

Aus dem  
Department für Diagnostische Labormedizin  
der Universität Tübingen  
Institut für Pathologie und Neuropathologie  
Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie  
und Pathologische Anatomie

**Molekularpathologische Charakterisierung großzelliger B-  
Zell-Lymphome des Waldeyer'schen Rachenrings**

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

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

**vorgelegt von**

**Streich, Sebastian Lukas**

**2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. L. Quintanilla Martinez de Fend
2. Berichterstatter: Professorin Dr. C. Gouttefangeas
3. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Hartmann

Tag der Disputation: 25.06.2024

Diese Arbeit widme ich meiner Familie.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	X
Tabellenverzeichnis .....	XIII
Abkürzungsverzeichnis .....	XV
1 Einleitung.....	1
1.1 Anatomie und Funktion des lymphatischen Systems .....	2
1.1.1 Anatomische Grundlagen .....	2
1.1.2 Entstehung und Reifung der B-Lymphozyten.....	2
1.1.3 Aktivierung der B-Lymphozyten .....	3
1.2 Klassifikation der Lymphome .....	5
1.3 Diffus großzellige B-Zell-Lymphome .....	6
1.3.1 Klassifikation.....	6
1.3.2 Pathogenese .....	10
1.3.3 Histopathologische Eigenschaften .....	13
1.3.4 Epidemiologie und Ätiologie.....	13
1.3.5 Klinik.....	15
1.3.6 Diagnose .....	15
1.3.7 Therapie .....	16
1.3.8 Prognose .....	20
1.4 Follikuläre Lymphome.....	22
1.4.1 Klassifikation.....	22
1.4.2 Pathogenese .....	22
1.4.3 Histopathologische Eigenschaften .....	23
1.4.4 Epidemiologie .....	23
1.4.5 Klinik & Diagnose .....	24
1.4.6 Therapie .....	24

## Inhaltsverzeichnis

1.4.7	Prognose .....	24
1.5	Großzellige B-Zell-Lymphome mit <i>IRF4</i> -Rearrangement .....	25
1.5.1	Rolle von <i>IRF4</i> in der normalen B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung.....	25
1.5.2	Pathogenese von <i>IRF4</i> -Dysfunktionen.....	27
1.5.3	Besondere Eigenschaften von großzelligen B-Zell-Lymphomen mit <i>IRF4</i> -Rearrangement im Vergleich zu DLBCL, NOS.....	27
1.6	DLBCLs im Waldeyer'schen Rachenring .....	29
1.7	Problemstellung und Ziel der Studie .....	30
2	Material und Methoden .....	31
2.1	Material.....	31
2.1.1	Untersuchungsmaterial.....	31
2.1.2	Geräte .....	32
2.1.3	Kits .....	33
2.1.4	Antikörper .....	34
2.1.5	FISH-Sonden.....	34
2.1.6	Primer.....	35
2.1.7	Enzyme .....	39
2.1.8	Chemikalien und Reagenzien .....	39
2.1.9	EDV-Programme .....	40
2.1.10	Hersteller .....	41
2.2	Klinisch-epidemiologische Eigenschaften .....	44
2.3	Morphologie und histopathologische Eigenschaften .....	44
2.4	Immunhistochemie (IHC) .....	44
2.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) .....	45
2.5.1	Vorbereitung.....	45
2.5.2	Waschung, Pepsinverdau, Denaturierung.....	45
2.5.3	Vorbereitung der Sonde, Auftragung, Hybridisierung.....	46
2.5.4	Post-Hybridisierungs-Waschung.....	46

## Inhaltsverzeichnis

2.5.5	Eindecken der Objektträger .....	47
2.5.6	Auswertung .....	47
2.6	Genexpressionsprofil-Analyse (GEP).....	48
2.6.1	Vorbereitung.....	48
2.6.2	Makrodissektion, Zellyse und Proteinverdau .....	48
2.6.3	Target-Protection mittels HTG EdgeSeq System .....	49
2.6.4	Library-Amplifikation .....	49
2.6.5	Quantifizierung und Normalisierung.....	49
2.6.6	Sequenzierung .....	49
2.6.7	Analyse und Auswertung .....	50
2.7	DNA-Extraktion.....	50
2.7.1	Vorbereitung.....	50
2.7.2	Makrodissektion.....	50
2.7.3	DNA-Extraktion und -Aufreinigung .....	51
2.8	DNA-Quantifizierung.....	51
2.8.1	Quantifizierung mit dem NanoDrop 2000-System .....	51
2.8.2	Quantifizierung mit dem Qubit 3.0 Fluorometer.....	52
2.9	PCR und Gelelektrophorese zur Evaluierung der DNA-Qualität.....	52
2.10	Next Generation Sequencing (NGS)-Panel-Sequenzierung.....	54
2.10.1	DNA-Amplifikation .....	55
2.10.2	Enzymatischer Primerverdau an den Amplikons.....	56
2.10.3	Adapterligation.....	56
2.10.4	Library-Aufreinigung .....	57
2.10.5	Library-Quantifizierung .....	57
2.10.6	Library-Pooling und Sequenzierung.....	58
2.10.7	Analyse und Auswertung .....	58
2.11	Einzelamplikon (EA)-Erstellung.....	60
2.11.1	Verdünnung der Primer .....	60

## Inhaltsverzeichnis

2.11.2	Reaktionsansatz .....	60
2.11.3	Amplifikation .....	61
2.11.4	Aufreinigung .....	61
2.11.5	Quantifizierung, Pooling und Sequenzierung .....	61
2.11.6	Analyse und Auswertung .....	61
2.12	Statistische Auswertung.....	61
3	Ergebnisse.....	63
3.1	Klinisch-pathologische Eigenschaften.....	64
3.1.1	Klinische Eigenschaften.....	64
3.1.2	Morphologische Eigenschaften.....	68
3.2	Immunhistochemie.....	69
3.3	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	72
3.3.1	<i>IRF4</i> -FISH .....	72
3.3.2	<i>BCL2</i> -FISH.....	73
3.3.3	<i>MYC</i> -FISH .....	73
3.3.4	<i>IGH</i> -FISH.....	73
3.3.5	Zusammenschau aller FISH-Befunde .....	74
3.3.6	Korrelation FISH – IHC .....	75
3.4	Genexpressionsprofil-Analyse (GEP).....	77
3.4.1	Qualitative Ergebnisse.....	77
3.4.2	Quantitative Ergebnisse und statistische Analysen .....	78
3.5	Mutationsanalyse.....	81
3.6	Getrennte Betrachtung einzelner Subgruppen.....	91
3.6.1	Fälle mit <i>IRF4</i> -Rearrangement (LBCL- <i>IRF4</i> ).....	91
3.6.2	CD10+ BCL6+ MUM1+ (DLBCL-AE) .....	95
3.6.3	Fälle mit nicht-übereinstimmender COO-Klassifikation durch IHC und GEP 96	
3.6.4	Follikuläre Lymphome Grad 3B/Follikulär große B-Zell-Lymphome .....	97

## Inhaltsverzeichnis

3.7	Korrelation der klinisch-pathologischen Eigenschaften, FISH, GEP und NGS	98
3.7.1	Pathogenitätsscores .....	98
3.7.2	Subgruppierung der Fälle .....	98
4	Diskussion .....	104
4.1	Repräsentatives Fallkollektiv für DLBCLs und FLs 3B/FLBLs des Waldeyer'schen Rachenrings.....	104
4.2	Chancen und Grenzen der Immunhistochemie .....	105
4.3	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung als Wegweiser für weiterführende Diagnostik .....	107
4.4	Vorteile der Genexpressionsprofilanalyse.....	108
4.5	Mutationsanalyse als Wegweiser für neue Klassifikationssysteme .....	109
4.6	Subgruppierung der Fälle nach der <i>Cell of Origin</i> .....	109
4.6.1	GCB-DLBCLs mit häufigen <i>BCL2</i> -Translokationen/-Mutationen und LBCL- <i>IRF4</i>	110
4.6.2	ABC-DLBCL mit Mutationen im NF- $\kappa$ B-Pathway und FL Grad 3B/FLBL	113
4.6.3	Unklassifizierbare Fälle als heterogene Subgruppe .....	115
4.7	LBCL- <i>IRF4</i> als definite Entität.....	116
4.8	FL 3B/FLBL als Lymphom mit ungewöhnlichen Eigenschaften.....	118
4.9	Nicht-übereinstimmende COO-Klassifikation .....	118
4.10	DLBCL-AE als heterogene Gruppe.....	119
4.11	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	119
5	Zusammenfassung .....	122
6	Literaturverzeichnis.....	125
7	Erklärung zum Eigenanteil .....	146
7.1	Allgemeine Erklärung zum Eigenanteil.....	146
7.2	Erklärung zum Eigenanteil für die Publikation Streich et al. (2023) .....	148
7.3	Erklärung zum Eigenanteil für die Publikation Frauenfeld et al. (2022) .....	150

## Inhaltsverzeichnis

8	Veröffentlichungen.....	151
	Publikationen.....	151
	Kongressbeiträge .....	151
	Danksagung .....	152

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunhistochemischer Algorithmus (sog. „Hans-Algorithmus“) für die COO-Klassifikation der DLBCLs. Die untersuchten Proteine sind hierbei CD10, BCL6 und MUM1, aus denen sich je nach Reaktionsausgang der Immunhistochemie (pos = positiv, neg = negativ) der entsprechende COO-Subtyp ergibt. GCB = <i>Germinal Center B-cell</i> , Non-GCB = <i>Non-Germinal Center B-cell</i> . Abbildung bearbeitet nach Hans et al. (2004). .....	8
Abbildung 2: Morphologische und immunhistochemische Eigenschaften eines mittels Immunhistochemie als GCB klassifizierten DLBCLs. Originale Vergrößerung 400-fach. Man erkennt die kräftige immunhistochemische Positivität für CD10 und BCL6 bei Negativität für MUM1, was typisch für DLBCLs vom GCB-Subtyp ist. Abbildung bearbeitet nach Frauenfeld et al. (2022). .....	8
Abbildung 3: Morphologie und Immunhistochemie eines als Non-GCB diagnostizierten DLBCLs. Originale Vergrößerung 400-fach. Zu erkennen ist die starke Positivität für BCL6 und MUM1, was bei Negativität für CD10 die Diagnose eines Non-GCB-Subtyps rechtfertigt. Abbildung bearbeitet nach Frauenfeld et al. (2022). .....	9
Abbildung 4: Anzahl an DLBCL-Neuerkrankungen im Jahr 2019 in Deutschland, getrennt nach Geschlecht. Abbildung erstellt aus: Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (2022). .....	14
Abbildung 5: Dreidimensionale Visualisierung der DNA-bindenden Domäne von MUM1. Abbildung entnommen aus und bearbeitet nach Zhang et al. (2006). .....	26
Abbildung 6: Übersicht der Fallzahlen nach Jahr der Diagnose. Pro Jahr wurden zwischen einem und fünf Fälle eingeschlossen, mit Ausnahme der Jahre 2003 bis 2005 sowie 2007, aus denen keine Fälle eingeschlossen wurden. ....	63
Abbildung 7: Altersstruktur des Fallkollektivs. Die 30 eingeschlossenen Patienten waren zwischen 37 und 87 Jahren alt, mit einem Überwiegen älterer Patienten. ....	64
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Hans-Algorithmus mit Angaben der konkreten Fallzahlen aus dem betrachteten Fallkollektiv (Zahlen über bzw. unter den Pfeilen). CD10, BCL6, MUM1 = Immunhistochemische Färbung gegen das entsprechende Antigen; pos, neg = Reaktionsausgang der jeweiligen Immunhistochemie; GCB, Non-GCB = sich aus der Immunhistochemie als Surrogat-	

## Abbildungsverzeichnis

Marker für die Genexpression ergebende DLBCL-Subtypen. Abbildung bearbeitet nach Hans et al. (2004). .....	70
Abbildung 9: Gene mit signifikanten Differenzen in der Genexpression zwischen den GEP-Subtypen GCB und ABC. Dargestellt sind alle Gene, deren Unterschiede zwischen den Subgruppen im Mann-Whitney U-Test signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ zeigten. Insgesamt zeigen sich bei 29 Genen signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den Subgruppen, dabei sind 11 Gene in der Subgruppe der GCBs signifikant erhöht, während die übrigen 18 Gene in der Subgruppe der ABCs signifikant erhöht sind. Abbildung bearbeitet nach Streich et al. (2023). .....	79
Abbildung 10: p-Werte des Kruskal-Wallis-Test zur Verteilung der Genexpression über die GEP-Subgruppen GCB, ABC und UNC. Dargestellt sind alle Gene, die in der Genexpressionsprofilanalyse untersucht wurden (X-Achse). Auf der Y-Achse sind hierbei die p-Werte für die Signifikanztests auf Unterschiede in der Genexpression zwischen den GEP-Subgruppen aufgetragen. Die violette Linie symbolisiert das Signifikanzniveau $p = 0,001$ , hier sind 11 Gene signifikant unterschiedlich exprimiert. Die grüne Linie symbolisiert das Signifikanzniveau $p = 0,01$ , hier sind weitere 5 Gene signifikant unterschiedlich exprimiert. Die rote Linie symbolisiert das Signifikanzniveau $p = 0,05$ , hier sind weitere 11 Gene signifikant unterschiedlich exprimiert. Abbildung bearbeitet nach Streich et al. (2023). .....	80
Abbildung 11: Gegenüberstellung der Genexpressionswerte abhängig von der immunhistochemischen Expression. Für CD10/ <i>MME</i> , BCL6/ <i>BCL6</i> und MUM1/ <i>IRF4</i> sind auf der X-Achse die immunhistochemische Expression aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die normalisierten Genexpressionswerte aufgetragen. Für alle drei untersuchten Gen-Genprodukt-Paare zeigen sich signifikante Zusammenhänge zwischen der Genexpression und der immunhistochemischen Expression. Abbildung bearbeitet nach Streich et al. (2023).....	81
Abbildung 12: Morphologische, immunhistochemische und FISH-Befunde eines LBCL- <i>IRF4</i> -Falls (Fall Nr. 13). Originale Vergrößerung (außer FISH) 400-fach. Man erkennt eine gleichzeitige immunhistochemische Positivität für alle drei immunhistochemischen Marker, was die Diagnose eines Falls mit aberranter Expression aller drei immunhistochemischer Marker rechtfertigt (DLBCL-AE). Mittels BAP-Sonden konnten Brüche in <i>IRF4</i> und <i>IGH</i> gezeigt werden (1 kolokalisiertes Signal (gelbe Pfeile) und 1 getrenntes Signal (grüne und rote Pfeile)), was in Zusammenschau der Befunde die Diagnose eines LBCL- <i>IRF4</i> zulässt. ....	93

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 13: Morphologische, immunhistochemische und FISH-Befunde eines weiteren LBCL- <i>IRF4</i> -Falls (Fall Nr. 35). Originale Vergrößerung (außer FISH) 400-fach. Man erkennt eine gleichzeitige immunhistochemische Positivität für CD10 und MUM1, was in Zusammenschau mit der Positivität für BCL6 (nicht dargestellt) die Diagnose eines Falls mit aberranter Expression aller drei immunhistochemischer Marker rechtfertigt. Mittels BAP-Sonden konnten Brüche in <i>IRF4</i> und IGH gezeigt werden (1 kolokalisiertes Signal (gelbe Pfeile) und 1 getrenntes Signal (grüne und rote Pfeile)), was in Zusammenschau der Befunde die Diagnose eines LBCL- <i>IRF4</i> zulässt. Abbildung bearbeitet nach Streich et al. (2023). .....	94
Abbildung 14: Übersicht über 30 Fälle von DLBCL und FL 3B/FLBL im Waldeyer'schen Rachenring. Die Fälle sind in drei Subgruppen gemäß der COO-Klassifikation mittels GEP eingeteilt. Dargestellt sind die Ergebnisse der COO-Klassifikation, der Immunhistochemie, der FISH und der Mutationsanalyse. Abbildung bearbeitet nach Streich et al. (2023).....	99
Abbildung 15: Altersverteilung der LBCL- <i>IRF4</i> -Fälle in der Literatur (Au-Yeung et al., 2020, Chisholm et al., 2019, Ramis-Zaldivar et al., 2020, Salaverria et al., 2011) und in dieser Studie (Hesius et al., 2023, Streich et al., 2023). Auf der X-Achse ist das Alter in Jahren aufgetragen, auf der Y-Achse die Anzahl der Fälle in diesem Alter, farbkodiert nach Studie. Beachten ist hierbei, dass die Daten verzerrt sein können, da Au-Yeung et al. (2020), Chisholm et al. (2019) und Ramis-Zaldivar et al. (2020) nur Kinder bzw. junge Erwachsene in ihre Studien eingeschlossen haben. ....	116
Abbildung 16: Altersverteilung der LBCL- <i>IRF4</i> -Fälle in nicht-altersselektierten Studien (Salaverria et al., 2011) und in dieser Studie (Streich et al., 2023). Auf der X-Achse ist das Alter in Jahren aufgetragen, auf der Y-Achse die Anzahl der Fälle in diesem Alter, farbkodiert nach Studie. ....	117

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ann-Arbor-Klassifikation. Tabelle bearbeitet nach Carbone et al. (1971)....	16
Tabelle 2: <i>International Prognostic Index</i> (IPI) und <i>Revised IPI</i> (R-IPI) im Vergleich. OS = Gesamtüberleben (engl. <i>Overall Survival</i> ). Tabelle bearbeitet nach The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project (1993), Sehn et al. (2006) und Horvat et al. (2018). .....	21
Tabelle 3: Follicular Lymphoma Prognostic Index (FLIPI). OS = Gesamtüberleben. Tabelle bearbeitet nach Solal-Céligny et al. (2004). .....	25
Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte. ....	32
Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits. ....	33
Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper. ....	34
Tabelle 7: Liste der verwendeten FISH-Sonden. ....	34
Tabelle 8: Liste der Primer für die Testung der Amplifizierbarkeit. ....	35
Tabelle 9: Liste der Primer für die Einzelamplikon-Erstellung. ....	36
Tabelle 10: Liste der verwendeten Enzyme. ....	39
Tabelle 11: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien. ....	39
Tabelle 12: Liste der verwendeten EDV-Programme. ....	40
Tabelle 13: Liste der Hersteller. ....	41
Tabelle 14: Liste der verwendeten Filter für die Fluoreszenz-Mikroskopie. ....	47
Tabelle 15: AmpliSeq Custom DLBCL Panel. Dargestellt sind die enthaltenen Gene mit den entsprechenden abgedeckten Bereichen sowie die Anzahl an Amplikons pro Genlocus. Die Amplikonlänge liegt zwischen 125 und 175 Basenpaaren (bp). CDS (%) bezeichnet die Abdeckung der kodierenden Sequenz in Prozent. Die Abdeckung des Panels liegt insgesamt bei 94,23 %. Insgesamt enthält das Panel 193 Amplikons, davon 98 in Pool 1 und 95 in Pool 2. ....	54
Tabelle 16: Übersicht der klinischen Daten. ....	67
Tabelle 17: Korrelation der Ergebnisse aus Immunhistochemie und FISH für <i>IRF4/MUM1</i> . ....	75

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 18: Korrelation der Ergebnisse aus Immunhistochemie und FISH für <i>BCL2/BCL2</i> .....	76
Tabelle 20: Korrelation der Subtypisierungsergebnisse mittels GEP und IHC.....	78
Tabelle 20: Übersicht über die durchgeführten Analysen im Rahmen der Mutationsanalyse. Tabelle bearbeitet nach Streich et al. (2023). ....	82
Tabelle 21: Liste aller Mutationen. # = Fall-Nummer. VAF Cutoff = Untere Grenze der Allelfrequenz, ab der eine Variante als Mutation betrachtet wird. VAF = Allelfrequenz. Coverage = Abdeckung in Reads. † = Mutation nur im Einzelamplikon abgedeckt, daher Angabe der Einzelamplikon-VAF. ‡ = Mutation in Panel und Einzelamplikon abgedeckt, Angabe der Einzelamplikon-VAF. Tabelle bearbeitet nach Streich et al. (2023).....	85

# Abkürzungsverzeichnis

<b>aaIPI</b>	Altersadaptierter IPI
<b>ABC</b>	Aktivierte B-Zelle (engl. <i>Activated B-cell</i> )
<b>AID</b>	engl. <i>Activation-induced Cytidine Deaminase</i>
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>aSHM</b>	Aberrante somatische Hypermutation
<b>BAP</b>	engl. <i>Break Apart Probe</i>
<b>BTK</b>	Bruton-Tyrosinkinase
<b>CAR</b>	Chimärer Antigen-Rezeptor
<b>CD</b>	engl. <i>Cluster of Differentiation</i>
<b>cFL</b>	Klassisches follikuläres Lymphom
<b>CLL</b>	Chronisch-lymphatische Leukämie
<b>CLP</b>	Gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle (engl. <i>Common Lymphoid Progenitor</i> )
<b>CNA</b>	engl. <i>Copy Number Alterations</i>
<b>COO</b>	Ursprungszelle (engl. <i>Cell of Origin</i> )
<b>DA-EPOCH-R</b>	<u>D</u> osis <u>a</u> daptiertes <u>E</u> toposid, <u>P</u> rednisolon, Vincristin ( <u>O</u> ncovin®), <u>C</u> yclophosphamid, Doxorubicin ( <u>H</u> ydroxydaunorubicin), <u>R</u> ituximab
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-phenylindol
<b>DFS</b>	Krankheitsfreies Überleben (engl. <i>Disease-free Survival</i> )
<b>DH/TH</b>	engl. <i>Double Hit/Triple Hit</i>
<b>DLBCL</b>	Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom (engl. <i>Diffuse large B-cell lymphoma</i> )
<b>DLBCL-AE</b>	DLBCL mit aberranter Expression von CD10, BCL6 und MUM1

## Abkürzungsverzeichnis

<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EA</b>	Einzelamplikon
<b>EFS</b>	Ereignisfreies Überleben (engl. <i>Event-free Survival</i> )
<b>FFPE</b>	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
<b>FISH</b>	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
<b>FL</b>	Follikuläres Lymphom
<b>FLBL</b>	Follikuläres großzelliges B-Zell-Lymphom (engl. <i>Follicular large B-cell lymphoma</i> )
<b>FLIPI</b>	engl. <i>Follicular Lymphoma International Prognostic Index</i>
<b>GALT</b>	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. <i>Gut-associated lymphatic tissue</i> )
<b>GCB</b>	Keimzentrums-B-Zelle (engl. <i>Germinal Center B-cell</i> )
<b>GEP</b>	Genexpressionsprofil-Analyse (engl. <i>Gene Expression Profiling</i> )
<b>HE</b>	Hämatoxylin/Eosin
<b>HPF</b>	engl. <i>High Power Field</i>
<b>IGH</b>	Schweres Immunglobulinketten-Gen
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>IL-7</b>	Interleukin-7
<b>IPI</b>	engl. <i>International Prognostic Index</i>
<b>IRF</b>	engl. <i>Interferon Regulatory Factor</i>
<b>IRF4</b>	engl. <i>Interferon Regulatory Factor 4</i>
<b>LBCL-IRF4</b>	Großzelliges B-Zell-Lymphom mit <i>IRF4</i> -Rearrangement (engl. <i>Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement</i> )
<b>LDH</b>	Lactat-Dehydrogenase

## Abkürzungsverzeichnis

<b>MALT</b>	Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. <i>Mucosa-associated lymphatic tissue</i> )
<b>MUM1</b>	engl. <i>Multiple Myeloma Oncogene 1</i>
<b>NALT</b>	Nasopharynx-assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. <i>Nasopharynx-associated lymphatic tissue</i> )
<b>NF-κB</b>	engl. <i>Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
<b>NGS</b>	engl. <i>Next Generation Sequencing</i>
<b>NHL</b>	Non-Hodgkin-Lymphom
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killer-Zellen
<b>Non-GCB</b>	engl. <i>Non-Germinal Center B-cell</i>
<b>NOS</b>	engl. <i>Not otherwise specified</i>
<b>OS</b>	Gesamtüberleben (engl. <i>Overall Survival</i> )
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PFS</b>	Progressionsfreies Überleben (engl. <i>Progression-free Survival</i> )
<b>qNPA</b>	quantitativer Nuclease-Schutz-Assay (engl. <i>quantitative Nuclease Protection Assay</i> )
<b>qPCR</b>	Quantitative PCR
<b>RAG</b>	engl. <i>Recombination Activating Gene</i>
<b>R-BEAM</b>	Rituximab, Carmustin, Etoposid, Cytarabin, Melphalan
<b>R-CHLiP</b>	R-CHOP mit liposomalem Vincristin
<b>R-CHOP</b>	<u>R</u> ituximab, <u>C</u> yclophosphamid, Doxorubicin ( <u>H</u> ydroxydaunorubicin), Vincristin ( <u>O</u> ncovin®), <u>P</u> rednisolon
<b>REL</b>	Rezidiv (engl. <i>Relapse</i> )
<b>R-IPI</b>	Rituximab-IPI
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure

## Abkürzungsverzeichnis

<b>RTX</b>	Radiotherapie
<b>SCT</b>	Stammzelltransplantation
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SNP</b>	engl. <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
<b>SSC</b>	Natrium/Natriumcitrat
<b>TEAM</b>	Thiotepa, Etoposid, Cytarabin, Melphalan
<b>uFL</b>	Follikulärs Lymphom mit ungewöhnlichen Eigenschaften
<b>UNC</b>	Unklassifizierbar
<b>UV</b>	Ultraviolettes Licht
<b>VAF</b>	Allelfrequenz
<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation
<b>WR</b>	Waldeyer'scher Rachenring

# 1 Einleitung

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

**Streich, S.**, Frauenfeld, L., [...] Quintanilla-Martinez, L. (2023). Prevalence of *IRF4* rearrangement in large B-cell lymphomas of the Waldeyer's ring in adults. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 482(3), 551–560. <https://doi.org/10.1007/s00428-023-03516-7>

Frauenfeld, L., Castrejon-de-Anta, N., [...] **Streich, S.**, [...] 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>

Jeder Organismus ist zu jeder Zeit einer Vielzahl von endo- und exogenen Pathogenen ausgesetzt, deren schnelle und zielgerichtete Elimination entscheidend für das Fortbestehen des Organismus ist. Im Lauf der Evolution hat der menschliche Körper hierzu eine Reihe von Abwehrmechanismen entwickelt, die synergistisch an der Abwehr von Pathogenen arbeiten. Generell lassen sich hierbei Mechanismen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort unterscheiden. Die angeborenen Mechanismen sind bereits pränatal vorhanden und können Pathogene ohne weitere Vorabmaßnahmen erkennen und bekämpfen. Hierzu zählen beispielsweise zelluläre Komponenten wie Makrophagen oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie humorale Komponenten wie das Komplementsystem. Im Gegensatz dazu ist die erworbene Immunantwort auf ein Training angewiesen, um Pathogene erkennen und bekämpfen zu können. Auch die erworbene Immunantwort lässt sich in zelluläre Mechanismen wie zytotoxische T-Zellen sowie humorale Mechanismen wie B-Zellen und T-Helferzellen unterteilen. Die angeborene und erworbene Immunantwort haben zahlreiche Verknüpfungen untereinander, so werden z.B. Makrophagen durch T-Helferzellen aktiviert. (Welsch et al., 2014)

## 1.1 Anatomie und Funktion des lymphatischen Systems

### 1.1.1 Anatomische Grundlagen

Die erworbene Immunantwort findet in großen Teilen im lymphatischen System statt, welches sich in primäre und sekundäre lymphatische Organe unterteilen lässt. Primäre lymphatische Organe sind das Knochenmark und der Thymus, in welchen die Bildung der lymphatischen (Vorläufer-)Zellen stattfindet. Zu den sekundären lymphatischen Organen zählen Milz, Lymphknoten und das sog. Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe (engl. *Mucosa-associated lymphatic tissue* (MALT)). In diesen Organen findet der Kontakt der Lymphozyten mit den Pathogenen statt, und eine Immunantwort wird initiiert. Das MALT lässt sich wiederum unterteilen: Der sog. Waldeyer'sche Rachenring besteht aus den Tonsillen im Nasen-Rachen-Bereich sowie Lymphfollikeln an der Rachenhinterwand und wird auch als Nasopharynx-assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. *Nasopharynx-associated lymphatic tissue* (NALT)) bezeichnet, weitere MALT-Lokalisationen sind bspw. die Bronchien (Cesta, 2006). Andererseits gibt es MALT-Anteile auch im Gastrointestinaltrakt, hier werden sie als Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe bezeichnet (engl. *Gut-associated lymphatic tissue* (GALT)) (Mörbe et al., 2021).

### 1.1.2 Entstehung und Reifung der B-Lymphozyten

Die Lymphozyten als Effektorzellen der erworbenen Immunantwort lassen sich in zwei große Gruppen unterteilen: T- und B-Lymphozyten. Während die T-Zellen vor allem Aufgaben in der Antigenerkennung und -präsentation (T-Helferzellen) sowie in der direkten Bekämpfung von infizierten oder pathologisch veränderten Zellen (zytotoxische T-Zellen) übernehmen, sind die B-Zellen in Form von Plasmazellen für die Produktion von Antikörpern und in der Form von Gedächtniszellen für eine langfristige Aufrechterhaltung der Immunität verantwortlich. Für diese Arbeit sind vor allem die B-Lymphozyten von Bedeutung, sodass sich die nachfolgenden Betrachtungen auf diese Zellreihe fokussieren werden.

Die Vorläuferzellen der reifen B-Zellen entstehen im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen. Diese Vorläuferzellen werden auch als *Common Lymphoid Progenitor*-Zellen (CLP-Zellen) bezeichnet, da sich aus ihnen sowohl B- als auch T-Zellen entwickeln können (Kondo et al., 1997). Initial wichtige Transkriptionsfaktoren für die

Entwicklung der Stammzellen in Richtung Lymphozyten sind PU.1, Ikaros und E2A (Bain et al., 1994, Georgopoulos et al., 1994, Scott et al., 1994). Unter dem Einfluss von Interleukin-7 (IL-7) findet eine frühe Restriktion des Differenzierungspotentials der Vorläuferzellen statt (Tsapogas et al., 2011). Durch den Transkriptionsfaktor E2A wird die Expression von FOXO1 ausgelöst (Welinder et al., 2011, Zhuang et al., 1996), welcher wiederum die Expression von EBF1 unterstützt, das für die weitere Differenzierung in Richtung B-Zelle erforderlich ist (Mansson et al., 2012, Zandi et al., 2008). Neben EBF1 ist ebenfalls PAX5 für die Differenzierung der frühen B-Lymphozyten erforderlich (Urbánek et al., 1994).

Im weiteren Verlauf der B-Zell-Entstehung kommt es dann zu einer Umlagerung spezifischer Genabschnitte, die für den B-Zell-Rezeptor kodieren. Diese Genabschnitte werden mit V (engl. *variable*), D (engl. *diversity*) und J (engl. *joining*) bezeichnet (Chi et al., 2020). Diese Umlagerung ist erforderlich, da auf genomischer Ebene nur ein gewisses Repertoire an unterschiedlichen Genen für den B-Zell-Rezeptor kodiert ist, mit dessen Hilfe alle möglichen Pathogene erkannt werden müssen. Durch diese Umlagerung wird die Anzahl an möglichen B-Zell-Rezeptoren erheblich gesteigert. Diese, aufgrund der beteiligten Genabschnitte auch als V(D)J-Rearrangement bezeichnete Umlagerung der Genabschnitte wird durch die Gene *RAG-1* und *RAG-2* aktiviert (Oettinger et al., 1990, Schatz et al., 1989). Nach Abschluss des V(D)J-Rearrangements bilden die frühen B-Zellen erstmalig Antikörper und exprimieren diese als ihren B-Zell-Rezeptor. In einem weiteren Schritt werden autoreaktive B-Zellen eliminiert, die auf körpereigene Antigene reagieren. Die anschließend noch verbleibenden, naiven und unreifen B-Zellen verlassen nun das Knochenmark und müssen in der Milz durch Kontakt zu follikulären dendritischen Zellen ausreifen. Für diese Ausreifung ist der B-Zell-aktivierende Faktor BAFF erforderlich (Batten et al., 2000, Giordano et al., 2023).

### **1.1.3 Aktivierung der B-Lymphozyten**

Im Anschluss an die Ausreifung sind die nun reifen, naiven B-Zellen in der Lage, ein zu ihrem B-Zell-Rezeptor passendes Antigen zu erkennen. Dieser Erstkontakt zu einem Antigen findet in den sekundären lymphatischen Organen statt und kann je nach Pathogen T-Zell-abhängig oder -unabhängig erfolgen (Hua und Hou, 2013, Parker, 1993, Vos et al., 2000). Innerhalb der sekundären lymphatischen Organe sind die

## Einleitung

Lymphozyten in Primärfollikeln, welche reife, naive B-Zellen enthalten, und Sekundärfollikel, welche reagierende B-Zellen enthalten, organisiert.

Nach Aktivierung der B-Zelle kommt es zur Auslösung verschiedener Signalkaskaden und infolgedessen zur Umwandlung der Primär- in Sekundärfollikel und innerhalb derer zur Bildung von Keimzentren, in denen sich die B-Zellen rapide vermehren und reifen können (Haberman et al., 2019, Zotos und Tarlinton, 2012). Innerhalb eines Keimzentrums unterscheidet man verschiedene Zonen, in denen unterschiedliche Subtypen der B-Lymphozyten prädominant sind. Im Inneren der Keimzentren findet man vor allem Zentroblasten, bei welchen es sich um große Zellen mit hoher Teilungsaktivität handelt. Im Zentroblasten-Stadium kommt es auch zur somatischen Hypermutation, die die Affinität des B-Zell-Rezeptors und der Antikörper weiter steigert. Unter der Stimulation durch follikuläre dendritische Zellen entwickeln sich die Zentroblasten zu Zentrozyten, welche morphologisch deutlich kleinere Zellen mit kondensiertem Kernchromatin sind. Im Rahmen der Affinitätsreifung wird ein Großteil der gebildeten Zellen durch Apoptose eliminiert, bevor sich die verbleibenden B-Zellen zu Plasma- oder B-Gedächtniszellen entwickeln.

Bei der Keimzentrumsreaktion kommt es neben der somatischen Hypermutation ebenfalls zum Klassenwechsel der exprimierten Immunglobuline. Diese beiden Vorgänge werden durch die *Activation-induced Cytidine Deaminase* (AID) kontrolliert (Muramatsu et al., 2000). Die AID selbst wird wiederum durch IRF8 reguliert, das ebenfalls die Expression von BCL6 steuert (Lee et al., 2005). BCL6 sorgt für eine Aufrechterhaltung der Keimzentren, vermindert die Transkriptionsaktivität und verhindert, dass die DNA-Brüche im Rahmen der somatischen Hypermutation zum Zelltod führen (Basso und Dalla-Favera, 2012, Dent et al., 1997). BCL6 sorgt außerdem dafür, dass zahlreiche Gene supprimiert werden, darunter der *Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) und die Onkogene *BCL2* und *MYC* (Ci et al., 2009, Pasqualucci und Dalla-Favera, 2018). Durch die somatische Hypermutation kann es neben den erwünschten Mutationen in den V(D)J-Genen auch zu Mutationen bspw. in *BCL6* kommen (Shen et al., 1998).

Nach Abschluss der Affinitätsreifung wird NF- $\kappa$ B in den Zentrozyten exprimiert und sorgt dafür, dass der *Interferon Regulatory Factor 4* (*IRF4*), auch *Multiple Myeloma Oncogene 1* (MUM1) genannt, exprimiert wird, der wiederum über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors BLIMP-1 (auch *PRDM1* genannt) BCL6 hemmt und damit die

Ausreifung der Zentrozyten zu Plasmazellen fördert (Cadera et al., 2009, Klein et al., 2006, Saito et al., 2007, Shaffer et al., 2002).

### 1.2 Klassifikation der Lymphome

Lymphome sind Neoplasien aus lymphatischen Zellen. Im Jahr 2019 traten in Deutschland 502.655 neue Fälle von Krebserkrankungen auf, davon waren 20.867 Lymphome (4,2 %) (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022). Klassischerweise werden Lymphome in Hodgkin- und Nicht-Hodgkin-Lymphome (NHLs) unterteilt. Hierbei machen die NHLs mit 18.336 Fällen (87,9 %) im Jahr 2019 den weitaus größeren Teil der Lymphome aus (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022). Zur Klassifikation der Lymphome haben sich zwei parallele Systeme etabliert, die in großen Teilen deckungsgleich sind: Einerseits können Lymphome nach der *International Consensus Classification* (ICC) klassifiziert werden (Campo et al., 2022), andererseits nach dem Klassifikationssystem der Weltgesundheitsorganisation (WHO), welches aktuell in der fünften Edition vorliegt (Alaggio et al., 2022).

