

Aus dem

Department für Diagnostische Labormedizin  
der Universität Tübingen

Institut für Pathologie und Neuropathologie

Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie  
und Pathologische Anatomie

**Mutationsanalyse als unterstützende Methode für die  
Unterscheidung des Subtyps des diffus großzelligen  
B-Zell-Lymphoms anhand der Ursprungszelle**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Mayer, Annika Katharina**

**2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. L. Quintanilla Martinez de Fend

2. Berichterstatter: Professorin Dr. U. Holzer

Tag der Disputation: 05.07.2024

## INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das diffus Großzellige B-Zell-Lymphom.....	1
1.2 Klinische Eigenschaften .....	1
1.3 Morphologische Eigenschaften .....	2
1.4 Ursprungszelle .....	3
1.4.1 Die Bedeutung des Keimzentrums .....	8
1.5 Molekulare Klassifikation des DLBCLs.....	8
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit .....	11
2 Material und Methoden .....	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Geräte.....	13
2.1.2 Kits.....	14
2.1.3 Primer .....	15
2.1.4 Reagenzien.....	16
2.1.5 Chemikalien .....	16
2.1.6 Antikörper und FISH-Sonden .....	17
2.1.7 Puffer.....	17
2.1.8 Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.9 EDV-Programme und Online-Software/Datenbanken .....	18
2.1.10 Hersteller .....	18

# Inhaltsverzeichnis

2.2	Methoden	20
2.2.1	Immunhistochemische Färbung	20
2.2.2	DNA-Extraktion	20
2.2.3	Quantitative und qualitative DNA-Untersuchungsmethoden	21
2.2.4	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	23
2.2.5	Next-Generation-Sequencing	24
2.2.6	Statistische Methoden	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Zusammenstellung des Patientenkollektivs	34
3.2	Immunhistochemische Merkmale	37
3.2.1	Verteilung der immunhistochemischen Färbungen des HA	39
3.3	Ergebnisse der FISH-Analyse	39
3.4	DNA-Integrität und -Quantität	42
3.5	Mutationsanalyse via NGS	43
3.5.1	Mutationsverteilung nach COO-Subtyp	51
3.5.2	Zusammenführung der IHC und Mutationsanalyse	52
3.5.3	Identifikation des dreifach positiven GCB-Subtyps	57
3.5.4	Zuordnung zu molekularen Subtypen	60
3.5.5	Hotspot-Mutationen	63
3.5.6	Validierung	63
4	Diskussion	68
4.1	Immunhistochemische und epidemiologische Merkmale	69
4.2	Genetische Merkmale	70
4.2.1	Translokationen	70
4.2.2	Mutationsanalyse	71
4.2.3	Charakterisierung des dreifach positiven GCB-Subtyps	73

4.3	Ausblick	75
5	Zusammenfassung	78
6	Literaturverzeichnis	79
7	Erklärung zum Eigenanteil	87
8	Veröffentlichungen	88
9	Danksagung	89

## Abbildungsverzeichnis

### ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Histologische Darstellung des DLBCL, NOS der verschiedenen morphologischen Subtypen .....	2
Abbildung 2: Model der Entwicklung des DLBCLs in Abhängigkeit von der Ursprungszelle .....	4
Abbildung 3: Darstellung der morphologischen und immunhistochemischen Färbungen des Hans-Algorithmus .....	6
Abbildung 4: Model der Differenzierung molekularer Subgruppen des DLBCL, NOS .....	10
Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Gelelektrophorese zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA .....	42
Abbildung 6: Graphische Darstellung einer MYD88 <sup>L265P</sup> -Mutation .....	43
Abbildung 7: Mutationsverteilung nach Subtyp .....	51
Abbildung 8: Morphologische und immunhistochemische Darstellung eines Falls vom dreifach positiven GCB-Subtyp .....	60
Abbildung 9: Überblick über alle 51 DLBCL, NOS-Fälle mit Mutationen eingeteilt nach COO .....	62

## Tabellenverzeichnis

### TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	PCR-Ansatz zur Analyse der DNA-Integrität .....	22
Tabelle 2:	Übersicht über das verwendete Ion AmpliSeq Custom Panel. ....	25
Tabelle 3:	Protokoll Library-Erstellung .....	26
Tabelle 4:	Protokoll zur FuPa Reagenz.....	27
Tabelle 5:	Protokoll Adapterligation .....	27
Tabelle 6:	Ansatz qPCR.....	29
Tabelle 7:	Fusion-PCR zur Herstellung der Einzelamplikons .....	32
Tabelle 8:	Patientencharakteristika .....	35
Tabelle 9:	Verteilung der immunhistochemischen Färbungen nach COO-Subtyp.....	38
Tabelle 10:	Ergebnisse der FISH-Analyse nach COO-Subtyp .....	40
Tabelle 11:	FISH-Ergebnis nach Immunhistochemie .....	41
Tabelle 12:	Übersicht Mutationsverteilung .....	45
Tabelle 13:	Übersicht aller nachgewiesenen Mutationen. ....	46
Tabelle 14:	Übersicht Immunhistochemie, Mutationsanalyse und FISH-Analyse aller analysierter Proben .....	53
Tabelle 15:	Patientencharakteristika nach Subtyp aufgeteilt nach immunhistochemischen Status.....	58
Tabelle 16:	Immunhistochemische Charakteristika dreifach positiver GCB-Fälle .....	59
Tabelle 17:	Verteilung der Abdeckung nach Gen .....	64
Tabelle 18:	Übersicht der durchgeführten Validierungen und bestätigten Mutationen .....	65

## Abkürzungsverzeichnis

### ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	activated B-cell
AID	activation-induced cytidine deaminase
aSHM	aberrant somatic hypermutation
bp	base pair
CDS	coding sequence
COMS	complementary metal-oxide semiconductor
COO	Cell of Origin
CSR	class switch recombination
DLBCL, AE	diffuse large B-cell lymphoma with aberrant coexpression of CD10 <sup>+</sup> BCL6 <sup>+</sup> MUM1 <sup>+</sup>
DLBCL, NOS	diffuse large B-cell lymphoma not otherwise specified
DNA	deoxyribonucleic acid
EA	Einzelamplikon
emPCR	Emulsions-PCR
FDC	follikuläre dendritische Zellen
FFPE	formalin-fixed, paraffin embedded
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GCB	germinal B-cell
GEP	gene expression profiling
HA	Hans-Algorithmus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGBCL	high-grade B-cell lymphoma
HGVS	Human Genome Variation Society
ICC	International Consensus Classification
IGV	Integrative Genomics Viewer
IHC	Immunhistochemie
ISFET	Ion-sensitive field-effect transistor



## Abkürzungsverzeichnis

ISP	Ion Sphere™ particles
NGS	next-generation sequencing
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PCR	polymerase chain reaction
PFS	progression-free survival
PGM	personal genome machine
qPCR	qualitative PCR
R-CHOP	Immunchemotherapieprotokoll aus Rituximab, Cyclophosphamid; Doxorubicin; Vincristin; Prednison
SBS	sequencing by synthesis
TMAP	Torrent Mapping Alignment Program
VAF	variant allele frequency
WHO	World Health Organization

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DAS DIFFUS GROSZELLIGE B-ZELL-LYMPHOM

Bei Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) handelt es sich um eine historisch gewachsene, heterogene Gruppe an Lymphomen, deren gemeinsames Merkmal ist, dass sie kein Hodgkin-Lymphom sind. Diese große Gruppe der NHL kann nach verschiedenen Parametern, wie Zellart (B- oder T-Zelle), Morphologie und Lokalisation sowie nach klinischen, pathologischen, genetischen und infektiologischen Eigenschaften eingeteilt werden (Swerdlow et al. 2017). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem häufigsten Typ der NHL, dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (engl.: diffuse large B-cell lymphoma [DLBCL]). Es gehört zur Gruppe der aggressiven, reifen B-Zell-Lymphome und macht 31 % der NHL aus (Jaffe et al. 2017; Kreuzer 2018).

## 1.2 KLINISCHE EIGENSCHAFTEN

Charakteristisch für das DLBCL sind schnell zunehmende Lymphknotenschwellungen und/oder extranodale Manifestationen (z. B. im Gastrointestinaltrakt, Knochen, Hoden oder Milz (Swerdlow et al. 2017)). Viele Patienten zeigen sich asymptomatisch, teilweise können Allgemeinsymptome (B-Symptomatik) wie z.B. Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsabnahme auftreten (Swerdlow et al. 2017). Mit der Erstlinientherapie mit dem Immunchemotherapieprotokoll R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamid; Doxorubicin; Vincristin; Prednison) besteht ein kurativer Therapieanspruch (Lenz et al. 2021). Die letzte bedeutsame Veränderung des Therapieregimes erfolgte 2002, mit der Erweiterung des Therapieregimes um Rituximab (Coiffier et al. 2002). Dieser gegen das auf B-Lymphozyten lokalisierte CD20 gerichtete, monoklonale Antikörper zeigte eine deutliche Erhöhung der Heilungsraten in allen Altersgruppen (Coiffier et al. 2010; Pfreundschuh et al. 2006) und ist seither für die konstante Heilungsrate von 60 bis 70 % mitverantwortlich (Jaffe et al. 2017; Kreuzer 2018; Sehn and Gascoyne 2015). Epidemiologisch wird eine Inzidenz des DLBCL in den USA als 2,7–9,3 pro 100.000 Personen pro Jahr berichtet (Morton et al. 2006). Kaukasisch stämmige Menschen sowie Personen,

## Einleitung

die dem männlichen Geschlecht angehören, sind häufiger betroffen (Morton et al. 2006).

### 1.3 MORPHOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN

Die überarbeitete fünfte Edition der WHO-Klassifikation von 2022 (Alaggio et al. 2022) und die 2022 International Consensus Classification (ICC) (Campo et al. 2022) unterscheiden das DLBCL, mit dem Suffix NOS (not otherwise specified) für nicht weiter spezifiziert, von anderen aggressiv/blastischen B-Zell-Lymphomen (Campo et al. 2022). Das DLBCL, NOS kann anhand morphologischer Kriterien (centroblastisch, immunoblastisch oder anaplastisch), immunhistochemischer Eigenschaften, molekularbiologisch oder biochemisch nachgewiesener Genexpression und/oder genetischen Veränderungen (z.B.: Translokation von *MYC*, *BCL2* und/oder *BCL6*) unterteilt werden. Als eigene Gruppe werden dabei DLBCL mit gleichzeitiger *MYC*- und *BCL2*- und/oder *BCL6*-Translokation (sogenannte Double-Hit- oder Triple-Hit-Lymphome) eingeteilt. Sie werden als High-Grade B-Zell-Lymphom definiert (Swerdlow et al. 2017; Lenz et al. 2021). Pathogenetisch ist das DLBCL eine heterogene Erkrankung.

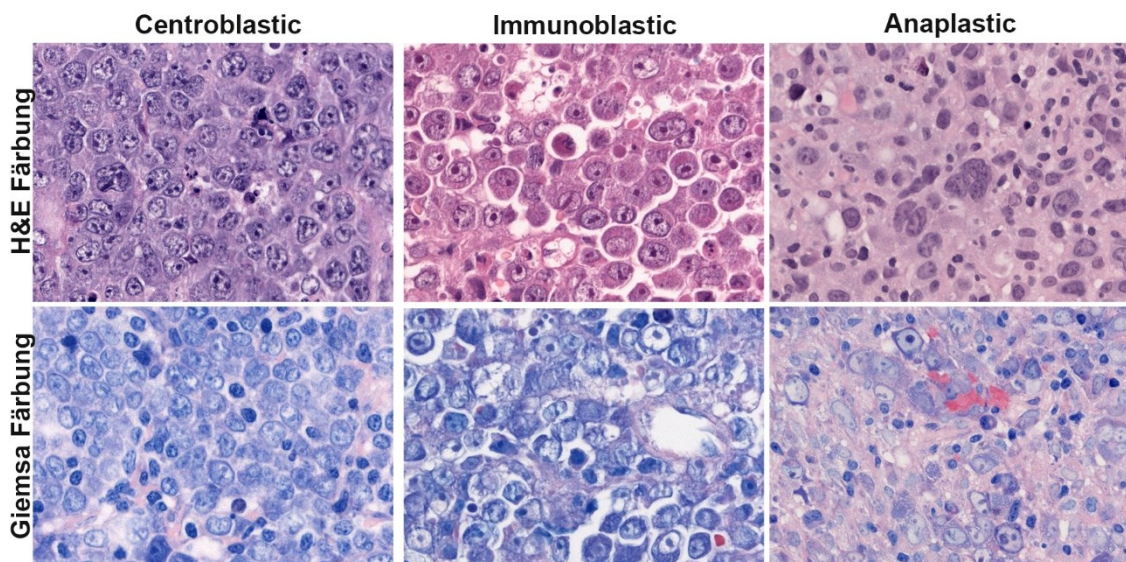


Abbildung 1: Histologische Darstellung des DLBCL, NOS der verschiedenen morphologischen Subtypen. Der centroblastische Subtyp zeigt typischerweise einen runden vesikulären Zellkern, mehrere kleine Nukleoli und einen schmalen Saum an Cytoplasma. Der immunoblastische Subtyp (hier in der Mitte) zeigt ebenfalls einen runden bis ovalen vesikulären Zellkern, jedoch nur einen größeren Nukleolus sowie etwas mehr basophiles Cytoplasma. Anaplastische DLBCL (hier rechts) sind oft größer und zeigen irregulär geformte Zellkerne. Vergrößerung: 630x.

## Einleitung

Ein Beispiel der Histologie bei DLBCL, NOS (Abbildung 1) zeigt, dass es sich vom Zellbild um einen „monoton“ erscheinenden Tumor mit diffus verteilten, großen Zellen mit mindestens doppelt so großen Kernen wie bei normalen Lymphozyten handelt. Immunhistochemisch zeigen die Tumorzellen B-Zell Marker wie CD19, CD20, CD22 und CD 79a. Typischerweise werden für die Charakterisierung eines DLBCLs die immunhistochemischen Färbungen auf CD10, BCL6 und MUM1/IRF4 zur Bestimmung der Ursprungszelle sowie BCL2 und MYC zum Screening auf mögliche Translokationen verwendet (Jaffe et al. 2017).

### 1.4 URSPRUNGSZELLE

Basierend auf Ähnlichkeiten mit der mutmaßlichen Ursprungszelle (Cell of Origin [COO]) lassen sich anhand der Genexpressionsanalyse (GEP) in drei Untergruppen einteilen: von keimzentrumsartigen (germinal center B-cell [GCB]-like) oder aktivierten B-Zellen ähnlichen (activated B-cell [ABC]-like) Zellen ausgehende Untergruppe (Alizadeh et al. 2000). Im Folgenden werden diese als Subtyp GBC und Subtyp ABC des DLBCL abgekürzt. Jedoch bleiben ca. 10–15 % der Fälle unklassifizierbar und können nicht eindeutig einem der beiden Subtypen zugeordnet werden (Rosenwald et al. 2002).

## Einleitung

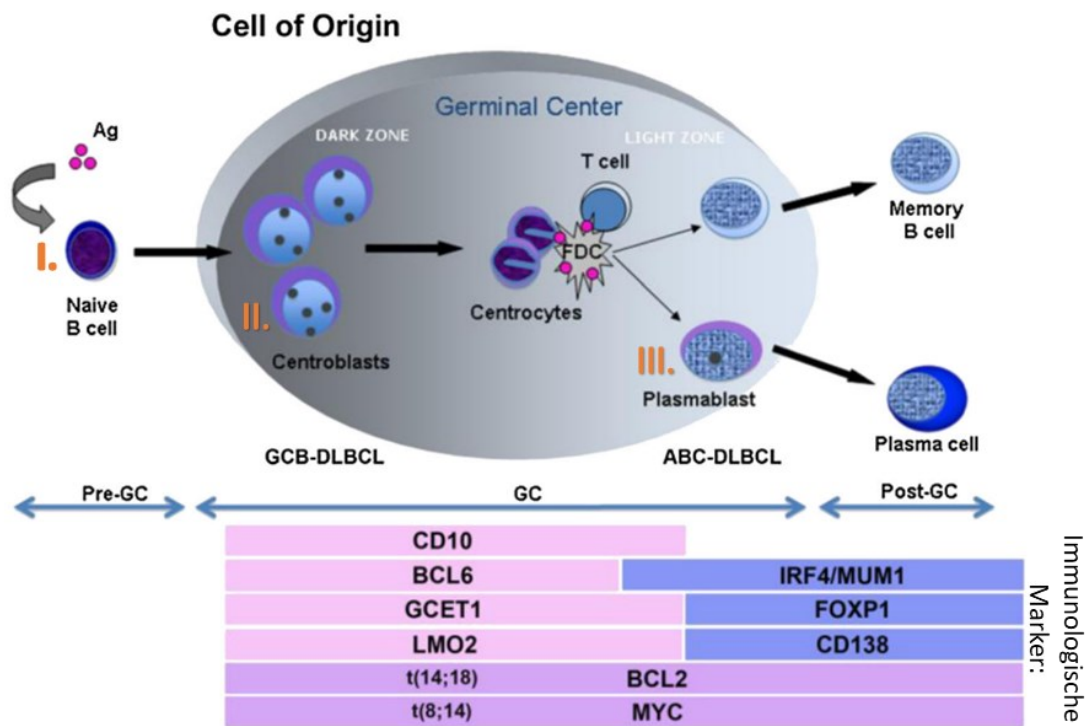


Abbildung 2: Model der Entwicklung des DLBCLs in Abhängigkeit von der Ursprungszelle. Der naive B-Lymphozyt löst nach Antigenkontakt im Primärfollikel sekundärer lymphatischer Organe (Lymphknoten, Milz, Tonsillen) die Entstehung eines Keimzentrums (germinal center [GC]) aus (I.). Dies führt zur Umwandlung zum Sekundärfollikel, durch die B-Zell-Proliferation entstehen Centroblasten (II.). Während der Reifung der Zellen zur Immunkompetenz wie Gedächtniszellen (Memory B cell) und Plasmazellen (Plasma cell) spielen auch T-Zellen und folliculäre dendritische Zellen (FDC) eine Rolle. Die unmittelbaren Vorläufer der Plasmazellen, die Plasmablasten, verlassen die helle Zone des Keimzentrums (III.). Für die GCB-DLBCL bzw. ABC-DLBCL sind die Centroblasten bzw. Plasmablasten die Ursprungszellen. Beide Zelltypen befinden sich zwar prinzipiell im GC-Bereich (großer Doppelpfeil), jedoch zeigt nur der GCB-Subtyp Keimzentrummarker (modifiziert nach Quintanilla-Martinez (2015)).

Diese Einteilung entspringt der Vorstellung, dass das DLBCL, NOS aus mindestens zwei Subgruppen besteht, deren Ursprungszellen sich in unterschiedlichen Entwicklungszuständen in der B-Zell-Entwicklung befinden (Rosenwald et al. 2002). In Abbildung 2 werden der Ort der Ursprungszelle und der Weg der Entstehung der molekularen Subtypen GBC und ABC des DLBCL schematisch veranschaulicht. Der naive B-Lymphozyt (in Abbildung 2: I.) löst nach Antigenkontakt im Primärfollikel sekundärer lymphatischer Organe (Lymphknoten, Milz, Tonsillen) die Entstehung eines Keimzentrums (germinal center [GC]) aus, das als Oval mit der dunklen Zone links und der hellen Zone rechts dargestellt ist. Die komplexen, immunologischen Vorgänge, die im Keimzentrum ablaufen und den Primärfollikel zum Sekundärfollikel umwandeln, führen dazu, dass in der dunklen Zone eine sehr hohe B-Zell-Proliferation

## Einleitung

einsetzt, die von den Centroblasten (siehe Abbildung 2: II.) getragen wird. Während der Reifung der Zellen zur Immunkompetenz von Gedächtniszellen (in Abbildung 2 Memory B cell genannt) und Plasmazellen (in Abbildung 2 Plasma cell genannt) spielen auch T-Zellen und folliculäre dendritische Zellen (FDC) eine Rolle. Die unmittelbaren Vorläufer der Plasmazellen, die Plasmablasten, sind kurz davor, die helle Zone des Keimzentrums zu verlassen (siehe Abbildung 2: III.). Bei der Entstehung der in der Abbildung mit GCB-DLBCL und ABC-DLBCL angesprochenen Subtypen GCB und ABC sind die Centroblasten bzw. Plasmablasten offenbar die Ursprungszellen. Beide Zelltypen befinden sich zwar prinzipiell im GC-Bereich (großer Doppelpfeil in Abbildung 2), jedoch wird nur die Ursprungszelle beim Subtyp GCB des DLBCL als keimzentrums B-Zell-ähnlich (GCB) etikettiert. Beim Subtyp ABC sind die während der Reifungsphase abgelaufenen Aktivierungsvorgänge der B-Zellen namensgebend. In Abbildung 2 sind immunologische Marker der verschiedenen Reifungsstadien und das Auftreten von Translokationen bei den Tumoren aufgeführt. Man sieht z.B. die Positivität von CD10 als wichtigster Marker, die sich nur bis in die nicht ganz späten Stadien der B-Zell-Reifung im Keimzentrum erstreckt, aber die frühen Stadien mit den Centroblasten einschließt, aus denen sich der Subtyp GCB ableitet. Bei den tumorassoziierten Translokationen der Onkogene *BCL2* von Chromosom 14 auf 18 (t[14;18]) und *MYC* von 8 auf 14 (t[8;14]) ist die prognostische Bedeutung unabhängig von dem Reifungsstadium bzw. der Ursprungszelle der Subtypen GCB oder ABC verzeichnet (vgl. siehe 1.4.1).

Es gibt verschiedene methodische Vorgehen zur Differenzierung des DLBCL in die Subtypen, GCB und ABC, anhand der Ursprungszelle. Die Klassifizierung kann mittels GEP, molekulargenetisch oder immunhistochemisch erfolgen. Zur genaueren Einteilung in Subtypen anhand der Ursprungszelle wurden verschiedene immunhistochemische Algorithmen entwickelt, wie z.B. der Hans-Algorithmus, der Tally-Algorithmus oder der (modifizierte) Choi-Algorithmus (Choi et al. 2009; Meyer et al. 2011; Hans et al. 2004). Routinemäßig wird zur Differenzierung der Algorithmus nach Hans eingesetzt (Swerdlow et al. 2016). Dabei werden drei immunhistochemische Färbungen angewandt: CD10, welches am wichtigsten ist, gefolgt von BCL6 und MUM1/IRF4 (Rosenwald et al. 2002; Hans et al. 2004). Für



## Einleitung

die Zuordnung eines Falls zum Subtyp GCB genügt als Kriterium der positive Ausfall der Reaktion auf CD10. Ist CD10 negativ, wird die Konstellation von BCL6 positiv und MUM1/IRF4 negativ als ebenfalls auf den Subtyp GCB hinweisend angesehen. Alle anderen Möglichkeiten werden dem Subtyp non-GCB zugeordnet (Hans et al. 2004), also nicht ausdrücklich den Subtyp ABC klassifizierend, aber diesen beinhaltend.

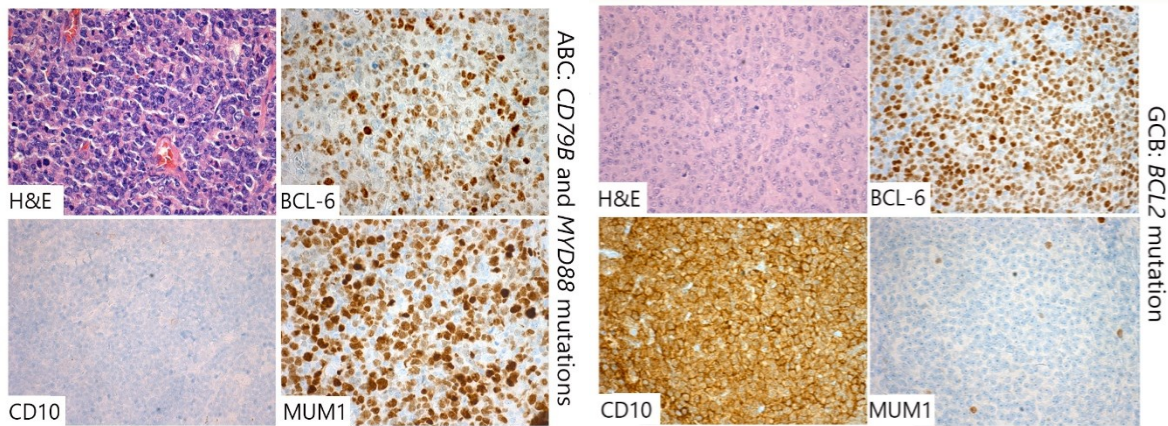


Abbildung 3: Darstellung der morphologischen und immunhistochemischen Färbungen des Hans-Algorithmus. Links zeigt sich die negative CD10-Färbung sowie die positiven BCL6- und MUM1/IRF4-Färbungen, entsprechend des non-GCB-Subtyps. In der genetischen Analyse zeigte sich eine CD79B- und MYD88-Mutation, sodass es sich um ein ABC-DLBCL handelt. Rechts zeigt sich die positive CD10-Färbung, positive BCL6-Färbung und negative MUM1/IRF4-Färbung. Entsprechend eines GCB-Subtyps. Genetisch konnte eine zum GCB passende BCL2-Mutation nachgewiesen werden. Vergrößerung 400x.

Die Abbildung 3 zeigt die immunhistochemische Darstellung eines typischen DLBCLs, NOS jeweils vom GCB und vom non-GCB-Subtyp. Dieses einfache Vorgehen bei der Unterscheidung der Subtypen im Hinblick auf die Ursprungszelle des Tumors wird von der 2022 ICC und 5. Auflage der WHO-Klassifikation von 2022 weiterhin empfohlen. Jedoch wird erwartet, bald molekulargenetische Klassifikationssysteme etablieren zu können (Song et al. 2023). Der Goldstandard bzw. die Definitionsbasis zur Bestimmung der Ursprungszelle bleibt die molekularbiologische bzw. biochemische GEP (Swerdlow et al. 2017; Quintanilla-Martinez 2017). Die Immunhistochemie stellt lediglich ein Surrogatverfahren für die GEP dar (Swerdlow et al. 2016; Quintanilla-Martinez 2017). So zeigte (Meyer et al. 2011), dass die Gruppenzuordnung nach dem Hans-Algorithmus zu etwa 86 % mit der molekularen Zuordnung durch GEP übereinstimmt. Die gewisse Abweichung

## Einleitung

erklärten Swerdlow et al. (2016) unter anderem durch das Potenzial der GEP zwischen dem ABC-Subtyp und unklassifizierbaren Fällen differenzieren zu können. Diese Unterscheidung wird in der Immunhistochemie mit der pauschalen Einteilung als „non-GCB“ nicht gemacht.

