

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie / Hämatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Droplet Digital PCR zur Quantifizierung der minimalen Resterkrankung (MRD) bei der Akuten Lymphoblastischen Leukämie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Schwinghammer-Gantert  
geborene Schwinghammer

Datum der Promotion: 29. November 2024



## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis .....	iii
Abbildungsverzeichnis .....	iv
Abkürzungsverzeichnis .....	v
Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	3
1 Einleitung .....	5
1.1 Akute Lymphoblastische Leukämie.....	5
1.2 MRD - <i>Minimal Residual Disease</i> .....	5
1.3 PCR-basierte MRD-Quantifizierung .....	6
1.4 Ziel der Studie .....	7
2 Methodik .....	9
2.1 Studiendesign .....	9
2.2 Präparation der Patientenproben .....	11
2.3 Quantifizierung des MRD-Wertes .....	12
2.3.1 <i>Real-time PCR</i> .....	12
2.3.2 <i>Droplet Digital PCR</i> .....	13
2.3.2.1 Materialien und technisches Equipment .....	15
2.3.2.2 Durchführung der MRD-Quantifizierung mit ddPCR .....	15
2.3.2.3 Ausarbeitung und Anwendung der Auswertungs- und Interpretationskriterien .....	19
2.3.2.4 Intra- und Inter-Assay Validierung der ddPCR.....	24
2.3.3 Multi-Color-Durchflusszytometrie .....	25
2.4 Statistische Auswertung .....	26
3. Ergebnisse .....	27
3.1 Signifikante Übereinstimmung zwischen den Messergebnissen der ddPCR und der qPCR.....	27

---

3.2	Akkurate Reproduzierbarkeit und Messgenauigkeit der ddPCR.....	28
3.3	Sensitivität und Quantitativer Range der MRD-Quantifizierung – Ein Vergleich zwischen der ddPCR und der qPCR .....	30
3.4	Abgleich der PCR-MRD-Ergebnisse mit der Durchflusszytometrie .....	31
4.	Diskussion.....	33
4.1	Implikationen für die klinische Praxis und zukünftige Forschung.....	35
4.2	Technische Grenzen und Herausforderungen der ddPCR .....	36
	Literaturverzeichnis .....	39
	Eidesstattliche Versicherung.....	45
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	46
	Auszug aus der Journal Summary List .....	48
	Druckexemplar der Publikation .....	49
	Curriculum vitae .....	69
	Komplette Publikationsliste .....	71
	Danksagung .....	72

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über das Studiendesign .....	11
Tabelle 2: Auflistung der mit der ddPCR verwendeten Materialien und des technischen Equipments .....	15
Tabelle 3: Beispiel einer 96-well PCR-Plattenbelegung einer ddPCR-Analyse .....	16
Tabelle 4: Protokoll des Reaktionsansatzes der ddPCR .....	17
Tabelle 5: Übersicht über den experimentellen Ansatz der Studie mittels ddPCR .....	19
Tabelle 6: Grundkriterien zur Auswertung der MRD-Quantifizierung mit ddPCR .....	22
Tabelle 7: Bewertungskriterien einer Targetprobe .....	23
Tabelle 8: Übersicht über die Inter- und Intra-Assay Validierung der ddPCR.....	25

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Tröpfchengenerierung bei der ddPCR-Methode .....	14
Abbildung 2: Schematische Verteilung der Target-DNA in einzelne Partitionen.....	14
Abbildung 3: Exemplarische Darstellung einer individuellen sowie manuellen Platzierung des <i>Thresholds</i> .....	21

## Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
BC	<i>Buffy Coat</i>
BQL	Positivität unterhalb des Quantitativen Ranges / Limits ( <i>below quantitative limit</i> )
C <sub>T</sub> -Wert	Schwellenwertzyklus der qPCR-Methode ( <i>Threshold Cycle</i> )
<i>Cut off</i>	MRD-Toleranzwert zur klinischen Entscheidungsfindung
CV	Variationskoeffizient
ddPCR	<i>Droplet Digital Polymerase chain reaction</i>
DNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
dPCR	<i>Digital Polymerase chain reaction</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
Flow	Multi-Color-Durchflusszytometrie
HEX	Hexachlorfluorescein
IG / TR	Immunglobulin / T-Zellrezeptor
MRD	Minimale Resterkrankung ( <i>Minimal Residual Disease</i> )
NTC	Negativkontrolle ohne Target ( <i>No Template Control</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
qPCR	(quantitative) <i>Real-time Polymerase chain reaction</i>
QR / QL	quantitativer Range / Limit der Quantifikation
SD	Standardabweichung
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

## Zusammenfassung

Die im Kindesalter am häufigsten vorkommende neoplastische Erkrankung des blutbildenden Systems ist die Akute Lymphoblastische Leukämie (ALL). Innerhalb von standardisierten Therapieprotokollen wird unter Verwendung von Immunglobulin / T-Zellrezeptor Genumlagerungen die minimale Resterkrankung (MRD) quantifiziert. Die MRD dient als stärkster unabhängiger prognostischer Parameter nicht nur zur Stratifizierung der Patienten in Behandlungsgruppen unterschiedlicher Chemotherapieintensitäten, sondern auch der kontinuierlichen Therapieanpassung. Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ist die derzeit standardisierte und etablierte PCR-basierte Technologie zur MRD-Quantifizierung. Als relative Messmethode ergeben sich jedoch technologische Limitationen. Die neue PCR-Technologie, *Droplet Digital PCR* (ddPCR), bietet mehrere methodische Fortschritte, die eine präzisere Quantifizierung des MRD-Wertes ermöglichen könnten. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass das Reaktionsvolumen mit der zu untersuchenden DNA-Sequenz in Partitionen aufgeteilt wird und so einzelne, voneinander unabhängige PCR-Reaktionen realisiert werden.

In der vorliegenden Studie wurden die beiden Messmethoden in Bezug auf die MRD-Quantifizierung im Rahmen einer Blindstudie mit Proben von pädiatrischen Patienten mit einem ALL-Rezidiv miteinander verglichen. Es erfolgte ein prospektiver Abgleich der Messergebnisse mit der Multi-Color-Durchflusszytometrie (Flow) als eine dritte MRD-Quantifizierungsmethode. Zudem wurde ein retrospektiver Studienansatz gewählt, um die qualitative und quantitative Messgenauigkeit der ddPCR im Vergleich zur qPCR zu überprüfen. Hierbei wurden ausgewählte Proben einer adulten Kohorte mit der ddPCR reevaluiert, die ein positives jedoch niedrig-kritisches MRD-Ergebnis aufwiesen. Die veröffentlichten Leitlinien (qPCR) und die neuesten Auswertungs- und Interpretationskriterien (ddPCR, Flow) wurden für die Datenanalyse angewandt. Diejenigen der ddPCR wurden im Rahmen dieser Studie überarbeitet und spezifiziert. Die erhobenen Ergebnisse belegten, dass die ddPCR eine überlegene Messgenauigkeit sowie eine akkurate Reproduzierbarkeit gegenüber der qPCR aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass die ddPCR in Bezug auf die Sensitivität und dem Limit der Quantifizierung (QL) in großem Maße die der qPCR übersteigt und dadurch eine präzisere Ermittlung des MRD-Wertes gerade bei Proben mit geringen DNA-Mengen ermöglicht. So wurde die Anzahl von BQL-MRD-Ergebnissen gegenüber der qPCR deutlich reduziert. Zudem zeigte sich im Abgleich der



Ergebnisse der ddPCR und qPCR mit der Flow-Methode, dass die Flow-MRD-Ergebnisse eher denen der ddPCR als der qPCR entsprechen. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie erscheint die ddPCR als diejenige Messmethode, die eine sensitivere und akkuratere MRD-Quantifizierung ermöglicht, was folglich die klinische Entscheidungsfindungen in Zukunft erleichtern könnte. Somit erweist sich die ddPCR als eine mögliche additive Diagnostikmethode oder sogar als eine potentielle Alternative zur qPCR für die MRD-Quantifizierung bei der ALL. In repräsentativen klinischen Studien muss zukünftig die Erleichterung der klinischen Entscheidungsfindung durch die Anwendung der ddPCR hinsichtlich der MRD-Quantifizierung weitergehend untersucht werden.

## Abstract

The most common neoplastic disease of the blood-forming system in childhood is Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). Within standardized therapy protocols, the Minimal Residual Disease (MRD) is quantified using immunoglobulin / T-cell receptor gene rearrangements. As the strongest independent prognostic parameter, it serves to stratify patients into treatment groups of different intensities of chemotherapy and also for continuous therapy adjustment. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) is the currently standardized PCR-based technology for MRD quantification. As a relative measurement method, however, there are technological limitations. The new PCR-technology, Droplet Digital PCR (ddPCR), offers several methodological advances that could enable more precise MRD quantification. This method divides the reaction volume with the DNA sequence into partitions so that individual, independent PCR reactions can be realized.

In the present study, the two methods were compared with regard to MRD quantification within the framework of a blind study in which samples from pediatric patients with an ALL-relapse were measured. A prospective comparison of the results with multi-color flowcytometry (Flow) as a third MRD quantification method was performed. In addition, a retrospective study approach was chosen to assess the qualitative and quantitative accuracy of ddPCR compared to qPCR. Selected samples from an adult cohort were re-evaluated with ddPCR, which showed a positive but low-critical MRD. The published guidelines (qPCR) and the latest evaluation and interpretation criteria (ddPCR, Flow) were applied for the data analysis, those of ddPCR were revised and specified in the context of this study. The results demonstrated that ddPCR has superior measurement accuracy and accurate reproducibility. It could be proven that ddPCR exceeds qPCR in terms of sensitivity and limit of quantification (QL) and thus enables a more precise determination of the MRD. Consequently, the number of low-critical MRD that were below the QL was significantly reduced compared to qPCR. In addition, the comparison of the results of ddPCR and qPCR with Flow showed that the Flow-MRD-results corresponded more to those of ddPCR than qPCR.

Based on the results of this study, ddPCR appears to be the measurement method that provides more sensitive and accurate MRD quantification, which could subsequently

facilitate clinical decision-making. Thus, ddPCR proves to be a possible additive diagnostic method or even a potential alternative to qPCR for MRD quantification in ALL. In representative clinical studies, the facilitation of clinical decision-making by the application of ddPCR with regard to MRD quantification must be further investigated in the future.

# 1 Einleitung

## 1.1 Akute Lymphoblastische Leukämie

Die Leukämie ist eine neoplastische Erkrankung des blutbildenden Systems und ist durch eine ungehemmte klonale Proliferation unreifer Zellen im Knochenmark gekennzeichnet. Im Kindesalter ist die am häufigsten vorkommende Leukämieform die Akute Lymphoblastische Leukämie (ALL).[1, 2] Dabei wird ein Häufigkeitsgipfel der Manifestation zwischen dem zweiten und vierten Lebensjahr beobachtet, wobei männliche Patienten<sup>1</sup> ein 30 % höheres Erkrankungsrisiko besitzen als weibliche.[1, 3] Durch standardisierte Therapieprotokolle, deren Hauptbestandteil eine Polychemotherapie ist, konnte über die letzten Jahrzehnte eine Steigerung der Gesamtüberlebensrate auf 80 bis 90 % der Kinder mit ALL erzielt werden.[3] Allerdings erleiden weiterhin 15 bis 20 % der Patienten ein Rezidiv. Ein Grund hierfür liegt darin, dass ihre leukämischen Zellen durch eine Resistenzentwicklung vergleichsweise weniger gut auf die Therapie ansprechen und ihre Remissionsrate niedriger ausfällt.[4] Ihr Krankheitsverlauf weist folglich eine ungünstigere Prognose auf.[4] Die Therapie der rezidierten ALL im Kindes- und Jugendalter stellt somit einen Balanceakt zwischen einer ausreichend intensiven Therapie und Methoden der Nebenwirkungsreduktion dar. Im Rahmen von Therapieoptimierungsstudien konnte indessen eine Verbesserung der Prognose von Kindern mit einem ALL-Rezidiv erzielt werden. Bewährt hat sich hier die Quantifizierung der minimalen Resterkrankung (*Minimal Residual Disease*, MRD), die eine kontinuierliche Therapieüberprüfung und -anpassung ermöglicht.[4-9]

## 1.2 MRD - *Minimal Residual Disease*

Die Quantifizierung der MRD ist ein wesentlicher Bestandteil der klinischen Behandlung von Kindern und Erwachsenen mit neu diagnostizierter und rezidivierter ALL.[10-12] Einerseits wird der MRD-Wert als stärkster unabhängig prognostischer Parameter für die Patienteneinteilung in verschiedene Behandlungsgruppen unter jeweiliger Anpassung

---

<sup>1</sup> Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation das generische Maskulinum verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich – sofern nicht anders kenntlich gemacht – auf alle Geschlechter.

der Intensität der Chemotherapie eingesetzt, andererseits beeinflusst er fortlaufende Behandlungsentscheidungen.[5-9] Darüber hinaus leistet der MRD-Wert eine prognostische Aussage über das Überleben der Patienten nach Stammzelltransplantation.[7, 13-16]

Die Messung der MRD basiert auf dem Nachweis von Genumlagerungen der Immunglobulin- (IG) oder T-Zell-Rezeptoren (TR) der klonalen Leukämiezellen und stellt folglich einen patienten- und leukämiespezifischen Marker dar. Die Extraktion und Quantifizierung erfolgt aus Proben der Knochenmarkspunktion zu terminierten Zeitpunkten innerhalb der entsprechenden (Studien-)Therapieprotokollen. In einigen Fällen werden Proben des peripheren Blutes zur MRD-Bestimmung verwendet.

Die Herausforderung der MRD-Diagnostik der ALL besteht in der Möglichkeit einer dynamischen Veränderung der leukämischen Zellen während der Erkrankung, sodass es zu einer Selektion einzelner Leukämiepopulationen oder zum Entstehen neuer leukämischer (Sub-)Klone kommen kann. Ein entscheidender Mechanismus ist in diesem Zusammenhang die Entwicklung von Resistenzen gegenüber den Chemotherapeutika.[17] Eine weitere Problematik besteht darin, dass die leukämischen Zellpopulationen in kleinsten Konzentrationen vorliegen können, womit sie durch die aktuell vorherrschende PCR-Methode nicht mehr valide quantifizieren werden können. Umso problematischer ist dies, weil gerade beim Auftreten von Rezidiven der ALL die Vermehrung dieser innerhalb der Diagnose nicht mehr quantifizierbaren Zellpopulationen eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.[17-19] Um die falsch-negative Quantifizierung der MRD zu reduzieren, sind Forschungsansätze zur genaueren quantitativen und qualitativen Messgenauigkeit einer PCR-Methode von hoher Relevanz.

### **1.3 PCR-basierte MRD-Quantifizierung**

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time polymerase chain reaction*, qPCR) ist die derzeit standardisierte und etablierte PCR-basierte Technologie zur MRD-Quantifizierung. Sie stellt in Europa somit den „Goldstandard“ in multizentrischen Studien von hämatologischen Malignomen dar.[20-22] Die technologischen Limitationen, die sich bei der qPCR dennoch ergeben, sind generell darauf zurückzuführen, dass sie eine relative Quantifizierungsmethode ist und somit die Evaluation auf einer vom initialen Diagnosematerial des Patienten berechneten Standardkurve basiert. Dies kann etwa dazu führen, dass eine leukämische Population, die auf subklonaler Ebene in der diagnostischen Probe vorhanden ist, überschätzt wird, was in einer nebenwirkungsreichen

Intensivierung der therapeutischen Maßnahmen münden kann.[23] Eine weitere Problematik hinsichtlich der qPCR ist, dass eine signifikant hohe Anzahl von Messwerten im Bereich des quantitativen Ranges / Limits (QR / QL) der Methodik liegen.[20, 22] Die daraus resultierende geringe methodische Präzision kann die klinische Entscheidungsfindung erheblich erschweren.