Entsprechend der Ursprungszelle können die Non-Hodgkin-Lymphome in B-, T- und NK-Zell-NHLs unterteilt werden (Swerdlow et al., 2016). Innerhalb dieser Subgruppen gibt es wiederum zahlreiche, zum Teil provisorische Entitäten, die anhand von klinischen, histologischen und molekularen Kriterien definiert werden. Eine der neuen Entitäten ist das großzellige B-Zell-Lymphom mit *IRF4*-Rearrangement (LBCL-*IRF4*) (Swerdlow et al., 2016) (siehe hierzu auch Abschnitt 1.5). Diese neue Entität ist in der ICC-Klassifikation sowie der angekündigten, jedoch noch nicht final veröffentlichten, fünften Edition der WHO-Klassifikation von Tumoren der hämatopoetischen und lymphoiden Gewebe und der Internationalen Konsens-Klassifikation der reifen lymphatischen Neoplasien als definite Entität definiert worden (Alaggio et al., 2022, Campo et al., 2022).

In der Gruppe der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome machen die diffus großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCLs) und hierbei insbesondere die nicht anderweitig klassifizierten DLBCLs (engl. *not otherwise specified* (NOS)) bei erwachsenen Patienten<sup>1</sup> die bei weitem größte Subgruppe aus (9.370 Fälle im Jahr 2019 in Deutschland) (Swerdlow et al., 2016, Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022). Die

---

<sup>1</sup> Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird auf eine geschlechtsneutrale Differenzierung verzichtet. Entsprechende Begriffe gelten im Sinne der Gleichbehandlung grundsätzlich für alle Geschlechter. Die verkürzte Sprachform beinhaltet keine Wertung.

zweitgrößte Subgruppe bildet das folliculäre Lymphom (FL) mit 3.169 Fällen im Jahr 2019 in Deutschland (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022).

## 1.3 Diffus großzellige B-Zell-Lymphome

### 1.3.1 Klassifikation

Die Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome wurde im Lauf der letzten 50 Jahre immer wieder auf Grund neuer Methoden und Ergebnisse ergänzt und verändert. Die erste, international verbreitete Klassifikation war die sog. Kiel-Klassifikation, die die NHLs in niedrig- und hochmaligne B- und T-Zell-Lymphome mit verschiedenen Subtypen unterteilte (Gerard-Marchant et al., 1974, Lennert und Mohri, 1974, Lennert et al., 1975). Knapp 20 Jahre später erschien die REAL-Klassifikation, die sowohl Hodgkin- als auch Non-Hodgkin-Lymphome klassifizierte und erstmals die Entitäten DLBCL und FL benannte (Harris et al., 1994). Die aktuell gültige WHO-Klassifikation der Tumore der hämatopoietischen und lymphatischen Gewebe (*WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*) in der überarbeiteten vierten Edition legt den Fokus zunehmend auf molekulare und genetische Merkmale (Swerdlow et al., 2017, Swerdlow et al., 2016). Die fünfte Edition ist bereits angekündigt (Alaggio et al., 2022), jedoch noch nicht offiziell gedruckt, sondern liegt bislang nur als Vorab-Version online vor.

Sowohl die ICC-Klassifikation als auch die aktuelle WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2017 unterteilt die DLBCLs in unterschiedliche Subgruppen. Hierbei machen die DLBCLs, NOS, die größte Subgruppe aus. Andere Subtypen sind bspw. das primäre DLBCL des zentralen Nervensystems, das primär kutane DLBCL der unteren Extremität oder das Epstein-Barr-Virus (EBV)-positive DLBCL (Campo et al., 2022, Swerdlow et al., 2017, Swerdlow et al., 2016).

Die DLBCLs, NOS, werden konventionell nach der Ursprungszelle (engl. *Cell of Origin* (COO)) klassifiziert. Die COO-Klassifikation kann mittels Genexpressionsprofil-Analyse (engl. *Gene Expression Profiling* (GEP)) oder dem Surrogatmarker der Immunhistochemie (IHC) erstellt werden; bei Verwendung der Genexpressionsprofilanalyse werden die DLBCLs gemäß ihrer COO in *Germinal Center B-cell* (GCB) und *Activated B-cell* (ABC) unterteilt (Alizadeh et al., 2000, Choi et al., 2009, Hans et al., 2004, Meyer et al., 2011, Rosenwald et al., 2002). In der

## Einleitung

Routinediagnostik ist die Immunhistochemie, und hierbei v.a. der Algorithmus nach Hans et al. (2004) auf Grund der breiten Verfügbarkeit, Kostengünstigkeit und einfachen Anwendung der Genexpressionsprofilanalyse überlegen. Die Klassifikation mittels GEP ist der immunhistochemischen Klassifikation jedoch in den Punkten Reproduzierbarkeit, Genauigkeit sowie der prognostischen Aussagekraft überlegen (Masqué-Soler et al., 2013, Scott et al., 2015, Scott et al., 2014).

Mittels der auf der Immunhistochemie basierenden COO-Klassifikation werden die DLBCLs in die Subtypen GCB und *Non-Germinal Center B-cell* (Non-GCB) unterteilt (Hans et al., 2004). Die immunhistochemisch untersuchten Marker sind hierbei CD10 (*MME*), BCL6 und MUM1 (*IRF4*). Der verwendete diagnostische Algorithmus ist auch Abbildung 1 zu entnehmen. Der Anteil der GCBs an allen nodalen und extranodalen DLBCLs liegt hierbei zwischen 40 und 53 % (Berglund et al., 2005, Copie-Bergman et al., 2009, Hans et al., 2004, Ott et al., 2010). Beispielhafte morphologische und immunhistochemische Befunde eines GCB und eines Non-GCB sind auch Abbildung 2 und Abbildung 3 zu entnehmen.

## Einleitung

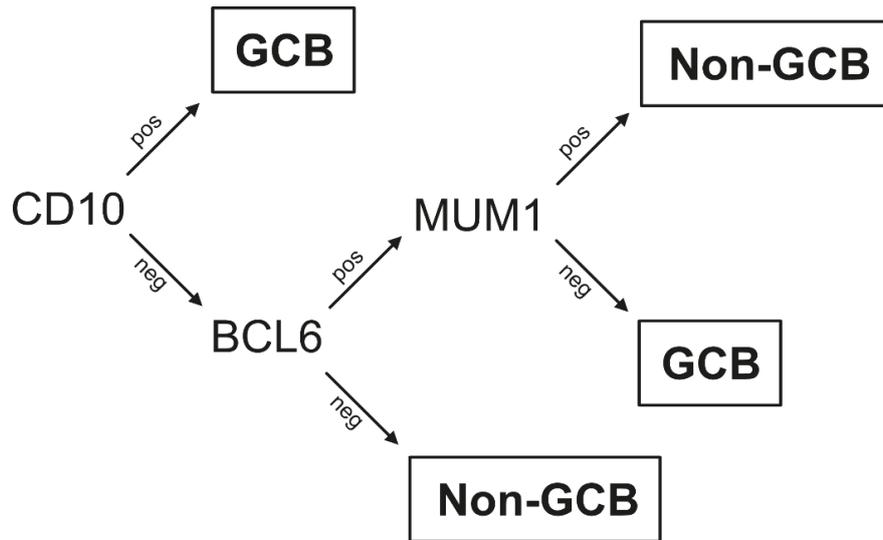


Abbildung 1: Immunhistochemischer Algorithmus (sog. „Hans-Algorithmus“) für die COO-Klassifikation der DLBCLs. Die untersuchten Proteine sind hierbei CD10, BCL6 und MUM1, aus denen sich je nach Reaktionsausgang der Immunhistochemie (pos = positiv, neg = negativ) der entsprechende COO-Subtyp ergibt. GCB = *Germinal Center B-cell*, Non-GCB = *Non-Germinal Center B-cell*. Abbildung bearbeitet nach Hans et al. (2004).

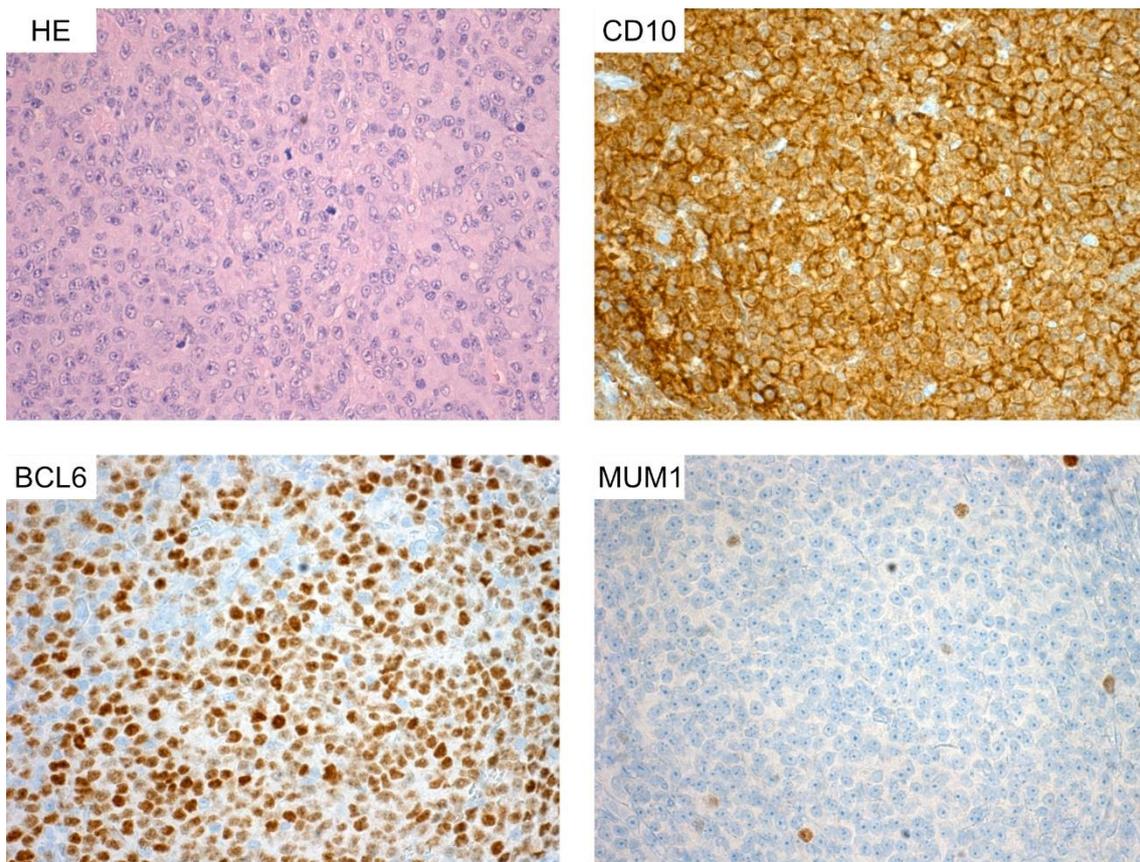


Abbildung 2: Morphologische und immunhistochemische Eigenschaften eines mittels Immunhistochemie als GCB klassifizierten DLBCLs. Originale Vergrößerung 400-fach. Man erkennt die kräftige immunhistochemische Positivität für CD10 und BCL6 bei Negativität für MUM1, was typisch für DLBCLs vom GCB-Subtyp ist. Abbildung bearbeitet nach Frauenfeld et al. (2022).

## Einleitung

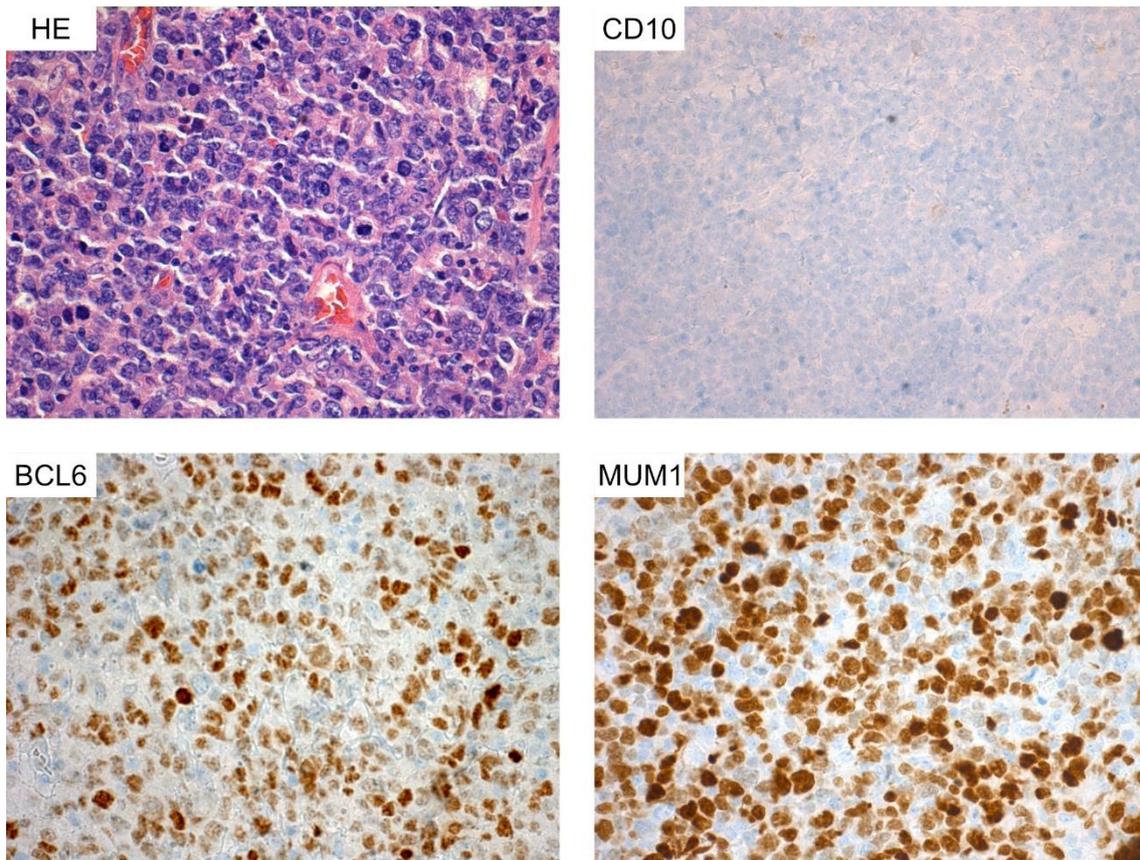


Abbildung 3: Morphologie und Immunhistochemie eines als Non-GCB diagnostizierten DLBCLs. Originale Vergrößerung 400-fach. Zu erkennen ist die starke Positivität für BCL6 und MUM1, was bei Negativität für CD10 die Diagnose eines Non-GCB-Subtyps rechtfertigt. Abbildung bearbeitet nach Frauenfeld et al. (2022).

Eine besondere Untergruppe nach dem Hans-Algorithmus stellen hierbei Fälle mit aberranter immunhistochemischer Co-Expression von CD10, BCL6 und MUM1 (CD10+ BCL6+ MUM1+, sog. *Triple positive*-Fälle) dar, da diese eine große Varianz an genetischen Alterationen besitzen und sich daher auch klinisch unterschiedlich präsentieren (Frauenfeld et al., 2022).

Aufgrund neuer, molekularer Methoden wurde die auf der Immunhistochemie basierende COO-Klassifikation in letzter Zeit immer weiter in Frage gestellt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die immunhistochemisch basierte COO-Klassifikation keinen Aussagen zu Unterschieden im Gesamtüberleben der beiden Subgruppen zulässt und die prognostische Aussagekraft somit deutlich eingeschränkt ist (Read et al., 2014). Aktuelle Studien, die auf Methoden wie Mutationsanalysen und *Copy Number Alterations* (CNA) beruhen, konnten bis zu sieben Subtypen zeigen, welche sich auch in den klinischen Eigenschaften und der Prognose unterscheiden (Chapuy et al., 2018, Lacy et al., 2020, Schmitz et al., 2018, Wright et al., 2020). Insbesondere die

Mutationsanalyse hat das Potential, direkte therapeutische und prognostische Implikationen zu geben (Reddy et al., 2017). Diese Klassifikation ist jedoch aufgrund der aufwendigen Methoden noch nicht im klinischen Alltag präsent, sodass diese Arbeit auf der etablierten COO-Klassifikation mittels GEP und IHC beruht.

### 1.3.2 Pathogenese

Die zahlreichen genetischen Interaktionen im Verlauf der B-Zell-Reifung und -Aktivierung können im Falle von genetischen Alterationen zu Dysregulationen der Reifung und Aktivierung führen, bei Alterationen in Onkogenen auch zur Lymphomentstehung.

Bereits während des V(D)J-Rearrangements im Knochenmark kann es durch die Enzyme RAG-1 und RAG-2 zu Umlagerungen außerhalb der V(D)J-Genabschnitte kommen, welche über mehrere Reifungsstadien bis in den Keimzentrumsstadien und aktivierten B-Zellen fortbestehen können (Callén et al., 2007). Auch eine aberrante Aktivierung der RAG-Enzyme innerhalb der Keimzentren kann dafür sorgen, dass normalerweise inaktivierte (Onko-)Gene wie *BCL2* oder *MYC* in die Nähe von Promotorregionen wie bspw. der des Gens der schweren Immunglobulinkette (IGH) transloziert werden, und hierdurch transkribiert und translatiert werden (Raghavan et al., 2004, Vaandrager et al., 2000, Wang et al., 2009).

Ebenso ist die *Activation-induced Cytidine Deaminase* (AID) in der Lage, Doppelstrangbrüche außerhalb der Immunglobulin-Gene zu induzieren und damit B-Zell-Lymphome auszulösen (Robbiani et al., 2009). Auch ist die AID erforderlich für Translokationen von Onkogenen wie *MYC* in den IGH-Lokus (Lenz et al., 2007, Ramiro et al., 2004). Studien konnten ebenfalls zeigen, dass die AID in DLBCLs dauerhaft exprimiert wird, während sie in gesunden B-Lymphozyten nur während der Keimzentrumsreaktion aktiviert ist (Greeve et al., 2003). Insbesondere ABC-DLBCLs zeigen hohe Spiegel der AID im Vergleich zu normalen B-Zellen und GCB-DLBCLs (Pasqualucci et al., 2004).

Aufgrund der grundlegend verschiedenen Tumorbilogie von GCB-DLBCLs und ABC-DLBCLs ist eine getrennte Betrachtung der beiden Subtypen vonnöten. GCB-DLBCLs zeigen das genetische Profil der Keimzentrums-B-Zellen, inklusive der weiterhin vorhandenen somatischen Hypermutation (Lossos et al., 2000). Im Gegensatz dazu zeigen ABC-DLBCLs das genetische Profil von aktivierten B-Zellen. Durch die

konstitutive Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Pathways in ABC-DLBCLs wird *IRF4* aktiviert und MUM1 exprimiert, das eine Differenzierung in Richtung Plasmazellen initiiert (Davis et al., 2001). *IRF4/MUM1* kann auch durch Translokation in den IGH-Genlocus aktiviert werden, was vor allem bei GCB-DLBCLs auftritt (Salaverria et al., 2011, Tsuboi et al., 2000). Die *IRF4*-Translokation, ggf. in Verbindung mit einer *IRF4*-Mutation, kennzeichnet den neuen Subtyp der großzelligen B-Zell-Lymphome mit *IRF4*-Rearrangement (Campo et al., 2022, Swerdlow et al., 2016); auf diesen Subtyp wird in Abschnitt 1.5 eingegangen.

Für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Pathways spielt auch *CARD11* eine entscheidende Rolle, das in normalen B-Zellen bei Antigenkontakt phosphoryliert wird und über einen Komplex mit anderen Proteinen NF- $\kappa$ B aktiviert (Ngo et al., 2006, Rawlings et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass *CARD11* in ABC-DLBCLs häufig mutiert ist und somit den NF- $\kappa$ B-Pathway aberrant aktivieren kann (Lenz et al., 2008a). Bei fehlender Mutation von *CARD11* kann der NF- $\kappa$ B-Pathway auch über ein aberrantes Signal des B-Zell-Rezeptors aktiviert werden, welcher neben dem Immunglobulin-Molekül aus den beiden Untereinheiten *CD79A* und *CD79B* besteht; gerade für *CD79B* konnten regelmäßige Mutationen in ABC-DLBCLs gezeigt werden (Davis et al., 2010). Ein weiteres, vor allem in ABC-DLBCL mutiertes Gen ist *MYD88*, das ebenfalls eine wichtige Rolle in der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Pathways spielt (Ngo et al., 2011). Charakteristischerweise tritt eine kanonische Mutation an Position p.265 auf, an der die Aminosäure Leucin durch Prolin ersetzt wird (p.L265P) (Choi et al., 2013, Rovira et al., 2016). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B sorgt wiederum dafür, dass viele antiapoptotische Gene aktiviert werden, darunter *BCL2* (Baldwin, 2001).

*BCL2* wirkt antiapoptotisch und sowohl in GCB- als auch ABC-DLBCLs regelmäßig exprimiert. Während in GCBs eine *BCL2*-Translokation wie t(14;18)(q32;q21.3) häufig nachgewiesen werden kann, zeigen ABCs diese Translokation typischerweise nicht (Iqbal et al., 2004, Scott et al., 2018). In ABCs hingegen kommt die *BCL2*-Aktivierung durch Amplifikationen des *BCL2*-Genlokus oder über eine Stimulation durch den NF- $\kappa$ B-Pathway zustande (Davis et al., 2001, Hu et al., 2013, Iqbal et al., 2006, Lenz et al., 2008c, Lim et al., 2012). Sowohl für GCBs als auch für ABCs konnten prognostische Unterschiede zwischen Fällen mit und ohne *BCL2*-Expression gezeigt werden (Iqbal et al., 2011, Iqbal et al., 2006).

Neben Alterationen von *BCL2* treten in GCB-DLBCLs auch häufig Veränderungen in *EZH2* auf, das für die katalytische Untereinheit einer Histon-Methyltransferase kodiert (Cao et al., 2002, Morin et al., 2010, Müller et al., 2002). *EZH2* ist auch in normalen

## Einleitung

Keimzentrums-B-Zellen exprimiert, bei Mutationen kann es zu Proliferation und Lymphomentstehung beitragen (Béguelin et al., 2013, Morin et al., 2010, Velichutina et al., 2010).

Ebenfalls in normalen Keimzentren ist BCL6 exprimiert, das im Verlauf der normalen B-Zell-Entwicklung für eine Aufrechterhaltung der Keimzentren sorgt und Prozesse wie die somatische Hypermutation steuert. An einer konstitutionellen Aktivierung von *BCL6* sind unter anderem Translokationen, vor allem in den Genlocus der schweren Immunglobulin-Kette, beteiligt, die während der somatischen Hypermutation auftreten können und entsprechend vor allem GCB-DLBCLs betreffen (Pasqualucci und Dalla-Favera, 2018).

Die Expression des Onkogens MYC ist assoziiert mit einer hohen Proliferationsrate und kommt häufig durch Translokationen in die Immunglobulin-Genloci zustande (Chisholm et al., 2015, Pasqualucci und Dalla-Favera, 2018, Swerdlow et al., 2016). Bei simultaner Expression von BCL2, BCL6 und/oder MYC spricht man von sog. *Double/Triple Expressor*-Fällen, gleiches gilt für simultane Translokationen dieser drei Gene, in diesem Fall spricht man entsprechend von *Double/Triple Hit*-Fällen (Ennishi et al., 2019, Riedell und Smith, 2018, Rosenthal und Younes, 2017, Scott et al., 2018). Diese besonderen genetischen Signaturen sorgen wiederum für eine abweichende Tumorbilogie und damit für ein anderes klinisches Verhalten und therapeutisches Ansprechen (Dodero et al., 2022, Dunleavy, 2021).

In neueren Studien wird die dichotome Klassifikation in GCB- und ABC-DLBCL zunehmend zugunsten einer tiefergehenden Klassifikation unter Einbezug genetischer Aberrationen verlassen (Chapuy et al., 2018, Schmitz et al., 2018). Diese Klassifikationen definieren neue Subtypen (Schmitz et al., 2018): Der MCD-Subtyp zeigt Mutationen in *CD79B* und/oder *MYD88* und tritt daher klassischerweise in ABC-DLBCLs auf. Im Subtyp BN2 treten Fusionen von *BCL6* und Mutationen von *NOTCH2* auf. Im dritten Subtyp EZB konnten *EZH2*-Mutationen und *BCL2*-Translokationen nachgewiesen werden, sodass dieser Subtyp vor allem in GCB-DLBCLs zu finden ist. Der Subtyp N1 basiert auf Mutationen in *NOTCH1*. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde die Klassifikation weiter differenziert, sodass aktuell je nach Literatur bis zu fünf Cluster bzw. sieben genetische Subtypen unterschieden werden (Chapuy et al., 2018, Wright et al., 2020).

### 1.3.3 Histopathologische Eigenschaften

Diffus großzellige B-Zell-Lymphome zeigen morphologisch mittelgroße bis große Zellen mit einem großen Nukleus und prominentem Nukleolus (Swerdlow et al., 2017, Swerdlow et al., 2008). Eine klassische Morphologie von DLBCLs kann Abbildung 2 und Abbildung 3 entnommen werden. Die WHO-Klassifikation definiert hierbei abhängig von der Zellgröße und der Konfiguration der Nukleoli verschiedene häufige und seltene morphologische Typen (Swerdlow et al., 2017). Die häufigen morphologischen Subtypen sind der zentroblastische, immunoblastische und anaplastische Subtyp: Der zentroblastische Subtyp ist der häufigste morphologische Subtyp und zeigt mittelgroße bis große Zellen, die typischerweise vesikuläre Kerne mit feinem Chromatin und mehreren Nukleoli aufweisen, normalerweise mit spärlichem Zytoplasma (Swerdlow et al., 2017). Beim immunoblastischen Subtyp liegt hingegen typischerweise reichlich Zytoplasma vor, ebenfalls besitzen die Kerne nur einen Nukleolus (Swerdlow et al., 2017). Der anaplastische Subtyp ist durch große bis sehr große Zellen mit pleomorphen Zellkernen charakterisiert, die teilweise den bei Hodgkin-Lymphomen vorkommenden Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen ähneln können (Swerdlow et al., 2017). Wichtig ist die Unterscheidung des anaplastischen Subtyps der DLBCLs von anaplastischen großzelligen Lymphomen, die sich durch eine grundlegend andere Tumorbilogie und Klinik auszeichnen (Swerdlow et al., 2017). Neben den drei häufigen morphologischen Subtypen der DLBCLs gibt es seltene Fälle mit bspw. myxoidem Stroma oder spindel- oder Siegelring-förmigen Zellen (Swerdlow et al., 2017).

### 1.3.4 Epidemiologie und Ätiologie

#### Ätiologie

DLBCLs zählen zu den hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen und können entweder *de novo* entstehen oder im Rahmen einer Transformation aus niedrigmalignen Lymphomen oder einer chronisch-lymphatischen Leukämie (sog. Richter-Transformation) hervorgehen, wobei sich die transformierten DLBCLs durch ein anderes molekulares Muster von *de novo* DLBCLs unterscheiden (Fischer et al., 2018, Petrackova et al., 2021, Rossi, 2015).

## Inzidenz

Im Jahr 2018 wurden weltweit 509.590 Fälle von Non-Hodgkin-Lymphomen diagnostiziert (Bray et al., 2018), in Deutschland im Jahr 2019 18.336 Fälle (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022). DLBCLs machen hierbei die größte Gruppe der NHLs aus (de Leval und Jaffe, 2020), im Jahr 2019 9.370 Fälle in Deutschland (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022). Die meisten Fälle treten hierbei bei Patienten mit höherem Lebensalter auf, das Maximum an Neuerkrankungen über alle Altersgruppen lag in der Gruppe von 75-79 Jahren (siehe auch Abbildung 4).

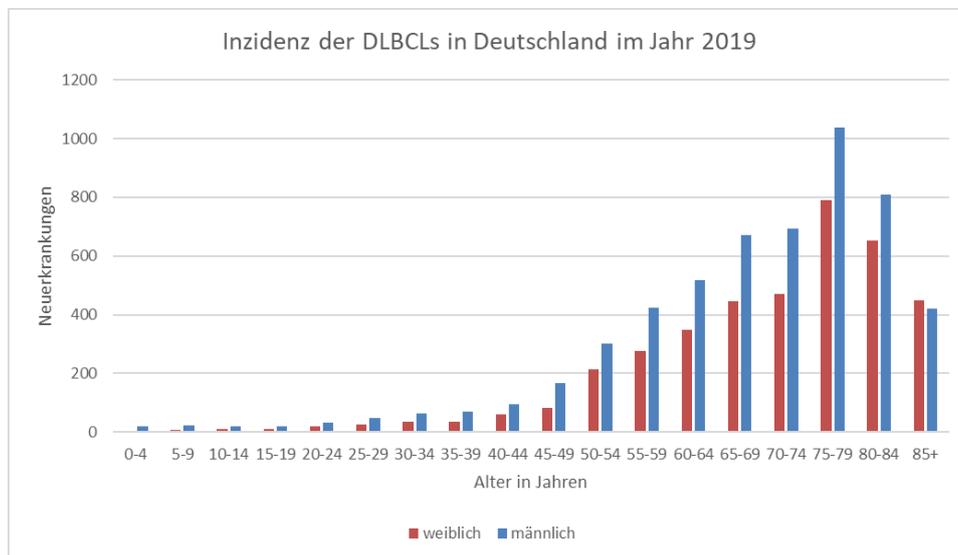


Abbildung 4: Anzahl an DLBCL-Neuerkrankungen im Jahr 2019 in Deutschland, getrennt nach Geschlecht. Abbildung erstellt aus: Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (2022).

## Mortalität

Im Jahr 2019 verstarben in Deutschland 1.317 Personen an einem DLBCL, das entspricht einem Anteil von 14,1 % an den Neuerkrankungen (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022). Weltweit gesehen haben Männer ein Lebenszeitrisiko, an einem NHL zu versterben, von 0,33 %, Frauen von 0,21 % (Bray et al., 2018).

### **Überleben**

In den Jahren 2017/18 lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei Frauen mit einem NHL bei 74 %, bei Männern bei 71 %; die 10-Jahre-Überlebensrate lag bei Frauen bei 67 %, bei Männern bei 64 % (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022).

### **Risikofaktoren**

Als nicht-modifizierbare Risikofaktoren für DLBCLs gelten höheres Alter und männliches Geschlecht (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022). Auch eine positive Familienanamnese für DLBCLs erhöht das Risiko für nachfolgende Generationen, ebenfalls an einem DLBCL zu erkranken (Cerhan et al., 2014). Wenn beim Patienten eine Autoimmunerkrankung vorliegt, ist das Risiko für ein DLBCL erhöht (Cerhan et al., 2014). Patienten, bei denen auf Grund einer anderen Krebserkrankung eine Bestrahlung durchgeführt wurde, haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko, an einem NHL zu erkranken (Kim et al., 2013). Wie bei anderen Krebserkrankungen auch, erhöhen Adipositas, Tabak- und Alkoholkonsum das Risiko für Non-Hodgkin-Lymphome (Geyer et al., 2010).

### **1.3.5 Klinik**

Die klinische Symptomatik von Patienten mit DLBCLs gleicht im Allgemeinen der von Patienten mit anderen NHLs, wobei die besondere Aggressivität der DLBCLs zu berücksichtigen ist. Je nach primärem Affektionsort des Lymphoms sind lokale Raumforderungen typisch. Wie für alle lymphatischen Neoplasien gilt auch für das DLBCL eine meist schmerzlose Lymphadenopathie als Kardinalsymptom. Weiterhin tritt auch beim DLBCL die als B-Symptomatik bezeichnete Trias aus Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß regelmäßig auf. Auch Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit und Müdigkeit sind häufig anzutreffen. (Herold, 2019)

### **1.3.6 Diagnose**

Eine erste differentialdiagnostische Richtung geben wie bei anderen Erkrankungen auch Anamnese und körperliche Untersuchung, die anschließend um eine Blutentnahme ergänzt werden können. Zur Abschätzung der Ausdehnung der Erkrankung (Staging) können bildgebende Verfahren wie Sonografie, Röntgen oder die Computertomographie herangezogen werden. Die Diagnose wird immer histologisch an einer Stanzbiopsie oder einem Lymphknotenexstirpat, ggf. unter zusätzlicher Hinzunahme einer

Knochenmarkstanze, gestellt, wobei zunächst die Morphologie untersucht wird, welche bei hinreichendem Verdacht um immunhistochemische Untersuchungen ergänzt werden kann. (Herold, 2019)

Diese immunhistochemischen Färbungen können im Anschluss auch für die COO-Klassifikation nach Hans-, Choi- oder Tally-Algorithmus verwendet werden, wobei der Hans-Algorithmus aufgrund der einfachen Anwendung im klinisch-pathologischen Alltag die bedeutendste Rolle einnimmt (Choi et al., 2009, Hans et al., 2004, Meyer et al., 2011). Für die Einordnung in klinische Stadien wird die ursprünglich für das Hodgkin-Lymphom entwickelte Ann-Arbor-Klassifikation verwendet, die die Patienten anhand der Anzahl und Lokalisation der befallenen Lymphknotenregionen bzw. lymphatischen Organe und dem Befall extralymphatischer Organe in vier Kategorien von I bis IV eingeteilt, die durch die zusätzliche Angabe von Großbuchstaben weiter subklassifiziert werden können, wobei die Angaben A, B und E die klinisch wichtigsten Zusatzangaben sind (Carbone et al., 1971).

Tabelle 1: Ann-Arbor-Klassifikation. Tabelle bearbeitet nach Carbone et al. (1971).

<b>Stadium</b>	<b>Kriterien</b>
I	Befall einer Lymphknotenregion (I) <u>oder</u> eines extralymphatischen Organs (I/E)
II	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf der gleichen Seite des Zwerchfells (II) <u>oder</u> lokalisierter Befall eines extralymphatischen Organs und einer oder mehr Lymphknotenregionen auf der gleichen Seite des Zwerchfells (II/E)
III	Befall von Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells (III), ggf. einschließlich des Befalls von extralymphatischen Organen (III/E)
IV	Diffuser Befall von einem oder mehr extralymphatischen Organen, ggf. mit Lymphknotenbefall

**Zusätze:** A (Fehlen einer B-Symptomatik), B (Vorhandensein einer B-Symptomatik)

### 1.3.7 Therapie

Bei der Therapie von DLBCLs gibt es etablierte Standard-Therapieschemata, die seit vielen Jahren regelhaft Anwendung im klinischen Alltag finden, und daneben neue, innovative Therapieansätze, die v.a. auf molekulare Targets fokussiert sind.

### **Standardtherapie**

Bereits in den 1970er-Jahren wurde das CHOP-Therapieschema für Non-Hodgkin-Lymphome entwickelt. Die Therapie besteht aus Cyclophosphamid, einem Alkylans, das für die Quervernetzung der DNA-Stränge sorgt, Hydroxydaunorubicin, auch Doxorubicin oder Adriamycin genannt, einem Topoisomerase-Hemmer aus der Gruppe der Anthracycline, Oncovin®, auch genannt Vincristin, einem Spindelgift aus der Gruppe der Vinca-Alkaloide und Prednisolon, einem Glukokortikoid (McKelvey et al., 1976). Eine Weiterentwicklung daraus stellt R-CHOP dar, das um den monoklonalen Anti-CD20-Antikörper Rituximab ergänzt wurde und damit spezifisch CD20-positive B-Zellen opsonieren und so dem Immunsystem zugänglich machen kann (Coiffier et al., 2002). Das Gesamtüberleben (engl. *Overall Survival* (OS)) und das progressionsfreie Überleben (engl. *Progression-free Survival* (PFS)) sind bei Verwendung von R-CHOP im Vergleich zu CHOP signifikant erhöht, sodass R-CHOP heute die Standardtherapie für DLBCLs darstellt (Coiffier et al., 2010). In vielen Studien wurde versucht, das R-CHOP-Schema durch Veränderung der Applikationsintervalle und Dosierungen (Cunningham et al., 2013, Delarue et al., 2013) oder Hinzunahme oder Austausch einzelner Substanzen (Vitolo et al., 2016, Wilson et al., 2016) zu verbessern, z.B. durch zusätzliche Gabe von Etoposid zu R-CHOP (DA-EPOCH-R) (Bartlett et al., 2019); diese Studien konnten aber insgesamt kein besseres Therapieansprechen oder Outcome nachweisen, sodass R-CHOP weiterhin als initiale Standardtherapie bei Patienten mit DLBCL gilt.

### **Weitere Therapiemöglichkeiten**

Sowohl die autologe als auch die allogene Stammzelltransplantation sind bei Patienten mit DLBCL erprobt, bleiben aber aufgrund der guten Verfügbarkeit, Verträglichkeit und Wirksamkeit von R-CHOP-haltiger Chemotherapie Fällen mit schlechtem Therapieansprechen oder Rezidiverkrankung vorbehalten (Izumi et al., 2019, Smith et al., 2011). Ähnliches gilt für die Radiotherapie, ggf. als Radiochemotherapie, die aufgrund von therapeutischen Alternativen Patienten mit refraktärer Primärerkrankung oder Rezidiven vorbehalten ist (Hodgson und Mikhaeel, 2015, Jones et al., 2022, Ng et al., 2018).

