

**PROGNOSTISCHE WAARDE VAN UITGEBREIDE
KARYOTYPERING MIDDELS COPY NUMBER VARIATION
(CNV) SEQUENCING BIJ NIEUW VASTGESTELD
MULTIPEL MYELOOM**

Koen Maes
00806029

Promotor 1: Prof. dr. F. Offner
Promotor 2: Prof. dr. J. Philippé

Masterproef master in de specialistische geneeskunde

Academiejaar: 2020 – 2021

Inhoudsopgave

Overzicht van weergegeven figuren	1
Introductie	2
Epidemiologie	2
Diagnose en evolutie uit premaligne stadia	2
Stadiëring en risicoclassificatie	5
Een overzicht van de genetische kennis bij myeloom	6
Toegepaste technieken voor genomanalyse	7
Germline events	9
Initiërende of primaire events	9
Secundaire events	10
Behandeling van multipel myeloom	11
Kader	15
Doelstellingen	17
Methoden	18
Samenstelling van de databank	18
Analyse	19
Resultaten	21
Overzicht databank	21
Overzicht van meest voorkomende CNV	22
Correlatie CNV profiel met CRAB criteria	24
Correlatie CNV profiel met type paraproteïne	25
Correlatie CNV profiel met R-ISS risicoclassificatie	26
Discussie	27
Conclusie en prospectieven	30
Referenties	31
Appendix 1: supplementaire figuren	36

Overzicht van weergegeven tabellen

Tabel 1: diagnostische criteria voor MGUS, smouldering multipel myeloom en multipel myeloom volgens de international myeloma working group (IMWG)

Tabel 2: Salmon-Durie criteria

Tabel 3: International Staging System (ISS) classificatie

Tabel 4: Revised-ISS classificatie

Tabel 5: Tranlocaties met betrokkenheid van chromosoomlocus 14q32.33, aangeduid als primair event bij ontstaan van multipel myeloom.

Tabel 6: Copy number variants (CNV) van chromosoomarmen, hun frequentie bij MM en hun prognostische invloed

Tabel 7: beschikbare klassen en molecules voor behandeling van multipel myeloom

Tabel 8: samenstelling van de databank wat betreft demografie, ziektekenmerken en klassieke cytogenetische kenmerken

Overzicht van weergegeven figuren

Figuur 1: Model voor myelomagenese

Figuur 2: Overzicht van het principe van shotgun sequencing

Figuur 3: Voorbeeld van de gehanteerde methodologie

Figuur 4: Voorbeeld van een ROC curve en AUC berekening

Figuur 5: Importance model voor het onderscheid tussen normaal en abnormaal karyotype

Figuur 6: Correlatie met nierinsufficiëntie

Figuur 7: Correlatie met type zware keten

Figuur 8: Correlatie met type lichte keten

Figuur 9: Correlatie met R-ISS I versus III classificatie

Figuur 10: Correlatie met R-ISS I versus II classificatie

Introductie

Epidemiologie

Multipel myeloom (MM) is een klonale B-cel neoplasie welke voortkomt uit terminaal gedifferentieerde plasmacellen (1). Het is de tweede meest voorkomende hematologische maligniteit na non-hodgkin lymfoom, en is verantwoordelijk voor 1% van de globale kankerdiagnoses en 10% van de hematologische maligniteiten (1,2). De incidentie van multipel myeloom in 2018 was 3,3-4,0 per 100.000 per jaar in Europa, met een mortaliteit van 1.7-1.8/100.000/jaar (2). De mediane leeftijd bij diagnose is 69 jaar (2).

Diagnose en evolutie uit premaligne stadia

Multipel myeloom bevindt zich in een spectrum van plasmacel neoplasie (of plasmaceldyscrasie) waarbij verondersteld wordt dat het consequent voorafgegaan wordt door een premaligne fase, geduid als monoclonale gammopathie van ongekend belang of *monoclonal gammopathy of unknown significance* (MGUS) (3).

Er is sprake van MGUS indien een monoclonaal immunoglobuline (Ig), het M proteïne, kan worden gedetecteerd in het serum of in de urine. De gehanteerde detectiemethodes zijn serum eiwit elektroforese voor screening, gevolgd door serum immunofixatie ter confirmatie en typering van de betrokken zware (IgG-IgA-IgM) en lichte ketens (Kappa-Lambda). Ongeveer 80% van de vastgestelde MM is afkomstig van non-IgM zware keten MGUS en 20% van lichte keten MGUS. In zeldzame gevallen is er sprake van een niet-secretoire ziekte, waarbij eenzelfde premaligne fase verondersteld wordt maar deze niet kan worden opgespoord met bovenstaande technieken. Het aandeel van niet-secretoire ziekte in multipel myeloom wordt geschat op 3% van de diagnoses (4). Het concept MGUS is ook breder dan enkel een voorstadium van MM. Naast progressie naar MM kan een MGUS immers ook evolueren naar een andere mature B-cel neoplasie als een chronische lymfatische leukemie (CLL), marginale zone lymfoom (MZL), lymfoplasmocytair lymfoom (ziekte van Waldenström, MW) of andere lymfoproliferatieve aandoening (5). Hierbij kan het type zware keten ook een aanknopingspunt vormen. Zo zal een IgM MGUS preferentieel evolueren naar een MW en een IgA MGUS preferentieel naar een MM (5,6).

De diagnose van een multipel myeloom wordt gesteld door het onderscheiden van myeloomgerelateerde eindorgaanschade of zogenaamde *myeloma defining events* (3,5). Een populair mnemotechnisch middel hiervoor is CRAB, bestaand uit *Calcemia, Renal failure,*

Anemia en Bone lesions. Deze zijn klassiek opgenomen in de diagnostische criteria (cf. tabel 1); ze ontstaan als consequentie van de groei van plasmacellen in het bot/beenmerg, dan wel de overmaat aan maligne M-proteïne. In een poging om een subset van patiënten te definiëren met hoog risico op eindorgaanschade op korte termijn en aldus vroegtijdig in te grijpen, werden in de recent geupdate criteria drie biomerkers van maligniteit toegevoegd. De eerste is een beenmerg plasmacelpercentage van 60%, bekomen via beenmergaspiraat of botbiopsie, toegevoegd aan de richtlijnen in 2011. De tweede is een ratio tussen betrokken en niet-betrokken serum vrije lichte ketens (*free light chain*) boven de 100, toegevoegd in 2014. Ten slotte werd ook de vondst van meer dan 1 focaal letsel (> 5 mm) op MRI studies geïncorporeerd in 2014. De gehanteerde drempels voor deze biomerkers zijn dat ze een progressie naar eindorgaanschade van 80% over 2 jaar voorspellen, en dus volgens de auteurs behandeling kunnen wettigen alvorens concreet gedocumenteerde orgaanschade (5).

Bij sommige patiënten wordt een interim stadium van ‘smeulend’ of *smouldering* multipel myeloom (SMM) gedefinieerd waarbij er sprake is van een hoog M-proteïne in bloed of urine en/of een plasmacelpercentage van 10 tot 60% in het beenmerg, maar verder afwezigheid van myeloomgerelateerde orgaanschade of bovenvermelde biomerkers. Buiten de experimentele setting is tot op heden enkel behandeling geadviseerd wanneer aan de criteria voor MM wordt voldaan. Vaststelling en onderscheid van de premaligne stadia SMM en MGUS heeft dus enkel prognostisch belang gezien de progressiekans ongeveer 1% per patiënt per jaar bedraagt voor een MGUS versus 10% per patiënt per jaar de eerste vijf jaar voor SMM (3,5).

Hoewel volgens huidige richtlijnen dus enkel waakzame follow-up van MGUS en SMM wordt aangeraden, dient te worden vermeld dat deze niet steeds asymptomatisch verlopen. Zij kunnen tal van auto-immuun fenomenen of depositieziektes met zich meebrengen, welke ook responderen op therapie gericht tegen de verantwoordelijke lymfoplasmocyttaire cellijn (6,7). Deze ziektes, waartoe o.a. AL amyloidose, POEMS syndroom (*Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, M-protein and Skin changes*) en MGRS (*monoclonal gammopathy of renal significance*) behoren, vallen buiten de scope van deze thesis (7).

Een solitair plasmocytoom, waarbij een gelokaliseerde groei van plasmacellen opgemerkt wordt door zijn massa-effect zonder beenmerginvasie of voldane MM criteria, wordt hier ook buiten beschouwing gelaten. Hierbij wordt de voorkeur gegeven aan lokale radiotherapie. Wel dient vermeld te worden dat 2 op 3 van deze patiënten een MM ontwikkelen na 10 jaar follow up. Indien door middel van sensitieve multichannel flowcytometrie beenmerginvasie kan

worden aangetoond bedraagt dit aantal zelfs 50% na slechts 2 jaar opvolging zoals aangetoond door Paiva et al. (8).

De evolutie van een normale cel naar een kankercel is een proces in meerdere fasen, dat voor multipel myeloom beter begrepen is dan voor de meeste maligniteiten omwille van het bestaan van bovengenoemde, goed gedefinieerde premaligne stadia. De genetische basis voor deze transformatie wordt verder besproken (3,9).

Definitie van MGUS:

- Serum monoklonaal proteïne (non IgM) < 30 g/l
- Klonaal beenmergplasmacelpercentage < 10%
- Afwezigheid van eindorgaanschade of biomerkers van maligniteit of AL amyloidose

Definitie van smouldering multipel myeloom

Beide criteria dienen voldaan te zijn::

- Serum M proteïne (IgG or IgA) ≥ 30 g/l of urinair M proteïne ≥ 500 mg per 24 h en/of klonaal beenmerg plasmacel gehalte van 10–60%
- Afwezigheid van bovenstaande MM definiërende criteria of AL amyloidose

Definitie van multipel myeloom

Klonale beenmerg plasmacellen $\geq 10\%$ of biptisch bewezen bot- of extramedullaire plasmocytoom, aangevuld door 1 of meerdere van de volgende myeloma defining events of maligne biomerkers:

Myeloma defining events: bewijs van eindorgaanschade, toegeschreven aan de onderliggende plasmacelproliferatie, waartoe behoren:

- Hypercalcemie: serum calcium $> 0,25$ mmol/l (>1 mg/dl) hoger dan de gestelde bovenste limiet of $>2,75$ mmol/l (>11 mg/dl)
- Nierinsufficiëntie: creatinineklaring < 40 ml per min of serum creatinine >177 μ mol/l (>2 mg/dl)
- Anemie: hemoglobinegehalte > 2 g/dl onder de gestelde onderste limiet of een hemoglobinegehalte <10 g/dl
- Botletsels: 1 of meerdere osteolytische letsels op skeletale radiografie, CT of PET-CT

Biomerkers van maligniteit:

- Klonaal beenmerg plasmacelpercentage $\geq 60\%$
- Betrokken/niet betrokken serum vrije lichte keten verhouding ≥ 100
- >1 focale letsels op MRI studies

Tabel 1: diagnostische criteria voor MGUS, smouldering multipel myeloom en multipel myeloom volgens de international myeloma working group (IMWG). (5)

Stadiëring en risicoclassificatie

Het verloop van multipel myeloom bij verscheidene patiënten is sterk heterogeen met variabele duur van respons op behandeling (10). Om een inschatting van de prognose te maken werden tal van uni- en multivariate analyses verricht met opstellen van prognostische modellen. Een eerste courant gebruikte classificatie was deze volgens Salmon en Durie (tabel 2), welke het niveau en type monoklonaal proteïne, hemoglobine, serum calcium en aantal botletsels op klassieke radiografie includeert. Dit systeem was instinctief, want gebaseerd op het bestaan van CRAB eindorgaanschade. Een belangrijk nadeel van dit systeem was de interobserver variabiliteit bij inschatting van de botaantasting (11).