Als absolute Quantifizierung stellt die digitale PCR (*Digital Polymerase chain reaction*, dPCR) die dritte Generation von PCR-basierten Methoden dar.[24] Sie zeichnet sich dadurch aus, dass das PCR-Reaktionsvolumen mit der zu untersuchenden DNA-Sequenz in tausende Partitionen aufgeteilt wird und so einzelne, voneinander unabhängige PCR-Reaktionen realisiert werden.[24] Bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten dPCR-Verfahren liegt das genetische Material in einer wässrigen Trägersubstanz als Mikrofluid in unpolarer Öl-Phase vor - die *Droplet Digital PCR* (*Droplet Digital Polymerase chain reaction*, ddPCR). Die gewonnenen einzelnen Mikrovolumina der jeweiligen Probe stellen dann eine Endpunkt-Amplifikation dar.[24, 25] Ein Verfahren des optischen bzw. digitalen Auslesens erlaubt es, das Verhältnis der einzelnen Partitionen hinsichtlich der Präsenz oder Abwesenheit der Target-DNA zu ermitteln und auf Grundlage der Annahme einer Poisson-Verteilung eine Zellkonzentration pro Mikroliter zu berechnen.[24] Ein Vorteil ist hierbei, dass die ddPCR aufgrund dieser Partition eine höhere Toleranz gegenüber PCR-Inhibitoren aufweist, sodass die Fluoreszenzsignalveränderungen präziser erkannt werden können und eine genauere Unterscheidung zum Hintergrundsignal ermöglicht wird.[25] Die ddPCR führt folglich zu einer Verbesserung der Quantifizierungseffizienz der Zielsequenz, sodass eine präzisere Bestimmung des MRD-Wertes, vor allem in niedrigeren DNA-Konzentrationen, ermittelt werden kann.[24-26]

#### **1.4 Ziel der Studie**

Da gerade MRD-Proben von Patienten mit relativ geringer Tumorlast erheblich die klinische Entscheidungsfindung, Therapieadjustierung und Prognose erschweren, ist eine hochsensitive und spezifische Quantifizierungsmethode zur MRD-Messung von größter Relevanz. Bei entsprechenden Patienten bewegt sich die Anzahl leukämischer Zellen in einem Bereich oder unterhalb von Grenzwerten (*cut offs*), zumeist zwischen  $1 \times 10^{-4}$  bis  $1 \times 10^{-3}$  Leukämiezellen, bezogen auf die Gesamtanzahl untersuchter, mononukleärer Zellen in einer MRD-Probe.[14] Als ein auch in dieser Größenordnung zuverlässiges und akkurates Messverfahren bietet sich die Technologie der ddPCR an, da sie im Gegensatz

zur aktuell vorherrschenden Methode („Goldstandard“) – der qPCR – auf einer absoluten Quantifizierung basiert und somit keine Kalibrierung einer Standardkurve benötigt.[24-26] In der medizinischen Diagnostik von onkologischen Entitäten, wie Lymphomen, Chronischer Lymphoblastischer Leukämie und Akuter Myeloischer Leukämie findet die ddPCR so bereits Anwendung.[27-29] Hinsichtlich solch hämatologischer Malignomen belegen Studien diesbezüglich die methodisch-technologischen Vorteile der ddPCR gegenüber der qPCR.[27, 28, 30-33]

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, anhand des Anwendungsfalls von Patienten mit Diagnose oder einem Rezidiv der ALL zu prüfen, inwiefern die ddPCR im Vergleich zur qPCR tatsächlich eine geeignetere PCR-Methode zur verlässlichen und sensitiven Quantifizierung der MRD darstellt und somit die MRD-Diagnostik verbessert werden kann. Damit soll nicht zuletzt ein Beitrag dazu geleistet werden, standardisierte Arbeits- und Interpretationsverfahren zur Verwendung der ddPCR-Technologie für die MRD-Quantifizierung zu etablieren. Diesbezüglich stellen die 2020 vom EuroMRD Konsortium anhand von Patienten mit einem Mantelzelllymphom herausgearbeiteten „Leitlinien“ einen ersten Schritt zu solch einer Standardisierung dar.[34] Darauf aufbauend werden mit der vorliegenden Studie die entsprechenden MRD-Auswertungsleitlinien durch weitere Kriterien spezifiziert, um so eine detaillierte Anleitung zur Durchführung sowie Interpretation zu erarbeiten und diese auf die MRD-Quantifizierung bei Patienten einer ALL anzuwenden.

Für den Vergleich zwischen ddPCR und qPCR werden in der Studie zwei unterschiedliche Ansätze zur methodischen Gegenüberstellung gewählt. Einerseits erfolgt eine Blindstudie, die pädiatrische Patienten mit einem Rezidiv der ALL inkludiert und prospektiv die Technologien der qPCR mit der ddPCR vergleicht. Um die dabei erzielten Messergebnisse durch einen weiteren Abgleich zu überprüfen, werden zudem prospektive Messungen anhand der Multi-Color-Durchflusszytometrie (Flow) als eine dritte MRD-Quantifizierungsmethode durchgeführt. Andererseits wird zur Überprüfung der qualitativen und quantitativen Messgenauigkeit der ddPCR im Vergleich zur qPCR ein retrospektiver Ansatz verfolgt, bei dem adulte Patienten mit einer ALL inkludiert sind. Dabei werden jene Proben mit der ddPCR reevaluiert, die zuvor in Messungen durch die qPCR einen positiven MRD-Wert aufwiesen, sich jedoch unterhalb des quantitativen Ranges / Limits der qPCR befanden. Die Messdaten des letzteren Studienansatzes wurden im Rahmen einer Kooperation in dem Universitätshospital Schleswig-Holstein in Kiel erhoben, allerdings innerhalb dieser Studie ausgewertet, statistisch analysiert und interpretiert.

## 2 Methodik

### 2.1 Studiendesign

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden für einen methodischen Vergleich der ddPCR mit der qPCR in Bezug auf die Quantifizierung des MRD-Wertes anhand des Anwendungsfalls von Patienten mit Diagnose oder einem Rezidiv der ALL zwei unterschiedliche Studienansätze gewählt (vgl. *Figure 1* aus Schwinghammer et al.).[35] Der erste prospektive Analyseansatz verglich im Rahmen einer Blindstudie die parallel gemessenen MRD-Ergebnisse der PCR-Methoden ddPCR und qPCR anhand von Proben einer pädiatrischen Kohorte mit insgesamt 28 Patienten (Tabelle 1). Betrachtet wurden hierbei 65 Proben von Kindern und Jugendlichen mit einem ersten oder zweiten Rezidiv der ALL, die im Zeitraum von Januar bis August 2016 gemessen und in ausreichender Menge vorhanden waren (Tabelle 1). Da sich die Erkrankung der ALL eines Patienten aus mehreren leukämischen Zellpopulationen zusammensetzen kann, die überdies jeweils unterschiedlich auf die Chemotherapie ansprechen können, wird angestrebt, mehr als eine IG- / TR-Genumlagerung zum Nachweis der Leukämiezellen anzuwenden. Dementsprechend konnten einzelne Patientenproben mit unterschiedlichen patientenspezifischen Markern gemessen werden (vgl. *Supplemental Table S3* aus Schwinghammer et al.).[35] Daraus resultiert, dass ein methodischer Vergleich der beiden PCR-Messmethoden anhand einer Gesamtzahl von 88 MRD-Werten durchgeführt werden konnte (Tabelle 1). Für einen Abgleich dieser Messergebnisse der beiden PCR-basierten Technologien wird die Flow-Methode herangezogen, da diese neben der ddPCR und qPCR eine dritte MRD-Quantifizierungsmethode darstellt. So erfolgt innerhalb der prospektiven Blindstudie zudem parallele MRD-Messungen von insgesamt 31 MRD-Messwerten (31/88) mit der Flow-Methode, womit ein anschließender Vergleich der drei Quantifizierungsmethoden erfolgen konnte (Tabelle 1). Dabei wurden von 16 Patienten der pädiatrischen Kohorte (16/28) 19 Proben (19/46) ausgewählt, um mit der Flow-Methode parallel zu jenen Probenanalysen der ddPCR und qPCR evaluiert zu werden (Tabelle 1). Die Durchführung aller Probenmessungen im Rahmen der prospektiv verlaufenden MRD-Quantifizierungen erfolgten in der Abteilung für pädiatrische Onkologie und Hämatologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Der zweite Studienansatz wird als eine retrospektive Analyse konzipiert: Es werden insgesamt 54 MRD-Proben von 28 adulten Patienten mit der Diagnose einer *BCR-*



*ABL1*<sup>2</sup>[36] negativen ALL mit der qPCR-Methode gemessen und im Anschluss mit der ddPCR reevaluiert (Tabelle 1). Um einen vertiefenden Vergleich der Messgenauigkeit der ddPCR gegenüber der qPCR zu erreichen, wurden insbesondere jene Proben ausgewählt, die in der qPCR-Methodik ein positives MRD-Ergebnis aufwiesen, sich jedoch am quantitativen Range / Limit (BQL) der Technologie befanden. Insgesamt konnten letztlich mit der qPCR sowie mit der ddPCR 65 MRD-Werte gemessen und miteinander verglichen werden (Tabelle 1). Die Messung der genannten Proben erfolgte im Rahmen einer Kooperation im Universitätshospital Schleswig-Holstein in Kiel; die Auswertung, statistischen Analyse und Interpretation erfolgte innerhalb dieser Studie.

Im Allgemeinen erfolgten die Probenentnahmen im Rahmen von ALL-Therapiestudien von Erwachsenen (GMALL 07/2003 Studie oder GMALL Register)<sup>3</sup> und Kindern bzw. Jugendlichen (ALL-REZ BFM<sup>4</sup> Register, ALL-REZ BFM 2002 oder IntReALL SR 2010 Studien<sup>5</sup>) mit einer Diagnose bzw. einem Rezidiv einer ALL. Die verschiedenen Zeitpunkte der Probenentnahme zur MRD-Quantifizierung waren im Protokoll der jeweiligen Therapiestudie oder des jeweiligen Registers standardisiert festgelegt bzw. empfohlen. Von den zuständigen Ethikkommissionen für medizinische Forschung lag jeweils ein positives Votum vor. Zudem war durch das schriftliche Einverständnis der Patienten bzw. ihres Vormundes eine weitere Voraussetzung für die Durchführung der Analysen gegeben.

---

<sup>2</sup> Bei dem *BCR-ABL1* Fusionsgen handelt es sich um eine Translokation der Chromosomen 9 und 22, auch Philadelphia Chromosom genannt, was zu einer konsekutiven Tyrosinkinase-Aktivität führt.

<sup>3</sup> GMALL, *German Multicenter Study Group on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia*; Multi-zentrische Therapieoptimierungsstudie der Akuten Lymphoblastischen Leukämie bei Erwachsenen und Adoleszenten ab 18 Jahren

<sup>4</sup> ALL-REZ BFM, Studie zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer Akuten Lymphoblastischen Leukämie (ALL) der Berlin-Frankfurt-Münster (BFM)-Gruppe

<sup>5</sup> IntReALL SR 2010, *International Study for Treatment of Standard Risk Childhood Relapsed ALL 2010 - A Randomized Phase III Study Conducted by the Resistant Disease Committee of the International BFM Study Group*; Internationale Studie zur Behandlung der rezidivierten ALL im Kindesalter mit Standardrisiko

**Tabelle 1: Übersicht über das Studiendesign**

<b>Prospektiver Studienansatz</b>	
Kohorte	Pädiatrische Patienten
Maligne Entität	Erstes oder zweites Rezidiv einer ALL
Vergleich der Messmethoden	<i>Digital Droplet PCR</i> und <i>real-time PCR</i>
Anzahl der Patienten	28
Anzahl der Patientenproben	46
Anzahl der MRD-Messungen	88
<hr/>	
Vergleich der Messmethoden	<i>Digital Droplet PCR</i> , <i>real-time PCR</i> und Multi-Color-Durchflusszytometrie
Anzahl der Patienten	16 der 28 Patienten
Anzahl der Patientenproben	19 der 46 Patientenproben
Anzahl der MRD-Messungen	31 der 88 MRD-Messungen
<b>Retrospektiver Studienansatz</b>	
Kohorte	Adulte Patienten
Maligne Entität	Diagnose einer <i>BCR-ABL1</i> negativen ALL
Vergleich der Messmethoden	<i>Digital Droplet PCR</i> und <i>real-time PCR</i>
Anzahl der Patienten	20
Anzahl der Patientenproben	54
Anzahl der MRD-Messungen	65

## 2.2 Präparation der Patientenproben

Die Isolierung der mononukleären Zellen aus den Proben von Knochenmark respektive Blut (letzteres: 4 der 46 Patientenproben) wurde durch Zentrifugieren in einer isotoni-schen Lösung (Ficoll) erreicht. In diesem physikalischen Trennverfahren werden die Zellen unter dem Einfluss von Zentrifugalkräften nach unterschiedlichen spezifischen Massen geschichtet.[37] Anschließend erfolgte die sofortige Lyse der Zellen und die DNA-Extraktion mit einem Säulen-basierten System von Machery-Nagel (*NucleoSpin Tissue Kit*, Düren, Deutschland) oder von Qiagen (*Puregene DNA-Isolation Kit*, Darmstadt, Deutschland), entsprechend der Empfehlungen der Hersteller. Bei der verwendeten Methodik lagert sich die DNA über ihre negativ geladenen Phosphatgruppen an eine Silikonmembran an, wobei eine Zellzahl von  $4 \times 10^6$  pro Probenahme bei der DNA-Extraktion angestrebt wurde. Die isolierte DNA wurden mittels Spektralphotometrie (NanoDrop, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) auf ihre Konzentration und

Reinheit überprüft und gegebenenfalls verdünnt, sodass ca. 100 ng/μL (akzeptierter Bereich: 80 bis 130 ng/μL) DNA in einer Probe zur weiteren Analyse verfügbar war. Bis zur Verwendung blieben die Proben bei -20 °C gekühlt und gelagert.