### **Neue Therapieansätze**

Neben dem R-CHOP-Therapieschema und Maßnahmen wie Bestrahlung und Stammzelltransplantation existieren zahlreiche, meist (noch) nicht zugelassene

Therapieoptionen für Patienten mit DLBCLs, die vor allem Spezifika der COO-Klassifikation und molekulare Gesichtspunkte berücksichtigen.

Auf Grund der schlechteren Prognose der ABC-DLBCLs im Vergleich zu den GCB-DLBCLs (s.u.) sind vor allem neue Therapien für ABC-DLBCLs interessant. Aufgrund der Tumorbiologie von ABC-DLBCLs ist ein mögliches Target der B-Zell-Rezeptor-Signalweg. Eine entscheidende Downstream-Komponente dieses Signalwegs ist die Bruton-Tyrosinkinase (BTK). Diese kann mittels des Tyrosinkinaseinhibitors Ibrutinib gezielt gehemmt werden, der bereits in der Therapie der chronisch-lymphatischen Leukämie (CLL) standardmäßig eingesetzt wird. In der Phase III-PHOENIX-Studie (NCT01855750) wurde der Effekt von R-CHOP ± Ibrutinib untersucht; auch wenn der primäre Endpunkt des Ereignis-freien Überlebens (engl. *Event-free survival* (EFS)) verfehlt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Ibrutinib bei jungen Patienten mit ABC-DLBCL einen positiven Effekt hat (Wilson et al., 2021, Younes et al., 2019). In einer aktuellen Phase III-Studie wird außerdem die Verwendung von Ibrutinib in Kombination mit einer Stammzelltransplantation untersucht (NCT02443077).

Ein weiterer Therapieansatz zur Therapie von ABC-DLBCLs ist die Verwendung von Lenalidomid, einem Immunmodulator, der in der Therapie des Multiplen Myeloms und anderen myeloproliferativen Erkrankungen eingesetzt wird. In der Phase III-ROBUST-Studie (NCT02285062) wurde die Verwendung von R-CHOP ± Lenalidomid untersucht, der primäre Endpunkt des verbesserten PFS wurde allerdings nicht erreicht (Nowakowski et al., 2021). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Lenalidomid die Expression von *IRF4*/MUM1 vermindert, welche für das Überleben der Plasmazellen und damit auch der ABC-DLBCL-Zellen elementar ist (Yang et al., 2012). Neuere Studien konnten zeigen, dass *IRF4* durch die Verwendung von spezifischen Antisense-Oligonukleotiden selektiv gehemmt werden kann; diese Wirkung wurde jedoch bisher nur bei Multiplen Myelomen und in einer Sonderform der T-Zell-Leukämie nachgewiesen werden und nicht bei DLBCLs (Mondala et al., 2021, Rauch et al., 2020).

In einer Phase Ib/II-Studie (NCT02077166) wurde ebenfalls die kombinierte Anwendung von Ibrutinib und Lenalidomid bei Patienten mit Rezidivkrankung untersucht; hierbei konnte insbesondere bei Patienten mit ABC-DLBCL ein gutes Therapieansprechen gezeigt werden (Goy et al., 2019).

In BCL2-positiven DLBCLs ist eine weitere Therapieoption der BCL2-Inhibitor Venetoclax. In einer kombinierten Phase Ib/II-Studie (NCT02055820) wurde der Einsatz von R-CHOP mit Venetoclax untersucht. Es konnte hierbei ein möglicherweise

## Einleitung

verbessertes Therapieansprechen bei Hochrisikopatienten mit BCL2-positiven DLBCLs gezeigt werden (Morschhauser et al., 2021, Zelenetz et al., 2019).

Es gibt ebenfalls Bestrebungen, zielgerichtete Therapeutika für BCL6 zu entwickeln. Während bereits einige Substanzen identifiziert wurden, die BCL6 *in vitro* und *in vivo* blockieren und damit das Tumorstadium unterdrücken, fehlen hier noch große Therapiestudien (Gu et al., 2022, Xing et al., 2022).

Der mTOR-Inhibitor Everolimus, der als Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin eingesetzt wird, wurde auch als mögliches Therapeutikum bei DLBCLs untersucht. In einer Phase II-Studie (NCT00869999) bei DLBCL-Patienten mit therapierefraktärer Erkrankung oder Rezidiv konnte in Verbindung mit Rituximab ein gutes Therapieansprechen gezeigt werden (Barnes et al., 2013). In der Phase III-PILLAR-2-Studie (NCT00790036) wurde Everolimus als adjuvante Therapie nach Rituximab-basierter Chemotherapie verabreicht, eine Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens (engl. *Disease-free survival* (DFS)) konnte allerdings nicht erreicht werden (Witzig et al., 2018).

Ebenfalls für das Target EZH2, das vor allem in GCB-DLBCLs alteriert ist, gibt es Bestrebungen, zielgerichtete Therapien zu entwickeln. In Phase I/II-Studien (NCT02889523, NCT01897571) mit dem EZH2-Inhibitor Tazemetostat, der bereits für die Verwendung bei folliculären Lymphomen erprobt ist, konnten vielversprechende Ergebnisse gezeigt werden, wobei große Therapiestudien der Phase II/III noch ausstehen (Italiano et al., 2018, Sarkozy et al., 2020).

Die besonders aggressiven *Double Hit/Triple Hit*-DLBCLs (DH/TH-DLBCLs) sind ein weiteres Target für spezifische Therapien. Durch Verwendung von intensivierten Therapieschemata vor Stammzelltransplantation konnte ein verbessertes Outcome erzielt werden (Petrich et al., 2014). Innovative Therapieverfahren für DH/TH-DLBCLs wie die Kombination von Venetoclax mit Rituximab und anderen Substanzen (NCT03255096) oder die Kombination von Chemotherapie mit Immuncheckpointinhibitoren (NCT03620578) befinden sich zurzeit im Studienstadium und haben bisher noch keine oder nur wenig aussagekräftige Ergebnisse (Dickinson et al., 2021).

Auch die Verwendung von T-Zellen mit chimärem Antigen-Rezeptor, sog. CAR-T-Zellen, bei Patienten mit refraktärem DLBCL oder Rezidiv ist ein vielversprechender Therapieansatz. Für die beiden Präparate Tisagenlecleucel und Axicabtagene

Ciloleucel, bei denen es sich jeweils um autologe Anti-CD19-CAR-T-Zellen handelt, konnte in den entsprechenden Phase I/II-Studien (JULIET (NCT02445248) bzw. ZUMA-1 (NCT02348216)) ein gutes Therapieansprechen und Langzeitoutcome gezeigt werden (Locke et al., 2019, Locke et al., 2017, Schuster et al., 2018, Schuster et al., 2021).

Als *Targeted Therapy* für therapierefraktäre DLBCLs und Rezidive steht inzwischen auch der monoklonale Anti-CD19-Antikörper Tafasitamab zur Verfügung, der in diesen Fälle in Kombination mit Lenalidomid verabreicht wird und in Studien (NCT02399085) ein gutes Therapieansprechen zeigte (Salles et al., 2020).

### 1.3.8 Prognose

Patienten mit DLBCL werden nach dem Internationalen Prognostischen Index (IPI) in verschiedene Risikogruppen stratifiziert, der neben dem Alter, dem Ann-Arbor-Stadium, der Anzahl extranodaler Herde, dem Allgemeinzustand auch die LDH-Konzentration im Serum berücksichtigt und anhand der Anzahl der Risikofaktoren eine Aussage über das 5-Jahres-Überleben zulässt (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993). Nach Einführung von R-CHOP als Standardtherapie von DLBCLs wurde eine überarbeitete Version des IPI veröffentlicht, R-IPI genannt, die eine bessere klinische Prognose anhand des Gesamtüberlebens (engl. *Overall Survival* (OS)) ermöglicht (Sehn et al., 2006). Eine Gegenüberstellung von IPI und R-IPI bietet Tabelle 2. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Standard-IPI auch in Zeiten von Rituximab-haltigen Therapieschemata weiterhin eine gute prognostische Aussagekraft besitzt, sodass der IPI im klinischen Alltag weiterhin regelhafte Anwendung findet (Ziepert et al., 2010).

## Einleitung

Tabelle 2: *International Prognostic Index (IPI)* und *Revised IPI (R-IPI)* im Vergleich. OS = Gesamtüberleben (engl. *Overall Survival*). Tabelle bearbeitet nach The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project (1993), Sehn et al. (2006) und Horvat et al. (2018).

Risiko- faktoren	IPI			R-IPI		
	Stadium	4-Jahres- OS <sup>1</sup>	10-Jahres- OS <sup>3</sup>	Stadium	4-Jahres- OS <sup>2</sup>	10-Jahres- OS <sup>3</sup>
0	Low	82 %	80 %	Very good	94 %	87 %
1						
2	Low- intermediate	81 %	60 %	Good	79 %	67 %
3	High- intermediate	49 %	43 %			
4	High	59 %	30 %	Poor	54 %	37 %
5						

<sup>1</sup> Daten aus The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project (1993)  
<sup>2</sup> Daten aus Sehn et al. (2006)  
<sup>3</sup> Daten aus Horvat et al. (2018)

Neben IPI und R-IPI existiert auch ein altersadjustierter IPI (aaIPI), der eine altersunabhängige Prognosestellung erlaubt (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993). Neuere Scores wie der NCCN-IPI oder die Erweiterung des IPI um Faktoren wie das Thrombozyten-zu-Lymphozyten-Verhältnis haben sich bisher aufgrund der komplizierteren Anwendung in der Praxis nicht durchsetzen können (Zhao et al., 2018, Zhou et al., 2014).

Generell muss bei der Prognose auch die *Cell of Origin*-Klassifikation, und hier insbesondere die COO-Klassifikation anhand der Genexpressionsprofil-Analyse, berücksichtigt werden, da Patienten mit GCB-DLBCL unter R-CHOP-Chemotherapie ein signifikant besseres PFS und OS im Vergleich zu Patienten mit ABC-DLBCL haben (Lenz et al., 2008b). Wichtig ist hierbei zu berücksichtigen, dass DH/TH-DLBCLs eine schlechtere Prognose als herkömmliche ABC- und GCB-DLBCLs haben (Alduaij et al., 2022). Unter Verwendung der neuen, molekulargenetisch basierten Klassifikationssysteme konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Subtypen N1 und MCD mit einer signifikant schlechteren Prognose vergesellschaftet sind als die Subtypen EZB und BN2 (Schmitz et al., 2018). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch für die

Klassifikation nach Chapuy et al. (2018) gezeigt werden. Im Fall von therapierefraktären DLBCLs oder Rezidiven ist ein Unterschied im Überleben zwischen ABC- und GCB-DLBCLs nicht nachgewiesen worden, während DH/TH-DLBCLs und Fälle mit simultaner Expression von *BCL2* und *MYC* mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet waren (Desai et al., 2023).

## 1.4 Follikuläre Lymphome

### 1.4.1 Klassifikation

Die Follikulären Lymphome (FL) werden in der *International Consensus Classification* (ICC) histologisch in die Grade 1-2, 3A und 3B unterteilt, wobei die Aggressivität der Tumoren mit steigendem Grad zunimmt (Campo et al., 2022).

Die fünfte Edition der WHO-Klassifikation der Tumoren der hämatopoetischen und lymphoiden Gewebe unterteilt die fllikulären Lymphome in vier Untergruppen: *In situ* fllikuläre B-Zell-Neoplasien, fllikuläre Lymphome, fllikuläre Lymphome vom pädiatrischen Typ und fllikuläre Lymphome vom duodenalen Typ (Alaggio et al., 2022). Die fllikulären Lymphome werden hierbei wiederum in klassische FLs (engl. *classic FL* (cFL)), fllikuläres großes B-Zell-Lymphom (engl. *follicular large B-cell lymphoma* (FLBL)) und FLs mit ungewöhnlichen Merkmalen (engl. *FL with uncommon features* (uFL)) unterteilt (Alaggio et al., 2022). Ein Grading in die Grade 1, 2, 3A und 3B, wie noch in der überarbeiteten vierten Edition der WHO-Klassifikation vorgesehen, ist in der aktuellen Edition nicht mehr verpflichtend; die Grade 1-3A entsprechen hierbei indolenten Lymphomen, der Grad 3B zählt zu den aggressiven Lymphomen (Alaggio et al., 2022, Swerdlow et al., 2017). Die neu definierte Entität des FLBL entspricht hierbei dem FL 3B gemäß dem alten Grading-System sowie der ICC-Klassifikation (Alaggio et al., 2022, Campo et al., 2022) und ähnelt dem DLBCL in vielen Eigenschaften (Salaverria und Siebert, 2011). Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit die kombinierte Bezeichnung FL 3B/FLBL für diese Lymphome verwendet.

### 1.4.2 Pathogenese

Charakteristisch für cFLs ist die Translokation t(14;18)(q32;q21), welche zu einer Fusion der Gene IGH und *BCL2* führt (Alaggio et al., 2022, Yunis et al., 1982). Diese

Translokation tritt in der Mehrzahl der cFLs auf und führt zu einer Überexpression des antiapoptotischen Proteins BCL2 (Swerdlow et al., 2017).

Im Rahmen des V(D)J-Rearrangements (siehe auch Abschnitt 1.1.2) kommt es zur Umlagerung der Genabschnitte, die für den B-Zell-Rezeptor kodieren. In folliculären Lymphomen wird hierbei *BCL2* in den IGH-Genlocus verlagert und durch die Transkription von *BCL2* durch den IGH-Promotor aktiviert (Stamatopoulos et al., 1997). *BCL2* wird in der Folge überexprimiert und inhibiert damit die Apoptose, durch die normalerweise Zellen mit DNA-Schäden eliminiert werden (Cleary et al., 1986). Neben diesem Mechanismus spielen zahlreiche weitere genetische Alterationen eine Rolle, welche teilweise über Jahre und Jahrzehnte akquiriert werden und in Summe zur Tumorentstehung führen können (Roulland et al., 2011).

### 1.4.3 Histopathologische Eigenschaften

Der Großteil der folliculären Lymphome zeigt zumindest ein teilweise folliculäres Wachstumsmuster, wobei die neoplastischen Follikel die reguläre Architektur der Lymphknoten zerstören (Swerdlow et al., 2017). Die neoplastischen Follikel zeigen sich meist bei aufgehobener Architektur unscharf begrenzt und bestehen aus Zentrozyten und Zentroblasten, hierbei entscheidet der Anteil der Zentroblasten pro Haupt Gesichtsfeld (engl. *high-power field* (HPF)) über das Grading in Grad 1 bis 3B (Alaggio et al., 2022, Campo et al., 2022, Swerdlow et al., 2017). Während in Tumoren der Grade 1 und 2 bis zu 15 Zentroblasten pro HPF vorliegen, sind es in den Graden 3A und 3B mehr als 15 Zentroblasten pro HPF; im Grad 3A sind hierbei noch Zentrozyten nachweisbar, während es im Grad 3B flächige Zellverbände von Zentroblasten ohne nachweisbare Zentrozyten gibt (Swerdlow et al., 2017).

### 1.4.4 Epidemiologie

Follikuläre Lymphome sind wie DLBCLs eine Erkrankung des älteren Menschen. Im Jahr 2019 erkrankten in Deutschland 3.169 Menschen an einem folliculären Lymphom, der Häufigkeitsgipfel liegt hierbei in der Altersgruppe zwischen 75 und 79 Jahren (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022). Im Gegensatz dazu verstarben im Jahr 2019 nur 246 Menschen an einem folliculären Lymphom (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022). Die Risikofaktoren, die das Risiko, an

einem folliculären Lymphom zu erkranken, erhöhen, entsprechen weitestgehend denen des DLBCL.

### 1.4.5 Klinik & Diagnose

Die Symptomatik des folliculären Lymphoms gleicht weitestgehend der anderer Non-Hodgkin-Lymphome wie bspw. dem DLBCL. Zu berücksichtigen ist allerdings der meist langsamere Krankheitsverlauf bei den indolenten Formen des FLs. (Herold, 2019)

Auch die diagnostischen Schritte bei V.a. ein folliculäres Lymphom sind denen bei V.a. DLBCL gleichzusetzen, die Stadieneinteilung erfolgt ebenfalls nach der Ann-Arbor-Klassifikation.

### 1.4.6 Therapie

Im Fall von indolenten Formen des FL kann bei asymptomatischen Patienten eine sog. *Watch and Wait*-Strategie verfolgt werden, in deren Rahmen die Patienten zunächst keine Therapie erhalten, sondern regelmäßig verlaufskontrolliert werden, um einen Krankheitsprogress auszuschließen (Freedman und Jacobsen, 2020). In niedrigen klinischen Stadien ist die Bestrahlung als Therapie der Wahl anzusehen, bei Patienten mit höherem Stadium stehen medikamentöse Therapien wie R-CHOP, Lenalidomid sowie Verfahren wie die Radioimmuntherapie oder Stammzelltransplantationen zur Verfügung (Freedman und Jacobsen, 2020).

### 1.4.7 Prognose

Die Prognose von Patienten mit FL wird anhand des *Follicular Lymphoma International Prognostic Index* (FLIPI) bestimmt, der sich am konventionellen IPI für DLBCLs orientiert: Die zu bestimmenden Risikofaktoren sind hierbei das Patientenalter über 60 Jahren, Ann-Arbor-Stadium III oder IV, Hämoglobin-Spiegel unter 12 g/dl, erhöhte Serum-LDH und mehr als vier betroffene Lymphknotenregionen (Solal-Céligny et al., 2004).

Anhand dieser fünf Faktoren werden die Patienten in drei Risikogruppen eingeteilt, die sich in der Prognose unterscheiden (siehe auch Tabelle 3).

Tabelle 3: Follicular Lymphoma Prognostic Index (FLIPI). OS = Gesamtüberleben. Tabelle bearbeitet nach Solal-Céligny et al. (2004).

Anzahl Risikofaktoren	Stadium	5-Jahres-OS	10-Jahres-OS
0-1	Low	91 %	71 %
2	Intermediate	78 %	51 %
3-5	High	53 %	36 %

Unter Hinzuziehung von molekularen Charakteristika kann der modifizierte m7-FLIPI berechnet werden, der die Prognose von Patienten, die mit R-CHOP therapiert werden, besser bestimmen kann, bei anderen Therapien außer R-CHOP allerdings keine bessere Prognosestellung ermöglicht (Lockmer et al., 2020, Pastore et al., 2015).

## 1.5 Großzellige B-Zell-Lymphome mit *IRF4*-Rearrangement

Die WHO-Klassifikation von Tumoren der hämatopoetischen und lymphoiden Gewebe aus dem Jahr 2017 hat neue, zum Teil provisorische Tumorentität definiert, darunter das großzellige B-Zell-Lymphom mit *IRF4*-Rearrangement (LBCL-*IRF4*) (Swerdlow et al., 2017, Swerdlow et al., 2016). Diese neue Entität ist in der angekündigten, jedoch noch nicht veröffentlichten fünften Edition der WHO-Klassifikation von Tumoren der hämatopoetischen und lymphoiden Gewebe und der Internationalen Konsens-Klassifikation der reifen lymphatischen Neoplasien als definitive Entität definiert worden (Alaggio et al., 2022, Campo et al., 2022).

### 1.5.1 Rolle von *IRF4* in der normalen B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung

Die Interferon-regulierenden Faktoren (engl. *Interferon regulatory factors* (IRF) sind eine Gruppe von neun Transkriptionsfaktoren, die wichtige Aufgaben in der Entwicklung, Differenzierung, Aktivierung und Regulation von Immunzellen übernehmen (Sundararaj und Casarotto, 2021, Taniguchi et al., 2001). Die 3D-Struktur der DNA-bindenden Domäne von IRF4/MUM1 kann Abbildung 5 entnommen werden. *IRF4*, und das durch *IRF4* kodierte Protein *Multiple Myeloma Oncogene 1* (MUM1), ist hierbei der einzige

## Einleitung

Faktor, der nur in Zellen des Immunsystems exprimiert wird und dabei eine essentielle Rolle in deren Entwicklung spielt (Nam und Lim, 2016). Ohne *IRF4* kommt es im Mausmodell zu keiner adäquaten B- oder T-Zellantwort (Mittrücker et al., 1997).

MUM1 ist ein Protein aus 451 Aminosäuren (The UniProt Consortium, 1997-2023). Strukturell besteht MUM1 aus einer N-terminalen DNA-bindenden Domäne (siehe Abbildung 5), deren Bindungseigenschaften durch eine autoinhibitorische Region von MUM1 moduliert werden können, und aus einer C-terminalen Interferon-aktivierende Domäne, die über eine flexible Linker-Region verbunden sind (Remesh et al., 2015).

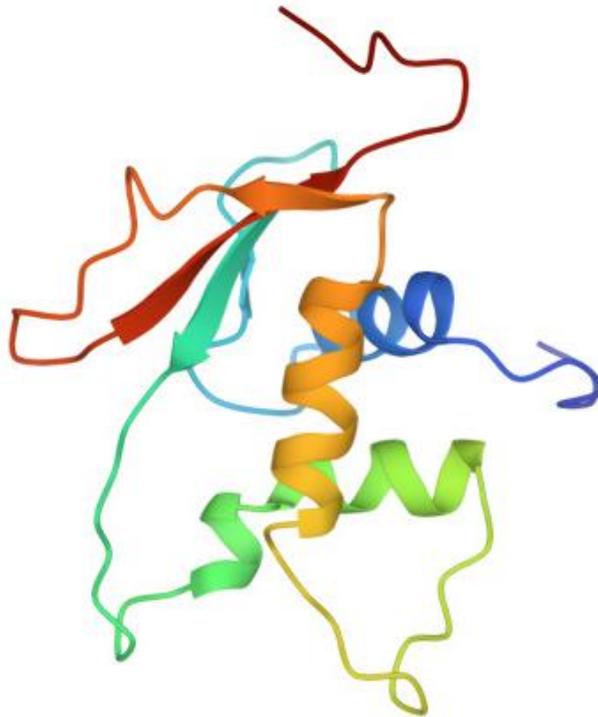


Abbildung 5: Dreidimensionale Visualisierung der DNA-bindenden Domäne von MUM1. Abbildung entnommen aus und bearbeitet nach Zhang et al. (2006).

*IRF4* bzw. MUM1 spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der B-Lymphozyten: In *IRF4/IRF8*-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass ohne *IRF4* aus den Vorläufer-B-Zellen keine B-Lymphozyten entstehen können (Lu et al., 2003). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass *IRF4/MUM1* im Rahmen der Keimzentrumsreaktion direkt *BCL6* aktiviert und damit die B-Zell-Differenzierung reguliert (Ochiai et al., 2013). Jedoch konnte dieser Effekt in anderen Arbeiten nicht nachgewiesen werden, hier wurde eine Repression von *BCL6* durch MUM1 nachgewiesen (Saito et al., 2007, Willis et al., 2014). Somit bleibt der Einfluss von

IRF4/MUM1 auf die Keimzentrums-B-Zellen fraglich. IRF4/MUM1 spielt hingegen eine essenzielle Rolle in der Differenzierung und dem Überleben von Plasmazellen (Tellier et al., 2016). Die genauen Funktionen und Interaktionen von IRF4/MUM1 in normalen und malignen Zellen sind hochkomplex und noch immer Gegenstand aktueller Forschung (Lu et al., 2023, Yang et al., 2012); neuere Arbeiten definieren IRF4/MUM1 hierbei sogar als „*Oncogenic Master Transcription Factor*“ (Wong et al., 2022).

### 1.5.2 Pathogenese von *IRF4*-Dysfunktionen

Bereits frühe Arbeiten konnten zeigen, dass IRF4/MUM1 in vielen lymphatischen Neoplasien und hierbei der Mehrzahl der DLBCLs exprimiert ist (Natkunam et al., 2001, Tsuboi et al., 2000). Ebenfalls konnte eine Co-Expression von BCL6 und MUM1 in fast 50 % der DLBCLs gezeigt werden, was eine Deregulation von IRF4/MUM1 in DLBCLs vermuten lässt (Falini et al., 2000). Hierbei waren die Expressionslevel von IRF4/MUM1 in malignen Zellen deutlich höher als in gesunden B-Zellen (Yamada et al., 2001).

IRF4/MUM1 wird in normalen B-Zellen nach Abschluss der Affinitätsreifung durch die Stimulation durch NF- $\kappa$ B exprimiert, wodurch über PRDM1/BLIMP-1 BCL6 gehemmt wird und die Ausreifung zu Plasmazellen beginnt (Cadera et al., 2009, Klein et al., 2006, Saito et al., 2007, Shaffer et al., 2002).

Durch die konstitutive Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Pathways in ABC-DLBCLs wird IRF4/MUM1 exprimiert, das eine Differenzierung in Richtung Plasmazellen initiiert (Davis et al., 2001). IRF4/MUM1 kann auch durch Translokation in den IGH-Genlocus hochreguliert werden, was vor allem bei GCB-DLBCLs auftritt (Salaverria et al., 2011, Tsuboi et al., 2000) und auch den neuen Subtyp der LBCL-*IRF4* betrifft (Alaggio et al., 2022, Campo et al., 2022, Swerdlow et al., 2017).

### 1.5.3 Besondere Eigenschaften von großzelligen B-Zell-Lymphomen mit *IRF4*-Rearrangement im Vergleich zu DLBCL, NOS

Der neue Subtyp des LBCL-*IRF4* ist durch Rearrangements im *IRF4*-Genlocus definiert. Diese Rearrangements treten, je nach Studie, in Häufigkeiten von 2 % der Fälle von DLBCLs und FLs 3B in gemischten Kohorten, und bis zu 21 % der Fälle in rein pädiatrischen Kohorten, meist unter Beteiligung der Immunglobulin-Genloci, auf (Au-Yeung et al., 2020, Chisholm et al., 2019, Hesius et al., 2023, Salaverria et al., 2011).

Morphologisch zeigen sich diese Fälle mit großen Zellen und diffusem oder folliculärem Wachstum und werden mittels Genexpressionsprofil-Analyse und Immunhistochemie meist als GCB klassifiziert und zeigen häufig eine kräftige MUM1-Expression (Salaverria et al., 2011, Zhou et al., 2021). Mittels GEP lassen sich in diesen Fällen meist erhöhte Expressionswerte von IRF4/MUM1 und BCL6 als in normalen DLBCLs, NOS, nachweisen, bei fehlender Expression von PRDM1/BLIMP-1, was der physiologischen Regulation von *PRDM1* und *BCL6* durch *IRF4* widerspricht (Berg et al., 2023, Salaverria et al., 2011). Die hohen BCL6-Expressionswerte sind zumindest teilweise durch häufige simultane Translokationen und/oder Mutationen von *BCL6* zu erklären (Salaverria et al., 2011), die vor allem bei erwachsenen Patienten auftreten (Berg et al., 2023).

In diesen Fällen mit *IRF4*-Rearrangement lassen sich häufig außerdem sekundäre Alterationen des Genoms detektieren, darunter *IRF4*-Mutationen, welche unter anderem im Rahmen einer aberranten somatischen Hypermutation auftreten können, sowie Mutationen in Genen des NF- $\kappa$ B-Pathways wie *MYD88*, *CD79B* und *CARD11* (Khodabakhshi et al., 2012, Ramis-Zaldivar et al., 2020, Salaverria et al., 2013, Zhou et al., 2021). Der Nachweis des *IRF4*-Rearrangements gelingt mit herkömmlicher Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung nicht in allen Fällen, weswegen in manchen Fällen trotz starker IRF4/MUM1-Expression und passenden übrigen Charakteristika kein Nachweis des *IRF4*-Rearrangements möglich ist (Chen et al., 2017, Quintanilla-Martinez et al., 2016).

Das LBCL-*IRF4* betrifft vor allem Kinder und junge Erwachsene bei einem medianen Alter je nach Studie von 12 bis 67 Jahren (Au-Yeung et al., 2020, Frauenfeld et al., 2022, Salaverria et al., 2011, Zhou et al., 2021). Es konnte eine Häufung der Lymphome in der Kopf-Hals-Region unter Beteiligung des Waldeyer'schen Rachenrings sowie im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden (Berg et al., 2023, Chisholm et al., 2019, Salaverria et al., 2011). Bei erwachsenen Patienten wurde eine Häufung von LBCL-*IRF4* auf bis zu 22 % der Fälle mit aberranter Co-Expression von CD10, BCL6 und MUM1 nachgewiesen (Frauenfeld et al., 2022).

Die Prognose der LBCL-*IRF4* im Vergleich zu herkömmlichen DLBCL, NOS, ist deutlich besser, mit einem 5-Jahres-OS je nach Studie von bis zu 100 %, was auch mit dem meist niedrigen klinischen Stadium bei Diagnosestellung zusammenhängen kann (Au-Yeung et al., 2020, Hesius et al., 2023, Salaverria et al., 2011).

## 1.6 DLBCLs im Waldeyer'schen Rachenring

Der sog. Waldeyer'sche Rachenring (WR) besteht aus den Tonsillen im Nasen-Rachen-Bereich sowie Lymphfollikeln an der Rachenhinterwand und wird auch als Nasopharynx-assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. *Nasopharynx-associated lymphatic tissue* (NALT)) bezeichnet. Knapp 11 % aller DLBCLs oder 20 % der nodalen DLBCLs sind im WR lokalisiert, damit ist der WR die häufigste Lokalisation von nodalen DLBCLs, nach den Lymphknoten (López-Guillermo et al., 2005, Shi et al., 2019). DLBCLs im WR zeigen hierbei häufiger als DLBCLs in anderen Lokalisationen einen GCB-Phänotyp, je nach Studie liegt der Anteil der GCBs an den WR-DLBCLs bei 20 bis 61 % (de Leval et al., 2012, Jing et al., 2017, Ma et al., 2020).

*IRF4*-Rearrangements finden sich in DLBCLs des Waldeyer'schen Rachenrings mit einer ähnlichen Rate wie in DLBCLs übriger Lokalisation, je nach Studie in bis zu 8 % der Fälle; nur in einer chinesischen Studie wurden *IRF4*-Rearrangements mit einer Frequenz von fast 25 % nachgewiesen (de Leval et al., 2012, Ma et al., 2020). Rearrangements von *BCL2* finden sich in 7 bis 10 % der Fälle von WR-DLBCLs (de Leval et al., 2012, Ma et al., 2020).

Bei WR-DLBCLs liegt häufiger als bei DLBCLs in anderen Lokalisationen bei Diagnose ein niedriges klinisches Stadium vor, nur eine chinesische Studie (Ma et al., 2020) fand in ihrer Fallkohorte ein Überwiegen der Stadien III und IV; das regelhaft niedrigere klinische Stadium könnte hierbei stärker für das bessere Überleben von Patienten mit WR-DLBCL im Vergleich zu DLBCLs in anderen Lokalisationen verantwortlich sein als der Faktor der Lokalisation im WR (de Leval et al., 2012, Jing et al., 2017, Oh et al., 2013, Qi et al., 2009). Therapeutisch werden die WR-DLBCLs seit der breiten Verfügbarkeit von R-CHOP mittels Chemotherapie behandelt, während zuvor andere therapeutische Algorithmen wie die Radiotherapie verbreitet waren, die vom Outcome allerdings R-CHOP unterlegen waren (Guan et al., 2021). Während in einer großen Phase III-Studie kein Vorteil von DA-EPOCH-R im Vergleich zu R-CHOP nachgewiesen werden konnte (Bartlett et al., 2019), konnte eine Studie ein verbessertes PFS und OS bei Patienten mit WR-DLBCLs nach Therapie mit DA-EPOCH-R zeigen (Liang et al., 2023); die Relevanz dieser Ergebnisse bleibt angesichts der wesentlich größeren Studienpopulation von Bartlett et al. (2019) aber fraglich.

## 1.7 Problemstellung und Ziel der Studie

Diffus großzellige B-Zell-Lymphome und folliculäre Lymphome machen die beiden häufigsten Non-Hodgkin-Lymphomentitäten bei erwachsenen Patienten aus (Swerdlow et al., 2016, Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022). Die häufigste Lokalisation der DLBCLs ist hierbei neben den Lymphknoten der Waldeyer'sche Rachenring (López-Guillermo et al., 2005, Shi et al., 2019). Durch die Definition von neuen Subtypen mit eigenständigen Charakteristika, wie zum Beispiel dem großzelligen B-Zell-Lymphom mit *IRF4*-Rearrangement, das vor allem bei Kindern auftritt und mit einer guten Prognose einhergeht, ergeben sich auch neue diagnostische und therapeutische Implikationen (Swerdlow et al., 2017). Eine umfassende molekularpathologische Aufarbeitung dieser Lymphome unterbleibt in der Regel im Rahmen der Routinediagnostik. Diese Analysen können jedoch erheblich zum Verständnis der Pathogenese der Lymphome beitragen und damit wichtige Hinweise sowohl für die Therapie als auch die Prognose geben.

Ziel dieser Studie war daher eine umfassende molekularpathologische Charakterisierung von DLBCLs und FLs 3B des Waldeyer'schen Rachenrings bei erwachsenen Patienten mittels Immunhistochemie, Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, *Next Generation Sequencing* und Genexpressionsprofilanalyse. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf der Prävalenz und den Eigenschaften der LBCL-*IRF4* und dem Vergleich dieser Fälle mit bekannten Charakteristika bei pädiatrischen Patienten. Eine weitere wichtige Fragestellung war, ob, und wenn ja, wie sich die Lymphome im Waldeyer'schen Rachenring von denen in anderen Lokalisationen unterscheiden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Untersuchungsmaterial

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden asservierte Gewebeprobe in Form von Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe (FFPE) von Patienten des Universitätsklinikums Tübingen und externen Einsendern wie ambulanten Praxen und anderen Kliniken verwendet. Das verfügbare Material stammte aus den Jahren 2002 bis 2020. Die Fälle 1, 2 und 13 wurden hierbei von externen Einsendern dem Archiv des Instituts für Pathologie überlassen. Fall 35 wurde im Rahmen einer konsiliarischen Mitbeurteilung eingesandt.

Die geplanten Arbeiten wurden im Vorfeld durch die lokale Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Tübingen unter der Antragsnummer 199/2020/BO2 genehmigt.

Zur Identifikation der zu untersuchenden Fälle wurde eine Recherche in der institutseigenen Datenbank und der dazugehörigen Software NEXUS/PATHOLOGIE (NEXUS AG) durchgeführt, in der alle routinediagnostischen Untersuchungen, Befunde und Diagnosen der Fälle erfasst sind. Hierfür wurde das integrierte Recherche-Tool verwendet, um in der Routine als DLBCL oder FL 3B/FLBL klassifizierte B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome bei erwachsenen Patienten zu identifizieren. Für die Fallsuche wurden die folgenden Suchbegriff-Kombinationen verwendet:

- *Tonsille AND Lymphom*
- *Tonsilla AND Lymphom*

Die so gewonnenen Suchergebnisse wurden dann wiederum manuell überprüft, ob tatsächlich ein in den Tonsillen lokalisiertes großzelliges B-Zell-Lymphom vorliegt. Ausgeschlossen wurden in den Tonsillen lokalisierte Rezidive oder Metastasen.

Bei denen im vorangegangenen Schritt identifizierten potenziellen Fällen wurde im Anschluss im Archiv die Verfügbarkeit von Schnitten bzw. Färbungen sowie FFPE-Blöcken überprüft. Hierbei wurden Fälle ausgeschlossen, bei denen kein oder nicht ausreichend FFPE-Material für die nachfolgenden Analysen zur Verfügung stand.

Die in der Routinediagnostik angefertigten Schnitte und Färbungen der Fälle, die die oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten, wurden im Rahmen des Screenings auf potenzielle Fälle für das Fallkollektiv erneut mikroskopiert und befundet, um in der Routine falsch befundene Fälle zu erkennen und ggf. auszuschließen.

### 2.1.2 Geräte

Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Axio Imager M2 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH
BenchMark ULTRA IHC/ISH System	Ventana Medical Systems
Biofuge Pico	Heraeus
Bohrschleifer	PROXXON S.A.
CN-200-WL/LC Gel-Dokumentationssystem	Peqlab
DynaMag-96 Side Magnet Plate	Thermo Fisher Scientific
Eppendorf Mastercycler Nexus GX2	Eppendorf AG
Gelkammer	Peqlab
HTG EdgeSeq Processor	HTG Molecular Inc.
Inkubations-/Inaktivierungsbad Nr. 1002	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Ion Chef	Thermo Fisher Scientific
Ion GeneStudio S5 Prime	Thermo Fisher Scientific
LightCycler 480	Roche Molecular Systems
Maxwell RSC	Promega GmbH
Maxwell RSC Cartridge Rack	Promega GmbH
Mikroliterpipetten „Eppendorf research“	Eppendorf AG
Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Multifuge 1L-R	Thermo Fisher Scientific/Heraeus
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Qubit 3.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific
ThermoBrite Hybridisierungssofen	Abbott GmbH
Thermocycler Flexcycler	Analytik Jena
Thermocycler Nexus X2	Eppendorf AG
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG

### 2.1.3 Kits

Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits.