Die Bedeutung der auf die Ursprungszelle bezogenen Subtypisierung des DLBCL, NOS hat sich, wie bereits dargelegt, von der Wissenschaft bisher nur wenig auf die Klinik ausgeweitet. Immerhin scheint ein gewisser prognostischer Nachteil des ABC-Subtyps gegenüber dem GCB-Subtyp zu bestehen (Swerdlow et al. 2017; Sehn and Salles 2021). Die Zuordnung zu GCB und damit die Identifizierung von Fällen mit Überlebensvorteil gelingt sicherer mittels GEP als mit immunhistochemischen Algorithmen (Swerdlow et al. 2016; Sehn and Salles 2021). Im gegenwärtigen Stadium hat die Zuordnung zu einem der Subtypen noch keine standardisierten therapeutischen Konsequenzen. Man strebt an, die Typisierung von Untergruppen des DLBCL, NOS zu verfeinern, in der Hoffnung, Subtypen zu identifizieren, die gezieltere Therapieansätze als die bisherigen zulassen. Die oben angeklungenen Unstimmigkeiten bei der Subtypisierung des Tumors müssen dazu zunächst überwunden werden.

Unterteilungen der Gruppe des DLBCL, NOS nach verschiedenen Kriterien sind einerseits von wissenschaftlichem Interesse, haben aber andererseits zum Ziel, Patientenkohorten nach Untergruppen zu separieren, die hinsichtlich des Verlaufs, der Prognose und der Therapie unterschiedlich sind, und deren Identifizierung somit dem Benefit der Patienten dienlich sein kann. Als relevant gilt die Unterscheidung in die durch die Ursprungszelle definierten Subtypen GCB und ABC des DLBCL (Alizadeh et al. 2000). Dabei ist die klinische Bedeutung dieser Unterscheidung noch nicht genau erwiesen, jedoch wird eine schlechtere Prognose der Patienten mit dem ABC-Subtyp des DLBCLs vermutet (Sehn and Salles 2021).



### 1.4.1 DIE BEDEUTUNG DES KEIMZENTRUMS

Das Keimzentrum des Lymphfollikels führt zur Bereitstellung hochaffiner Antikörper-produzierender Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen für erworbene Immunität. Die dazu notwendige starke Proliferation in der dunklen Zone des Keimzentrums geht mit somatischer Hypermutation in variablen Regionen des B-Zell-Rezeptors einher, um möglichst hohe B-Zellrezeptor-Affinität für das Antigen zu erreichen. Solche normalen Vorgänge bergen eine gewisse Gefahr für eine akzidentelle Tumorentstehung in sich (Pasqualucci 2019). Bei der somatischen Hypermutation kommt es u.a. zu erwünschten DNA-Brüchen, die aber auch zu unerwünschtem DNA-Umbau führen können. Insgesamt toleriert das Keimzentrum somit eine gewisse genetische Instabilität. Die Mutagenese wird von dem Enzym aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AID) gesteuert. Dieses Enzym steuert auch den Klassenwechsel der Immunglobuline (class switch recombination [CSR]), bei dem Umbauvorgänge der DNA es ermöglichen, dass B-Zellen bei erhaltener Antigen-Spezifität ihren Antikörper-Isotyp wechseln und z.B. die Isotypen IgA, IgE, IgG bereitstellen (Pasqualucci et al. 2008). Diese Vorgänge können onkogene Translokationen begünstigen, finden aber nach neuerer Erkenntnis bevorzugt vor der B-Zell-Reifung im Keimzentrum statt. Letztlich werden jedoch im Keimzentrum die immunkompetentesten B-Zellen ausgewählt, der Rest wird zur Apoptose gebracht. Dazu muss die BCL2-Expression herunterreguliert werden. Bei Zellen mit t(14;18)-Translokation fehlt diese Herunterregulierung. Dadurch besteht die Gefahr genomischer Instabilität und des Erwerbs sekundärer genomischer Veränderungen, weil die Entfernung der überflüssigen Zellen nicht gewährleistet ist (Basso and Dalla-Favera 2015; Pasqualucci 2019). Die angesprochenen Vorgänge werfen auch Licht auf die Pathogenese des DLBCL, das mit seinen Subtypen im Keimzentrum des Lymphfollikels, einem Hotspot für mögliche Tumorentwicklung, ausgelöst werden kann.

### 1.5 MOLEKULARE KLASSIFIKATION DES DLBCLs

Während bei der Subtypisierung bisher vor allem die Expressionsmuster intakter Gene einschließlich des Surrogats der Immunhistochemie mit einigem Erfolg genutzt wurden, ist der zusätzliche molekulare Zugang über Mutationsmuster der

## Einleitung

Gene in seinem Potenzial eine der großen Themen in der aktuellen Forschung (Sehn and Salles 2021; de Leval et al. 2022). Beim Subtyp GCB sind neben Translokationen in *BCL2*, Mutationen in *BCL2* und *EZH2* relativ charakteristisch (Pasqualucci 2019; Pasqualucci and Dalla-Favera 2015; Swerdlow et al. 2017). Dagegen kommen beim Subtyp ABC offenbar Veränderungen der Gene *CARD11*, *CD79A/B*, *MYD88*, *TNFAIP3* und *PDRM1* (Pasqualucci and Dalla-Favera 2015; Sehn and Gascoyne 2015; Swerdlow et al. 2017) vor, wobei dieses Mutationsmuster der Aktivierung des NF-κB-Signalwegs und der Blockierung der B-Zell-Differenzierung entspricht (Davis et al. 2001; Sehn and Gascoyne 2015; Pasqualucci and Dalla-Favera 2015; Lenz et al. 2008). Die Genuntersuchungen haben den Aufschwung seit der Einführung des Next-Generation-Sequencings (NGS) genutzt, so dass inzwischen z. B. genetische Landkarten angelegt werden können, die die Verteilung häufiger Mutationen bei den beiden Subtypen des DLBCL darstellen (Pasqualucci and Dalla-Favera 2014; Swerdlow et al. 2017; de Leval et al. 2022).

## Einleitung

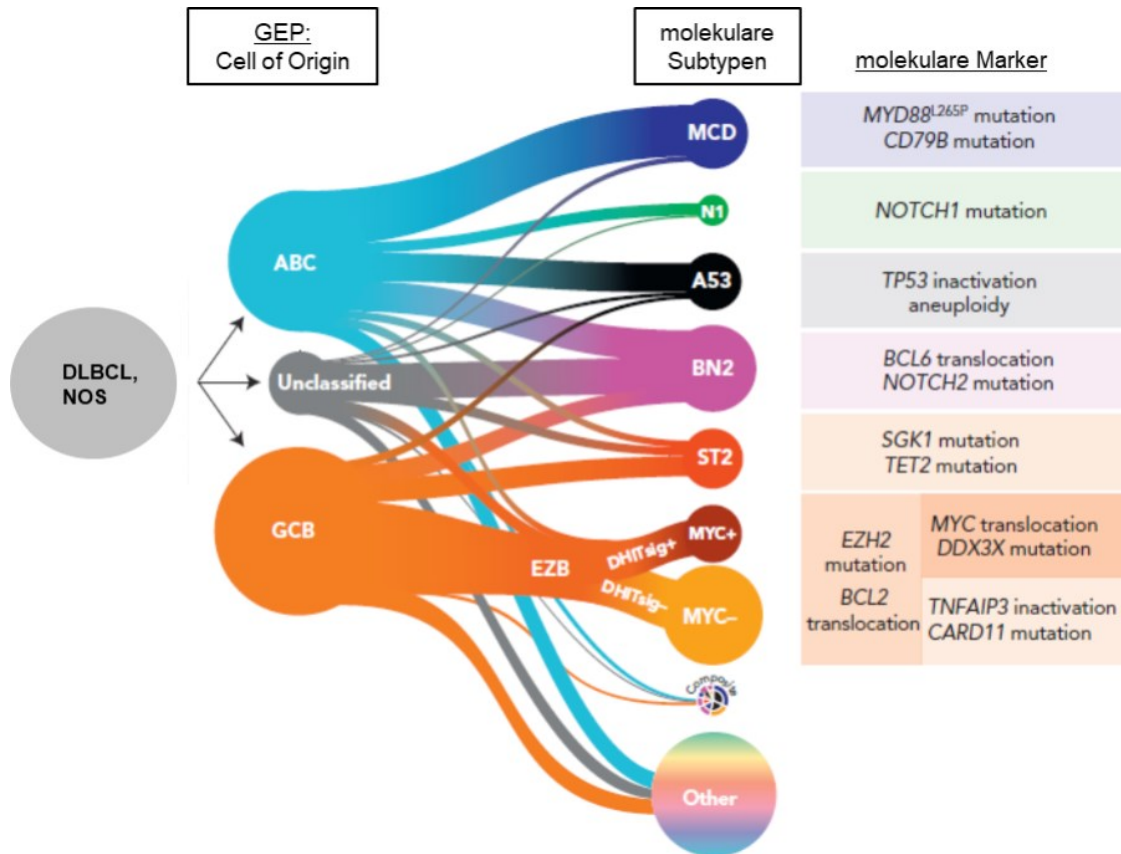


Abbildung 4: Model der Differenzierung molekularer Subgruppen des DLBCL, NOS. Eingeteilt anhand des LymphGen Algorithmus verändert nach de Leval et al. (2022). Das Verhältnis der dichotomen COO-Analyse via GEP bezogen auf eine aktuell vorgeschlagene genetische Subklassifizierung ist dargestellt. Subklassen des LymphGen Algorithmus: MCD, N1, A53, BN2, ST2, EZB, Composite: passend zu zwei oder mehr genetischen Subgruppen, Other: keine passende genetische Zuordnung, GEP: Genexpression, COO: Cell of Origin (Ursprungszelle), DLBCL, NOS: diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, nicht anderweitig spezifiziert.

Aktuelle große Studien zum genetischen Profil des DLBCLs stellen Cluster aus 4 bis 7 verschiedenen molekularen Subtypen dar (de Leval et al. 2022). In Abbildung 4 zeigt ein Model von de Leval et al. (2022) die Beziehung der COO-Einteilung via GEP und der Einteilung in mögliche genetische Subgruppen anhand molekularer Marker. Die ersten derartigen Einteilungen wurden von Chapuy et al. (2018) in 6 verschiedene Cluster C0–C5 vorgeschlagen und Wright et al. (2020) in die Subtypen MCD; N1, A53, BN2, ST2, EZB-MYC<sup>+</sup>, EZB-MYC<sup>-</sup> erweitert. Teilweise überlappen sich die verschiedenen definierten Subtypen (Song et al. 2023). Song et al. (2023) stellten die Überschneidung der EZB-MYC<sup>-</sup> Gruppe von Wright et al. (2020) mit dem Cluster C3 von Chapuy et al. (2018) dar. Beide zeigen genetische Veränderung in *EZH2* und *BCL2* und scheinen dem GCB-Subtyp anzugehören. Als weiteres Beispiel zeigten Song et al. (2023) das

## Einleitung

Cluster C5 bzw. den MCD-Subtyp, beide zeigen häufig *MYD88*- oder *CD79B*-Mutationen und scheinen dem ABC-Subtyp anzugehören.

Auch Lacy et al. (2020) zeigten einen Einteilungsvorschlag in 5 molekulare Subtypen, die teilweise mit den von Chapuy et al. (2018) und Schmitz et al. (2018) vorgeschlagenen überlappen.

2022 wurden von Morin et al. (Morin, Arthur, and Hodson 2022) in einem Review die Gemeinsamkeiten der verschiedenen vorgeschlagenen molekularen Subgruppen anhand ähnlicher Biologie und onkogenen Signalwege dargestellt. Morin, Arthur, and Hodson (2022) betonten die Wichtigkeit weiterer genaueren Analysen, um die Einteilung und damit ggf. auch die Therapie zu optimieren und somit die Prognose der Patienten besser einschätzen zu können. Gleichzeitig betonen sie, dass eine einheitliche molekulargenetische Subgruppen-Einteilung die Vergleichbarkeit der Studien sicherstellt.

### 1.6 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, durch ein Amplikon-basiertes NGS-Panel weitere Mutationsmuster hinsichtlich der Subtypen des DLBCL zu identifizieren. Für bestimmte bekannte Signalwege, wie dem NF- $\kappa$ B-Signalweg, stehen Medikamente wie Bortezomib oder Lenalidomid für die sogenannte zielgerichtete Krebstherapie („targeted therapy“) zur Verfügung (Dunleavy et al. 2009; Nowakowski et al. 2015; Pasqualucci and Dalla-Favera 2015). Einige dieser Medikamente wurden bisher in kontrollierten Studien (Nowakowski et al. 2015; Leonard et al. 2017; Camicia, Winkler, and Hassa 2015) eingesetzt, jedoch mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen (Sehn and Salles 2021). Dabei variierte die Methode bzw. die Definitionsbasis zur Einteilung der Subtypen erheblich. So wurde die Einteilung teils auf Basis der GEP und teils mit Hilfe der IHC vorgenommen. Dies kann zur Erklärung der Widersprüchlichkeit der Ergebnisse beitragen und zeigt die Notwendigkeit der Verfeinerung der Subtypeneinteilung, um künftig auf einer einheitlichen und leicht zugänglichen Basis weitere Forschung betreiben zu können. Auch basiert der angenommene Wirkmechanismus einzelner Medikamente auf theoretischen Überlegungen oder in vitro Analysen, sodass voreilige Schlüsse in Anbetracht der inkompletten

## Einleitung

Kenntnisse der Mutationsspektren der Subtypen problematisch sein könnten (Pasqualucci and Dalla-Favera 2015; Sehn and Gascoyne 2015; Sehn and Salles 2021). Ferner wird in dieser Arbeit die Frage behandelt, inwieweit durch Mutationsanalyse abgegrenzte Subtypen sich mit den Subtypen decken, die bei Anwendung des Hans-Algorithmus ermittelt werden, oder auch, ob beide Zugänge sich ergänzen, um zu einer belastbaren Aussage zu kommen.

Eine Präzisierung der Einteilung in Subgruppen auf Basis des Mutationsspektrums könnte eine Verbesserung der Behandlung von Patienten führen und ein genaueres Verständnis für die Entstehung der Erkrankung ermöglichen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 GERÄTE

<i>Gerätbezeichnung:</i>	<i>Hersteller</i>
Axio Imager.M2 mit ApoTome.2 System	Zeiss
BenchMarkULTRA	Ventana Medical Systems
Centrifuge/Vortex Combi-Spin FVL2400	Peqlab
Färbeautomat Tissue-Tek® Prisma® Folieneindeckautomat	Sakura
FlexCycler	Analytik Jena
Geldokumentationssystem CN-300-WL/LC	Peqlab
Gelkammer	Peqlab
Heraeus Biofuge fresco	Heraeus Holding
Heraeus Multifuge 1L-R	Heraeus Holding
HM 355S automatisches Mikrotome	Fisher Scientific
Ion Chef™ Instrument	Thermo Fisher Scientific
Ion Chip™ Minifuge	Thermo Fisher Scientific
Ion OneTouch™ 2 System	Thermo Fisher Scientific
Ion PGM™ Torrent Server	Thermo Fisher Scientific
Ion Torrent PGM™	Thermo Fisher Scientific
LightCycler® 480 Instrument	Roche
Magnetplatte DynaMag™-96 Side	Thermo Fisher Scientific
Magnetständer DynaMag-2 Magnet	Thermo Fisher Scientific
Maxwell® 16 MDx Instruments	Promega
Mixer Uzusio VTX 3000L	LMS Consult
NanoDrop™ 2000	Thermo Scientific
Pipettierhelfer accu-jet	Brand
Pipetten	Eppendorf

## Material und Methoden

Qubit® 3.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific
Skalpell	pfm medical ag
Spannungsgerät GPS 200/400	Pharmacia
Sterilwerkbank HERsafe	Heraeus
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tissue-Tek® Film®	Sakura
Vortexer	Biozym
Waage	Sartorius

### 2.1.2 KITS

#### *Kit:*

Agencourt® CleanSEQ® Kit	Beckman Coulter
GenomeLab™ DTCS - Quick Start Kit	Beckman Coulter
Ion 318™ Chip Kit v2 BC	Thermo Fisher Scientific
Ion AmpliSeq™ Kit for Chef DL8	Thermo Fisher Scientific
Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0	Thermo Fisher Scientific
Ion Library TagMan® Quantitation Kit	Thermo Fisher Scientific
Ion PGM Hi-Q-View OT2 Kit	Thermo Fisher Scientific
Ion PGM™ Hi-Q™ View Chef Kit	Thermo Fisher Scientific
Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific
Ion Sphere™ Quality Control Kit	Thermo Fisher Scientific
Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit	Thermo Fisher Scientific
HighPrep™ PCR Clean Up Kit	Merck
LymphoTrack® FR1 IGH Assay - PGM™ Kit	Invivoscribe
Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit	Promega
Qubit® dsDNA HS Assay Kits	Thermo Fisher Scientific

#### *Hersteller:*

## Material und Methoden

### 2.1.3 PRIMER

5'-3'Richtung angegeben.

Primer zur DNA-Qualitätsbestimmung:

AF4/X3U	GGAGCAGCATTCCATCCAGC
AF4/X3L	CATCCATGGGCCGGACATAA
AF4/X11U	CCGCAGCAAGCAACGAACC
AF4/X11L	GCTTTCCTCTGGCGGCTCC
PLZF/X1U	TGCGATGTGGTCATCATGGTG
PLZF/X1L	CGTGTCATTGTCTGTCTGAGGC
RAG1/X2U	TGTTGACTCGATCCACCCCA
RAG1/X2L	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA
TBXAS1/X9U	GCCCGACATTCTGCAAGTCC
TBXAS1/X9L	GGTGTTGCCGGGAAGGGTT

Primeranhänge für die Validierung, Prinzip siehe Absatz 2.2.5.10

A-Adapter CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG

trP1-Adapter CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT

Verbindungsstück GAT

Primer für die Validierung

<i>CARD11</i> -856-857-F	GCTCCTCTCTTCGCTCCC
<i>CARD11</i> -856-857-R	GTTTGAAGCTGGCGAGATCC
<i>CARD11</i> -1045-1047-F	GCAGAAGACGGAGACCATCA
<i>CARD11</i> -1045-1047-R	AGGATCATCACGGAGGGTC
<i>EZH2</i> -Ex16-646-R	TGAATACAGGTTATCAGTGCCTT
<i>EZH2</i> -Ex16-646-F	TATTGCTGGCACCATCTGAC
<i>IRF4</i> -54-60-F	GTGTGGGAGAACGAGGAGAA



## Material und Methoden

<i>IRF4-54-60-R</i>	GGCCGGAGACCTTGAAGAG
<i>IRF4-Exon2-F</i>	CGGGGCATGAACCTGGAG
<i>IRF4-Exon2-R</i>	CGGTTGTAGTCCTGCTTGC
<i>IRF4-1-35-F</i>	TCTCCCCGCAGTGCAGAG
<i>IRF4-1-35-R</i>	TCGTTCTCCCACACCAGC
<i>IRF4-35-72-F</i>	GAAGCTCCGCCAGTGG
<i>IRF4-35-72-R</i>	CTCTGTCTCTGGGCCCTC
<i>PIM1-1-9-F</i>	GCCCTCAGTTGTCCTCCG
<i>PIM1-1-9-R</i>	CTTGGTGGCGTGCAGGTC
<i>PIM1-32-59-F</i>	ACTGAGTCCCCGTGCTTC
<i>PIM1-32-59-R</i>	GTCAGGTTCCCTCGTCCG
<i>BCL2-192-F</i>	TGAGGCTCCGAC
<i>BCL2-192-R</i>	TGAGGCTCCGAC

Die Primer wurden im Auftrag von der Firma Merck synthetisiert.

### 2.1.4 REAGENZIEN

#### *Reagenz:*

6X DNA Loading Dye

AmpliTaq Gold Polymerase

dNTPs

Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1

GelRed Nucleic Acid Stain

GeneRuler 100 bp DNA Ladder

Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity

#### *Hersteller:*

Thermo Scientific

Thermo Scientific

Thermo Scientific

Invitrogen™

Biotium

Thermo Scientific

Thermo Fisher Scientific

### 2.1.5 CHEMIKALIEN

#### *Chemikalie:*

#### *Hersteller:*

## Material und Methoden

Ethanol p.a.	Merck
Gibco™ Distilled Water	Life Technologies
LE Agarose	Biozym
NaOH 1 M	Merck
Xylol	VWR

### 2.1.6 ANTIKÖRPER UND FISH-SONDEN

#### *Sonde/Antikörper:*

#### *Hersteller:*

BCL2 (100/D5)	DCS
BCL6 (GI191E/A8)	Zyted
CD10 (56C6)	Novocastra
CD20 (L26)	DAKO
MYC (y69)	Roche
Ki67 (MiB-1)	DAKO
MUM1 (Mum1p)	DAKO
Vysis BCL6 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe	Abbott
Vysis LSI BCL2 Dual Color BAP	Abbott
Vysis MYC Dual Color Break Apart Rearrangement Probe	Abbott

### 2.1.7 PUFFER

#### 5x TBE-Puffer für die Gelelektrophorese:

#### *Endkonzentration in 1 L:*

#### *Hersteller:*

445 mM Tris	Sigma-Aldrich
445 mM Borsäure	Merck
12,5 mM EDTA	AppliChem

## Material und Methoden

### 2.1.8 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Amcor, Beckman Coulter, Biozym, Corning Inc., Eppendorf

### 2.1.9 EDV-PROGRAMME UND ONLINE-SOFTWARE/DATENBANKEN

<i>Software:</i>	<i>Hersteller:</i>
AxioVision Software (Version 4.8.2.)	Zeiss
COSMIC	Welcome Trust Sanger Inst.
EndNote X9	Thomson Reuters
Ensembl	WTSI / EBI
Exome Variant Server	NHLBI GO ESP
Integrative Genomics Viewer (Version 2.9.4)	Broad Institute
Ion AmpliSeq™ Designer	Thermo Fisher Scientific
Ion Reporter™ Software (Version 5.6)	Thermo Scientific
JMP 16	SAS Institute GmbH
LightCycler® 480 Software (Version 1.5)	Roche
Microsoft Office	Microsoft
NanoDrop™ 2000/2000c Software (Version 1.4.1)	Thermo Scientific
Polyphen-2	Harvard Medical School
Primer3web (Version 4.1.0)	Whitehead Institute for Biomedical Research
SIFT	J. Craig Venter Institute
Torrent Suite™ Software (Version 5.6)	Thermo Fisher Scientific

### 2.1.10 HERSTELLER

<i>Name:</i>	<i>Standort:</i>
Abbott Laboratories	Abbott Park, Illinois, USA
Amcor	Zürich, Schweiz
Analytik Jena	Jena, Deutschland
AppliChem	Darmstadt, Deutschland

## Material und Methoden

Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Biotium	Hayward, CA, USA
Biozym	Oldendorf, Deutschland
DAKO	Hamburg, Deutschland
DCS Innovative Diagnostik Systeme	Hamburg, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Heraeus Holding	Hanau, Deutschland
LMS Consult	Brigachtal, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Microm International GmbH	Walldorf, Deutschland
Novocastra (Leica Biosystems)	Wetzlar, Deutschland
Peqlab	Erlangen, Deutschland
Pharmacia	Uppsala, Schweden
pfm medical ag	Köln, Deutschland
Roche	Penzberg, Deutschland
Sakura	Staufen, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Ventana Medical Systems	Tucson, AZ, USA
VWR	Bruchsal, Deutschland
Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Zytomed	Berlin, Deutschland
Zytovision	Bremerhaven, Deutschland

### 2.2 METHODEN

#### 2.2.1 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden 2,5 µm dicke Schnitte der Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten (engl.: formalin-fixed, paraffin embedded [FFPE]) Gewebeproben mit HM 355S automatischen Mikrotomen hergestellt. Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen sind am Färbeautomaten (Sakura) durchgeführt worden. Für die immunhistochemischen Färbungen wurde der BenchMark ULTRA Färbeautomat (Ventana Medical Systems) verwendet, dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Folgende Proteine wurden gefärbt: BCL2 (1:20; DAKO), CD10 (1:100; Novocastra), CD20 (1:1000; DAKO) und Ki67 (1:1000; DAKO), BCL6 (1:50; Zytomed), MUM1 (1:400; DAKO), MYC (ready to use; Roche). Die Färbungen waren bereits im Rahmen der Routinediagnostik erfolgt. Ggf. fehlende immunhistochemische Färbungen wurden durch das Routinelabor des Instituts für allgemeine und molekulare Pathologie erstellt.

#### 2.2.2 DNA-EXTRAKTION

Die zu untersuchenden Proben setzten sich aus Tumorzellen und unveränderten Körperzellen zusammen. Der Anteil an Tumorzellen variierte je nach Ausgangsmaterial. Um eine hohe Reinheit an Tumor-DNA zu erreichen, wurden bei einem Tumorgehalt von weniger als 20 Prozent die Proben durch Makrodissektion angereichert. Dadurch soll eine Verunreinigung der Probe und konsekutiven Analyseschritten durch DNA von reaktiven Zellen vermindert werden. Zur Bestimmung des Tumorgehalts erfolgte die histologische Begutachtung der Gewebeschnitte durch Frau Professor Quintanilla-Martinez de Fend.

##### 2.2.2.1 Makrodissektion

Zur DNA-Extraktion wurden drei 5 µm dicke Leerschnitte von Paraffinblöcken verwendet. Zur Entparaffinierung wurden diese für 2 x 5 min in 100%igem Xylol gebadet und danach getrocknet. Mit einem Skalpell wurden die tumorhaltigen Bereiche des Schnittes abgekratzt und in den Inkubationspuffer des Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kits gegeben. Bei Proben mit einem hohen Tumorgehalt wurden die Schnitte direkt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt

und 180 µl Inkubationspuffer dazugegeben. Alle Proben wurden mit 20 µl Proteinase K versetzt und bei 70 °C in einem Thermoschüttler über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die DNA mit dem Maxwell® 16 MDx Instrument extrahiert.

### 2.2.2.2 DNA-Extraktion

Die Extraktionsmethode basiert auf dem Prinzip der Absorption der DNA an paramagnetische Teilchen. Dazu wurde die Probe lysiert, sodass die DNA an die paramagnetischen Silica Teilchen binden kann, diese wurden gereinigt und danach wurde die DNA wieder in eine lösliche Phase überführt (Promega 2022). Die Extraktion der DNA erfolgt nach Herstellerangaben.

## 2.2.3 QUANTITATIVE UND QUALITATIVE DNA-UNTERSUCHUNGSMETHODEN

### 2.2.3.1 DNA-Integritätsbestimmung

Zur Messung der Integrität der extrahierten DNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Analyse der maximalen Amplifizierbarkeit der Fragmente durchgeführt. Dabei wurden Fragmente mit 100 (*TBXAS1-Exon 9*), 200 (*RAG1-Exon2*), 300 (*PLZF-Exon1*), 400 (*AF4-Exon 11*), und 600 (*AF4-Exon 3*) Basenpaarlänge amplifiziert, entsprechend den Standards von Van Dogen (van Dongen et al. 2003).

