizierung der TCR-Rearrangements möglich, was allerdings nicht Gegenstand dieser Laborinformation sein soll.) So ist die MRD Diagnostik der stärkste prognostische Faktor etwa bei juveniler B-ALL (BCP-ALL): Das 7y-event-free survival (EFS) nach Diagnose kann in Abhängigkeit von der erreichten MRD (gemessen an Tag 78, nach Induktionstherapie) in drei signifikant unterschiedliche Gruppen unterteilt werden: MRD negativ ($<10^{-4}$): 91,1%, bei MRD $<10^{-3}$ und $>10^{-4}$: 76% und bei MRD $>10^{-3}$: 46,6% 7y-EFS (van Dongen et al., 2015).

MRD als prognostischer Marker nach allogener Stammzell-Transplantation bei CLL

Neben der Kategorisierung von Therapie-Effekten ist die MRD ebenfalls ein nützlicher Parameter bei Verlaufskontrollen nach allogener Stammzell-Transplantation: So wurde berichtet, dass MRD-Negativität 12 Monate nach durchgeführter Transplantation der einzige Faktor sei, der mit höherem PFS und OS assoziiert ist (Algrin et al., 2017).

MRD-Diagnostik in Leitlinien

Aufgrund des offensichtlich hohen Stellenwertes der MRD bezüglich Therapie-Effizienz und Prognose hat diese Diagnostik bereits Eingang in Empfehlungen/ Leitlinien gefunden.

Das Deutsche Ärzteblatt berichtet in seiner Ausgabe vom Januar 2019 von MRD-gesteuerten Therapien, bei der nach Debulking- und Induktionstherapie eine Erhaltungstherapie abhängig vom MRD-Status angeschlossen wird. Hier konnten laut ersten Ergebnissen 90% der Erstlinien-therapierten Patienten eine MRD-negative Remission erreichen.

In der DGHO-Stellungnahme zur Neubewertung von Venetoclax (2019) wird der MRD-Status zur Analyse der Therapie-Effizienz Bendamustin-Rituximab vs. Venetoclax-Rituximab herangezogen (nach Therapie 13,3% vs. 62,4% MRD-negativ).

Die EMA hat die MRD als frühen Indikator für PFS in einer Leitlinie veröffentlicht (2015; „low MRD levels are a desirable and achievable goal of CLL therapy“).

Laut S3-Leitlinie CLL sollen im ersten Jahr nach Chemo(-immun)therapie alle drei Monate und ab dem zweiten bei CR alle sechs Monate (KANN) sowie bei PR weiterhin alle drei Monate Nachsorgeuntersuchungen erfolgen. Im Zuge dieser Termine erscheint die Erhebung des MRD-Status äußerst sinnvoll.

Methode:

NGS mittels LymphoTrack® Dx IGH FR1 Assay for MiSeq

Hinweis: Wenn es sich nicht um eine Untersuchung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bzw. zum Zeitpunkt vor Therapie handelt, teilen Sie uns bitte zusätzlich die Sequenz des VDJ-Rearrangements der klonalen B-Zellpopulation mit, damit eine sinnvolle Analyse und Beurteilung hinsichtlich des MRD-Status möglich ist. Die Methode kann außerdem akzessorisch zur Bestimmung des IgVH-Mutationsstatus eingesetzt werden, sofern mehr als ein dominantes VDJ-Rearrangement der gleichen Familie die Analytik verkompliziert.

Material:

5 ml EDTA-Blut oder EDTA-Knochenmark

Kontakt:

Dr. Marco Graf Tel.: +49 231 9572 6659
E-Mail: graf@labmed.de

Literatur:

- van Dongen JJM et al. (2015). Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 1215:3996-4009
- S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL). Langversion 1.0 - März 2018, AWMF-Nr. 018-0320L
- Labmed-Letter Nr. 130, November 2019 (zu CLL-IPI)
- Rawstron AC et al. (2013). Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update in the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia* 27: 142-149
- Böttcher S et al. (2012). Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol* 20: 980-988
- Strati P et al. (2014). Eradication of bone marrow minimal residual disease may prompt early treatment discontinuation in CLL. *Blood* 123: 3727-3732
- Kovacs G et al. (2016). Minimal Residual Disease Assessment Improves Prediction of Outcome in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Who Achieve Partial Response: Comprehensive Analysis of Two Phase III Studies of the German CLL Study Group. *J Clin Oncol* 34: 3758-3765
- <http://www.ericll.org/wp-content/uploads/2017/11/MRD-in-CLL.pdf>
- European Medicines Agency (2015). Guideline on the use of minimal residue disease as an endpoint in chronic lymphocytic leukaemia studies.
- Algrin C et al. (2017). Flow cytometry minimal residual disease after allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 98: 363-370
- Kater AP et al. (2018). Fixed Duration of Venetoclax-Rituximab in Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia Eradicates Minimal Residual Disease and Prolongs Survival: Post-Treatment Follow-Up of the MURANO Phase III Study. *J Clin Oncol* 37: 269-286
- Hallek M et al. (2018). Guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment and supportive management of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*
- Stilgenbauer S et al. (2017). 22nd EHA Annual Meeting, Oral Presentation #S771