Bei der Quantifizierung der MRD werden klonale IG- / TR-Genumlagerungen als Marker verwendet. Die Identifikation dieser Genumlagerungen erfolgte mittels im Labor etablierter PCR-Verfahren, die folgende Beurteilung ihrer klonalen Eigenschaften wurde mithilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese kontrolliert.[38-42] Nach Aufreinigung der Proben erfolgte die Sanger-Sequenzierung zur Detektion der genauen Basenabfolge der IG- / TR-Genumlagerungen, sodass patienten- sowie klonspezifische Primer designt werden konnten.[38, 40-43]

## 2.3 Quantifizierung des MRD-Wertes

### 2.3.1 Real-time PCR

Die als Goldstandard betrachtete Methode zur quantitativen Messung des MRD-Wertes ist die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, kurz *Real-Time PCR* oder qPCR.[10, 20, 22, 44] Das Messprinzip der Methode beruht auf einer in-vitro Amplifikation selektiver Loci einer DNA-Sequenz mit gleichzeitig proportionalem Anstieg eines Fluoreszenzfarbstoffsignals, was schließlich die Quantifizierung der eingesetzten DNA mit dem zu untersuchenden Target ermöglicht. Als Grundlage der PCR-Amplifikation wird die Fähigkeit der Taq-Polymerase<sup>6</sup> genutzt, die neben der 3'-5'-Polymeraseaktivität ebenfalls eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität aufweist. Eingesetzt wird eine Taqman-Sonde (Hydrolyse-Sonde), die am 5'-Ende einen Reporter-Farbstoff (hier: 6-Carboxyfluorescein, FAM) und am 3'-Ende ein Quencher (hier: 6-Carboxytetramethylrhodamin, TAMRA) besitzt. Letzteres bewirkt in räumlicher Nähe zum Reporter-Farbstoff eine Unterdrückung seines Fluoreszenzfarbstoffsignals. Durch die Aktivität der Polymerase wird diese Sonde während der PCR-Zyklen hydrolysiert. Die resultierende räumliche Trennung von Reporter-Farbstoff und Quencher bewirkt eine Zunahme des Fluoreszenzfarbstoffsignals. Folglich steigt die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffsignals proportional zu der Anzahl der amplifizierten PCR-Produkte. Im Anschluss eines jeden PCR-Zyklus wird so die Anzahl der PCR-Produkte durch optisches bzw. digitales Auslesen des Fluoreszenzfarbstoffsignals quantifiziert. Der Schwellenwertzyklus (*Threshold Cycle*, C<sub>T</sub>-Wert) gibt dabei die minimale

---

<sup>6</sup> thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq)

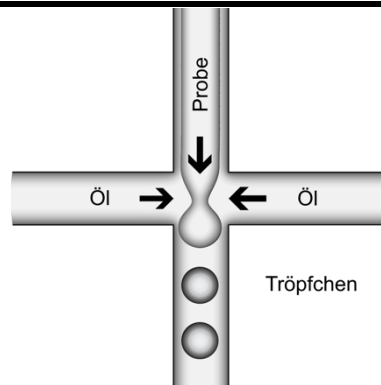
PCR-Zyklusanzahl an, bei der es erstmals zu einer signifikanten Überschreitung des Fluoreszenzfarbstoffsignals der Taqman-Sonde gegenüber dem Hintergrundsignal (Kontrolle ohne Target, *No Template Control*, NTC) kommt. Somit beschreibt der  $C_T$ -Wert den Beginn des exponentiellen Anstiegs der Amplifikation der PCR-Produkte, welcher direkt proportional zur eingesetzten Nukleinsäuremenge ist.

Innerhalb der vorliegenden Studie erfolgte die Auswertung der qPCR entsprechend der Euro-MRD Leitlinien.[22] Auf Grundlage der linearen, umgekehrt proportionalen Beziehung zwischen dem  $C_T$ -Wert und der logarithmisch skalierten Menge der eingesetzten Verdünnungsschritte wurde eine Standardkurve erstellt. Die Berechnung der ursprünglich eingesetzten Anzahl der Leukämiezellen einer Probe erfolgte aus der Geradengleichung der jeweiligen Standardkurve, sodass der MRD-Wert folglich relativ zur Diagnoseprobe bestimmt wurde.

### 2.3.2 Droplet Digital PCR

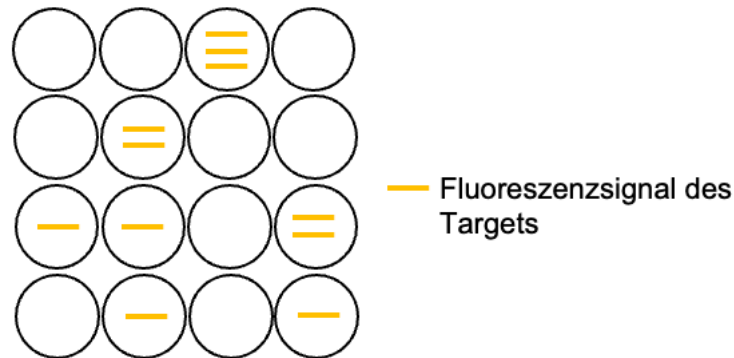
Die digitale PCR-Technologie, kurz dPCR, stellt eine neue Generation von PCR-Methoden dar. Ihre Eigenschaft besteht darin, dass sie auf einer Endpunkt-Amplifikation basiert. Hierbei werden die zu untersuchenden Nukleinsäuremoleküle einer Probe entweder in einer wässrigen Trägersubstanz als Mikrofluid in eine unpolare Öl-Phase (in der vorliegenden Studie angewendet: *Droplet Digital PCR*, ddPCR) oder in einzelne Kolumnen einer Nanoplatte (*Nanoplate Digital PCR*) fraktioniert. Bei diesen Verfahrensweisen wird das Probenmaterial mit der eingesetzten genomischen DNA in einzelne Partitionen aufgeteilt. Das in der hiesigen Studie eingesetzte ddPCR-System von der Firma Bio-Rad generiert durchschnittlich 20.000 Tröpfchen in einer Probe mit einem Volumen von 20  $\mu$ L (Abbildung 1). Die Aufteilung der zu untersuchenden DNA (Target-DNA) innerhalb dieser Tröpfchen erfolgt unter der Annahme einer Poisson-Verteilung[45]: Folglich entstehen Tröpfchen mit keinem, einem oder mehreren Nukleinsäuremolekülen der Target-DNA (Abbildung 2). Die in den einzelnen Partitionen unabhängig voneinander ablaufenden Reaktionen entsprechen dem PCR-Prinzip der qPCR. Zur Quantifizierung des Fluoreszenzfarbstoffsignals wird gleichermaßen eine Taqman-Sonde genutzt und im Anschluss in meist zwei Fluoreszenzfarbstoffen (FAM und Hexachlorfluorescein, HEX; hier nur FAM angewendet) optisch bzw. digital ausgelesen. Im Gegensatz zur Methode der qPCR allerdings, bei der das optische bzw. digitale Auslesen der Amplifikationsprodukte am Ende jedes PCR-Zyklus abläuft, findet bei der ddPCR das Auslesen des Fluoreszenzfarbstoffsignals am Ende der gesamten PCR-Reaktion statt. Dabei wird eine Partition, in der

ein Fluoreszenzsignal generiert wird, mit dem Vorhandensein einer Target-DNA assoziiert. Aus der Anzahl der detektierten Fluoreszenzsignale der Tröpfchen kann die Gesamtkonzentration der Target-DNA (*copies/μL*) in der Probe unter Zuhilfenahme einer Poisson-Verteilung berechnet werden.[25, 45]



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Tröpfchengenerierung bei der ddPCR-Methode**

Das ddPCR-System teilt das PCR-Reaktionsvolumen (Probe) mit der zu untersuchenden Target-DNA in Partitionen auf, sodass das genetische Material in einer wässrigen Trägersubstanz als Mikrofluid in unpolarer Öl-Phase vorliegt (Tröpfchen). (modifiziert aus Bio-Rad, *Droplet Digital PCR: Applications Guide*)[45]



**Abbildung 2: Schematische Verteilung der Target-DNA in einzelne Partitionen**

Die Konzentration der Target-DNA innerhalb der einzelnen Tröpfchen basiert auf der Annahme einer Poisson-Verteilung. (modifiziert aus Bio-Rad, *Droplet Digital PCR: Applications Guide*)[45]

### 2.3.2.1 Materialien und technisches Equipment

Im Folgenden ist eine Übersicht über die in dieser Studie mit der ddPCR-Messmethode eingesetzten Materialien sowie des technischen Equipments aufgeführt (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Auflistung der mit der ddPCR verwendeten Materialien und des technischen Equipments**

<b>Probenpräparation</b>	
Spektralphotometrie	NanoDrop (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA)
ddPCR Mastermix	<i>ddPCR Supermix for probes (No dUTP)</i> (Bio-Rad, Nr. 186-3023)
Pufferlösung	<i>ddPCR Buffer control for probes</i> (Bio-Rad, Nr. 1863052)
Versiegelungsfolie	<i>Adhesive Clear Film (Applied Biosystems)</i>
Zentrifuge	5810 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
<b>Tröpfchengenerierung</b>	
System	<i>QX200 Droplet Generator</i> (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
Kartuschenhalterung	<i>DG8 Cartridge Holder</i> (Bio-Rad, Nr. 1863051)
Kartusche	<i>DG8 Cartridges</i> (Bio-Rad, Nr. 1864008)
Öl	<i>ddPCR Droplet Generation Oil for probes</i> (Bio-Rad, Nr. 1863005)
Gummidichtung	<i>DG8 Gaskets</i> (Bio-Rad, Nr. 1863009)
<b>PCR-Reaktion</b>	
96-well PCR-Platte	<i>DG8 Cartridges for QX200</i> (Bio-Rad, Nr. 1864007)
Versiegelungsfolie	<i>Pierceable foil heat seal</i> (Bio-Rad, Nr. 1814040 186-3052)
<i>Thermal Cycler</i>	<i>T100 Thermal Cycler</i> (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
<b>Analyse</b>	
Auslese-System	<i>QX200 Droplet Reader</i> (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
Öl	<i>ddPCR Droplet Reader Oil</i> (Bio-Rad, Nr. 186-3004)
Analyse-Software	QuantaSoft, Version 1.7.4.0917 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

dUTP, Desoxyuridintriphosphat.

### 2.3.2.2 Durchführung der MRD-Quantifizierung mit ddPCR

Der Ausgangspunkt einer jeden in dieser Studie durchgeführten ddPCR-Analyse umfasste eine identische Anordnung und Anzahl von Probevolumina mit entsprechenden Targetproben, Negativkontrollen und Schritten der Verdünnungsreihe (Tabelle 3). Eine

ddPCR-Analyse beinhaltet stets drei Replikate der Target-DNA, bei denen die endgültige Menge an DNA jeweils 500 ng in einem Probenvolumen von 20 µL beträgt. Es erfolgte eine erneute Messung der DNA-Konzentration mithilfe der Spektralphotometrie. Die Amplifikationseigenschaft der DNA wurde als Referenzgen entweder mit der qPCR oder zusätzlich mit der ddPCR überprüft.

Des Weiteren schloss jede Analyse stets zwei unterschiedliche Ansätze von Negativkontrollen mit ein: Zum einen wurden vier bis sechs Kontrollen inkludiert, die aus dem *Buffy Coat*<sup>7</sup> (BC) von mindestens zehn gesunden Spendern bestanden, zum anderen mindestens eine Kontrolle ohne eine Target-DNA (*No Template Control*, NTC). Obwohl die ddPCR eine absolute Quantifizierungsmethode ist, wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe als Referenz angesetzt, um die Ergebnisse der beiden Messmethoden in einem zusätzlichen Schritt miteinander vergleichen zu können. Die Verdünnungsreihe bestand aus sieben Verdünnungsstufen:  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ . Jede ddPCR-Analyse enthielt so mindestens zwei, jedoch überwiegend drei Replikate der jeweiligen Verdünnungsstufe.

**Tabelle 3: Beispiel einer 96-well PCR-Plattenbelegung einer ddPCR-Analyse**

	1	2	3	4
A	$1 \times 10^{-1}$	$1 \times 10^{-1}$	BC	BC
B	$1 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-2}$	BC	BC
C	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-3}$	BC
D	$5 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}$	BC
E	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-4}$	BC
F	$5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$	BC
G	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-5}$	NTC
H	Targetprobe	Targetprobe	Targetprobe	NTC

$1 \times 10^{-1}$  bis  $1 \times 10^{-5}$ , Schritte der Verdünnungsreihe; BC, *Buffy Coat* als Negativkontrolle; NTC, Kontrolle ohne Target.

<sup>7</sup> Der *Buffy Coat* bezeichnet eine sich nach dem Zentrifugieren eines antikoagulierten Vollblutes bildende Trennschicht, welche aus Leukozyten und Thrombozyten besteht.

Anhand des vorliegenden Protokolls wurde eine jede Probe der ddPCR-Analyse angesetzt (Tabelle 4). Dieses Protokoll ist zur Herstellung eines Reaktionsvolumens ausgelegt und konnte daher auf die benötigte Anzahl an Reaktionen einer gesamten ddPCR-Analyse erweitert werden. Um sicherzustellen, dass zur Herstellung der Tröpfchen exakt 20  $\mu\text{L}$  zur Verfügung standen, wurde ein Überschuss von 4  $\mu\text{L}$  pro Probe angesetzt.

**Tabelle 4: Protokoll des Reaktionsansatzes der ddPCR**

<b>Reagenzien</b>	<b>1 Reaktionsvolumen</b>
Aqua destillata	2,1 $\mu\text{L}$
ddPCR SuperMix (no dUTP)	12 $\mu\text{L}$
<i>Forward Primer</i>	1,7 $\mu\text{L}$
<i>Reverse Primer</i>	1,7 $\mu\text{L}$
TaqMan Sonde	0,5 $\mu\text{L}$
<b>Totales Reaktionsvolumen</b>	<b>18 <math>\mu\text{L}</math></b>
Target-DNA* (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	6 $\mu\text{L}$
<b>Totales Probenvolumen</b>	<b>24 <math>\mu\text{L}</math></b>

dUTP, Desoxyuridintriphosphat. \*DNA zuvor thermisch bei 95  $^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten denaturiert. (modifiziert aus Schwinghammer et al., 2022)[35]

Das „Totale Probenvolumen“ wurde im Anschluss in eine 96-well-Platte transferiert, mit einer Folie versiegelt und zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden die jeweiligen Probenvolumina einige Male pipettiert, sodass von einer nahezu homogenen Mischung auszugehen war. Zur Generierung der Tröpfchen wurde entsprechend der Herstellerempfehlungen 70  $\mu\text{L}$  Öl verwendet. Anschließend wurde die Kartusche mit 20  $\mu\text{L}$  des angesetzten Probenvolumens mithilfe einer Mehrkanalpipette aufgefüllt. Hierbei war es von besonderer Wichtigkeit, dass die Volumina frei von Luftblasen waren und stets auf eine ausreichende Durchmischung des Probenvolumens geachtet wurde. Schließlich konnten 40  $\mu\text{L}$  Probenvolumen mit den generierten Mikrovolumina in eine 96-well PCR-Platte transferiert und mit einer Folie zur Amplifikation versiegelt werden.