## Material und Methoden

Tabelle 1: PCR-Ansatz zur Analyse der DNA-Integrität

<b>Primer Mix</b>		
<i>Forward und Reverse Primer</i>	<i>Volumen [µl]</i>	<i>Endkonzentration in der Multiplex-PCR [pmol]</i>
AF4/X3U und AF4/X3L	5	2,5
AF4/X11U und AF4/X11L	2,5	1,25
PLZF/X1U und PLZF/X1L	2,5	1,25
RAG1/X2U und RAG1/X2L	2,5	1,25
TBXAS1/X9U und TBXAS1/X9L	2,5	1,25
ddH <sub>2</sub> O	170	
<b>25 µl PCR-Ansatz</b>		
<i>Reagenzien</i>	<i>Volumen [µl]</i>	<i>Endkonzentration in der Multiplex-PCR</i>
ddH <sub>2</sub> O	anpassen	
10x Puffer II (ohne MgCl <sub>2</sub> )	2,5	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2	2 mM
10 µM dNTPs	0,5	0,2 mM
Primer-Mix	2	<i>Siehe oben</i>
AmpliTaQ Gold DNA Polymerase (5U/µl)	0,2	0,04 U/µl
DNA	Bis zu 2,5	25-100 ng
<b>Thermocycler-Programm</b>		
7 min	95 °C	
45 sec	95 °C	
45 sec	60 °C	35 Zyklen
60 sec	72 °C	
4 min	72 °C	
unbegrenzt	16 °C	

Zur Bestimmung der amplifizierten Fragmentlängen wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden von jedem PCR-Produkt 10 µl auf Parafilm vorgelegt und mit ca. 2 µl DNA Gel Loading Dye (6X) vermischt. Verwendet wurde ein 2%iges Agarosegel, welches 7 % GelRed enthielt. In die erste Tasche des Gels wurden 10 µl GeneRuler 100 bp Ladder pipettiert, die gemischten PCR-Produkte in die weiteren Taschen. Bei einer Spannung von 160 Volt lief die Gelelektrophorese für 30 min. Anschließend wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt und so die durch den GelRed-Farbstoff gefärbten DNA-Fragmente sichtbar gemacht und als Bild aufgenommen.

### 2.2.3.2 **Messung der DNA-Quantität mittels Spektrophotometrie**

Zur Messung der DNA-Quantität wurde hier NanoDrop™ 2000 und die dazugehörige Software eingesetzt. Dabei wird mittels UV/VIS-Spektrophotometrie die Extinktion der Probe bei 260 nm gemessen werden. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Extinktionsmessung nicht zwischen fragmentierter einsträngigen und intakter doppelsträngiger DNA unterscheiden kann, sodass die amplifizierbare Menge an DNA aus FFPE Material überschätzt werden kann. Gleichzeitig kann die Reinheit anhand von Extinktionsverhältnissen berechnet werden (Thermo Fisher Scientific 2009).

### 2.2.3.3 **Messung der DNA-Quantität mittels Fluorometrie**

Um die Konzentration der doppelsträngigen DNA zu messen, wurde eine Messung mit dem Qubit 3.0 Fluorometer unter Verwendung des Qubit dsDNA HS assay Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip basiert auf der Fluorometrie. Es wurde ein Farbstoff eingesetzt, der ungebunden kaum fluoresziert, sobald er allerdings an DNA bindet, sehr stark fluoreszierend wirkt. Da eine standardisierte Konzentration des Farbstoffs dazugegeben wurde, konnte anhand der Intensität der Fluoreszenz die Menge an dsDNA mit einer Standardkurve bestimmt werden. Da der Farbstoff des verwendeten Assays spezifisch dsDNA bindet, ist die Messung der vorhandenen DNA-Menge sehr genau, insbesondere auch bei geringen Konzentrationen (Thermo Fisher Scientific 2021).

### 2.2.4 *FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG*

Zum Nachweis chromosomaler Aberrationen wie Translokationen und Amplifikationen wurde die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) eingesetzt. In dieser Arbeit wurde auf bereits vorhandene Daten der FISH-Analysen zurückgegriffen, die im Rahmen der Routinediagnostik erfolgt waren. Die entsprechenden Daten wurden aus den Arztbriefen übernommen. Insgesamt war eine FISH-Analyse bei 24 der 65 Fällen erfolgt. Bei 41 Fällen erfolgte keine FISH-Analyse. Dabei wurde zur Detektion von *BCL2*-, *BCL6*- und *MYC*-Translokationen eine Break-apart-Sonde eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Ausgewertet wird mit dem Axio Imager.M2 mit dem ApoTome.2 System.



### 2.2.5 NEXT-GENERATION-SEQUENCING

Das NGS funktioniert grundsätzlich nach dem Sequencing-by-Synthesis (SBS)-Prinzip, die Sequenzierung erfolgt durch die Erstellung der komplementären DNA-Strangs. Der Vorteil bei allen Methoden des NGS besteht darin, dass ein „Massiv parallel sequencing“ betrieben werden kann, also viele verschiedene DNA-Stränge einzeln gleichzeitig analysiert werden können. Somit können Hochdurchsatzanalysen durchgeführt und damit auch Kosten reduziert werden. In dieser Arbeit wurde als NGS-Methode das Ion Torrent System verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wird das Prinzip des „gezielten Sequenzieren“ (engl.: „targeted sequencing“) angewandt. Dabei wird nach genetischen Veränderungen in einer ausgewählten Gruppe von bereits bekannten Genen gesucht.

Grundsätzlich werden für die zu analysierenden Zielbereiche Amplikon-Bibliotheken hergestellt (sog. Libraries). Diesen werden Adapter für die klonale Amplifikation und Identifikation angehängt. Zur Signalverstärkung wird eine klonale Amplifikation durchgeführt.

#### 2.2.5.1 Prinzip des Halbleiterbasierten Ion Torrent PGM System

Das zur Sequenzierung verwendete Ion Torrent personal genome machine (PGM) System basiert auf dem Halbleiter-Prinzip, genauer einem complementary metal-oxide semiconductor (COMS). Dabei misst ein Chip, die durch die Abspaltung eines Hydroxid-Ions resultierende Änderung des pH-Werts in einer Reaktionskammer bei der Anlagerung eines weiteren Nukleotids und wandelt sie in eine Spannung um. Das Prinzip nennt sich Ion-sensitive field-effect transistor (ISFET) (Rothberg et al. 2011). Somit werden keine speziellen fluoreszenzmarkierten Nukleotide oder optische Geräte zur Detektion dieser benötigt (Quail et al. 2012). Auch werden die Nukleotide für alle Sequenzen einzeln nacheinander in einem festen Zeitabstand zugegeben, sodass zu einem Zeitpunkt in allen Reaktionskammern das gleiche Nukleotid vorliegt, diese werden ausgewaschen und danach werden diese mit einem anderen Nukleotid geflutet.

### 2.2.5.2 Überblick über die Amplikon-basierte Sequenzierung

Für die Amplikon-basierte Sequenzierung wurden zuerst die Primer für die entsprechenden Zielregionen erstellt. Die Erstellung des Ion AmpliSeq Custom DNA Panels, mit dem die Amplikon-Bibliotheken der zu analysierenden Genregionen generiert werden, erfolgte mittels Ion AmpliSeq Designer (Thermo Fisher Scientific). Die mittlere Amplikonlänge betrug 125-175 bp. Als Referenzgenom wurde hg19 verwendet. Das komplette Panel umfasst 193 Amplikons mit einer 94,23 % Abdeckung der Zielregionen, ist 19,52 kbp groß, die Primer sind auf zwei Pools (mit einmal 95 und einmal 98 Amplikons) aufgeteilt (Tabelle 2).

*Tabelle 2: Übersicht über das verwendete Ion AmpliSeq Custom Panel. Bei CD79B wurden die Hotspots p.Y197 und p.H225, auf Exon 5 und 6 abgedeckt, bei EZH2 der Hotspot p.Y646 auf Exon 16 und bei MYD88 zusätzlich zu Exon 3 und 4 der Hotspot p.L265 auf Exon 5; CDS steht für codierende Sequenz (engl.: coding sequence). Tabelle verändert nach Frauenfeld et al. (2022).*

Gene	Referenz-sequenz	Position (GRCh37/hg19)	Exon	Amplikons [n]	Abdeckung der CDS [%]
<b>BCL2</b>	NM_000633	chr18:60,795,858– chr18:60,985,899	CDS	9	95,86
<b>BCL6</b>	NM_001706	chr3:187,440,246– chr3:187,451,481	CDS	27	92,14
<b>CARD11</b>	NM_032415	chr7:2,946,272– chr7:2,998,140	CDS	54	95,30
<b>CD79B</b>	NM_001039 933	chr17:62,006,789– chr17:62,006,840	5	1	-
<b>CD79B</b>		chr17:62,006,586– chr17:62,006,654	6	1	-
<b>EZH2</b>	NM_004456	chr7:148,508,712– chr7:148,508,789	16	1	-
<b>IRF4</b>	NM_002460	chr6:393,153– chr6:407,598	CDS	18	95,61
<b>MYD88</b>	NM_002468	chr3:38,181,874– chr3:38,182,064	3	4	-
<b>MYD88</b>		chr3:38,182,243– chr3:38,182,344	4	2	-
<b>MYD88</b>		chr3:38,182,618– chr3:38,182,726	5	2	-
<b>PIM1</b>	NM_002648	chr6:37,138,352– chr6:37,141,867	CDS	16	90,98
<b>PRDM1</b>	NM_001198	chr6:106,534,429– chr6:106,555,361	CDS	29	91,66
<b>TNFAIP3</b>	NM_001270 507	chr6:138,192,365– chr6:138,202,456	CDS	29	96,49

Da es sich bei allen verwendeten Proben um FFPE-Material handelt, das häufig stark fragmentiert ist, wurde die Amplifizierbarkeit der DNA bestimmt (Abschnitt

2.2.3.1). Die Amplifizierbarkeit der DNA wird mit einem PCR-Ansatz bestimmt und nur Proben, die eine mindestens 300 bp amplifizierbare DNA aufweisen, werden für die NGS-Analyse verwendet.

Die Generierung der Bibliotheken sowie die weiteren nötigen Arbeitsschritte (Adapterligation, Aufreinigung, Quantifizierung, Emulsions-PCR, Sequenzierung) wurden nach den Vorgaben der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt und werden im Folgenden kurz beschrieben.

### 2.2.5.3 AmpliSeq PCR

Zur Erstellung der Amplikon-Bibliothek wurde mittels des Ion AmpliSeq Library Kits 2.0 und der Primer aus dem Custom Panel die Zielsequenzen amplifiziert (Tabelle 3). Danach wurden die Primer verdaut (Tabelle 4) und die Proben mit spezifisch Barcode-Adapttern (Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit) markiert (Tabelle 5).

Tabelle 3: *Protokoll Library-Erstellung*

<b>20 µl PCR-Ansatz</b>		
<i>Reagenzien</i>	<i>Volumen [µl]</i>	<i>Endkonzentration</i>
5X Ion AmpliSeq HiFi Mix	4	
2X Ion AmpliSeq Primer Pool	10	
DNA	≤ 6	10 ng
ddH <sub>2</sub> O	auf 20	
<b>Thermocycler-Programm</b>		
2min	99 °C	
15 sec	99 °C	24 Zyklen
4 min	60 °C	
Über Nacht	10 °C	

## Material und Methoden

Tabelle 4: Protokoll zur FuPa Reagenz

22 µl PCR-Ansatz	
Reagenzien	Volumen [µl]
Ansatz aus vorheriger PCR	20
FuPa Reagent	2
<b>Thermocycler-Programm</b>	
10 min	50 °C
10 min	55 °C
20 min	60 °C
bis zu 60 min	10 °C

Tabelle 5: Protokoll Adapterligation

30 µl PCR-Ansatz	
Reagenz	Volumen [µl]
Verdaute Amplikons aus vorheriger PCR	22
Switch Solution	4
Barcodemix	2
DNA-Ligase	2
<b>Thermocycler-Programm</b>	
30 min	22 °C
10 min	72 °C
bis zu 60 min	10 °C

In einem letzten Schritt wurde die Bibliothek unter Verwendung der HighPrep™ PCR Purification System magnetischen Beads aufgereinigt. Zur Aufreinigung wurden 54 µl HighPrep™ PCR paramagnetic beads solution pro 30 µl Libraries verwendet. Die Ansätze wurden gut vermischt, abzentrifugiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation in der 96-Well Magnetplatte (DynaMag™-96 Side Magnet) für 2 Minuten. Die 80 µl Überstand wurden abgenommen und verworfen, danach erfolgte die Reinigung mit frisch angesetztem 80%igem Ethanol. Dazu wurden die Reaktionsgefäße in der Platte so versetzt, dass die Beads aufgrund des magnetischen Felds durch das Reaktionsgefäß wanderten. Nach 30 Sekunden wurde der Überstand abgenommen und der Waschschrift ein weiteres Mal wiederholt. Zur vollständigen Verdunstung des Ethanols wurden die Ansätze 5 Minuten mit

offenem Deckel bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Resuspension mit 35 µl LowTe Puffer (Ion AmpliSeq Library Kit 2.0). Dann wurden die Beads für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach bei geöffnetem Deckel für weiter 2 Minuten in der Magnetplatte. Der die aufgereinigten Libraries enthaltende 30 µl Überstand wurde abgenommen und in ein frisches PCR-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die gesamte Aufreinigung ein weiteres Mal wiederholt.

### 2.2.5.4 Quantifizierung der Libraries mittels qPCR

Zur Quantifizierung der Libraries wurde mit dem Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit eine Real Time PCR, auch qualitative PCR (qPCR) genannt, durchgeführt. Das Prinzip einer qPCR ist folgendes: mithilfe einer fluoreszenzmarkierten Sonde lässt sich in Echtzeit die Konzentration der eingesetzten Libraries bestimmen. Dabei binden spezifische Primer des TaqMan® Assay an die Ion Library Adapter. Zusätzlich wird eine Oligonukleotid-Sonde eingesetzt, die aus einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (R) am 5'-Ende und einem Quencher-Farbstoff (Q) am 3'-Ende zusammengesetzt ist. Im Ausgangszustand führt die Anordnung der beiden Farbstoffe via Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) zu einer Reduktion der Fluoreszenz. Bindet ein Primer, so erfolgt die Verlängerung des PCR-Produkts via Taq-Polymerase, bis auf die Sonde getroffen wird. Dabei wird der Reporterfarbstoff R von der Sonde gelöst. Dadurch wird eine räumliche Entfernung der beiden Komponenten R und Q erzeugt, und die Fluoreszenz nimmt zu. Insgesamt steigt die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge der eingesetzten Amplikons.

Zur absoluten Quantifizierung wird ein E. Coli DH10B Standard mit definierter Konzentration zur Erstellung einer Standardkurve eingesetzt. Dieser wurde in drei Verdünnungen zu 6,8 pM, 0,68 pM und 0,068 pM eingesetzt. Die Libraries wurden in einer 1:500 Verdünnung eingesetzt. Insgesamt wurde die 96 Reaktionsgefäße-Platte im Doppelansatz befüllt. Nach Ansetzen der Reaktionen in der 96 Reaktionsgefäße-Platte (Tabelle 6) wurde diese mit einer Klebefolie für die LightCycler-Platte abgedeckt und einmal auf 2000 G abzentrifugiert. Die qPCR erfolgte mittels LightCycler 480 und die entsprechenden Konzentrationen der Libraries wurde anhand der Standardkurve berechnet. Bei einer

## Material und Methoden

Konzentration von unter 20 pM wurde von einer ungenügenden Erstellung der Amplikon-Bibliothek ausgegangen, diese Probe verworfen und eine neue erstellt.

*Tabelle 6: Ansatz qPCR. Dabei ist mit Library die zu analysierende, bereits verdünnte Amplikon-Bibliothek gemeint, mit E. coli die Verdünnungsreihe und ddH<sub>2</sub>O wird als Negativkontrolle verwendet*

10 µl qPCR-Ansatz		
Reagenz	Volumen [µl]	
2X TaqMan MasterMix	5	
2X Ion TaqMan Assay	0,5	
Library <b>oder</b>	4,5	
E-coli (6,8 pM/ 0,68 pM/ 0,068 pM) <b>oder</b>		
ddH <sub>2</sub> O		
LightCycler Programm		
120 sec	50 °C	
3 sec	95 °C	40 Zyklen
30 sec	60 °C	

### 2.2.5.5 Poolen der Amplikon-Bibliotheken

Zum Poolen der Amplikon-Bibliotheken wurden diese auf 100 pM verdünnt und in einen Pool mit einer Endkonzentration von 8 pM gemischt.

### 2.2.5.6 Template Preparation

Zur Template Preparation wurde zur klonalen Amplifikation eine Emulsions-PCR (emPCR) mit dem Ion OneTouch 2 durchgeführt. Dabei wurde das Ion PGM Hi-Q-View OT2 Kit 200 nach Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip der Emulsion-PCR besteht in der Kompartimentierung der DNA-Fragmente in kleine Fetttropfen innerhalb einer Wasser-Öl-Emulsion. Optimalerweise befindet sich innerhalb eines Fetttropfens nur ein einzelnes Amplikon sowie ein Ion Sphere™ particles [ISP]. Ein ISP trägt eine komplementäre Sequenz zu dem Adapter und Barcode des einzelnen Amplikons, sodass das Amplikon daran bindet. Es kommt zur Bildung eines Mikroreaktors. Innerhalb des Mikroreaktors werden die Fragmente mittels PCR vervielfältigt, sodass ein ISP mit vielen identischen klonalen Sequenzen eines Amplikons zur Signalverstärkung beladen ist (Luthra, Singh, and Patel 2016).

### 2.2.5.7 **Anreicherung der ISPs**

Zur Anreicherung wurden Streptavidin-gekoppelte Dynabeads® genutzt, die nur an beladene ISP binden und selbst eine supramagnetische Eigenschaft haben. Sodass durch eine magnetische Sortierung die beladenen von den unbeladene ISPs getrennt werden konnten. Zur Bestimmung des prozentualen Anteiles der positiv beladenen ISPs wurde mit Hilfe des Ion Sphere™ Quality Control Kit durch das Qubit 3.0 Fluorometer das Verhältnis der AF647-Fluoreszenz zu der AF488-Fluoreszenz gemessen. Dieser sollte zwischen 5 und 30 % liegen.

### 2.2.5.8 **Vollautomatisierte Library-Erstellung mittels Ion Chef System**

Bei 24 Proben erfolgte eine Erstellung und Verdünnung der Amplikon-Bibliotheken, Adapterligation sowie die klonale Amplifikation und Beladungen des Chips vollautomatisiert mit dem Ion Chef System unter Verwendung des Ion AmpliSeq™ Kit for Chef DL8.

### 2.2.5.9 **Sequenzierung mittels Ion Torrent PGM Plattform und Auswertung der Daten**

Die Sequenzierung fand mit dem Ion PGM™ Sequencer unter Verwendung des Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit statt. Dabei wurden die positiv beladenen ISPs auf einen Ion Chip geladen (Ion 318™ Chip Kit v2 BC) unter Verwendung des Ion One Touch Systems. Alternativ wurde teilweise die emPCR sowie die Anreicherung der ISPs, einschließlich der Beladung des Ion Chips mittels des Ion Chef unter Verwendung des Ion PGM Hi-Q View Chef Kits durchgeführt.

Zur Analyse der Rohdaten wurden diese vom Torrent Server in die Torrent Suite und dann in die Ion Reporter Software hochgeladen und dort weiterverarbeitet. Dabei wurden diese mit dem Torrent Mapping Alignment Program (TMAP) gegen das hg19 abgeglichen sowie graphisch die Qualität der Beladung des Chips dargestellt und überprüft. Zudem wurde überprüft, ob alle Regionen ausreichend gut amplifiziert waren. Es sollten mindestens 100 reads je sequenzierter Region vorliegen. Bei allen Mutationen mit einer Abdeckung von 50 bis 200 wurde die Mutation mittels EA validiert.

Die detektierten Varianten wurden tabellarisch aufgelistet. Diese Varianten wurden anhand von vorgefertigten oder individualisierbaren Filtern gefiltert. Für diese Arbeit wurden Varianten mit einer Allelfrequenz von weniger als 5 % und weniger als 50 reads Abdeckung herausgefiltert. Es erfolgte eine Überprüfung der gefundenen Varianten in den Rohdaten mittels der kostenfreien Software Integrative Genomics Viewer (IGV) zum Ausschluss von Artefakten. Artefakte stellen sich teilweise als Veränderungen dar, die exklusiv nur im Forward- bzw. Reverse-Strang vorkamen. Auch Homopolymersequenzen, also die wiederholte Abfolge derselben Base direkt hintereinander, können aufgrund der technischen Gegebenheiten beim Ion Torrent zu Fehlern führen (Loman et al. 2012; Slatko, Gardner, and Ausubel 2018). Der Vergleich wiederkehrender Variationen mit anderen Proben, diente dem Ausschluss von Panelartefakten.

Die gefundenen Veränderungen wurden mit den frei zugänglichen Datenbanken COSMIC, Ensembl und Exome Variant Server zur Identifizierung bereits bekannter somatische Mutation oder SNPs abgeglichen. Varianten, die in mehr als 1% der untersuchten Bevölkerung auftraten wurden als SNP definiert. Die biologische Bewertung der Mutation erfolgte mittels der frei zugänglichen Datenbanken Polyphen (Adzhubei, Jordan, and Sunyaev 2013) oder SIFT.

Die Benennung der Varianten erfolgte nach dem „HGVS nomenclature standard“ entsprechend der Richtlinien der Human Genome Variation Society (den Dunnen et al. 2016). Die codierende DNA-Referenzsequenz ist in Tabelle 2 unter der entsprechende Referenzsequenz-ID angegeben. Alle im folgenden beschriebenen Varianten auf DNA-Ebene beziehen sich auf die Referenzsequenzen.

### 2.2.5.10 Validierung mittels Einzelamplikon

Artefakte können zum Beispiel im Rahmen der Fixierung mit Formalin oder auch durch die Alterung der Proben entstehen. Häufig zeigt sich ein C:G- bzw. T:A-Austausch, welcher durch eine Desaminierung entsteht. Das im Formalin enthaltenen Formaldehyd, welches als Molekül bekannterweise mit DNA interagieren kann, beschleunigt die Desaminierung und trägt zur Fragmentierung der DNA bei (Kim et al. 2017).



## Material und Methoden

Zur Validierung von Varianten, die nicht sicher als Artefakte oder tatsächliche Mutationen klassifiziert werden konnten, wurden Einzelamplikons (EA) zur spezifischen Analyse der fraglichen Sequenz mit der Ion Amplikon Library Preparation (Fusion Method) (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben erstellt. Dafür wurden spezifische Primer generiert (Absatz 2.1.3). Aus den Primern wurden zwei Primermixe hergestellt. Dabei wurde für Mix 1 der F-Primer mit Barcode-Adapter und R-trP1-Primer im Verhältnis 1:1 gemischt und für Mix 2 die entsprechend anderen Primer. Zur Vervielfältigung der zu analysierenden DNA-Sequenz wurde eine PCR durchgeführt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Fusion-PCR zur Herstellung der Einzelamplikons

28 µl PCR-Ansatz		
Reagenz	Volumen [µl]	Endkonzentration
Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity	22,5	
Primer-Mix 1 oder 2	0,5	
DNA	5	25 ng
Thermocycler-Programm		
180 sec	94 °C	
30 sec	94 °C	
30 sec	58 °C	40 Zyklen
60 sec	68 °C	
Über Nacht	16 °C	

Danach erfolgte die Aufreinigung der EA, wie unter Absatz 2.2.5.3 beschrieben, eine Konzentrationsmessung mittels Qubit 3.0 Fluorometer (Absatz 2.2.3.3), die Zugabe der EA zu dem Bibliothekenpool (Absatz 2.2.5.5) sowie die Sequenzierung wie ab Absatz 2.2.5.9 beschrieben.

Teilweise wurde die EA-Erstellung und Validierungen durch Kollegen durchgeführt, wie in der Erklärung zum Eigenanteil aufgeführt.

### *2.2.6 STATISTISCHE METHODEN*

Zur Verwaltung der Daten wurde eine Microsoft Excel Tabelle erstellt, die statistischen Analysen erfolgten mittels des Programms JMP ® (Version 16). Zur statistischen Analyse der Daten wurden Chi<sup>2</sup> Tests und T-Tests verwendet. Ein p-Wert von kleiner 0.05 wurde als signifikant definiert.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 ZUSAMMENSTELLUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS

Das Patientenkollektiv wurde retrospektiv aus dem Archiv der Pathologie Tübingen ausgewählt. Die interne Pasnet Datenbank wurde am 07.09.2017 nach dem Begriff „diffus großzellig“ durchsucht, und alle Ergebnisse in Excel exportiert. Eine Aktualisierung der Datenbankabfrage fand am 02.01.2018 statt. Insgesamt wurden 2841 Elemente gefunden. Beginnend bei den aktuellen Fällen wurden die Befunde von 460 Patienten geprüft und nach der Diagnose eines DLBCL, NOS entsprechend der 2016 aktualisierten Diagnosekriterien der WHO inklusive der Einteilung in die Subgruppen GCB und non-GCB gesucht (Swerdlow et al. 2016). Zur Einteilung wurde wie von der WHO empfohlen, der Hans Algorithmus verwendet (Swerdlow et al. 2016). Zusätzlich wurde ein Fall mit residualen Anteilen eines folliculären Lymphoms Typ 3B ausgewählt (Fall Nr. 021), da dieses dem DLBCL de novo genetisch und morphologisch sehr ähnlich ist (Horn et al. 2011).

323 Fälle wurden aufgrund folgender Kriterien ausgeschlossen:

- Rezidive oder Transformationen aus niedriggradigen Lymphomen, zum Beispiel die Richtertransformation oder Transformationen aus einem folliculären Lymphom
- Material aus Knochenmarkstanzen
- Das DLBCL des ZNS, der primär mediastinale Typ und der primär kutane Typ, bzw. leg type
- Technische Aspekte wie zu geringe noch vorhandenen Materialmenge für weitere Analyse oder Referenzbegutachtungen

Bei 137 Fällen trafen die formale Bedingung zu. Im nächsten Schritt wurden im Archiv Blöcke und Schnitte der 137 Fälle zu einer Sammlung zusammengestellt und alle diese Fälle ein weiteres Mal von einer erfahrenen Hämatopathologin (Frau Professor Quintanilla-Martinez de Fend) begutachtet. Dabei wurden die Fälle nach der Qualität der Fixierung, Anteil an Nekrose und Tumorgehalt analysiert. Fälle, bei denen das Material nur in Form von Knochenmarksstanzen

## Ergebnisse

vorlag, wurden ausgeschlossen, da dort meist der Tumorgehalt nicht hoch genug ist, und somit nicht die benötigte Qualität und Quantität der DNA erreicht werden kann.

Ausgewählt wurden Fälle mit möglichst hohem Tumorgehalt und in ausreichender Qualität und Menge vorhandenem Gewebe, um die NGS-Analyse durchführen zu können. Das endgültige Patientenkollektiv bestand aus 65 Fällen, die in den Jahren 2015–2018 routinemäßig in der Pathologie Tübingen diagnostiziert wurden. Ein positives Ethikvotum der Universitätsklinik Tübingen liegt vor (105/2013BO2).

Bei 17 der 65 (25 %) Proben wurde nur ein bestimmter Bereich des Schnittes zur Makrodissektion verwendet, mit dem Ziel, die Menge an extrahierter Tumor-DNA anzureichern. Der zu verwendende Bereich wurde durch einen erfahrenen Pathologen gekennzeichnet.