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
AmpliAq Gold DNA Polymerase with Gold Buffer and MgCl <sub>2</sub> Kit	Thermo Fisher Scientific
Agencourt AMPure XP-Kit	Beckman Coulter
Ion AmpliSeq Library Kit 2.0	Thermo Fisher Scientific
Ion Library TaqMan Quantitation Kit	Thermo Fisher Scientific
Ion Express Barcode Adapters 1-96 Kit	Thermo Fisher Scientific
Maxwell RSC FFPE Plus DNA Purification Kit	Promega GmbH
HighPrep™ PCR Clean-up System	MagBio Genomics Inc.
OneTaq Hot Start 2X Master Mix with GC Buffer	New England BioLabs GmbH

KAPA Library Quantification Kit Ion/Universal	KAPA Biosystems
--	-----------------

#### 2.1.4 Antikörper

Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Klon	Hersteller
BCL2	100/D5	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG
BCL6	G1191E/A8	Roche Molecular Solutions
CD10	56C6	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Ki-67	MIB1	Agilent Technologies Inc.
MUM1	MUM1p	Agilent Technologies Inc.
MYC	Y69	Roche Molecular Solutions

#### 2.1.5 FISH-Sonden

Tabelle 7: Liste der verwendeten FISH-Sonden.

Gen	Sonde	Region	Hersteller
<i>IRF4</i>	ZytoLight SPEC IRF4,DUSP22 Dual Color Break Apart Probe	6p25.3	ZytoVision GmbH
IGH	ZytoLight SPEC IGH Dual Color Break Apart Probe	14q32.33	ZytoVision GmbH
<i>BCL2</i>	Vysis LSI BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe	18q21	Abbott Molecular
<i>MYC</i>	Vysis LSI MYC Dual Color Break Apart Rearrangement Probe	8q24	Abbott Molecular

## 2.1.6 Primer

### Primer für die Testung der Amplifizierbarkeit (nach Van Dongen et al. (2003))

Tabelle 8: Liste der Primer für die Testung der Amplifizierbarkeit.

<b>Gen</b>	<b>Exon</b>	<b>Richtung</b>	<b>Produktlänge</b>	<b>Sequenz</b>
<i>AF4</i>	3	Forward	600 bp	GGAGCAGCATTCCATCCAGC
<i>AF4</i>	3	Reverse	600 bp	CATCCATGGGCCGGACATAA
<i>AF4</i>	11	Forward	400 bp	CCGCAGCAAGCAACGAACC
<i>AF4</i>	11	Reverse	400 bp	GCTTTCCTCTGGCCGGCTCC
<i>PLZF</i>	1	Forward	300 bp	TGCGATGTGGTCATCATGGTG
<i>PLZF</i>	1	Reverse	300 bp	CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC
<i>RAG1</i>	2	Forward	200 bp	TGTTGACTCGATCCACCCCA
<i>RAG1</i>	2	Reverse	200 bp	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA
<i>TBXAS1</i>	9	Forward	100 bp	GCCCGACATTCTGCAAGTCC
<i>TBXAS1</i>	9	Reverse	100 bp	GGTGTGCGCCGGAAGGGTT

**Primer für die Einzelamplikon-Erstellung**

Tabelle 9: Liste der Primer für die Einzelamplikon-Erstellung.

<b>Gen</b>	<b>Exon</b>	<b>Position</b>	<b>Typ</b>	<b>Barcode</b>	<b>Primer-Sequenz (5'-3')</b>
<i>EZH2</i>	16	c.646	AF	63	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGAGTTCGATTATTGCTGGCACCATCTGAC
	16	c.646	AR	63	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGAGTTCGATTGAATACAGGTTATCAGTGCCTT
	16	c.646	trP1F		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTATTGCTGGCACCATCTGAC
	16	c.646	trP1R		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTGAATACAGGTTATCAGTGCCTT
	16	c.646	AF	64	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGAGTTCCGACGATTATTGCTGGCACCATCTGAC
	16	c.646	AR	64	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGAGTTCCGACGATTGAATACAGGTTATCAGTGCCTT
	16	c.646	trP1F		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTATTGCTGGCACCATCTGAC
	16	c.646	trP1R		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTGAATACAGGTTATCAGTGCCTT
	16	c.646	AF	65	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTGGCACATCGATTATTGCTGGCACCATCTGAC
	16	c.646	AR	65	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTGGCACATCGATTGAATACAGGTTATCAGTGCCTT
	16	c.646	trP1F		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTATTGCTGGCACCATCTGAC
	16	c.646	trP1R		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTGAATACAGGTTATCAGTGCCTT
<i>IRF4</i>	2	c.12-19	AF	91	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGGAAGGATGCGATCGGGGCATGAACCTGGAG
	2	c.12-19	AR	91	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGGAAGGATGCGATCGGTTGTAGTCCTGCTTGC

## Material und Methoden

<b>Gen</b>	<b>Exon</b>	<b>Position</b>	<b>Typ</b>	<b>Barcode</b>	<b>Primer-Sequenz (5'-3')</b>
	2	c.12-19	trP1F		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCGGGGCATGAACCTGGAG
	2	c.12-19	trP1R		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCGGTTGTAGTCCTGCTTGC
	2	c.1-35	AF	69	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCAATTGGCGATTCTCCCCGAGTGCAGAG
	2	c.1-35	AR	69	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCAATTGGCGATTCTCGTTCTCCACACCAGC
	2	c.1-35	trP1F		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCTCCCCGAGTGCAGAG
	2	c.1-35	trP1R		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCTCGTTCTCCACACCAGC
	2	c.35-72	AF	69	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCAATTGGCGATGAAGCTCCGCCAGTGG
	2	c.35-72	AR	69	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCAATTGGCGATCTCTGTCTCTGGGCCCTC
	2	c.35-72	trP1F		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGAAGCTCCGCCAGTGG
	2	c.35-72	trP1R		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTCTGTCTCTGGGCCCTC
<i>CARD11</i>	20	c.871	AF	58	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTAGAACACGATAGGGCCTGACTGATTGATAAAT
	20	c.871	AR	58	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTAGAACACGATCTGAAGGAGCTGGCCAAAA
	20	c.871	trP1F		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAGGGCCTGACTGATTGATAAAT
	20	c.871	trP1R		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTGAAGGAGCTGGCCAAAA
	23	c.1046	AF	60	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGCTCTTCGATCTCAGAAGGCAGAAGACGGA
	23	c.1046	AR	60	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGCTCTTCGATCATCCAACCTCCCAGTCCC

## Material und Methoden

<b>Gen</b>	<b>Exon</b>	<b>Position</b>	<b>Type</b>	<b>Barcode</b>	<b>Primer-Sequenz (5'-3')</b>
	23	c.1046	trP1F		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTCAGAAGGCAGAAGACGGA
	23	c.1046	trP1R		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCATCCAACCTCCCAGTCCC
	5	c.215	AF	33	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCTCATTGAACGATTGGAGCTGCTAACCTTCCAG
	5	c.215	AR	33	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCTCATTGAACGATGTCTCGGCTCCTCATGACC
	5	c.215	trP1F		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTGGAGCTGCTAACCTTCCAG
	5	c.215	trP1R		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTCTCGGCTCCTCATGACC
<i>PIM1</i>	4	c.124	AF	71	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGGCTCCGACGATAAGAAGGTGAGCTCGGGTTT
	4	c.124	AR	71	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGGCTCCGACGATTTTTTCGTCCTTGATGTCGCG
	4	c.124	trP1F		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAAGAAGGTGAGCTCGGGTTT
	4	c.124	trP1R		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTTTTCGTCCTTGATGTCGCG
<i>BCL2</i>	2	c.192	AF	71	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGGCTCCGACGATGCCTTCTTTGAGTTCGGTGG
	2	c.192	AR	71	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGGCTCCGACGATCACCAAGTGCACCTACCCA
	2	c.192	trP1F		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGCCTTCTTTGAGTTCGGTGG
	2	c.192	trP1R		CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCACCAAGTGCACCTACCCA

## 2.1.7 Enzyme

Tabelle 10: Liste der verwendeten Enzyme.

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
Pepsin	Sigma-Aldrich

## 2.1.8 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 11: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Ethanol absolut zur Analyse	Merck KGaA
Eosin G	Carl Roth GmbH + Co. KG
Formamid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck KGaA
Hämatoxylin-Monohydrat	AppliChem GmbH
Polyethylenglykol 8000	Carl Roth GmbH + Co KG
TBE-Puffer	Selbst hergestellt aus Trizma base (Sigma-Aldrich), Borsäure (Merck KGgA) und EDTA (Merck KGgA)
Loading Dye	Thermo Fisher Scientific
DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GelRed	Biotium
Agarose	Biozym
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG
UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water	Thermo Fisher Scientific Corporation

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Invitrogen Platinum PCR SuperMix High Fidelity	Thermo Fisher Scientific
Waschpuffer A	Zytovision GmbH
DAPI	Abbott Molecular
DAPI	Zytovision GmbH1
LSI/WCP Hybridization Buffer	Abbott Molecular
NP-40	Abbott Molecular
SSC 20x	Abbott Molecular
Xylol reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG

### 2.1.9 EDV-Programme

Tabelle 12: Liste der verwendeten EDV-Programme.

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
AxioVision	Carl Zeiss Microscopy GmbH
BioCapt	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
HTG EdgeSeq RUO Library Calculator	HTG Molecular Inc.
HTG EdgeSeq Parser	HTG Molecular Inc.
IBM SPSS Statistics, Version 28	IBM Deutschland GmbH
Integrative Genomics Viewer	Broad Institute, University of California
Ion AmpliSeq Designer	Thermo Fisher Scientific
Ion Torrent Software	Thermo Fisher Scientific
Ion Reporter Software	Thermo Fisher Scientific
LightCycler Software	Roche Molecular Systems
Microsoft Excel Version 2107	Microsoft Corporation

NanoDrop Software	Thermo Fisher Scientific
NEXUS/PATHOLOGIE	NEXUS AG
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research
R	The R Foundation for Statistical Computing
RStudio Desktop, Version Version 2022.12.0+353	Posit Software, PBC formerly RStudio, PBC

### 2.1.10 Hersteller

Tabelle 13: Liste der Hersteller.

<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>	<b>Land</b>
Abbott GmbH & Co. KG	Wiesbaden	Deutschland
Abbott Molecular	Des Plaines, IL	USA
Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, CA	USA
Analytik Jena	Jena	Deutschland
AppliChem GmbH	Darmstadt	Deutschland
Beckman Coulter GmbH	Krefeld	Deutschland
Bender & Hobein AG	Zürich	Schweiz
Biotium	Fremont, CA	USA
Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf	Deutschland
Broad Institute	San Diego, CA	USA
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Carl Zeiss Jena GmbH	Oberkochen	Deutschland
Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena	Deutschland

## Material und Methoden

<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>	<b>Land</b>
DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG	Hamburg	Deutschland
Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
Fisher Scientific GmbH	Schwerte	Deutschland
GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel	Deutschland
Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Heraeus	Hanau	Deutschland
HTG Molecular Inc.	Tucson, AZ	USA
IBM Deutschland GmbH	Ehningen	Deutschland
KAPA Biosystems	Kapstadt	Südafrika
Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nussloch	Deutschland
Life Technologies AS	Oslo	Norwegen
Life Technologies Corporation	Carlsbad, CA	USA
Life Technologies Holdings Pte Ltd	Singapur	Singapur
Marabu GmbH & Co. KG	Tamm	Deutschland
MagBio Genomics Inc.	Gaithersburg, MD	USA
medac GmbH	Wedel	Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Microsoft Corporation	Redmond, WA	USA
neoLab	Heidelberg	Deutschland

## Material und Methoden

<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>	<b>Land</b>
New England BioLabs GmbH	Frankfurt am Main	Deutschland
NEXUS AG	Donaueschingen	Deutschland
Peqlab/VWR Life Science	Darmstadt	Deutschland
Posit Software, PBC formerly RStudio, PBC	Boston, MA	USA
Promega GmbH	Walldorf	Deutschland
PROXXON S.A.	Wecker	Luxemburg
R. Langenbrinck GmbH	Emmendingen	Deutschland
Roche Molecular Solutions	Pleasanton, CA	USA
Roche Molecular Systems	Pleasanton, CA	USA
Sigma-Aldrich	St. Louis, MO	USA
The R Foundation for Statistical Computing	Wien	Österreich
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA	USA
Thomson Reuters	NewYork, NY	USA
Ventana Medical Systems	Tucson, AZ	USA
Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Eberhardzell	Deutschland
VWR International B.V.	Amsterdam	Niederlande
Whitehead Institute for Biomedical Research	Cambridge, MA	USA
Zytomed Systems GmbH	Berlin	Deutschland
ZytoVision GmbH	Bremerhaven	Deutschland

## **2.2 Klinisch-epidemiologische Eigenschaften**

Von allen Fällen war bereits durch die Aufarbeitung in der Routinediagnostik das Geschlecht sowie das Alter der Patienten bei Diagnosestellung bekannt. Diese Angaben wurden als Grundlage für die klinischen Falldaten verwendet. Ergänzt wurden sie durch Angaben zum klinischen Stadium nach Ann-Arbor, dem Internationalen Prognostischen Index IPI sowie zur eventuell durchgeführten Therapie. Weiterhin wurden Daten zum Therapieansprechen sowie zur Follow-up-Dauer der Patienten erhoben. Diese Daten wurden anhand der in den Arztbriefen, welche im Rahmen der klinischen Versorgung der Patienten erstellt worden waren, dokumentierten Angaben zu Verlauf und Therapie akquiriert. Bei der Einsicht der Daten wurde jeweils die Genehmigungsnummer des Ethikantrags hinterlegt. (Streich et al., 2023)

## **2.3 Morphologie und histopathologische Eigenschaften**

Zur Diagnosestellung sowie der Beurteilung der Morphologie wurden von allen Fällen neue Hämatoxylin-Eosin-(HE)- sowie Giemsa-Färbungen angefertigt, auch wenn eventuell bereits entsprechende Färbungen aus der Routinediagnostik vorlagen. Diese Färbungen wurden erneut gemeinsam mit einer Fachärztin für Pathologie mikroskopiert und Fälle, welche nicht zu den Einschlusskriterien passten, wurden aus dem Fallkollektiv exkludiert und wieder in das Archiv überführt. (Streich et al., 2023)

## **2.4 Immunhistochemie (IHC)**

Als nächster Schritt wurden bei allen Fällen grundlegende immunhistochemische Färbungen angefertigt. In einigen Fällen wurde auf Grund von wenig vorliegendem FFPE-Material auf die in der Routinediagnostik erstellen immunhistochemischen Färbungen zurückgegriffen, wenn sichergestellt war, dass hierfür dieselben Antikörper verwendet worden waren, welche auch in den im Rahmen der Studie angewandten immunhistochemischen Färbungen verwendet werden. Die Färbungen erfolgten automatisiert im Immunfärbeautomat (BenchMark ULTRA IHC/ISH System, Ventana Medical Systems) nach Herstellerangaben. Die verwendeten Antikörper sind Tabelle 6 zu entnehmen. (Streich et al., 2023)

## **2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

Für die Analyse von Translokationen und Gains in einzelnen Genloci wurden FISH-Analysen durchgeführt. Die verwendeten Sonden inklusive zugehörigen Verdünnungs- und Hybridisierungspuffern sind Tabelle 7 zu entnehmen. (Streich et al., 2023)

### **2.5.1 Vorbereitung**

Zur Freilegung der zu hybridisierenden Strukturen wurden die Leerschnitte zunächst entparaffiniert. Hierzu wurde eine Xylolreihe (Carl Roth GmbH + Co. KG), bestehend aus drei aufeinanderfolgenden Bädern, verwendet. Die Schnitte wurden in jedem der drei Bäder für zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurden die entparaffinierten Schnitte für je fünf Minuten in zwei aufeinander folgende 100%-ige Ethanol-Bäder (Merck KGaA) dehydratisiert und anschließend für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. (Streich et al., 2023)

### **2.5.2 Waschung, Pepsinverdau, Denaturierung**

Im Anschluss an die Entparaffinierung wurden die Schnitte bei 95 °C für 40 Minuten in Natriumcitrat-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG) inkubiert und anschließend in A. dest. gewaschen. Währenddessen wurde bei -18 °C gelagertes Pepsin (25 mg/ml, Sigma-Aldrich) mit 37 °C warmer 0,9 %-iger Natriumchlorid-Lösung (hergestellt aus Natriumchlorid (Merck KGaA) + A. dest.) aufgetaut und verdünnt (250 µg/ml). Bei den Analysen, für deren Sonde ein Verdau mit Pepsin nötig ist, wurden nach der Waschung in A. dest. die Gewebestücke mit Pepsin überschichtet und im ThermoBrite-Hybridisierungsofen (Abbott GmbH & Co. KG) bei 37 °C für vier Minuten inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit A. dest. gespült. Anschließend wurden die Objektträger bei 73 °C für zehn Minuten in einer 70 %-igen Formamid/2x SSC-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG und AppliChem) denaturiert. Zum Abschluss der Denaturierung wurden die Schnitte für jeweils zwei Minuten in 70- und 100 %-igem Ethanol dehydratisiert und dann für fünf Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. (Streich et al., 2023)

### **2.5.3 Vorbereitung der Sonde, Auftragung, Hybridisierung**

Nach der Trocknung wurde auf der Unterseite der Objektträger die Hybridisierungsstelle anhand der Einzeichnung auf der HE-Färbung mit einem Diamantschleifer markiert. (Streich et al., 2023)

Danach wurden die zu verwendenden Sonden aufgetaut, ggf. nach Herstellerangaben verdünnt und anschließend für fünf Minuten bei 73 °C denaturiert. Im Anschluss daran wurden die denaturierten Sonden für zwei bis drei Minuten auf Eis gelegt, gevortext und herunterzentrifugiert. Nun wurden die zu hybridisierenden Stellen mit jeweils 1,5 µl der ggf. verdünnten Sonde bedeckt, mit einem runden Deckglas (Durchmesser 9mm) abgedeckt und mit Marabu-Fixogum Rubber Cement (Marabu GmbH & Co. KG) abgedichtet. Die so vorbereiteten Objektträger wurden für 15 bis 17 Stunden bei 37 °C im ThermoBrite Hybridisierungsofen hybridisiert. (Streich et al., 2023)

### **2.5.4 Post-Hybridisierungs-Waschung**

Am nächsten Tag wurden die über Nacht hybridisierten Objektträger entdeckelt und je nach verwendeter Sonde gewaschen:

#### **Sonden von Abbott Molecular**

Die mit diesen Sonden hybridisierten Schnitte wurden für zehn Minuten bei Raumtemperatur in 2x SSC-Lösung (AppliChem) inkubiert und anschließend für fünf Minuten bei 73 °C in einer NP40/2x SSC-Lösung (Abbott Molecular/AppliChem) spezifisch gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut in 2x SSC-Lösung gewaschen, bevor sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 85 %, 100 %) (Merck KGaA) dehydratisiert und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet wurden. (Streich et al., 2023)

#### **Sonden von ZytoVision**

Bei mit diesen Sonden hybridisierten Proben wurden die Schnitte in einem herstellereigenen Waschpuffer A bei 37 °C für drei Minuten gewaschen, anschließend erneut für fünf und dann für weitere fünf Minuten in jeweils frischem Waschpuffer gewaschen. Danach wurden auch diese Schnitte in der bereits im vorherigen Absatz beschriebenen aufsteigenden Ethanolreihe dehydratisiert und bei Raumtemperatur getrocknet. (Streich et al., 2023)

### 2.5.5 Eindecken der Objektträger

Nach der Post-Hybridisierungs-Waschung wurden die Gewebeschnitte mit 3,2 µl des Fluoreszenzfarbstoffs 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Zytovision GmbH bzw. Abbott Molecular) gegengefärbt und mit einem rechteckigen Deckglas eingedeckt. Nach einer Einwirkzeit von mindestens 20 Minuten wurden die Schnitte ausgewertet. (Streich et al., 2023)

### 2.5.6 Auswertung

Die hybridisierten und gegengefärbten Schnitte wurden unter dem Zeiss Axio Imager M2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) mit für die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe spezifischen Filtersätzen im Vier-Augen-Prinzip mikroskopiert. Die verwendeten Filter sind Tabelle 14 zu entnehmen. Die Ergebnisse wurden sowohl schriftlich, in einigen Fällen auch mit dem integrierten Kamerasystem fotografisch, dokumentiert und digital gespeichert. (Streich et al., 2023)

Tabelle 14: Liste der verwendeten Filter für die Fluoreszenz-Mikroskopie.

Filtersatz	Anregung	Strahlteiler	Emission	Hersteller
38 HE	BP 470/40 (HE)	FT 495 (HE)	BP 525/50 (HE)	Carl Zeiss Microscopy GmbH
47 HE	BP 436/25 DMR 25	FT 455 HE	BP 480/40 DMR 25	Carl Zeiss Microscopy GmbH
43 HE	BP 550/25 (HE)	FT 570 (HE)	BP 605/70 (HE)	Carl Zeiss Microscopy GmbH
49	G 365	FT 395	BP 445/50	Carl Zeiss Microscopy GmbH
46	BP 500/20	FT 515	BP 535/30	Carl Zeiss Microscopy GmbH
45	BP 560/40	FT 585	BP 630/75	Carl Zeiss Microscopy GmbH

## 2.6 Genexpressionsprofil-Analyse (GEP)

Zur Analyse der Genexpression wurde eine Genexpressionsanalyse (engl. *Gene Expression Profiling* (GEP)) vorgenommen. Hierbei wurde das EdgeSeq-System der Firma HTG Molecular verwendet, das einen quantitativen Nuclease-Schutz-Assay (engl. *quantitative Nuclease Protection Assay* (qNPA)) nutzt, um in Kombination mit Next-Generation Sequencing (NGS) eine semiquantitative Genexpressionsanalyse zu erstellen. Mit dem HTG EdgeSeq DLBCL Cell of Origin Assay kann die Expression von 92 Genen untersucht werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. (Streich et al., 2023)

Für die GEP-Analyse wurden neben dem HTG EdgeSeq DLBCL Cell of Origin Assay folgende Kits und Reagenzien verwendet:

- OneTaq Hot Start 2X Master Mix with GC Buffer (New England BioLabs GmbH)
- KAPA Library Quantification Kit Ion/Universal (KAPA Biosystems)
- AMPure XP (Beckman Coulter GmbH)

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben der Firmen HTG Molecular und KAPA Biosystems. (Streich et al., 2023)

### 2.6.1 Vorbereitung

Für die Analyse des Genexpressionsprofils wurden 5 µm dicke Leerschnitte von den FFPE-Blöcken angefertigt. Diese wurden auf SuperFrost Plus Objektträger (R. Langenbrinck GmbH) aufgezogen. Außerdem wurde ein HE-Schnitt mit einem Facharzt für Pathologie mikroskopiert und die Zielregion für die GEP-Analyse markiert. (Streich et al., 2023)

### 2.6.2 Makrodissektion, Zellyse und Proteinverdau

Um das Genexpressionsprofil nur aus dem Tumorgewebe zu erstellen und um das Hintergrundrauschen durch anderes Gewebe möglichst gering zu halten, wurde das Gewebe auf dem Leerschnitt im zuvor eingezeichneten Bereich makrodisseziert. Nach Zellyse und Proteinverdau nach Herstellerangaben wurden die Proben entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C bis zur weiteren Analyse asserviert. (Streich et al., 2023)

### **2.6.3 Target-Protection mittels HTG EdgeSeq System**

Nach der Zellyse und dem Proteinverdau wurden an die Ziel-mRNAs zielgerichtete Nuklease-Schutzsonden gebunden. Anschließend wurden ungebundene mRNAs sowie überschüssige Sonden durch eine S1-Nuklease abgebaut. Im nächsten Schritt wurden die Sonden/mRNA-Duplexe durch Denaturierung getrennt und die freigewordene mRNA abgebaut, sodass nur noch die ehemals gebundenen Sonden vorhanden waren. (Streich et al., 2023)

### **2.6.4 Library-Amplifikation**

Nachdem die Sonden der Zielgene im HTG EdgeSeq System isoliert worden waren, wurden die einzelnen Proben mit einem jeweils individuellen molekularen Barcode (BC), einer spezifischen Basenabfolge, markiert, um später die Analyse und Zuordnung in den Sequenzdaten zu ermöglichen. Die Amplifikation, das Labeln mit einem probenspezifischen Barcode und das Hinzufügen der Sequenzier-Adapter erfolgte in einem PCR-Ansatz nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die Proben mit einer AMPure XP-basierten Aufreinigung aufgereinigt. (Streich et al., 2023)

### **2.6.5 Quantifizierung und Normalisierung**

Im Anschluss wurde die Konzentration der PCR-Produkte im LightCycler 480 qPCR-Gerät (Roche Molecular Systems) gemessen. Hierzu wurde das KAPA Library Quantification Kit Ion/Universal (KAPA Biosystems) verwendet. Anschließend erfolgte das Library-Pooling nach Herstellerangaben. (Streich et al., 2023)

### **2.6.6 Sequenzierung**

Nachdem die Proben gepoolt worden waren, erfolgte eine klonale Amplifikation sowie die Beladung des Sequenzier-Chips im Ion Chef Instrument (Thermo Fisher Scientific). Die anschließende NGS-Sequenzierung erfolgte im Ion GeneStudio S5 Prime (Thermo Fisher Scientific). Der Sequenzier-Laufplan wurde nach Herstellerangaben der Firma HTG Molecular erstellt. (Streich et al., 2023)

### **2.6.7 Analyse und Auswertung**

Nach Abschluss der Sequenzierung im Ion GeneStudio S5 erfolgte einerseits die semi-automatische Auswertung der Genexpression mittels des Daten-Parsing-Systems von HTG Molecular. Durch die Analyse der Genexpressionslevel wurde dadurch auf den Subtyp (ABC, GCB, UNC) zurückgeschlossen. Andererseits erfolgte eine manuelle Auswertung der durch den Parser generierten Rohdaten. Hierzu erfolgte zunächst eine Datenaufbereitung in Microsoft Excel Version 2107 (Bestandteil von Microsoft Office 365 ProPlus, Microsoft Corporation). Anschließend wurden die vorbereiteten Daten in R Studio Version 4.2.2 mittels eines *Quantile Normalization*-Algorithmus normalisiert (Bolstad et al., 2003), um anschließend verschiedenen statistischen Tests unterzogen zu werden (siehe hierzu auch Kapitel 2.12). (Streich et al., 2023)

## **2.7 DNA-Extraktion**

Um die DNA weiteren molekularpathologischen Untersuchungen zugänglich zu machen, musste sie zunächst aus dem FFPE-Material extrahiert und aufgereinigt werden.

### **2.7.1 Vorbereitung**

Von den FFPE-Blöcken wurden 5 µm dicke Leerschnitte angefertigt. Wenn im betreffenden Block annähernd ausschließlich Tumorgewebe vorhanden war, wurde der Schnitt nicht auf einen Objektträger aufgezogen, sondern direkt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bei Fällen, bei denen neben dem Tumorgewebe auch anderes Gewebe auf dem Block vorhanden war, wurde ein herkömmlicher Leerschnitt auf einem Objektträger mit positiver Oberflächenladung erstellt.

### **2.7.2 Makrodissektion**

Die zuvor auf Objektträger aufgezogenen Fälle wurden zunächst in zwei aufeinanderfolgenden Xylobädern entparaffiniert. Im Anschluss daran wurde mit einem Skalpell das zuvor festgelegte Zielgewebe vom Objektträger makrodisseziert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 180 µl Inkubationspuffer (enthalten im Maxwell FFPE Plus DNA Purification Kit, Promega GmbH) vorgelegt worden waren. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß kurz gevortext und zentrifugiert. Bei den

bereits in Reaktionsgefäßen vorliegenden Schnitten wurden in diesem Schritt ebenfalls 180 µl Inkubationspuffer zugegeben.

### **2.7.3 DNA-Extraktion und -Aufreinigung**

Alle für die DNA-Extraktion verwendeten Reagenzien stammen aus dem Maxwell FFPE Plus DNA Purification Kit (Promega GmbH).

Für den Proteinverdau wurden 20 µl Proteinase K zugegeben und die Probe anschließend bei 70 °C für 18 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurden 400 µl Lysepuffer hinzugefügt und die Probe anschließend kurz gevortext und zentrifugiert. Nachdem das Maxwell RSC Instrument (Promega GmbH) mit den Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und den Proben bestückt worden war, wurde der automatisierte Lauf gestartet. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit der isolierten DNA in eine Magnetplatte platziert und wenige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die magnetischen Partikel mit den anhaftenden Verunreinigungen zu einem Pellet zu formen. Der flüssige Überstand, welcher die isolierte DNA enthielt, wurde im Anschluss in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren. (Streich et al., 2023)

## **2.8 DNA-Quantifizierung**

Die zuvor extrahierte DNA wurde nun mittels zwei Methoden quantifiziert. Zunächst wurde eine Quantifizierung im NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Da für die nachfolgende Sequenzierung nur die doppelsträngige DNA von Bedeutung ist, wurde eine weitere Messung mit dem sensitiveren Qubit 3 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Hierbei erfolgte die Messung unter Verwendung des Qubit dsDNA HS Assay Kits und des Qubit dsDNA BR Assay Kits (beide Thermo Fisher Scientific). Beide Methoden sind für die Anwendung in einem NGS-Workflow etabliert, wobei das NanoDrop-Verfahren jedoch tendenziell höhere Werte der DNA-Konzentrationen liefert (Masago et al., 2021). (Streich et al., 2023)

### **2.8.1 Quantifizierung mit dem NanoDrop 2000-System**

Im NanoDrop-Photometer wird das Absorptionsverhalten der zu messenden Lösung untersucht. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass DNA ein Absorptionsmaximum bei

260 nm hat, und mögliche Verunreinigungen wie Proteine andere Absorptionsmaxima besitzen (Gallagher und Desjardins, 2006, Gill und von Hippel, 1989). Zur Messung wurde die mitgelieferte NanoDrop-Software in der Einstellung „Nucleic Acid“ verwendet. Am Beginn einer Messreihe wurde ein Nullwert-Abgleich mit 1 µl ddH<sub>2</sub>O durchgeführt. Nach erfolgter Kalibrierung wurde jeweils 1 µl der zu messenden Probe in das Gerät gegeben und der Extinktionswert gemessen. Nach erfolgter Messung wurde das Gerät mit ddH<sub>2</sub>O gereinigt und die Messung einer weiteren Probe konnte begonnen werden. (Streich et al., 2023)

### **2.8.2 Quantifizierung mit dem Qubit 3.0 Fluorometer**

Zunächst wurde das System mit den mitgelieferten Standard-Lösungen nach Herstellerangaben kalibriert. Das Qubit dsDNA HS-Reagenz wurde lichtgeschützt aufgetaut, um mögliche Verfälschungen des Fluoreszenzverhaltens durch Tageslicht bzw. UV-Strahlung zu vermeiden. Alle Arbeitsschritte erfolgten ebenfalls bei möglichst wenig Licht. Anschließend wurde für jede zu messende Probe 1 µl Qubit dsDNA HS-Reagenz mit 199 µl Qubit dsDNA HS Puffer zur Working Solution verdünnt und gevortext. Von den erhaltenen 200 µl der Working Solution wurden 199 µl mit 1 µl der zu messenden Probe vermischt und gevortext. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Kalibrierung des Qubit 3.0 Fluorometers (s.o.) wurde das Programm „DNA“ in der Einstellung „dsDNA High Sensitivity“ ausgewählt und die Proben analysiert. Wenn eine Konzentration festgestellt wurde, die für das Gerät über der oberen Messgrenze lag, wurden die beschriebenen Arbeitsschritte unter Verwendung des Qubit dsDNA BR-Reagenz wiederholt, welches ein größeres Messintervall zulässt. Bei zu niedrigen Konzentrationen wurde die Probe für ca. 10 Minuten unter Vakuum bei 45 °C eingedampft, bis sich das Volumen halbiert hatte. Anschließend wurde die Probe erneut wie beschrieben vorbereitet und mit dem Qubit dsDNA HS-Reagenz gemessen. (Streich et al., 2023)

## **2.9 PCR und Gelelektrophorese zur Evaluierung der DNA-Qualität**

DNA in FFPE-Material neigt nach einiger Zeit zur Fragmentierung, welche die Amplifizierbarkeit und damit die Sequenzierbarkeit negativ beeinflussen kann (Kresse et

al., 2018, Nguyen et al., 2022). Um Aussagen über die Qualität und Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA zu ermöglichen, wurde im Anschluss an die Quantifizierung eine Qualitäts-PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für die PCR wurde das AmpliTaq Gold DNA Polymerase with Gold Buffer and MgCl<sub>2</sub> Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Pro Probe wurde folgender Reaktionsansatz erstellt:

- 16,8 µl ddH<sub>2</sub>O
- 1,5 µl GeneAmp 10X Gold Buffer II (ohne MgCl<sub>2</sub>) (Thermo Fisher Scientific)
- 2 µl 25 mM Magnesiumchlorid (Thermo Fisher Scientific)
- 0,5 µl 10 mM dNTPs (Thermo Fisher Scientific)
- 2 µl Primermix (Sigma-Aldrich)

Im Primermix waren Primer für Produktlängen von 100 bis 600 bp enthalten (vgl. Abschnitt 2.1.6 und Van Dongen et al. (2003)).

Nach Zugabe von 50 ng DNA wurde diese im Thermocycler nach folgendem Schema amplifiziert:

- 95 °C für 7 Minuten
- 35 Zyklen von
  - 95 °C für 45 Sekunden
  - 60 °C für 45 Sekunden
  - 72 °C für 1 Minute
- 72 °C für 4 Minuten
- 10 °C Haltetemperatur

Wenn die PCR-Produkte nicht direkt auf das Agarosegel zur elektrophoretischen Auftrennung geladen wurden, wurden sie bei -20 °C asserviert.

Für das Agarosegel wurden 2 g LE-Agarose (Biozym) mit 100 ml TBE-Puffer (selbst hergestellt, Edukte siehe Abschnitt 2.1.8) für 2-4 Minuten gekocht, bis die Flüssigkeit komplett klar war. Anschließend wurde sie unter ständigem Rühren für 3 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt, bevor 7 µl GelRed (Biotium) zugegeben wurden. Das Gel wurde anschließend gegossen und härtete für mindestens 30 Minuten aus. Wenn das Gel nicht direkt verwendet wurde, wurde es bei 4 °C gelagert.

In die erste Geltasche wurden 10 µl 100 bp Ladder (Thermo Fisher Scientific) gegeben. Pro Probe wurden 2 µl Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) auf einem Streifen Parafilm vorgelegt, und anschließend mit jeweils 10 µl Probe gemischt, bevor das

Gemisch in die Geltaschen überführt wurde. Bei 160 Volt wurden die Amplifikate der Größe nach für 15-30 Minuten aufgetrennt; entscheidend für die genau Elektrophoresendauer war die optisch ersichtliche Auftrennung im Gel. Die Gele wurden unter UV-Licht mit Hilfe der Software BioCapt (Vilber Lourmat Deutschland GmbH) fotografisch dokumentiert und anschließend ausgewertet. Anhand der Länge der DNA-Amplifikate konnten hiermit Aussagen über die Amplifizierbarkeit in der nachfolgenden Sequenzierung getroffen werden. Als optimal wurden Fragmentlängen von 300 Basenpaaren und länger angesehen. Proben mit Fragmentlängen von 200 Basenpaaren und kürzer wurden ebenfalls mittels NGS sequenziert, allerdings wurden die Sequenzen in der Auswertung auf Grund der stärkeren Degradierung des Ausgangsmaterials verstärkt überprüft und ggf. auf Grund des Artefaktreichtums ausgeschlossen.

## 2.10 Next Generation Sequencing (NGS)-Panel-Sequenzierung

Zum Nachweis von genetischen Alterationen auf DNA-Ebene wurde eine DNA-Sequenzierung mittels Halbleitersequenzierung durchgeführt. Hierfür wurde das Ion Gene Studio S5 Prime (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Für die NGS-Panel-Analyse wurde das Ion AmpliSeq Custom DLBCL Panel (Thermo Fisher Scientific) verwendet, das mit dem Ion AmpliSeq Designer (Thermo Fisher Scientific) erstellt worden war. Die im Panel abgedeckten Gene mit entsprechenden Genloci sind Tabelle 15 zu entnehmen. (Streich et al., 2023)

Tabelle 15: AmpliSeq Custom DLBCL Panel. Dargestellt sind die enthaltenen Gene mit den entsprechenden abgedeckten Bereichen sowie die Anzahl an Amplikons pro Genlocus. Die Amplikonlänge liegt zwischen 125 und 175 Basenpaaren (bp). CDS (%) bezeichnet die Abdeckung der kodierenden Sequenz in Prozent. Die Abdeckung des Panels liegt insgesamt bei 94,23 %. Insgesamt enthält das Panel 193 Amplikons, davon 98 in Pool 1 und 95 in Pool 2.