Das Protokoll der PCR-Reaktion innerhalb des *Thermal Cyclers* wurde für jede ddPCR-Analyse identisch angewendet. Eine jede PCR-Reaktion bestand aus 40 Wieder-



holungen eines Zyklus, zusammengesetzt aus der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation. Zur Aktivierung der Taqman-Polymerase wurde die PCR-Reaktion initial bei einer Temperatureinstellung von 95 °C über 10 Minuten erhitzt, wobei dieser Schritt innerhalb der PCR-Reaktion nicht nochmals durchgeführt wurde. Der sich wiederholende PCR-Zyklus begann mit der Denaturierung der DNA. Hierfür wurde eine Temperatur von 94 °C über einen Zeitraum von 30 Sekunden gewählt. Im nächsten Schritt wurde die Probe auf 60 °C für eine Minute abgekühlt, was eine Anlagerung der spezifischen Primer an die DNA-Einzelstränge erlaubte. Es folgte die letzte Phase der PCR-Reaktion, die Elongation: Indem die Temperatur für 10 Minuten auf 98 °C erhöht wurde, erfolgte die Polymerisation der DNA. Bis zur Weiterbearbeitung der Probenvolumina wurden diese dann auf 4 °C abgekühlt. Das amplifizierte Produkt konnte anschließend im *QX200 Droplet Reader* optisch bzw. digital ausgelesen und mithilfe der *QuantaSoft Software* analysiert werden. Eine umfangreiche Zusammenfassung dieses experimentellen Ansatzes der Studie mittels ddPCR ist in der Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5: Übersicht über den experimentellen Ansatz der Studie mittels ddPCR**

<b>Volumina und Konzentrationen</b>	
Totales Reaktionsvolumen	18 µL
Volumen DNA (~100 ng/µL)	6 µL
Totales Probenvolumen	24 µL
Totale DNA-Menge im Probenvolumen (24 µL)	650 ng
Probenvolumen transferiert in Tröpfchengenerator	20 µL
Totale Konzentration der DNA im Probenvolumen (20 µL)	500 ng
Volumen Tröpfchengenerator-Öl	70 µL
Totales Mikrofluid-Probenvolumen	40 µL
Einzelnes Volumen eines Tröpfchens	0,85 nL[46, 47] – 0,87 nL*
Theoretisches Maximum der Tröpfchenanzahl	22.989 – 23.529 Anzahl pro Probe
Schritte der Verdünnungsreihe	$1 \times 10^{-1}$ , $1 \times 10^{-2}$ , $1 \times 10^{-3}$ , $5 \times 10^{-4}$ , $1 \times 10^{-4}$ , $5 \times 10^{-5}$ , $1 \times 10^{-5}$ Zellen pro Verdünnungsschritt
<b>Anzahl der Replikate</b>	
Replikate der Patientenprobe mit Target-DNA	≥ 2
Replikate der Negativkontrolle (BC)	≥ 4
Replikate der NTC	≥ 1
Replikate der einzelnen Verdünnungsschritte	≥ 2

BC, *Buffy Coat* als Negativkontrolle; NTC, Negativkontrollen ohne Target-DNA. \*gemäß Herstellerangaben (Bio-Rad)

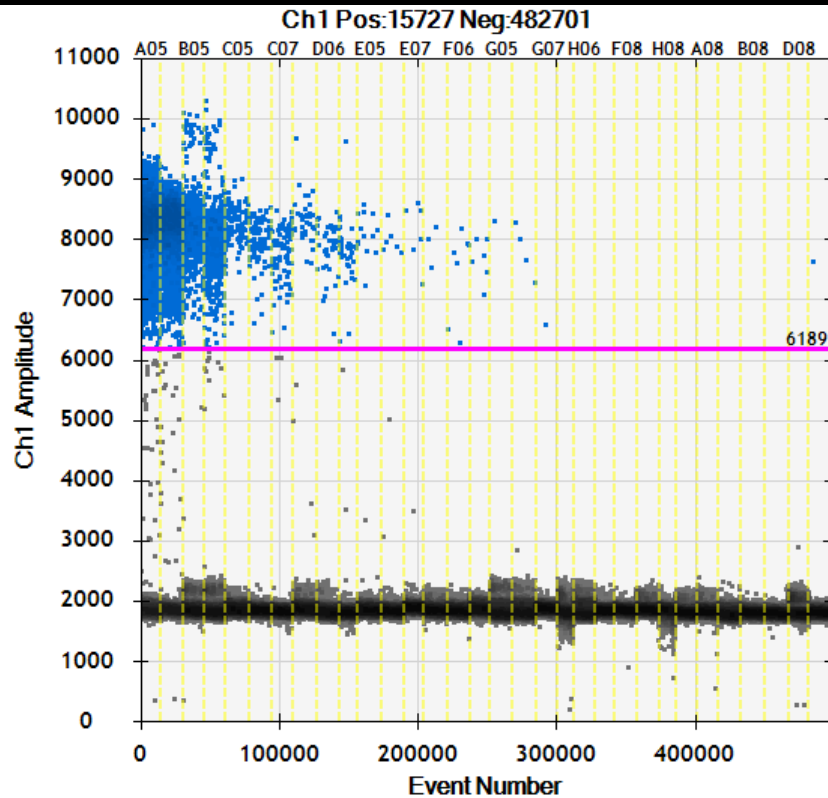
### 2.3.2.3 Ausarbeitung und Anwendung der Auswertungs- und Interpretationskriterien

Die in der Publikation von Drandi et al.[34] anhand von Patienten mit einem Mantelzell-lymphom veröffentlichten „Leitlinien“ zur MRD-Quantifizierung wurden herangezogen, um detaillierte Kriterien zur Auswertung und Interpretation der ddPCR-Rohdaten ausarbeiten zu können und so ein strukturiertes Vorgehen zur Analyse der MRD-Quantifizierung zu ermöglichen. Eine solche Erweiterung der bereits bestehenden Kriterien lässt sich in drei aufeinander aufbauenden Analyseschritten einteilen: ( I ) akzeptierte Grundbedingungen, ( II ) Bewertungskriterien sowie ( III ) die Berechnung des MRD-Wertes.

### ( I ) Akzeptierte Grundbedingungen

Zur akkuraten Auswertung bedurfte es zunächst der Festlegung einer akzeptierten Mindestanzahl der jeweiligen Replikate einer Probenmessung, da aufgrund eines technischen Fehlers oder geringer Mengen des Ausgangsmaterials eine Reduktion möglich ist. In Tabelle 6 ( i ) ist eine Übersicht über die Anzahl der jeweilig akzeptierten Replikate aufgelistet. Ferner konnte die Qualität der Messung anhand der Anzahl der Tröpfchen im Mikrofluid einer jeden Probe bewertet werden, sodass Grenzbereiche für die Probenanalyse beider Kohorten festgelegt wurden (Tabelle 6, ii ).

Die positiv oder negativ Bewertung der einzelnen Tröpfchen erfolgte durch die optische bzw. digitale Auslesung des Fluoreszenzfarbstoffsignals für alle Mikrovolumina einer jeweiligen Probe. Das QuantaSoft Programm zur Auswertung der ddPCR-Analysen erlaubte die graphische Darstellung dieser Analyse, mit dieser wurde die Intensitätsamplitude des Fluoreszenzfarbstoffsignals für jedes Tröpfchen aufgezeigt (Abbildung 3). Innerhalb des so entwickelten Diagramms wurde durch eine optisch festgelegte Trennlinie (*Threshold*) eine klare Unterscheidung der negativ und positiv bewerteten Mikrovolumina vollzogen (Abbildung 3, *Threshold*: rosa Linie). Hierbei war es von größter Relevanz, diese Festlegung des *Thresholds* so zu wählen, dass potenziell positive Tröpfchen innerhalb der Negativkontrollen (BC oder NTC) sicher als eine signifikant unspezifische Positivität gewertet werden konnten (Tabelle 6, iii ). Um dies zu ermöglichen, wurde der *Threshold* sowohl individuell für einen jeden ddPCR-Ansatz einer Gesamtanalyse als auch manuell anhand der optisch dargestellten Fluoreszenzamplitude gezogen. Dabei wurde die Trennlinie so nah wie möglich an jene Tröpfchengruppe gelegt, die eine große Amplitude mit hoher Fluoreszenzfarbstoffintensität aufwies. Hieraus folgte, dass die Negativkontrollen in den meisten Fällen als absolut oder nahezu negativ zu interpretieren waren.



**Abbildung 3: Exemplarische Darstellung einer individuellen sowie manuellen Platzierung des *Thresholds***

Aufgezeigt ist die Bildschirmansicht einer ddPCR-MRD-Probenanalyse mit dem QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Der individuell für die gesamte ddPCR-Analyse sowie manuell gesetzte *Threshold* wird als rosa Linie dargestellt. Diese Linie trennt die als positiv von denen als negativ zu bewertenden Tröpfchen, erstere sind in blauer, letztere in schwarzer Farbe abgebildet. Die obere Abszissenachse gibt die Nummerierung der verwendeten 96-well PCR-Platte an, wobei jede Einzelanalyse durch die gelb-gestrichelte Linie abgegrenzt wird - in der Reihenfolge von links nach rechts: A05 bis G07, Replikate der Verdünnungsreihe von  $1 \times 10^{-1}$  bis  $1 \times 10^{-5}$ ; H05 bis H07, 3 Replikate der Targetprobe 1; F08 bis H08, 3 Replikate der Targetprobe 2; A07 bis D08, 6 Replikate der Negativkontrolle mit *Buffy Coat*; E08, Negativkontrolle ohne Target-DNA (NTC).

**Tabelle 6: Grundkriterien zur Auswertung der MRD-Quantifizierung mit ddPCR**

Grundkriterium	Erläuterungen
i Akzeptierte Anzahl der Replikate	<p>≥2 Replikate der Patientenprobe</p> <p>≥4 Replikate des BCs</p> <p>≥1 Replikat der NTC</p>
ii Akzeptierte Tröpfchenanzahl	<p>pädiatrische Kohorte: ≥9.000 bis ≤20.000 Tröpfchen pro Probe</p> <p>adulte Kohorte: ≥9.000 bis ≤23.000 Tröpfchen pro Probe</p>
iii Setzung der Trennlinie	<p>Innerhalb des vom QuantaSoft Auswertungsprogramm generierten Diagramms wurde die Trennlinie manuell anhand der optischen Darstellung der Amplitude des Fluoreszenzfarbstoffs gesetzt. Zudem erfolgte diese Festlegung individuell für jeden ddPCR-Ansatz einer Gesamtanalyse eines Experiments. Hierbei wurde die Trennlinie direkt unter die Tröpfchengruppe mit einer hohen Amplitude des Fluoreszenzfarbstoffs platziert. Es resultierte eine definierte Abgrenzung zum Hintergrundsignal und eine klare Identifizierung einer möglichen signifikant unspezifischen Positivität innerhalb der Negativkontrollen.</p>

BC, *Buffy Coat* als Negativkontrolle; NTC, Negativkontrollen ohne Target-DNA.

## ( II ) Bewertungskriterien

Der nächste Analyseschritt umfasste die abschließende Bewertung der jeweiligen Proben in entweder positiv, negativ oder BQL (Tabelle 7). Hierfür wurde die durch die QuantaSoft Software kalkulierte Angabe von „*merge of events*“ berücksichtigt. Unter dieser Angabe wird die Gesamtzahl der durch das optische bzw. digitale Auslesen positiv detektierten Tröpfchen von allen Replikaten einer Targetprobe zusammengefasst. Eine signifikant unspezifische Positivität wurde in derjenigen Negativkontrolle identifiziert, die als positiv bewertet wurde.

**Tabelle 7: Bewertungskriterien einer Targetprobe**

<b>Patientenprobe</b>	<b>2 oder 3 Replikate</b>
Positiv	<i>merge of events</i> $\geq 3$
Negativ	<i>merge of events</i> = 0 oder <i>merge of events</i> = 1
BQL	<i>merge of events</i> = 2
<b>Negativkontrolle (BC, NTC)</b>	<b>4,5 oder 6 Replikate</b>
Positiv	<i>merge of events</i> $> 3$
Negativ	<i>merge of events</i> $\leq 3$

BQL, Positivität unterhalb des Quantitativen Ranges / Limits; BC, *Buffy Coat*; NTC, Kontrollen ohne Target-DNA. (modifiziert aus Schwinghammer et al., 2022)[35]

### (III) Berechnung des MRD-Wertes

Nach Berücksichtigung und Korrektur gemäß den vorhergenannten Analyseschritten erfolgte als letzter Schritt die finale Berechnung des MRD-Wertes einer jeden Patientenprobe. Die Konzentration einer jeweiligen Probe wurde durch das QuantaSoft-System in *copies/μL* angegeben und zur Berechnung des MRD-Wertes herangezogen. Hierbei wurde das arithmetische Mittel von allen Replikaten einer einzelnen Targetprobe (Patientenprobe oder Negativkontrolle) für die Konzentration *copies/μL* ermittelt. Dies stellte damit die Anzahl der Leukämiezellen bezogen auf die untersuchte Probe dar. Zeigte sich innerhalb einer ddPCR-Analyse eine signifikant unspezifische Positivität in der Negativkontrolle, wurde die vom System angegebene Konzentration von derjenigen der Patientenprobe subtrahiert. Nachfolgend konnte das MRD-Ergebnis einer jeden Patientenprobe ermittelt werden: Die Konzentration wurde auf mit dem Gesamtvolumen der eingesetzten Probe (20 μL) multipliziert und anschließend durch die eingesetzte Menge von 500 ng DNA, respektive 75.000 Zellen, dividiert (vgl. Schwinghammer et al.).[35]

#### 2.3.2.4 Intra- und Inter-Assay Validierung der ddPCR

Um zu überprüfen, ob die ddPCR-Methode valide reproduzierbare Messungen hervorbringen konnte, wurden Verdünnungsreihen von vier Patientenproben der pädiatrischen Kohorte mit der zu erwartenden Zellkonzentration der einzelnen Verdünnungsstufen verglichen (Tabelle 8). Dabei wurden die Zellzahlen von insgesamt 12 Replikaten einer jeden Verdünnungsstufe mit der ddPCR quantifiziert - jeweils von sechs Replikaten an zwei konsekutiven Tagen (Tabelle 8). Zur Qualitätskontrolle wurden zudem 12-fach Messungen (2 x 6 Replikate) einer Negativkontrolle inkludiert. Die Berechnung des MRD-Wertes eines jeden Replikats erfolgte nach den oben herausgearbeiteten Auswertungs- und Interpretationskriterien (siehe Kapitel 2.3.2.3). Im Anschluss wurden für alle 12 Replikate einer Verdünnungsstufe die Standardabweichung sowie der Variationskoeffizienten (CV) bestimmt.

Anhand der gemessenen Verdünnungsreihen einer jeden Probe einer ddPCR-Analyse wurde die technische Präzision dieser Messmethode überprüft. Hierbei konnten die Sensitivität und der QR / QL einer jeden ddPCR-Probe bestimmt werden, was den Vergleich zwischen der qPCR mit der ddPCR ermöglichte. Die Auswertung der einzelnen Verdünnungsstufen erfolgte ebenfalls nach den oben beschriebenen Auswertungs- und Interpretationskriterien (siehe Kapitel 2.3.2.3).

In dieser Studie erfolgte der Vergleich zwischen den beiden Methoden hinsichtlich der Sensitivität der Messung einer Patientenprobe anhand von insgesamt 58 Verdünnungsreihen, die mit beiden Messmethoden bestimmt wurden (Tabelle 8). Die Sensitivität einer Messung gibt im Rahmen der MRD-Quantifizierung mit qPCR den niedrigsten nachweisbaren MRD-Wert an, ungeachtet der Möglichkeit einer unspezifischen Amplifikation eines Hintergrundsignals.[22] Dementsprechend wurde die Sensitivität eines ddPCR-Messung als der niedrigste spezifische MRD-Wert der Verdünnungsreihe definiert, der sich unter Anwendung der oben beschriebenen Strategien der Analyse und Auswertung ergab.