Salmon-Durie	Stage I	Stage II	Stage III
	Alle onderstaande criteria	1 of meer van onderstaande criteria	1 of meer van onderstaande criteria
Hemoglobine	> 10 g/dl	8,5-10 g/dl	< 8,5 g/dl
Calcium	< 3 mmol/l	3 mmol/l	> 3 mmol/l
M-proteïne			
- IgA	< 30 g/l	30-50 g/l	> 50 g/l
- IgG	< 50 g/l	50-70 g/l	> 70 g/l
Urine lichte keten	< 4 g/24h	4-12 g/24h	> 12 g/24h
Bot RX	Normale botstructuur	Mineure botletsels	Gevorderde botletsels
Creatinine subclassificatie		Stadium A (serum creatinine < 2 mg/dl) Stadium B (serum creatinine > 2 mg/dl)	

Tabel 2: Salmon-Durie criteria (11)

In 2005 werd door Greipp et al. het *International Staging System (ISS)* geformuleerd, dat zich baseerde op de integratie van twee biochemische merkers welke univariaat als belangrijke prognostische factoren werden aangeduid: het serum albumine en het β_2 -microglobuline. Er werden drie categorieën gedifferentieerd waarbij respectievelijk een mediane algemene overleving (mOS) van 62 maanden in ISS I, 44 maanden in ISS II en 29 maanden in ISS III werd onderscheiden, zie tabel 3 (11).

ISS	Stage I	Stage II	Stage III
	Beide voldaan	1 of meer	
Serum β_2 -microglobuline	<3,5 mg/dl	3,5 – 5,5 mg/dl	\geq 5,5 mg/dl
Serum albumine	\geq 3,5 g/dl	< 3,5 g/dl	

Tabel 3: International Staging System (ISS) classificatie (11)

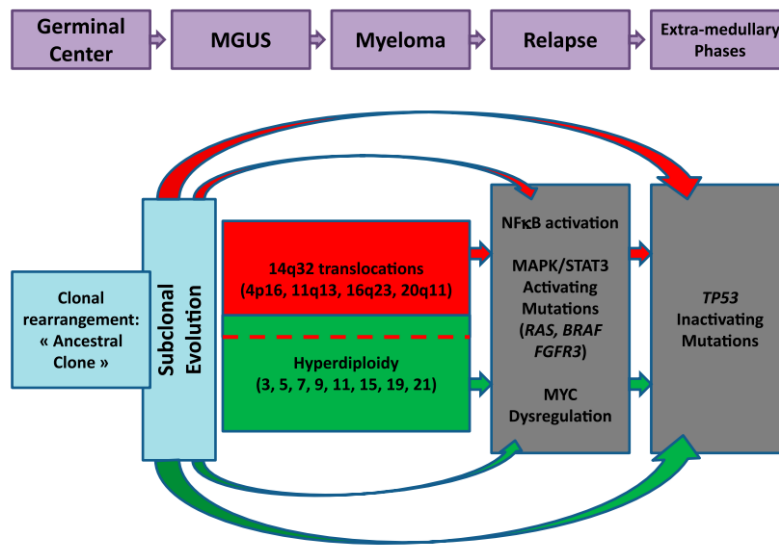
In 2015 werd hieraan het serum lactaat dehydrogenase (LDH) toegevoegd en drie prognostisch ongunstige cytogenetische afwijkingen, vastgesteld via interfase fluorescent in situ hybridisatie (iFISH) na CD138 plasma cell purificatie: translocatie (4;14), translocatie (14;16) en deletie 17p. In dit *Revised International Staging System* (R-ISS) werden in de drie categorieën respectievelijk een mOS onderscheiden welke in R-ISS I niet bereikt was na 72 maand follow-up, 83 maand in R-ISS II en 43 maand in R-ISS III (12). In diezelfde validatiecohortte vond men respectievelijke mOS die niet bereikt was in ISS I, 87 maand in ISS II en 56 maand in ISS III. Het uitgesproken verschil in overleving volgens ISS t.a.v. de oorspronkelijke ISS cohortte werden uiteraard toegeschreven aan introductie van *novel agents* na 2005, zie verder (12).

R-ISS	Stage I	Stage II	Stage III
	Alle criteria voldaan		
ISS	I	II	III + 1 van onderstaande
Serum LDH	normaal		Verhoogd
Cytogenetica (iFISH)	Standaard risico		Hoog risico

Tabel 4: Revised-ISS classificatie. ISS wordt berekend volgens methode in tabel x. Hoog risico wordt gedefinieerd als: t(4;14), t(14,16) of del 17p. Hoog LDH wordt gedefinieerd als serum LDH > bovenste limiet.

Een overzicht van de genetische kennis bij myeloom

Multipel myeloom is een genetisch complexe en heterogene ziekte ten gevolge van een variëteit aan genomische events die aan de basis liggen van de ontwikkeling en progressie van de aandoening. Zoals eerder aangehaald vormt MM een unieke opportuniteit om de hiërarchie en sequentie van deze events in kaart te brengen dankzij het bestaan van de goed gedefinieerde premaligne stadia MGUS en SMM. Zodoende ontstaat er een myelomagenese model dat zowel de heterogeniteit als klonale evolutie verklaart, zie fig. 1 (9,13).



Figuur 1: Model voor myelomagenese waarin verschillende stadia aan bod komen alsook voornaamste genetische events. Dit begint bij het bestaan van voorbeschikkende genetica in de “ancestral clone”. Het primair genetisch event (hyperdiploidie of een 14q32 translocatie) kondigt het ontstaan van een MGUS aan, waarna verdere secundaire wijzigingen klonale selectie en evolutie naar een meer agressieve ziekte mogelijk maken. Mutaties in TP53 of genomische events in diens locus op 17p kondigen vaak extramedullaire ziekte en therapieresistentie aan. Figuur overgenomen uit Corre et al (14).

De sequentie van genomische aberraties begint bij vooraf bestaande aangeboren *germline* mutaties die een aangeboren predispositie voor de ziekte uitmaken. Vervolgens zijn er vroege, verworven events die de eerste aanzet geven naar een abnormale kloon: het zogenaamde primair of initiërend event. Vanaf dat moment treden verdere secundaire aberraties op die tot klonale evolutie en diversiteit bijdragen en zodoende tot ziekteprogressie en uiteindelijk ook therapieresistentie (9). Mutaties die worden aangetroffen in het MGUS stadium zijn dus meer waarschijnlijk initiërende of voorbestemmende mutaties, terwijl mutaties in MM stadium die nog niet gevonden werden in MGUS veronderstelde secundaire events zijn.

Toegepaste technieken voor genomanalyse

Conventionele karyotypering: een techniek waarvoor eerst de cellen uit het beenmerg of perifeer bloed in cultuur gebracht worden mits stimulatie met onder andere interleukine-6. Vervolgens worden de cellen gefixeerd in de metafase, waarna kleuringen aangebracht worden op de chromosomen (zogenaamde G-banding). De resultante is een patroon, waarbij de lichtere banden duiden op coderende stukken DNA en donkere banden op non-coding DNA. De chromosomen worden voor de visuele inschatting gepaard volgens grootte en vorm om 22 paar

autosomen te krijgen en 1 paar geslachtschromosomen. Hierop kunnen vervolgens numerieke afwijkingen herkend worden of grote deleties, duplicaties of translocaties (15).

Bij multiple myeloom wordt in ongeveer 25-30% van de patiënten een afwijkend karyotype beschreven. Belangrijke nadelen van deze techniek zijn de beperkte resolutie (enkel afwijkingen ≥ 5 Mb worden opgemerkt), operator dependentie en het missen van gebalanceerde translocaties (15,16). Bovendien is viabel weefsel noodzakelijk dat in kweek kan gezet worden.

Fluorescentie in situ hybridisatie (FISH): Bij deze techniek wordt het DNA van de targetcel gedenuceerd en vervolgens gehybridiseerd met een fluorescent gelabelde DNA probe, gericht tegen een specifieke chromosomale regio. Het betreft geen overzichtsonderzoek van het genoom, maar is geschikt om met hoge gevoeligheid recurrente translocaties of grote copy number alteraties aan te tonen. Bij multiple myeloom is het een standaard aanvulling aan karyotypering om bijvoorbeeld de 14q32.33 translocaties in beeld te brengen. Een voordeel is dat het kan uitgevoerd worden op cellen in interfase, waardoor geen celdeling noodzakelijk is. Een belangrijke beperking is de nood aan *cell sorting* omdat er vaak een relatief laag plasmacelaantal aanwezig is in het beenmerg. De plasmacellen worden op basis van CD138 expressie gesorteerd. De resolutie bedraagt ongeveer 1 Mbp (16).

Copy Number Variant (CNV) sequencing: uitbreiding op de conventionele karyotypering voor het opsporen van kleinere deleties of duplicaties. Cfr methoden.

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) mapping arrays: Om single nucleotide polymorfismen in te schatten qua frequentie en correlatie met een bepaalde aandoening werden technieken voor *whole genome association studies* (GWAS) ontwikkeld. De SNP array maakt gebruik van een DNA microarray, een chip waarop alle specifieke oligonucleotiden (ongeveer 20 bp lang) zijn geïmmobiliseerd op een hard oppervlak. Hieraan wordt fluorescent gelabeld DNA van de targetcellen toegevoegd. Daarna volgt denaturatie, hybridisatie en wegwassen van ongehybridiseerd materiaal, gelijkaardig aan de bovenbeschreven FISH techniek. Door middel van een geautomatiseerde detectiemicroscopie kan nagegaan worden welke oligonucleotiden gehybridiseerd zijn. Toepassing van deze techniek is duur en uitdagend op vlak van bio-informatica. Gezien de sterk wisselende frequentie van de SNP in de algehele populatie en wisselende -doch doorgaans lage- samenhang met ziekterisico is deze test minder geschikt voor klinische toepassing.

Germline events

Germline genetische informatie helpt om de waarschijnlijkheid op het ontwikkelen van kanker in te schatten, maar met een relatieve bijdrage die bij verschillende kankers sterk verschilt. Eerstegraads verwanten van een patiënt met MM hebben een 2- tot 4-voudig verhoogd relatief risico om zelf MM te ontwikkelen, wat een eerder sterke genetische predispositie doet vermoeden (17). Om dit verder in kaart te brengen werden genome-wide association studies (GWAS) opgezet die op grote schaal SNP vergeleken tussen gezonde controles en patiënten met MM. Deze studies ontdekten zeven genetische loci waarin SNP geassocieerd waren met een verhoogde odds ratio (OR) voor ontwikkeling van MM. Collectief gezien verklaren ze naar schatting 13% van de familiale voorbeschikking voor MM (18,19). Kort daarna werden deze zeven loci ook in verband gebracht met MGUS, wat logischerwijs hun rol als vooraf bestaande factor ondersteunt (20). De functionele rol van deze kandidaat genen is nog niet opgeklaard (9).

Initiërende of primaire events

De primaire genetische events worden opgedeeld in hyperdiploide (HRD) en non-hyperdiploide (non-HRD) subtypes. Bij HRD ziekte wordt typisch een aantal chromosomen tussen de 48 en 74 gezien met trisomie van hoofdzakelijk de chromosomen 3-5-7-9-11-15-19 en 21. Non-HRD ziekte wordt dan weer gekenmerkt door translocaties met betrokkenheid van de korte arm van chromosoom 14, zoals bij t(4;14), t(6;14), t(11;14), t(14;16) en t(14;20) (9,21).

Aan de basis voor het ontstaan van de **chromosomale translocaties** liggen de somatische hypermutatie en klasse switch recombinitie, twee belangrijke processen in de B-cel ontwikkeling in de kiemcentra. Voor beide is de expressie van *single stranded DNA cytosine deaminase* (AICDA of AID genoemd) noodzakelijk, alsook het veroorzaken van breuken in het dubbelstrengig DNA in de regio die voor IgH (*Immunoglobulin Heavy Chain*) codeert; dit creeërt de omstandigheden waarin foute recombinitie kan ontstaan. In 90% van de gevallen ontstaat een translocatie van chromosoom 14, meer bepaald op de IgH locus op 14q32.33. Gezien het IGH gen in een normale plasmacel één van de meest actief overgeschreven genen is, zal bij een translocatie het deelnemend gen onder controle van de IgH *enhancer* sterk geactiveerd worden. In bovenvernoemde translocaties zijn dit oncogenen, die bij actieve transcriptie een selectief overlevingsvoordeel opleveren voor de gemuteerde kloon. Ze hebben vermoedelijk alle een ontregeling van cycline D expressie en dus de celcyclus gemeen, zie tabel 5 voor een overzicht (9,14). De translocaties t(4;14), t(14;16) en t(14;20) worden in verband gebracht met een ongunstige prognose, zoals aangegeven in de R-ISS risicoclassificatie (12,13).