Gen	Transkript	Position (GRCh37/hg19)	Exon(s)	Amplikons	CDS (%)
<b>EZH2</b>	NM_004456	chr7:148,508,712 - chr7:148,508,789	16	1	-
<b>CD79B</b>	NM_001039933	chr17:62,006,789 - chr17:62,006,840	5	1	-
		chr17:62,006,586 - chr17:62,006,654	6	1	-
<b>MYD88</b>	NM_002468	chr3:38,181,874 - chr3:38,182,064	3	4	-

Gen	Transkript	Position (GRCh37/hg19)	Exon(s)	Amplikons	CDS (%)
		chr3:38,182,243 - chr3:38,182,344	4	2	-
		chr3:38,182,618 - chr3:38,182,726	5	2	-
<b>CARD11</b>	NM_032415	chr7:2,946,272 - chr7:2,998,140	CDS	54	95,30
<b>IRF4</b>	NM_002460	chr6:393,153 - chr6:407,598	CDS	18	95,61
<b>BCL2</b>	NM_000633	chr18:60,795,858 - chr18:60,985,899	CDS	9	95,86
<b>TNFAIP3</b>	NM_006290	chr6:138,192,365 - chr6:138,202,456	CDS	29	96,49
<b>PRDM1</b>	NM_001198	chr6:106,534,429 - chr6:106,555,361	CDS	29	91,66
<b>BCL6</b>	NM_001706	chr3:187,440,246 - chr3:187,451,481	CDS	27	92,14
<b>PIM1</b>	NM_002648	chr6:37,138,352 - chr6:37,141,867	CDS	16	90,98

### 2.10.1 DNA-Amplifikation

Die DNA wurde mit Panel-spezifischen Primern mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction* (PCR)) amplifiziert. Hierfür wurde das Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Pro Fall wurden jeweils zwei 200 µl Reaktionsgefäße für 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurde in jedes Reaktionsgefäß folgende Reagenzien bzw. Probenmaterial gegeben:

- 4 µl 5X Ion AmpliSeq HiFi Mix Plus (enthalten im Ion AmpliSeq Library Kit 2.0)
- 10 µl 2X Ion AmpliSeq Primer Pool 1 bzw. 2 (Thermo Fisher Scientific)
- 10 ng DNA (Volumen variiert je nach ermittelter Konzentration, jedoch nicht mehr als 6 µl)
- mit ddH<sub>2</sub>O Gesamtvolumen auf 20 µl auffüllen

Die so vorbereiteten PCR-Pools wurden nun nach folgendem Schema im Eppendorf Mastercycler Nexus GX2 (Eppendorf AG) amplifiziert:

- 99 °C für 2 Minuten

- 23 Zyklen von
  - o 99 °C für 15 Sekunden
  - o 60 °C für 4 Minuten
- 10 °C Haltetemperatur

Wenn die PCR-Produkte nicht direkt verwendet wurden, wurden sie bei -20 °C asserviert. (Streich et al., 2023)

### **2.10.2 Enzymatischer Primerverdau an den Amplikons**

In jedes PCR-Reaktionsgefäß wurden nun 2 µl FuPa Exonuklease (enthalten im Ion AmpliSeq Library Kit 2.0) für den Anverdau der PCR-Primer gegeben. Der Verdau fand im Eppendorf Mastercycler Nexus GX2 (Fisher Scientific GmbH) mit folgendem Programm statt (Streich et al., 2023):

- 50 °C für 10 Minuten
- 55 °C für 10 Minuten
- 60 °C für 20 Minuten
- 10 °C für bis zu 60 Minuten

### **2.10.3 Adapterligation**

Um später die Sequenzdaten den einzelnen Proben zuordnen zu können, wurde jeder Probe ein individueller Barcode zugeordnet sowie weitere Sequenzier-Adapter an die Amplifikate mittels PCR hinzugefügt. Der hierzu benötigte Barcodemix wurde aus 2 µl Ion P1 Adapter (Thermo Fisher Scientific), 2 µl Ion Xpress Barcode (Thermo Fisher Scientific) und 4 µl ddH<sub>2</sub>O angesetzt. Anschließend wurden zu jeder Probe 4 µl Switch Solution (enthalten im Ion AmpliSeq Library Kit 2.0) und 2 µl DNA-Ligase (enthalten im Ion AmpliSeq Library Kit 2.0) gegeben, bevor jeweils 2 µl der individuellen Barcodemixes (enthalten im Ion Express Barcode Adaptors 1-96 Kit, Thermo Fisher Scientific) hinzugegeben wurden. Die anschließende Adapterligation erfolgte im Eppendorf Mastercycler Nexus GX2 (Fisher Scientific GmbH) nach folgendem Protokoll:

- 22 °C für 30 Minuten
- 72 °C für 10 Minuten
- 10 °C für bis zu 60 Minuten

Die mit den Barcodes ligierten Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert. (Streich et al., 2023)

### **2.10.4 Library-Aufreinigung**

Die Proben wurden anschließend mit dem HighPrep PCR Clean-up System (MagBio Genomics Inc.) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte in Anlehnung an das Herstellerprotokoll. Dazu wurden 30 µl Library und 54 µl HighPrep in bestrahlte 200 µl Reaktionsgefäße gegeben. Nach einer Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben für zwei Minuten in der DynaMag-96 Side Magnet Plate (Thermo Fisher Scientific) inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, und anschließend wurden 200 µl 80 % Ethanol zugegeben. Nach einer Inkubationsphase von 30 Sekunden wurde das Ethanol entfernt und erneut 200 µl Ethanol zugegeben. Nach einer weiteren 30-sekündigen Inkubationsphase wurde das Ethanol abermals entfernt und die Beads wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden 35 µl Low TE-Puffer (enthalten im Ion AmpliSeq Library Kit 2.0) zu den trockenen Beads gegeben und diese vollständig resuspendiert. Nach einer Inkubationsphase von zwei Minuten wurde der Überstand in neue 200 µl Reaktionsgefäße überführt. Die gesamte Aufreinigung wurde ein weiteres Mal wiederholt, im zweiten Durchlauf wurden 35 µl Low TE-Puffer verwendet, damit in den zu entnehmenden 30 µl Überstand keine Beads enthalten waren. Diese 30 µl wurden erneut in neue 200 µl Reaktionsgefäße gegeben. Diese wurden bei Weiterverarbeitung am selben Tag bei 4 °C, für die längere Asservierung bei -20 °C gelagert. (Streich et al., 2023)

### **2.10.5 Library-Quantifizierung**

Die aufgereinigten Libraries wurden im nächsten Schritt mittels quantitativer PCR (qPCR) quantifiziert. Dazu wurde eine UV-bestrahlte LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche Molecular Systems) verwendet. Die Reagenzien und Standards entstammen dem Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific). Pro Library-Pool wurden Duplikate angefertigt, außerdem wurden 6 Wells mit E. coli DH10B Control Library-Standards und zwei Wells mit ddH<sub>2</sub>O als Negativkontrolle genutzt. Die E. coli DH10B Control Library wurde auf drei Standard-Konzentrationen von 6,8 pM, 0,68 pM und 0,068 pM eingestellt. In die ermittelte Anzahl an Wells wurden jeweils 5 µl Ion Library qPCR Master Mix sowie 0,5 µl Ion Library TaqMan Quantitation Assay vorgelegt. Anschließend wurden jeweils entweder 4,5 µl Standard, ddH<sub>2</sub>O oder 1:500 verdünnte

Library zugegeben. Die so vorbereitete qPCR-Platte wurde anschließend im LightCycler® 480 (Roche Molecular Systems) nach folgendem Protokoll analysiert:

- 50 °C für 2 Minuten
- 95 °C für 20 Sekunden
- 40 Zyklen von
  - 95 °C für 3 Sekunden
  - 60 °C für 30 Sekunden
  - Fluoreszenz-Messung

Die so ermittelten Cp-Werte wurden mittels der Standard-Konzentrationen in Konzentrationen in pM umgerechnet. Diese Werte waren die Grundlage für das anschließende Library-Pooling. (Streich et al., 2023)

### **2.10.6 Library-Pooling und Sequenzierung**

Nach Abschluss der Quantifizierung wurden die aufgereinigten Libraries der verschiedenen Proben so vermischt („gepoolt“), dass von jeder Probe die gleiche Menge DNA im Pool enthalten war. Hierzu wurde jede Probe auf eine Konzentration von 27,5 pM verdünnt und anschließend in gleichen Anteilen gepoolt, sodass auch der Library-Pool eine Konzentration von 27,5 pM hatte. Anschließend folgte zur Signalverstärkung eine klonale Amplifikation der generierten Library an sog. *Ion Sphere Particels* (ISPs) sowie die Beladung des Sequenzier-Chips (Ion 520 bzw. 530 Chips (enthalten im entsprechenden Ion Chip Kit, Thermo Fisher Scientific) im Ion Chef Instrument (Thermo Fisher Scientific). Die Proben auf dem so vorbereiteten Chip wurden anschließend im Ion GeneStudio S5 Prime (Thermo Fisher Scientific) sequenziert. (Streich et al., 2023)

### **2.10.7 Analyse und Auswertung**

Nach Abschluss der Sequenzierung wurden die Sequenzier-Rohdaten aus der Ion Torrent Software in die Ion Reporter Software (beide Thermo Fisher Scientific) geladen. Diese analysierte die Daten nach Einstellung der zu untersuchenden Genbereiche und lieferte pro Fall eine Tabelle mit allen detektierten Abweichungen zum Referenzgenom (hg19). In dieser Tabelle wurden nun alle Varianten außerhalb von Exons und Spliceseiten, alle synonymen Veränderungen und alle bereits bekannten SNPs ausgeschlossen. Für die Analyse wurde ein Cutoff der Allelfrequenz von größer/gleich 5 % gesetzt, in einigen Fällen wurde aufgrund einer schlechten Qualität der eingesetzten

DNA in Absprache mit einer erfahrenen wissenschaftlichen Mitarbeiterin ein höherer Cutoff-Wert der Allelfrequenz von bis zu 7 % festgelegt. Alle Varianten, die mit einer geringeren Frequenz auftraten, wurden nicht analysiert. Außerdem wurden Genbereiche, welche mit weniger als 100 Kopien abgedeckt waren, nicht gewertet, da die Abdeckung zu gering für eine valide Aussage war. Die nun noch bestehenden Einträge wurden zunächst auf Plausibilität und Richtigkeit im Integrative Genomics Viewer (Broad Institute, University of California) überprüft. Anschließend wurden eventuell vorhandene Panelartefakte entfernt, bevor die noch verbliebenen Alterationen mit den folgenden Datenbanken abgeglichen wurden:

- COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, zuletzt aufgerufen am 07.01.2023
- Varsome, erreichbar unter <https://varsome.com>, zuletzt aufgerufen am 07.01.2023
- Reference SNP (rs) Report der U.S. National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>, zuletzt aufgerufen am 07.01.2023
- OncoKB des Memorial Sloan Kettering Cancer Center, <https://www.oncokb.org>, zuletzt aufgerufen am 07.01.2023
- CADD (Combined Annotation Dependent Depletion) der University of Washington, des Hudson-Alpha Institute for Biotechnology und des Berlin Institute of Health, <https://cadd.gs.washington.edu>, zuletzt aufgerufen am 07.01.2023
- Ensembl genome browser 99, <https://www.ensembl.org/index.html>, zuletzt aufgerufen am 07.01.2023
- Exome Variant Server des NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), <https://www.ensembl.org/index.html>, zuletzt aufgerufen am 07.01.2023
- gnomAD (Genome Aggregation Database), <https://gnomad.broadinstitute.org>, zuletzt aufgerufen am 07.01.2023

Jede Variante wurde in Zusammenschau aller Datenbankeinträge und Vergleichswerte aus früheren Analysen mit einer erfahrenen wissenschaftlichen Mitarbeiterin diskutiert und bewertet und entweder als echte Variante bewertet, zur genaueren Untersuchung fraglich valider Varianten eine Einzelamplikon-Analyse durchgeführt (siehe 2.11) oder die Variante als Artefakt exkludiert. (Streich et al., 2023)

## 2.11 Einzelamplikon (EA)-Erstellung

Zur Bestätigung von fraglich validen Mutationen, zur Erhöhung der Abdeckung der Genloci und zum Ausschluss von Panelartefakten wurde bei einigen genetischen Alterationen eine Ergebnisvalidierung mittels Einzelamplikon vorgenommen. Hierzu wurden Einzelamplikons gemäß der Ion Amplicon Library Preparation Fusion Method (Thermo Fisher Scientific) erstellt. Die verwendeten Amplikons sind Tabelle 9 zu entnehmen. Die benötigten Primer wurden mittels der Primer3-Software (Whitehead Institute for Biomedical Research) generiert und anschließend entsprechend dieser Daten von Sigma-Aldrich hergestellt. (Streich et al., 2023)

### 2.11.1 Verdünnung der Primer

Zunächst wurden Forward- und Reverse-Primer auf eine Konzentration von jeweils 10 pM verdünnt. Für den Primer-Mix 1 wurden anschließend der verdünnte Forward-Primer sowie der Reverse-trP1-Primer im Verhältnis 1:1 gemischt. Für den Primer-Mix 2 wurde entsprechend mit dem Reverse-Primer und dem Forward-trP1-Primer verfahren. (Streich et al., 2023)

### 2.11.2 Reaktionsansatz

Für eine Einzelamplikonerstellung wurden zwei 200 µl Reaktionsgefäße für 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurde in jedes Reaktionsgefäß 22,5 µl Invitrogen Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Thermo Fisher Scientific) gegeben. Danach wurden 0,5 µl des Primer-Mixes 1 in das erste Reaktionsgefäß und 0,5 µl des Primer-Mixes 2 in das zweite Reaktionsgefäß gegeben. Zu diesen Ansätzen wurden je 25 ng, jedoch nicht mehr als 8 µl, extrahierte DNA hinzugefügt. (Streich et al., 2023)

### **2.11.3 Amplifikation**

Die Amplifikation erfolgte im Eppendorf Mastercycler Nexus GX2 (Fisher Scientific GmbH) nach folgendem Protokoll (Streich et al., 2023):

- 94 °C für 3 Minuten
- 40 Zyklen:
  - 94 °C für 30 Sekunden
  - 58 °C für 30 Sekunden
  - 68 °C für 1 Minute
- 16 °C Haltetemperatur

### **2.11.4 Aufreinigung**

Anschließend erfolgte eine HighPrep-basierte (MagBio Genomics Inc.) Aufreinigung (vgl. dazu Kapitel 2.10.4, S. 57). Im Gegensatz zur oben erwähnten Aufreinigung erfolgte bei der Aufreinigung der Einzelamplikons nur die einmalige Zugabe der HighPrep-Beads. (Streich et al., 2023)

### **2.11.5 Quantifizierung, Pooling und Sequenzierung**

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden nun mit dem Qubit 3 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) mit dem zugehörigen dsDNA HS Assay Kit nach Herstellerangaben photometrisch quantifiziert. Anhand der gemessenen Konzentration wurde eine 5 pM-Verdünnung hergestellt, die als Edukt für das Chip-Pooling sowie die anschließende Sequenzierung (vergleiche Kapitel 2.10.6, S. 58) verwendet wurde. (Streich et al., 2023)

### **2.11.6 Analyse und Auswertung**

Nach erfolgter Sequenzierung wurden die Sequenzdaten im Integrative Genomics Viewer (Broad Institute, University of California) analysiert und unter Berücksichtigung der in Kapitel 2.10.7, S. 58 beschriebenen Datenbanken bewertet. (Streich et al., 2023)

## **2.12 Statistische Auswertung**

Die statistischen Analysen wurden mit R in Verbindung mit RStudio Desktop, Version 2022.12.0+353 (Posit Software, PBC formerly RStudio, PBC) sowie IBM SPSS

## Material und Methoden

Statistics, Version 28 für Microsoft Windows (IBM Deutschland GmbH) durchgeführt. Alle statistischen Analysen waren, soweit nicht explizit anders beschrieben, zweiseitig. Statistische Signifikanz wurde für p-Werte  $< 0,05$  angenommen. Für die Signifikanztests wurde bei unabhängigen Stichproben auf der Nominalskala der Chi-Quadrat-Test verwendet. Für ordinalskalierte und/oder nicht-normalverteilte intervallskalierte Daten wurde bei genau zwei unabhängigen Stichproben der Mann-Whitney U-Test, bei mehr als zwei Stichproben der Kruskal-Wallis-Test verwendet. (Streich et al., 2023)

### 3 Ergebnisse

Die Recherche in der Datenbank des Instituts für Pathologie und Neuropathologie am Universitätsklinikum Tübingen ergab in der Zeit von 2002 bis 2020 insgesamt 30 Fälle von großzelligen B-Zell-Lymphomen, lokalisiert in der Tonsille, bei denen qualitativ und quantitativ ausreichendes FFPE-Material vorhanden war, darunter 28 Fälle von DLBCLs sowie zwei Fällen von FL3B/FLBL, siehe auch Abbildung 6.

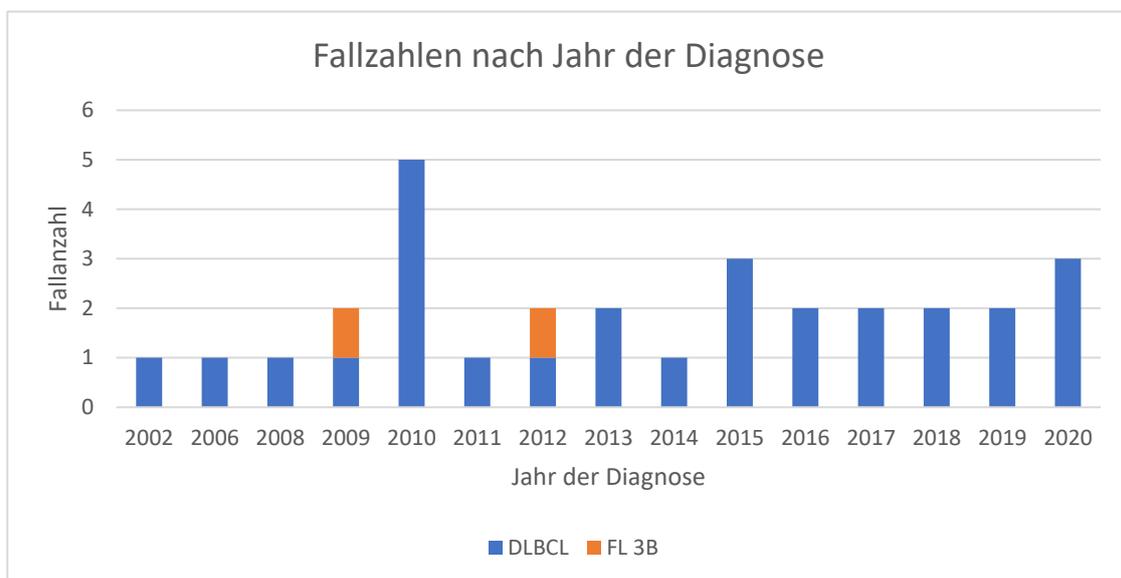


Abbildung 6: Übersicht der Fallzahlen nach Jahr der Diagnose. Pro Jahr wurden zwischen einem und fünf Fälle eingeschlossen, mit Ausnahme der Jahre 2003 bis 2005 sowie 2007, aus denen keine Fälle eingeschlossen wurden.

Mehr als die Hälfte der eingeschlossenen Fälle stammte aus den Jahren 2013 bis 2020, sodass insgesamt von einer guten Materialqualität für die nachfolgenden Analysen auszugehen war.

### 3.1 Klinisch-pathologische Eigenschaften

#### 3.1.1 Klinische Eigenschaften

Im Studienkollektiv mit insgesamt 30 Fällen waren 18 Fälle (60 %) von weiblichen Patienten, die übrigen 12 Fälle waren männlichen Patienten zuzuordnen. Das mediane Alter bei Diagnosestellung lag bei 69,5 Jahren mit einer Standardabweichung von 14,3 Jahren. Die Altersspanne lag bei 37 bis 87 Jahren. Hierbei betrug das gesamte Durchschnittsalter 65,1 Jahre. Unter den männlichen Patienten war das mediane und das mittlere Alter 61,5 respektive 62,5 Jahre, unter den weiblichen Patienten 70 respektive 66,9 Jahre. (Streich et al., 2023)

In der Gruppe der DLBCLs lag das mittlere bzw. mediane Alter bei 64,4 respektive 66,5 Jahren (SD 14,7), in der Gruppe der FLs Grad 3B bei 75,5 respektive 75,5 Jahren (SD 7,8) (Streich et al., 2023).

Die Altersstruktur des Fallkollektivs ist auch Abbildung 7 zu entnehmen.

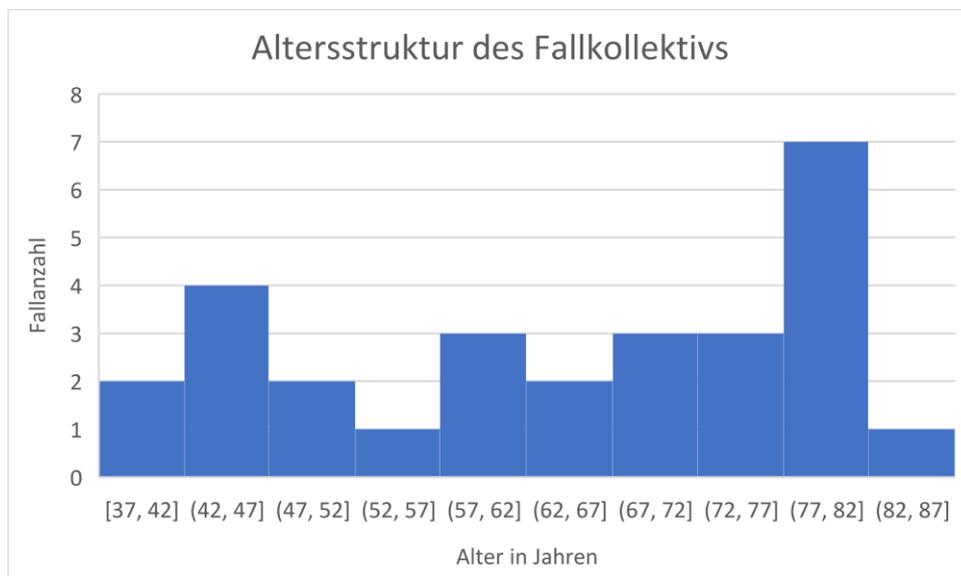


Abbildung 7: Altersstruktur des Fallkollektivs. Die 30 eingeschlossenen Patienten waren zwischen 37 und 87 Jahren alt, mit einem Überwiegen älterer Patienten.

Von insgesamt 23/30 Patienten waren Daten zum klinischen Verlauf verfügbar (Streich et al., 2023). Erhobene Daten waren das klinische Stadium nach Ann-Arbor von I bis IV mit den Zusätzen A/B/E, der *International Prognostic Index* (IPI), Angaben zur Therapie

## Ergebnisse

sowie zum Therapieansprechen und eventuellen Residualtumoren oder Rezidiven, und weiterhin Daten des klinischen Follow-ups. In einigen Fällen waren in einzelnen der genannten Kategorien keine Daten verfügbar. Angaben zum klinischen Stadium waren bei 23/30 Patienten verfügbar, der IPI bei 20/30 Patienten, Angaben zur Therapie bei 23/30, Angaben zum Therapieansprechen oder Rezidiven bei 18/30 und Angaben zum Follow-up bei 22/30 Patienten (Streich et al., 2023).

Das klinische Stadium nach Ann-Arbor lag zwischen IA und IVB/E, wobei 18 Patienten (18/23, 78 %) einem niedrigen Stadium (I oder II) zuzuordnen waren, während bei fünf Patienten (5/23, 22 %) ein hohes Stadium vorlag (III oder IV) (Streich et al., 2023). In sieben Fällen waren keine Informationen zum klinischen Stadium verfügbar. Nur in einem der beiden Fällen von FL 3B waren klinische Daten verfügbar, sodass eine getrennte Betrachtung der Patienten mit dieser Entität nicht möglich war. Unter den 18 weiblichen Patienten waren in 5 Fällen keine klinischen Daten verfügbar. Von den verbleibenden 13 Fällen waren 11 Fälle (11/13, 85 %) in einem niedrigen Stadium (I oder II), die übrigen 2 Fälle in einem hohen Stadium (III oder IV). Unter den 12 männlichen Patienten waren in 2 Fällen keine klinischen Daten verfügbar. Von den verbleibenden 10 Fällen waren 7 Fälle (7/10, 70 %) in Stadium I oder II, die übrigen 3 Fälle in Stadium III oder IV.

Der internationale prognostische Index IPI war in 20 Fällen verfügbar. In den meisten Fällen war der IPI von der Kategorie LOW (14/20, 70 %), LOW-INTER in drei Fällen (3/20, 15 %), HIGH-INTER in zwei Fällen (2/20, 10 %) und HIGH in einem Fall (1/20, 5 %) (Streich et al., 2023). Von 5 Fällen im Stadium I(A) war in 4 Fällen der IPI verfügbar. Alle bis auf einen Fall waren IPI LOW, der verbleibende Fall war HIGH-INTER. Von 13 Fällen im Stadium II(A/E) war der IPI in 12 Fällen verfügbar. Alle Fälle bis auf einen Fall waren IPI LOW, der verbleibende Fall war LOW-INTER. Beide Fälle des Stadiums III(A) waren IPI LOW-INTER. Von den drei Fällen im Stadium IV(A/B/E) war der IPI in einem Fall HIGH-INTER, in einem Fall HIGH und in einem Fall nicht verfügbar. In Zusammenschau über alle klinischen Stadien hinweg zeigte sich somit ein Zusammenhang zwischen fortgeschrittenem klinischem Stadium und hohem IPI.

Angaben zur Therapie waren bei 23 Patienten verfügbar. Hiervon erhielten 19 Patienten eine R-CHOP-haltige Chemotherapie, wobei bei zwei dieser Patienten eine reduzierte Dosis CHOP appliziert wurde (Streich et al., 2023). Einige der Patienten, die R-CHOP erhielten, erhielten synchron oder metachron weitere Chemotherapien, Bestrahlungen oder Stammzelltransplantationen. Drei weitere Patienten erhielten andere

## Ergebnisse

Chemotherapieschemata: Jeweils ein Patient erhielt Rituximab und Bendamustin (R-B), Rituximab, Cyclophosphamid, liposomales Vincristin und Prednisolon (R-CHLiP) bzw. Thiotepa, Etoposid, Cytarabin und Melphalan (TEAM) (Streich et al., 2023). Ein Patient erhielt keine Therapie (Streich et al., 2023).

Informationen zum Therapieverlauf und zu möglichen Rezidiven waren von 18 Patienten verfügbar. Bei 16 Patienten zeigte sich im Therapieverlauf eine Komplettremission (engl. *complete remission* (CR)), und bei einem weiteren Patienten eine partielle Remission (engl. *partial remission* (PR)) (Streich et al., 2023). Ein Patient zeigte trotz Therapie ein Rezidiv nach initialem Therapieansprechen (engl. *relapse* (REL)), nach erneuter Therapie war auch in diesem Fall eine Komplettremission nachweisbar (Streich et al., 2023).

Von 22 Patienten waren Daten eines klinischen Follow-ups verfügbar. Die mittlere Follow-up-Dauer betrug hierbei 55,0 Monate mit einer Spanne von einem bis zu 125 Monaten. (Streich et al., 2023)

Die klinischen Daten sind in Tabelle 16, S. 67f. zusammengefasst.

## Ergebnisse

Tabelle 16: Übersicht der klinischen Daten.

#	G	A	Diagnose	Stadium	IPI	Therapie	R/R	Follow-up
1	F	44	DLBCL	NA	NA	NA	NA	NA
2	F	45	DLBCL	IIA	Low	6x R-CHOP	CR	125 mo NED
5	F	81	FL 3B	NA	NA	NA	NA	NA
6	F	64	DLBCL	II	Low-inter	MAIN 6x R-CHOP 6x R	CR	61 mo NED
7	F	79	DLBCL	NA	NA	NA	NA	NA
8	F	57	DLBCL	IIA/E	Low	6x R-CHOP	CR	120 mo NED
9	F	70	FL 3B	IIE	Low	6x R-CHOP	CR	98 mo NED
10	F	69	DLBCL	IIA/E	Low	1x R-CHOP	NA	LFU
11	M	52	DLBCL	II	Low	6x R-CHOP	CR	84 mo NED
13 §	F	78	DLBCL	II	Low	4x R-CHOP	CR	97 mo NED
15	M	47	DLBCL	IA	Low	4x R-CHOP 2x R	CR	72 mo NED
16	M	78	DLBCL	IIA	Low	4x R-CHOP 4x R	CR	53 mo NED
17	F	79	DLBCL	IIA	Low	6x R-CHOP 2x R	CR	58 mo NED
19	F	87	DLBCL	IV	NA	Keine Therapie	-	1 mo DOD
20	F	78	DLBCL	NA	NA	NA	NA	NA
21	M	52	DLBCL	III	Low-inter	8x R-CHOP 8x R R-BEAM SCT	REL	NA
22	F	47	DLBCL	IIA	Low	4x R-CHOP RTX 39,6 Gy	CR	45 mo NED
23	F	74	DLBCL	IVB/E	High	4x R-B	PR	5 mo LFU
24	M	74	DLBCL	IIA/E	Low	6x R-CHOP	CR	65 mo NED

## Ergebnisse

#	G	A	Diagnose	Stadium	IPI	Therapie	R/R	Follow-up
25	F	63	DLBCL	IA	High-inter	6x R-CHOP 2x R MTX	CR	48 mo NED
26	F	70	DLBCL	NA	NA	NA	NA	NA
27	M	62	DLBCL/ FL 3B	IIA	NA	4x R-CHLiP 4x R	CR	48 mo NED
29	M	81	DLBCL	IIIA	Low-inter	1x R-miniCHOP	NA	NA
30	M	71	DLBCL	NA	NA	NA	NA	2 mo LFU
31	F	82	DLBCL	IA	NA	3x R-miniCHOP	NA	2 mo LFU
32	M	61	DLBCL	IVA	High-inter	TEAM SCT	NA	18 mo LFU
33	M	58	DLBCL	I	Low	4x R-CHOP 2x R	CR	17 mo NED
34	M	37	DLBCL	IIA	Low	6x R-CHOP 2x R	CR	51 mo NED
35 §	F	37	DLBCL	IA	Low	6x R-CHOP 2x R	CR	30 mo NED
36	M	77	DLBCL	NA	NA	NA	NA	NA

# = Fallnummer. G = Geschlecht. A = Alter in Jahren bei Diagnose. Stadium = klinisches Stadium nach Ann-Arbor. IPI = Internationaler prognostischer Index. R/R = Therapieansprechen (engl. *Remission/Relapse*). Follow-up = Follow-up-Dauer und Drop-out-Grund. M = männlich (engl. *male*). F = weiblich (engl. *female*). NA = nicht verfügbar (engl. *not available*). NED = kein Hinweis für Krankheitsaktivität (engl. *no evidence of disease*). DOD = verstorben an der Krankheit (engl. *died of disease*). PR = partielle Remission. CR = Komplettremission. REL = Rezidiv (engl. *relapse*).  
Therapieschemata: MAIN: R-CHOP mit oder ohne Bevacizumab (NCT00486759). MTX: Methotrexat. R: Rituximab. R-B: Rituximab, Bendamustin. R-BEAM: Rituximab, Carmustine, Etoposid, Cytarabin, Melphala. R-CHLiP: Rituximab, Cyclophosphamid, liposomales Vincristin, Prednison. R-CHOP: Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison. R-miniCHOP: Rituximab mit dosisreduziertem CHOP. RTX: Radiotherapie. SCT: Stammzelltransplantation. TEAM: Thiotepa, Etoposid, Cytarabin, Melphalan. Tabelle bearbeitet nach Streich et al. (2023).

### 3.1.2 Morphologische Eigenschaften

Von den 30 eingeschlossenen Fällen wurden 28 Fälle als DLBCL, NOS klassifiziert. Diese Fälle zeigten überwiegend eine klassische Morphologie für DLBCLs (siehe auch Abbildung 2 und Abbildung 3). Einer dieser Fälle zeigte eine blastoide Morphologie mit mittelgroßen Zellen, unauffällige Nukleoli und kaum Zytoplasma. Zwei der Fälle zeigten eine klassische Morphologie für FL 3B/FLBL mit mehr als 15 Zentroblasten pro HPF und wenig bis keinen Zentrozyten. (Streich et al., 2023)

### 3.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden im Vier-Augen-Prinzip beurteilt. Eine Expression des entsprechenden Markers in über 30 Prozent, im Fall von MYC in über 40 Prozent, der neoplastischen Zellen wurde als positiv gewertet.

#### **Immunhistochemische Analysen von CD10, BCL6, MUM1**

Alle Fälle wurden anhand des Hans-Algorithmus (Hans et al., 2004) evaluiert (siehe auch Abbildung 8). Für das Antigen CD10 waren 16 Fälle (entsprechend 53 %) der Gesamtkohorte positiv, die übrigen 14 Fälle wurden als negativ bewertet. Unter den negativ gewerteten Fällen war ein Fall (Nr. 15), bei dem sich zwar eine schwache CD10-Expression nachweisen ließ, die jedoch als negativ gewertet wurde, da sie unter dem Grenzwert von 30 % lag und am ehesten auf ein Fixierungsartefakt zurückzuführen war. (Streich et al., 2023)

Bei der Bewertung des immunhistochemischen BCL6-Status zeigten sich unter 28 Fälle positiv, entsprechend einer Rate von 93 %; die übrigen 2 Fälle waren negativ (Streich et al., 2023).

Die MUM1-Expression wurde in 17 Fällen als positiv bewertet, entsprechend einer Rate von 57 %. Die verbleibenden 13 Fälle stellten sich negativ dar (Streich et al., 2023).

Entsprechend der vorangegangenen immunhistochemischen Beurteilung wurden die Fälle primär in die Subtypen GCB und Non-GCB unterteilt (siehe auch Abbildung 2 und Abbildung 3).

Die 16 CD10-positiven Fälle wurden vollständig der GCB-Gruppe zugeordnet. Des Weiteren wurden zwei CD10-negative, BCL6-positive und MUM1-negative Fälle identifiziert, die ebenfalls als GCB gewertet wurden. Somit ergaben sich insgesamt 18 Fälle vom Subtyp eines GCBs, entsprechend 60 % des gesamten Fallkollektivs. Die übrigen 12 CD10-negativen Fälle wurden dem Non-GCB-Subtyp zugeordnet. Hiervon waren 10 Fälle positiv für BCL6 und MUM1, weitere zwei Fälle waren negativ für BCL6. (Streich et al., 2023)

## Ergebnisse

Alle als GCB diagnostizierten Fälle waren durchgängig positiv für BCL6. Währenddessen zeigten insgesamt nur 5 Fälle eine Positivität für MUM1; diese Fälle waren ohne Ausnahme ebenfalls positiv für CD10 sowie BCL6 (s.u.). Kein einziger GCB-Fall zeigte eine Expression von CD10 und MUM1 bei fehlender BCL6-Expression. Im Gegensatz dazu waren alle bis auf zwei GCB-Fälle positiv für CD10 und BCL6. Bei den Non-GCB-Fällen zeigte sich erwartungsgemäß eine durchgehende Negativität für CD10 bei durchgehender Positivität für MUM1 sowie in bis auf zwei Fällen Positivität für BCL6. Fälle mit fehlender Expression aller drei immunhistochemischen Marker (sog. *Triple Negative*) konnten nicht identifiziert werden. Die Verteilung der Fälle nach den immunhistochemischen Ergebnissen ist auch Abbildung 8 zu entnehmen. (Streich et al., 2023)

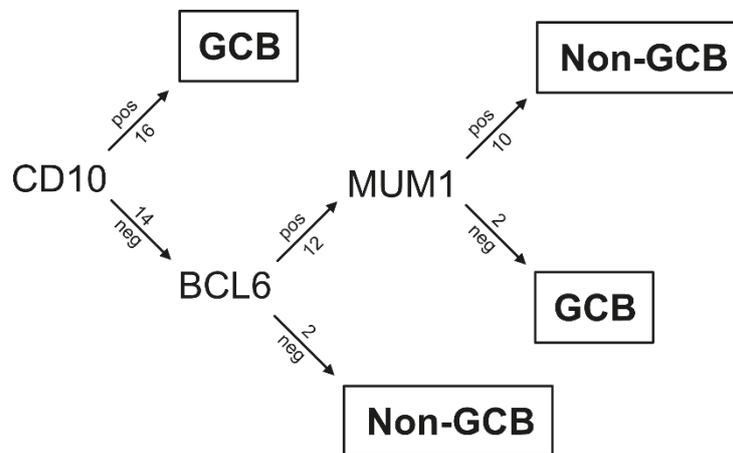


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Hans-Algorithmus mit Angaben der konkreten Fallzahlen aus dem betrachteten Fallkollektiv (Zahlen über bzw. unter den Pfeilen). CD10, BCL6, MUM1 = Immunhistochemische Färbung gegen das entsprechende Antigen; pos, neg = Reaktionsausgang der jeweiligen Immunhistochemie; GCB, Non-GCB = sich aus der Immunhistochemie als Surrogat-Marker für die Genexpression ergebende DLBCL-Subtypen. Abbildung bearbeitet nach Hans et al. (2004).