Der QR / QL der qPCR wird durch denjenigen Bereich der Standardkurve widergespiegelt, in dem der MRD reproduzierbar quantifiziert werden kann.[22] Folglich wird der QR / QL definiert durch ( I ) eine ausreichende PCR-Effizienz über den gesamten Quantifizierungsbereich, der anhand der Steigung und des Abstands zwischen den Verdünnungsschritten der Standardkurve ermittelt wird, ( II ) durch die Intra-Assay Reproduzierbarkeit, die durch den Abstand zwischen den  $C_T$ -Werten der Replikate definiert wird

und (III) durch die Spezifität, die durch unspezifische Signale in der DNA-Negativkontrolle bestimmt wird.[22, 35] Der QR / QL im Rahmen der ddPCR-Methodik wurde demgemäß als die niedrigste Verdünnungsstufe definiert, die nach Anwendung der Auswertungs- und Interpretationskriterien als positiv zu bewerten war. Im so ermöglichten Vergleich zwischen den beiden Messmethoden wurden die QR / QL anhand von 56 Verdünnungsreihen bestimmt; für zwei Verdünnungsreihen konnte kein QR / QL ermittelt werden, so dass diese nicht in der Gegenüberstellung miteinbezogen wurden (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Übersicht über die Inter- und Intra-Assay Validierung der ddPCR**

<b>Reproduzierbarkeitsvalidierung</b>	
Anzahl der Patientenproben	4
Schritte der Verdünnungsreihe	$1 \times 10^{-1}$ , $1 \times 10^{-2}$ , $1 \times 10^{-3}$ , $5 \times 10^{-4}$ , $1 \times 10^{-4}$ , $5 \times 10^{-5}$ , $1 \times 10^{-5}$ Zellen pro Verdünnungsschritt
Replikate der MRD-Proben	2 x 6, an 2 verschiedenen Messtagen
Replikate der Negativkontrolle	2 x 6, an 2 verschiedenen Messtagen
<b>Präzisionsvalidierung</b>	
Anzahl der Verdünnungsstufen	7
Anzahl der Verdünnungsreihen	58
Anzahl der Patienten	27
Anzahl der Einzelmessungen	406
Anzahl der bestimmten Sensitivitäten	58, jeweils mit ddPCR und qPCR
Anzahl der bestimmten QR / QL	56*, jeweils mit ddPCR und qPCR

QR / QL, Quantitativer Range / Limit. \*Exklusion von zwei Verdünnungsreihen

### 2.3.3 Multi-Color-Durchflusszytometrie

Die erzielten Messwerte mittels ddPCR und qPCR wurden zudem mit prospektiven Messungen anhand der Multi-Color-Durchflusszytometrie als eine dritte MRD-Quantifizierungsmethode verglichen. Diese Messmethode bietet die Möglichkeit der Unterscheidung verschiedener leukämischer Zellpopulationen anhand ihrer Streulichteigenschaften, sowie durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper die Typisierung des Antigenexpressionsmusters. Folglich können unterschiedliche leukämische (Sub)Populationen innerhalb einer Probe gemessen werden. Für die Quantifizierung mittels Flow wurde der Leukämie-assoziierte Immunphänotyp angewendet und die Messung erfolgte



nach den zuvor publizierten Standards im Labor der pädiatrischen Onkologie und Hämatologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin.[23]

## 2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde innerhalb des Programms *IBM SPSS Statistics* (Version 25, 2017, Armonk, NY: IBM Corp.) umgesetzt. Zur Testung auf die signifikante Unabhängigkeit der Merkmale der verschiedenen Gruppen wurde der exakte Fisher-Test für kategoriale Variablen herangezogen. Die quantitativen MRD-Werte von qPCR und ddPCR wurden mithilfe der bivariaten nichtparametrischen Spearman-Korrelationsstatistik überprüft, die eine Beurteilung über den Zusammenhang von ordinalskalierten Variablen erlaubt. Folglich wurde das Ergebnis der Korrelationstestung nicht nur als Punktediagramm (*Scatter Plot*) graphisch dargestellt, sondern ebenfalls mithilfe einer Bland-Altman-Analyse betrachtet, um die Grenzen der Übereinstimmung zwischen den Messergebnissen bewerten zu können. Die entsprechenden Abbildungen wurden innerhalb der Software von GraphPad (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA, Version 7.00, 2016) angefertigt. Hierbei wurden zur besseren grafischen Darstellung alle BQL- sowie negativen MRD-Ergebnisse auf  $1 \times 10^{-6}$  und  $1 \times 10^{-7}$  skaliert.

Im Rahmen der Validierungsversuche der Reproduzierbarkeit von der ddPCR-Methode wurden die Standardabweichungen (SD) bestimmt. Ferner wurde als Maß der Assoziation der Variationskoeffizient [ $CV = (SD/Mittelwert) \cdot 100$ ] der Intra- und Inter-Assay Wiederholungsmessungen für jede Probe berechnet und schließlich mittels *t*-Test für gepaarte qPCR- und ddPCR-Daten miteinander verglichen.

### 3. Ergebnisse

Innerhalb dieser Studie konnten detaillierte Arbeits- und Interpretationsverfahren zur MRD-Quantifizierung bei Proben von Patienten mit einer Diagnose oder einem Rezidiv der ALL ausgearbeitet werden. Hierbei wurden die vom EuroMRD Konsortium veröffentlichten MRD-Auswertungskriterien[34] als Basis herangezogen und anschließend erweitert und optimiert. So leistet diese Studie nicht zuletzt einen Beitrag zur Etablierung eines standardisierten Arbeits- und Interpretationsverfahren zur Verwendung der ddPCR-Technologie für die MRD-Quantifizierung.

Auch konnte mit der Studie hervorgehoben werden, dass die ddPCR eine geeignetere PCR-Methode als die qPCR zur Quantifizierung der MRD darstellt und folglich mit ihr die MRD-Diagnostik tatsächlich verbessert werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen diesbezüglich, dass die ddPCR gegenüber der qPCR eine überlegene Messgenauigkeit sowie eine akkurate Reproduzierbarkeit aufweist. Obwohl im Vergleich der beiden Messmethoden eine signifikante Übereinstimmung der MRD-Messergebnisse ausgemacht werden konnte, hat die Studie so dennoch herausgearbeitet, dass die Messmethode der ddPCR in Bezug auf die Sensitivität und dem QR / QL in großem Maße, die der qPCR übersteigt. Gerade bei Proben mit geringen DNA-Mengen ermöglicht die ddPCR somit eine präzisere Quantifizierung der MRD: Die Anzahl von MRD-Ergebnissen mit BQL-Bewertung konnte mit ihrer Anwendung gegenüber der qPCR deutlich reduziert werden. Dass sich die ddPCR innerhalb der Studie somit als präzisere Messmethode erweist, konnte zusätzlich auch durch einen Abgleich der Forschungsergebnisse hinsichtlich der beiden PCR-Methoden mit der Flow-Methode gezeigt werden.

In den folgenden Kapitelabschnitten werden diese Ergebnisse der Gesamtstudie detailliert präsentiert. Die Ergebnisse basieren auf der mit dieser Dissertation verbundenen Publikation von Schwinghammer et al., veröffentlicht im Fachjournal „*Journal of Molecular Diagnostics*“.[35]

#### 3.1 Signifikante Übereinstimmung zwischen den Messergebnissen der ddPCR und der qPCR

In Hinblick auf die MRD-Ergebnisse der pädiatrischen Kohorte weisen die beiden PCR-basierten Messmethoden der ddPCR und der qPCR eine Übereinstimmung von 84 % (74/88) auf. Dabei sei darauf hingewiesen, dass innerhalb der adulten Patientenkohorte

eine entsprechende Überprüfung der Konkordanz der MRD-Ergebnisse nicht berücksichtigt wurde, da hier von vornherein eine selektierte Auswahl von Proben mit einem BQL-MRD-Ergebnis vorgenommen worden war. In Gegenüberstellung der sowohl durch ddPCR als auch durch qPCR als positiv oder negativ bewerteten MRD-Ergebnisse beider Kohorten zeigt der Vergleich dieser Messmethoden eine hohe Sensitivität und Spezifität von >90 % je Kohorte (vgl. *Table 3* aus Schwinghammer et al.).[35] Ferner gibt es eine signifikante Korrelation von MRD-Ergebnissen der ddPCR mit der qPCR sowohl innerhalb der prospektiven Studie (Spearman-Korrelationskoeffizient:  $\rho = 0,92$ ;  $P < 0,001$ ) als auch in der retrospektiven Studie ( $\rho = 0,83$ ;  $P < 0,001$ ), wie veranschaulicht in einem Scatter-Diagramm (vgl. *Figure 4, A und C* aus Schwinghammer et al.).[35]

Entlang einer durch ein Bland-Altman-Histogramm[48] gefertigten Darstellung jeder einzelnen differierten Messungen beider Methoden wird ersichtlich, dass nahezu alle Unterschiede bezüglich jeder einzelnen Messung innerhalb des aus der Standardabweichung errechneten 95 %-Konfidenzintervalls liegen (vgl. *Figure 4, B und D* aus Schwinghammer et al.).[35] Selbst außerhalb des Konfidenzintervalls liegende Differenzen zwischen den Ergebnissen von ddPCR sowie qPCR können darauf zurückgeführt werden, dass in der Studie die BQL und negativen MRD-Ergebnisse auf  $1 \times 10^{-6}$  bzw.  $1 \times 10^{-7}$  zur besseren graphischen Darstellung umgeschrieben worden sind. Zusammenfassend lässt sich somit eine signifikante Übereinstimmung und Korrelation der mit beiden Messmethoden gemessenen MRD-Werte der ALL-Patienten ausmachen. Als eine interessante Feststellung bleibt diesbezüglich allerdings hervorzuheben, dass die Messungen der qPCR tendenziell zu einem höheren MRD-Wert führten als jene Vergleichsmessungen mit der ddPCR.

### **3.2 Akkurate Reproduzierbarkeit und Messgenauigkeit der ddPCR**

Um zu überprüfen, ob die ddPCR-Technologie präzise MRD-Werte reproduzieren kann, erfolgte ein Vergleich von vier MRD-Proben, deren einzelne Verdünnungsstufen in 12-facher Ausführung gemessen wurden. Die zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit herangezogene Standardabweichung von Messergebnissen[48] wurde hinsichtlich der vorliegenden Ergebnissen in der Einheit *copies/ $\mu$ L* der jeweiligen sechsfach Bestimmungen angewendet (vgl. *Supplemental Table S4* aus Schwinghammer et al.).[35] In der Studie wurde so bezüglich des für die medizinische Therapieanpassung wichtigen *Cut offs* mit

der Zellzahl  $1 \times 10^{-3}$  eine Standardabweichung im Bereich von 0,2 bis 5,5 *copies/μL* gemessen. Des Weiteren wiesen 18 von 21 (86 %) Messungen minimale Standardabweichungen von  $\leq 0,2$  *copies/μL* in den sensitiven Verdünnungsstufen von  $1 \times 10^{-4}$  bis  $1 \times 10^{-5}$  auf. Überdies wurde der Variationskoeffizient (CV) der einzelnen Verdünnungsstufen mit dem Ergebnis bestimmt, dass im Allgemeinen eine Zunahme des CVs bei niedrigen Verdünnungsstufen festzustellen war. Hingegen wiesen die Proben der Stufen mit hohen Zellzahlen von  $1 \times 10^{-1}$  bis  $5 \times 10^{-4}$  niedrige Variationen mit einem CV von  $<15$  % auf. Der mit den Verdünnungsstufen zunehmende CV lässt sich auf die Auswertungsmethode der ddPCR-Technologie zurückzuführen, da diese durch eine Zusammenführung aller Replikatergebnisse einer Targetprobe eine gemeinsame Berechnung der CV ermöglicht (sogenannte „merge“-Funktion der QuantaSoft Software). Die „merge“-Funktion wurde angewendet, sobald eine der jeweiligen Wiederholungen negativ bewertet war, was in der Studie vor allem bei den niedrigsten Verdünnungsstufen im Bereich von  $5 \times 10^{-5}$  bis  $1 \times 10^{-5}$  auftrat. In diesem Sinne ist zu unterstreichen, dass analog zu einem steigenden CV-Wert negative Einzelergebnisse der Replikate ebenfalls zunahmen. Dies zeigte sich zusätzlich innerhalb des Vergleichs der Replikate der gemessenen Verdünnungsreihen einer jeden Patientenprobe der prospektiven Kohorte. Niedrige Variationen wurden in den Verdünnungsstufen hoher Zellzahlen berechnet: Ein CV von  $\leq 15$  % wiesen 94 % der Messung (101/108) der Verdünnungen  $1 \times 10^{-1}$  und  $1 \times 10^{-2}$  sowie die Hälfte der Messungen der Verdünnungsstufe  $5 \times 10^{-4}$  auf. Im Bereich der oben beschriebenen für die klinische Praxis relevanten *Cut off*-Bereiche von  $1 \times 10^{-4}$  oder  $5 \times 10^{-5}$  wiesen 61 % (59/97) der Messungen einen CV von  $\leq 45$  % auf.

Zusammenfassend veranschaulichen die Ergebnisse dieser durchgeführten Intra-Assay- und Inter-Assay Validierung der ddPCR ihre überlegene Messgenauigkeit sowie eine akkurate Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse. Zudem zeigt die Parallelismusvalidierung der 12-fach Messungen eine hohe Assoziation der gemessenen Ergebnisse zur erwarteten Zellzahl der einzelnen Verdünnungsstufen (vgl. *Figure 2* aus Schwinghammer et al.)[35], wie durch den berechneten Korrelationskoeffizienten (R2) von stets  $\leq 0,99$  bestätigt wird.

### 3.3 Sensitivität und Quantitativer Range der MRD-Quantifizierung – Ein Vergleich zwischen der ddPCR und der qPCR

Obwohl die ddPCR eine absolute Quantifizierungsmethode darstellt und so keinen Bezug zu einer Standardkurve bedarf, wurde dennoch zur besseren Vergleichbarkeit ihrer Sensitivität und QR / QL gegenüber jener der qPCR ebenfalls Verdünnungsreihen durch ddPCR-Messungen ermittelt. Die daraus entspringende Möglichkeit, einen Vergleich zwischen den beiden in der Studie herangezogenen Messmethoden zu ziehen, hatte eine eindeutige Tendenz zu einer höheren Sensitivität der ddPCR zum Ergebnis. So zeigte sich in den mit der ddPCR durchgeführten Messungen eine Sensitivität von mindestens  $1 \times 10^{-4}$  deutlich häufiger (57/58, 98 %) als in jenen Messungen, bei denen die qPCR (46/58, 79 %,  $p < 0,0001$ ) angewendet wurde (vgl. *Figure 3, B* aus Schwinghammer et al.).[35] Ferner konnte eine Sensitivität von  $5 \times 10^{-5}$  oder  $1 \times 10^{-5}$  mittels ddPCR in 85 % (49/58) der erhobenen Messungen ermittelt werden, während dies nur in 45 % (26/58) der durch qPCR gemessenen Fälle zutraf.

Im Ergebnis des anhand von QR / QL-Werten aufgestellten Vergleichs zwischen den beiden PCR-Methoden konnte der für die MRD-Bestimmung etablierte Grenzwert von mindestens  $1 \times 10^{-4}$  mittels ddPCR in 95 % (53/56) der Targetproben, mittels qPCR in nur 29 % (16/56,  $p < 0,0001$ ) erreicht werden (vgl. *Figure 3, A* aus Schwinghammer et al.).[35]. Des Weiteren erzielte die ddPCR in 73 % (41/56) der Messungen ein QR / QL im Bereich niedriger Zellzahlen von  $5 \times 10^{-5}$  bis  $1 \times 10^{-5}$ . Mit der qPCR hingegen lag ein QR / QL von  $5 \times 10^{-5}$  maximal in 7 % (4/56,  $p < 0,0001$ ) der Proben vor (vgl. *Figure 3, A* aus Schwinghammer et al.).[35]

Die durch die ddPCR derart gesteigerte Sensitivität sowie erweiterte QR / QL ermöglichten schließlich eine Reduktion der in der qPCR gemessenen und als BQL bewerteten MRD-Werte. Veranschaulicht wird dies vor allem im Rahmen des retrospektiven Studienansatzes, bei dem explizit qPCR-Proben mit einem hohen Anteil an BQL-Ergebnissen ausgesucht und mittels ddPCR reevaluiert wurden. Während insgesamt 29 der durch die qPCR gemessenen Proben als BQL definiert werden mussten, konnten 24 dieser Proben (24/29) durch die ddPCR klar einem positiven oder negativen MRD-Ergebnis zugeordnet werden. Die fünf restlichen Proben (5/29) bleiben auch mittels Messung durch ddPCR als MRD-Ergebnis mit BQL zu bewerten (vgl. *Supplemental Table S5* aus Schwinghammer et al.).[35] Demgemäß erzielte die ddPCR eine Reduktion der BQL-Er-

gebnisse auf 17 % (vgl. *Supplemental Table S5* aus Schwinghammer et al.).[35] Im prospektiven Ansatz dieser Studie wurden wiederum 13 Messungen durch die qPCR als BQL definiert. Durch die Reevaluation mittels ddPCR konnten hier bezüglich zehn der 13 Proben jeweils ein positives oder negatives Ergebnis erzielt werden, sodass lediglich drei MRD-Werte ebenfalls als BQL charakterisiert wurden. Dies entspricht einer Reduktion auf 23 % (vgl. *Supplemental Table S5* aus Schwinghammer et al.).[35]

Die gesammelten Ergebnisse sowohl in Bezug auf die Sensitivität als auch auf die QR / QL unterstreichen so die erheblichen Vorteile der ddPCR gegenüber der qPCR. Die vorliegende Studie zeigt, dass die ddPCR in diesem Vergleich die Sensitivität in großem Maße steigert, genauso wie sie den QR / QL erweitert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die ddPCR eine Quantifizierung der MRD gerade bei Proben mit geringen Targetmengen ermöglicht und dementsprechend MRD-Ergebnisse mit BQL deutlich reduzieren kann.