*Tabelle 8: Patientencharakteristika. Darstellung der demographischen, klinischen und pathologischen Charakteristika nach COO-Subtyp.  
COO: Cell of Origin (Ursprungszelle), GCB-Subtyp: Keimzentrumssubtyp, non-GCB-Subtyp: nicht-Keimzentrumssubtyp, HGBCL: High-Grade B-Zell-Lymphom*

	<b>Gesamt [n = 65]</b>	<b>GCB-Subtyp [n = 35]</b>	<b>non-GCB-Subtyp [n = 30]</b>
<b>Alter [Jahre]</b>			
Median (range)	72 (20–91)	70 (20–91)	75,5 (33–91)
<b>Geschlecht [n]</b>			
Männlich (%)	35 (53,8)	18 (51,4)	17 (56,7)
Weiblich (%)	30 (46,2)	17 (48,6)	13 (43,4)
<b>Tumorlokalisation [n]</b>			
<b>Nodal (%)</b>	22 (33,8)	13 (37,1)	9 (30)
<b>Extranodal gesamt (%)</b>	43 (66,2)	22 (62,9)	21 (70)
Sonstige	17	8	9
Rachenraum	16	10	6
GI-Trakt	5	3	2
Hoden	5	1	4
<b>HGBCL [n (%)]</b>	3 (4,6)	2 (5,7)	1 (3,3)

## Ergebnisse

Wie in der Tabelle 8 gezeigt, bestand das Kollektiv aus 35 Fällen vom GCB- und 30 Fällen vom non-GCB-Subtyp, das entspricht einem Anteil von 53,8 % GCB-Subtyp.

Das Alter bei Diagnosestellung betrug im Median 72 Jahre. Dabei zeigte sich, dass die Patienten mit einem non-GCB-Subtyp etwas älter waren. Das mediane Alter der non-GCB Patienten lag bei 75,5 Jahren (range: 33 bis 91 Jahre), das der Patienten mit einem GCB-Subtyp bei 70 Jahren (range: 20 bis 91 Jahre).

Insgesamt waren 65 Patienten in die Studie eingeschlossen, davon 35 männlich und 30 weiblich. In beiden Subtypen zeigten sich jeweils etwas mehr Männer als Frauen. Das Geschlechterverhältnis lag somit bei 1,2:1 (m:w).

22 Patienten (34 %) zeigten eine nodale Tumorlokalisierung, bei 43 Patienten (66 %) zeigte sich eine extranodale Tumorlokalisierung, davon 16 Fälle (25 %) im Rachenraum, 5 Fälle in den Hoden (8 %), und 5 Fälle im Gastrointestinaltrakt (8 %), die restlichen 17 Fälle zeigten verschiedene Lokalisationen.

Bei drei Fällen handelte es sich formal um HGBCL, deren Charakteristika in Kapitel 3.3 genauer beschrieben werden.

### 3.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE MERKMALE

Bei allen Fällen wurden mittels Immunhistochemie die Färbungen MIB1, CD20, BCL2, MYC, CD10, BCL6 und MUM1/IRF4 bestimmt. Als positiv wurde eine Färbung von mehr als 30 % der Zellen bei CD10, BCL6 und MUM1/IRF4 gewertet. Bei MYC galt die Färbung ab 40 % der Zellen als positiv und BCL2 ab 50 % als positiv. In Tabelle 9 werden die immunhistochemischen Merkmale dargestellt.

Der Proliferationsindex, dargestellt durch die MIB1-Färbung zeigte folgende Verteilung: sechs Fälle (9,4 %) zeigten einen Proliferationsindex von kleiner 40 %, 40,6 % der Fälle zeigten einen von 40 bis 80 %, und 50 % der Fälle von über 80%. Der mediane Proliferationsindex der Gesamtkohorte lag bei 82,5 %, beim non-GCB-Subtyp bei 90%, beim GCB-Subtyp 80 %. Wobei deutlich mehr GCB-Fälle einen Proliferationsindex im Bereich von 40 bis 80 % zeigten (8 zu 18) und die non-GCB Fälle häufiger einen von > 80 % zeigten (20 zu 12). Insgesamt gesehen zeigten 69 % aller non-GCB-Fälle einen Proliferationsindex von größer 80 %, wohingegen nur 34,3 % der GCB-Fälle. Statistisch zeigt sich der Unterschied des mittleren Proliferationsindex der beiden Subtypen signifikant (ungleiche Varianz,  $t(60,3) = -2.75$ ,  $p = .008$ ).

98,5 % (64 von 65) der Fälle waren positiv für den B-Zell-Marker CD20. Der Fall Nr. 057 weist eine CD20-Negativität ohne vorhergehende Therapie mit Rituximab auf.

CD10-Positivität zeigte sich in 36,9 % (24 von 64) der Fälle, 8 von 64 waren schwach positiv, BCL6-Expression konnte in 87,7 % (57 von 65) der Fälle nachgewiesen werden, MUM1/IRF4-Expression in 60 % (39 von 65), BCL2-Expression in 80 % (52 von 65) und MYC-Positivität in 35,4 % (23 von 65).

## Ergebnisse

Tabelle 9: Verteilung der immunhistochemischen Färbungen nach COO-Subtyp. COO: Cell of Origin (Ursprungszelle), GCB-Subtyp: Keimzentrumssubtyp, non-GCB-Subtyp: nicht-Keimzentrumssubtyp. Fehlende Werte aus technischen Gründen.

Charakteristika	Gesamt [n = 65]	GCB-Subtyp [n = 35]	Non-GCB-Subtyp [n = 30]
<b>CD10 [n]</b>			
Negativ (%)	32 (49,2)	2 (5,7)	30 (100)
Schwach positiv (%)	8 (12,3)	8 (22,9)	0 (0)
Positiv (%)	24 (36,9)	24 (68,6)	0 (0)
Fehlend	1 (1,5)	1 (2,9)	0 (0)
<b>BCL6 [n]</b>			
Negativ	4 (6,2)	0 (0)	4 (13,3)
Schwach positiv	4 (6,2)	0 (0)	4 (13,3)
Positiv	57 (87,7)	35 (100)	22 (73,3)
<b>MUM1/IRF4 [n]</b>			
Negativ	25 (38,5)	25 (71,4)	0 (0)
Schwach positiv	1 (1,5)	1 (2,9)	0 (0)
Positiv	39 (60)	9 (25,7)	30 (100)
<b>BCL2 [n]</b>			
Negativ	13 (20)	8 (22,9)	5 (16,7)
Schwach positiv	6 (9,2)	5 (14,9)	1 (3,3)
Positiv	46 (70,1)	22 (62,9)	24 (80)
<b>MYC [n]</b>			
Negativ	42 (64,6)	27 (77,1)	15 (50)
Positiv	23 (35,4)	8 (22,9)	15 (50)
<b>MYC [%]</b>			
Median	30	15	37,5
<b>MIB1 [%]</b>			
Mittelwert [%]	78	72	85
0–40 % [n (%)]	6 (9,4)	5 (14,9)	1 (3,3)
40–80 % [n (%)]	26 (40,6)	18 (51,4)	8 (26,7)
> 80 % [n (%)]	32 (50)	12 (34,3)	20 (66,7)
Fehlend	0 (0)	0 (0)	1 (3,3)

Der GCB-Subtyp zeigte per Definition eine deutliche Expression von CD10, zwei der GCB-Subtypfälle waren CD10 negativ. Alle untersuchten GCB-Fälle waren

## Ergebnisse

BCL6 positiv, bei 10 Fällen zeigte sich eine MUM1/IRF4-Positivität, davon eine schwach.

BCL2 zeigte sich bei 27 der GCB-Fälle positiv, ähnlich oft bei den Fällen des non-GCB-Subtyps. Bei der MYC-Positivität zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Subtypen. 65,2 % der MYC-positiven Fälle gehörten dem non-GCB-Subtyp an.

### 3.2.1 VERTEILUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN DES HA

Der HA ist hierarchisch aufgebaut und definiert als GCB jeden CD10-positiven Fall (mit CD10 >30 %) oder wenn ein Fall CD10 negativ ist, muss die Kombination BCL6-positiv (BCL6<sup>+</sup>) und MUM1/IRF4-negativ (MUM1/IRF4<sup>-</sup>) eintreten. Wie schon in Tabelle 9 dargestellt, waren fast alle GCB-Fälle CD10 positiv (32/35 Fälle). Es zeigte sich folgende Verteilung:

- 15 Fälle CD10<sup>+</sup>BCL6<sup>+</sup>MUM1/IRF4<sup>-</sup>
- 10 Fälle CD10<sup>+</sup>BCL6<sup>+</sup>MUM1/IRF4<sup>+</sup>, davon jeweils einmal schwach positiv für BCL6 bzw. MUM1/IRF4
- 7 Fälle CD10 schwach positiv, BCL6<sup>+</sup> und MUM1/IRF4<sup>-</sup>
- 2 Fälle CD10<sup>-</sup>BCL6<sup>+</sup>MUM1/IRF4<sup>-</sup>
- Ein Fall mit unbekannter CD10-Färbung, BCL6<sup>+</sup> und MUM1/IRF4<sup>-</sup>

Beim non-GCB-Subtyp (30 Fälle) zeigte sich folgende Verteilung:

- 4 Fälle CD10<sup>-</sup>BCL6<sup>-</sup>MUM1/IRF4<sup>+</sup>
- 26 Fälle mit CD10<sup>-</sup>BCL6<sup>+</sup>MUM1/IRF4<sup>+</sup>, davon bei 4 MUM1/IRF4 schwach positiv

### 3.3 ERGEBNISSE DER FISH-ANALYSE

Bei der Auswertung der FISH-Analyse handelt es sich um eine retrospektive Analyse, der bereits im diagnostischen Algorithmus durchgeführten und ausgewerteten FISH-Analysen. Es wurden keine neuen FISH-Analysen für diese Arbeit angefertigt. Bei deutlich positiver immunhistochemischer MYC- oder BCL2-Färbung wurde zum Screening initial eine FISH-Analyse für MYC durchgeführt, bei positiver MYC FISH-Analyse wurde zusätzlich eine BCL2 und



## Ergebnisse

*BCL6* FISH-Analyse durchgeführt. Bei manchen Fällen wurde aufgrund von anderen individuellen Überlegungen eine FISH durchgeführt.

Somit wurde eine FISH-Analyse für *MYC*, *BCL2* und/oder *BCL6* bei 25 der Fälle durchgeführt, in 9 Fällen zeigte sich mindestens eine Translokation. Tabelle 10 zeigte eine Übersicht über die Ergebnisse der FISH-Analyse nach COO-Subtyp.

Tabelle 10: Ergebnisse der FISH-Analyse nach COO-Subtyp. Dabei variable Gruppengröße, da in diagnostischem Algorithmus FISH nur bei klinischer Relevanz analysiert wurde. COO: Cell of Origin (Ursprungszelle), FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung GCB-Subtyp: Keimzentrumssubtyp, non-GCB-Subtyp: nicht-Keimzentrumssubtyp, HGBCL: High-Grade B-Zell-Lymphom

	Gesamt	GCB-Subtyp [n = 8]	Non-GCB-Subtyp [n =16]
<b>MYC [n =23]</b>			
Negativ	17	5	12
Positiv	7	2	5
<b>BCL6 [n =12]</b>			
Negativ	8	2	6
Positiv	4	2	2
<b>BCL2 [n =17]</b>			
Negativ	15	4	11
Positiv	2	2	0
<b>HGBCL [n]</b>	3	2	1

Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse der FISH-Analysen im Detail. Am häufigsten zeigten sich *MYC*-Translokationen.

## Ergebnisse

*Tabelle 11: FISH-Ergebnis nach Immunhistochemie.*

*Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen: 0 negativ, 1 positiv, 2 nicht durchgeführt, 3 schwach positiv. Ergebnisse der FISH: 0 negativ, 1 positiv, 2 nicht durchgeführt*

*TP: Triple positiv, GCB: Keimzentrumssubtyp, nGCB: nicht-Keimzentrumssubtyp, FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung*

<b>Fall-Nr.</b>	<b>MUM1</b>	<b>CD10</b>	<b>BCL6</b>	<b>BCL2</b>	<b>MYC [%]</b>	<b>Typ</b>	<b>TP</b>	<b>FISH-MYC</b>	<b>FISH-BCL2</b>	<b>FISH-BCL6</b>
<b>008</b>	1	0	1	1	60	nGCB	0	1	0	0
<b>009</b>	1	0	1	1	70	nGCB	0	0	0	0
<b>014</b>	1	0	1	1	80	nGCB	0	0	2	2
<b>020</b>	1	0	1	1	50	nGCB	0	0	0	0
<b>029</b>	1	0	1	0	30	nGCB	0	0	0	1
<b>030</b>	1	0	1	1	65	nGCB	0	0	2	2
<b>031</b>	1	0	1	1	60	nGCB	0	0	0	0
<b>033</b>	1	0	0	1	80	nGCB	0	1	0	2
<b>042</b>	1	0	3	1	70	nGCB	0	0	0	2
<b>043</b>	1	0	0	1	80	nGCB	0	0	2	2
<b>044</b>	1	0	1	0	35	nGCB	0	0	2	2
<b>046</b>	1	0	1	1	60	nGCB	0	0	0	0
<b>048</b>	1	0	1	1	30	nGCB	0	0	0	0
<b>052</b>	1	0	3	0	50	nGCB	0	1	2	2
<b>062</b>	1	0	0	1	60	nGCB	0	1	2	2
<b>063</b>	1	0	1	1	75	nGCB	0	1	0	1
<b>065</b>	1	0	3	1	40	nGCB	0	0	0	2
<b>015</b>	1	1	1	1	15	GCB	1	0	0	0
<b>016</b>	0	1	1	1	60	GCB	0	0	2	2
<b>019</b>	0	3	1	1	80	GCB	0	0	1	1
<b>021</b>	0	0	1	1	0	GCB	0	2	0	2
<b>024</b>	1	1	1	1	70	GCB	1	0	0	2
<b>047</b>	0	3	1	1	55	GCB	0	1	1	0
<b>057</b>	1	1	1	1	95	GCB	1	1	0	1
<b>058</b>	0	1	1	0	30	GCB	0	0	2	2

## Ergebnisse

### 3.4 DNA-INTEGRITÄT UND -QUANTITÄT

FFPE Material zeigt oft eine starke Fragmentierung der DNA. Zu kurze Fragmente lassen sich mittels PCR je nach Produktlänge schlecht amplifizieren. Für die NGS-Analyse sollte die DNA-Fragmentlänge mindestens 200 bp betragen. Bei allen 65 Proben wurde die DNA-Integrität bestimmt, bei zwei Proben zeigten sich bis zu 200 bp amplifizierbar, bei 41 Proben eine Länge von bis zu 300 bp und bei 22 eine Länge von bis zu 400 bp amplifizierbar (Abbildung 5).

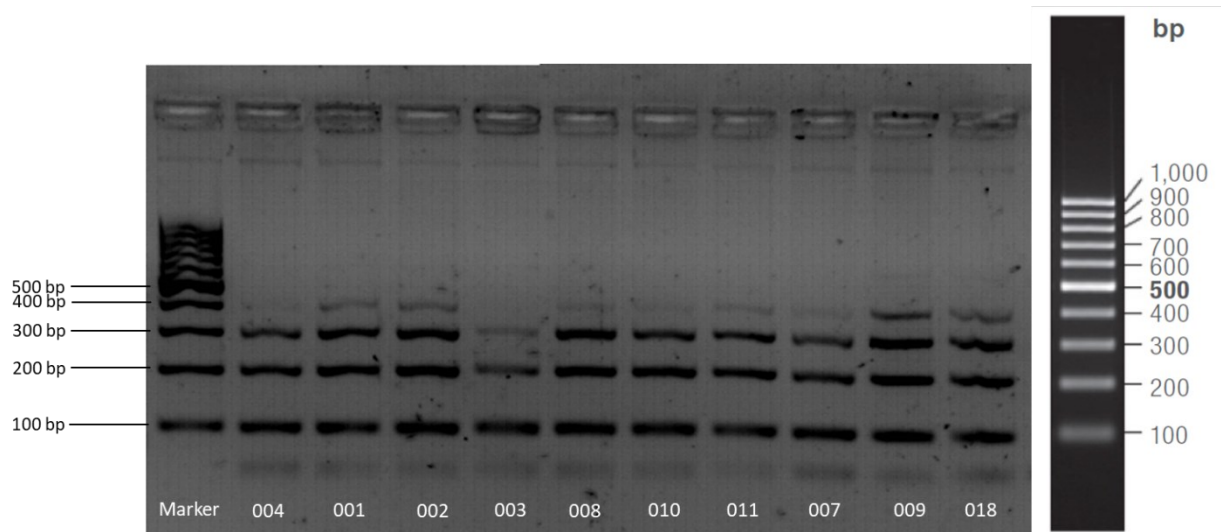


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Gelelektrophorese zur Bestimmung der Amplifizierbarkeit der DNA. Zur Bestimmung der Fragmentlängen erfolgt ein Abgleich mit dem Marker auf der linken Seite. Die Zahl in jeder Spur gibt die eingesetzte Probe an.

Die DNA-Konzentration wurde mittels zwei verschiedener Methoden bestimmt:

Bei der spektrometrischen Messung via NanoDrop™ zeigte sich ein mediane DNA-Konzentration von 277,95 ng/μl. Mit einem Minimum von 15,0 ng/μl und einem Maximum von 974,4 ng/μl. Bei drei Proben fehlte die Messung mit NanoDrop. Für die weitere Verarbeitung war die fluorometrische Messung entscheidend, diese zeigte deutliche abweichende Werte zur spektrometrischen Messung. Eine Ausgangsmenge von absolut 10 ng dsDNA war für die NGS-Analyse notwendig. Es zeigte sich ein mediane DNA-Konzentration von 62,8 ng/μl, mit einem Minimum von 1,4 ng/μl und einem Maximum von 102 ng/μl. Bei allen Fällen lag eine Konzentrationsmessung mit Qubit vor.

## Ergebnisse

### 3.5 MUTATIONSANALYSE VIA NGS

Insgesamt wurden alle 65 Fälle mit dem in Tabelle 2 beschriebenen Custom Panel auf genetische Veränderungen analysiert. In Abbildung 6 wird die graphische Darstellung der nachgewiesenen Mutationen in den Rohdaten exemplarisch an der *MYD88*<sup>L265P</sup>-Hotspot-Mutation dargestellt.

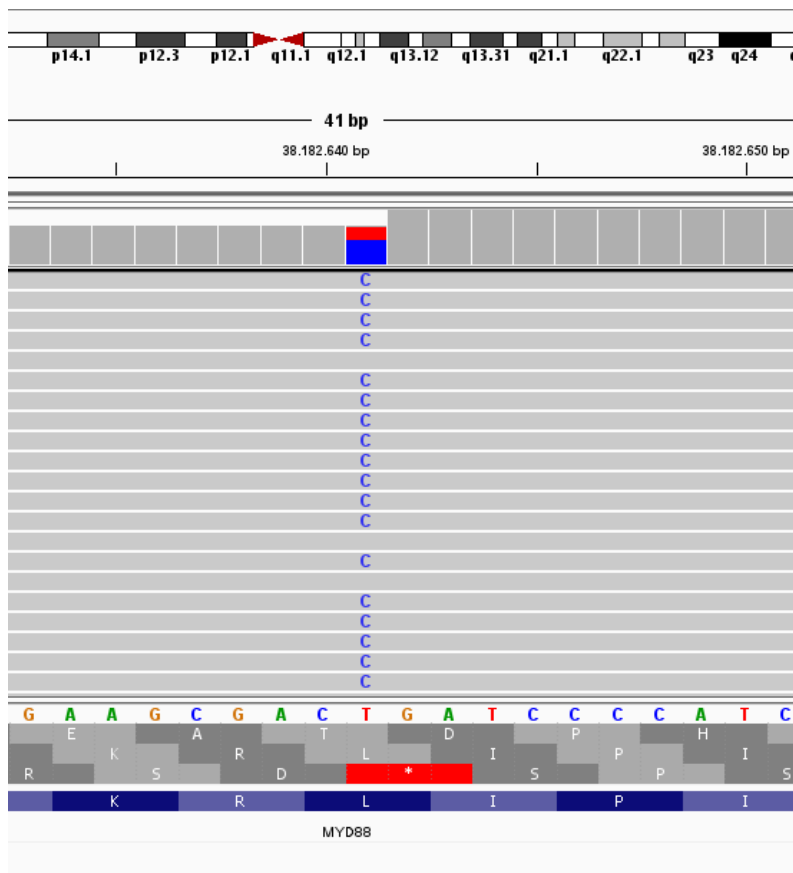


Abbildung 6: Graphische Darstellung einer *MYD88*<sup>L265P</sup>-Mutation dargestellt im Programm IGV. Es zeigt sich im unteren Bereich die Referenzsequenz. In Orange (G), Grün (A), Blau (C) und Rot (T) ist die Basenabfolge der Referenzsequenz dargestellt. Die grauen Linien repräsentieren die reads. In Blau zeigt sich jeweils die detektierte Variante. IGV: Integrative Genomics Viewer.

In 51 der 65 (78,5 %) analysierten Proben zeigten sich genetische Veränderungen. Es wurden Mutationen in den codierenden Bereichen sowie Spleiß-Mutationen als relevant erachtet. Die Tabelle 12 stellt die Charakteristika der gefundenen Mutationen dar. Die durchschnittliche Anzahl an nachgewiesenen Mutationen pro Fall über alle Proben gerechnet beträgt 2,43.

Ohne Berücksichtigung der Proben, bei denen keine Mutation nachgewiesen werden konnte, wurden durchschnittlich 3,1 Mutationen pro Fall nachgewiesen,

## Ergebnisse

dabei 3,33 beim GCB-Subtyp und 2,83 beim non-GCB-Subtyp. Es zeigte sich ein Mittelwert von 1,43 verschiedenen mutierten Genen beim GCB-Subtyp, und 1,8 beim non-GCB-Subtyp. Dieser Gruppenunterschied zeigte sich jedoch nicht signifikant (gleiche Varianz, Student T-test,  $t(63) = -1.28$ ,  $p = .200$ ).

Die meisten Mutationen stellten sich als Missense-Mutationen dar, jedoch wurden auch Frameshift-Mutationen, Duplikationen, Deletionen und Insertionen sowie stop-lost- und Spleiß-Mutationen nachgewiesen. Dabei zeigten sich deutlich mehr verschiedene Mutationstypen bei den non-GCB Fällen. Bezüglich des Mutationstyps zeigte sich, dass Spleiß-Mutationen nur bei *PRDM1* und *PIM1* aufgetreten sind, und fast überwiegend bei non-GCB-Subtyp (Tabelle 12).

## Ergebnisse

Tabelle 12: Übersicht Mutationsverteilung  
 GCB-Subtyp: Keimzentrumssubtyp, non-GCB-Subtyp: nicht-Keimzentrumssubtyp

	<b>Gesamt</b> [n = 65]	<b>GCB-Subtyp</b> [n = 35]	<b>Non-GCB-Subtyp</b> [n = 30]
<b>Mutationen</b>			
<b>gesamt [n]</b>	158	90	68
pro Fall	2,43	2,57	2,26
<b>Mutierte Gene [n]</b>	104	50	54
<b>Fälle mit mehrfachen Mutationen in einem Gen [n]</b>	20	13	7
<b>Anzahl verschiedener Mutationen pro Fall [n]</b>			
0	14	8	6
1	17	12	5
2	18	8	10
3	13	6	7
4	3	1	2
<b>Mittelwert</b>	1,62	1,43	1,8
<b>Mutationstyp [n]</b>			
Missense	132	82	50
Nonsense	6	2	4
Insertion/Deletion	7	3	4
stop-lost	1	1	0
Duplikation	1	0	1
Spleiß	7	1	6
Frameshift	4	1	3

Ein Überblick über alle nachgewiesenen Mutationen sowie Abdeckung und Häufigkeit ist in Tabelle 13 dargestellt.

Insgesamt zeigten sich 158 verschiedene Mutationen in 51 der 65 analysierten Proben (Tabelle 12). Mutierte Fälle zeigten in bis zu vier Genen Mutationen. Bei 14 Proben, davon 8 vom GCB-Subtyp und 6 vom non-GCB-Subtyp wurde keine Mutation nachgewiesen.

Bei 20 der 65 Fälle wurden mehrere Mutationen in einem Gen nachgewiesen, insbesondere bei den GCB-Fällen (13 zu 8). Häufig traten mehrfache Mutationen

## Ergebnisse

in *BCL2* (8 Fälle, alle GCB) auf, aber auch in *PIM1* (9 Fälle, 3 GCB-Subtyp/6 non-GCB-Subtyp) und *IRF4* (2 Fälle, alle GCB). In den Genen *MYD88*, *CARD11*, *EZH2*, *BCL6* traten keine mehrfachen Mutationen auf.

Am häufigsten wurden *PIM1*-Mutationen (46/158) nachgewiesen mit insgesamt 29,1 % aller nachgewiesenen Mutationen. Mit 21,5 % (34/158) traten *BCL2*-Mutationen am zweit häufigsten auf. *MYD88*-Mutationen stellten 10,8 %, *IRF4*- 10,1 % (16/158), *CD79B*- 9,5 % (15/158) und *PRDM1*-Mutationen 5,1 % (8/158), der insgesamt nachgewiesenen Mutationen dar. *EZH2*-Mutationen konnten 3,8 % (6/158) mal nachgewiesen werden.

*CARD11*- (6/158), *BCL6*- (4/158) und *TNFAIP3*-Mutationen (6/158) wurden in dieser Analyse eher selten nachgewiesen (Tabelle 13).

Ohne Berücksichtigung mehrfacher Mutationen wurden mit 26 % am häufigsten *PIM1*-Mutationen nachgewiesen (27/104), an zweiter Stelle mit 16,4% *MYD88*- (17/104), dann mit 13,5 % *CD79B*- (14/104) und mit 11,5% *BCL2*-Mutationen (12/104). *PRDM1*-Mutationen stellen 6,7 % (7/104), *EZH2*-, *IRF4*- und *CARD11*-Mutationen machen jeweils 5,8 % der nachgewiesenen Mutationen aus. Selten wurden *TNFAIP3*- mit 4,8% und *BCL6*-Mutationen mit 3,9 % nachgewiesen.