Betrachtet man die zwei Fälle von FL 3B/FLBL getrennt vom gesamten Fallkollektiv, zeigt sich hierbei folgendes: Beide Fälle (Nr. 5 und 9) werden als Non-GCB klassifiziert. Einer der beiden Fälle ist positiv für BCL6 und MUM1, und zeigt sich damit wie die überwiegende Mehrheit der DLBCLs, während ein Fall ausschließlich positiv für MUM1 ist, und damit die Hälfte der beiden CD10- und BCL6-negativen und MUM1-positiven Fälle überhaupt ausmacht. Im Umkehrschluss daraus folgt, dass die Non-GCB-DLBCLs alle bis auf einen Fall durchgehend positiv für BCL6 und MUM1 sind, bei erwartungsgemäßer Negativität für CD10.

## Ergebnisse

Bei Analyse der epidemiologischen Daten nach IHC-Subtyp zeigt sich folgendes Ergebnis: Das mittlere bzw. mediane Alter in der GCB-Subgruppe liegt bei 63,9 respektive 66,5 Jahren, in der Non-GCB-Subgruppe bei 66,9 respektive 69,5 Jahren. Damit zeigte sich im Mann Whitney U-Test kein signifikanter Altersunterschied zwischen der GCB- und der Non-GCB-Subgruppe ( $p = 0,545$ ). Bezüglich der Geschlechterverteilung zeigt sich das Folgende: In der GCB-Gruppe sind 10 der 18 Fälle von weiblichen Patienten (56 %), während in der Non-GCB-Gruppe 8 von 12 Fällen von Frauen stammen (67 %). Damit zeigt sich die GCB-Gruppe im Vergleich zum gesamten Fallkollektiv etwas betonter zugunsten der männlichen Patienten, während in der Non-GCB-Gruppe im Vergleich überproportional viele weibliche Patienten sind.

In einem zusätzlichen Schritt wurden die GCB-Fälle auf eine Expression aller drei untersuchten immunhistochemischen Marker untersucht, und die so identifizierten CD10+BCL6+MUM1+ Fälle zusätzlich als Fälle mit aberranter Expression (sog. *Triple Positive*) gewertet. Hierbei konnten insgesamt fünf Fälle identifiziert werden. Somit ergibt sich für den modifizierten Hans-Algorithmus eine Verteilung von 13 GCB-DLBCL, 12 Non-GCB-DLBCL sowie fünf Fällen DLBCL mit aberranter Expression, was prozentualen Raten von 43 %, 40 % und 17 % entspricht. (Streich et al., 2023)

### **Immunhistochemische Analysen von BCL2, MYC, Ki-67**

Im gesamten Fallkollektiv wurde bei 23 Fällen eine positive Färbung für BCL2 festgestellt (77 %), die verbleibenden 7 Fälle zeigten einen negativen Reaktionsausgang. Während in der GCB-Subgruppe nur 11/18 (61 %) positiv für BCL2 waren, waren in der Subgruppe der Non-GCBs alle 12 Fälle positiv für diesen Marker. Fünf der sieben BCL2-negativen GCBs waren weiterhin negativ für MUM1, die übrigen zwei Fälle waren positiv. Diese beiden Fälle waren komplett dem Subtyp mit aberranter Expression von CD10, BCL6 und MUM1 zuzuordnen. (Streich et al., 2023)

Die Expression von MYC konnte nur in 27 von 30 Fällen bewertet werden, da in den drei nicht untersuchten Fällen kein FFPE-Material mehr für die Untersuchung zugänglich war. Eine Expression über dem Cutoff-Wert von 40 Prozent und damit ein als positiv zu wertendes Ergebnis zeigten 4 von 27 Fälle (15 %). (Streich et al., 2023)

Die Proliferationsrate wurde mittels des Surrogatmarkers Ki-67 und dem dazugehörigen Klon MIB1 bestimmt. Im Bereich von 1-25 % lag sie bei einem Fall, im Bereich von 26-50 % bei zwei Fällen, im Bereich von 51-75 % bei 7 Fällen, und im Bereich von 76-100 % bei den übrigen 20 Fällen. Bei der Wachstumsrate ließ sich im Vergleich zwischen GCBs

und Non-GCBs kein Trend erkennen; ein als Non-GCB klassifiziertes FL 3B/FLBL (Fall Nr. 5) zeigte die über das gesamte Fallkollektiv niedrigste Expression von 20 Prozent proliferierender Zellen. Die Fälle mit aberranter Expression von CD10, BCL6 und MUM1 zeigten im Vergleich zu den übrigen Fällen keine Auffälligkeiten in Bezug auf die Proliferationsrate. (Streich et al., 2023)

### 3.3 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Alle im Fallkollektiv eingeschlossenen Fälle wurden mittels FISH für strukturelle Alterationen in den Genen *IRF4*, *BCL2* und *IGH* untersucht. Lediglich in einem Fall (Nr. 20) war auf Grund von Mangel an ausreichendem FFPE-Material keine Untersuchung auf Alterationen im *IGH*-Gen möglich.

#### 3.3.1 *IRF4*-FISH

Bruchereignisse im *IRF4*-Gen konnten in zwei Fällen (2/30, 7 %) nachgewiesen werden (Fall-Nr. 13, 35) (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023). Außerdem wurde in sieben weiteren Fällen eine Vervielfältigung (*Gains*) des *IRF4*-Gens nachgewiesen (23 %) (Streich et al., 2023). Insgesamt lag somit in neun von 30 Fällen (30 %) eine genetische Alteration von *IRF4* vor.

Beide Translokationen traten in Fällen aus der GCB-Gruppe auf, wobei beide Fälle ebenfalls immunhistochemisch positiv für CD10, BCL6 und MUM1 waren und somit auch als Fälle mit aberranter Expression von CD10, BCL6 und MUM1 (*Triple positive*) zu klassifizieren waren. Somit war in allen Fällen mit einer *IRF4*-Translokation auch eine immunhistochemische Expression des entsprechenden Proteins MUM1 gegeben. (Streich et al., 2023)

Fünf der sieben Fälle mit *Gains* im *IRF4*-Genlokus waren immunhistochemisch als Non-GCB klassifiziert worden und zeigten allesamt eine durchgehend positive MUM1-Expression. Im Gegensatz dazu exprimierten die beiden verbleibenden Fälle mit *IRF4*-*Gains*, die durch die immunhistochemischen Analysen als GCB klassifiziert worden waren, kein MUM1. Während alle Fälle mit *IRF4*-Translokation der Gruppe der DLBCLs zuzuordnen war, war ein Fall mit *IRF4*-*Gains* als FL 3B/FLBL diagnostiziert worden. (Streich et al., 2023)

Bei den *IRF4*-translozierten Fällen lag das mittlere und mediane Alter mit 57,5 Jahren (Altersspanne: 37 bis 78 Jahre) unter dem Mittelwert bzw. Median des gesamten Fallkollektivs. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Altersunterschiede zwischen den Fällen mit *IRF4*-Translokation, *IRF4*-Gains und/oder ohne Alterationen von *IRF4* (Mann-Whitney U-Test,  $p = 0,715$ ). Bemerkenswerterweise war jedoch einer der beiden Fälle mit *IRF4*-Translokation dem jüngsten Patienten aus dem gesamten Fallkollektiv zuzuordnen. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

### 3.3.2 *BCL2*-FISH

In sechs Fällen konnten Translokationen im *BCL2*-Gen nachgewiesen werden. Alle diese Fälle wurden immunhistochemisch als GCB klassifiziert und zeigten weiterhin eine durchgehend starke Expression von *BCL2* in der Immunhistochemie. Des Weiteren wurden in zwei Fällen Gains im *BCL2*-Genlocus nachgewiesen, je ein Fall war zuvor durch den Hans-Algorithmus als GCB bzw. Non-GCB klassifiziert worden. Auch in diesen Fällen konnte eine immunhistochemische Expression von *BCL2* gezeigt werden. Somit wiesen 7 von 18 als GCB klassifizierten Fälle genetische Alterationen von *BCL2* auf, was einer Rate von 39 % entspricht, im Gegensatz zu einem von 12 Fällen bei den Non-GCBs und damit 8 % entsprechend. In keinem Fall konnte eine simultane Translokation von *IRF4* und *BCL2* nachgewiesen werden, lediglich ein Fall zeigte *IRF4*-Gains beim Vorliegen einer *BCL2*-Translokation. Kein Fall mit einer Alteration von *BCL2* war der Gruppe der Fälle mit aberranter Expression von CD10, *BCL6* und MUM1 (*Triple positive*) zuzuordnen. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

### 3.3.3 *MYC*-FISH

Von den vier immunhistochemisch für *MYC* positiven Fälle, die mittels FISH auf Veränderungen im *MYC*-Gen untersucht wurden, zeigte keiner der Fälle Translokationen oder Gains im *MYC*-Gen.

### 3.3.4 *IGH*-FISH

Eine Analyse von genetischen Alterationen mittels FISH des *IGH*-Genlocus war nur in 29 der 30 Fälle des gesamten Fallkollektivs möglich, da im verbleibenden Fall nach Abschluss der anderen Analysen kein Material mehr zur Verfügung stand. In 13/29 Fällen (45 %) konnte ein Translokationsereignis im *IGH*-Locus nachgewiesen werden.

Davon entfielen zehn Fälle auf die Gruppe der immunhistochemisch identifizierten GCBs, die verbleibenden drei auf die Gruppe der ABCs. Vier von fünf der Fälle mit aberranter Expression von CD10, BCL6 und MUM1 (*Triple positive*) wiesen hierbei eine IGH-Translokation auf. Weiterhin konnten in einem Fall Gains des IGH-Genlocus gezeigt werden, dieser Fall war der Gruppe der ABCs zuzuordnen. Bei diesem Fall waren zuvor außerdem Gains im *IRF4*-Genlocus nachgewiesen worden. In 6/13 Fällen (46 %) mit einer Translokation konnten entweder *IRF4* oder *BCL2* als Translokationspartner identifiziert werden. In den verbleibenden sieben Fällen war mit den verwendeten Sonden kein Nachweis eines Translokationspartners für IGH möglich. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

### **3.3.5 Zusammenschau aller FISH-Befunde**

Bei insgesamt 89 durchgeführten FISH-Untersuchungen konnten in 21 Analysen eine Translokation sowie in weiteren zehn Analysen Gains nachgewiesen werden. 18 der 21 nachgewiesenen Translokationen traten in der Gruppe der GCBs auf. Translokationen traten entweder nur in einem Gen auf, oder bei Auftreten in zwei Genen war in jedem Fall IGH eins der beteiligten Gene. Im Umkehrschluss daraus folgt, dass in keinem Fall ein gleichzeitiges Auftreten von Translokationen von *IRF4* und *BCL2* beobachtet wurde. Daraus folgt ebenfalls, dass in keinem Fall Translokationen in allen drei untersuchten Genen nachgewiesen werden konnten. Geht man von den acht Non-IGH-Translokationen aus (zwei *IRF4*, sechs *BCL2*), so konnte in sechs davon IGH als Translokationspartner identifiziert werden. In den übrigen beiden Fällen verblieben die *BCL2*-Translokationen ohne Nachweis eines Translokationspartners. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

Neben dem Nachweis von Translokationsereignissen gelang in zehn Analysen der Nachweis von Gains. Von diesen zehn Untersuchungen entfielen acht Stück auf die Gruppe der ABCs. Lediglich in einem Fall konnten Gains in zwei Genen nachgewiesen werden. Außerdem traten in zwei Fällen Translokationen in einem und Gains in einem anderen der untersuchten Gene auf. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

### 3.3.6 Korrelation FISH – IHC

Im Fall von *IRF4/MUM1* und *BCL2/BCL2* war eine Korrelation der Ergebnisse der Immunhistochemie mit denen der FISH-Analysen möglich, da sowohl Gen als auch das zugehörige Protein untersucht worden waren.

#### ***IRF4/MUM1***

FISH-negative Fälle waren zu etwa gleichen Anteilen immunhistochemisch positiv und negativ. Lag eine Translokation im *IRF4*-Gen vor, so war in allen Fällen eine immunhistochemische Expression des entsprechenden Proteins gegeben. Bei Vorliegen von Gains war im überwiegenden Teil der Fälle eine Expression mittels Immunhistochemie nachweisbar, jedoch verblieben zwei Fälle mit Gains immunhistochemisch negativ. Im Chi-Quadrat-Test ergab sich mit  $p = 0,329$  ein nicht signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der Immunhistochemie und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Die entsprechenden Ergebnisse sind auch in Tabelle 17 dargestellt. (Streich et al., 2023)

Tabelle 17: Korrelation der Ergebnisse aus Immunhistochemie und FISH für *IRF4/MUM1*.

		<b>FISH (<i>IRF4</i>)</b>		
		negativ	Translokation	Gains
<b>IHC (MUM1)</b>	negativ	10	0	2
	positiv	11	2	5

## Ergebnisse

### ***BCL2/BCL2***

In der FISH negative Fälle waren zu gut einem Drittel immunhistochemisch negativ, zu gut zwei Drittel positiv. Lag eine Translokation vor, so war in jedem Fall eine immunhistochemische Expression nachweisbar. Gleiches gilt für den Nachweis von Gains, auch hier war in allen Fällen eine Expression nachweisbar. Somit war bei allen Fällen mit einer genetischen Alteration von *BCL2* eine Expression des entsprechenden Proteins nachweisbar. Im Chi-Quadrat-Test auf Zusammenhänge zwischen FISH- und IHC-Befunden ergab sich mit  $p = 0,190$  kein signifikantes Ergebnis. Die entsprechenden Ergebnisse sind auch in Tabelle 18 dargestellt. (Streich et al., 2023)

Tabelle 18: Korrelation der Ergebnisse aus Immunhistochemie und FISH für *BCL2/BCL2*.

		<b>FISH (<i>BCL2</i>)</b>		
		negativ	Translokation	Gains
<b>IHC (<i>BCL2</i>)</b>	negativ	7	0	0
	positiv	15	6	2

## 3.4 Genexpressionsprofil-Analyse (GEP)

### 3.4.1 Qualitative Ergebnisse

In allen 30 Fällen war eine Bestimmung des Genexpressionprofils möglich. Jeweils 14 Fälle wurden als GCB und ABC klassifiziert, während in zwei Fällen auch bei wiederholter Analyse keine eindeutige Bestimmung des Subtyps möglich war und diese daher vom Analyse-Algorithmus als unklassifizierbar (UNC) gewertet wurden. Die Ergebnisse der Subtypen-Bestimmung mittels Genexpressionsprofil-Analyse und Immunhistochemie sind auch Tabelle 19, Seite 78 zu entnehmen. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

Alle Fälle, die mittels GEP als GCB klassifiziert wurden, waren zuvor auch mittels Immunhistochemie als GCB identifiziert worden. Zusätzlich gab es drei Fälle (Nr. 19, 29, 32), die mittels GEP als ABC, durch die Immunhistochemie jedoch als GCB klassifiziert wurden. Weiterhin verblieb ein Fall in der Genexpressionsanalyse UNC, während dieser mittels IHC ebenfalls als GCB klassifiziert worden war. Zwei der nicht übereinstimmenden Fälle (Nr. 19, 32) waren immunhistochemisch als CD10+, BCL6+, MUM1+ (*Triple positive*) und damit als Fälle mit aberranter Expression identifiziert worden. In beiden Fällen war die Proliferationsrate, bestimmt mittels Ki-67, hoch; in einem Fall bei 70 %, im anderen bei über 80 %. Der dritte Fall (Nr. 29) mit einem Widerspruch zwischen Immunhistochemie und Genexpressionsprofil-Analyse war immunhistochemisch positiv für CD10, BCL6 und BCL2 bei Negativität für MUM1 und MYC sowie einer Proliferationsrate von 60 %. Auch der mittels GEP als unklassifizierbar gewertete Fall (Nr. 34) war in der Immunhistochemie positiv für CD10 und BCL6 bei Negativität für MUM1, BCL2 und MYC sowie einer Proliferationsrate von über 80 %. (Streich et al., 2023)

Alle bis auf einen der immunhistochemisch als ABC identifizierten Fällen zeigten sich auch in der Genexpressionsprofilanalyse als ABC. Jener eine Fall (Nr. 10), der in der Immunhistochemie als ABC klassifiziert worden war, verblieb in der GEP unklassifizierbar (UNC); in der Immunhistochemie zeigten sich hier eine Positivität für BCL6, MUM1 und BCL2 bei Negativität für CD10 und MYC sowie einem Proliferationsindex von 70 %. (Streich et al., 2023)

In einem weiteren Schritt wurde die Subtyp-Klassifizierung durch die Genexpressionsprofil-Analyse mit der durch die Immunhistochemie verglichen. Im Chi-

## Ergebnisse

Quadrat-Test ergab sich eine Signifikanz mit  $p = 0,000451$  und damit ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Diagnose aus IHC und GEP.

Tabelle 19: Korrelation der Subtypisierungsergebnisse mittels GEP und IHC.

		GEP		
		GCB	ABC	UNC
IHC	GCB	14	3	1
	Non-GCB	0	11	1

### 3.4.2 Quantitative Ergebnisse und statistische Analysen

Neben der Subtypisierung in GCB und ABC wurden die Genexpressionsprofile auch quantitativ untersucht. Nach einer Quantilennormalisierung der Rohdaten wurden die Expressionswerte mit einem Mann-Whitney U-Test für unabhängige Stichproben auf Unterschiede zwischen den GEP-Subtypen GCB und ABC untersucht. In 29 der untersuchten Gene konnten signifikante Unterschiede in der Expression zwischen den Subgruppen GCB und ABC detektiert werden. Von den 29 Genen waren 11 im GCB-Subtyp signifikant erhöht, während die verbleibenden 18 Gene im ABC-Subtyp signifikant erhöht waren. Die signifikant unterschiedlich exprimierten Gene sind auch Abbildung 9, Seite 79 zu entnehmen. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

Unter Betrachtung aller drei GEP-Subgruppen GCB, ABC und UNC mittels Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben zeigt sich folgendes: Für *IRF4* wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den GEP-Subgruppen mit  $p = 0,00065$  (\*\*\*) gefunden. Für *BCL6* wurde ebenfalls eine signifikante Differenz in der Genexpression detektiert, hierbei mit  $p = 0,00118$  (\*\*). Auch für *MME* war ein signifikanter Unterschied mit  $p = 0,00668$  (\*\*) nachweisbar. Für *BCL2* wurde ebenfalls eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Genexpression zwischen den Subgruppen mit  $p = 0,01616$  (\*) gefunden. Insgesamt sind bei Betrachtung aller drei GEP-Subgruppen GCB, ABC und UNC 27 Gene signifikant unterschiedlich zwischen den Subgruppen exprimiert. Die p-Werte für die Signifikanztests aller untersuchten Gene sind auch Abbildung 10, Seite 80 zu entnehmen. (Streich et al., 2023)

## Ergebnisse

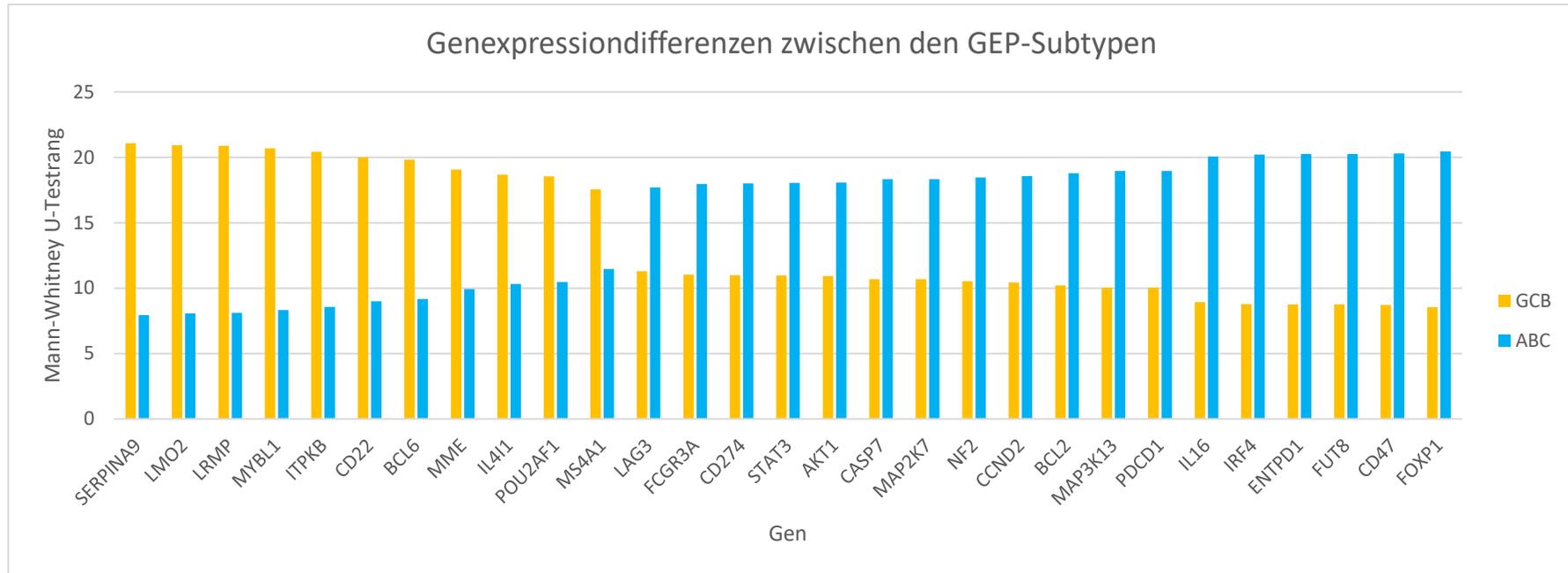


Abbildung 9: Gene mit signifikanten Differenzen in der Genexpression zwischen den GEP-Subtypen GCB und ABC. Dargestellt sind alle Gene, deren Unterschiede zwischen den Subgruppen im Mann-Whitney U-Test signifikante Unterschiede mit  $p < 0,05$  zeigten. Insgesamt zeigen sich bei 29 Genen signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den Subgruppen, dabei sind 11 Gene in der Subgruppe der GCBs signifikant erhöht, während die übrigen 18 Gene in der Subgruppe der ABCs signifikant erhöht sind. Abbildung bearbeitet nach Streich et al. (2023).

## Ergebnisse

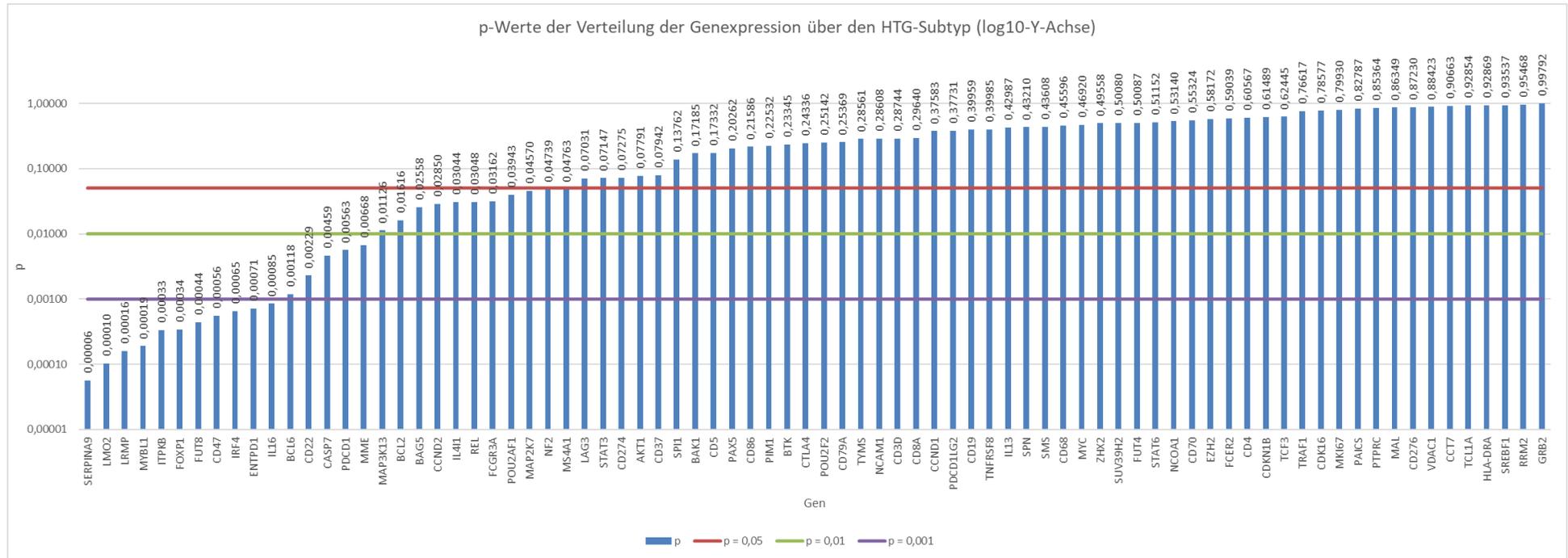


Abbildung 10: p-Werte des Kruskal-Wallis-Test zur Verteilung der Genexpression über die GEP-Subgruppen GCB, ABC und UNC. Dargestellt sind alle Gene, die in der Genexpressionsprofilanalyse untersucht wurden (X-Achse). Auf der Y-Achse sind hierbei die p-Werte für die Signifikanztests auf Unterschiede in der Genexpression zwischen den GEP-Subgruppen aufgetragen. Die violette Linie symbolisiert das Signifikanzniveau  $p = 0,001$ , hier sind 11 Gene signifikant unterschiedlich exprimiert. Die grüne Linie symbolisiert das Signifikanzniveau  $p = 0,01$ , hier sind weitere 5 Gene signifikant unterschiedlich exprimiert. Die rote Linie symbolisiert das Signifikanzniveau  $p = 0,05$ , hier sind weitere 11 Gene signifikant unterschiedlich exprimiert. Abbildung bearbeitet nach Streich et al. (2023).

### Zusammenhang zwischen Genexpression und immunhistochemischer Expression

Weiterhin wurde die Expression der Gene der zum Hans-Algorithmus zugehörigen Proteine (*MME/CD10*, *BCL6/BCL6*, *IRF4/MUM1*) im Vergleich zwischen positiver und negativer immunhistochemischer Expression untersucht. Hierbei zeigten sich in Mann-Whitney U-Tests für unabhängige Stichproben sowohl für *MME/CD10*, *BCL6/BCL6* als auch für *IRF4/MUM1* signifikante Unterschiede in der Genexpression abhängig davon, ob eine immunhistochemische Expression des entsprechenden Proteins vorhanden war (siehe hierzu auch Abbildung 11). Die p-Werte lagen hierbei bei  $p = 0,000006$  für *MME/CD10*, bei  $p = 0,000239$  für *IRF4/MUM1* und bei  $p = 0,000009$  für *BCL6/BCL6*. (Streich et al., 2023)

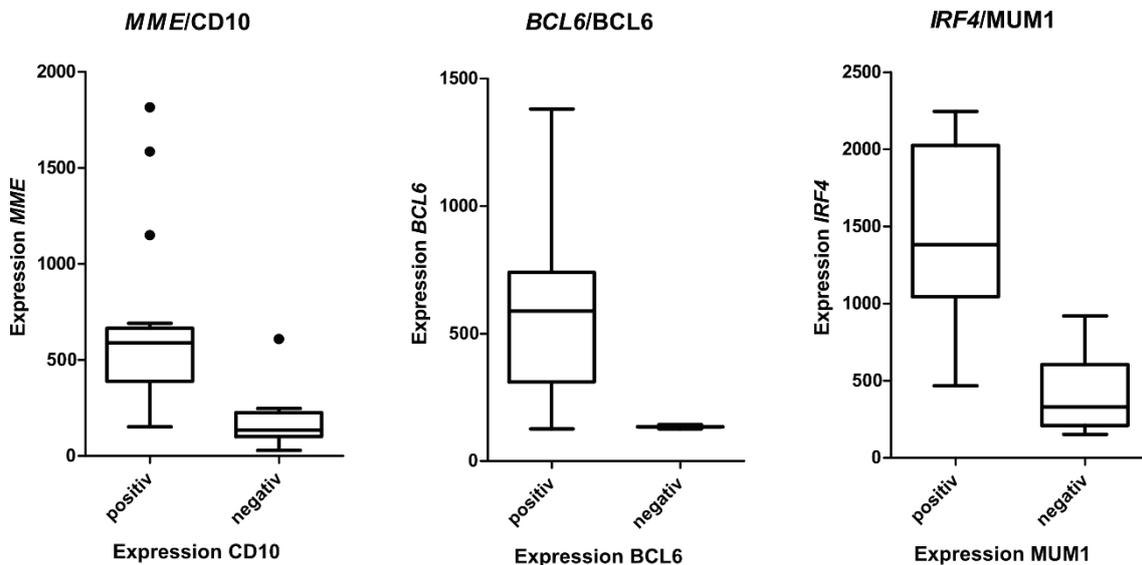


Abbildung 11: Gegenüberstellung der Genexpressionswerte abhängig von der immunhistochemischen Expression. Für *CD10/MME*, *BCL6/BCL6* und *MUM1/IRF4* sind auf der X-Achse die immunhistochemische Expression aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die normalisierten Genexpressionswerte aufgetragen. Für alle drei untersuchten Gen-Genprodukt-Paare zeigen sich signifikante Zusammenhänge zwischen der Genexpression und der immunhistochemischen Expression. Abbildung bearbeitet nach Streich et al. (2023).

### 3.5 Mutationsanalyse

Alle 30 Fälle wurden mittels NGS-Panelsequenzierung sowie Einzelamplikons auf genomische Varianten untersucht. Die durchgeführten Analysen sind Tabelle 20 zu entnehmen.

## Ergebnisse

Tabelle 20: Übersicht über die durchgeführten Analysen im Rahmen der Mutationsanalyse. Tabelle bearbeitet nach Streich et al. (2023).

<b>Fall</b>	<b>NGS-Panelsequenzierung</b>	<b>Einzelamplikons</b>
<b>1</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>EZH2</i> Ex16 646 <i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>2</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>CARD11</i> Ex20 871 <i>EZH2</i> Ex16 646 <i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>5</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>EZH2</i> Ex16 646 <i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>6</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 35-72 <i>EZH2</i> Ex16 646
<b>7</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>8</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>9</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>CARD11</i> Ex5 215 <i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>10</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>11</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>CARD11</i> Ex23 1046 <i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>13</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>CARD11</i> Ex23 1046 <i>IRF4</i> Ex2 1-35 <i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>15</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>CARD11</i> Ex23 1046 <i>EZH2</i> Ex16 646 <i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>16</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>CARD11</i> Ex23 1046 <i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>17</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>CARD11</i> Ex23 1046 <i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>19</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>EZH2</i> Ex16 646 <i>IRF4</i> Ex2 35-72

## Ergebnisse

<b>Fall</b>	<b>NGS-Panelsequenzierung</b>	<b>Einzelamplikons</b>
<b>20</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>BCL2</i> Ex2 53 <i>IRF4</i> Ex2 35-72 <i>EZH2</i> Ex16 646
<b>21</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 35-72 <i>EZH2</i> Ex16 646
<b>22</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>23</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>24</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>25</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>EZH2</i> Ex16 646 <i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>26</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 35-72 <i>BCL2</i> Ex2 192
<b>27</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>29</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>EZH2</i> Ex16 646 <i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>30</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>31</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>32</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>EZH2</i> Ex16 646 <i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>33</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>EZH2</i> Ex16 646 <i>IRF4</i> Ex2 35-72 <i>PIM1</i> Ex4 124
<b>34</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>35</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 1-35 <i>IRF4</i> Ex2 35-72
<b>36</b>	AmpliSeq Custom DLBCL Panel	<i>IRF4</i> Ex2 1-35 <i>IRF4</i> Ex2 35-72

Mittels NGS-Panel-Sequenzierung sowie Einzelamplikonerstellung konnten 65 genomische Varianten identifiziert werden. Diese wurden in 20/30 (67 %) der untersuchten Fälle nachgewiesen, in den verbleibenden 10 Fällen wurden keine

## Ergebnisse

Varianten identifiziert werden. Das entspricht einer mittleren Mutationslast von 2,2 Mutationen/Fall bei Betrachtung aller Fälle (mutiert und Wildtyp) bzw. 3,3 Mutationen/Fall bei ausschließlicher Betrachtung der 20 Fälle mit Mutationen. (Streich et al., 2023)

Insgesamt wurden 58 Missense-, 3 Nonsense-, 2 Frameshift- sowie 2 Splice-Site-Mutationen identifiziert. Am häufigsten war *PIM1* von Mutationen betroffen (8/30 Fälle 27 %), gefolgt von *BCL2* (7/30 Fälle, 23 %), *CARD11* und *MYD88* (jeweils 4/30 Fälle, 13 %), *CD79B* und *PRDM1* (jeweils 3/30 Fälle, 10 %), *IRF4* und *EZH2* (jeweils 2/30 Fälle, 7 %) und *BCL6* und *TNFAIP3* (jeweils 1/30 Fälle, 3 %). (Streich et al., 2023)

Die Allelfrequenzen der Mutationen betragen zwischen 7 und 89 % mit einer mittleren Allelfrequenz von 33,6 % bei einer Standardabweichung von 19,1. Unter den Fällen mit Mutationen waren 10 Fälle mit nur einem mutierten Gen, fünf Fälle mit zwei mutierten Genen und weitere fünf Fälle mit drei mutierten Genen. (Streich et al., 2023)

Die identifizierten Varianten sind Tabelle 21 zu entnehmen.

## Ergebnisse

Tabelle 21: Liste aller Mutationen. # = Fall-Nummer. VAF Cutoff = Untere Grenze der Allelfrequenz, ab der eine Variante als Mutation betrachtet wird. VAF = Allelfrequenz. Coverage = Abdeckung in Reads. † = Mutation nur im Einzelamplikon abgedeckt, daher Angabe der Einzelamplikon-VAF. ‡ = Mutation in Panel und Einzelamplikon abgedeckt, Angabe der Einzelamplikon-VAF. Tabelle bearbeitet nach Streich et al. (2023).