Translocatie	Frequentie	Betrokken oncogen
t(4;14)(p16;q32)	12-15% NDMM, gecorreleerd met IgA isotype	Overexpressie fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) Overexpressie multiple myeloma SET (MMSET/WHSC1)
t(6;14)(p21;q32)	0,8% NDMM	Overexpressie Cyclin D3 (CCND3)
t(11;14)(q13;q32)	15-20% NDMM, gecorreleerd met lambda lichte keten en AL amyloidose	Overexpressie Cyclin D1 (CCND1)
t(14;16)(q32;q23)	Zeldzaam, gecorreleerd met plasmacel leukemie	Overexpressie Cyclin D2 (CCND2)
t(14;20)(q32;q21)	Zeldzaam	Overexpressie MAFB en downstream Cyclin D2 (CCND2)

Tabel 5: Translocaties met betrokkenheid van chromosoomlocus 14q32.33, aangeduid als primair event bij ontstaan van multipel myeloom. NDMM: *newly diagnosed multiple myeloma* (14).

Hyperdiploidie is aanwezig bij naar schatting 50% van de mensen met MGUS, SMM of MM. Het ontstaan van deze drastische veranderingen in het genoom is nog niet volledig begrepen. Men vermoedt dat eerder dan het cumulatief verwerven van deze trisomieën, één catastrofaal mitotisch event aan de basis ligt van het sterk afwijkend karyotype. Slechts een klein aantal HRD ziektes hebben een gelijktijdige primaire translocatie van IGH, al kan dit wel bij verdere klonale evolutie ontstaan. Hoe de hyperdiploidie bijdraagt tot de tumorigenese is ook minder goed begrepen dan bij de translocaties. Mogelijk resulteert de chromosoomovermaat in een overexpressie van proliferatie geassocieerde genen of in aberrante expressie van genen van onder andere de NF-κB signalisatie (9). Een hyperdiploïd karyotype wordt geassocieerd met een betere prognose dan een non-HRM afwijking, maar impliceert wel een slechtere prognose dan een normaal karyotype (13).

Secundaire events

Secundaire events worden minder frequent aangetroffen bij premaligne stadia. Ze veroorzaken een overlevingsvoordeel voor een specifieke subkloon over de ganse populatie plasmacellen en spelen een rol in de tumor progressie. Het betreffen vaak *copy number variaties* (CNV), translocaties met betrokkenheid van het MYC gen of somatische mutaties in de MAPK, NF-κB en DNA herstel pathways (1).

Copy number variaties omschrijven een breed spectrum van genomische aberraties. De term omvat zowel deleties als duplicaties en dit van chromosoomfragmenten tot een ganse chromosoomarm of een gans chromosoom zoals bij HRD MM. Zoals bij SNP kan een CNV zowel een driver als een passenger event zijn (16).

CNV met betrokkenheid van een ganse chromosoomarm wordt frequent beschreven bij MM. De meest frequente chromosoomarm CNV en hun prognostische invloed worden weergegeven in tabel 6.

Chromosoomarm	Frequentie bij MM patiënten	Prognostische invloed
Duplicatie 1q	35-40%	Ongunstig, sterker naarmate meer kopijen van 1q
Deletie 1p	30%	Ongunstig
13q deletie	45-50% (associatie met non-HRD MM) Mogelijk ook rol als primair event	Vermoedelijk ongunstig, maar vertekend door associatie met ongunstige translocaties.
17p deletie	10% bij diagnose, tot 80% in latere stadia	Ongunstige prognose en grotere kans op extramedullaire ziekte

Tabel 6: Copy number variants (CNV) van chromosoomarmen, hun frequentie bij MM en hun prognostische invloed (1).

Kleinere en minder frequente CNV vormen de basis voor dit werk en zullen verder in meer detail ter sprake komen. Van hun prognostische invloed is minder gekend aangezien meer gedetailleerde karyotypering noodzakelijk is om deze op te sporen. Tot op heden wordt in de routine slechts een conventionele karyotypering en iFISH aangeraden ter prognosticatie (4). De reeds beter gekende focale CNV zijn de duplicatie van 8q24.21 (14% van MM patiënten) waarin het MYC gen vervat zit, en de duplicatie van 11q13.2 (15% van MM patiënten) waarin cycline D1 (CCND1) vervat zit. Deletie van 14q32.32 komt voor in 10% en leidt tot betrokkenheid van TRAF3 (TNF receptor associated factor 3), een gen dat bijdraagt tot de NF- κ B pathway (9,22).

Behandeling van multipel myeloom

Sinds het nieuwe millennium werd een revolutie gezien op vlak van nieuwe behandelingsopties voor multipel myeloom. In de eerste plaats werden tal van behandelingen ontwikkeld welke niet langer tot de categorie van cytostatica behoren. Aan deze producten, die zowel tot de categorie van immuunglobulines als small molecules behoren, werd de term *novel agents* gegeven (tabel 7 geeft de beschikbare producten en hun werkingsmechanisme weer). Bovendien wordt steeds diepere remissie gezien bij aanwenden van multimodale therapie o.v.v. zogenaamde *doublets*, *triplets* en zelfs *quadruplets*, doelend op de combinaties van deze agentia. Zodoende bestaat de hedendaagse uitdaging niet zozeer uit welke therapie dient aangewend te worden, maar eerder in welke combinatie en in welke sequentie. Gezien MM tot op heden als ongeneeslijk beschouwd wordt dienen levensduur en *quality of life* (QoL) hierbij in overweging te worden genomen. Op heden wordt druk gezocht naar biomerkers om de

respons op bepaalde agentia in te schatten en zoveel mogelijk therapie op maat van de patiënt en diens ziekte af te stemmen (23).

Een tot op heden belangrijk onderdeel van elke multimodale therapie zijn corticosteroiden. Hun werkingsmechanisme berust op stimulatie van de intracellulaire activatie van de glucocorticoidreceptor en inhibitie van de NF- κ B pathway, leidend tot apoptose van de plasmacel (23).

Verder wordt in verschillende stadia gebruik gemaakt van alkylerende agentia als melfalan en cyclofosfamide. Deze zijn niet celcyclusfase specifiek en veroorzaken cellulaire schade op DNA niveau met apoptose tot gevolg. Sinds de novel agents raakt hun toepassing beperkt tot stamcelmobilisatie en consolidatie o.v.v. autologe stamceltransplantatie. Gezien steeds minder blootstelling aan chemotherapie in vroege therapielijnen worden ze ook steeds vaker aangewend in palliatieve setting (4).

Volgens de huidige standaarden is nog een rol weggelegd voor hoge dosis chemotherapie met stamcelrescue (of kortweg autologe stamceltransplantatie: ASCT) in eerste lijn, waardoor bij diagnose de patiënt moet geëvalueerd worden naar fitheid en zo ingedeeld in de *transplant eligible* of *ineligible* groep. Bij de eerste groep wordt er gestreefd naar een remissie inductie met combinaties van novel agents en consolidatie met ASCT om langdurige controle te verkrijgen. Bij de tweede groep worden de novel agents gecontinueerd tot bij progressie. Voor een overzicht van de huidige standaard van behandeling van MM in eerste en daarop volgende lijnen verwijzen we naar de laatste versie van de gepubliceerde ESMO (*European Society for Medical Oncology*) richtlijnen door Dimopoulos et al (4).

Voor de respons evaluatie in MM verwijzen we eveneens naar de ESMO guidelines van 2021 (4). In recentere trials werd naast de klassieke respons criteria rekening gehouden met minimaal residuele ziekte of *minimal residual disease* (MRD). Middels gebruik van *next-generation DNA sequencing* of *next-generation flowcytometry* wordt getracht om een minimale ziekterest aan te tonen in het beenmerg. Een andere manier om MRD te evalueren is dmv PET-CT beeldvorming. MRD negativiteit, vastgesteld met bovenstaande technieken bij patiënten die een complete respons bereikten is zowel voor hoog risicoziekte als voor de totale populatie consistent gecorreleerd met langere progressievrije overleving (PFS) (4). Derhalve kan het een surrogaat eindpunt zijn voor deze laatste. Dit laat toe om sneller superieure behandelingen te identificeren en te implementeren in de richtlijnen. Een probleem met MRD interpretatie is dat

verschillende studies er verscheidene technieken op nahouden en andere detectiedrempels (vb 1 op 10^5 of 10^6 plasmacellen in het beenmerg). Bij gebrek aan uniformiteit beperkt MRD bepaling zich momenteel tot de context van klinische trials. Klinische strategieën op basis van MRD, met bijvoorbeeld vervroegde therapie-onderbreking bij MRD negatieve status of intensificatie bij uitblijven hiervan, worden momenteel geëvalueerd (4,10).

Niettemin de introductie van de novel agents een grote impact heeft gehad op de gemiddelde overleving van de patiënt met MM, welke nu meer dan 8 jaar bedraagt, blijft het verloop zeer uiteenlopend. Naar schatting 15-20% van de patiënten kent een agressief verloop met een overlijden binnen de drie jaar (24). Binnen de eerder beschreven prognostische scoresystemen kent de cytogenetica de grootste impact op overleving. In bijzonder voor de deletie 17p werd in het laatste decennium nauwelijks vooruitgang geboekt, waardoor voor deze groep de nood aan innovatie het grootst is (13).

In een consensus statement van de International Myeloma Working Group (IMWG) van 2016 werden aanbevelingen geformuleerd voor behandeling van hoog risico patiënten met deletie 17p en t(4;14). Initieel werd de conclusie getrokken dat geen behandelingsstrategie het effect van de nadelige cytogenetica volledig kan overtreffen. Bovendien werd geconcludeerd dat strategieën die sterker werkzaam bleken voor de standaard risico ziekte ook bij hoog risico ziekte een voordeel bieden (24). In bijzonder wordt een inductie met proteasoom inhibitor aangeraden voor alle hoog risico patiënten, met de sterkste evidentie voor bortezomib bij t(4;14). Bovendien wordt een combinatie met lenalidomide aangeraden (13). Vooralsnog wordt net als in de standaard risicopopulatie een ASCT aangeraden als consolidatie van de eerstelijns behandeling (4,13). Globaal is het doel een zo diep mogelijke remissie te bekomen met oog op de langst mogelijke progressievrije overleving.

Het principe van een tandem transplantatie (twee ASCT binnen de 12 weken) heeft geen meerwaarde aangetoond in de standaardpopulatie, maar wordt wel aangeraden in de hoog risico setting (13,25). De aanbeveling is echter gebaseerd op de analyse van verschillende trials met bortezomib gebaseerde inductie en zonder vergelijking met verdere onderhouds- of consolidatiebehandelingen na ASCT. Om aan deze laatste opmerking tegemoet te komen werd de STaMINA trial uitgevoerd, welke na VRD (bortezomib-lenalidomide-dexamethasone) inductie en ASCT de verschillende aanvullende strategieën vergeleek (1. tandem ASCT + lenalidomide (len) maintenance, 2. Single ASCT + 4 cycli VRD consolidatie + len maintenance, 3. Single ASCT + len maintenance). Na drie jaar follow up kon geen verschil in PFS of OS in

de ganse cohorte noch de hoog risico subgroepen aangetoond worden. Een recente 6 jaar follow up analyse suggereerde echter wel een verschil met PFS van respectievelijk 49,4% voor tandem ASCT + len, 39,7% voor single ASCT + VRD + len en 38,6% voor de single ASCT + len ($p=0,015$) (26). Of het voordeel van een tandem transplantatie blijft bestaan in de context van meer potente inductiebehandelingen blijft af te wachten. Recent werd in de FORTE trial onderzocht of een ASCT na een inductie met 4x KRD (carfilzomib = een tweede generatie proteasoom inhibitor-lenalidomide-dexamethasone) en gevolgd door 4x KRD consolidatie nog een voordeel heeft ten aanzien van continueren van KRD tot 12 maand, waarmee dus het principe van een single ASCT wordt uitgedaagd. Hoewel er sprake was van identieke en hoge *response rates* voor beide strategieën (met tot 50% MRD negativiteit bij de hoog risico patiënten), was er een hogere kans op vroeg herval bij de hoog risico patiënten die geen ASCT ontvingen (27).