### **3.4 Abgleich der PCR-MRD-Ergebnisse mit der Durchflusszytometrie**

Die in dieser Studie generierten MRD-Messwerte der Flow-Methode stimmen in signifikanten Maße nicht nur mit denen der ddPCR ( $\rho = 0,96$ ,  $P < 0,001$ ), sondern gleichermaßen mit den Ergebnissen der qPCR ( $\rho = 0,90$ ,  $P < 0,001$ ) überein. Diese Übereinstimmungen konnten statistisch validiert und entlang einer durch Bland-Altman-Histogramme[48] gefertigten Darstellungen veranschaulicht werden. Eine weitere Bestätigung dieser Korrelationen erfolgte mithilfe eines *t*-Tests, der die Differenzen zwischen ddPCR und qPCR gegenüber der Flow prüft. Es ist hervorzuheben, dass diese Untersuchungen insgesamt eine höhere Konkordanz der MRD-Werte von ddPCR und Flow belegen als zwischen jenen der qPCR und der Flow. Es können zwei Gründe hierfür im Rahmen der Gegenüberstellung von den Ergebnissen der Flow sowie der qPCR angeführt werden: Einerseits zeigte sich ein als kleiner geschätzter Unterschied zwischen den Messwerten der ddPCR und Flow. Andererseits kann entlang der Analyse nach Bland-Altman ein kleineres 95 %-Konfidenzintervall zwischen den durch Flow und ddPCR gewonnenen MRD-Werten als zwischen jenen von Flow und qPCR gelieferten Messergebnissen nachgewiesen werden (*Table 5* aus Schwinghammer et al.).[35] In diesem Sinne kann diese Studie ihre Ergebnisse auch im Lichte eines direkten Vergleichs der jeweiligen Messresultate der beiden PCR-basierten Methoden mit einer durch Flow durchgeführten Analyseseinheit präsentieren: In diesem Vergleich zeigt sich, dass die Flow-MRD-Ergebnisse

eine größere Übereinstimmung mit denen der ddPCR aufwiesen, obgleich die mittleren Differenzwerte aufgrund einer geringen Anzahl an verfügbaren und für die statistische Bland-Altman-Analyse zur Verfügung stehenden Proben, keine statistische Signifikanz erreichen konnte.

Eine weitere Diskrepanz konnte zudem zwischen den Ergebnissen der Analyse mittels Flow zu jenen anhand der beiden PCR-Messmethoden generierten Resultate festgestellt werden: Hier zeigte sich im Allgemeinen, dass sich die als positiv bewerteten MRD-Werte der Flow sowie der ddPCR nach logarithmischer Transformation tendenziell einen deutlich niedrigeren Messwert aufwiesen als die positiven MRD-Ergebnisse der qPCR (vgl. *Figure 5* aus Schwinghammer et al.).[35] Hierbei belief sich die Diskrepanz der Messergebnisse von einer akzeptierten, bei repetitiven Messungen möglichen Variabilität im Bereich von  $<1/2$  log-Stufe, bis hin zu weitreichenden ( $>1/2$  log-Stufe). Letztere kann nicht mehr durch eine simple kausale Rückführung auf wiederholte Messungen gedeckt werden und muss so auf tatsächliche Messunterschiede der qPCR gegenüber der Flow- bzw. ddPCR-Methode zurückzuführen sein.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die ddPCR-Methode hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit zur Quantifizierung der MRD bei Patienten mit einer ALL überprüft. Gegenüberstellend zur derzeit etablierten Messmethode - der qPCR – wurde anhand mehrerer Studienansätzen eruiert, inwiefern die ddPCR eine geeignetere PCR-Messmethode zur verlässlichen und sensitiven MRD-Quantifizierung darstellt. Um einen direkten Vergleich dieser Messmethoden zu ermöglichen, mussten in einem ersten Schritt detaillierte Analyse- und Interpretationskriterien zur Auswertung der ddPCR-Messdaten erarbeitet werden. Die zunächst entlang der Euro-MRD Leitlinien[22] für die qPCR sowie in Abgleich mit einer Verdünnungsreihe entwickelten Auswertungskriterien wurden kritisch hinterfragt und als nicht zielführend bewertet. Als Grund hierfür lässt sich einerseits anführen, dass die ddPCR als absolute Quantifizierungsmethode grundsätzlich keine Verdünnungsreihe als Referenz benötigt. Andererseits ließen sich die Euro-MRD-Leitlinien zur qPCR nur unzulänglich auf eine Analyse von Rohdaten der ddPCR übertragen, weil gewichtige Unterschiede zwischen den beiden Messtechnologien in Bezug auf die Durchführung der PCR-Reaktion bestehen. Ein weiterer Beweggrund zur Veränderung der Auswertungskriterien war zudem die zeitgleich zu diesem ersten Analyseschritt der vorliegenden Studie veröffentlichte Publikation von Drandi et al. und dem hier dargestellten maßgeblichen Fortschritt in der Analyse und Interpretation von ddPCR-Daten.[34] Aufgrund dieser drei Aspekte wurde der Entschluss gefasst, die von Drandi et al. erarbeiteten Analyse- und Interpretationskriterien aufzugreifen, zu erweitern und diese in Anwendung auf den in der Studie zentralen Fall von Patienten mit einer ALL zur MRD-Quantifizierung zu präzisieren. Gegenüber der ausschlaggebenden Studie von Drandi et al. konnten so detaillierte Analyse- und Interpretationskriterien zur Auswertung der patientenspezifischen MRD-Quantifizierung mithilfe der ddPCR-Methode ausgearbeitet werden.

Die vorliegenden Ergebnisse konnten die erheblichen Vorteile der ddPCR-Messmethode gegenüber der qPCR herausstellen und bestätigen so die unter anderem von Drandi et al. und Della Starza et al. veröffentlichten Ergebnisse.[28, 31] Innerhalb der genannten Studien wurde die ddPCR zur Bestimmung des MRD-Werts von Patienten mit einer ALL oder einem Lymphom mittels IG- / TR-Genumlagerung angewendet. Diesbezüglich zeichnet sich die vorliegende Studie allerdings dadurch aus, dass dieser Vergleich sowohl anhand eines prospektiven als auch eines retrospektiven Studienansatzes



und somit in Bezug auf zwei unterschiedliche Fragestellungen eingebettet wurde. Darüber hinaus konnte die vorliegende Studie den Nachweis der Messgenauigkeit der ddPCR mit einer vergleichsweise großen Anzahl an Proben erbringen und so die Messresultate bereits vorliegender Studien eindringlicher beleuchten: So zeigt die hiesige Studie die Überlegenheit der ddPCR gegenüber der qPCR anhand einer Inter- und Intra-Assay-Analyse eines Vergleiches prospektiv gemessener Verdünnungsreihen beider PCR-Technologien sowie durch eine zusätzlich durchgeführte Validierungsanalyse zur Überprüfung der methodischen Reproduzierbarkeit. Mit dem Vergleich der Verdünnungsreihen wurde die erhöhte Sensitivität sowie die Erweiterung der QR / QL der ddPCR nachgewiesen. Dadurch konnte diese Studie dezidiert aufzeigen, dass die Anzahl der MRD-Werte mit einem in der qPCR-Methode bewerteten BQL-Ergebnis durch die Anwendung der ddPCR deutlich reduziert werden kann: Innerhalb des retrospektiven Studienansatzes konnte die Anzahl an BQL-Ergebnissen auf einen Restbestand von 17 % (Reduktion um 83 %), innerhalb des prospektiven Ansatzes auf 23 % (Reduktion um 77 %) gesenkt werden. Die nachgewiesene Reduktion bestätigt die bereits ähnlich von Drandi et al. (Reduktion auf 12 %, 29/240) oder Della Starza et al. (Reduktion auf 35,5 %, 16/45) angeführten Ergebnisse (vgl. *Supplemental Table S5* aus Schwinghammer et al.).[34, 35, 49]. Die vorliegende Studie konnte somit aufzeigen, dass die ddPCR eine sensitivere MRD-Messung mit Verbesserung der Quantifizierungseffizienz des Zielgens darstellt und damit eine exaktere klinische Entscheidungsfindung ermöglicht werden könnte. Insbesondere für das Therapiekonzept für Patienten mit einer ALL könnten die in der hiesigen Studie erbrachten Ergebnisse demgemäß einen entscheidenden Beitrag zur Optimierung der klinischen Praxis darstellen. Dafür müssen allerdings die Übertragbarkeit der Ergebnisse in die klinische Praxis zum Gegenstand weiterer prospektiver Blindstudien mit einer großen, einheitlich behandelten Studienkohorten werden. Dieser Aspekt wurde erstmals in der Studie von Della Starza et al. betrachtet.[44] Eine solch zukünftige Überprüfung der hier erbrachten Ergebnisse erhält ihre Relevanz auch dadurch, dass eben der Spielraum an Sensitivitätssteigerung der aktuell angewendeten qPCR-Methode stark eingeschränkt ist: Die Sensitivität kann nur durch den Einsatz signifikant größerer DNA-Mengen gesteigert werden.

Durch den Vergleich der PCR-Methoden mit der Flow-Methode konnte die vorliegende Studie darüber hinaus auch die Nachteile der qPCR in Hinblick auf die MRD-Quantifizierung aus einem anderen Blickwinkel beleuchten. Ausgangspunkt hierfür war der anhand von acht Proben gemessene Unterschied der positiven MRD-Ergebnisse zwischen

Flow und qPCR, von dem bereits in anderen Studien berichtet wurde.[44, 50-56] Bezüglich der Messresultate unterscheiden sich die Ergebnisse dieser Studie diesbezüglich nicht von vergleichbaren Ergebnissen: Die MRD-Resultate von qPCR lagen in der hiesigen Studie um den Faktor 1,6 unterhalb denen der Flow und in der Studie *ALL-REZ-BFM* etwa in einem Durchschnitt von 2,5.[23] Jedoch konnte in der vorliegenden Studie ein erster Schritt hinsichtlich des noch ausstehenden Erklärungsansatzes für dieses Phänomen der beobachteten Abweichung erarbeitet werden. Nach erneuter Analyse von sieben (7/8) innerhalb des Vergleichs mit Flow erhobenen qPCR-Messergebnisse konnte ein hoher  $C_T$ -Wert ( $C_T \geq 27$ ) der  $1 \times 10^{-1}$ -Verdünnungsstufe (hier höchste Konzentration der Verdünnungsreihe) festgestellt werden. Dieser hohe  $C_T$ -Wert scheint ein Hinweis auf eine leukämische Subpopulation zu sein, deren Zellzahl auf niedriger quantitativer Ebene der Diagnose vorliegt. In einem solchen Fall könnte mit der qPCR aus genannten methodischen Gründen die Anzahl der Leukämiezellen überschätzt worden sein und somit zu einem erhöhten MRD-Ergebnis geführt haben. Auch in dieser Hinsicht einer möglichen Überschätzung der vorliegenden MRD-Werte lässt sich ableiten, dass die qPCR in einem solchen Fall keine optimale Messtechnologie darstellt, beziehungsweise die ddPCR in ihrer Eigenschaft als eine absolute Messmethode von Vorteil erscheint.

#### **4.1 Implikationen für die klinische Praxis und zukünftige Forschung**

Die in dieser Studie herausgearbeiteten Ergebnisse lassen den generellen Schluss zu, dass die ddPCR aufgrund ihrer aufgeführten Vorzüge als eine mögliche additive Diagnostikmethode oder sogar als eine vielversprechende Alternative zur qPCR für die MRD-Quantifizierung bei der ALL eingesetzt werden kann. Dennoch muss die mögliche Optimierung der klinischen Entscheidungsfindung auf Grundlage der MRD-Diagnostik mittels ddPCR zukünftig in repräsentativen klinischen Studien weitergehend untersucht werden. Die möglichen Positivaspunkte einer weitläufigen Einführung der ddPCR werden zudem noch dadurch unterstrichen, wenn ein aktuell vorherrschender Erklärungsansatz zum ursächlichen Auftreten von Rezidiven bei einer ALL einbezogen wird. In diesem Erklärungsansatz wird beschrieben, dass ein in der Diagnose vorliegender Subklon einer oligoklonalen Leukämiepopulation aufgrund einer inhärent resistenten Eigenschaft expandieren und folglich verantwortlich für das Auftreten eines Rezidivs sein könnte.[17-19] Zudem wird ein Kausalzusammenhang zwischen der Zellzahl dieses leukämischen Subklons

und dem Zeitpunkt des Auftretens eines Rezidivs (zeitlicher Abstand zur Diagnose) beobachtet.[17, 18] Für diesen Fall verspricht der Einsatz der ddPCR durch ihre Fähigkeit auch subklonale Veränderungen quantitativ monitoren zu können demgemäß eine verbesserte Diagnose- und Behandlungsmöglichkeit sowie eine exaktere Prognose. Eine zukünftige Forschung könnte Proben von Patienten mit einem Rezidiv der ALL vergleichend mit Proben aus der Diagnose des jeweiligen Patienten untersuchen. Dies könnte die Möglichkeit bieten, die im besagten Erklärungsansatz aufgeführten Zusammenhänge zu überprüfen.

Um zukünftig die ddPCR-Methode in den Studientherapieprotokollen als ergänzende oder ersetzende Messmethode für die patientenspezifische MRD-Quantifizierung heranziehen zu können, müssen zusätzlich hochgradig standardisierte, multizentrisch überprüfte Richtlinien für die Analyse der ddPCR erstellt werden. Diesbezüglich erweisen sich die in dieser Studie auf Grundlage der von Drandi et al. ausgearbeiteten Analyse- und Interpretationskriterien als ein entscheidender Fortschritt.[34] In Zukunft sollten – darauf aufbauend - technologische Aspekte und apparativen Unterschiede, wie beispielsweise die Volumenvariabilität der Tröpfchen, weitergehend untersucht und berücksichtigt werden.

Die in der Studie gewonnenen Erkenntnisse über die ddPCR könnten sich weitläufiger, auch über den spezifischen Anwendungsfall der MRD-Quantifizierung bei Patienten mit einer ALL hinaus, auf die Messung anderer (genomischer) Targets übertragen lassen, die in der Routine mit qPCR analysiert werden; zunehmend ist dies bereits in der medizinischen Diagnostik von hämatologischen Entitäten wie Lymphomen, Chronischer Lymphoblastischer Leukämie und Akuter Myeloischer Leukämie der Fall.