#	VAF Cutoff	Gen	Transkript	Koordinaten	VAF	Coverage	Veränderung cDNA	Veränderung Protein	Prognose		
									COSMIC FATHMM	Varsome	CADD
2	5%	<i>CD79B</i>	NM_001039933	chr17:62006798	29%	2076	c.590A>C	p.Y197S	Pathogenic (score 0.94)	Likely pathogenic	24.5
5	5%	<i>TNFAIP3</i>	NM_001270507	chr6:138198338	10%	10385	c.931G>T	p.E311*	–	Pathogenic	38
8	5%	<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985692	45%	2488	c.208T>G	p.S70A	–	Uncertain significance	17.07
		<i>EZH2</i>	NM_004456	chr7:148508728	14%	190	c.1936T>A	p.Y646N	Pathogenic (score 0.99)	Likely pathogenic	32
9	5%	<i>PIM1</i>	NM_002648	chr6:37139097	19%	33595	c.437G>A	p.S146N	Pathogenic (score 0.78)	Uncertain significance	21.9
		<i>CARD11</i>	NM_032415	chr7:2983885	10%	5299	c.645G>C	p.K215N	–	Uncertain significance	22
10	5%	<i>MYD88</i>	NM_002468	chr3:38182292	50%	18078	c.728G>A	p.S243N	–	Pathogenic	28.7
		<i>PIM1</i>	NM_002648	chr6:37138354	14%	3582	c.3G>A	p.M1I	–	Pathogenic	24.1
		<i>PIM1</i>	NM_002648	chr6:37138423	13%	3699	c.72G>C	p.K24N	–	Uncertain significance	18.57
11	5%	<i>PRDM1</i>	NM_001198	chr6:106536223 - chr6:106536233	50%	34216	c.190_200dup	p.D68Tfs	–	Pathogenic	N/A

## Ergebnisse

#	VAF Cutoff	Gen	Transkript	Koordinaten	VAF	Coverage	Veränderung cDNA	Veränderung Protein	Prognose		
									COSMIC FATHMM	Varsome	CADD
13	5%	<i>PRDM1</i>	NM_001198	chr6:106547183	51%	7353	c.420delC	p.R141Efs	–	Pathogenic	31
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393187	23%	1217	c.35T>G	p.F12C	–	Uncertain significance	23.3
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393190	23%	1218	c.38G>C	p.G13A	–	Uncertain significance	25
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393208	22%	3827	c.56G>T	p.C19F	–	Uncertain significance	28.9
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393252	28% †	61399	c.100A>G	p.S34G	–	Uncertain significance	27
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393260	42% †	61720	c.108G>T	p.K36N	Pathogenic (score 0.91)	Uncertain significance	24.8
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393295	26% †	64929	c.143G>A	p.S48N	–	Uncertain significance	25
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393332	38% †	65135	c.180G>C	p.Q60H	Pathogenic (score 0.87)	Uncertain significance	24.9
15	5%	<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393342	41% †	65920	c.190C>T	p.R64C	–	Uncertain significance	32
		<i>PIM1</i>	NM_002648	chr6:37139062 - chr6:37139070	89%	4100	c.402_410del	p.E135_G137 del	–	Uncertain significance	N/A
		<i>CD79B</i>	NM_001039933	chr17:62006798	42%	4652	c.590A>T	p.Y197F	Pathogenic (score 0.94)	Uncertain significance	24

## Ergebnisse

#	VAF Cutoff	Gen	Transkript	Koordinaten	VAF	Coverage	Veränderung cDNA	Veränderung Protein	Prognose		
									COSMIC FATHMM	Varsome	CADD
17	5%	<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985889	14%	4434	c.11C>T	p.A4V	Pathogenic (score 0.92)	Uncertain significance	22.7
		<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985743	89%	2300	c.157C>T	p.P53S	Neutral (score 0.04)	Uncertain significance	11.12
		<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985594	58%	5600	c.306C>A	p.D102E	Neutral (score 0.01)	Uncertain significance	21.2
		<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985590	58%	5600	c.310T>A	p.F104I	–	Uncertain significance	22.2
		<i>CARD11</i>	NM_032415	chr7:2977614	51%	11300	c.1070A>T	p.D357V	Pathogenic (score 0.94)	Uncertain significance	28.2
		<i>CARD11</i>	NM_032415	chr7:2979453	46%	3970	c.794A>C	p.Q265P	–	Uncertain significance	21.6
		<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985890	45%	2300	c.10G>C	p.A4P	Neutral (score 0.44)	Uncertain significance	22.2
		<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985886	45%	2300	c.14G>A	p.G5E	–	Uncertain significance	25.3
		<i>PIM1</i>	NM_002648	chr6:37139210	36%	13990	c.550C>G	p.L184V	Pathogenic (score 0.94)	Uncertain significance	27.3
		19	5%	<i>MYD88</i>	NM_002468	chr3:38182641	84%	5946	c.794T>C	p.L265P	Pathogenic (score 0.96)
<i>PRDM1</i>	NM_001198			chr6:106534471	61%	837	c.42+1G>C	p.?	–	Pathogenic	35

## Ergebnisse

#	VAF Cutoff	Gen	Transkript	Koordinaten	VAF	Coverage	Veränderung cDNA	Veränderung Protein	Prognose		
									COSMIC FATHMM	Varsome	CADD
		<i>PRDM1</i>	NM_001198	chr6:106554273	59%	2282	c.1801C>T	p.R601W	–	Uncertain significance	32
		<i>PIM1</i>	NM_002648	chr6:37138802 - chr6:37138804	38%	3128	c.235_237delinsAAA	p.E79K	Pathogenic (score 0.97)	Uncertain significance	23.4
<b>20</b>	7%	<i>MYD88</i>	NM_002468	chr3:38182641	52%	9706	c.794T>C	p.L265P	Pathogenic (score 0.96)	Pathogenic	32
		<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985840	33%	5426	c.60T>G	p.H20Q	N/A	Uncertain significance	21.9
<b>21</b>	5%	<i>CARD11</i>	NM_032415	chr7:2977614	30%	8364	c.1070A>T	p.D357V	Pathogenic (score 0.94)	Uncertain significance	29.8
		<i>BCL6</i>	NM_001706	chr3:187444538	30%	10326	c.1689C>G	p.S563R	–	Uncertain significance	28.8
<b>23</b>	5%	<i>MYD88</i>	NM_002468	chr3:38182032	28%	11828	c.656C>G	p.S219C	Pathogenic (score 0.96)	Uncertain significance	29.1
		<i>PIM1</i>	NM_002648	chr6:37138769	35%	1057	c.202C>T	p.H68Y	Pathogenic (score 0,97)	Uncertain significance	22.4
<b>24</b>	5%	<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985549	7%	2238	c.351C>G	p.S117R	Neutral (score 0,03)	Uncertain significance	14.26
		<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985562	8%	2211	c.338C>T	p.A113V	Neutral (score 0,03)	Uncertain significance	14.07
		<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985575	8%	2216	c.325C>G	p.R109G	–	Uncertain significance	24.7

## Ergebnisse

#	VAF Cutoff	Gen	Transkript	Koordinaten	VAF	Coverage	Veränderung cDNA	Veränderung Protein	Prognose		
									COSMIC FATHMM	Varsome	CADD
		<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985635	32%	658	c.265G>A	p.V89M	–	Uncertain significance	22.4
		<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985644	32%	644	c.256C>G	p.L86V	Neutral (score 0,24)	Uncertain significance	17.47
<b>25</b>	5%	<i>CARD11</i>	NM_032415	chr7:2958135	55%	347	c.2597G>A	p.R866Q	Neutral (score 0.22)	Uncertain significance	12.47
		<i>PIM1</i>	NM_002648	chr6:37138365	35%	1027	c.14A>G	p.K5R	–	Uncertain significance	24.1
		<i>PIM1</i>	NM_002648	chr6:37138367	35%	1027	c.16A>G	p.I6V	–	Uncertain significance	18.74
<b>26</b>	6%	<i>PIM1</i>	NM_002648	chr6:37138901	30%	2088	c.241C>T	p.P81S	Pathogenic (score 0,97)	Uncertain significance	22.8
		<i>EZH2</i>	NM_004456	chr7:148508727	30% ‡	5985	c.1937A>G	p.Y646C	Pathogenic (score 0,99)	Likely pathogenic	25.2
		<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985644	34%	1002	c.256C>T	p.L86F	Neutral (score 0,29)	Uncertain significance	19.64
		<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985326	9% ‡	256782	c.574A>C	p.N192H	Neutral (0,10)	Uncertain significance	28,2
<b>27</b>	5%	<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60795869	30%	9448	c.709G>A	p.G237S	–	Uncertain significance	24.5
		<i>BCL2</i>	NM_000633	chr18:60985840	24%	4187	c.60T>A	p.H20Q	N/A	Uncertain significance	21.9

## Ergebnisse

#	VAF Cutoff	Gen	Transkript	Koordinaten	VAF	Coverage	Veränderung cDNA	Veränderung Protein	Prognose		
									COSMIC FATHMM	Varsome	CADD
31	5%	<i>CD79B</i>	NM_001039933	chr17:62006793	62%	9807	c.594+1G>C	p.?	–	Pathogenic	32
33	5%	<i>PIM1</i>	NM_002648	chr6:37139078	13% ‡	152732	c.418C>T	p.Q140*	N/A	Pathogenic	37
		<i>PIM1</i>	NM_002648	chr6:37139063	11% ‡	152732	c.403G>T	p.E135*	–	Pathogenic	37
35	5%	<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393172	31%	903	c.20G>T	p.G7V	–	Uncertain significance	22
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393201	11%	911	c.49G>C	p.V17L	–	Uncertain significance	22.6
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393206	11%	906	c.54C>A	p.S18R	–	Uncertain significance	22.6
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393262	21% †	2285	c.110A>T	p.Y37F	–	Uncertain significance	28.4
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393283	21% †	2444	c.131A>G	p.N44S	–	Uncertain significance	27
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393295	16% †	2310	c.143G>C	p.S48T	–	Uncertain significance	21.1
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393298	23% †	2496	c.146T>C	p.I49T	–	Uncertain significance	25.4
		<i>IRF4</i>	NM_002460	chr6:393330 - chr6:393332	23% †	2575	c.178_180delinsTTC	p.Q60F	–	Uncertain significance	N/A

## 3.6 Getrennte Betrachtung einzelner Subgruppen

### 3.6.1 Fälle mit *IRF4*-Rearrangement (LBCL-*IRF4*)

Von den 30 untersuchten Fällen von DLBCLs und FLs 3B aus dem Waldeyer'schen Rachenring konnten in zwei Fällen (Fall-Nr. 13 und 35) eine Translokation von *IRF4* nachgewiesen werden, diese Fälle qualifizierten sich somit für die Diagnose eines LBCL-*IRF4*. Beide Fälle waren aus der Subgruppe der DLBCLs. Die Patientinnen waren beide weiblich und zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 37 und 78 Jahre alt, was im Vergleich mit dem gesamten Fallkollektiv keinen signifikanten Altersunterschied ergab (Mann-Whitney U-Test,  $p = 0,607$ ). In beiden Fällen lag ein niedriges klinisches Stadium vor (I bis II), der IPI war in beiden Fällen LOW. Beide Patientinnen erzielten unter R-CHOP-haltiger Chemotherapie eine Komplettremission und waren auch im Follow-up über 30 bzw. 97 Monate tumorfrei. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

Beide Fälle zeigten eine immunhistochemische Expression von CD10, BCL6 und MUM1 (*Triple positive*) und wurden daher als GCB klassifiziert. Je einer der beiden Fälle war immunhistochemisch positiv bzw. negativ für BCL2; gleiches galt für MYC. Die Proliferationsrate lag in beiden Fällen im Intervall 76-100 % und war damit ähnlich hoch wie in der Mehrheit der übrigen Fälle. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

Mittels GEP wurden beiden Fälle der Subgruppe der GCBs zugeordnet, was die Diagnose mittels Immunhistochemie bestätigte. Für *BCL6* zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen den LBCL-*IRF4* und dem übrigen Fallkollektiv (Mann-Whitney U-Test,  $p = 0,028$ ). Weiterhin zeigten sich signifikante Unterschiede für *CDKN1B*, *MYBL1*, *NCOA1* und *PTPRC*. Für *MME*, *IRF4*, *BCL2* und *MYC* sowie alle weiteren im GEP-Panel enthaltenen Gene ließ sich dieser Unterschied nicht statistisch signifikant nachweisen. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

In FISH-Analysen konnte in beiden Fällen die zu erwartende Translokation von *IRF4* nachgewiesen werden, in beiden Fällen mit IGH als potentiell Partner mit Nachweis eines Bruchpunktes. Weitere Translokationen oder Gains zeigten sich nicht. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

Durch NGS-Panelsequenzierung und Einzelamplikons wurden in beiden Fällen Mutationen von *IRF4* nachgewiesen, in einem Fall zusätzliche Mutationen in *PRDM1*. Andere Mutationen zeigten sich nicht. In beiden Fällen zeigten sich jeweils acht

## Ergebnisse

Mutationen von *IRF4*, im Fall von *PRDM1* zeigte sich nur eine einzelne Mutation. Die mittlere Mutationslast lag damit bei 8,5 Mutationen/Fall und somit deutlich höher als in den übrigen Fällen. Die Mutationen von *IRF4* waren in beiden Fällen im Bereich der für die ersten 64 Aminosäuren kodierenden DNA nachzuweisen, was als Zeichen für die aberrante somatische Hypermutation gewertet werden kann. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

Morphologische und immunhistochemische Eigenschaften sowie die Ergebnisse der FISH-Analysen dieser Fälle sind auch Abbildung 12 und Abbildung 13 zu entnehmen.

## Ergebnisse

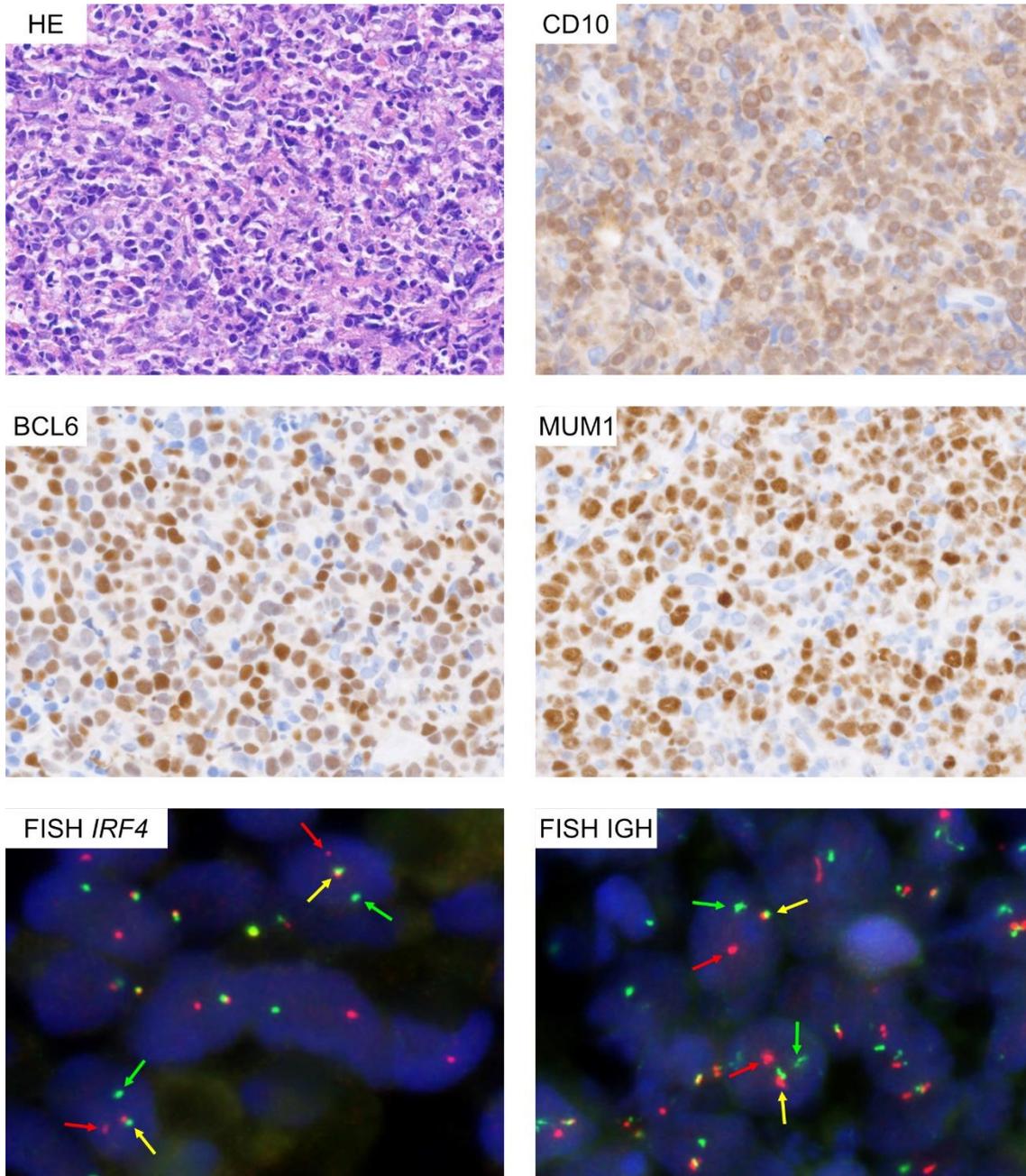


Abbildung 12: Morphologische, immunhistochemische und FISH-Befunde eines LBCL-*IRF4*-Falls (Fall Nr. 13). Originale Vergrößerung (außer FISH) 400-fach. Man erkennt eine gleichzeitige immunhistochemische Positivität für alle drei immunhistochemischen Marker, was die Diagnose eines Falls mit aberranter Expression aller drei immunhistochemischer Marker rechtfertigt (DLBCL-AE). Mittels BAP-Sonden konnten Brüche in *IRF4* und IGH gezeigt werden (1 kolokalisiertes Signal (gelbe Pfeile) und 1 getrenntes Signal (grüne und rote Pfeile)), was in Zusammenschau der Befunde die Diagnose eines LBCL-*IRF4* zulässt.

## Ergebnisse

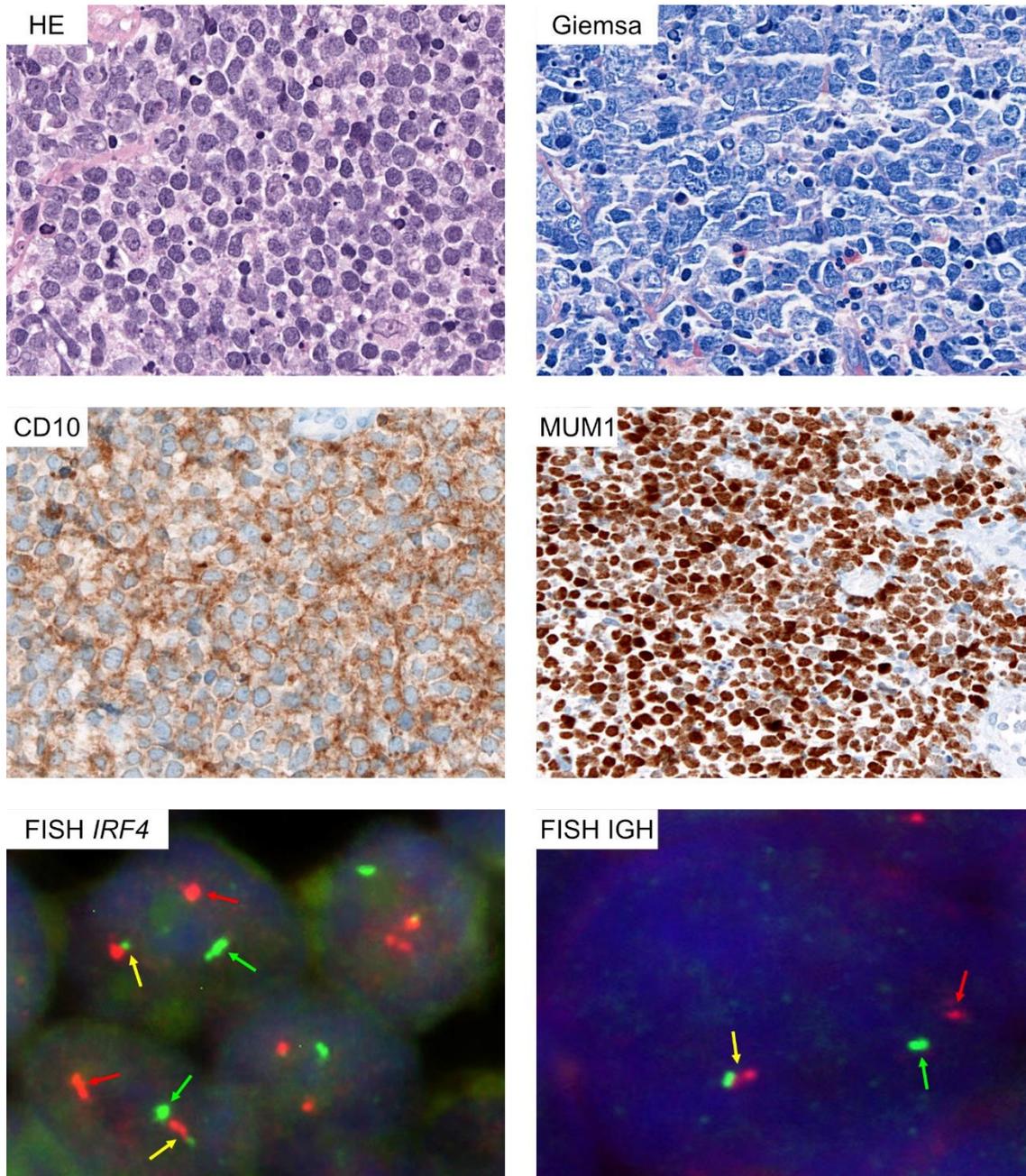


Abbildung 13: Morphologische, immunhistochemische und FISH-Befunde eines weiteren LBCL-*IRF4*-Falls (Fall Nr. 35). Originale Vergrößerung (außer FISH) 400-fach. Man erkennt eine gleichzeitige immunhistochemische Positivität für CD10 und MUM1, was in Zusammenschau mit der Positivität für BCL6 (nicht dargestellt) die Diagnose eines Falls mit aberranter Expression aller drei immunhistochemischer Marker rechtfertigt. Mittels BAP-Sonden konnten Brüche in *IRF4* und IGH gezeigt werden (1 kolokalisiertes Signal (gelbe Pfeile) und 1 getrenntes Signal (grüne und rote Pfeile)), was in Zusammenschau der Befunde die Diagnose eines LBCL-*IRF4* zulässt. Abbildung bearbeitet nach Streich et al. (2023).

### 3.6.2 CD10+ BCL6+ MUM1+ (DLBCL-AE)

Von insgesamt 30 untersuchten Fällen waren 5 Fälle (5/30, 17 %) immunhistochemisch positiv für CD10, BCL6 und MUM1 (DLBCL-AE). Bei diesen Fällen handelte es sich um die Fall-Nummern 13, 19, 32, 35 und 36. Die Patienten waren bei Diagnosestellung zwischen 37 und 87 Jahre alt und bildeten damit die gesamte Altersspanne des Fallkollektivs ab. Der Altersmittelwert betrug 68,0 Jahre, der Median 77 Jahre bei einer Standardabweichung von 17,6. 3/5 der Patienten waren weiblich. Bei allen Fällen handelte es sich um DLBCLs. Das klinische Stadium reichte von I bis IV, wobei in zwei Fällen ein Stadium IV vorlag und bei einem Fall keine Informationen zum klinischen Stadium verfügbar waren. Der IPI war von drei Fällen verfügbar, in zwei Fällen war er LOW, in einem HIGH-INTER. Nur von vier Patienten waren Informationen zu Therapie verfügbar: Zwei Patienten erhielten eine R-CHOP-haltige Chemotherapie, ein Patient erhielt eine Chemotherapie mit Thiotepa, Etoposid, Cytarabin und Melphalan (sog. TEAM-Schema) und nachfolgend eine Stammzelltransplantation. Eine Patientin erhielt keine Therapie. Bei drei der Patienten waren Informationen zum Therapieausgang verfügbar, alle waren nach Therapie in einer Komplettremission. Die Patientin, die keine Therapie erhalten hatte, verstarb einen Monat nach Diagnosestellung an der Erkrankung. Zum Follow-up waren Informationen von drei Patienten verfügbar, die Follow-up-Zeiträume reichten von 18 bis 97 Monate, in allen Fällen zeigte sich kein Hinweis auf eine residuelle Erkrankung oder ein Rezidiv. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

Bei diesen Fällen fiel die COO-Klassifikation mittels Immunhistochemie bei Positivität für CD10 zugunsten der GCB-DLBCLs aus. Diese Klassifikation ließ sich mittels GEP nur in 3/5 Fällen bestätigen, die beiden anderen Fälle wurden mittels GEP als ABC-DLBCL klassifiziert. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

In 3/5 Fällen zeigte sich neben der Positivität für CD10, BCL6 und MUM1 ebenfalls eine immunhistochemische Positivität für BCL2. MYC war in 2/5 Fällen positiv. Die Proliferationsrate, gemessen über die Expression von Ki-67 war in 4/5 Fällen über 50 %, in einem Fall darunter. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

Mittels FISH zeigten sich in 2/5 Fällen Translokationen von *IRF4*, sodass es sich bei diesen beiden Fällen um LBCL-*IRF4*-Fälle handelte. In diesen beiden Fällen konnte ebenfalls eine Translokation in IGH festgestellt werden. Weiterhin zeigten sich in zwei weiteren Fällen ebenfalls Translokationen von IGH, ohne das sonstige Translokationen auftraten. Translokationen von *BCL2* oder *MYC* konnten in keinem der fünf Fälle

nachgewiesen werden. Ebenso zeigten sich keine Gains in allen untersuchten Genen. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

In der NGS-Panelsequenzierung und den Einzelamplikons zeigten sich bei den beiden *IRF4*-translozierten Fällen auch *IRF4*-Mutationen (s.o.). In einem dieser beiden Fälle zeigte sich außerdem eine Mutation in *PRDM1*. In einem anderen Fall waren neben einer kanonischen *MYD88*-Mutation auch Mutationen in *PIM1* und *PRDM1* nachweisbar. In den verbleibenden zwei Fällen zeigten sich keine Mutationen. (Frauenfeld et al., 2022, Streich et al., 2023)

### **3.6.3 Fälle mit nicht-übereinstimmender COO-Klassifikation durch IHC und GEP**

In 5/30 Fällen (17 %) zeigten sich widersprüchliche COO-Klassifikationen mittels IHC und GEP. Diese Fälle stammten überwiegend von männlichen Patienten (3/5). Das Alter bei Diagnosestellung lag zwischen 37 und 87 Jahre und bildete damit die gesamte Altersspanne des Fallkollektivs ab. Das mittlere Alter lag bei 67,0 Jahren, der Median bei 69 Jahren und die Standardabweichung bei 17,5. Bei allen Fällen handelte es sich um DLBCLs. In allen Fällen waren Informationen zum klinischen Stadium verfügbar, das von II bis IV reichte, wobei in drei Fällen ein hohes Stadium (III oder IV) vorlag. Der IPI war in vier Fällen verfügbar und reichte von LOW bis HIGH-INTER. Drei der Patienten erhielten eine R-CHOP-haltige Chemotherapie, ein Patient erhielt eine Chemotherapie nach TEAM-Schema sowie eine Stammzelltransplantation, eine Patientin erhielt keine Therapie. Informationen zum Therapieerfolg waren nur in einem Fall vorhanden, hier zeigte sich eine Komplettremission. Die Patientin, die keine Therapie erhalten hatte, starb einen Monat nach Diagnosestellung an der Erkrankung. Follow-up-Informationen waren in zwei Fällen verfügbar, die Zeiträume reichten von 18 bis 51 Monate, in beiden Fällen zeigte sich kein Hinweis auf eine residuelle Tumorlast oder ein Rezidiv. (Streich et al., 2023)

Die COO-Klassifikation mittels IHC war in allen 30 Fällen möglich, mittels GEP verblieben zwei Fälle (Fall-Nr. 10 und 34) unklassifizierbar (UNC). Neben diesen beiden Fällen mit nicht-übereinstimmender COO-Klassifikation zeigten sich weitere drei Fälle (Fall-Nr. 19, 29, 32), die mittels IHC als GCB klassifiziert worden waren, in der Genexpressionsprofil-Analyse jedoch als ABC klassifiziert wurden. Zwei der drei Fälle waren immunhistochemisch CD10+ BCL6+ MUM1+ (*Triple positive*), der dritte nur positiv für CD10 und BCL6. Weiterhin waren zwei der Fälle positiv für BCL2, nur einer

für MYC. Die Proliferationsrate war in allen Fällen über 50 %. In der FISH konnte nur in einem der drei Fälle eine IGH-Translokation nachgewiesen werden, andere Translokationen zeigten sich nicht. Außerdem zeigte ein Fall Gains in *BCL2*. (Streich et al., 2023)

Mittels NGS-Panelsequenzierung und Einzelamplikons wurde in einem Fall (Nr. 19) eine kanonische *MYD88*-Mutation sowie Mutationen in *PIM1* und *PRDM1* nachgewiesen. In den beiden anderen Fällen wurden keinerlei Mutationen nachgewiesen. (Streich et al., 2023)

### **3.6.4 Follikuläre Lymphome Grad 3B/Follikulär große B-Zell-Lymphome**

2/30 (7 %) der Fälle wurden morphologisch als FL 3B/FLBL klassifiziert (Fall-Nr. 5, 9). Beide Fälle stammten von weiblichen Patientinnen, sie waren bei Diagnosestellung 70 bzw. 81 Jahre alt. Nur in einem der Fälle waren Informationen zum klinischen Verlauf und zur Therapie verfügbar: Initial lag ein Ann-Arbor-Stadium IIE, IPI LOW vor. Diese Patientin erhielt eine R-CHOP-haltige Chemotherapie, voraufhin sich eine Komplettremission einstellte. Auch im 98 Monate dauernden Follow-up zeigte sich kein Hinweis auf eine residuelle Tumorlast oder ein Rezidiv. (Streich et al., 2023)

Beide Fälle wurden mittels Immunhistochemie als Non-GCB klassifiziert, ein Fall war positiv für MUM1 und BCL2, der andere für BCL6, MUM1 und BCL2. Die Proliferationsrate war in einem Fall unter 25 %, damit handelte es sich um den Fall mit der niedrigsten Proliferationsrate im gesamten Fallkollektiv. Im anderen Fall wurde die Proliferationsrate mit auf 75 % bestimmt. (Streich et al., 2023)

Die Genexpressionsprofil-Analyse konnte die COO-Klassifikation mittels Immunhistochemie als ABC/Non-GCB bestätigen. (Streich et al., 2023)

In der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zeigten sich keine Translokationen in den untersuchten Genen, lediglich ein Fall zeigte Gains in *IRF4*. (Streich et al., 2023)

Auf genomischer Ebene wurden mittels *Next Generation Sequencing* Mutationen in *TNFAIP3*, *CARD11* und *PIM1* nachgewiesen. (Streich et al., 2023)

## **3.7 Korrelation der klinisch-pathologischen Eigenschaften, FISH, GEP und NGS**

### **3.7.1 Pathogenitätsscores**

Die prognostischen Scores, die im Rahmen der Datenbankrecherche zu den einzelnen Mutationen erhoben wurden, wurden mit den klinischen Daten der Fälle korreliert und auf eventuelle Zusammenhänge hin überprüft.

Für den COSMIC/FATHMM-Score zeigte sich bei fehlender statistischer Signifikanz ( $p = 0,404$ ) im Kruskal-Wallis-Test eine Tendenz zu höheren Scores bei höheren klinischen Stadien. Eine Signifikanz konnte unter anderem wegen der großen Anzahl und Variabilität an Fällen im Stadium I nicht erreicht werden. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich beim Test auf statistische Signifikanz zwischen IPI und COSMIC/FATHMM ( $p = 0,370$ ).

Entsprechende statistische Tests für den VARSOME-Score waren auf Grund eines nicht-stetigen Testfelds nicht möglich.

Im Fall des CADD-Scores zeigte sich ebenfalls eine Tendenz zu höheren Scores bei höherem klinischen Stadium, hier wurde jedoch im Kruskal-Wallis-Test ebenfalls keine Signifikanz erreicht ( $p = 0,521$ ). Auch hier war für den Test zwischen IPI und CADD kein signifikanter Unterschied nachzuweisen ( $p = 0,355$ ).

Ebenfalls untersucht wurden mögliche Zusammenhänge zwischen der Anzahl der Mutationen pro Fall und dem klinischen Stadium bzw. IPI, auch hier verblieben die statistischen Tests jedoch nicht signifikant ( $p = 0,905$  bzw.  $p = 0,320$ ).

### **3.7.2 Subgruppierung der Fälle**

Mittels Genexpressionsprofil-Analyse wurden jeweils 14 Fälle als GCB und ABC klassifiziert, zwei Fälle verblieben unklassifizierbar. Anhand dieser COO-Klassifikation wurde eine Unterteilung des Fallkollektivs in drei Subgruppen vorgenommen. (Streich et al., 2023)

Eine Übersicht der zuvor beschriebenen Ergebnisse und der nachfolgenden Subgruppierung bietet auch Abbildung 14.

# Ergebnisse

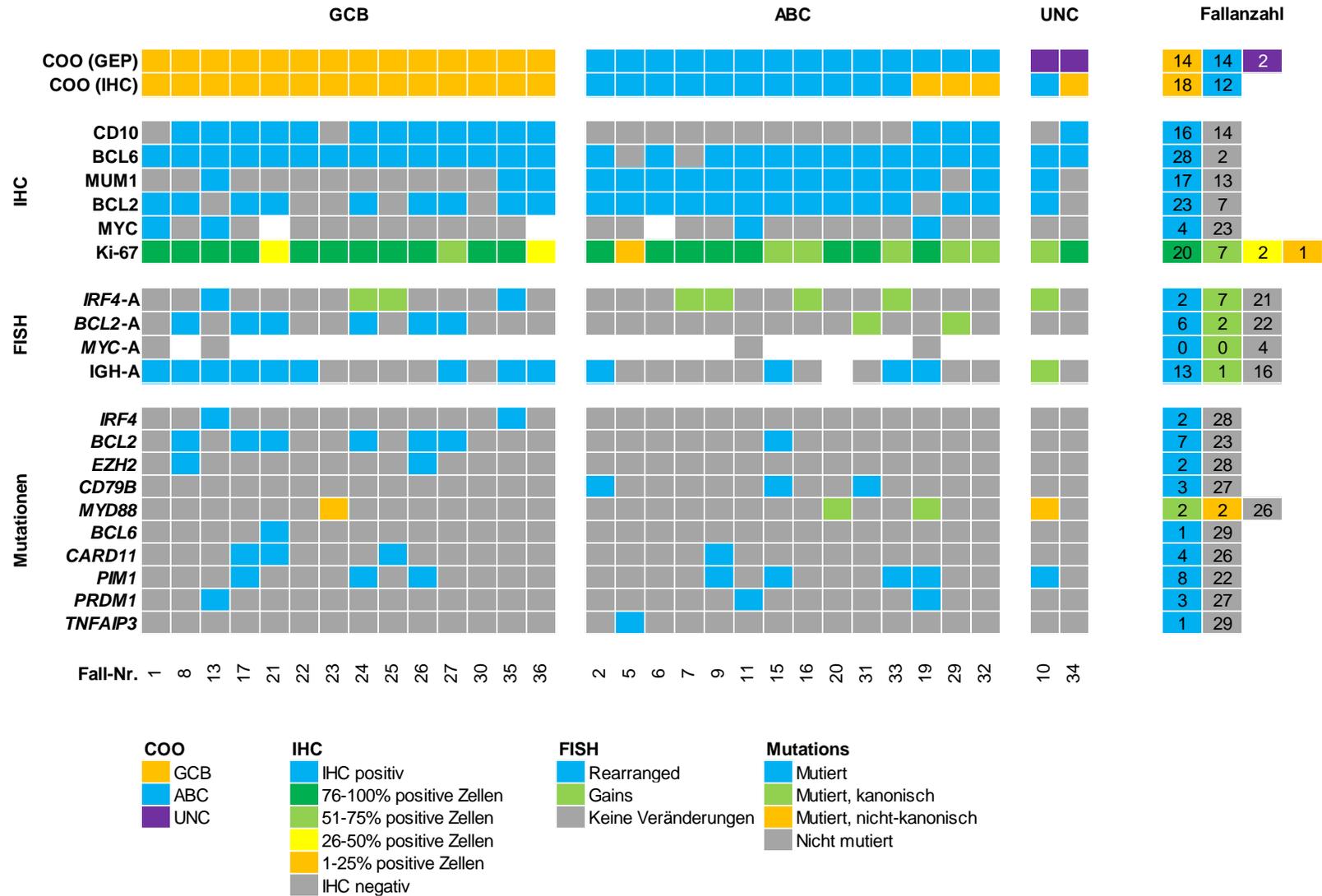


Abbildung 14: Übersicht über 30 Fälle von DLBCL und FL 3B/FLBL im Waldeyer'schen Rachenring. Die Fälle sind in drei Subgruppen gemäß der COO-Klassifikation mittels GEP eingeteilt. Dargestellt sind die Ergebnisse der COO-Klassifikation, der Immunhistochemie, der FISH und der Mutationsanalyse. Abbildung bearbeitet nach Streich et al. (2023).