Klasse	Beschikbare producten	Target
Immunomoduloire agentia (Imids)	thalidomide lenalidomide (Revlimid ®) pomalidomide (Imnovit ®)	Interactie met intracellulair complex Cereblon/E3 ubiquitin ligase/Cul4A/DB1 - degradatie van transcriptiefactoren - activatie van immuuncellen (NK, CD4 en CD8 T cellen) - Synergisme met monoclonale antilichamen
Proteasoom inhibitoren (PI)	Bortezomib (Velcade ®) Ixazomib (Ninlaro ®) Carfilzomib (Kyprolis ®)	Binding met 26S proteasoom, verantwoordelijk voor afbraak van regulatoire proteïnen in de cel, betrokken bij de celcyclus, apoptose en DNA herstel. Dit leidt tot accumulatie van deze onaangepaste proteïnes en activatie van apoptose.
Monoclonale antilichamen (mAbs)	Daratumumab (Darzalex ®) Elotuzumab (Empliciti ®)	Daratumumab: binding CD38 epitoom, aanwezig op plasmacellen en inductie van antibody dependent cell cytotoxicity (ADCC), antibody dependent cell phagocytosis (ADCP) en complement directed cytotoxicity (CDC). Elotuzumab: anti-SLAMF7 (signaling lymfocytic activation molecule F7). Deze heeft expressie op NK cellen en myeloomcellen. Dit geeft ADCC, mede door activatie NK cellen.
Deacetylase inhibitor (DAC inhibitor)	Panobinostat (Farydak ®)	Inhibitie van histon en non histon deacetylase en dus epigenetische modificatie van genen. Op deze wijze moduleert het genexpressie en proteïen metabolisme. Eerder werd DAC overexpressie aangetoond bij myeloom
Nucleair-cytoplasmatische transport receptor inhibitor	XPO1 inhibitor (Selinexor ®)	Binding aan XPO1, een receptor die transport van RNA en proteïnes in- en uit de celkern medeert. XPO1 expressie in MM cellen is hoog en correleert met celoverleving.

Tabel 7: beschikbare klassen en moleculen voor behandeling van multipel myeloom.

Voor MM zijn ook nog tal van nieuwe producten in ontwikkeling. Het verst in deze ontwikkeling staan de verschillende therapeutische agentia gericht tegen BCMA (B-cel maturatie antigen). Het betreft een transmembraan glycoproteïne van de tumor necrosis factor

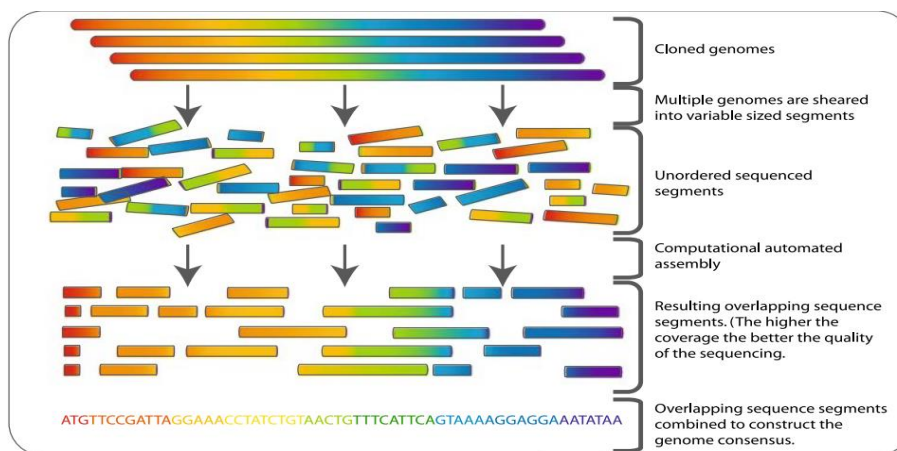
(TNF) superfamilie, welke enkel aanwezig is op plasmacellen en overexpressie vertoont op MM cellen. Er zijn drie anti-BCMA strategieën in ontwikkeling. De eerste is een *antibody-drug conjugate* dat een microtubulus verstorend agens aflevert bij de BCMA dragende cel met cytostatisch effect, naast de ADCP en ADCC effecten (*antibody-dependent cell phagocytosis en -cell cytotoxicity*) van een monoclaal antilichaam. Het eerste product in deze klasse is Belantamab mafodotin. Ten tweede werden reeds verschillende *chimeric antigen receptor* of CAR T-cellen ontwikkeld tegen deze target. Ten slotte zijn er tal van bispecifieke antilichamen (*bispecifiek T-cel engager*: BITE) in ontwikkeling, welke enerzijds BCMA binden en anderzijds CD3 of een ander T-cel epitoom en zo T-cel cytotoxiciteit, cytokineproductie en formatie van een cytolytische synaps promoten (28).

Kader

Sinds 2017 werd in ons centrum, op vlak van de standaard genetische uitwerking van vloeibaar beenmerg bij vermoeden van multipel myeloom, het klassieke karyotype vervangen door een *next generation sequencing* (NGS) techniek waarbij copy number variations ter hoogte van de verschillende chromosomale regio's in meer detail kunnen weergegeven worden. Naast de gekende cytogenetische bevindingen met prognostisch belang bij MM (oa t(4;14), t(11;14), (t14;16), del 17p) gedetecteerd d.m.v. FISH, levert dit omwille van de sterk verhoogde resolutie zeer complexe karyotypes op met deleties of duplicaties van kleinere chromosomale regio's met een tot op heden ongekend belang.

NGS is een overkoepelende term voor meerdere technieken die hebben mogelijk gemaakt om het ganse genoom in kaart te brengen. Samengevat geven ze allemaal de mogelijkheid om grote hoeveelheden kleine DNA fragmenten gelijktijdig te analyseren, ook wel *massive parallel sequencing* genoemd (29). Hiervoor wordt het genoom op willekeurige wijze in kleine fragmenten gebroken door gebruik van DNase enzymen, hiertoe wordt gerefereerd als *shotgun sequencing* (30). Door gebruik van bio-informatica wordt uit de individuele uitgelezen sequenties (*reads*) een reconstructie verricht van het ganse genoom, gebruik makend van een humaan referentiegenoom alsook overlap van de fragmenten. Om de accuraatheid op te drijven kan men de zogenaamde *coverage* opdrijven. De coverage refereert naar het gemiddelde aantal keer dat een gegeven nucleotide werd uitgelezen en wordt afgeleid uit de lengte van het genoom (G), het aantal reads (N) en de gemiddelde lengte van de reads (l) (31). Gesteld dat een genoom bestaand uit 10.000 bp gereconstrueerd wordt uit 20 reads met een lengte van 500 nucleotiden, dan zal de coverage 1x bedragen, als afgeleid uit de formule $\frac{l \times N}{G}$. Afhankelijk van deze

coverage wordt het onderscheid gemaakt tussen *shallow whole genome sequencing* (ook wel *low pass* of *low coverage sequencing* genoemd) of *deep sequencing*. De gehanteerde coverage beïnvloedt sterk de bekomen resolutie, maar ook de kostprijs (29). In de literatuur schijnt er geen consequente definitie te bestaan van de respectievelijke coverage, doch tussen de 0,3x en 1x wordt doorgaans als low coverage geduid terwijl bij deep sequencing de coverage tot de grootte orde van tientallen tot zelfs duizenden bedraagt (32). De toegepaste techniek in UZ Gent kent een resolutie van 400 kbp en behoort tot de low coverage sequencing; dit baat als vervanging van de klassieke karyotypering daar het een lagere kost kent door automatisatie met reeds een gevoelige verhoging van de resolutie t.a.v. de G-banding.



Figuur 2: overzicht van het principe van shotgun sequencing. In deze figuur wordt uitgegaan van gekloonde genomen in plaats van meerdere cellulaire kopijen in onze praktijk. De genomen worden in fragmenten van variabele lengte opgedeeld op willekeurige wijze en vervolgens uitgelezen. Van de overlap in de reads wordt gebruik gemaakt om tot een reconstructie van het genoom te komen. Overgenomen uit Commins et al (30).

Exploratie van copy number variaties, met focus op identificatie van genomische regio's met mogelijk prognostisch belang, werd reeds toegepast bij tal van solide tumoren en hematologische maligniteiten. Een bijzondere revolutie is het onderzoek d.m.v. genomische profiling van circulerend tumor DNA (ctDNA) met (differentieel-) diagnostische intentie, de zogenaamde *liquid biopsy*. Als bij concreet voorbeeld bleek uit onderzoek door Raman et al. genomische profiling op ctDNA een adequate methode om de histologische classificatie van longtumoren (*small cell vs non-small cell*) te voorspellen op een bloedstaal (33). Bij Hodgkin lymfoom (HL) en diffuus grootcellig B-cel lymfoom (DLBCL) bleek de methode ook betrouwbaar om deze beide te onderscheiden. De sensitiviteit voor DLBCL was wel lager dan voor HL (74,1% versus 84,2%) (34). Een exploratie bij multipel myeloom toonde sterk potentieel voor zowel diagnostische doeleinden als longitudinale merker van klonale evolutie en ziekteresistentie, doch verder onderzoek is noodzakelijk (35).

Doelstellingen

1. Ontwikkeling van een databank van patiënten met een nieuwe diagnose van multiple myeloom met inbegrip van ziektepresentatie, risicoclassificatie op basis van internationaal gedefinieerde criteria en output van de CNV sequencing.
2. Analyse van deleties en duplicaties, welke niet tot de klassieke hoog risico cytogenetica behoren en terugkoppeling naar de literatuur.
3. Correlatie met CRAB-criteria, type paraproteïne en R-ISS risicoclassificatie
4. Formuleren van toekomstige onderzoekspistes

Methoden

Samenstelling van de databank

Voor de databank werden gegevens verzameld voor alle gevallen van nieuw vastgesteld multipel myeloom (NDMM) vanaf invoer van de CNV karyotypering in de klinische routine in het UZ Gent. De data behelst diagnoses in een periode van 06/2017 tot en met 05/2020 met laatste update van de gegevens in 11/2020. Patiënten waarvan geen CNV karyotype beschikbaar was (vb. diagnose louter op biopsie van een plasmocytoom) werden geëxcludeerd. Enkel patiënten die een behandeling ondergingen in het UZ Gent werden weerhouden (exclusie van verwerkte beenmergstalen van andere ziekenhuizen). Ook wanneer de patiënt pas met een herhal myeloom (RRMM) verwezen wordt na eerdere lijnen therapie in een ander centrum werd deze niet geïncludeerd.

Voor dit werk en verzameling van de gegevens voor de databank werd een goedkeuring verkregen van de commissie voor medische ethiek UZ Gent, binnen de context van een retrospectief onderzoeksproject op gezondheidsgegevens (dossiernummer: BC-09261).

Naast demografische gegevens zoals leeftijd en geslacht van de patiënt werden gegevens rond de basistypering van het MM verzameld (type zware en lichte keten, gekend voorafgaand stadium van MGUS of SMM, plasmacel leukemie of extramedullaire ziekte). De gegevens voor diagnose aan de hand van de CRAB criteria werden verzameld (calcemie, hemoglobine, serum creatinine en al dan niet bestaan van botletsels alsook gebruikte modaliteit van beeldvorming). Biochemische merkers met gekende prognostische impact (β_2 -microglobuline, albumine) en gegevens omtrent translocatie en hoog risico cytogenetica op basis van FISH werden verzameld alsook de R-ISS score. Teneinde het verloop in te schatten werd de patiënt gecategoriseerd volgens transplant eligible of non-eligible en werd eerstelijnstherapie, responseevaluatie, autologe of stamceltransplantatie en maintenance gecodeerd. Bij herhal werd een tweedelijnstherapie en PFS aangegeven. In geval van overlijden werd de doodsoorzaak en OS gecodeerd.

De gegevens van de CNV karyotypering werd gecategoriseerd per chromosoom met weergave van precieze locatie.