## **4.2 Technische Grenzen und Herausforderungen der ddPCR**

Eine technische Problematik der ddPCR liegt in der Variabilität des Volumens der bei dieser Methodik generierten Tröpfchen, die potenziell zu Ungenauigkeiten im Messergebnis führen können. Die Festlegung auf eine wie vom Hersteller Bio-Rad empfohlene Tröpfchenanzahl wird dadurch erschwert: Gemäß entsprechender Instruktionen muss diese auf eine Spanne zwischen 9.000 bis 20.000 Tröpfchen pro Messung eingegrenzt werden, um verlässliche Ergebnisse unter der Annahme einer Poisson-Verteilung gewährleisten zu können.[45] Im Fall des retrospektiven Studienansatzes wurde jedoch ge-

häuft eine Tröpfchenanzahl von  $\geq 20.000$  Tröpfchen pro Messung festgestellt. Um mögliche Auswirkungen hinsichtlich der ddPCR-Analysen innerhalb dieser Studie einschätzen zu können, wurde der Hersteller Bio-Rad konsultiert und die angegebene Anzahl der Tröpfchen angepasst. Das vom Hersteller angegebene durchschnittliche Volumen von 1 nL pro Tröpfchen konnte in Bezug auf das in der Studie angewendete System auf einen theoretischen Wert von 0,87 nL pro Tröpfchen angepasst werden. Hieraus ergibt sich bei verwendetem Ansatzvolumen von 20  $\mu$ L eine theoretische Tröpfchenanzahl von 22.989 pro Probe. Zudem wurde in anderen Studien von einem Volumen von 0,85 nL pro Tröpfchen berichtet, was theoretisch zu einer maximalen Tröpfchenanzahl von 23.529 pro Probe führt.[46, 47] Aus den neu gewonnenen Information und der vorliegenden Beobachtung wurde daher das Auftreten der Tröpfchenanzahl von  $\geq 20.000$  pro Messung auf einen Effekt, der vor allem durch das eingesetzte Proben-basierten Chemikaliensystem verursacht wird, zurückgeführt. Auf Grundlage dieser Erfahrungswerte konnte in der retrospektiven Studie die Tröpfchenanzahl auf einen maximalen Wert von 23.000 pro Ansatz als Grundkriterium festgelegt werden, um die beschriebene mögliche Variabilität der Tröpfchenvolumina unter der Annahme der Poisson-Verteilung zu berücksichtigen. Ein weiterer Grund für Variationen des Tröpfchenvolumens könnte durch Verunreinigungen, wie beispielsweise mitgeführte Detergenzien aus der Nukleinsäurepräparation hervorgerufen werden, die unter anderem die Oberflächenspannung der Tröpfchen in großem Maße beeinflussen können. Damit standardisierte Richtlinien für die Analyse der ddPCR erstellen werden können, sollte die Variabilität der Tröpfchenvolumina und damit die Festlegung der Tröpfchenanzahl individuell untersucht und einbezogen werden.

Eine weitere technische Problematik der ddPCR, gerade hinsichtlich der genauen und standardisierten MRD-Analyse, stellen mögliche Messungenauigkeiten aufgrund des sogenannten „Regens“ dar. Unter diesem Begriff werden jene nicht genau definierbaren Punkte beschrieben, die sich zwischen dem positiven und dem negativen Fluoreszenzintensitätscluster befinden und graphisch, wie in Abbildung 3 illustriert, durch die Analyse-Software QuantaSoft (Version 1.7.4.0917) von Bio-Rad dargestellt werden. Das Auftreten des „Regens“ ist nicht vollends geklärt. Es wird angenommen, dass die Entstehung des „Regens“ ursächlich auf Effekte während der Durchführung der Analysen zurückzuführen ist. Als Beispiele hierfür lassen sich Pipetten-Kalibrierfehler, Verunreinigung der DNA, Änderungen im PCR-Reaktionsprogramm (Anzahl der Zykluswiederholungen, Temperatureinstellung bei der Primerhybridisierung) oder beschädigte sowie koagulierte Tröpf-

chen, die zu Verzerrungen bei der Durchführung der physikalischen Messung des Fluoreszenzfarbstoffsignals führen, nennen.[57] Das in dieser Studie vorgestellte Vorgehen zur Analyse von ddPCR-Daten könnte in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zum Umgang vor allem mit methodischen Fehlerquellen dienen. Generell ist aber eine genaue Ursachenklärung der Entstehung des „Regens“ für eine verbesserte Festlegung des Schwellenwertes (*Threshold*) zwischen positiven und negativen Tröpfchen notwendig. Um dies zu erreichen und entsprechend eine Verbesserung der ddPCR-Messgenauigkeit zu erzielen, müssen die Ursachen und Auswirkungen des „Regens“ demgemäß weitergehend untersucht werden.

## Literaturverzeichnis

1. Erdmann, F., Kaatsch P, Grabow D, Spix C, *German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018)*. 2020, Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz.
2. Onciu, M.: *Acute lymphoblastic leukemia*. Hematol Oncol Clin North Am, 2009. **23**(4): S. 655-74.
3. Erdmann, F., Frederiksen, L.E., Bonaventure, A., Mader, L., Hasle, H., Robison, L.L. and Winther, J.F.: *Childhood cancer: Survival, treatment modalities, late effects and improvements over time*. Cancer Epidemiol, 2021. **71**(Pt B): S. 101733.
4. Bhojwani, D. and Pui, C.H.: *Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet Oncol, 2013. **14**(6): S. e205-17.
5. Borowitz, M.J., Devidas, M., Hunger, S.P., Bowman, W.P., Carroll, A.J., Carroll, W.L., Linda, S., Martin, P.L., Pullen, D.J., Viswanatha, D., Willman, C.L., Winick, N., Camitta, B.M. and Children's Oncology, G.: *Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study*. Blood, 2008. **111**(12): S. 5477-85.
6. Eckert, C., Hagedorn, N., Sramkova, L., Mann, G., Panzer-Grumayer, R., Peters, C., Bourquin, J.P., Klingebiel, T., Borkhardt, A., Cario, G., Alten, J., Escherich, G., Astrahantseff, K., Seeger, K., Henze, G. and von Stackelberg, A.: *Monitoring minimal residual disease in children with high-risk relapses of acute lymphoblastic leukemia: prognostic relevance of early and late assessment*. Leukemia, 2015. **29**(8): S. 1648-55.
7. Eckert, C., Henze, G., Seeger, K., Hagedorn, N., Mann, G., Panzer-Grumayer, R., Peters, C., Klingebiel, T., Borkhardt, A., Schrappe, M., Schrauder, A., Escherich, G., Sramkova, L., Niggli, F., Hitzler, J. and von Stackelberg, A.: *Use of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation based on minimal residual disease response improves outcomes for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in the intermediate-risk group*. J Clin Oncol, 2013. **31**(21): S. 2736-42.
8. Flohr, T., Schrauder, A., Cazzaniga, G., Panzer-Grumayer, R., van der Velden, V., Fischer, S., Stanulla, M., Basso, G., Niggli, F.K., Schafer, B.W., Sutton, R., Koehler, R., Zimmermann, M., Valsecchi, M.G., Gadner, H., Masera, G., Schrappe, M., van Dongen, J.J., Biondi, A., Bartram, C.R. and International, B.F.M.S.G.: *Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2008. **22**(4): S. 771-82.
9. Cave, H., van der Werff ten Bosch, J., Suci, S., Guidal, C., Waterkeyn, C., Otten, J., Bakkus, M., Thielemans, K., Grandchamp, B. and Vilmer, E.: *Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. N Engl J Med, 1998. **339**(9): S. 591-8.
10. Nunes, V., Cazzaniga, G. and Biondi, A.: *An update on PCR use for minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia*. Expert Rev Mol Diagn, 2017. **17**(11): S. 953-963.

11. van Dongen, J.J., van der Velden, V.H., Bruggemann, M. and Orfao, A.: *Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies*. Blood, 2015. **125**(26): S. 3996-4009.
12. Bruggemann, M., Raff, T. and Kneba, M.: *Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL?* Blood, 2012. **120**(23): S. 4470-81.
13. Bader, P., Kreyenberg, H., von Stackelberg, A., Eckert, C., Salzmann-Manrique, E., Meisel, R., Poetschger, U., Stachel, D., Schrappe, M., Alten, J., Schrauder, A., Schulz, A., Lang, P., Muller, I., Albert, M.H., Willasch, A.M., Klingebiel, T.E. and Peters, C.: *Monitoring of minimal residual disease after allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia allows for the identification of impending relapse: results of the ALL-BFM-SCT 2003 trial*. J Clin Oncol, 2015. **33**(11): S. 1275-84.
14. Eckert, C., von Stackelberg, A., Seeger, K., Groeneveld, T.W., Peters, C., Klingebiel, T., Borkhardt, A., Schrappe, M., Escherich, G. and Henze, G.: *Minimal residual disease after induction is the strongest predictor of prognosis in intermediate risk relapsed acute lymphoblastic leukaemia - long-term results of trial ALL-REZ BFM P95/96*. Eur J Cancer, 2013. **49**(6): S. 1346-55.
15. Bader, P., Kreyenberg, H., Henze, G.H., Eckert, C., Reising, M., Willasch, A., Barth, A., Borkhardt, A., Peters, C., Handgretinger, R., Sykora, K.W., Holter, W., Kabisch, H., Klingebiel, T., von Stackelberg, A. and Group, A.-R.B.S.: *Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group*. J Clin Oncol, 2009. **27**(3): S. 377-84.
16. Steinbach, D., Bader, P., Willasch, A., Bartholomae, S., Debatin, K.M., Zimmermann, M., Creutzig, U., Reinhardt, D. and Gruhn, B.: *Prospective validation of a new method of monitoring minimal residual disease in childhood acute myelogenous leukemia*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(6): S. 1353-9.
17. Henderson, M.J., Choi, S., Beesley, A.H., Sutton, R., Venn, N.C., Marshall, G.M., Kees, U.R., Haber, M. and Norris, M.D.: *Mechanism of relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia*. Cell Cycle, 2008. **7**(10): S. 1315-20.
18. Choi, S., Henderson, M.J., Kwan, E., Beesley, A.H., Sutton, R., Bahar, A.Y., Giles, J., Venn, N.C., Pozza, L.D., Baker, D.L., Marshall, G.M., Kees, U.R., Haber, M. and Norris, M.D.: *Relapse in children with acute lymphoblastic leukemia involving selection of a preexisting drug-resistant subclone*. Blood, 2007. **110**(2): S. 632-9.
19. Mullighan, C.G., Phillips, L.A., Su, X., Ma, J., Miller, C.B., Shurtleff, S.A. and Downing, J.R.: *Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia*. Science, 2008. **322**(5906): S. 1377-80.
20. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J. and van Dongen, J.J.: *Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects*. Leukemia, 2003. **17**(6): S. 1013-34.
21. van der Velden, V.H., Panzer-Grumayer, E.R., Cazzaniga, G., Flohr, T., Sutton, R., Schrauder, A., Basso, G., Schrappe, M., Wijkhuijs, J.M., Konrad, M., Bartram, C.R., Masera, G., Biondi, A. and van Dongen, J.J.: *Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting*. Leukemia, 2007. **21**(4): S. 706-13.
22. van der Velden, V.H., Cazzaniga, G., Schrauder, A., Hancock, J., Bader, P., Panzer-Grumayer, E.R., Flohr, T., Sutton, R., Cave, H., Madsen, H.O., Cayuela, J.M., Trka, J., Eckert, C., Foroni, L., Zur Stadt, U., Beldjord, K., Raff, T., van der Schoot, C.E., van Dongen, J.J. and European Study Group on, M.R.D.d.i.A.L.L.:

- Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data.* Leukemia, 2007. **21**(4): S. 604-11.
23. Karawajew, L., Dworzak, M., Ratei, R., Rhein, P., Gaipa, G., Buldini, B., Basso, G., Hrusak, O., Ludwig, W.D., Henze, G., Seeger, K., von Stackelberg, A., Mejstrikova, E. and Eckert, C.: *Minimal residual disease analysis by eight-color flow cytometry in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia.* Haematologica, 2015. **100**(7): S. 935-44.
  24. Bizouarn, F.: *Introduction to digital PCR.* Methods Mol Biol, 2014. **1160**: S. 27-41.
  25. Basu, A.S.: *Digital Assays Part I: Partitioning Statistics and Digital PCR.* SLAS Technol, 2017. **22**(4): S. 369-386.
  26. Kim, I.S.: *Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: technical aspects and implications for clinical interpretation.* Blood Res, 2020. **55**(S1): S. S19-S26.
  27. Drandi, D., Ferrero, S. and Ladetto, M.: *Droplet Digital PCR for Minimal Residual Disease Detection in Mature Lymphoproliferative Disorders.* Methods Mol Biol, 2018. **1768**: S. 229-256.
  28. Drandi, D., Kubiczkova-Besse, L., Ferrero, S., Dani, N., Passera, R., Mantoan, B., Gambella, M., Monitillo, L., Saraci, E., Ghione, P., Genuardi, E., Barbero, D., Omede, P., Barberio, D., Hajek, R., Vitolo, U., Palumbo, A., Cortelazzo, S., Boccadoro, M., Inghirami, G. and Ladetto, M.: *Minimal Residual Disease Detection by Droplet Digital PCR in Multiple Myeloma, Mantle Cell Lymphoma, and Follicular Lymphoma: A Comparison with Real-Time PCR.* J Mol Diagn, 2015. **17**(6): S. 652-60.
  29. Park, H., Shin, D.Y., Kim, I., Sohn, S.K., Koh, Y., Lee, J.H., Lee, K.H., Kim, D.Y., Kim, H.J., Ahn, J.S., Lee, J.O., Bang, S.M., Cheong, J.W., Park, S.G., Park, S., Lee, Y.J. and Ahn, S.Y.: *Use of Droplet Digital Polymerase Chain Reaction for Detecting Minimal Residual Disease: A Prospective Multi-Institutional Study.* In Vivo, 2019. **33**(6): S. 2273-2280.
  30. Della Starza, I., Chiaretti, S., De Propriis, M.S., Elia, L., Cavalli, M., De Novi, L.A., Soscia, R., Messina, M., Vitale, A., Guarini, A. and Foa, R.: *Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Technical and Clinical Advances.* Front Oncol, 2019. **9**: S. 726.
  31. Della Starza, I., Nunes, V., Cavalli, M., De Novi, L.A., Ilari, C., Apicella, V., Vitale, A., Testi, A.M., Del Giudice, I., Chiaretti, S., Foa, R. and Guarini, A.: *Comparative analysis between RQ-PCR and digital-droplet-PCR of immunoglobulin/T-cell receptor gene rearrangements to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia.* Br J Haematol, 2016. **174**(4): S. 541-9.
  32. Brunetti, C., Anelli, L., Zagaria, A., Minervini, A., Minervini, C.F., Casieri, P., Coccaro, N., Cumbo, C., Tota, G., Impera, L., Orsini, P., Specchia, G. and Albano, F.: *Droplet Digital PCR Is a Reliable Tool for Monitoring Minimal Residual Disease in Acute Promyelocytic Leukemia.* J Mol Diagn, 2017. **19**(3): S. 437-444.
  33. Della Starza, I., Cavalli, M., De Novi, L.A., Genuardi, E., Mantoan, B., Drandi, D., Barbero, D., Ciabatti, E., Grassi, S., Gazzola, A., Mannu, C., Agostinelli, C., Piccaluga, P.P., Bomben, R., Degan, M., Gattei, V., Guarini, A., Foa, R., Galimberti, S., Ladetto, M., Ferrero, S., Del Giudice, I. and Fondazione Italiana Linfomi, M.R.D.N.: *Minimal residual disease (MRD) in non-Hodgkin lymphomas: Interlaboratory reproducibility on marrow samples with very low levels of disease within the FIL (Fondazione Italiana Linfomi) MRD Network.* Hematol Oncol, 2019. **37**(4): S. 368-374.