Tabelle 13: Übersicht aller nachgewiesenen Mutationen. Benennung der Mutationen auf Proteinebene gemäß HGVS\_p (Human Genome Variation Society), auf cDNA-Ebene gemäß HGVS\_c, VAF: variant allele frequency, \* Validierung durchgeführt, \*\* Mutation nur in EA nachgewiesen

Fall Nr.	Gen	HGVS_c	HGVS_p	VAF [%]	Abdeckung
02	<i>PIM1</i>	c.164G>A	p.G55D	23,1	746*
03	<i>BCL2</i>	c.573T>G	p.D191E	36	3027
	<i>BCL2</i>	c.193C>T	p.P65S	45	2457
04	<i>PIM1</i>	c.82+1G>C	splice site Exon 1	38	2019
06	<i>PIM1</i>	c.73_74del	p.L25Gfs	27	4467
07	<i>PIM1</i>	c.189+1G>C	splice site Exon 2	37	819
	<i>CD79B</i>	c.590A>G	p.Y197C	83	3072
09	<i>IRF4</i>	c.178C>T	p.Q60*	13,9	4166*
	<i>PRDM1</i>	c.664+2T>A	splice site Exon 4	22	4597
011	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	70	7098
013	<i>BCL2</i>	c.256C>T	p.L86F	70,3	2160
014	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	59,6	6406

## Ergebnisse

Fall Nr.	Gen	HGVS_c	HGVS_p	VAF [%]	Abdeckung	
015	<i>PRDM1</i>	c.473G>A	p.W158*	80,1	3050	
	<i>CARD11</i>	c.367G>A	p.G123S	63,5	1461	
	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	41,3	6612	
	<i>IRF4</i>	c.178C>T	p.Q60*	7,8	1743*	
	<i>PIM1</i>	c.4C>T	p.L2F	44,5	1151*	
016	<i>CD79B</i>	c.590A>G	p.Y197C	32,4	3816	
	<i>EZH2</i>	c.1936T>C	p.Y646H	45,3	268	
	<i>BCL2</i>	c.475G>C	p.V159L	36,5	7008	
	<i>BCL2</i>	c.338C>G	p.A113G	35,8	8099	
	<i>BCL2</i>	c.190G>A	p.D64N	64,2	2372	
017	<i>BCL2</i>	c.157C>T	p.P53S	64,2	2392	
	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	52	13069	
	<i>CD79B</i>	c.590A>T	p.Y197F	68,8	6024	
	018	<i>EZH2</i>	c.1936T>C	p.Y646H	23	99*
		019	<i>CARD11</i>	c.688G<A	p.D230N	35,5
<i>BCL2</i>			c.392C>T	p.A131V	27,5	8378
020	<i>BCL2</i>	c.17G>C	p.R6T	55,5	4137	
	<i>PIM1</i>	c.176_177delinsTT	p.S59F	7,8	2131*	
022	<i>BCL6</i>	c.1015T>C	p.C339R	13,6	2758	
	<i>TNFAIP3</i>	c.1299G>T	p.M433I	18	1528	
	<i>TNFAIP3</i>	c.1301_1302delinsTC	p.A434V	18	1528	
023	<i>MYD88</i>	c.617C>G	p.S206C	33	9715	
	<i>PIM1</i>	c.143G>T	p.G48V	53	610*	
	<i>PIM1</i>	c.149G>A	p.G50D	53	610*	
	<i>PIM1</i>	c.240+1G>A	splice site Exon 3	49	3799	
	<i>PIM1</i>	c.418C>T	p.Q140*	49	4455	
	<i>PRDM1</i>	c.1849C>T	p.H617Y	83,1	2393	
024	<i>CARD11</i>	c.644A>C	p.K215T	14,4	1105	
	<i>IRF4</i>	c.4A>G	p.N2D	16,1	**	
	<i>IRF4</i>	c.65G>T	p.G22V	13,6	**	
	<i>IRF4</i>	c.70C>T	p.L24F	13,4	**	
	<i>IRF4</i>	c.73C>A	p.R25S	15,3	**	
025	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	25	7635	
	<i>CD79B</i>	c.589T>G	p.Y197D	29,2	4279	
027	<i>PIM1</i>	c.20A>G	p.N7S	53	748*	
	<i>PIM1</i>	c.97C>T	p.P33S	73,1	403*	
	<i>PIM1</i>	c.437G>C	p.S146T	13	1505	



## Ergebnisse

Fall Nr.	Gen	HGVS_c	HGVS_p	VAF [%]	Abdeckung
028	<i>PIM1</i>	c.587C>G	p.T196S	73,2	3755
	<i>PIM1</i>	c.940T>G	p.*314E	24,9	1455
	<i>PIM1</i>	c.4C>T	p.L2F	18	1214*
	<i>BCL2</i>	c.571G>A	p.D191N	28	1098
	<i>BCL2</i>	c.175C>T	p.P59S	52	1132
	<i>BCL2</i>	c.179C>T	p.A60V	51	1131
	<i>BCL2</i>	c.34C>T	p.R12W	32	1638
	<i>BCL2</i>	c22G>A	p.G8R	35	1473
	<i>BCL2</i>	c.4G>A	p.A2T	35	1469
029	<i>IRF4</i>	c.295T>C	p.C99R	35,4	4103
	<i>TNFAIP3</i>	c.1804C>T	p.Q362*	36	1657
030	<i>PIM1</i>	c.4C>T	p.L2F	35	466*
	<i>PIM1</i>	c.208G>A	p.E70K	58	475
	<i>PRDM1</i>	c.291_291+1delinsAA	splice site Exon 2	68	3018
	<i>CD79B</i>	c.676_687del	p.H226_Q229del	36	1396
	<i>CD79B</i>	c.590A>C	p.Y197S	29	2662
	<i>BCL2</i>	c.133G>A	p.A45T	32	1971
031	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	42	4283
	<i>PIM1</i>	c.231_236dup	p.G78_E79dup	38	1921
032	<i>BCL6</i>	c.1759G>A	p.A587T	18	745
033	<i>CD79B</i>	c.589dup	p.197Lfs	32	2220
034	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	35	4173
	<i>PIM1</i>	c.256G>C	p.V86L	27	1806
	<i>PIM1</i>	c.493C>T	p.H165Y	27	3131
	<i>PRDM1</i>	c.291G>C	p.E97D	63	1917
035	<i>PIM1</i>	c.14A>G	p.K5R	35	1027*
	<i>PIM1</i>	c.16A>G	p.I6V	35	1027*
	<i>PIM1</i>	c.241C>T	p.P81S	21	2088
	<i>EZH2</i>	c.1937A>G	p.Y646C	30	48*
	<i>BCL2</i>	c.256C>T	p.L86F	34	1002
	<i>BCL2</i>	c.574A>C	p.N192H	5	1996*
036	<i>PIM1</i>	c.26T>C	p.L9P	41,9	1282*
	<i>TNFAIP3</i>	c.721C>T	p.Q241*	52,9	3305
	<i>EZH2</i>	c.1937A>T	p.Y646F	18	105*
037	<i>PIM1</i>	c.72G>C	p.K24N	11	1788
039	<i>PIM1</i>	c.403G>A	p.E135K	34	150*
041	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	20	4532

## Ergebnisse

Fall Nr.	Gen	HGVS_c	HGVS_p	VAF [%]	Abdeckung
	<i>PIM1</i>	c.176C>T	p.S59F	42,6	1855*
	<i>PIM1</i>	c.187C>T	p.P63S	44	1557*
	<i>CARD11</i>	c.367G>A	p.G123S	29,4	1052
<b>042</b>	<i>PIM1</i>	c.713G>C	p.G238A	27	2454
	<i>PIM1</i>	c.756_757delinsCA	p.Q252_V253delinsHI	28	2451
	<i>PIM1</i>	c.189+1_189+5delinsCTGAA	splice site Exon 2	50	1041
	<i>TNFAIP3</i>	c.377T>C	p.L126P	28	3526
	<i>CD79B</i>	c.589T>C	p.Y197H	87	2934
	<i>BCL2</i>	c.400G>A	p.V134M	61,5	6964
<b>043</b>	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	39	4840
	<i>PIM1</i>	c.4C>T	p.L2F	47	1301*
	<i>PIM1</i>	c.97C>T	p.P33S	48	589*
	<i>PIM1</i>	c.487_489delinsATA	p.V163I	47	3170
	<i>PIM1</i>	c.544C>G	p.L182V	42	5679
	<i>PIM1</i>	c.549G>T	p.K183N	46	5699
<b>44</b>	<i>PIM1</i>	c.97C>A	p.P33T	20	287*
	<i>CD79B</i>	c.590A>C	p.Y197S	26	2188
<b>045</b>	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	23	4583
	<i>CD79B</i>	c.590A>G	p.Y197C	51	2348
<b>046</b>	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	70	6883
	<i>PRDM1</i>	c.412-1G>A	splice site Exon 4	34	2596
	<i>CD79B</i>	c.590A>C	p.Y197S	39	2156
<b>048</b>	<i>MYD88</i>	c.773C>T	p.P258L	17,3	5092
	<i>CD79B</i>	c.590A>G	p.Y197C	27	1784
<b>050</b>	<i>CARD11</i>	c.290T>G	p.F97C	22	6655
	<i>EZH2</i>	c.1936T>A	p.Y646N	23	176*
<b>051</b>	<i>PIM1</i>	c.202C>T	p.H68Y	32	1056
	<i>BCL2</i>	c.351C>G	p.S117R	7	2238
	<i>BCL2</i>	c.338C>T	p.A113V	8	2211
	<i>BCL2</i>	c.325C>G	p.R109G	8	2216
	<i>BCL2</i>	c.265G>A	p.V89M	31	658
	<i>BCL2</i>	c.256C>G	p.L86V	31	664
<b>052</b>	<i>MYD88</i>	c.656C>G	p.S219C	20	3714
	<i>IRF4</i>	c.104G>C	p.G35A	44	981
	<i>PIM1</i>	c.571G>A	p.A191T	38	5051
<b>055</b>	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	43	1998
	<i>PIM1</i>	c.72G>C	p.K24N	68	1154

## Ergebnisse

Fall Nr.	Gen	HGVS_c	HGVS_p	VAF [%]	Abdeckung
057	<i>CD79B</i>	c.590A>G	p.Y197C	39	2274
	<i>BCL2</i>	c.391G>A	p.A131T	58	3839
	<i>BCL2</i>	c.302G>C	p.G101A	31	1420
	<i>BCL2</i>	c.268C>G	p.P90A	36	837
	<i>BCL2</i>	c.205A>T	p.T69S	37	794
	<i>BCL2</i>	c.53A>T	p.Y18F	39	2388
058	<i>PIM1</i>	c.241_242delinsTT	p.P81F	7	920*
059	<i>BCL6</i>	c.1031G>A	p.P344L	31	2169
060	<i>PIM1</i>	c.358C>G	p.L120V	11	377
	<i>BCL2</i>	c.22G>C	p.G8R	7	6126
061	<i>TNFAIP3</i>	c.2268delC	p.D756fs	66	5602
	<i>IRF4</i>	c.20G>T	p.G7V	31	35*
	<i>IRF4</i>	c.49G>C	p.V17L	11	135*
	<i>IRF4</i>	c.54C>A	p.S18R	11	157*
	<i>IRF4</i>	c.110A>T	p.Y37F	21	**
	<i>IRF4</i>	c.131A>G	p.N44S	21	**
	<i>IRF4</i>	c.143G>C	p.S48T	16	**
	<i>IRF4</i>	c.146T>C	p.I49T	23	**
	<i>IRF4</i>	c.178_180delinsTTC	p.Q60F	23	**
062	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	52	11778
	<i>CD79B</i>	c.589T>A	p.Y197N	86	5441
063	<i>MYD88</i>	c.794T>C	p.L265P	26	7110
	<i>PIM1</i>	c.208G>A	p.E70K	11	3358
	<i>PRDM1</i>	c.291G>C	p.E97D	37	2500
064	<i>PRDM1</i>	c.975dup	p.R326Sfs	37	6928
	<i>BCL6</i>	c.1756C>T	p.P586S	40	1641
	<i>EZH2</i>	c.1936T>A	p.Y646N	65	128*
	<i>BCL2</i>	c.574A>C	p.N192H	40	3255
	<i>BCL2</i>	c.537G>T	p.E179D	39	3031
	<i>BCL2</i>	c.513C>A	p.D171E	38	3034
	<i>BCL2</i>	c.494A>G	p.E165G	40	3012
065	<i>PIM1</i>	c.370G>C	p.E124Q	52	121*
	<i>PIM1</i>	c.373C>G	p.P125A	9	121*
	<i>CARD11</i>	c.1010G>A	p.R337Q	38	1557
	<i>CD79B</i>	p.589T>G	p.Y197D	23	2970

## Ergebnisse

### 3.5.1 MUTATIONSVERTEILUNG NACH COO-SUBTYP

Beim GCB-Subtyp, im Vergleich zum non-GCB-Subtyp, zeigten sich häufiger Mutationen in *EZH2* (100% aller *EZH2*-Mutationen) *BCL2* (94 % aller *BCL2*-Mutationen) und *IRF4* (81 % aller *IRF4*-Mutationen) (Abbildung 7). Ohne Berücksichtigung mehrfacher Mutationen stellen *BCL2*-Mutationen 11,5 % aller Mutationen dar (10/104 bei GCB- vs. 2/104 beim non-GCB-Subtyp). Beim GCB-Subtyp zeigen sich häufiger mehrfache Mutationen innerhalb des Gens. Bei der rein qualitativen Betrachtung, ob mindestens eine Mutation im *IRF4*-Gen vorhanden ist, zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl der Fälle mit *IRF4*-Mutation zwischen den beiden Subtypen (3/50 beim GCB-Subtyp vs. 3/54 beim non-GCB-Subtyp).

Beim non-GCB-Subtyp wurden häufiger Mutationen in *PRDM1*- (87,5 % aller *PRDM1*-Mutationen), *CD79B*- (80 % aller *CD79B*-Mutationen) und *MYD88*-Gen (76,5 % aller *MYD88*-Mutationen) als beim GCB-Subtyp detektiert.

Ähnlich häufig in beiden Subtypen mutiert waren *CARD11* (6/158), *BCL6* (4/158) und *TNFAIP3* (6/158).

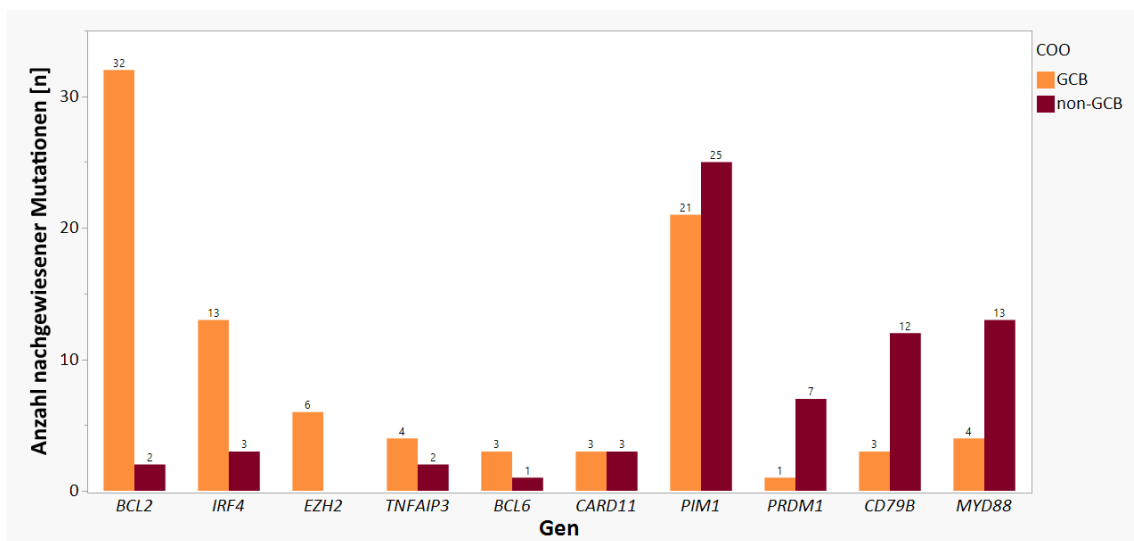


Abbildung 7: Mutationsverteilung nach Subtyp. In Orange wird der GCB-Subtyp, in Rot der non-GCB-Subtyp dargestellt. Die Höhe der Balken gibt die Anzahl der insgesamt nachgewiesenen Mutationen in einem Gen an. IHC: Immunhistochemie, GCB: Keimzentrumssubtyp, non-GCB: nicht-Keimzentrumssubtyp

Die beiden *BCL2*-Mutationen, die bei non-GCB-Subtyp auftraten, fanden sich in Kombination mit einer *CD79B*-Mutation.

## Ergebnisse

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Mutationsverteilung zwischen dem non-GCB- und dem GCB-Subtyp (für alle Mutationen:  $\text{Chi}^2(9) = 61,84$ ;  $p < .050$ ; für alle mutierten Gene ohne multipel Mutationen auf einem Gen:  $\text{Chi}^2(9) = 29,11$ ;  $p < .050$ ). Dieser Unterschied zeigte sich sowohl bei der Betrachtung aller gefundene Mutationen als auch in der Betrachtung der Verteilung der mutierten Gene, unabhängig der Anzahl verschiedener Mutationen in einem Gen.

### 3.5.2 ZUSAMMENFÜHRUNG DER IHC UND MUTATIONSANALYSE

Tabelle 14 stellt eine Übersicht über die immunhistochemischen Färbungen sowie die Ergebnisse der Mutationsanalyse dar.

## Ergebnisse

**Tabelle 14:** Übersicht Immunhistochemie, Mutationsanalyse und FISH-Analyse aller analysierter Proben. Dreifach positiv bezeichnet eine positive Färbung in der Immunhistochemie (IHC) für CD10, BCL6 und MUM1/IRF4; Bei den immunhistochemischen Färbungen steht 0 für negativ, 1 für positiv, 2 für nicht durchgeführt, 3 für schwach positiv. sp-s: Spleiß-Mutation, HGBCL: High-Grade B-Zell-Lymphom. TL: Translokation, TP: Tripel positiv (dreifach positiv), neg.: negativ. HA: Hans-Algorithmus (Algorithmus zur Bestimmung der Ursprungszelle). GCB: Keimzentrumssubtyp, non-GCB: nicht-Keimzentrumssubtyp, FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, IHC: Immunhistochemie

Fall Nr.	Alter	CD10	BCL6	MUM1	Typ HA	BCL2	MYC [%]	MYC	Mutierte Gene	Anmerkungen
001	81	0	1	1	non-GCB	0	35	0	keine	-
002	68	1	1	0	GCB	1	10	0	<i>PIM1</i>	-
003	76	1	1	0	GCB	1	0	0	<i>2x BCL2</i>	-
004	75	0	1	0	GCB	0	0	0	<i>PIM1 (sp-s)</i>	-
005	81	3	1	0	GCB	0	15	0	keine	-
006	85	0	1	1	non-GCB	1	10	0	<i>PIM1</i>	-
007	71	0	1	1	non-GCB	1	35	0	<i>PIM1, CD79B</i>	-
008	82	0	1	1	non-GCB	1	60	1	keine	<b>FISH:</b> MYC TL, BCL2, BCL6 neg.
009	62	0	1	1	non-GCB	1	70	1	<i>IRF4, PRDM1 (sp-s)</i>	<b>FISH:</b> MYC, BCL2, BCL6 neg.
010	63	1	1	3	GCB	3	30	0	keine	<b>IHC:</b> TP
011	78	0	1	1	non-GCB	1	10	0	<i>MYD88<sup>L265P</sup></i>	-
012	37	1	1	0	GCB	3	30	0	keine	-
013	74	1	1	0	GCB	1	0	0	<i>BCL2</i>	-
014	74	0	1	1	on-GCB	1	80	1	<i>MYD88<sup>L265P</sup>, PRDM1, CARD11</i>	<b>FISH:</b> MYC neg
015	67	1	1	1	GCB	1	15	0	<i>MYD88<sup>L265P</sup>, IRF4, PIM1, CD79B</i>	<b>IHC:</b> TP; <b>FISH:</b> MYC, BCL2, BCL6 neg.
016	64	1	1	0	GCB	1	60	1	<i>EZH2, 4x BCL2</i>	<b>FISH:</b> MYC negativ

## Ergebnisse

Fall Nr.	Alter	CD10	BCL6	MUM1	Typ HA	BCL2	MYC [%]	MYC	Mutierte Gene	Anmerkungen
017	87	0	1	1	non-GCB	1	35	0	<i>MYD88<sup>L265P</sup>, CD79B</i>	-
018	70	1	1	0	GCB	1	10	0	<i>EZH2</i>	-
019	72	3	1	0	GCB	1	80	1	<i>CARD11, 2x BCL2</i>	<b>FISH:</b> <i>BCL2::BCL6</i> TL, <i>MYC</i> neg.
020	91	0	1	1	non-GCB	1	50	1	<i>PIM1</i>	<b>FISH:</b> <i>MYC, BCL2, BCL6</i> neg.
021	91	0	1	0	GCB	1	0	0	keine	-
022	65	3	1	0	GCB	0	0	0	<i>BCL6, 2x TNFAIP3</i>	-
023	82	0	1	1	non-GCB	1	20	0	<i>MYD88, 4xPIM1, PRDM1</i>	-
024	37	1	1	1	GCB	1	70	1	<i>CARD11, 4x IRF4</i>	<b>IHC:</b> TP; <b>FISH:</b> <i>BCL2, MYC</i> neg.
025	64	0	1	1	Non-GCB	1	70	1	<i>MYD88<sup>L265P</sup>, CD79B</i>	-
026	40	0	1	1	Non-GCB	1	15	0	keine	-
027	70	1	1	0	GCB	1	10	0	<i>5x PIM1</i>	-
028	80	1	1	1	GCB	3	10	0	<i>PIM1, 6x BCL2</i>	<b>IHC:</b> TP
029	33	0	1	1	Non-GCB	0	30	0	<i>IRF4, TNFAIP3</i>	<b>FISH:</b> <i>BCL6</i> TL, <i>MYC, BCL2</i> neg.
030	76	0	1	1	Non-GCB	1	65	1	<i>BCL2, 2x PIM1, 2x CD79B, PRDM1 (sp-s)</i>	<b>FISH:</b> <i>MYC</i> negativ
031	55	0	1	1	Non-GCB	1	60	1	<i>MYD88<sup>L265P</sup>, PIM1</i>	<b>FISH:</b> <i>MYC, BCL2, BCL6</i> neg.
032	44	0	1	1	Non-GCB	1	10	0	<i>BCL6</i>	-
033	79	0	0	1	Non-GCB	1	80	1	<i>CD79B</i>	<b>FISH:</b> <i>MYC</i> TL, <i>BCL2</i> neg.
034	75	1	1	1	GCB	1	40	1	<i>MYD88<sup>L265P</sup>, 2x PIM1, PRDM1</i>	<b>IHC:</b> TP

## Ergebnisse

Fall Nr.	Alter	CD10	BCL6	MUM1	Typ HA	BCL2	MYC [%]	MYC	Mutierte Gene	Anmerkungen
035	70	1	1	0	GCB	1	50	1	3x PIM1, 2x BCL2, EZH2	-
036	71	1	1	0	GCB	1	0	0	PIM, TNFAIP3, EZH2	-
037	74	1	1	0	GCB	0	10	0	PIM1	-
038	42	3	1	0	GCB	3	65	1	keine	-
039	79	1	1	0	GCB	1	30	0	PIM1	-
040	20	1	1	1	GCB	3	30	0	keine	IHC: TP
041	77	0	0	1	Non-GCB	1	30	0	MYD88 <sup>L265P</sup> , 2x PIM1, CARD11	-
042	83	0	3	1	Non-GCB	1	70	1	CD79B, 3x PIM1 (sp- s), TNFAIP3, BCL2	FISH: MYC, BCL2 neg.
043	76	0	0	1	Non-GCB	1	80	1	MYD88 <sup>L265P</sup> , 5x PIM1	FISH: MYC neg.
044	75	0	1	1	Non-GCB	0	35	0	PIM1, CD79B	FISH: MYC neg.
045	54	3	1	0	GCB	1	20	0	MYD88 <sup>L265P</sup> , CD79B	-
046	78	0	1	1	Non-GCB	1	60	1	MYD88 <sup>L265P</sup> , PRDM1 (sp-s), CD79B	FISH: MYC, BCL2, BCL6 neg.
047	82	3	1	0	GCB	1	55	1	keine	FISH: MYC::BCL2 TL, BCL6 neg., HGBCL
048	63	0	1	1	Non-GCB	1	30	0	MYD88, CD79B	FISH: MYC, BCL2, BCL6 neg.
049	70	0	3	1	Non-GCB	0	0	0	keine	-
050	43	1	1	0	GCB	0	10	0	CARD11, EZH2	-
051	74	1	1	0	GCB	1	0	0	PIM1, 5x BCL2	-
052	57	0	3	1	Non-GCB	0	50	1	MYD88, IRF4, PIM1	FISH: MYC TL



## Ergebnisse

Fall Nr.	Alter	CD10	BCL6	MUM1	Typ HA	BCL2	MYC [%]	MYC	Mutierte Gene	Anmerkungen
053	74	0	1	1	Non-GCB	3	0	0	keine	-
054	78	0	1	1	Non-GCB	1	20	0	keine	-
055	59	1	1	1	GCB	1	15	0	<i>MYD88<sup>L265P</sup>, CD79B, PIM1</i>	<b>IHC:</b> TP
056	72	1	1	0	GCB	0	0	0	keine	-
057	68	1	1	1	GCB	1	95	1	<i>5x BCL2</i>	<b>IHC:</b> CD20 neg., TP <b>FISH:</b> <i>MYC::BCL6</i> TL, <i>BCL2</i> neg., HGBCL
058	31	1	1	0	GCB	0	30	0	<i>PIM1</i>	<b>FISH:</b> <i>MYC</i> neg.
059	77	3	1	0	GCB	0	10	0	<i>BCL6</i>	-
060	71	3	1	1	GCB	1	30	0	<i>PIM1, BCL2, TNFAIP3</i>	<b>IHC:</b> TP
061	37	1	1	1	GCB	1	30	0	<i>8x IRF4</i>	<b>IHC:</b> TP
062	73	0	0	1	Non-GCB	1	60	1	<i>MYD88<sup>L265P</sup>, CD79B</i>	<b>FISH:</b> <i>MYC</i> TL
063	77	0	1	1	Non-GCB	1	75	1	<i>MYD88<sup>L265P</sup>, PIM1, 2x PRDM1</i>	<b>FISH:</b> <i>MYC::BCL6</i> TL, <i>BCL2</i> neg., HGBCL
064	68	2	1	0	GCB	1	0	0	<i>4x BCL2, BCL6, EZH2</i>	-
065	53	0	3	1	Non-GCB	1	40	1	<i>CARD11, CD79B, 2x PIM1</i>	<b>FISH:</b> <i>MYC, BCL2</i> neg.

### 3.5.3 IDENTIFIKATION DES DREIFACH POSITIVEN GCB-SUBTYP

Ein kleiner Teil der Fälle des GCB-Kollektivs (10/35) zeigte Auffälligkeiten in der Mutationsverteilung (Abbildung 9). Die Auffälligkeiten lassen sich folgendermaßen benennen:

- keine *EZH2*-Mutation: insgesamt wurden 6 *EZH2*-Mutationen nachgewiesen, alle traten beim nicht dreifach positiven GCB-Subtyp auf
- *IRF4*-Mutationen: es traten insgesamt bei 6 Fällen *IRF4*-Mutationen auf, davon jeweils drei beim non-GCB-Subtyp und drei beim dreifach positiven GCB-Subtyp
- *MYD88/CD79B*-Mutationen: insgesamt wurden 23 *MYD88*- oder *CD79B*-Mutationen nachgewiesen, 18 % traten beim GCB-Subtyp auf, und davon 75 % beim dreifach positiven GCB-Subtyp

Immunhistochemisch zeigte diese GCB-Untergruppe eine Gemeinsamkeit: CD10<sup>+</sup>BCL6<sup>+</sup>MUM1/IRF4<sup>+</sup>. Diese Fälle waren für alle drei Färbungen des HA positiv.

Diese Untergruppe wird im Folgenden dreifach positive GCB-Fälle genannt und genauer klassifiziert.

Statistisch zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Mutationsverteilung aller Mutationen dreifach positiver GCB-Fälle zu nicht dreifach positiven GCB-Fällen ( $Chi^2(9) = 30,47, p < .001$ ).

#### 3.5.3.1 Charakterisierung der dreifach positiven GCBs

Die Tabelle 15 zeigt die wichtigsten Patientencharakteristika aufgeteilt nach Subtyp. Dabei wurden die Fälle des GCB-Subtyps in dreifach positiv und nicht dreifach positiv unterteilt. Es zeigte sich, dass Patienten mit einem dreifach positiven DLBCL vom GCB-Subtyp eher jünger und häufiger weiblich sind.