Analyse

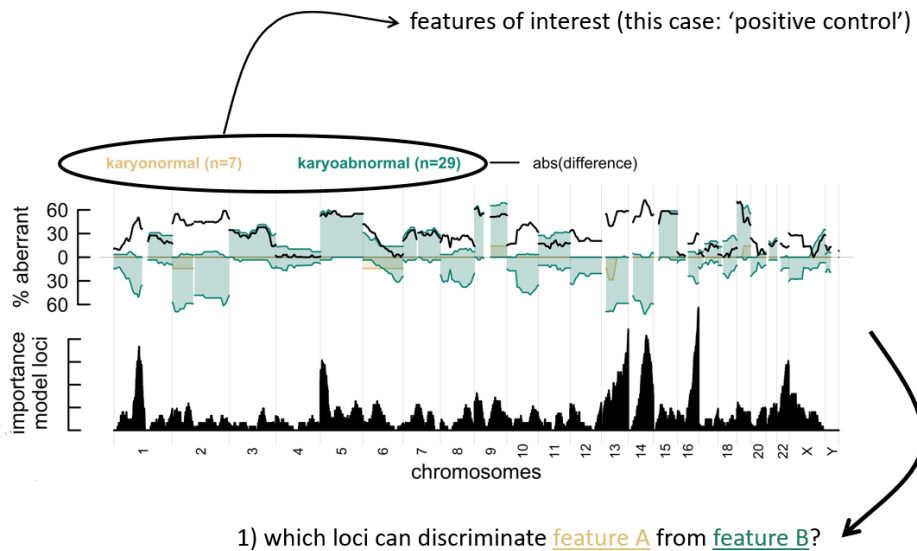
Oorspronkelijk gezien was de intentie om therapierespons, herval en daaruit volgende PFS en OS te correleren met bestaande CNV profielen. Evenwel gezien de relatief jonge databank is het verloop nog onvoldoende gevorderd om PFS of OS te analyseren. Met een gemiddelde opvolging van 21 maand (range 2 – 41 maand) werden immers slechts 15 hervallen vastgesteld op een totaal van 44 patiënten. Zodus werd na heroverweging besloten om de voorspellende waarde van het CNV profiel te toetsen tegenover de variabelen van de CRAB criteria alsook de R-ISS als prognostische indicator.

Voor een gedetailleerde verwerkingsmethode van de sequencing output verwijzen we naar het werk van Raman et al (34,36). Samengevat worden de gegenereerde reads na NGS sequencing gealigneerd door middel van het Bowtie 2 algoritme op een humaan referentiegenoom (GRCh38) tot een *sequence alignment map* (SAM) en vervolgens gecodeerd tot een *binary alignment map* (BAM) *file*. Het BamSorMaDup algoritme van het programma Biobambam sorteert en markeert de duplicaten in de BAM files. Voor het genereren van een copy number (= een genormaliseerde *log 2* ratio voor een gegeven regio) werd gebruik gemaakt van het WisecondorX algoritme. Deze maakt hiervoor opnieuw gebruik van referentie genomen voor de copy number van chromosomen. Daarnaast deelt deze het genoom op in 100 kb fragmenten (*bins*), waarvoor een accuratere copy number kan gegenereerd worden op basis van *within sample reference*. Door middel van *circulair binary segmentation* (in de DNACopy package van R) worden bovendien segmenten geïdentificeerd (minstens 2 bins = 200 kb) met een gelijke copy number, dit proces wordt ook *breakpoint calling* genoemd. Voor deze laatste segmenten worden Z-scores (aantal standaarddeviaties afwijkend van de normaal) berekend, waarvoor de cut-off op 3 ligt om als aberrant aan te duiden. De resultante is dus een chromosoom-, segmentair- en bin-wise *log 2* ratio en een segmentaire Z-score (34,36).

De BAM-files konden slechts voor 40 patiënten gerecupereerd worden. Bovendien werden nog vier patiënten geëxcludeerd waarbij een vlak CNV karyotype werd gezien en op beenmerg een normaal plasmacelaantal. Dit leidt tot 36 patiënten voor CNV karyotype analyse.

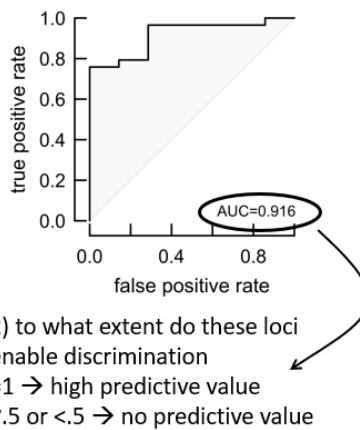
Om het voorspellend vermogen van het CNV karyotype t.o.v. gekende variabelen in te schatten, wordt gebruik gemaakt van bin-wise copy number Z-scores, afgeleid uit segmentaire Z-scores. Er werd een *Random Forest* model opgesteld (met gebruik van de RandomForest package in R), waarna optimalisatie en validatie door middel van *bootstrap* methodes en variatie in toegepaste variabelen (hier CNV).

Concreet wordt telkens voor een dichotome ‘afhankelijke’ variabele dergelijk predictief model opgesteld op basis van het CNV profiel, met individuele CNV als ‘onafhankelijke’ variabelen. De meest performante CNV in het model worden gerapporteerd als *importance model loci*, zie fig 3 (34).



Figuur 3: Voorbeeld van de gehanteerde methodologie. Voor de dichotome categorie normaal karyotype (karyonormal: geel) of abnormaal karyotype (karyoabnormal: groen) wordt in de bovenste grafiek het percentage CNV aberratie grafisch afgebeeld per chromosoom. De zwarte curve geeft het absolute verschil tussen de beide weer. De onderste curve geeft weer welke chromosomale loci op basis hiervan het grootste vermogen hebben om de twee groepen van elkaar te onderscheiden.

Om vervolgens het vermogen van predictief model m.b.t. het voorspellen van deze dichotome variabele uit te drukken wordt een ROC (*receiver operating characteristic*) curve opgesteld in R. Deze plot voor verschillende detectiedrempels de sensitiviteit (X-as) en specificiteit (Y-as) van deze bevinding als ‘test’, zie figuur 4 ter illustratie. Een ideaal onderscheidend vermogen wordt weergegeven door een rechthoekige curve met een oppervlakte onder de curve (*area under the curve: AUC*) van 1. Bij een AUC van 0,5 kan CNV karyotype helemaal geen onderscheid maken tussen de twee categorieën.



Figuur 4: voorbeeld van een ROC curve en AUC berekening. Ook hiervoor werd het voorbeeld van de dichotome categorie normaal karyotype of abnormaal karyotype uitgezet, dat eerder werd weergegeven in figuur 3. Afwijkingen in het CNV karyotype kunnen logischerwijs goed het bestaan van een normaal karyotype inschatten, resulterend in een hoge AUC.

Resultaten

Overzicht databank

In de periode van 06/2017 tot en met 11/2020 kregen 44 patiënten een nieuwe diagnose van MM in ons centrum, die een CNV karyotypering kregen op een eerste beenmergaspiraats en voldoen aan de andere vooropgestelde criteria. De demografische kenmerken en voornaamste karakteristieken vindt u samengevat in tabel 8.

Demografie				
Geslacht	Man 26 (60%)	Vrouw 18 (40%)		
Leeftijd bij diagnose	40-60j 10 (22%)	60-80j 32 (74%)	> 80j 2 (4%)	
Ziektekenmerken				
Zware keten	IgG 23 (52%)	IgA 16 (36%)	IgM 1 (2%)	Uitsluitend lichte keten 4 (10%)
Lichte keten	Lambda 20 (45%)	Kappa 24 (55%)	Geen lichte keten 0	
Plasmacel leukemie	1 (2%)			
Extramedullaire ziekte	4 (10%)			
R-ISS	I 15 (35%)	II 22 (50%)	III 7 (15%)	
Cytogenetica				
Hyperdiploidie	15 (35%)			
Gain 1q	10 (23%)			
Del (17p)	3 (7%)			
t(4;14)	1 (2%)			
t(14;16)	1 (2%)			

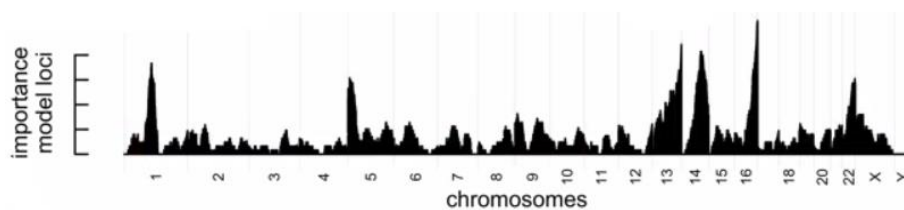
t(11;14)	5 (10%)			
----------	---------	--	--	--

Tabel 8: samenstelling van de databank wat betreft demografie, ziektekenmerken en klassieke cytogenetische kenmerken.

De leeftijdsverdeling is zoals te verwachten bij nieuwe diagnose van MM. Ook de basis ziektekenmerken (zwarte en lichte keten, extramedullaire ziekte en plasmacel leukemie) passen bij de verdeling in de literatuur. Op basis van de FISH resultaten alleen hebben 5 patiënten hoog risico cytogenetische kenmerken (3 met 17p deletie, 1 met t(4;14) en 1 met t(14;16)). Samen met overige biochemische kenmerken resulteert dit in een totaal van 7 patiënten die een hoge R-ISS III hebben. De eerste duidelijke meerwaarde van de CNV karyotypering t.a.v. FISH zit in de detectie van gain 1q bij een totaal van 10 patiënten, waarbij er slechts overlap is met andere hoog risico afwijkingen bij 1 patiënt. Hoewel de gain 1q niet in de R-ISS vervat zit, is een negatieve prognostische impact hiervan duidelijk aangetoond en werd zelfs als criterium aangenomen in de studies omtrent tandem ASCT (1,4,13).

Overzicht van meest voorkomende CNV

Naast een representatie van de gehanteerde methode in figuur 3, kan men logischerwijze uit die specifieke importance model curve afleiden waar de meest voorkomende CNV in onze populatie zich bevinden, zie figuur x. De hoogste pieken vinden we op de loci 1p, 1q, 5p, 13q, 14q en 16q. Dat ze frequent voortkomen uit deze analyse betekent uiteraard niet noodzakelijk dat ze een prognostische impact hebben. We koppelen de meest voorkomende CNV terug naar de literatuur.



Figuur 5: Importance model voor het onderscheid tussen normaal karyotype en afwijkend karyotype op basis van CNV karyotype, afgeleid uit figuur 3. Dit importance model geeft derhalve de meest voorkomende CNV weer.

Zoals eerder aangehaald is **chromosoom 1** onderhevig aan veel secundaire genomische CNV. De 1q21 gain (3 kopijen) of 1q amplificatie (4 of meer kopijen) is geassocieerd met een kortere survival. De amplificatie zou ook geassocieerd zijn met een deletie 1p. Betrokken genen in deze regio zijn onder meer MCL-1 (myeloid cell leukemia-1, een anti-apoptotisch eiwit in de BCL-2 (B-cell lymfoma-2) superfamilie (1). In vitro werd reeds gevoeligheid aangetoond voor anti-MCL1 targeting (al dan niet aangevuld door anti-BCL2 targeting) bij gain 1q21 humane myeloom cellijnen (37).

De meeste **chromosoom 5** afwijkingen betreffen ganse trisomieën binnen de context van hyperdiploidie, aldus geassocieerd met gunstige prognose. Echter bij een drietal patiënten werd ook een deletie 5p15 aangetroffen. De impact hiervan op de prognose is nog niet onderzocht in de literatuur.

We troffen bij 14 patiënten een deletie van een volledig **chromosoom 13** aan en bij 1 patiënt een 13q deletie. Monosomie 13 en deletie 13q is klassiek gelinkt aan een slechtere outcome in het chemotherapie tijdperk, maar deze impact is minder duidelijk bij gebruik van novel agents als bortezomib en lenalidomide (24). Andere auteurs beweren dat de veronderstelde impact van deletie 13q te maken heeft met diens associatie met andere hoog risico cytogenetische afwijkingen (1). In onze populatie hebben alle 15 patiënten met monosomie 13 of del (13q) een complex CNV karyotype met meer dan 3 CNV. Acht patiënten hebben geassocieerde duplicatie (1q) en 1 deletie (1p). Bij twee patiënten is del (17p) aanwezig, bij twee andere respectievelijk t(4,14) en t(14;16).

Verlies van **chromosoom 14** materiaal zien we bij 10 patiënten (4 monosomie 14 en 6 deletie 14q23). We zien ook 2 patiënten met duplicatie van 14q32 materiaal. Bij twee van deze patiënten is ook een t(11,14) aanwezig. Van de deletie 14q is over het algemeen weinig prognostische implicatie gekend. Uit whole genome sequencing studies is wel gebleken dat het TRAF3 gen (TNF receptor associated factor 3), een negatieve regulator van de NF- κ B pathway gelegen op 14q32, een frequent gemuteerd tumor suppressor gen is in MM en andere B-cel maligniteiten. In humane myeloom cellijnen is bovendien aangetoond dat 14q32 deletie gepaard gaat met minder gevoeligheid voor bortezomib (38).