34. Drandi, D., Alcantara, M., Benmaad, I., Sohlbrandt, A., Lhermitte, L., Zaccaria, G., Ferrante, M., Genuardi, E., Mantoan, B., Villarese, P., Cheminant, M., Starza, I.D., Ciabatti, E., Bomben, R., Jimenez, C., Callanan, M., Abdo, C., Eckert, C., Ribrag, V., Cortelazzo, S., Dreyling, M., Hermine, O., Delfau-Larue, M.H., Pott, C., Ladetto, M., Ferrero, S. and Macintyre, E.: *Droplet Digital PCR Quantification of Mantle Cell Lymphoma Follow-up Samples From Four Prospective Trials of the European MCL Network*. *Hemasphere*, 2020. **4**(2): S. e347.
35. Schwinghammer, C., Koopmann, J., Chitadze, G., Karawajew, L., Bruggemann, M. and Eckert, C.: *A New View on Minimal Residual Disease Quantification in Acute Lymphoblastic Leukemia using Droplet Digital PCR*. *J Mol Diagn*, 2022. **24**(8): S. 856-866.
36. Melo, J.V.: *BCR-ABL gene variants*. *Baillieres Clin Haematol*, 1997. **10**(2): S. 203-22.
37. Boyum, A.: *Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents*. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1968. **97**: S. 31-50.
38. van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Bruggemann, M., Evans, P.A., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., Garcia-Sanz, R., van Krieken, J.H., Droese, J., Gonzalez, D., Bastard, C., White, H.E., Spaargaren, M., Gonzalez, M., Parreira, A., Smith, J.L., Morgan, G.J., Kneba, M. and Macintyre, E.A.: *Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936*. *Leukemia*, 2003. **17**(12): S. 2257-317.
39. Eckert, C. and Landt, O.: *Real-time PCR to detect minimal residual disease in childhood ALL*. *Methods Mol Med*, 2004. **91**: S. 175-82.
40. Szczepanski, T., Pongers-Willemse, M.J., Langerak, A.W., Harts, W.A., Wijkhuijs, A.J., van Wering, E.R. and van Dongen, J.J.: *Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage*. *Blood*, 1999. **93**(12): S. 4079-85.
41. Szczepanski, T., van der Velden, V.H., Hoogeveen, P.G., de Bie, M., Jacobs, D.C., van Wering, E.R. and van Dongen, J.J.: *Vdelta2-Jalpha rearrangements are frequent in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia but rare in normal lymphoid cells*. *Blood*, 2004. **103**(10): S. 3798-804.
42. Langerak, A.W., Szczepanski, T., van der Burg, M., Wolvers-Tettero, I.L. and van Dongen, J.J.: *Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations*. *Leukemia*, 1997. **11**(12): S. 2192-9.
43. Pongers-Willemse, M.J., Seriu, T., Stolz, F., d'Aniello, E., Gameiro, P., Pisa, P., Gonzalez, M., Bartram, C.R., Panzer-Grumayer, E.R., Biondi, A., San Miguel, J.F. and van Dongen, J.J.: *Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia*. *Leukemia*, 1999. **13**(1): S. 110-8.
44. Malec, M., van der Velden, V.H., Bjorklund, E., Wijkhuijs, J.M., Soderhall, S., Mazur, J., Bjorkholm, M. and Porwit-MacDonald, A.: *Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR*

- analysis of Ig/TcR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping*. *Leukemia*, 2004. **18**(10): S. 1630-6.
45. Bio-Rad Laboratories Inc.: *Droplet Digital PCR: Applications Guide*. Bulletin 6407 Rev A, [besucht am 2017/07/02]. Abger. unter: [https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6407.pdf](https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf).
  46. Corbisier, P., Pinheiro, L., Mazoua, S., Kortekaas, A.M., Chung, P.Y., Gerganova, T., Roebben, G., Emons, H. and Emslie, K.: *DNA copy number concentration measured by digital and droplet digital quantitative PCR using certified reference materials*. *Anal Bioanal Chem*, 2015. **407**(7): S. 1831-40.
  47. Huggett, J.F., Cowen, S. and Foy, C.A.: *Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool*. *Clin Chem*, 2015. **61**(1): S. 79-88.
  48. Altman, D.G. and Bland, J.M.: *Measurement in Medicine - the Analysis of Method Comparison Studies*. *Journal of the Royal Statistical Society Series D-the Statistician*, 1983. **32**(3): S. 307-317.
  49. Della Starza, I., Nunes, V., Lovisa, F., Silvestri, D., Cavalli, M., Garofalo, A., Campeggio, M., De Novi, L.A., Soscia, R., Oggioni, C., Mussolin, L., Biondi, A., Guarini, A., Valsecchi, M.G., Conter, V., Biffi, A., Basso, G., Foa, R. and Cazzaniga, G.: *Droplet Digital PCR Improves IG-/TR-based MRD Risk Definition in Childhood B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Hemasphere*, 2021. **5**(3): S. e543.
  50. Denys, B., van der Sluijs-Gelling, A.J., Homburg, C., van der Schoot, C.E., de Haas, V., Philippe, J., Pieters, R., van Dongen, J.J. and van der Velden, V.H.: *Improved flow cytometric detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2013. **27**(3): S. 635-41.
  51. Gaipa, G., Cazzaniga, G., Valsecchi, M.G., Panzer-Grumayer, R., Buldini, B., Silvestri, D., Karawajew, L., Maglia, O., Ratei, R., Benetello, A., Sala, S., Schumich, A., Schrauder, A., Villa, T., Veltroni, M., Ludwig, W.D., Conter, V., Schrappe, M., Biondi, A., Dworzak, M.N. and Basso, G.: *Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2012. **97**(10): S. 1582-93.
  52. Garand, R., Beldjord, K., Cave, H., Fossat, C., Arnoux, I., Asnafi, V., Bertrand, Y., Boulland, M.L., Brouzes, C., Clappier, E., Delabesse, E., Fest, T., Garnache-Ottou, F., Hugué, F., Jacob, M.C., Kuhlein, E., Marty-Gres, S., Plesa, A., Robillard, N., Roussel, M., Tkaczuk, J., Dombret, H., Macintyre, E., Ifrah, N., Bene, M.C. and Baruchel, A.: *Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL*. *Leukemia*, 2013. **27**(2): S. 370-6.
  53. Irving, J., Jesson, J., Virgo, P., Case, M., Minto, L., Eyre, L., Noel, N., Johansson, U., Macey, M., Knotts, L., Helliwell, M., Davies, P., Whitby, L., Barnett, D., Hancock, J., Goulden, N., Lawson, S., Group, U.F.M. and Group, U.M.s.: *Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting*. *Haematologica*, 2009. **94**(6): S. 870-4.
  54. Neale, G.A., Coustan-Smith, E., Stow, P., Pan, Q., Chen, X., Pui, C.H. and Campana, D.: *Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2004. **18**(5): S. 934-8.

55. Campana, D., Neale, G.A., Coustan-Smith, E. and Pui, C.H.: *Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: the St Jude experience*. *Leukemia*, 2001. **15**(2): S. 278-9.
56. Coustan-Smith, E., Gajjar, A., Hijjiya, N., Razzouk, B.I., Ribeiro, R.C., Rivera, G.K., Rubnitz, J.E., Sandlund, J.T., Andreansky, M., Hancock, M.L., Pui, C.H. and Campana, D.: *Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia after first relapse*. *Leukemia*, 2004. **18**(3): S. 499-504.
57. Witte, A.K., Mester, P., Fister, S., Witte, M., Schoder, D. and Rossmannith, P.: *A Systematic Investigation of Parameters Influencing Droplet Rain in the Listeria monocytogenes prfA Assay - Reduction of Ambiguous Results in ddPCR*. *PLoS One*, 2016. **11**(12): S. e0168179.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Claudia Schwinghammer-Gantert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Droplet Digital PCR zur Quantifizierung der minimalen Resterkrankung (MRD) bei der Akuten Lymphoblastischen Leukämie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Claudia Schwinghammer-Gantert hatte folgenden Anteil an der nachstehenden Publikation:

Schwinghammer C, Koopmann J, Chitadze G, Karawajew L, Bruggemann M, Eckert C: A New View on Minimal Residual Disease Quantification in Acute Lymphoblastic Leukemia using Droplet Digital PCR. *J Mol Diagn* 2022, 24:856-866.

*Journal Impact Factor* (2020): 5.568

### Beitrag im Einzelnen:

- Quantifizierung aller MRD-Messungen der pädiatrischen Kohorte mittels ddPCR, dies beinhaltete: die Vorbereitung (Probenauswahl, Erstellen der Protokolle, Pipettieren der Reaktionsansätze und Verdünnungsreihen), Durchführung der ddPCR-Messungen (Tröpfchen generieren, PCR-Reaktion, Auslesen der Proben) und die Auswertung der ddPCR-Analysen (gemäß den erstellten Auswertungs- und Interpretationskriterien), die ddPCR- und qPCR-Analysen der adulten Kohorte wurden in Kiel in Kooperation mit dem Universitätshospital Schleswig-Holstein gemessen, allein die Rohdaten wurden zur Verfügung gestellt
- Intra- und Inter-Assay Validierungsversuche der ddPCR, dies beinhaltete: die Vorbereitung (Probenauswahl, Erstellen der Protokolle, Pipettieren der Reaktionsansätze und Verdünnungsreihen), die Durchführung der ddPCR-Messungen (Tröpfchen generieren, PCR-Reaktion, Auslesen der Proben) und die Auswertung der ddPCR-Analysen gemäß den erstellten Auswertungs- und Interpretationskriterien)
- Führung an der Ausarbeitung von Auswertungs- und Interpretationskriterien der ddPCR-Messmethode, detaillierte Niederschrift der finalen Kriterien als Leitfaden zur ddPCR-Analyse, anschließende Auswertung der ddPCR-Analysen (Messergebnisse aus der pädiatrischen und adulten Kohorte, Intra- und Inter-Assay Validierungsversuche)
- Zusammenstellung der ddPCR-Analysen und Vergleich dieser mit den Ergebnissen der qPCR (pädiatrische und adulte Kohorte)

- 
- Vollständige statistische Auswertung (Auswertungskonzept, Durchführung und Interpretation) der Messergebnisse aus der pädiatrischen sowie adulten Kohorte und aus den Intra- und Inter-Assay Validierungsversuchen, Ausnahme: statistische Auswertung des Abgleichs der PCR-basierten Methoden mit der Flow
  - Erstellung von allen Abbildungen (Abb. 1-5) , Tabellen (Tab. 1-4) und des Supplements (Supp. 1-5) der Publikation, Ausnahme: „Table 5“, S. 863, der dazugehörigen Publikation
  - Ausarbeitung (Grundgerüst, Kapitelstruktur) und Niederschrift der Publikation, Ausnahme: Abschnitt der Publikation: „Results“, Unterabschnitt: „Comparison of MRD by ddPCR and qPCR with Flow MRD: Better Concordance between Flow and ddPCR“, S. 862
  - Führung des Überarbeitungsprozesses bis zum Einreichen der finalen Version der Publikation und die Bearbeitung nach dem Reviewprozess

---

Unterschrift der Doktorandin

## Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"PATHOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 77 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease	6,874	23.472	0.007930
2	ACTA NEUROPATHOLOGICA	28,031	17.088	0.036970
3	Seminars in Immunopathology	5,651	9.623	0.009960
4	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	4,791	8.090	0.004640
5	JOURNAL OF PATHOLOGY	22,441	7.996	0.017610
6	MODERN PATHOLOGY	18,699	7.842	0.021190
7	CELLULAR ONCOLOGY	2,462	6.730	0.002430
8	BRAIN PATHOLOGY	6,559	6.508	0.006220
9	AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY	26,272	6.394	0.020620
10	Disease Models & Mechanisms	8,412	5.758	0.012590
11	LABORATORY INVESTIGATION	12,539	5.662	0.008240
12	Journal of Pathology Clinical Research	685	5.638	0.001970
13	JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS	5,407	5.568	0.009650
14	ARCHIVES OF PATHOLOGY & LABORATORY MEDICINE	13,569	5.534	0.013270
15	PATHOLOGY	4,251	5.306	0.005340
16	CANCER CYTOPATHOLOGY	3,904	5.284	0.004350
17	EXPERT REVIEW OF MOLECULAR DIAGNOSTICS	3,943	5.225	0.005610
18	HISTOPATHOLOGY	13,171	5.087	0.012900
19	HLA	1,447	4.513	0.001740
20	PATHOBIOLOGY	1,415	4.342	0.001410

## Druckexemplar der Publikation

Anbei finden Sie ein Druckexemplar der folgenden Publikation:

Schwinghammer, C., Koopmann, J., Chitadze, G., Karawajew, L., Bruggemann, M. and Eckert, C.: *A New View on Minimal Residual Disease Quantification in Acute Lymphoblastic Leukemia using Droplet Digital PCR*. J Mol Diagn, 2022. **24**(8): S. 856-866.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.04.013>

*Journal Impact Factor* (2020): 5.568



## **Curriculum vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Komplette Publikationsliste

- I. Schwinghammer, C., Koopmann, J., Chitadze, G., Karawajew, L., Bruggemann, M. and Eckert, C.: *A New View on Minimal Residual Disease Quantification in Acute Lymphoblastic Leukemia using Droplet Digital PCR*. *J Mol Diagn*, 2022. **24**(8): S. 856-866.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.04.013>  
*Journal Impact Factor* (2020): 5.568

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Privatdozentin Dr. Cornelia Eckert, bedanken, die mir nicht nur dieses hochinteressante Thema überließ, sondern auch mit Ihrer warmherzigen Art jede Phase dieser Arbeit intensiv und professionell begleitete. Besonders möchte ich mich für die eingeräumte Freizeit bedanken, in der Sie stets mit kompetentem Rat mir zur Seite stand, was maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Weiterhin gebührt den Molekulargenetikerinnen und immunologischen Labortechnikerinnen Susanne Pawlik, Grit Czerwony, Marion Fillies, Claudia Hanel, Ute Schwiem und Anke Schaubitzer großen Dank. Sie nahmen mich freundschaftlich in Ihr Team auf und arbeiteten mich mit großer Hingabe in die Laborarbeiten ein. Bei Fragen standen Sie mir jeder Zeit unterstützend zur Seite.

Meinen unaussprechlich großen Dank möchte ich jedoch an meinen Bruder, Christian Schwinghammer, richten. Es bedeutete mir unbeschreiblich viel, dass er zu jeder Zeit bereit war, mir umfängliche Tipps und Hilfestellungen zu leisten. Ohne seinen Rat und seine unermüdliche Hilfe mit detaillierter Präzision in Wort und Tat wäre diese Dissertation so nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir in jeder Lebensphase liebevoll zur Seite stehen. Für ihre vielseitige Unterstützung und ihre Bereitschaft dafür alles zu geben bin ich unheimlich dankbar.

An letzter, doch eigentlich an erster Stelle möchte ich mich bei meinem Ehemann, Jens-Christian Gantert, bedanken. Seine ausgezeichnete Unterstützung gerade in technischen Fragen dieser Arbeit führten stets zu anregenden Diskussionen. Bei dieser Gelegenheit muss ich mich für seine zahlreichen Tipps zur Erstellung und Bearbeitung von Graphiken und Abbildungen am Computer bedanken, die die Fertigstellung der Dissertation unendlich erleichtert haben. Doch vornehmlich bin ich für sein geduldiges Zuhören, seine Rücksichtnahme, seine uneingeschränkten Aufmunterungen und nicht zuletzt für seine vielen Umarmungen gerade in der schwierigen Endphase dieser Dissertation unheimlich dankbar.