## Ergebnisse

Tabelle 15: Patientencharakteristika nach Subtyp aufgeteilt nach immunhistochemischen Status. Der GCB-Subtyp wurde nach immunhistochemischen Status in dreifach positiv (CD10<sup>+</sup>BCL6<sup>+</sup>MUM1/IRF4<sup>+</sup>) und nicht dreifach positiv aufgeteilt. HGBCL: High-Grade B-Zell-Lymphom, GCB-Subtyp: Keimzentrumssubtyp, non-GCB-Subtyp: nicht-Keimzentrumssubtyp

	GCB-Subtyp nicht dreifach positiv [n = 25]	GCB-Subtyp dreifach positiv [n = 10]	Non-GCB- Subtyp [n = 30]
<b>Alter [Jahre]</b>			
Median	71	65	75,5
<b>Geschlecht [n]</b>			
Männlich (%)	15 (60)	3 (30)	17 (56,6)
Weiblich (%)	10 (40)	7 (70)	13 (43,4)
<b>Tumorlokalisation</b>			
<b>Nodal (%)</b>	9 (36)	4 (40)	9 (30)
<b>Extranodal gesamt (%)</b>	16 (64)	6 (60)	21 (70)
Sonstige	7	1	9
Rachenraum	7	3	6
GI-Trakt	2	1	2
Hoden	0	1	4
<b>HGBCL</b>	1	1	1

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen nach COO-Subtyp sind in Tabelle 16 dargestellt. Es fiel auf, dass alle dreifach positiven Fälle BCL2 positiv waren, wobei drei nur schwach. Die Fälle zeigten sich in 70 % MYC negativ.

Es ist anzumerken, dass eine CD10- und eine MUM1/IRF4-Färbung schwach positiv war. Sonst zeigten sich deutlich positive Färbungen zur Identifikation der dreifach positiven Fälle.

## Ergebnisse

*Tabelle 16: Immunhistochemische Charakteristika dreifach positiver GCB-Fälle. GCB-Subtyp: Keimzentrumssubtyp, non-GCB-Subtyp: nicht-Keimzentrumssubtyp. Fehlende Werte aus technischen Gründen*

	<b>Gesamt [n = 65]</b>	<b>GCB- Subtyp nicht dreifach positiv [n = 25]</b>	<b>GCB-Subtyp dreifach positiv [n = 10]</b>	<b>Non-GCB- Subtyp [n = 30]</b>
<b>CD10 [n]</b>				
Negativ (%)	32 (49,2)	2 (8)	0 (0)	30 (100)
Schwach positiv (%)	8 (12,3)	7 (28)	1 (10)	0 (0)
Positiv (%)	24 (36,9)	15 (60)	9 (90)	0 (0)
Fehlend	1 (1,5)	1 (4)	0 (0)	0 (0)
<b>BCL6 [n]</b>				
Negativ (%)	4 (6,2)	0 (0)	0 (0)	4 (13,3)
Schwach positiv (%)	4 (6,2)	0 (0)	0 (0)	4 (13,3)
Positiv (%)	57 (87,7)	25	10 (100)	22 (73,3)
<b>MUM1/IRF4 [n]</b>				
Negativ (%)	25 (38,5)	25	0 (0)	0 (0)
Schwach positiv (%)	1 (1,5)	0 (0)	1 (10)	0 (0)
Positiv (%)	39 (60)	0 (0)	9 (90)	30 (100)
<b>BCL2 [n]</b>				
Negativ (%)	13 (20)	8 (32)	0 (0)	5 (16,6)
Schwach positiv (%)	6 (9,2)	2 (8)	3 (30)	1 (3,3)
Positiv (%)	46 (70,1)	15 (60)	7 (70)	24 (80)
<b>MYC [n]</b>				
Negativ (%)	42 (64,6)	20 (80)	7 (70)	15 (50)
Positiv (%)	23 (35,4)	5 (20)	3 (30)	15 (50)
<b>MYC [%]</b>				
Median	30	10	30	37,5
<b>MIB1 [%]</b>				
Mittelwert [%]	78	72	80	85
0–40 [n (%)]	6 (9,4)	5 (20)	0 (0)	1 (3,3)
40–80 [n (%)]	26 (40,6)	13 (52)	5 (50)	8 (26,7)
> 80 [n (%)]	32 (50)	7 (28)	5 (50)	20 (66,7)
Fehlend	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3,3)

## Ergebnisse

In Abbildung 8 zeigt sich die immunhistochemische Darstellung eines Falls vom dreifach positiven GCB-Subtyp.

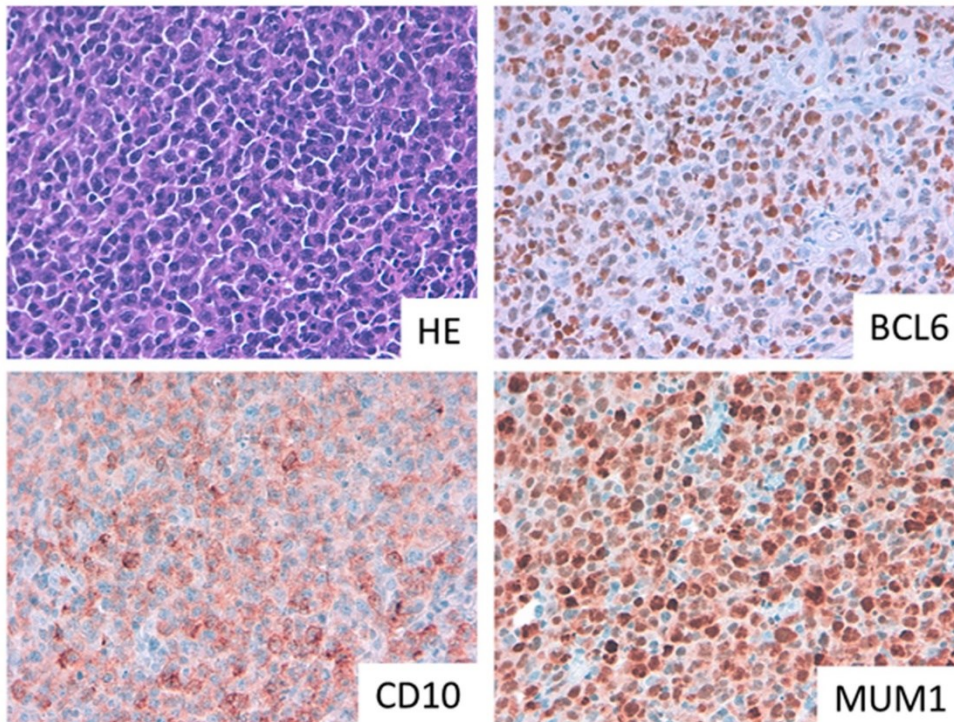


Abbildung 8: Morphologische und immunhistochemische Darstellung eines Falls vom dreifach positiven GCB-Subtyp. Die HE-Färbung zeigt ein DLBCL, welches immunhistochemisch eine CD10-, BCL6- und MUM1/IRF4-Expression zeigt. Vergrößerung 400x.

### 3.5.4 ZUORDNUNG ZU MOLEKULAREN SUBTYPEN

Abbildung 9 zeigt die Mutationsverteilung in Abhängigkeit vom Subtyp und der FISH-Analyse. In der Abbildung wurden die Fälle entsprechend des Mutationsprofils dem molekularen Subtyp zugeordnet, nach der Einteilung von Wright et al. (2020). Dem EZB-Subtyp lassen sich hier 11 Fälle zuordnen, alle Fälle mit *BCL2*- oder *EZH2*-Mutationen wurden dieser Kategorie zugeordnet. Es zeigt sich, dass keine Fälle vom non-GCB-Subtyp in diese Kategorie fallen.

23 Fällen wurden dem MCD-Subtyp zugeteilt. Es zeigten sich 19 *CD79B*- und/oder *MYD88*-Mutationen bei Fällen vom non-GCB-Subtyp und 4 beim GCB-Subtyp. Zusätzlich ließen sich 11 Fälle in Zusammenschau der Mutationen dem MCD-Subtyp zuordnen. Die Mutationen sind nicht alle hierfür am häufigsten beschrieben, sondern sind teilweise einzeln häufiger in einem anderen Subtyp vertreten (zwei beim non-GCB-Subtyp, zwei beim dreifach positiven GCB-Subtyp

## Ergebnisse

und sechs beim GCB-Subtyp). Dabei wurden Mutationen in *PIM1*, *PRDM1* und *IRF4* als MCD-assoziierte festgelegt, entsprechend der Publikation von (Wright et al. 2020).

Zum BN2-Subtyp wurden zwei Fälle zugeordnet, beide Fälle wiesen eine *BCL6*-Translokation auf. Zusätzlich zeigten sich in drei Fällen mit dem BN2-Subtyp assoziierte Mutationen. Als mit dem BN2-Subtyp assoziierte Mutationen wurden hier Mutationen im *BCL6*-Gen gewertet.

In Abbildung 9 lässt sich zeigen, dass von den 10 dreifach positiven GCB-Fällen bei 5 eine Zuordnung zum MCD-Subtyp passt, bei zwei Fällen zum EZB- und bei einem zum BN2-Subtyp. In zwei Fällen wurde keine Mutation nachgewiesen, somit kann keine Aussage getroffen werden.

Eine isolierte *MYC*-Translokation zeigte sich bei vier Fällen vom non-GCB-Subtyp. Die Mutationsverteilung der Fälle wird in Abbildung 9 dargestellt. Fall 008 fehlt, da dieser zwar eine isolierte *MYC*-Translokation aufweist, jedoch keine Mutation. Bei drei der untersuchten Fälle handelte es sich nach Definition um HGBCL, sogenannte „double-hit Lymphome“ (2x vom GCB-Subtyp, 1x vom non-GCB-Subtyp). Dabei konnte bei einem Fall vom GCB-Subtyp eine *MYC::BCL2*-Translokation nachgewiesen werden. Dieser Fall zeigte keine Mutationen und wird deshalb in Abbildung 9 nicht dargestellt. Die beiden anderen Fälle zeigten *MYC::BCL6*-Translokationen und sind in Abbildung 9 dargestellt. Ein Fall vom GCB-Subtyp zeigte die Kombination einer *BCL2::BCL6*-Translokation ohne *MYC*-Translokation. Per definitionem handelt es sich nicht um ein HGBCL.

## Ergebnisse

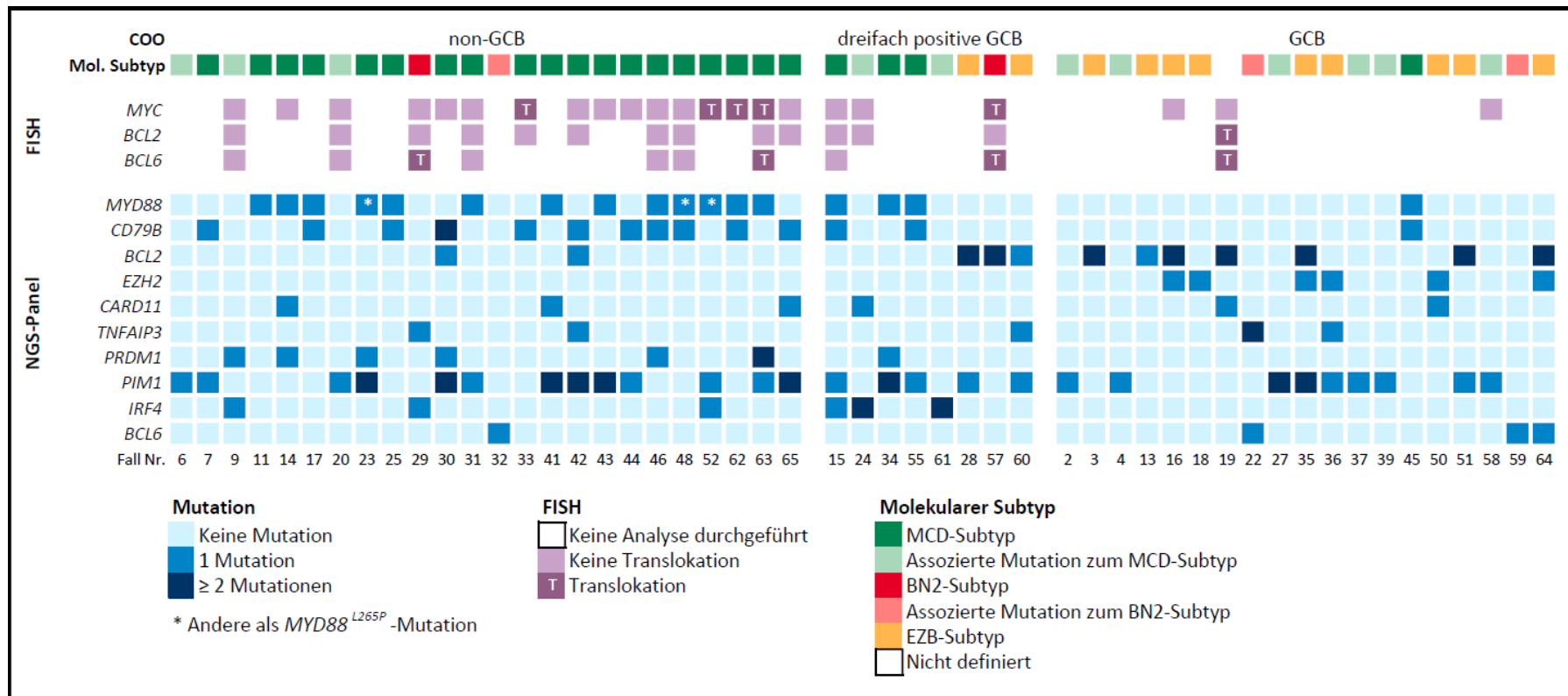


Abbildung 9: Überblick über alle 51 DLBCL, NOS-Fälle mit Mutationen eingeteilt nach COO. GCB: Keimzentrumssubtyp, non-GCB: nicht-Keimzentrumssubtyp, es zeigen sich zwei *MYC*::*BCL6*-Translokationen, somit zwei HGBCL (High-Grade B-Zell-Lymphom), ebenso eine *BCL2*::*BCL6*-Translokation. Zuordnung zum molekularen Subtyp als Schlussfolgerung aus dem Mutationsprofil entsprechend der Definition von Wright et al. (2020). Als assoziierte Mutationen zum MCD-Subtyp wurde *PIM1*, *PRDM1*, *IRF4* gewertet. Als assoziiert zum BN2-Subtyp wurden Mutationen in *BCL6* bei fehlender Aussage über den Translokationsstatus gewertet. Zum EZB-Subtyp wurden alle *BCL2*- und *EZH2*-Mutationen zugeordnet. Nicht dargestellt sind 14 Fälle, bei denen keine Mutationen nachgewiesen wurden.

### 3.5.5 HOTSPOT-MUTATIONEN

Im *MYD88*-Gen zeigten sich in 17 von 65 Fällen eine Mutation. Meist zeigte sich die p.L265P Hotspot-Mutation (14/65). Die drei anderen Mutationen waren p.P258L (non-GCB, Nr. 048), p.S206C (non-GCB, Nr. 023), p.S219C (non-GCB, Nr. 052). Alle drei wurden als pathogen beschrieben.

Bei *CD79B* und *EZH2* wurde durch das verwendete Panel nur der Hotspotbereich abgedeckt. Im *CD79B*-Gen zeigten sich 15 Mutationen in 14 Fällen, davon 5x p.Y197C, 3x p.Y197S, 2x p.Y197D, jeweils einmal p.Y197H/N/F sowie eine Frameshift-Mutation in p.Y197Lfs und einmalig eine Deletion der Codons 226–229 (non-GCB). Auch in *EZH2* zeigten sich insgesamt 6 Mutationen, davon 2x p.Y646H, 2x p.Y646N, und jeweils einmal p.Y646F und p.Y646C.

### 3.5.6 VALIDIERUNG

Bei einer Mutation mit einer Abdeckung von unter 200 reads wurden mittels EA Validierungen durchgeführt. In Tabelle 18 sind alle bestätigten Mutationen durch Validierungen, die durchgeführt wurden, dargestellt.

Die durchschnittliche Abdeckung über alle Mutationen gerechnet betrug 3447,9 reads. In Tabelle 17 wird die mittlere Abdeckung der einzelnen Gene dargestellt. Bei dem Gen *EZH2* zeigte sich eine mittlere Abdeckung von 137,3 reads. Deshalb wurden in diesen Genregionen die Rohdaten zusätzlich auf Mutationen geprüft. In Fall 035 wurde damit eine Mutation mit einer Abdeckung von 48 reads nachgewiesen. Diese wurde in der Validierung bestätigt. Ebenfalls zeigte sich in Fall 061 und 024 im *IRF4*-Gen eine schwankende Abdeckung. Aufgrund dieser Abdeckung wurde eine Validierung durchgeführt, durch die weitere Mutationen detektiert wurden, die in der ursprünglichen Analyse nicht erkannt wurden.



## Ergebnisse

Tabelle 17: Verteilung der Abdeckung nach Gen

<b>Gen</b>	<b>Abdeckung Mittelwert</b>
<b><i>BCL2</i></b>	2787,4
<b><i>BCL6</i></b>	1828,3
<b><i>CARD11</i></b>	2474,2
<b><i>CD79B</i></b>	3038
<b><i>EZH2</i></b>	137,3
<b><i>IRF4</i></b>	1954
<b><i>MYD88</i></b>	5894,8
<b><i>PIM1</i></b>	1810,6
<b><i>PRDM1</i></b>	3374,9
<b><i>TNFAIP3</i></b>	2857,7

## Ergebnisse

Tabelle 18: Übersicht der durchgeführten Validierungen und bestätigten Mutationen. EA: Einzelamplikon, VAF: variant allele frequency, k. A.: keine Angabe aufgrund Archivierung der Daten

Primer	Fall Nr.	Gen	Region	Mutation cDNA	Mutation Protein	VAF Mutation [%]	Abdeckung Mutation [n]	VAF EA [%]	Abdeckung EA
<b>PIM1-EA-33</b>	002	<i>PIM1</i>	chr6:37138630	c.164G>A	p.G55D	23	746	17	2493
<b>PIM1-EA-33</b>	020	<i>PIM1</i>	chr6:37138642	c.176_177delins TT	p.S59F	7,8	2131	9	7929
<b>PIM1-EA-33</b>	023	<i>PIM1</i>	chr6:37138609	c.143G>T	p.G48V	53	610	43	3938
<b>PIM1-EA-33</b>	023	<i>PIM1</i>	chr6:37138609	c.149G>A	P.G50D	53	610	46	3941
<b>PIM1-EA-33</b>	027	<i>PIM1</i>	chr6:37138563	c.97C>T	p.P33S	73	403	65	3111
<b>PIM1-EA-33</b>	043	<i>PIM1</i>	chr6:37138563	c.97C>T	p.P33S	48	589	2	1483
<b>PIM1-EA-33</b>	044	<i>PIM1</i>	chr6:37138563	c.97C>A	p.P33T	20	287	28	1590
<b>PIM1-EA-33</b>	041	<i>PIM1</i>	chr6:37138642	c.176C>T	p.S59F	42,6	1855	67	322
<b>PIM1-EA-33</b>	041	<i>PIM1</i>	chr6:37138653	c.187C>T	p.P63S	44	1557	68	312
<b>PIM1-EA-2</b>	028	<i>PIM1</i>	chr6:37138355	c.4C>T	p.L2F	18	1214	14	28821
<b>PIM1-EA-2</b>	030	<i>PIM1</i>	chr6:37138355	c.4C>T	p.L2F	35	466	43	8793
<b>PIM1-EA-2</b>	035	<i>PIM1</i>	chr6:37138365	c.14A>G	p.K5R	35	1027	26	9369
<b>PIM1-EA-2</b>	035	<i>PIM1</i>	chr6:37138367	c.16A>G	p.I6V	35	1027	27	9000
<b>PIM1-EA-2</b>	036	<i>PIM1</i>	chr6:37138377	c.26T>C	p.L9P	41,9	1282	38	2930
<b>PIM1-EA-2</b>	015	<i>PIM1</i>	chr6:37138355	c.4C>T	p.L2F	44,5	1151	47	3821
<b>PIM1-EA-2</b>	027	<i>PIM1</i>	chr6:37138371	c.20A>G	p.N7S	53	748	57	7785
<b>PIM1-EA-2</b>	043	<i>PIM1</i>	chr6:37138355	c.4C>T	p.L2F	47	1304	46	1177

## Ergebnisse

Primer	Fall Nr.	Gen	Region	Mutation cDNA	Mutation Protein	VAF Mutation [%]	Abdeckung Mutation [n]	VAF EA [%]	Abdeckung EA
<b>PIM1-EA-80</b>	058	<i>PIM1</i>	chr6:37138901	c.241_242delC CinsTT	p.P81F	7	920	8	89130
<b>PIM1-EA-124</b>	065	<i>PIM1</i>	chr6:37139030	c.370G>C	p.E124Q	52	121	54	153006
<b>PIM1-EA-124</b>	065	<i>PIM1</i>	chr6:37139033	c.373C>G	p.P125A	9	120	5	153006
<b>PIM1-EA-124</b>	039	<i>PIM1</i>	chr6:37139063	c.403G>A	p.E135K	34	150	22	225214
<b>IRF4-EA 35-72</b>	009	<i>IRF4</i>	chr6:393330	c.178C>T	p.Q60*	13,9	4166	17	205382
<b>IRF4-EA 35-72</b>	015	<i>IRF4</i>	chr6:393330	c.178C>T	p.Q60*	7,8	1743	8	5730
<b>IRF4-EA 35-72</b>	061	<i>IRF4</i>	chr6:393262	c.110A>T	p.Y37F			21	2285
<b>IRF4-EA 35-72</b>	061	<i>IRF4</i>	chr6:393283	c.131A>G	p.N44S	nur im EA		21	2444
<b>IRF4-EA 35-72</b>	061	<i>IRF4</i>	chr6:393295	c.143G>C	p.S48T	nachgewiesen bei		16	2310
<b>IRF4-EA 35-72</b>	061	<i>IRF4</i>	chr6:393298	c.146T>C	p.I49T	geringer Abdeckung		23	2496
<b>IRF4-EA 35-72</b>	061	<i>IRF4</i>	chr6:393330– chr6:393332	c.178_180delins TTC	p.Q60F			23	2575
<b>IRF4-EA-1-34</b>	061	<i>IRF4</i>	chr6:393172	c.20G>T	p.G7V	37	35	31	903
<b>IRF4-EA-1-34</b>	061	<i>IRF4</i>	chr6:393201	c.49G>C	p.V17L	9	153	11	911
<b>IRF4-EA-1-34</b>	061	<i>IRF4</i>	chr6:393206	c.54C>A	p.S18R	9	157	11	906
<b>IRF4-EA-1-34</b>	024	<i>IRF4</i>	chr6:393156	c.4A>G	p.N2D	nur im EA		16	k. A.
<b>IRF4-EA-1-34</b>	024	<i>IRF4</i>	chr6:393217	c.65G>T	p.G22V	nachgewiesen bei		14	k. A.
<b>IRF4-EA-1-34</b>	024	<i>IRF4</i>	chr6:393222	c.70C>T	p.L24F	geringer Abdeckung		13	k. A.
<b>IRF4-EA-1-34</b>	024	<i>IRF4</i>	chr6:393225	c.73C>A	p.R25S			15	k. A.
<b>EZH2-EA-646</b>	018	<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>C	p.Y646H	23	99	24	55015

## Ergebnisse

Primer	Fall Nr.	Gen	Region	Mutation cDNA	Mutation Protein	VAF Mutation [%]	Abdeckung Mutation [n]	VAF EA [%]	Abdeckung EA
<b>EZH2-EA-646</b>	035	<i>EZH2</i>	chr7:148508727	c.1937A>G	p.Y646C	30	48	27	5985
<b>EZH2-EA-646</b>	036	<i>EZH2</i>	chr7:148508727	c.1937A>T	p.Y646F	18	105	18	1215515
<b>EZH2-EA-646</b>	064	<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>A	p.Y646N	65	128	53	41820
<b>EZH2-EA-646</b>	050	<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>A	p.Y646N	24	176	22	94649
<b>BCL2-EA-192</b>	035	<i>BCL2</i>	chr18:60985326	c.574A>C	p.N192H	5	1996	9	256782

## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mutationsanalyse als unterstützende Methode zur Einteilung des DLBCL, NOS anhand der COO untersucht. Die Subgruppeneinteilung des DLBCL, NOS anhand der COO wird in der 5. Edition der WHO-Klassifikation weiterhin gefordert und von den ICC als prognostisch relevant angesehen (Campo et al. 2022; Alaggio et al. 2022). Alaggio et al. (2022) bewerten die prognostische Relevanz der COO-Einteilung als „begrenzt außerhalb von Studien“. Die Verbesserung der Subtypeneinteilung des DLBCL, NOS ist somit dringend notwendig. Es scheint, diese prognostische Bedeutung lässt sich verlässlicher mittels GEP und/oder molekulargenetischen Analysen reproduzieren, welche teilweise mit der immunhistochemischen COO Einteilung korreliert (Sehn and Salles 2021). Im diagnostischen Alltag wird aufgrund von Praktikabilität-, Zeit- und Kostengründen jedoch häufig die IHC zur Identifikation der COO verwendet. Dies ist von der WHO und der ICC so anerkannt. Folgende Aspekte sind bei der Anwendung von IHC-Algorithmen, insbesondere dem HA zur Einteilung des COO-Subtyps zu beachten:

- Die Immunhistochemie stellt einen Surrogatparameter für die Genexpression dar. Die Genauigkeit der Prädiktion des GEP-COO-Subtyps ist begrenzt, mit einer Übereinstimmungsrate von ca. 80 bis 85 % zwischen IHC und GEP (Morin, Arthur, and Hodson 2022), (Hans et al. 2004).
- Durch die dichotome Klassifikation in GCB- und non-GCB-Subtyp wird die mittels GEP nachweisbare, unklassifizierbare Gruppe der DLBCL, NOS, die ca. 15 % der Fälle ausmacht, nicht erkannt.

Somit ist die rein dichotome immunhistochemische COO-Einteilung nicht differenziert genug, um „die Komplexität und Varianz dieser Erkrankung abzubilden“ (Quintanilla-Martinez et al. 2023).

Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Kombination der Mutationsanalyse mit der immunhistochemischen COO-Bestimmung die

Einteilung präzisieren kann. Das dafür verwendete Patientenkollektiv besteht aus 65 Probanden, die jeweils anhand der Immunhistochemie via HA der entsprechenden COO zugeordnet wurden. Zusätzlich erfolgte eine Mutationsanalyse von 10 Genen mittels gezielter Sequenzierung durch NGS.

### 4.1 IMMUNHISTOCHEMISCHE UND EPIDEMIOLOGISCHE MERKMALE

Das analysierte Patientenkollektiv stellt mit insgesamt 65 Probanden von der Anzahl her ein kleines Kollektiv dar. Es zeigt sich eine leichte männliche Geschlechtsdominanz. Mit einem M:F-Verhältnis von 1:1,2 in unserem Kollektiv entspricht dies der beim DLBCL,NOS zu erwartenden Verteilung (Jaffe et al. 2017). Die Altersverteilung liegt mit einem medianen Alter von 72 Jahren bei Diagnosestellung etwas über dem in der Literatur angegeben mittleren 6. Lebensjahrzehnt (Sehn and Salles 2021).