Een verlies van **chromosoom 16** materiaal wordt gezien in 9 patiënten (drie met monosomie 16, zes met deletie 16q doch op drie verschillende plaatsen). De prognostisch invloed van deze afwijkingen zijn lijkt laag te zijn. Als eventueel betrokken driver gen wordt het WWOX gen beschreven (WW domain containing oxidoreductase). Dit tumor suppressor gen, waarbij mutaties beschreven zijn in tal van humane maligniteiten, bevindt zich op 16q23 (1,39).

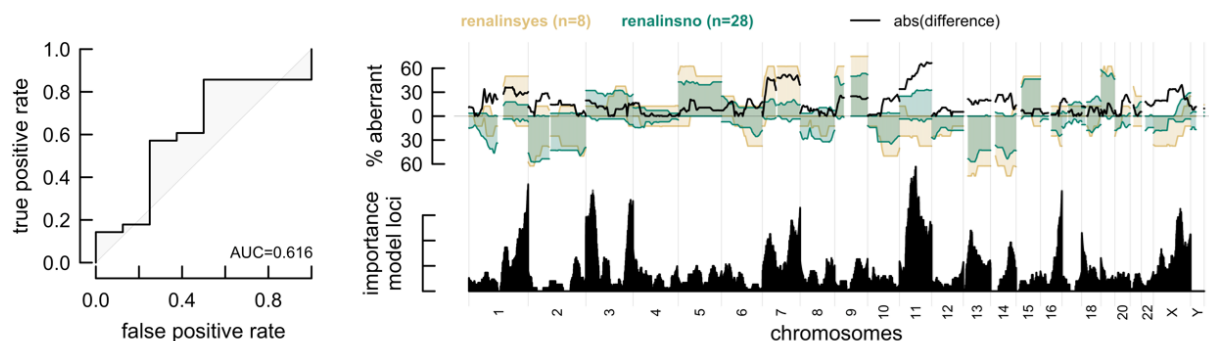
We merken op dat del (17p) niet uit deze analyse naar voor komt, vermoedelijk omwille van de lage frequentie bij nieuwe diagnose van 10% welke tot 80% kan oplopen bij RRMM. In onze populatie hebben slechts drie NDMM patiënten een del (17p).

Correlatie CNV profiel met CRAB criteria

We onderzochten of bepaalde CNV correleren met de ziektepresentatie o/v CRAB criteria. Via bovengenoemde methode werd getoetst of via het CNV profiel betrouwbare voorspellingen kunnen gemaakt worden hieromtrent. Voor de analyse werden de afhankelijke variabelen telkens als dichotoom gehercodeerd.

Voor hypercalcemie werd de analyse niet verricht gezien hiervan slechts twee slechts bij twee van de 36 patiënten sprake was.

Voor de exploratie van nierinsufficiëntie werd een dichotome afgeleide variabele gecodeerd waarin al dan niet voldaan werd aan het CRAB criterium (serum creatinine > 2 mg/dl of glomerulaire filtratiesnelheid < 40 ml/min). In onze populatie voldeden 8 patiënten hieraan (22%). Hoewel voor verschillende chromosoomloci een verschil werd gezien tussen de groepen, leverde de ROC curve een AUC op van 0,616 (figuur 5). Dit indiceert een flauwe correlatie of een te kleine populatie om correlatie te bewijzen.



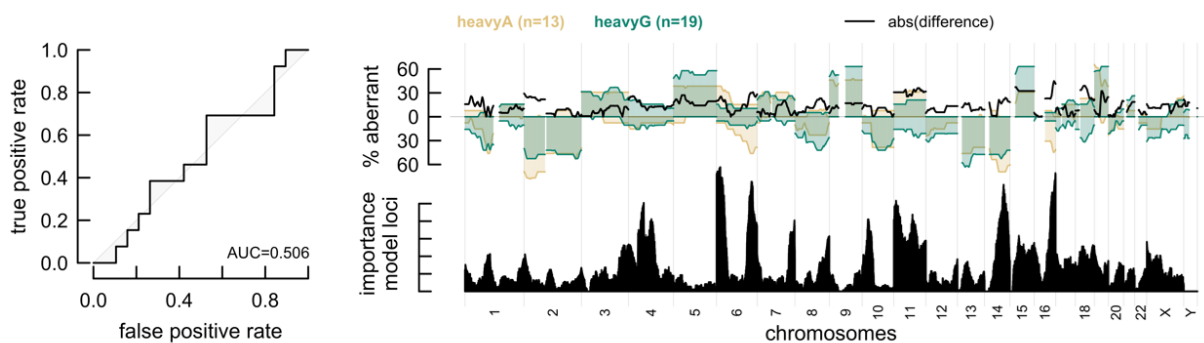
Figuur 6: Correlatie met nierinsufficiëntie. Rechtsboven: weergave van het percentage CNV aberraties per chromosoom en voor de twee groepen. Renalinsyes (geel): voldaan aan CRAB criteria voor nierinsufficiëntie, renalinsno (groen): niet voldaan aan CRAB criteria voor nierinsufficiëntie. De volle lijn geeft het absoluut verschil weer tussen de groepen. Rechtsonder: grafiek van de chromosoomloci met mogelijk voorspellend effect. Links: weergave van de ROC curve met AUC als inschatting van het voorspellend vermogen van CNV karyotype.

Wat betreft anemie werd de dichotome variabele gecodeerd met als drempel een hemoglobine van 10 g/dl. In de populatie voldeden 12 patiënten hieraan (33%). De ROC curve leverde een AUC op van 0,469 (zie supplementaire figuren).

Voor botletsels werd bovenstaande analyse niet verricht. De variabele is immers moeilijk te herleiden naar een dichotome variabele wegens verschillende beeldvormingsmodaliteiten en sterke verschillen in rapportage. Zie discussie.

Correlatie CNV profiel met type paraproteïne

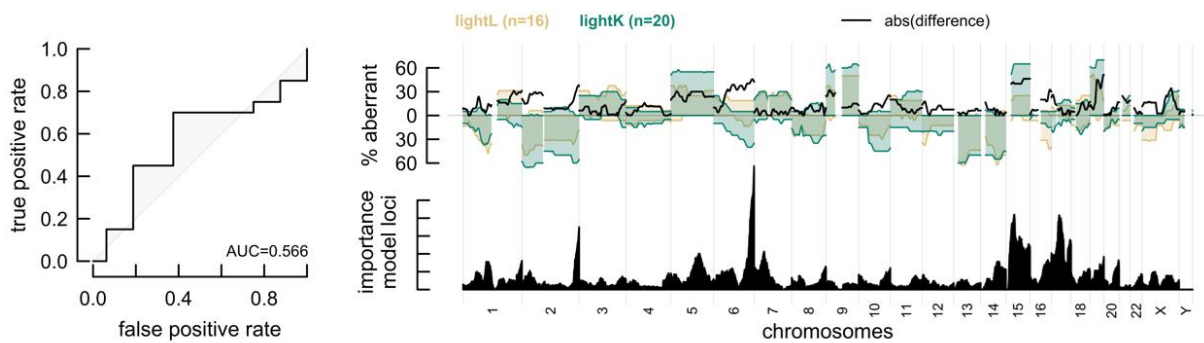
Volgens dezelfde methode werd onderzocht of er een samenhang bestaat met het type geproduceerde zware keten of lichte keten. Gezien in de databank slechts 1 patiënt met IgM type zware keten werd opgenomen, werd eerst geëxploreerd of het onderscheid tussen een IgA en IgG kan voorspeld worden. Onder de 36 geanalyseerde patiënten waren er 13 met IgA zware keten en 19 met IgG zware keten. Opnieuw zijn de loci met mogelijk onderscheidend vermogen wijdverspreid over het genoom. Bovendien levert de AUC van de ROC curve hier een 0,506 waardoor het voorspellend vermogen als laag tot onbestaande wordt ingeschat (figuur 6).



Figuur 7: Correlatie met type zware keten. Rechtsboven: weergave van het percentage CNV aberraties per chromosoom en voor de twee groepen. HeavyA (geel): IgA zware keten paraproteïne, heavyG (groen): IgG zware keten paraproteïne. De volle lijn geeft het absoluut verschil weer tussen de groepen. Rechtsonder: grafiek van de chromosoomloci met mogelijk voorspellend effect. Links: weergave van de ROC curve met AUC als inschatting van het voorspellend vermogen van CNV karyotype.

Gezien het ganse heavy chain gen (IgH) zich bevindt op chromosoom 14 viel te voorspellen dat het onderscheid d.m.v. CNV karyotype moeilijk zou zijn. Dit is anders voor de genen van de lichte ketens lambda en kappa, welke zich respectievelijk op chromosoom 22 en 2 bevinden. In onze populatie bevonden zich 16 mensen met lambda lichte keten productie (waarvan 3 uitsluitend lichte keten) en 20 met kappa lichte keten productie (waarvan 1 uitsluitend lichte keten myeloom).

Analyse van het voorspellend vermogen van CNV karyotype voor type van lichte keten toonde wel een potentieel voor chromosoom 2 CNV, maar niet voor chromosoom 22. Ook hier valt de AUC laag uit op 0,566 (figuur 7).

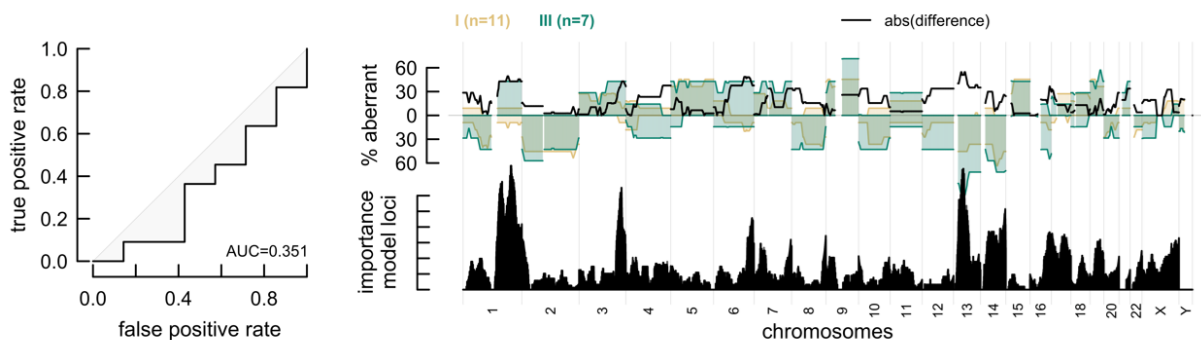


Figuur 8: Correlatie met type lichte keten. Rechtsboven: weergave van het percentage CNV aberraties per chromosoom en voor de twee groepen. LightL (geel): lichte keten lambda paraproteïne, lightK (groen): lichte keten kappa paraproteïne. De volle lijn geeft het absoluut verschil weer tussen de groepen. Rechtsonder: grafiek van de chromosoomloci met mogelijk voorspellend effect. Links: weergave van de ROC curve met AUC als inschatting van het voorspellend vermogen van CNV karyotype.

Correlatie CNV profiel met R-ISS risicoclassificatie

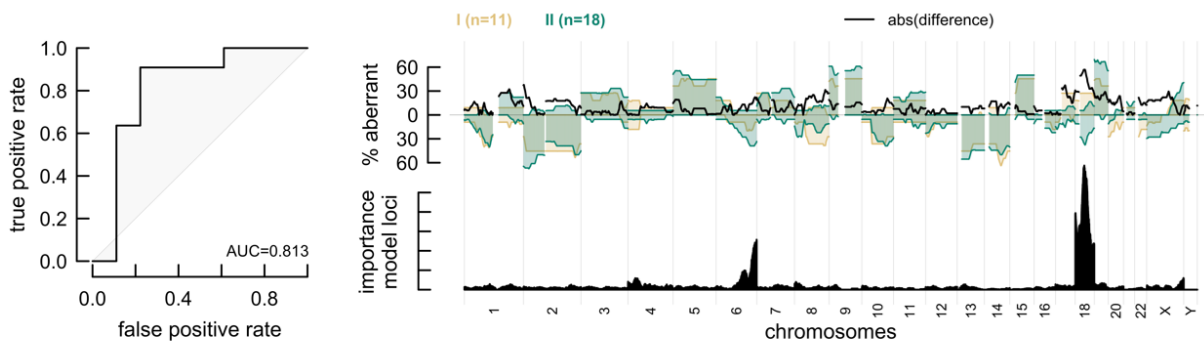
Zoals eerder aangegeven is R-ISS de huidige standaard voor risicoclassificatie van een NDMM met incorporatie van zowel hoog risico cytogenetica o.v.v. t(4;14), t(14;16) en del(17p) als de voornaamste biochemische merkers β_2 -microglobuline, serum albumine en LDH. Vanuit dit opzicht loont het om te exploreren of de R-ISS kan ingeschat worden op basis van CNV karyotype. Er werd geopteerd voor R-ISS (en niet ISS) aangezien de translocaties niet vervat zitten in het CNV karyotype. Een nadeel is dat de del(17p) hier wel reeds in vervat zit, al betreft dit slechts een drietal patiënten. Het doel van dit onderdeel is dus om na te gaan of CNV karyotype op zich evenveel prognostische informatie op als de ganse uitwerking met iFISH en biochemische merkers?