Die analysierten Proben stammen zur 34 % aus nodalem Tumorbefall. Jaffe et al. (2017) geben eine extranodale Herkunft bei 30 % der DLBCL-Patienten an, und beschreiben bei bis zu 70 % der Patienten eine extranodale Beteiligung. Swerdlow et al. (2017) beschreiben, dass sowohl ein extranodaler als auch nodaler Tumorbefall auftreten kann, und geben bei mindestens 40 % der Fälle einen extranodalen Befall an. Eine Analyse von Gutiérrez-García et al. (2010) zeigte in 53 % der DLBCL-Patienten eine primäre nodale Manifestation. Eine aktuelle Analyse bei Patienten im Stadium I zeigte sogar in nur 34 % nodale Manifestation (Bobillo et al. 2021).

Der Proliferationsindex liegt bei DLBCLs meist hoch. In der WHO-Klassifikation von 2017 (Swerdlow et al. 2017) wird er mit über 40 %, teilweise bis über 90 % angegeben. Jaffe et al. (2017) geben einen Median von 55 % für den Proliferationsindex an. In diesem Kollektiv liegt der Median bei 82,5 %. Möglicherweise könnte der hohe Proliferationsindex in der Präselektion des analysierten Kollektivs begründet liegen. Die gezielte Auswahl von tumorreichen Proben könnte zu einer Akkumulation von besonders proliferationsaktiven Tumoren geführt haben.

## Diskussion

Jaffe et al. (2017) beschreiben eine immunhistochemische CD10-Positivität in 30–50 % der Fälle, Berglund et al. (2005) geben 35 % an. Das vorliegende Kollektiv zeigte sich in 36,9 % der Fälle CD10 positiv. Für BCL6-Positivität wird von Jaffe et al. (2017) ca. 60 % angegeben, ein älteres Review von de Leval and Harris (2003) nennt eine Spanne von 57 bis 100 %. Im vorliegenden Kollektiv zeigte sich ein hoher Anteil von 87 % BCL6 positiven Fällen.

Ein Fall weist CD20-Negativität auf. Ein Verlust der CD20-Positivität kann durch eine Therapie mit Rituximab erklärt werden. Die liegt in diesem Fall nicht vor, soweit aus den vorliegenden Unterlagen ersichtlich.

Für MUM1/IRF4-Positivität variieren die Angaben von de Leval and Harris (2003) und Swerdlow et al. (2017) von 35 bis 75 %. Im hier analysierten Kollektiv zeigten sich 60 % der Fälle MUM1/IRF4 positiv.

Die BCL2-Färbung zeigt sich laut Sehn and Salles (2021) in ca. 65 % der Fälle positiv. Hier zeigte sich BCL2 in 70 % der Fälle positiv.

Die MYC-Positivität variierte ebenfalls deutlich; Jaffe et al. (2017) geben ein Mittelwert von 40 % an, jedoch mit einer großen Spanne. Als Grund benennen Jaffe et al. (2017) die variablen Cut-off-Werte um Positivität zu definieren. Die 2017 WHO-Klassifikation empfiehlt einen Cut-off-Wert von mindestens 40 % der Zellen (Swerdlow et al. 2017). Sehn and Salles (2021) geben bei 45 % der DLBCL-Fälle MYC als positiv an. Hier zeigte sich eine MYC-Positivität in 35,4 % der Fälle.

HGBCL zeigen sich hier als 4,6 % der Fälle. Dies entspricht ebenfalls der von Sehn and Salles (2021) berichteten Häufigkeit von 4 bis 8 % der DLBCL.

Insgesamt stellt das hier analysierte Kollektiv ein kleines, aber repräsentatives Kollektiv des DLBCL, NOS dar.

## 4.2 GENETISCHE MERKMALE

### 4.2.1 TRANSLOKATIONEN

Chromosomale Translokationen, die den *IGH*-Lokus und verschiedene Protoonkogene betreffen, stellen einen besonderen Mechanismus in der

Tumorentstehung bei B-Zell-Lymphomen dar. Häufig treten bei DLBCLs *IGH::BCL2*-, *IGH::BCL6*- und *IGH::MYC*-Translokationen auf (Klein and Dalla-Favera 2008). Dadurch geraten diese Protoonkogene unter die Kontrolle der regulatorischen Sequenzen der *IGH*-Gene, was zu einer veränderten Expression der entsprechenden Protoonkogene führen kann (Klein and Dalla-Favera 2008). Die Expression von MYC korreliert nur zu 30–40 % mit einer Translokation, wie in einem Review von Ott, Rosenwald, and Campo (2013) dargelegt. Die Autoren beschreiben, dass Fälle mit einer *MYC*-Translokation hohe MYC-Expression zeigen (Ott, Rosenwald, and Campo 2013). Hier zeigten sich in 7 Fällen eine *MYC*-Translokation, alle davon waren MYC positiv (mit einem Cut-off-Wert von 40%), jedoch auch 13 der MYC<sup>+</sup>-Fälle zeigten keine Translokation. Somit bestätigte sich die zu erwartende Verteilung und zeigt, dass die IHC einen sensitiven Marker mit jedoch geringer Spezifität für *MYC*-Translokationen darstellt.

*BCL2*-Translokation sind assoziiert mit einer *BCL2*-Expression und treten häufiger beim GCB-Subtyp auf (Swerdlow et al. 2017). Hier zeigten sich bei 12 Fällen *BCL2*-Mutationen und bei zwei Fällen zeigten sich *BCL2*-Translokationen in der FISH-Analyse, wie erwartet beim GCB-Subtyp. Beide Fälle mit *BCL2*-Translokation zeigten eine deutliche *BCL2*-Expression.

### 4.2.2 MUTATIONSANALYSE

#### 4.2.2.1 Technische Aspekte

Für den analytischen Teil lag eine ausreichende DNA-Qualität vor. Es war zu erwarten, dass mit NanoDrop höhere DNA-Konzentrationen als mit Qubit gemessen wurden. Die Unterschiede lassen sich in der Methode erklären, da bei Qubit nur doppelsträngige DNA gemessen wird, NanoDrop jedoch nicht zwischen einsträngigen DNA/RNA-Fragmenten und dsDNA unterscheiden kann.

Bei der Validierung muss berücksichtigt werden, dass die Reproduzierbarkeit von Mutationen in Genregionen mit vielen Mutationen aufgrund dieser mit unterschiedlichen Primern reduziert ist. Die Primer binden in den mutierten Bereichen nicht an beide Allele gleich gut. Dies erklärt bei Fall 043 die deutlich niedrigere VAF von 2 %, bezogen auf 48 % im Panel.



### 4.2.2.2 Mutationsverteilung

Ein weiterer besonderer Mechanismus der Tumorentstehung bei DLBCLs ist die aberrante somatische Hypermutation aSHM (Pasqualucci et al. 2001). Der Mechanismus der somatischen Hypermutation befähigt B-Zellen die Variabilität der Antikörper zu erhöhen. Eine wichtige Rolle in diesem Vorgang spielt wie unter Abschnitt 1.4.1 beschrieben das Enzym AID, welches Desaminierungen am Cytosin durchführt, die zu Doppelstrangbrüchen führen können (Bross et al. 2000). Die SHM kann sowohl *IGH*- als auch nicht *IGH*-Gene betreffen (Pasqualucci et al. 1998). Die Gene *BCL6*, *BCL2*, *PIM1*, *MYC*, und *PAX5* stellen typischerweise Zielgene der aberrante somatische Hypermutation dar (Khodabakhshi et al. 2012). Dies erklärt die hier insbesondere in *BCL2*, *PIM1* und *IRF4* nachgewiesenen mehrfachen Mutationen.

In dieser Arbeit konnte im Mutationsspektrum signifikante Unterschiede zwischen den immunhistochemischen non-GCB und GCB-Subtypen des DLBCL, NOS dargestellt werden. Wie zu erwarten, zeigten typische CD10<sup>+</sup>MUM1-GCB-Fälle Mutationen in Genen wie *BCL2* und *EZH2* (Schmitz et al. 2018). Insgesamt wurden sechs *EZH2*-Mutationen (in 6 Fällen) und 34 *BCL2*-Mutationen (in 12 Fällen) detektiert. Alle *EZH2*-Mutationen wurden hier bei GCB-Fällen nachgewiesen, *BCL2*-Mutationen zu 94 % (10 von 12) in Fällen vom GCB-Subtyp.

Der non-GCB-Subtyp bzw. ABC-Subtyp weist häufig ein chronisches B-Zell-Rezeptorsignal und eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf. Bei typischen non-GCB-Fällen zeigte sich ein gehäuftes Auftreten von Mutationen in klassischen ABC-Genen wie *MYD88*, *CD79B* und *PRDM1* (Sehn and Salles 2021). Insgesamt wurden in dieser Analyse 17 *MYD88*-Mutationen bei insgesamt 17 Fällen, 15 *CD79B*-Mutationen in insgesamt 14 Fällen und 8 *PRDM1*-Mutationen in 7 Fällen detektiert. 76,5 % aller *MYD88*-Mutationen (13 von 17 Fällen), 80 % aller *CD79B*-Mutationen (11 von 14 Fällen) und 87,5 % aller *PRDM1*-Mutationen (6 von 7 Fällen) traten beim non-GCB-Subtyp auf.

Es erfolgte die Darstellung einer möglichen Zuordnung zu den molekularen Subtypen entsprechend der Einteilung von Wright et al. (2020). 23 Fälle mit

*CD79B*- und/oder *MYD88*-Mutationen wurden der MCD-Kategorie zugeordnet (Abbildung 9). 11 Fälle konnten dem EZB/C3-Subtyp zugeordnet werden (Sehn and Salles 2021), zwei Fälle dem BN2-Subtyp. Wie in Abbildung 9 dargestellt, lassen sich fast alle Fälle entsprechend der molekularen Subtypen von Wright et al. (2020) zuteilen. Dies bestätigt aktuell bestehende Modelle zur molekularen Subgruppeneinteilung.

### 4.2.3 CHARAKTERISIERUNG DES DREIFACH POSITIVEN GCB-SUBTYP

Der dreifach positive GCB-Subtyp lässt sich durch die Kombination der zeitgleichen immunhistochemischen Expression von CD10, BCL6 und MUM1/IRF4 identifizieren. Genetisch tragen diese Fälle für eine GCB-Abstammung ungewöhnlich viele *MYD88*- oder *CD79B*-Mutationen, *IRF4*-Mutationen und selten bis keine *EZH2*-Mutation.

Diese zeitgleiche Expression von CD10 und BCL6 als Keimzentrumsmarker in Kombination mit MUM1/IRF4, welches in der linearen Entwicklung einer B-Zelle später exprimiert wird, stellt eine aberrante, unphysiologische Proteinexpression dar und gibt Hinweise auf eine Fehlentwicklung. Eine normal entwickelte B-Zelle weist zuerst ein hochreguliertes BCL6 auf, welches im Verlauf herunterreguliert wird, damit MUM1/IRF4 hochreguliert werden kann (Basso and Dalla-Favera 2015). Es wäre möglich, dass sich in diesen dreifach positiven GCB-Fällen ein Teil des unklassifizierbaren Subtyps der GEP-Analysen widerspiegelt. Denn auch bei Betrachtung des molekularen Subtyps stellt sich diese Gruppe der dreifach positiven GCB-Fälle sehr heterogen dar (Abbildung 9).

Insgesamt wurden in der Arbeit 10 der 65 Fälle als dreifach positive Fälle identifiziert (15 %). Eine erste Vermutung war, dass möglicherweise ein technischer Grund eine Rolle spielen könnte. Die Möglichkeit, dass dies über die Hinzunahme der Kategorie "schwach positive" zu erklären ist, konnte ausgeschlossen werden, da (wie in Tabelle 9 ersichtlich) nur in zwei Fällen jeweils eine Färbung als schwach positiv kategorisiert wurde. Außerdem bezieht sich „schwach“ auf die Intensität der Färbung und nicht auf die Anzahl der Zellen. Somit könnte es sich um einen relevanten Unterschied handeln. In der Literatur war bis dato keine weitere Charakterisierung des CD10<sup>+</sup>BCL6<sup>+</sup>MUM1/IRF4-

GCB-Subtyps zu finden. Aus dieser Arbeit ging eine weitere Arbeit hervor, um die Eigenschaften dieser Gruppe genauer zu beschreiben (Frauenfeld et al. 2022).

In der Arbeit von Frauenfeld et al. (2022) wurden bei 55 dreifach positiven Fällen zusätzlich zur IHC und Mutationsanalyse auch eine GEP-Analyse durchgeführt. Es konnte bestätigt werden, dass dreifach positive Fälle, auch „DLBCL mit aberranter Expression (AE)“ von MUM1/IRF4, CD10 und BCL6, kurz DLBCL, AE genannt, als eine besondere Identität gewertet werden sollten. Frauenfeld et al. (2022) konnten nachweisen, dass bei ca. 41 % der DLBCL, AE-Fälle im GEP konträre Ergebnisse zum HA zeigen. Somit liegt bei dieser Untergruppe die Konkordanz deutlich unter den zu erwartenden 86 % (Meyer et al. 2011). Daraus lässt sich schließen, dass diese Fälle ein hohes Risiko haben, anhand der immunhistochemischen Analyse zur falschen COO zugeordnet zu werden. Möglicherweise erklärt die fehlende Abbildung der nicht klassifizierbaren Fälle im HA die variable Reproduzierbarkeit der prognostischen Relevanz der COO-Einteilung anhand der IHC (Campo et al. 2022).

Die Autorinnen (Frauenfeld et al. 2022) legten dar, dass sich die GBC DLBCL, AE in drei Gruppen einteilen lassen:

Eine Gruppe entspricht dem durch GEP bestätigtem ABC-Subtyp mit einem Mutationsprofil überwiegend passend zum MCD/C5-Subtyp. Dies wurde in dieser Studie bei den Fällen Nr. 034 und 055 gezeigt (Abbildung 9).

Die zweite Gruppe zeigt *IRF4*-Mutationen und -Translokationen. Interessanterweise lassen sich die Fälle, obwohl sie molekulargenetisch NF-kB bezogene Mutationen zeigen, im GEP sowohl zum GCB- als auch zum ABC-Subtyp zuordnen. Diese Gruppe könnte am ehesten den Fällen mit einer *IRF4*-Mutation entsprechen: Nr. 015, 024 und 061. Dies unterlegt die besondere Bedeutung des *IRF4*-Gens.

Gruppe drei zeigt den GCB-Subtyp im GEP mit passenden Mutationen entsprechend der EZB/C3-Subgruppe. In der vorliegenden Arbeit könnten die Fälle Nr. 028 und 060 in diese Kategorie fallen.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei typischem ABC- bzw. non-GCB- und GCB-Subtyp sich Mutationsanalyse und IHC gut ergänzen. Insbesondere lässt sich darstellen, dass durch die Kombination der IHC mit der Mutationsanalyse eine genetische Untergruppe differenziert werden konnte, welche sich genetisch deutlich von dem typischen GCB-Subtyp abzuheben scheint und bis dahin noch nicht beschrieben worden war. Dies zeigt die bedeutsamen Unterschiede, die anhand der Zusammenführung der Immunhistochemie und der Mutationsanalyse nachgewiesen werden können, welche durch die einzelnen Methoden separat nicht nachweisbar gewesen wären.

### 4.3 AUSBLICK

Die Stärke der hier vorliegenden Arbeit liegt darin, eine einfache und effiziente Beobachtung darzustellen, nach der gezielt in der alltäglichen Diagnostik stratifiziert werden kann, in welchen Fällen eine aufwändige Diagnostik notwendig ist. So kann die Immunhistochemie, welche weiterhin zur Diagnosestellung eines DLBCLs notwendig ist, als Screening-Parameter genutzt werden, um daraus folgend effizient weitere Diagnostik einzusetzen. Die Daten von Schmitz et al. (2018), Chapuy et al. (2018) und Sehn and Salles (2021) zeigen die Optimierbarkeit durch die molekularbiologischen Einteilung, jedoch keine praktische Umsetzung, da kein Zusammenhang zur Immunhistochemie getroffen wird. Diese Analyse zeigt, dass zur besseren Subklassifikation, die mittlerweile auf molekularer Ebene deutlich optimiert wurde, weithin von der immunhistochemischen Färbung ausgegangen werden kann. Bestimmte Parameter sollten aber anzeigen, wann es sich gezielt und effizient lohnt, weitergehende Diagnostik einzusetzen, um die Patientenversorgung und bestenfalls den Behandlungserfolg zu verbessern. Denn nur wenn das Mutationsspektrum bekannt ist, ist es möglich eine „targeted therapy“ auszuwählen (Sehn and Salles 2021).

Trotz des vorhandenen Wissens um die pathogenetischen und damit auch prognostischen Unterschiede, hat sich die klinische Behandlung der Patienten mit einem DLBCL, NOS, abgesehen von Studien, aktuell noch nicht differenziert.

## Diskussion

Die Erstlinientherapie stellt immer noch die Immunchemotherapie mit R-CHOP dar, die eine Heilungsrate von 40 bis 50 % beim ABC-DLBCL bzw. 70 bis 80 % beim GCB-DLBCL hat (Swerdlow et al. 2017; Song et al. 2023). Das Nichtansprechen auf Chemotherapie oder frühe Rezidive von 20 bis 40 % der Patienten ist ein Abbild der Heterogenität, für die das Prinzip „one fits all“ nicht zutreffen kann (Maurer et al. 2014). Besonders für diese Patienten ist eine differenzierte und valide COO-Einteilung wichtig, um gezielt individualisierbare Therapieoptionen zu etablieren und so die Gesamtüberlebensprognose zu verbessern. Die Präzisierung der molekularen Subgruppen-Einteilung dient der Sicherstellung, dass innerhalb eines (molekularen) Subtyps eine möglichst große Homogenität erreicht wird. Um eine zielgerichtete Therapie zu erreichen, ist es wichtig, dass die molekularen Charakteristika und genetischen Unterschiede derselben Erkrankung bekannt und festgelegt sind. Denn nur dann, wenn die untersuchte Gruppe so homogen wie möglich ist, können Therapiestudien valide Aussagen treffen. So zeigte Leonard et al. (2017), dass die Gabe von Bortezomib zur Standardtherapie R-CHOP bei neu diagnostizierten non-GCB-Patienten keinen Unterschied im progressionsfreien Überleben (progression-free survival [PFS]) macht. Molekulargenetisch hemmt Bortezomib als Proteasom-Inhibitor die Aktivität von NF- $\kappa$ B. Bei non-GCB-Fällen, bzw. klassischen ABC-Fällen kann von einer Überaktivierung von NF- $\kappa$ B ausgegangen werden, sodass durch Bortezomib ein Benefit bei dieser Subgruppe zu erwarten wäre. Die Autoren erklären den fehlenden Unterschied unter anderem durch die zu grobe Einteilungsweise des HA.

Ein weiteres Beispiel ist der Antikörper-Drug-Konjugat-Wirkstoff Polatuzumab Vedotin. Insgesamt verlängert das Medikament bei allen DLBCL das PFS (Tilly et al. 2022): Bei der Studie wurde jedoch der COO-Subtyp oder ein Rearrangement von z.B. *MYC*, *BCL2* oder *BCL6* nicht berücksichtigt. Eine Metaanalyse von Sheng et al. (2023) führte eine differenzierte Subgruppenanalyse durch und zeigt die Überlegenheit von Polatuzumab Vedotin nur bei ABC-DLBCL. Polatuzumab Vedotin besteht aus einem Anti-CD79B-Antikörper und Auristatin E, einem Mikrotubulus-Inhibitor, welcher intravenös verabreicht wird. Möglicherweise zeigt sich die Überlegenheit häufig in beim

## Diskussion

ABC-DLBCL auftretenden *CD79B*-Mutationen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit molekulare Subtypen einheitlich und reproduzierbar zu definieren. Weitere Studien zur Anwendung neuer, zielgerichteter Medikamente unter Berücksichtigung dieser molekularen Subklassifikationen sind notwendig.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Mutationsanalyse eine wichtige Bedeutung in der COO-Einteilung zukommen sollte. Mit der Analyse von 10 Genen konnte eine Einteilung der Subtypen geschaffen werden, und gleichzeitig bestand dann bereits das Wissen über die vorliegenden Mutationen. Mit dem hier verwendeten Panel wurde bei 78,5 % der Fälle mindestens eine Mutation nachgewiesen. Bei der Bewertung der Analyse sollte beachtet werden, dass in der vorgelegten Arbeit eine Ungenauigkeit für die Subtypisierung aufgrund der überschaubaren Anzahl von 10 Genen vorliegen kann. Die aktuelle technische Entwicklung hat zu einer Vergrößerung der Panels und zur Verbesserung der Verfügbarkeit von NGS-Analysen geführt.

Mit dieser Arbeit wurde ein kleiner Teil zur Entschlüsselung der molekularen Landkarte des DLBCL, NOS beigetragen. Besonders durch die Charakterisierung der dreifach positiven GCB-DLBCL als eigene Untergruppe, konnte ein kleines Puzzleteil hinzugefügt werden. Dies betont nochmals die Wichtigkeit für weitere Studien zur molekularen Subklassifikation des DLBCL, NOS.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) ist das häufigste Non-Hodgkin-Lymphom bei Erwachsenen. Genexpressionsanalysen (GEP) haben gezeigt, dass das DLBCL anhand der Ursprungszelle (engl. Cell of Origin [COO]) in drei Subgruppen unterteilt werden kann: in den Subtyp, der einer aktivierten B-Zelle ähnelt (activated B-cell-like [ABC]), den Keimzentrums-Subtyp (germinal center B-cell-like [GCB]) und in eine unklassifizierbare Gruppe. Der molekulare Subtyp hat einen erheblichen Einfluss auf die Prognose des Patienten. Routinemäßig wird ein immunhistochemischer Algorithmus zur Unterscheidung genutzt, meistens der Hans-Algorithmus (HA) basierend auf CD10, MUM1/IRF4 und BCL6. Der HA weist die Proben nur den Subtypen GCB oder non-GCB (ABC) zu, er unterscheidet nicht den unklassifizierten Subtyp. Die Komplexität des DLBCLs wurde durch aktuelle Studien gezeigt, in denen eine Unterscheidung von 4 bis 7 molekularen Subtypen dargestellt wurden. Das Ziel dieser Studie war es, ein Next-Generation-Sequencing (NGS)-Panel mit 10 häufig mutierten Genen des DLBCLs zu etablieren und das Mutationsprofil mit der Ursprungszelle, die anhand des HA definiert wurde, zu vergleichen.

Das Kollektiv bestand aus 65 Proben von DLBCLs. Davon waren 30 Proben nach HA dem Subtyp non-GCB und 35 Proben dem Subtyp GCB zuzuordnen. Insgesamt konnten 158 Mutationen nachgewiesen werden. Es zeigten sich 46 *PIM1*-Mutationen, gleich häufig in beiden Subtypen. Insgesamt konnten 34 *BCL2*-Mutationen, davon 94 % beim GCB-Subtyp, 16 Mutationen in *IRF4* und sechs in *EZH2*, davon zu 81 % bzw. 100 % bei GCB-Subtypen, nachgewiesen werden. Insgesamt wurden 17 *MYD88*-, 15 *CD79B*- und 7 *PRDM1*-Mutationen nachgewiesen, dabei jeweils 76 % bzw. 80 % bzw. 87 % beim non-GCB-Subtyp. Bei 21,5 % der analysierten Fälle (14 von 65, davon 8 beim GCB- und 6 beim non-GCB-Subtyp) wurden keine Mutation nachgewiesen werden. Die Daten definierten eine besondere Untergruppe, die immunhistochemisch für alle drei Färbungen des HA positiv ist und häufig *IRF4*-Mutationen zeigt. Diese Untergruppe entspricht teilweise der neu entdeckten eigenständigen Identität der DLBCL, AE (aberrant coexpression).

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adzhubei, I., D. M. Jordan, and S. R. Sunyaev. 2013. 'Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2', *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 7: Unit7 20.
- Alaggio, R., C. Amador, I. Anagnostopoulos, A. D. Attygalle, I. B. O. Araujo, E. Berti, G. Bhagat, A. M. Borges, D. Boyer, M. Calaminici, A. Chadburn, J. K. C. Chan, W. Cheuk, W. J. Chng, J. K. Choi, S. S. Chuang, S. E. Coupland, M. Czader, S. S. Dave, D. de Jong, M. Q. Du, K. S. Elenitoba-Johnson, J. Ferry, J. Geyer, D. Gratzinger, J. Guitart, S. Gujral, M. Harris, C. J. Harrison, S. Hartmann, A. Hochhaus, P. M. Jansen, K. Karube, W. Kempf, J. Khoury, H. Kimura, W. Klapper, A. E. Kovach, S. Kumar, A. J. Lazar, S. Lazzi, L. Leoncini, N. Leung, V. Leventaki, X. Q. Li, M. S. Lim, W. P. Liu, A. Louissaint, Jr., A. Marcogliese, L. J. Medeiros, M. Michal, R. N. Miranda, C. Mitteldorf, S. Montes-Moreno, W. Morice, V. Nardi, K. N. Naresh, Y. Natkunam, S. B. Ng, I. Oschlies, G. Ott, M. Parrens, M. Pulitzer, S. V. Rajkumar, A. C. Rawstron, K. Rech, A. Rosenwald, J. Said, C. Sarkozy, S. Sayed, C. Saygin, A. Schuh, W. Sewell, R. Siebert, A. R. Sohani, R. Tooze, A. Traverse-Glehen, F. Vega, B. Vergier, A. D. Wechalekar, B. Wood, L. Xerri, and W. Xiao. 2022. 'The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms', *Leukemia*, 36: 1720-48.
- Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, R. E. Davis, C. Ma, I. S. Lossos, A. Rosenwald, J. C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J. I. Powell, L. Yang, G. E. Marti, T. Moore, J. Hudson, Jr., L. Lu, D. B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W. C. Chan, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. O. Armitage, R. Warnke, R. Levy, W. Wilson, M. R. Grever, J. C. Byrd, D. Botstein, P. O. Brown, and L. M. Staudt. 2000. 'Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling', *Nature*, 403: 503-11.
- Basso, K., and R. Dalla-Favera. 2015. 'Germinal centres and B cell lymphomagenesis', *Nat Rev Immunol*, 15: 172-84.
- Berglund, M., U. Thunberg, R. M. Amini, M. Book, G. Roos, M. Erlanson, J. Linderöth, M. Dictor, M. Jerkeman, E. Cavallin-Stahl, C. Sundstrom, S. Rehn-Eriksson, C. Backlin, H. Hagberg, R. Rosenquist, and G. Enblad. 2005. 'Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis', *Mod Pathol*, 18: 1113-20.
- Bobillo, S., E. Joffe, J. A. Lavery, D. Sermer, P. Ghione, A. Noy, P. C. Caron, A. Hamilton, P. A. Hamlin, S. M. Horwitz, A. Kumar, M. J. Matasar, A. Moskowitz, C. N. Owens, M. L. Palomba, C. L. Batlevi, D. Straus, G. von Keudell, A. D. Zelenetz, J. Yahalom, A. Dogan, V. E. Seshan, and A. Younes. 2021. 'Clinical characteristics and outcomes of extranodal stage I diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era', *Blood*, 137: 39-48.
- Bross, L., Y. Fukita, F. McBlane, C. Demolliere, K. Rajewsky, and H. Jacobs. 2000. 'DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation', *Immunity*, 13: 589-97.