Een eerste analyse maakte gebruik van R-ISS classificatie I (n = 11) en III (n = 7) patiënten als dichotoom gecategoriseerde groep (figuur 8). Verrassend genoeg levert dit een AUC op lager dan 0,5 wat lijkt te suggereren dat aanwezigheid van CNV aberraties correleert met een lagere R-ISS score (zij het met een zwak voorspellend vermogen gezien slechts een AUC van 0.351).



Figuur 9: Correlatie met R-ISS I versus III classificatie. Rechtsboven: weergave van het percentage CNV aberraties per chromosoom en voor de twee groepen. I (geel): R-ISS categorie I, III(groen): R-ISS categorie III. De volle lijn geeft het absoluut verschil weer tussen de groepen. Rechtsonder: grafiek van de chromosoomloci met mogelijk voorspellend effect. Links: weergave van de ROC curve met AUC als inschatting van het voorspellend vermogen van CNV karyotype.

Verrassend genoeg krijgen we een ander beeld wanneer we CNV karyotype proberen te correleren met het onderscheid tussen R-ISS I (n = 11) en R-ISS II (n = 18) (figuur 9). Hierbij wordt een hoge AUC berekend van 0,813 indicatief voor een sterk onderscheidend vermogen. Bovendien levert de locus prioritization vrij geïsoleerde pieken op ter hoogte van chromosoom 6 en 18. Verdere studie naar de aard van de chromosoom 6 en 18 CNV leverde geen consequent patroon op, bestaande uit duplicaties of deleties en op verschillende chromosoomregio's. Bovendien leverde literatuuronderzoek geen gekende relevantie op. Voor verdere exploratie dient dit herhaald te worden op grotere groepen patiënten.



Figuur 10: Correlatie met R-ISS I versus II classificatie. Rechtsboven: weergave van het percentage CNV aberraties per chromosoom en voor de twee groepen. I (geel): R-ISS categorie I, II(groen): R-ISS categorie II. De volle lijn geeft het absoluut verschil weer tussen de groepen. Rechtsonder: grafiek van de chromosoomloci met mogelijk voorspellend effect. Links: weergave van de ROC curve met AUC als inschatting van het voorspellend vermogen van CNV karyotype.

Discussie

In een ziekte als multipel myeloom, die wordt gekenmerkt door genomische instabiliteit en klonale selectie, biedt gedetailleerd genetisch onderzoek een enorm potentieel om de ziekte verder te typeren. Ondanks de expansie in therapeutische opties met exploratie van combinaties van beschikbare producten en onderzoek naar nieuwe targets, blijft het immers een aandoening met een sterke klinische heterogeniteit op vlak van presentatie zowel als therapierespons. De huidige risicoclassificatie integreert biochemische merkers met eerder gedefinieerde hoog risico translocaties t(4;14), t(14;16) alsook verlies van chromosoom 17p materiaal, opgespoord door klassieke karyotypering (G-banding) en interfase FISH.

Sinds 2017 werd in het UZ Gent een techniek van next generation sequencing ingevoerd met rapportage van een copy number variants karyotype in de standaard uitwerking van beenmergstalen bij patiënten met multipel myeloom. Hoewel dit voornamelijk gedreven werd door overwegingen van performantie en kostprijs, levert het dankzij zijn gevoelig hogere resolutie complexe karyotypes op waarvan de volle implicaties nog niet zijn gekend.

De enige gerapporteerde CNV met impact op de behandeling op heden zijn de chromosoomarm CNV als duplicatie 1q, deletie 1p en deletie 17p. Hiervan is het prognostisch belang goed gekend, zodat ze in studies tot de hoog risico cytogenetische afwijkingen worden gerekend. Bijgevolg werden voor deze categorieën ook specifieke therapie richtlijnen uitgeschreven (13,25). Bij tal van gerapporteerde focale CNV is het prognostisch belang dus nog onzeker. Hiervan is niet gekend of ze een driver functie hebben, en dus de overleving van een (sub)kloon bevorderen, of een passenger fenomeen zijn door genomische instabiliteit.

We verzamelden de gegevens van alle patiënten met een nieuw vastgesteld multipel myeloom in het UZ Gent van 6/2017 tot en met 05/2020 voor retrospectieve analyse. Van de 45 patiënten in de databank, waren voor 36 patiënten de BAM-files beschikbaar voor analyse. Voor correlaties met harde eindpunten als progressievrije overleving of overall survival werd geacht dat het tijdsbestek te klein was met weinig events van herval of overlijden. Hierom werd besloten om de voorspellende waarde van CNV karyotype te onderzoeken met betrekking tot ziektepresentatie, type paraproteïne en de huidige standaard risicoclassificatie.

We vonden geen belangrijke voorspellende waarde van het CNV karyotype m.b.t. het presenteren met nierinsufficiëntie of anemie (als al dan niet voldaan CRAB criterium). Voor nierinsufficiëntie was de AUC 0,616 en het importance model toonde dat de mogelijk relevante CNV verspreid liggen over het ganse genoom. Voor anemie benaderde de AUC 0,5. Analyse van hypercalcemie als CRAB criterium werd niet verricht daar slechts 2 patiënten van de 36 aan dit criterium voldeden. Hoewel de agressiviteit van de aandoening uiteraard een rol kan spelen in de presentatie, veronderstellen we dat de bovenstaande criteria voor eindorgaanschade meer een maat is voor de *burden of disease* en dus ziektevoordering.

De bot aantasting kon naar ons oordeel niet herleid worden tot een dichotome variabele omwille van verschillende beeldvormingsmodaliteiten met een andere detectiedrempel. Bovendien vormt besluitvorming uitgaand van functionele MRI (fMRI) beeldvorming een nieuwe uitdaging, daar er naast letsels van demineralisatie ook rapportage plaatsvindt van skeletale

infiltratie op basis van cellulariteit en vascularisatie (40). Naarmate fMRI zijn ingang kent in de diagnostische – en responscriteria zal het interessant zijn om de analyse te hernemen om bepaalde fenotypes van botinvasie (vb. focaal versus gedissemineerd) te correleren met het CNV profiel.

Het CNV profiel kon geen voorspelling maken welk type zware of lichte keten het paraproteïne uitmaakt. Voor de zware ketens valt dit wellicht te verklaren doordat het ganse IgH gen huist op de chromosoom 14q32 locus, waar de primaire translocaties plaatsvinden. Hierdoor is het onwaarschijnlijk dat specifieke chromosomale CNV de groepen zullen kunnen onderscheiden. Voor de lichte ketens zijn de genen wel verspreid over chromosoom 2 en 22, maar ook hier kon geen correlatie worden aangetoond. Dit valt wellicht te verklaren doordat de meeste primaire genetische events zich voordoen als chromosoom 14 translocaties of hyperdiploidie en dat mogelijke chromosoom 2 of 22 CNV tot de secundaire events behoren en zich chronologisch pas voordoen nadat het type lichte keten van de ontspoorde cellijn al gedetermineerd was.

Om het CNV profiel af te toetsen t.a.v. de huidige standaard risicoclassificatie, werd onderzocht of een correlatie bestond tussen het CNV karyotype en de R-ISS met exploratie van eventuele betrokken chromosoomloci. Het onderscheidend vermogen tussen de R-ISS I en III categorie bleek teleurstellend met bovendien een AUC kleiner dan 0,5, wat een omgekeerde correlatie doet vermoeden. Bij verder nazicht van de twee groepen blijkt dat er in de hoog risico groep met R-ISS III twee patiënten zijn met een normaal karyotype, die hun hoge R-ISS te danken hebben aan een zeer hoog β_2 -microglobuline. In de R-ISS I groep zijn er dan weer 4 patiënten met een hyperdiploïd karyotype, wat andermaal aantoonde dat tal van CNV inderdaad niet noodzakelijk correleren met een hoog risico ziekte. Bijgevolg lijkt het CNV karyotype meer een maat voor laagrisico ziekte gezien (althans in onze populatie) hyperdiploidie met een lagere R-ISS is gecorreleerd. We benadrukken ook dat in deze analyse bijzonder kleine groepen werden opgenomen (resp. 7 en 11 patiënten), daar veel patiënten in de intermediaire risicogroep geclassificeerd zijn.

Een sterk verschillend beeld wordt gezien wanneer we de analyse herhalen voor R-ISS categorie I versus II. Hierbij wordt een sterk onderscheidend vermogen vermoed uit een AUC van 0,813. Bovendien geeft de software voor het importance model twee duidelijke loci weer ter hoogte van chromosoom 6 en 18. De discrepantie met de vorige analyse wordt opnieuw duidelijk bij verdere studie van de vergeleken groepen. Hier zijn in de categorie II R-ISS verschillende patiënten opgenomen met een hyperdiploïd karyotype, zodat deze elkaar kunnen

uitmiddelen. Bovendien heeft slechts 1/21 van de R-ISS II patiënten een normaal karyotype versus 4/11 in de R-ISS I groep. Ten derde betreffen het dit keer grotere groepen, waardoor de test iets meer power krijgt. Verdere studie van de chromosoom 6 en 18 CNV leverde geen duidelijk patroon (duplicaties zowel als deleties) of consequent betrokken locus op. Ook verder literatuuronderzoek leverde geen aanknopingspunten. Deze resultaten dienen op grotere cohortes herhaald te worden om eventuele ongekende focale CNV op chromosoom 6 en 18 van prognostisch belang aan het licht te brengen.

Samenvattend lijkt het CNV karyotype een weinig bruikbaar middel om laag van hoog risico ziekte volgens de R-ISS risicoclassificatie te onderscheiden. De verschillende analyses brachten wel aan het licht dat hyperdiploïde karyotypes een belangrijke confounder kunnen zijn wanneer wordt gesteld dat bepaalde CNV correleren met hoog risico ziekte. De matige correlatie met R-ISS kan alternatief verklaard worden doordat CNV karyotypes mogelijk prognostische informatie bevatten zoals del (17p) of dup (1q) die ontbreekt in de R-ISS. Bovendien kan het zijn dat de biochemische merkers als β_2 -microglobuline bijkomende prognostische informatie bevatten die het CNV karyotype niet omvat.

Conclusie en prospectieven

We konden geen correlatie aantonen tussen de CNV karyotypes en de ziektepresentatie of type paraproteïne. In de correlatie met de huidige gekende prognostische merkers o.v.v. de R-ISS risicoclassificatie stoten we op de belangrijke methodologische beperking dat vele laag risico patiënten in onze populatie geen normaal ‘controle’ CNV histogram hebben, maar ook indrukwekkende duplicaties kunnen vertonen o.v.v. hyperdiploïdie. Hierdoor wordt de evaluatie van CNV met prognostische impact tweezijdig met zowel laag risico kenmerken als hoog risico kenmerken.

De waarachtige prognostische impact van het CNV karyotype moet blijken uit longitudinale opvolging van de gedefinieerde cohorte. Immers, de R-ISS classificatie laat veel patiënten in de intermediaire risicogroep en integratie met bijkomende CNV info als dup(1q) kan dit verder verfijnen. Dat een CNV karyotype (nog) geen substituut is voor de R-ISS blijkt naast onze resultaten uit het feit dat twee patiënten in de databank een R-ISS III classificatie kregen bij een normaal CNV karyotype en FISH. Hierbij is dus zeker nog een complementaire rol weg gelegd voor gevalideerde biochemische merkers als β_2 -microglobuline.

Naast verdere studie over de impact van het CNV karyotype bij diagnose op het verdere verloop zullen aanvullende analyses bij respons evaluatie en hervat nieuwe pistes voor onderzoek opleveren. Het in kaart brengen van klonale selectie en mutaties die leiden tot therapieresistentie zullen vermoedelijk meer impact hebben op de therapiekeuze in latere therapielijnen dan op een initiële behandeling. Zodoende wordt gewerkt naar een ziektespecifieke en patiënt tailored behandeling.

De analyse van cfDNA biedt een bijzondere opportuniteit om genomische informatie te verkrijgen uit een bloedstaal in plaats van een beenmergaspiraats. Dit kan een meerwaarde betekenen bij een (extramedullaire) massa met brede differentiaaldiagnose. Echter mits verbeelding kan een uitwerking voor MM met diagnose, prognosticatie en indicatiestelling voor behandeling op basis van enkel een bloedname een belangrijke comfortwinst betekenen voor de patiënt.

Referenties

1. Castaneda O, Baz R. Multiple Myeloma Genomics - A Concise Review. *Acta Med Acad.* 2019;48(1):57–67.
2. Global Cancer Observatory. Multiple Myeloma Factsheet. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. 2018;2018–9.
3. van Nieuwenhuijzen N, Spaan I, Raymakers R, Peperzak V. From MGUS to multiple myeloma, a paradigm for clonal evolution of premalignant cells. *Cancer Res.* 2018;78(10):2449–56.
4. Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, Mateos MV, Zweegman S, Cook G, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol [Internet].* 2021;32(3):309–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.014>
5. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol [Internet].* 2014;15(12):e538–48. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)
6. Go RS, Vincent Rajkumar S. How i manage monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood.* 2018;131(2):163–73.

7. Femand JP, Bridoux F, Kyle RA, Kastritis E, Weiss BM, Cook MA, et al. How I treat monoclonal gammopathy of renal significance (MGRS). *Blood*. 2013;122(22):3583–90.
8. Paiva B, Chandia M, Vidriales MB, Colado E, Caballero-Velázquez T, Escalante F, et al. Multiparameter flow cytometry for staging of solitary bone plasmacytoma: New criteria for risk of progression to myeloma. *Blood*. 2014;124(8):1300–3.
9. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2017;14(2):100–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.122>
10. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, Mateos M V., Zamagni E, Avet-Loiseau H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* [Internet]. 2017;28(April):iv52–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdx096>
11. Greipp PR, Miguel JS, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J. International Staging System for Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23(15).
12. Palumbo A, Avet-loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma : A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015;33(26).
13. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usmani S, Siegel D, Anderson KC, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: A consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2016;127(24):2955–62.
14. Corre J, Munshi N, Avet-Loiseau H. Genetics of multiple myeloma: Another heterogeneity level? *Blood*. 2015;125(12):1870–6.
15. Soekojo CY, Wang G miao, Chen Y, Casan J, Wolyncewicz G, Lin A, et al. Role of Conventional Karyotyping in Multiple Myeloma in the Era of Modern Treatment and FISH Analysis. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* [Internet]. 2019;19(8):e470–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clml.2019.04.011>
16. Chan NCN, Chan NPH. Recurrent cytogenetic abnormalities in multiple myeloma. *Methods Mol Biol*. 2017;1541:295–302.

17. Altieri A, bowang C. Familial risks and temporal incidence trends of multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006;42(11):1661–70.
18. Chubb D, Weinhold N, Broderick P, Chen B, Johnson DC, Försti A, et al. Common variation at 3q26.2, 6p21.33, 17p11.2 and 22q13.1 influences multiple myeloma risk. *Nat Genet*. 2013;45(10):1221–5.
19. Broderick P, Chubb D, Johnson DC, Weinhold N, Försti A, Lloyd A, et al. Common variation at 3p22.1 and 7p15.3 influences multiple myeloma risk. *Nat Genet*. 2016;44(1):58–61.
20. Weinhold N, Johnson DC, Rawstron AC, Asta F, Broderick P, Dahir NB, et al. Inherited genetic susceptibility to monoclonal gammopathy of unknown signi fi cance. *Blood*. 2014;123(16):2513–7.
21. Locher M, Fresser F, Steurer M, Jukic E, Keller MA, Ruepp C, et al. The prognostic value of additional copies of 1q21 in multiple myeloma depends on the primary genetic event. 2020;(September):1562–71.
22. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, Dickens NJ, Jenner MW, Boyd KD, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. 2010;116(15):56–65.
23. Szalat R, Munshi NC. Novel agents in multiple myeloma. *Cancer J*. 2019;25(617):45–53.
24. Sarah G, Id O, Shaji K, Id O. Current Approaches to Management of High-Risk Multiple Myeloma. *Am J Hematol*. 2021;1(507):0–2.
25. Stadtmauer EA, Pasquini MC, Blackwell B, Hari P, Bashey A, Devine S, et al. Autologous transplantation, consolidation, and maintenance therapy in multiple myeloma: Results of the BMT CTN 0702 trial. *J Clin Oncol*. 2019;37(7):589–97.
26. Devarakonda S, Cottini F, Bumma N, Khan A, Sharma N, Chaudhry M, et al. Multiple Myeloma: Clinical Updates from the American Society of Clinical Oncology Annual Scientific Symposium 2020. *J Clin Med*. 2020;9(11):3626.
27. Gay F, Cerrato C, Petrucci MT. Efficacy of carfilzomib lenalidomide dexamethasone

- (KRd) with or without transplantation in newly diagnosed myeloma according to risk status: Results from the FORTE trial. *J Clin Oncol*. 2019;37(15):8002–8002.
28. Cho SF, Anderson KC, Tai YT. Targeting B cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: Potential uses of BCMA-based immunotherapy. *Front Immunol*. 2018;9(AUG).
 29. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2013;98(6):236–8.
 30. Commins J, Toft C, Fares MA. Computational biology methods and their application to the comparative genomics of endocellular symbiotic bacteria of insects. *Biol Proced Online*. 2009;11(1):52–78.
 31. Peng H, Lu L, Zhou Z, Liu J, Zhang D, Nan K, et al. CNV detection from circulating tumor DNA in late stage non-small cell lung cancer patients. *Genes (Basel)*. 2019;10(11).
 32. Deleye L, Dheedene A, De Coninck D, Sante T, Christodoulou C, Heindryckx B, et al. Shallow whole genome sequencing is well suited for the detection of chromosomal aberrations in human blastocysts. *Fertil Steril*. 2015;104(5):1276-1285.e1.
 33. Raman L, Van Der Linden M, Van Der Eecken K, Vermaelen K, Demedts I, Surmont V, et al. Shallow whole-genome sequencing of plasma cell-free DNA accurately differentiates small from non-small cell lung carcinoma. *Genome Med*. 2020;12(1):1–12.
 34. Raman L, Van der Linden M, De Vriendt C, Van den Broeck B, Muylle K, Deeren D, et al. Shallow-depth sequencing of cell-free DNA for Hodgkin and diffuse large B-cell lymphoma (differential) diagnosis: a standardized approach with underappreciated potential. *Haematologica*. 2020;Online ahe:0.
 35. Guo G, Raje NS, Seifer C, Kloeber J, Ha G, Yee AJ, et al. Genomic discovery and clonal tracking in multiple myeloma by cell free DNA sequencing. *Leukemia*. 2018;32(8):1838–41.
 36. Raman L, Dheedene A, De Smet M, Van Dorpe J, Menten B. WisecondorX: improved copy number detection for routine shallow whole-genome sequencing. *Nucleic Acids*

Res. 2019;47(4):1605–14.

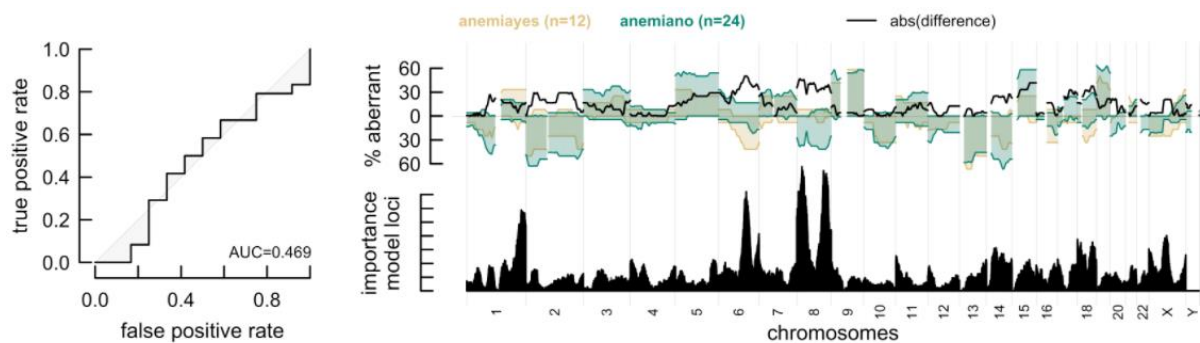
37. Slomp A, Moesbergen LM, Gong JN, Cuenca M, von dem Borne PA, Sonneveld P, et al. Multiple myeloma with 1q21 amplification is highly sensitive to MCL-1 targeting. *Blood Adv.* 2019;3(24):4202–14.
38. Neja SA. The roles of TRAF3 mutation in the oncogenic progression and drug response of multiple myeloma. *Genome Instab Dis* [Internet]. 2020;1(5):278–85. Available from: <https://doi.org/10.1007/s42764-020-00022-x>
39. Hussain T, Liu B, Shrock MS, Williams T, Aldaz CM. WWOX, the FRA16D gene: A target of and a contributor to genomic instability. *Genes Chromosom Cancer.* 2019;58(5):324–38.
40. Dutoit JC, Verstraete KL. Whole-body MRI, dynamic contrast-enhanced MRI, and diffusion-weighted imaging for the staging of multiple myeloma. *Skeletal Radiol.* 2017;46(6):733–50.

Overzicht van gebruikte afkortingen

ADCC	Antibody dependent Cell Cytotoxicity
ADCP	Antibody dependent Cell Phagocytosis
AICDA/AID	single stranded DNA cytosine deaminase
ASCT	Autologe Stamceltransplantatie
AUC	Area Under the Curve
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
BCMA	B-cell Maturation Antigen
BITE	Bispecific T-cell Engager
CCND1	Cycline D1
CLL	Chronische Lymfatische Leukemie
CNV	Copy Number Variation
CRAB	Calcemia, Renal failure, Anemia, Bone lesions
ctDNA	Circulating tumor DNA
DAC	Deacetylasecirc
DLBCL	Diffuus grootcellig B-cel lymfoom
ESMO	European Society of Medical Oncology
FISH	Fluorescentie In Situ Hybridisatie
fMRI	Functional Magnetic Resonance Imaging
GISTIC	Genome Identification of Significant Targets in Cancer
GWAS	Genome-wide Association Studies
HL	Hodgkin lymfoom
HRD	Hyperdiploid
Ig	Immunoglobuline
IgH	Immunoglobuline Heavy chain gen
IMWG	International Myeloma Working Group
ISS	International Staging System
KRD	Kyprolis-Revlimid-Dexamethasone
LDH	Lactaat dehydrogenase

mAb	Monoclonal Antibody
MCL-1	Myeloid Cell Leukemia 1
MGRS	Monoclonal Gammopathy of Renal Significance
MGUS	Monoclonal gammopathy of unknown significance
MM	Multipel myeloom
mOS	Median Overall Survival
MRD	Minimal Residual Disease
MW	Morbus Waldenström
MZL	Marginale Zone Lymfoom
NDMM	Newly diagnosed Multipel Myeloom
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NGS	Next-Generation Sequencing
Non-HRD	Non-Hyperdiploid
PFS	Progressievrije overleving
PI	Proteasoom Inhibitor
POEMS	Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, Monoclonal protein, Skin manifestations
QoL	Quality of life
R-ISS	Revised International Staging System
ROC	Receiver Operating Characteristic
RRMM	Relapsing-Remitting Multipel Myeloom
SMM	Smouldering Multipel Myeloom
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF3	TNF receptor associated factor 3
VRD	Velcade-Revlimid-Dexamethasone
WWOX	WW domain containing oxidoreductase

Appendix 1: supplementaire figuren



Figuur 1: Correlatie met anemie. Rechtsboven: weergave van het percentage CNV aberraties per chromosoom en voor de twee groepen. anemiayes (geel): Hemoglobine < 10 g/dl, anemiano (groen): Hemoglobine > 10 g/dl. De volle lijn geeft het absoluut verschil weer tussen de groepen. Rechtsonder: grafiek van de chromosoomloci met mogelijk voorspellend effect. Links: weergave van de ROC curve met AUC als inschatting van het voorspellend vermogen van CNV karyotype.