- Camicia, R., H. C. Winkler, and P. O. Hassa. 2015. 'Novel drug targets for personalized precision medicine in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a comprehensive review', *Mol Cancer*, 14: 207.
- Campo, E., E. S. Jaffe, J. R. Cook, L. Quintanilla-Martinez, S. H. Swerdlow, K. C. Anderson, P. Brousset, L. Cerroni, L. de Leval, S. Dirnhofer, A. Dogan, A. L. Feldman, F. Fend, J. W. Friedberg, P. Gaulard, P. Ghia, S. M. Horwitz, R. L. King, G. Salles, J. San-Miguel, J. F. Seymour, S. P. Treon, J. M. Vose, E. Zucca, R. Advani, S. M. Ansell, W. Au, C. Barrionuevo, L. Bergsagel, W. C. Chan, J. I. Cohen, F. d'Amore, A. Davies, B. Falini, I. M. Ghobrial, J. R. Goodlad, J. G. Gribben, E. D. Hsi, B. S. Kahl, W.-S Kim, S. Kumar, A. S. LaCasce, C. Laurent, G. Lenz, J. P. Leonard, M. P. Link, A. Lopez-Guillermo, M. V. Mateos, E. A. Macintyre, A. M. Melnick, F. Morschhauser, S. Nakamura, M. Narbaitz, A. Pavlovsky, S. A. Pileri, M. A. Piris, B. Pro, V. Rajkumar, S. T. Rosen, B. Sander, L. H. Sehn, M. A. Shipp, S. M. Smith, L. M. Staudt, C. Thieblemont, T. Tousseyn, W. H. Wilson, T. Yoshino, P.-L. Zinzani, M. Dreyling, D. W. Scott, J. N. Winter, and A. D. Zelenetz. 2022. 'The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee', *Blood*, 140: 1229-53.
- Chapuy, B., C. Stewart, A. J. Dunford, J. Kim, A. Kamburov, R. A. Redd, M. S. Lawrence, M. G. M. Roemer, A. J. Li, M. Ziepert, A. M. Staiger, J. A. Wala, M. D. Ducar, I. Leshchiner, E. Rheinbay, A. Taylor-Weiner, C. A. Coughlin, J. M. Hess, C. S. Pedomallu, D. Livitz, D. Rosebrock, M. Rosenberg, A. A. Tracy, H. Horn, P. van Hummelen, A. L. Feldman, B. K. Link, A. J. Novak, J. R. Cerhan, T. M. Habermann, R. Siebert, A. Rosenwald, A. R. Thorner, M. L. Meyerson, T. R. Golub, R. Beroukhim, G. G. Wulf, G. Ott, S. J. Rodig, S. Monti, D. S. Neuberg, M. Loeffler, M. Pfreundschuh, L. Trümper, G. Getz, and M. A. Shipp. 2018. 'Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes', *Nat Med*, 24: 679-90.
- Choi, W. W., D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, M. A. Piris, A. H. Banham, J. Delabie, R. M. Braziel, H. Geng, J. Iqbal, G. Lenz, J. M. Vose, C. P. Hans, K. Fu, L. M. Smith, M. Li, Z. Liu, R. D. Gascoyne, A. Rosenwald, G. Ott, L. M. Rimsza, E. Campo, E. S. Jaffe, D. L. Jaye, L. M. Staudt, and W. C. Chan. 2009. 'A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy', *Clin Cancer Res*, 15: 5494-502.
- Coiffier, B., E. Lepage, J. Briere, R. Herbrecht, H. Tilly, R. Bouabdallah, P. Morel, E. Van Den Neste, G. Salles, P. Gaulard, F. Reyes, P. Lederlin, and C. Gisselbrecht. 2002. 'CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma', *N Engl J Med*, 346: 235-42.
- Coiffier, B., C. Thieblemont, E. Van Den Neste, G. Lepeu, I. Plantier, S. Castaigne, S. Lefort, G. Marit, M. Macro, C. Sebban, K. Belhadj, D. Bordessoule, C. Ferme, and H. Tilly. 2010. 'Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte', *Blood*, 116: 2040-5.

- Davis, R. E., K. D. Brown, U. Siebenlist, and L. M. Staudt. 2001. 'Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells', *J Exp Med*, 194: 1861-74.
- de Leval, L., A. A. Alizadeh, P. L. Bergsagel, E. Campo, A. Davies, A. Dogan, J. Fitzgibbon, S. M. Horwitz, A. M. Melnick, W. G. Morice, R. D. Morin, B. Nadel, S. A. Pileri, R. Rosenquist, D. Rossi, I. Salaverria, C. Steidl, S. P. Treon, A. D. Zelenetz, R. H. Advani, C. E. Allen, S. M. Ansell, W. C. Chan, J. R. Cook, L. B. Cook, F. d'Amore, S. Dirnhofer, M. Dreyling, K. Dunleavy, A. L. Feldman, F. Fend, P. Gaulard, P. Ghia, J. G. Gribben, O. Hermine, D. J. Hodson, E. D. Hsi, G. Inghirami, E. S. Jaffe, K. Karube, K. Kataoka, W. Klapper, W. S. Kim, R. L. King, Y. H. Ko, A. S. LaCasce, G. Lenz, J. I. Martin-Subero, M. A. Piris, S. Pittaluga, L. Pasqualucci, L. Quintanilla-Martinez, S. J. Rodig, A. Rosenwald, G. A. Salles, J. San-Miguel, K. J. Savage, L. H. Sehn, G. Semenzato, L. M. Staudt, S. H. Swerdlow, C. S. Tam, J. Trotman, J. M. Vose, O. Weigert, W. H. Wilson, J. N. Winter, C. J. Wu, P. L. Zinzani, E. Zucca, A. Bagg, and D. W. Scott. 2022. 'Genomic profiling for clinical decision making in lymphoid neoplasms', *Blood*, 140: 2193-227.
- de Leval, L., and N. L. Harris. 2003. 'Variability in immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical relevance', *Histopathology*, 43: 509-28.
- den Dunnen, J. T., R. Dalgleish, D. R. Maglott, R. K. Hart, M. S. Greenblatt, J. McGowan-Jordan, A. F. Roux, T. Smith, S. E. Antonarakis, and P. E. Taschner. 2016. 'HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update', *Hum Mutat*, 37: 564-9.
- Dunleavy, K., S. Pittaluga, M. S. Czuczman, S. S. Dave, G. Wright, N. Grant, M. Shovlin, E. S. Jaffe, J. E. Janik, L. M. Staudt, and W. H. Wilson. 2009. 'Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma', *Blood*, 113: 6069-76.
- Frauenfeld, L., N. Castrejon-de-Anta, J. E. Ramis-Zaldivar, S. Streich, J. Salmeron-Villalobos, F. Otto, A. K. Mayer, J. Steinhilber, M. Pinyol, B. Mankel, C. Ramsower, I. Bonzheim, F. Fend, L. M. Rimsza, I. Salaverria, E. Campo, O. Balague, and L. Quintanilla-Martinez. 2022. 'Diffuse large B-cell lymphomas in adults with aberrant coexpression of CD10, BCL6, and MUM1 are enriched in IRF4 rearrangements', *Blood Adv*, 6: 2361-72.
- Gutiérrez-García, G., L. Colomo, N. Villamor, L. Arenillas, A. Martínez, T. Cardesa, A. García-Herrera, X. Setoain, S. Rodríguez, G. Ghita, P. Abrisqueta, E. Giné, F. Bosch, E. Campo, E. Montserrat, and A. López-Guillermo. 2010. 'Clinico-biological characterization and outcome of primary nodal and extranodal diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era', *Leukemia & Lymphoma*, 51: 1225-32.
- Hans, C. P., D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, R. D. Gascoyne, J. Delabie, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, E. Campo, R. M. Braziel, E. S. Jaffe, Z. Pan, P. Farinha, L. M. Smith, B. Falini, A. H. Banham, A. Rosenwald, L. M. Staudt, J. M. Connors, J. O. Armitage, and W. C. Chan. 2004. 'Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray', *Blood*, 103: 275-82.

- Horn, H., C. Schmelter, E. Leich, I. Salaverria, T. Katzenberger, M. M. Ott, J. Kalla, M. Romero, R. Siebert, A. Rosenwald, and G. Ott. 2011. 'Follicular lymphoma grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles', *Haematologica*, 96: 1327-34.
- Jaffe, E. S., D. A. Arber, E. Campo, N. L. Harris, and L. Quintanilla-Martinez. 2017. *Hematopathology* (Elsevier: Philadelphia, PA).
- Khodabakhshi, A. H., R. D. Morin, A. P. Fejes, A. J. Mungall, K. L. Mungall, M. Bolger-Munro, N. A. Johnson, J. M. Connors, R. D. Gascoyne, M. A. Marra, I. Birol, and S. J. Jones. 2012. 'Recurrent targets of aberrant somatic hypermutation in lymphoma', *Oncotarget*, 3: 1308-19.
- Kim, S., C. Park, Y. Ji, D. G. Kim, H. Bae, M. van Vrancken, D. H. Kim, and K. M. Kim. 2017. 'Deamination Effects in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples in the Era of Precision Medicine', *J Mol Diagn*, 19: 137-46.
- Klein, U., and R. Dalla-Favera. 2008. 'Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy', *Nat Rev Immunol*, 8: 22-33.
- Kreuzer, Karl-Anton. 2018. *Referenz Hämatologie* (Thieme).
- Lacy, S. E., S. L. Barrans, P. A. Beer, D. Painter, A. G. Smith, E. Roman, S. L. Cooke, C. Ruiz, P. Glover, S. J. L. Van Hoppe, N. Webster, P. J. Campbell, R. M. Tooze, R. Patmore, C. Burton, S. Crouch, and D. J. Hodson. 2020. 'Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report', *Blood*, 135: 1759-71.
- Lenz, G., B. Chapuy, B. Glaß, F. Keil, Wolfram Klapper, Maike Nickelsen, Novak Urban, and Heinz Schmidberger. 2021. 'Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom-Onkopedia', Accessed zuletzt 19.11.2023. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/diffuses-grosszelliges-b-zell-lymphom/@@guideline/html/index.html>.
- Lenz, G., G. W. Wright, N. C. Emre, H. Kohlhammer, S. S. Dave, R. E. Davis, S. Carty, L. T. Lam, A. L. Shaffer, W. Xiao, J. Powell, A. Rosenwald, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, E. Campo, E. S. Jaffe, J. Delabie, E. B. Smeland, L. M. Rimsza, R. I. Fisher, D. D. Weisenburger, W. C. Chan, and L. M. Staudt. 2008. 'Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 13520-5.
- Leonard, J. P., K. S. Kolibaba, J. A. Reeves, A. Tulpule, I. W. Flinn, T. Kolevska, R. Robles, C. R. Flowers, R. Collins, N. J. DiBella, S. W. Papish, P. Venugopal, A. Horodner, A. Tabatabai, J. Hajdenberg, J. Park, R. Neuwirth, G. Mulligan, K. Suryanarayan, D.-L. Esseltine, and S. de Vos. 2017. 'Randomized Phase II Study of R-CHOP With or Without Bortezomib in Previously Untreated Patients With Non-Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma', *Journal of Clinical Oncology*, 35: 3538-46.
- Loman, N. J., R. V. Misra, T. J. Dallman, C. Constantinidou, S. E. Gharbia, J. Wain, and M. J. Pallen. 2012. 'Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms', *Nat Biotechnol*, 30: 434-9.

- Luthra, R., R. R. Singh, and K. P. Patel. 2016. *Clinical Applications of PCR* (Humana Press: Department of Hematopathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA).
- Maurer, M. J., H. Ghesquieres, J. P. Jais, T. E. Witzig, C. Haioun, C. A. Thompson, R. Delarue, I. N. Micallef, F. Peyrade, W. R. Macon, T. Jo Molina, N. Ketterer, S. I. Syrbu, O. Fitoussi, P. J. Kurtin, C. Allmer, E. Nicolas-Virelizier, S. L. Slager, T. M. Habermann, B. K. Link, G. Salles, H. Tilly, and J. R. Cerhan. 2014. 'Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy', *J Clin Oncol*, 32: 1066-73.
- Meyer, P. N., K. Fu, T. C. Greiner, L. M. Smith, J. Delabie, R. D. Gascoyne, G. Ott, A. Rosenwald, R. M. Braziel, E. Campo, J. M. Vose, G. Lenz, L. M. Staudt, W. C. Chan, and D. D. Weisenburger. 2011. 'Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab', *J Clin Oncol*, 29: 200-7.
- Morin, R. D., S. E. Arthur, and D. J. Hodson. 2022. 'Molecular profiling in diffuse large B-cell lymphoma: why so many types of subtypes?', *Br J Haematol*, 196: 814-29.
- Morton, L. M., S. S. Wang, S. S. Devesa, P. Hartge, D. D. Weisenburger, and M. S. Linet. 2006. 'Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001', *Blood*, 107: 265-76.
- Nowakowski, G. S., B. LaPlant, W. R. Macon, C. B. Reeder, J. M. Foran, G. D. Nelson, C. A. Thompson, C. E. Rivera, D. J. Inwards, I. N. Micallef, P. B. Johnston, L. F. Porrata, S. M. Ansell, R. D. Gascoyne, T. M. Habermann, and T. E. Witzig. 2015. 'Lenalidomide combined with R-CHOP overcomes negative prognostic impact of non-germinal center B-cell phenotype in newly diagnosed diffuse large B-Cell lymphoma: a phase II study', *J Clin Oncol*, 33: 251-7.
- Ott, G., A. Rosenwald, and E. Campo. 2013. 'Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification', *Blood*, 122: 3884-91.
- Pasqualucci, L. 2019. 'Molecular pathogenesis of germinal center-derived B cell lymphomas', *Immunol Rev*, 288: 240-61.
- Pasqualucci, L., G. Bhagat, M. Jankovic, M. Compagno, P. Smith, M. Muramatsu, T. Honjo, Herbert C. Morse, Michel C. Nussenzweig, and R. Dalla-Favera. 2008. 'AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis', *Nature Genetics*, 40: 108-12.
- Pasqualucci, L., and R. Dalla-Favera. 2014. 'SnapShot: diffuse large B cell lymphoma', *Cancer Cell*, 25: 132-32 e1.
- . 2015. 'The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma', *Semin Hematol*, 52: 67-76.
- Pasqualucci, L., A. Migliazza, N. Fracchiolla, C. William, A. Neri, L. Baldini, R. S. Chaganti, U. Klein, R. Kuppers, K. Rajewsky, and R. Dalla-Favera. 1998. 'BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 11816-21.

- Pasqualucci, L., P. Neumeister, T. Goossens, G. Nanjangud, R. S. Chaganti, R. Kuppers, and R. Dalla-Favera. 2001. 'Hypermethylation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas', *Nature*, 412: 341-6.
- Pfreundschuh, M., L. Trümper, A. Österborg, R. Pettengell, M. Trneny, K. Imrie, D. Ma, D. Gill, J. Walewski, P.-L. Zinzani, R. Stahel, S. Kvaloy, O. Shpilberg, U. Jaeger, M. Hansen, T. Lehtinen, A. López-Guillermo, C. Corrado, A. Scheliga, N. Milpied, M. Mendila, M. Rashford, E. Kuhnt, and M. Loeffler. 2006. 'CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group', *The Lancet Oncology*, 7: 379-91.
- Promega. 2022. 'DNA Purification | DNA Extraction Methods | Promega'. <https://www.promega.de/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/#dna-purification-basics-610cd142-f329-4aa2-8446-8ddd6c7f02ab>.
- Quail, M. A., M. Smith, P. Coupland, T. D. Otto, S. R. Harris, T. R. Connor, A. Bertoni, H. P. Swerdlow, and Y. Gu. 2012. 'A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers', *BMC Genomics*, 13: 341.
- Quintanilla-Martinez, L. 2015. 'IX. Is it only about MYC? How to approach the diagnosis of diffuse large B-cell lymphomas', *Hematol Oncol*, 33 Suppl 1: 50-5.
- . 2017. 'The 2016 updated WHO classification of lymphoid neoplasias', *Hematol Oncol*, 35 Suppl 1: 37-45.
- Quintanilla-Martinez, L., C. Laurent, L. Soma, S. B. Ng, F. Climent, S. L. Ondrejka, A. Zamo, A. Wotherspoon, L. de Leval, S. Dirnhofer, and L. Leoncini. 2023. 'Emerging entities: high-grade/large B-cell lymphoma with 11q aberration, large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement, and new molecular subgroups in large B-cell lymphomas. A report of the 2022 EA4HP/SH lymphoma workshop', *Virchows Arch*, 483: 281-98.
- Rosenwald, A., G. Wright, W. C. Chan, J. M. Connors, E. Campo, R. I. Fisher, R. D. Gascoyne, H. K. Muller-Hermelink, E. B. Smeland, J. M. Giltneane, E. M. Hurt, H. Zhao, L. Averett, L. Yang, W. H. Wilson, E. S. Jaffe, R. Simon, R. D. Klausner, J. Powell, P. L. Duffey, D. L. Longo, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, W. G. Sanger, B. J. Dave, J. C. Lynch, J. Vose, J. O. Armitage, E. Montserrat, A. Lopez-Guillermo, T. M. Grogan, T. P. Miller, M. LeBlanc, G. Ott, S. Kvaloy, J. Delabie, H. Holte, P. Krajci, T. Stokke, L. M. Staudt, and Project Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling. 2002. 'The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma', *N Engl J Med*, 346: 1937-47.
- Rothberg, J. M., W. Hinz, T. M. Rearick, J. Schultz, W. Mileski, M. Davey, J. H. Leamon, K. Johnson, M. J. Milgrew, M. Edwards, J. Hoon, J. F. Simons, D. Marran, J. W. Myers, J. F. Davidson, A. Branting, J. R. Nobile, B. P. Puc, D. Light, T. A. Clark, M. Huber, J. T. Branciforte, I. B. Stoner, S. E. Cawley, M. Lyons, Y. Fu, N. Homer, M. Sedova, X. Miao, B. Reed, J. Sabina, E. Feierstein, M. Schorn, M. Alanjary, E. Dimalanta, D. Dressman, R. Kasinskas, T. Sokolsky, J. A. Fidanza, E. Namsaraev, K. J. McKernan,

- A. Williams, G. T. Roth, and J. Bustillo. 2011. 'An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing', *Nature*, 475: 348-52.
- Schmitz, R., G. W. Wright, D. W. Huang, C. A. Johnson, J. D. Phelan, J. Q. Wang, S. Roulland, M. Kasbekar, R. M. Young, A. L. Shaffer, D. J. Hodson, W. Xiao, X. Yu, Y. Yang, H. Zhao, W. Xu, X. Liu, B. Zhou, W. Du, W. C. Chan, E. S. Jaffe, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, E. Campo, A. Lopez-Guillermo, A. Rosenwald, G. Ott, J. Delabie, L. M. Rimsza, K. Tay Kuang Wei, A. D. Zelenetz, J. P. Leonard, N. L. Bartlett, B. Tran, J. Shetty, Y. Zhao, D. R. Soppet, S. Pittaluga, W. H. Wilson, and L. M. Staudt. 2018. 'Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma', *New England Journal of Medicine*, 378: 1396-407.
- Sehn, L. H., and R. D. Gascoyne. 2015. 'Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity', *Blood*, 125: 22-32.
- Sehn, L. H., and G. Salles. 2021. 'Diffuse Large B-Cell Lymphoma', *N Engl J Med*, 384: 842-58.
- Sheng, Z., D. Li, B. Chen, C. Zhao, W. Zhang, B. Ding, and L. Wang. 2023. 'Superiority of polatuzumab vedotin over other novel agents in previously untreated ABC-type diffuse large B-cell lymphoma: a network meta-analysis of 20 RCTs', *Ann Hematol*, 102: 1011-17.
- Slatko, B. E., A. F. Gardner, and F. M. Ausubel. 2018. 'Overview of Next-Generation Sequencing Technologies', *Curr Protoc Mol Biol*, 122: e59.
- Song, J. Y., S. Dirnhofer, M. A. Piris, L. Quintanilla-Martinez, S. Pileri, and E. Campo. 2023. 'Diffuse large B-cell lymphomas, not otherwise specified, and emerging entities', *Virchows Arch*, 482: 179-92.
- Swerdlow, S. H., E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, and J. Thiele. 2017. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (IARC: Lyon).
- Swerdlow, S. H., E. Campo, S. A. Pileri, N. L. Harris, H. Stein, R. Siebert, R. Advani, M. Ghielmini, G. A. Salles, A. D. Zelenetz, and E. S. Jaffe. 2016. 'The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms', *Blood*, 127: 2375-90.
- Thermo Fisher Scientific. 2009. "NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual." In.
- . 2021. 'RNA/DNA Quantification | Thermo Fisher Scientific - DE', Accessed 07.06.2021. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-quantitation.html>.
- Tilly, H., F. Morschhauser, L. H. Sehn, J. W. Friedberg, M. Trneny, J. P. Sharman, C. Herbaux, J. M. Burke, M. Matasar, S. Rai, K. Izutsu, N. Mehta-Shah, L. Oberic, A. Chauchet, W. Jurczak, Y. Song, R. Greil, L. Mykhalska, J. M. Bergua-Burgues, M. C. Cheung, A. Pinto, H. J. Shin, G. Hapgood, E. Munhoz, P. Abrisqueta, J. P. Gau, J. Hirata, Y. Jiang, M. Yan, C. Lee, C. R. Flowers, and G. Salles. 2022. 'Polatuzumab Vedotin in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma', *N Engl J Med*, 386: 351-63.
- van Dongen, J. J., A. W. Langerak, M. Bruggemann, P. A. Evans, M. Hummel, F. L. Lavender, E. Delabesse, F. Davi, E. Schuurin, R. Garcia-Sanz, J. H. van Krieken, J. Droese, D. Gonzalez, C. Bastard, H. E. White, M. Spaargaren, M. Gonzalez, A. Parreira, J. L. Smith, G. J. Morgan, M.

## Literaturverzeichnis

- Kneba, and E. A. Macintyre. 2003. '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*, 17: 2257-317.
- Wright, G. W., D. W. Huang, J. D. Phelan, Z. A. Coulibaly, S. Roulland, R. M. Young, J. Q. Wang, R. Schmitz, R. D. Morin, J. Tang, A. Jiang, A. Bagaev, O. Plotnikova, N. Kotlov, C. A. Johnson, W. H. Wilson, D. W. Scott, and L. M. Staudt. 2020. 'A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications', *Cancer Cell*, 37: 551 - 68.e14.

## 7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde am Institut für allgemeine Pathologie und Neuropathologie unter Betreuung von Frau Professor Quintanilla-Martinez de Fend durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Professor Quintanilla-Martinez de Fend, die Betreuung durch Julia Steinhilber PhD. Das Ion AmpliSeq Custom Panel wurde von Frau Steinhilber entworfen, entsprechend dem aktuellen Stand der Wissenschaft. Die Fälle wurden von mir nach der Datenbankrecherche im Archiv der Pathologie Tübingen gesucht. Die immunhistochemischen Färbungen, die bereits für die Routinediagnostik vorlagen, wurden durch mich und Frau Professor Quintanilla-Martinez de Fend erneut analysiert und der entsprechenden COO zugeteilt. Ggf. fehlende immunhistochemische Färbungen wurden durch das Routinelabor des Instituts für allgemeine und molekulare Pathologie erstellt und erneut durch mich und Frau Professor Quintanilla-Martinez de Fend begutachtet.

Im Labor wurde die DNA-Extraktion, die DNA-Aufbereitung und Amplikon- sowie EA-Erstellung von mir (nach Einarbeitung durch Labormitglieder Julia Steinhilber und Inga Müller) eigenständig durchgeführt. Die EA für *IRF4*, *EZH2* und/oder *BCL2* für die Fälle 018, 024, 035 und 061 wurden durch Leonie Frauenfeld, Sebastian Streich und Franziska Otto erstellt und die Ergebnisse der Validierung wurden mir zur Verfügung gestellt. Die Beladung des Chips wurde durch Frau Isabell Haußmann durchgeführt. Die Auswertung der NGS-Daten erfolgte durch mich nach Anleitung von Julia Steinhilber und Franziska Otto. Dabei wurden alle Spleiß-Mutationen von Franziska Otto ausgewertet und mir die Daten zur Verfügung gestellt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Frau Professor Quintanilla-Martinez de Fend verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 7. Oktober 2024

A. Mayer



## 8 VERÖFFENTLICHUNGEN

Ein Teil der Daten wurde in folgendem Manuskript veröffentlicht:

Frauenfeld, L., Castrejon-de-Anta, N., Ramis-Zaldivar, J. E., Streich, S., Salmerón-Villalobos, J., Otto, F., **Mayer, A. K.**, Steinhilber, J., Pinyol, M., Mankel, B., Ramsower, C., Bonzheim, I., Fend, F., Rimsza, L. M., Salaverria, I., Campo, E., Balagué, O., & Quintanilla-Martinez, L. (2022). Diffuse large B-cell lymphomas in adults with aberrant coexpression of CD10, BCL6, and MUM1 are enriched in IRF4 rearrangements. *Blood advances*, 6(7), 2361–2372.  
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006034>

### Kongressteilnahme mit Vortrag

19th Meeting of the European Association for Haematopathology, Edinburgh, UK,  
02.10.–04.10.2018:

Mutations analysis as an aid to separate diffuse large B-cell lymphoma subgroups according to the cell of origin (COO)

**Mayer A.**, Steinhilber J., Bonzheim I., Fend F., Quintanilla-Martinez L.

### Kongressteilnahme mit Poster

Forschungskolloquium der Universität Tübingen im Rahmen des IZKF-Promotionskolleg, 26.01.2019:

Mutationsanalyse als unterstützende Methode für die Unterscheidung des Subtyps des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms anhand der Ursprungszelle

**Mayer A.**, Steinhilber J., Bonzheim I., Fend F., Quintanilla-Martinez L.

## 9 DANKSAGUNG

Ich danke Frau Professor Dr. med. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend für die freundliche Überlassung des Themas und die herausragende Betreuung. Ihre große Erfahrung, kritische Hinterfragungen und Geduld haben einen großen Teil zum Erfolg dieses Projektes geleistet.

Des Weiteren möchte ich mich bei Julia Steinhilber und Irina Bonzheim für ihre fachliche Beratung und Unterstützung bei allen Problemen bedanken. Sowie bei Franziska Otto und Leonie Frauenfeld für ihre freundliche Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Inga Müller und Antonio Vogelberg danke ich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre und die vielen gemeinsamen Stunden im Labor.

Auch Klaus Harzer danke ich für seine klugen Anmerkungen und wertvollen Tipps sowie für das wiederholte Korrekturlesen.

Ich danke meinen Eltern Uli und Peter und meiner Schwester Katja für die Unterstützung, die vielen Korrekturen und ihre unermüdliche Motivation meine statistischen Fragen zu beantworten.

Zuletzt danke ich meinem Partner Marc Krause für die liebevolle Unterstützung, akribische Überarbeitungen und anhaltende Motivation weiterzumachen.