### **Gruppe 1: COO-Klassifikation als GCB mittels GEP**

14 Fälle wurden mittels GEP als GCB klassifiziert. Diese Fälle stammten von 9 weiblichen und 5 männlichen Patienten. Das Patientenalter bei Diagnose lag im Mittel bei 63,2 Jahren mit einem Median von 66,5 Jahren und einer Standardabweichung von 13,3 bei einer Altersspanne von 37 bis 79 Jahren. Das klinische Stadium bei Diagnose reichte von I bis IV, von vier Patienten waren keine Daten zum klinischen Stadium verfügbar. Bei acht Patienten (8/10, 80 %) lag ein niedriges Stadium vor (I oder II), bei den verbleibenden beiden Patienten jeweils einmal Stadium III und IV. Der IPI war bei 9 Patienten verfügbar, in 6 Fällen war er LOW (6/9, 67 %). Angaben zur Therapie waren von 10 Patienten vorliegend, davon erhielten 8 Patienten eine R-CHOP-haltige Chemotherapie, die beiden übrigen andere Chemotherapien. In 9 Fällen zeigte sich nach Therapie eine Komplettremission, hiervon kam es in einem Fall zunächst zu einem Rezidiv, nach erneuter Therapie stellte sich allerdings eine komplette Remission ein. In einem Fall wurde unter Therapie eine partielle Remission erreicht. Von vier Patienten waren keine Angaben zum Therapieansprechen verfügbar. Informationen zum Follow-up lagen bei 11 Patienten vor, die Follow-up-Dauer reichte von 2 bis 120 Monate mit einem Mittel von 57,0 Monaten, einem Median von 48 Monaten und einer Standardabweichung von 37,1. (Streich et al., 2023)

In allen 14 Fällen ergab auch die COO-Klassifikation mittels Immunhistochemie einen GCB-Subtyp. 12/14 Fällen (86 %) zeigten eine immunhistochemische Positivität für CD10, alle Fälle (100 %) eine Positivität für BCL6. MUM1-positiv waren lediglich drei Fälle (3/14, 21 %). Eine Positivität für BCL2 zeigte sich in 9/14 Fällen (64 %). MYC war lediglich in zwei Fällen positiv (2/14, 14 %). Der Proliferationsindex, bestimmt über Ki-67 war in zwei Fällen kleiner/gleich 50 %, in den übrigen 12 Fällen über 50 %. (Streich et al., 2023)

Mittels FISH konnten in zwei Fällen (2/14, 14 %) Translokationen von *IRF4* nachgewiesen werden, ebenso zeigten sich in zwei weiteren Fällen Gains von *IRF4*. In sechs Fällen (6/14, 43 %) konnten weiterhin Translokationen von *BCL2* nachgewiesen werden. Bruchereignisse in *MYC* zeigten sich in keinem der untersuchten Fälle. Translokationen in IGH zeigten sich in insgesamt 9 Fällen (9/14, 64 %), davon war in sechs Fällen entweder *IRF4* oder *BCL2* ebenfalls transloziert. Gemeinsame Translokationen von *IRF4* und *BCL2* im selben Fall zeigten sich nicht. Somit waren alle Fälle mit Translokationen von *IRF4* oder *BCL2* dieser Subgruppe zuzuordnen. (Streich et al., 2023)

## Ergebnisse

In beiden Fällen mit *IRF4*-Translokation zeigte sich ebenfalls eine *IRF4*-Mutation. Für *BCL2* traf das ebenfalls in allen sechs Fällen zu. Weiterhin zeigten zwei der Fälle mit *BCL2*-Translokation/Mutation ebenfalls eine Mutation in *EZH2*. Kein Fall zeigte eine Mutation von *CD79B*. (Streich et al., 2023)

In einem Fall wurde eine nicht-kanonische Mutation von *MYD88* detektiert (p.S219C). Dieser Fall zeigte insgesamt ein ungewöhnliches immunhistochemisches und genetisches Muster: Immunhistochemisch war dieser Fall nur positiv für BCL6 bei Negativität für alle anderen Marker (insbesondere CD10), der Proliferationsindex war mit über 75 % hoch. Es zeigten sich keinerlei Translokationen oder Gains. Neben der bereits beschriebenen nicht-kanonischen *MYD88*-Mutation zeigten sich auch keine weiteren Mutationen. (Streich et al., 2023)

Weitere häufig detektierte Mutationen waren in *CARD11* und *PIM1* (jeweils 3/14 Fälle, 21 %) sowie *BCL6* und *PRDM1* (jeweils 1/14 Fälle, 7 %) zu finden. Diese Mutationen traten überwiegend in den Fällen auf, in denen auch eine Mutation in *IRF4* oder *BCL2* nachgewiesen wurde. (Streich et al., 2023)

### **Gruppe 2: COO-Klassifikation als ABC mittels GEP**

Ebenfalls 14 Fälle wurden mittels Genexpressionsprofil-Analyse als ABC klassifiziert. Diese Fälle stammten von 8 weiblichen und 6 männlichen Patienten. Das mittlere Alter bei Diagnose lag bei 68,8 Jahren (Median 74,0 Jahre) bei einer Standardabweichung von 13,6. Die Altersspanne betrug 45 bis 87 Jahre. In dieser Subgruppe waren bei elf Patienten Informationen zum klinischen Stadium verfügbar: Bei acht Patienten (8/11, 73 %) lag ein niedriges Stadium vor (I oder II), bei den verbleibenden drei ein hohes Stadium (III oder IV). Angaben zum IPI waren bei 9 Patienten vorliegend, hier zeigte die Mehrheit der Patienten (6/9, 67 %) LOW, zwei Patienten LOW-INTER und ein Patient HIGH-INTER. 9 Patienten erhielten eine R-CHOP-haltige Chemotherapie, 1 Patient eine sonstige Chemotherapie. Ein Patient erhielt keine Therapie, bei den verbleibenden drei Patienten waren keine Angaben zur Therapie verfügbar. Nur in der Hälfte der Fälle waren Daten zum Therapieansprechen vorhanden, in allen diesen Fällen lag nach Therapie eine Komplettremission vor. Die Follow-up-Dauer lag im Mittel bei 53,1 Monaten (Median 57,0 Monate) bei einer Standardabweichung von 40,5, die Zeitspanne lag bei 1 bis 125 Monate. (Streich et al., 2023)

In 11/14 Fällen (79 %) wurde auch mittels Immunhistochemie ein ABC-Subtyp diagnostiziert, in drei Fällen jedoch ein GCB-Subtyp. Diese drei Fälle waren allesamt

## Ergebnisse

positiv für CD10 und wurden daher als GCB gewertet; die Fälle wurden bereits in Abschnitt 3.6.3 ausführlich dargestellt. Bis auf diese drei genannten Fälle waren alle Fälle in dieser Subgruppe CD10-negativ. Eine Positivität für BCL6 zeigte sich in allen bis auf zwei Fällen (12/14, 86 %), diese zwei Fälle waren nicht der Gruppe der Fälle mit diskrepanter COO-Klassifikation zuzuordnen. Alle Fälle bis auf einen der COO-diskrepanten Fälle zeigten eine Positivität für MUM1. BCL2 war ebenfalls in allen bis auf einen der COO-diskrepanten Fälle positiv. Immunhistochemisch konnte in zwei Fällen eine Positivität für MYC nachgewiesen werden, wobei einer dieser beiden Fälle COO-diskrepanz war. Die Proliferationsrate über die gesamte Subgruppe hinweg war hoch (über 50%), nur in einem Fall, einem FL 3B/FLBL, war die Proliferationsrate unter 25 %. (Streich et al., 2023)

Mittels FISH wurde in vier Fällen (4/14, 29 %) ein Bruchereignis in IGH nachgewiesen, jedoch ohne dass ein passender Translokationspartner identifizierbar war. Überhaupt waren außer den genannten IGH-Translokationen keinerlei Translokationen in den untersuchten Genen nachweisbar, lediglich in 4 Fällen zeigten sich *IRF4*-Gains sowie in zwei Fällen *BCL2*-Gains. (Streich et al., 2023)

Die häufigsten nachgewiesenen Mutationen waren *CD79B* (3/14 Fälle, 21 %) sowie *MYD88* (2/14 Fälle, 14 %). Bei den beiden *MYD88*-Mutationen handelte es sich um kanonische Mutationen vom Typ p.L265P. Somit lagen in insgesamt 5/14 Fällen (36 %) Mutationen in einem dieser beiden Gene vor. In insgesamt 4/14 Fällen (29 %) wurden Mutationen in *PIM1* nachgewiesen, in 2/14 Fällen (14 %) in *PRDM1*. (Streich et al., 2023)

Ein Fall aus dieser Gruppe (Fall-Nr. 15) zeigte ein ungewöhnliches genetisches Muster. Der Fall wurde sowohl mittels GEP als auch mittels IHC als ABC klassifiziert, er zeigte eine immunhistochemische Positivität für BCL6, MUM1 und BCL2. Mittels FISH konnte in diesem Fall eine Translokation in IGH nachgewiesen werden, jedoch ohne Nachweis von Bruchereignissen in den anderen untersuchten Genen. Im *Next Generation Sequencing* zeigte dieser Fall die untypische Konstellation von Mutationen in *CD79B* (klassischerweise ABC) und *BCL2* (klassischerweise GCB), weiterhin bestand eine Mutation in *PIM1*. (Streich et al., 2023)

### **Gruppe 3: COO-Klassifikation als UNC mittels GEP**

In 2/30 Fällen (7 %) konnte trotz wiederholter Analyse keine Zuordnung des Falls in die Kategorien GCB oder ABC mittels GEP getroffen werden, sodass diese Fälle (Fall-Nr. 10 und 34) unklassifizierbar verblieben (UNC). (Streich et al., 2023)

## Ergebnisse

Die Patienten, von denen diese Fälle stammten, waren bei Diagnosestellung 37 bzw. 69 Jahre alt. In beiden Fällen handelte es sich um ein DLBCLs im niedrigen klinischen Stadium (II). Der IPI war in beiden Fällen LOW. Beide Patienten erhielten R-CHOP-haltige Chemotherapie. In einem Fall waren keine Informationen zum Therapieansprechen oder dem Verlauf verfügbar, im anderen Fall kam es nach einer Komplettremission im 51 Monate dauernden Follow-up nicht zu einem Rezidiv. (Streich et al., 2023)

Einer der beiden Fälle zeigte eine immunhistochemische Positivität für BCL6, MUM1 und BCL2 bei Negativität der übrigen untersuchten Marker und wurde daher als Non-GCB klassifiziert. Der andere Fall war immunhistochemisch positiv für CD10 und BCL6 bei Negativität für alle anderen untersuchten Marker und wurde daher als GCB klassifiziert. Beide Fälle zeigten mittels Ki-67 eine Proliferationsrate von über 50 %. (Streich et al., 2023)

Mittels FISH wurde in keinem der beiden Fälle eine Translokation in den untersuchten Genen nachgewiesen, allerdings wies einer der beiden Fälle Gains in *IRF4* und *IGH* auf. In diesem Fall wurden mittels NGS-Panelsequenzierung und Einzelamplikonerstellung Mutationen in *MYD88* und *PIM1* nachgewiesen, wobei es sich bei der Mutation von *MYD88* um eine der beiden nicht-kanonischen Mutationen im gesamten Fallkollektiv handelte. Im anderen Fall konnten keinerlei Mutationen nachgewiesen werden. (Streich et al., 2023)

## 4 Diskussion

In dieser Studie wurden 30 Fälle von DLBCLs und FLs 3B des Waldeyer'schen Rachenrings bei erwachsenen Patienten auf ihre morphologischen und molekularen Eigenschaften hin untersucht und auf Fälle der neuen Entität LBCL-*IRF4* überprüft. Durch den Einsatz von IHC, FISH, NGS und GEP ist es gelungen, eine umfassende genetische Charakterisierung der Lymphome des WR zu erstellen und diese Fälle anhand ihrer Eigenschaften zu gruppieren. Weiterhin war es möglich, Fälle der neuen Entität LBCL-*IRF4* zuzuordnen.

### 4.1 Repräsentatives Fallkollektiv für DLBCLs und FLs 3B/FLBLs des Waldeyer'schen Rachenrings

Das mediane Alter bei Diagnosestellung lag in diesem Fallkollektiv bei 69,5 Jahren und entsprach damit den Daten aus der Literatur (Hesius et al., 2023, Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2022). Das mediane Alter der Patienten in der Gruppe der FLs 3B/FLBLs war knapp 10 Jahre höher als das der Patienten mit DLBCL, wobei die Aussagekraft dieser Tatsache aufgrund der kleinen Anzahl an Fällen mit FL 3B/FLBL deutlich eingeschränkt ist. Der jüngste Patient im Fallkollektiv war 37 Jahre alt, was einerseits durch den Ausschluss von pädiatrischen Fällen erklärt werden kann, andererseits war aufgrund des hohen Durchschnittsalters der Erkrankung bei Diagnose und dem kleinen Fallkollektiv die Prätest-Wahrscheinlichkeit, Fälle von jüngeren Patienten zu finden, deutlich eingeschränkt. Somit spiegelt das hier beschriebene Fallkollektiv in der Gesamtschau die Bandbreite der Fälle in der Bevölkerung recht gut wider.

Nur bei 77 % der Patienten waren Daten zum klinischen Verlauf verfügbar. Der Großteil (78 %) der Patienten präsentierte sich bei Diagnosestellung mit einem niedrigen klinischen Stadium (Ann-Arbor-Stadium I oder II). In der Literatur sind hierzu noch höhere Anteile an Patienten mit niedrigem klinischem Stadium beschrieben, teilweise bis zu 92 % (de Leval et al., 2012, Jing et al., 2017, Qi et al., 2009). Dieser Unterschied kann aber aufgrund der geringen Fallanzahl wahrscheinlich als Zufallsereignis erklärt werden.

Der *International Prognostic Index* war in 67 % der Fälle verfügbar. Hierbei waren 70 % der Fälle der Kategorie LOW zuzuordnen, die verbleibenden Fälle in absteigender

Häufigkeit den nächsthöheren Kategorien. Damit entspricht diese Verteilung des Fallkollektivs auf die verschiedenen IPI-Gruppen den aus der Literatur bekannten Daten (de Leval et al., 2012, Jing et al., 2017, Qi et al., 2009).

Der Großteil der Patienten erhielt eine R-CHOP-haltige Chemotherapie, bei einigen Patienten unter Hinzunahmen von weiteren therapeutischen Maßnahmen. R-CHOP gilt aktuell als Standardtherapie bei Patienten mit DLBCL, unabhängig von der Lokalisation, sodass hierbei kein Unterschied zu Fällen außerhalb des WR gefunden werden konnte (Coiffier et al., 2002, Coiffier et al., 2010).

Die Erhebung von systematischen Daten zum erkrankungsfreien Überleben oder Gesamtüberleben war aufgrund des Studiendesigns in dieser Arbeit nicht möglich. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass Lymphome im WR generell eine gute Prognose besitzen, was jedoch möglicherweise eher durch das tendenziell niedrigere Stadium als die Lokalisation im WR zu erklären ist (de Leval et al., 2012, Jing et al., 2017, Oh et al., 2013, Qi et al., 2009).

Zusammenfassend ist das hier beschriebene Fallkollektiv also mit den genannten Einschränkungen als repräsentativ für DLBCL und FL 3B/FLBL im Waldeyer'schen Ring bei erwachsenen Patienten zu betrachten.

### **4.2 Chancen und Grenzen der Immunhistochemie**

Mittels des immunhistochemischen Algorithmus nach Hans et al. (2004) wurden 60 % der Fälle als GCB klassifiziert, die verbleibenden 40 % als Non-GCB. Damit stimmt das Ergebnis sehr gut mit den Daten von de Leval et al. (2012) überein, wobei andere Studien innerhalb des WR GCB-Raten von 20 % und außerhalb des WR von 40 bis 53 % berichten (Copie-Bergman et al., 2009, Hans et al., 2004, Ma et al., 2020, Ott et al., 2010). Die beiden Fälle von FL 3B/FLBL zeigten einen Non-GCB-Phänotyp, was für Low-Grade-FL ungewöhnlich ist, da diese aus den Keimzentrums-B-Zellen entstehen, und somit einen GCB-Phänotyp zeigen sollten, bei High-Grade-FL allerdings vorbekannt ist (Alaggio et al., 2022, Campo et al., 2022). In der Literatur sind derartige FL jedoch bereits vorbeschrieben und zeigen ungewöhnliche klinische und molekulare Eigenschaften, unter anderen ein hohes Grading und das Fehlen der für FL charakteristischen t(14;18) *BCL2*/IGH-Translokation (Karube et al., 2007). Daher sollten diese Fälle nicht als klassische folliculäre Lymphome betrachtet werden; die fünfte Edition der WHO-Klassifikation der Tumore der hämatopoetischen und lymphatischen Gewebe definiert

diese Fälle als follikuläres großes B-Zell-Lymphom (FLBL) (Alaggio et al., 2022). Generell haben GCB-Fälle unabhängig von der Lokalisation eine bessere Prognose als Non-GCB-Fälle, was auch für WR-DLBCL gezeigt werden konnte (de Leval et al., 2012, Fu et al., 2008, Meyer et al., 2011). Somit kann die bessere Prognose der WR-DLBCL neben dem generell niedrigeren klinischen Stadium auch mit dem erhöhten Anteil an GCB-Fällen zusammenhängen.

Fünf der GCB-Fälle zeigten eine Expression aller drei immunhistochemischen Marker des Hans-Algorithmus, sodass diese Fälle als Fälle mit aberranter Koexpression von CD10, BCL6 und MUM1 gewertet wurden. Fälle mit diesem Expressionsmuster haben ein großes Spektrum an genetischen Alterationen und werden aufgrund der CD10-Expression immunhistochemisch immer als GCB klassifiziert, wobei mittels GEP große Teile dieser Fälle als ABC zu klassifizieren oder unklassifizierbar sind (Frauenfeld et al., 2022). Somit sollte in Fällen mit aberranter immunhistochemischer Expression von CD10, BCL6 und MUM1 immer eine COO-Klassifikation mittels GEP erfolgen.

BCL2 wurde in 77 % der Fälle exprimiert, wobei alle Non-GCB-Fälle BCL2 exprimierten, und nur 61 % der GCB-Fälle positiv für BCL2 waren. Alle Fälle, die eine *BCL2*-Translokation oder -Mutation zeigten, waren auch immunhistochemisch positiv für BCL2. In der Literatur werden sowohl aus Studien innerhalb, als auch außerhalb des WR niedrigere Anteile an BCL2-positiven Fällen berichtet (Berglund et al., 2005, de Leval et al., 2012). Studien vor der R-CHOP-Ära konnten zeigen, dass die BCL2-Expression mit einem schlechten klinischen Outcome assoziiert ist (Colomo et al., 2003, Gascoyne et al., 1997, Hermine et al., 1996). Diese Ergebnisse wurden seit Einführung von R-CHOP als Standardtherapie mehrmals mit unterschiedlichen Ergebnissen überprüft (Mounier et al., 2003, Tsuyama et al., 2017). Seit der Einführung des BCL2-Inhibitors Venetoclax spielt der Translokations- und Expressionsstatus von *BCL2/BCL2* eine stärkere Rolle, da Patienten mit BCL2-Expression von einer direkten BCL2-Inhibition profitieren können (Morschhauser et al., 2021, Zelenetz et al., 2019). Somit sollte bei Hochrisikopatienten eine Bestimmung der BCL2-Expression erfolgen, um die Erfolgsaussichten einer Therapie mit Venetoclax abschätzen zu können.

Die Proliferationsrate war über das gesamte Fallkollektiv hinweg hoch bis sehr hoch, hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen GCB- und Non-GCB-Fällen. Es ist bekannt, dass eine hohe Proliferationsrate mit einem schlechteren Therapieansprechen und höheren Rezidivraten assoziiert ist (Gaudio et al., 2011, He et al., 2014, Li et al., 2012, Yoon et al., 2010).

### 4.3 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung als Wegweiser für weiterführende Diagnostik

In zwei Fällen konnten Translokationen von *IRF4* nachgewiesen werden, was die Diagnose als großzelliges B-Zell-Lymphom mit *IRF4*-Rearrangement rechtfertigte. Der Anteil an LBCL-*IRF4*-Fällen an allen Fällen lag damit bei 7 % und somit im Rahmen der Angaben in der Literatur von 2 bis 13 % für Studien in adulten und gemischten Fallkollektiven (de Leval et al., 2012, Hesius et al., 2023, Salaverria et al., 2011). Bei Betrachtung rein pädiatrischer Fallkollektive zeigen sich deutlich höhere Anteile von LBCL-*IRF4* von bis zu 32 %, wobei auch hier der Großteil der Fälle im WR auftrat (Au-Yeung et al., 2020, Ramis-Zaldivar et al., 2020). Auf die Fälle der LBCL-*IRF4* wird im Abschnitt 4.7 detaillierter eingegangen.

Sechs Fälle zeigten eine Translokation von *BCL2*, wobei alle diese Fälle als GCB klassifiziert wurden. Diese Konstellation ist typisch, da *BCL2* im Rahmen der Keimzentrumsreaktion durch die RAG-Enzyme in die Nähe der IGH-Promotorregion transloziert werden kann (Raghavan et al., 2004, Vaandrager et al., 2000). Auch in der Literatur ist die typische t(14;18)(q32;q21)-Translokation vor allem in GCBs beschrieben worden (Iqbal et al., 2004, Scott et al., 2018). Durch die *BCL2*-Translokation in die Nähe des IGH-Promotors kommt es typischerweise auch zu einer *BCL2*-Expression, die auch in allen *BCL2*-translozierten Fällen in diesem Fallkollektiv nachgewiesen werden konnte. In diesen Fällen kann eine spezifische Inhibition von *BCL2* mit Venetoclax weniger wirksam sein, sodass Patienten vor einer Therapie mit Venetoclax auf eine solche Translokation getestet werden sollten (Bodo et al., 2016).

IGH-Translokationen konnten in insgesamt 13 Fällen nachgewiesen werden. Hierbei konnten in sechs Fällen entweder *IRF4* oder *BCL2* als wahrscheinlicher Translokationspartner identifiziert werden. In den verbleibenden sieben Fällen gelang kein Nachweis eines Translokationspartners, sodass eine vorhandene Translokation in *IRF4* oder *BCL2* mit den verwendeten Sonden möglicherweise nicht detektiert werden konnte. Diese Problematik ist auch in der Literatur bereits vorbeschrieben (Chen et al., 2017, Quintanilla-Martinez et al., 2016). Eine andere Möglichkeit ist, dass Translokationen in Genen vorliegen, die nicht untersucht wurden, bspw. in *BCL6* oder *MYC*, welche in DLBCL häufig beschrieben sind (Li et al., 2019, Riedell und Smith, 2018, Rosenthal und Younes, 2017, Scott et al., 2018). Um eine umfassende Charakterisierung dieser Fälle zu erreichen, sollte also unter Umständen weitere FISH-

Analysen durchgeführt werden, da Translokationen in *BCL2*, *BCL6* und/oder *MYC* die Diagnose eines Double/Triple Hit-Lymphoms zulassen, welche durch ein vermindertes Therapieansprechen und eine schlechtere Prognose gekennzeichnet sind (Dodero et al., 2022, Rosenthal und Younes, 2017).

In allen Fällen mit einer Translokation von *IRF4* oder *BCL2* zeigte sich in der nachfolgend durchgeführten Mutationsanalyse (siehe auch Abschnitt 4.5) eine Mutation des entsprechenden Genes. Aufgrund der therapeutischen Implikationen der Mutationen sollte also in Fällen mit Translokationen der genannten Gene eine Mutationsanalyse folgen.

### **4.4 Vorteile der Genexpressionsprofilanalyse**

Mittels GEP war eine COO-Klassifikation in 28 Fällen möglich, jeweils 14 Fälle wurden als GCB und ABC klassifiziert, zwei Fälle verblieben unklassifizierbar. Es zeigte sich hierbei ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Diagnose der IHC und des GEP, sodass die IHC als Surrogatmarker für die GEP bei WR-DLBCL bestätigt wurde (Hans et al., 2004). Allerdings lag in fünf Fällen ein diskrepantes Ergebnis zwischen IHC und GEP vor, wobei zwei der Fälle mittels GEP unklassifizierbar waren und daher einen Vergleich mit der IHC nicht zuließen. Von den verbleibenden drei Fällen waren zwei der Fälle immunhistochemisch positiv für CD10, BCL6 und MUM1 und wurden daher als GCB klassifiziert, während das GEP sie als ABC klassifizierte. Diese Fälle sollten daher nicht mittels des Algorithmus nach Hans et al. (2004) klassifiziert werden, da bekannt ist, dass diese Fälle heterogen sind und ein großes Spektrum an genetischen Alterationen aufweisen können (Frauenfeld et al., 2022).

Für *MME*, *BCL6* und *IRF4*, die für die im Algorithmus nach Hans et al. (2004) enthaltenen Proteine CD10, BCL6 und MUM1 kodieren, konnten signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den drei GEP-Subgruppen GCB, ABC und UNC nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Genexpression von *BCL2* zwischen den Subgruppen. Somit konnte die Verwendung von CD10, BCL6 und MUM1 für die immunhistochemische COO-Klassifikation bestätigt werden. Insgesamt waren 27 Gene zwischen den GEP-Subgruppen signifikant unterschiedlich exprimiert; diese Gene könnten in zukünftigen Arbeiten die Grundlage für neue COO-Klassifikationsmodelle sein (Masqué-Soler et al., 2013, Read et al., 2014, Scott et al., 2014, Wright et al., 2020).

Auch bei Vergleich der Genexpression von *MME/CD10*, *BCL6/BCL6* und *IRF4/MUM1* abhängig vom immunhistochemischen Expressionsstatus zeigten sich signifikante Unterschiede, wodurch die Immunhistochemie als Surrogatmarker für die Genexpression bestätigt werden konnte.

Anhand der Ergebnisse der Genexpressionsprofil-Analyse wurde eine Subgruppierung der Fälle in drei Gruppen vorgenommen, hierzu siehe Abschnitt 4.6.

### **4.5 Mutationsanalyse als Wegweiser für neue Klassifikationssysteme**

Insgesamt konnten 65 Mutationen im Fallkollektiv identifiziert werden, wobei sich diese Fälle auf 20 mutierte Fälle verteilen, die verbleibenden 10 Fällen waren nicht mutiert für die untersuchten Gene. Mittels NGS-Panelsequenzierung und Einzelamplikons wurden die Fälle nur auf Mutationen in *BCL2*, *BCL6*, *CARD11*, *CD79B*, *EZH2*, *IRF4*, *MYD88*, *PIM1*, *PRDM1* und *TNFAIP3* untersucht. Aus den Arbeiten von Chapuy et al. (2018), Lacy et al. (2020), Schmitz et al. (2018) und Wright et al. (2020) ist jedoch bekannt, dass zum Mutationsspektrum von DLBCLs weit mehr Gene gehören. Somit ist anzunehmen, dass Mutationen von bspw. *NOTCH1/2*, *JAK1/2* oder *TP53* zwar vorliegen können, mit den verwendeten Methoden allerdings nicht untersucht werden konnten.

Bemerkenswert ist, dass in allen Fällen mit Translokationen von *IRF4* oder *BCL2* auch Mutationen in den entsprechenden Genen nachgewiesen werden konnten. Anhand des Musters der Mutationen und der Tatsache, dass in all diesen Fällen ebenfalls IGH transloziert war, ist davon auszugehen, dass es sich zumindest bei einem Teil dieser Mutationen um Fälle von aberranter somatischer Hypermutation (aSHM) handelt (Burkhard et al., 2015, Hadj Khodabakhshi et al., 2012, Pasqualucci et al., 2001).

Die Betrachtung der einzelnen Mutationen erfolgt getrennt für die GEP-Subgruppen, siehe Abschnitt 4.6.

### **4.6 Subgruppierung der Fälle nach der *Cell of Origin***

Für die COO-Klassifikation gilt die Genexpressionsprofil-Analyse als Goldstandard (Hans et al., 2004, Scott et al., 2014). Daher wurde anhand der mittels GEP erhobenen COO-Klassifikation eine Subgruppierung der Fälle vorgenommen.

#### 4.6.1 GCB-DLBCLs mit häufigen *BCL2*-Translokationen/-Mutationen und LBCL-*IRF4*

Mittels GEP wurden 14 Fälle als GCB klassifiziert, alle diese Fälle waren auch mittels IHC als GCB klassifiziert worden. Somit gab es in dieser Subgruppe eine 100-prozentige Übereinstimmung von GEP und dem Surrogatmarker IHC.

Der überwiegende Teil der Patienten zeigte ein niedriges klinisches Stadium, IPI LOW und erhielt eine R-CHOP-haltige Chemotherapie. In der Literatur sind für Fälle mit GCB COO deutlich bessere Verläufe in Bezug auf PFS und OS beschrieben, sowohl für Fallkollektive von WR-DLBCL als auch DLBCL außerhalb des Waldeyer'schen Rachenrings (Berglund et al., 2005, de Leval et al., 2012, Jing et al., 2017). In allen bis auf einen Fall wurde unter Therapie eine Komplettremission erreicht, der verbleibende Fall zeigte eine partielle Remission, im weiteren Verlauf waren zu diesem Fall allerdings keine Follow-up-Daten mehr verfügbar. Aufgrund des Studiendesigns ist es nicht möglich, Aussagen zum Überleben der Patienten zu treffen, jedoch gibt das überaus gute Therapieansprechen Grund zur Annahme, dass bei den Patienten in diesem Fallkollektiv ähnliche Langzeitverläufe wie in der Literatur beschrieben erreicht werden können.

Alle Fälle aus dieser Subgruppe exprimierten immunhistochemisch BCL6, und alle bis auf zwei Fälle außerdem CD10. Allerdings exprimierten drei Fälle außerdem MUM1, sodass es sich bei diesen Fällen um Fälle mit aberranter Co-Expression aller drei immunhistochemischer Marker (DLBCL-AE) handelte.

Zwei dieser Fälle mit aberranter Co-Expression zeigten ein *IRF4*-Rearrangement und waren daher der Gruppe der LBCL-*IRF4* zuzuordnen (s.u.). Somit sollten Fälle mit aberranter Co-Expression von CD10, BCL6 und MUM1 für Translokationen in *IRF4* gescreent werden, da bekannt ist, dass LBCL-*IRF4*-Fälle vermehrt in Fällen mit aberranter Co-Expression vorkommen, und LBCL-*IRF4* eine deutlich bessere Prognose als DLBCL-AE haben (Alaggio et al., 2022, Frauenfeld et al., 2022).

Translokationen von *BCL2* traten über das gesamte Fallkollektiv hinweg nur in dieser Subgruppe auf. Diese Tatsache wird durch die GCB COO unterstützt, da es im Rahmen der Keimzentrumsreaktion durch die RAG-Enzyme zu Translokationen von Genen wie *BCL2* oder *MYC* in die Nähe des IGH-Promotors kommen kann (Raghavan et al., 2004, Vaandrager et al., 2000, Wang et al., 2009). Alle Fälle mit *BCL2*-Translokation zeigten sowohl eine BCL2-Expression als auch Mutationen von *BCL2*, was in Zusammenschau

mit der Art der Mutationen eine Genese zumindest eines Teils der Mutationen durch die aberrante somatische Hypermutation wahrscheinlich erscheinen lässt (Burkhard et al., 2015, Hadj Khodabakhshi et al., 2012, Pasqualucci et al., 2001). In allen bis auf zwei Fällen mit *BCL2*-Translokation/-Mutation war auch eine IGH-Translokation nachweisbar, was eine t(14;18)-Translokation und damit eine aSHM von *BCL2* umso wahrscheinlicher erscheinen lässt. Allerdings konnte in den verbleibenden zwei Fällen mit *BCL2*-Translokation/-Mutation keine IGH-Translokation nachgewiesen werden. In der Literatur sind allerdings auch Translokationen mit den Genen der leichten Immunglobulinketten  $\lambda$  und  $\kappa$  (IGL, IGK) beschrieben, welche in diesen beiden Fällen als wahrscheinlich anzusehen sind (Martín-Subero et al., 2002). Der Anteil an *BCL2*-Translokationen von 43 % der GCB-Fälle in diesem Fallkollektiv lag deutlich über dem in der Literatur beschriebenen Anteil von *BCL2*-Translokationen in WR-DLBCL-Fallkollektiven (8 % bei de Leval et al. (2012), 10 % bei Ma et al. (2020)), und lag eher im Bereich des Anteils von Fallkollektiven außerhalb des WR (ca. 11 % bei Copie-Bergman et al. (2009), 34 % bei Iqbal et al. (2004)). Durch den methodenübergreifend bestimmten GCB-Subtyp, den Nachweis von Translokationen in *BCL2* und IGH in allen diesen Fällen und damit der als wahrscheinlich anzusehenden t(14;18)-*BCL2*::IGH-Translokation und den Nachweis von aSHM-typischen Mutationen von *BCL2* in allen Fällen sind diese Ergebnisse in der Zusammenschau als sehr schlüssig anzusehen.

Auffällig ist, dass beide Fälle von FL 3B/FLBL nicht dieser Gruppe zuzuordnen waren, und stattdessen sowohl mittels GEP als auch IHC der Gruppe der ABC-/Non-GCB-Fälle zugeordnet wurden. Weiterhin zeigten diese beiden Fälle auch nicht die für FL charakteristischen *BCL2*- und IGH-Translokationen. Dieses Ergebnis unterstützt die Klassifikation der FL 3B als follikuläre große B-Zell-Lymphome (FLBL) in der fünften Edition der WHO-Klassifikation (Alaggio et al., 2022). Auf die beiden Fälle der FL wird auch in Abschnitt 4.8 eingegangen.

Neben den Mutationen von *IRF4* und *BCL2* traten in dieser Subgruppe weitere Mutationen auf. An erster Stelle sind hierbei zwei Fälle mit Mutationen in *EZH2* zu nennen, welche die einzigen *EZH2*-Mutationen im gesamten Fallkollektiv bildeten. In beiden Fällen bestand auch eine *BCL2*-Translokation/-Mutation, sodass diese Fälle als EZB-Subtyp gemäß Schmitz et al. (2018) zu klassifizieren sind. Diese Fälle haben zusammen mit Fällen des BN2-Subtyps das beste PFS und OS aller DLBCL, zeigen im Vergleich zu anderen GCB-DLBCL ohne diese genetischen Alterationen jedoch ein schlechteres OS (Schmitz et al., 2018). Somit kann diese Arbeit die Zugehörigkeit des

EZB-Subtyps nach Schmitz et al. (2018) in die GCB-COO-Subgruppe bestätigen. Eine Evaluation der Fälle auf Vorhandensein des BN2-Subtyps war nicht möglich, da die Fälle nicht auf *BCL6*-Fusionen oder *NOTCH2*-Mutationen untersucht wurden.

In einem Fall der GCB-DLBCL wurde eine nicht-kanonische Mutation von *MYD88* (p.S219C) detektiert. Dieses war die einzige Mutation von *MYD88* in der gesamten Subgruppe der GCB-DLBCL. Der mutierte Fall zeigte neben dieser Mutation auch keine anderen Mutationen oder Translokationen. Die detektierte Mutation ist in der Literatur bekannt und stellt die häufigste *MYD88*-Mutation in GCB-DLBCL und die zweithäufigste *MYD88*-Mutation neben p.L265P, welche charakteristisch für ABC-DLBCL ist, dar (Jiang et al., 2020, Ngo et al., 2011, Rovira et al., 2016).

Ein Fall aus dieser Subgruppe zeigte neben einer *BCL2*-Translokation/-Mutation auch eine *BCL6*-Mutation sowie eine *CARD11*-Mutation. Immunhistochemisch exprimierte dieser Fall CD10, *BCL6* und *BCL2*. *BCL6*-Mutationen sind sowohl in normalen Keimzentrums-B-Zellen als auch in GCB-DLBCL bekannt, vor allem im Bereich der – in dieser Studie nicht untersuchten – 5'-nichtkodierenden Region von *BCL6* und treten im Rahmen der somatischen Hypermutation als auch als Ergebnis der aSHM auf (Migliazza et al., 1995, Pasqualucci et al., 1998, Shen et al., 1998). In diesem Fall lag neben der *BCL2*-Translokation auch eine Translokation von IGH vor, während *BCL6* in dieser Arbeit nicht auf Translokationen hin untersucht wurde. Somit besteht die Möglichkeit, dass in diesem Fall eine *BCL6*-Translokation vorliegt. Dieser Fall wurde aufgrund von zu wenig vorhandenem FFPE-Material nicht auf eine immunhistochemische *MYC*-Expression hin untersucht, welche Grundlage für eine *MYC*-FISH war. Somit besteht die Möglichkeit, dass in diesem Fall ein Double/Triple Hit-Lymphom vorliegt, ohne dass es mit den verwendeten Methoden zu diagnostizieren gewesen wäre. Der Patient präsentierte sich mit einem Ann-Arbor-Stadium III und erhielt R-CHOP-Chemotherapie, zusätzlich Rituximab, sowie R-BEAM-Chemotherapie und eine Stammzelltransplantation, da in diesem Fall das einzige Rezidiv im gesamten Fallkollektiv auftrat. Double/Triple Hit-Lymphome sind für ihren aggressiven klinischen Verlauf und das schlechte Therapieansprechen auf herkömmliche R-CHOP-Chemotherapie bekannt (Doderio et al., 2022, Dunleavy, 2021, Ennishi et al., 2019, Riedell und Smith, 2018, Rosenthal und Younes, 2017). In Zusammenschau der verfügbaren klinischen und molekularpathologischen Eigenschaften scheint die Diagnose eines aggressiven Double/Triple Hit-Lymphoms wahrscheinlich, ohne dass sie am vorhandenen Material zu beweisen wäre. Somit sollte in Fällen mit

immunohistochemischer Expression von BCL6, BCL2 und/oder MYC nach Möglichkeit eine entsprechende FISH-Diagnostik angeschlossen werden, um DH/TH-Lymphome zu diagnostizieren. Auch kann die Mutationsanalyse in diesen Fällen wertvolle Hinweise zum Therapieansprechen und zur Prognose geben.

### **4.6.2 ABC-DLBCL mit Mutationen im NF- $\kappa$ B-Pathway und FL Grad 3B/FLBL**

14 Fälle wurden mittels GEP als ABC-COO klassifiziert, wobei drei dieser Fälle mittels IHC als GCB klassifiziert worden waren. Die Übereinstimmung von GEP und IHC war in dieser Subgruppe dementsprechend 76 %. Innerhalb dieser Gruppe waren auch die beiden Fälle der folliculären Lymphome Grad 3B/folliculären großzelligen B-Zell-Lymphome (FLBL) nach ICC- bzw. neuer WHO-Klassifikation einzuordnen (Alaggio et al., 2022, Campo et al., 2022). Auf diese Fälle wird in Abschnitt 4.8 genauer eingegangen.

Der überwiegende Teil der Fälle in dieser Subgruppe zeigte ein niedriges klinisches Stadium, IPI LOW und erhielt eine R-CHOP-haltige Chemotherapie. In allen Fällen, in denen Daten zum Therapieansprechen verfügbar waren, stellte sich nach Therapie eine Komplettremission ein. Daten aus der Literatur zeigen eine wesentlich schlechtere Prognose von ABC-DLBCLs im Vergleich zur GCB-Subgruppe (Berglund et al., 2005, de Leval et al., 2012, Jing et al., 2017). Aufgrund des Studiendesigns können diese Daten weder bestätigt noch widerlegt werden, jedoch geben die teilweise langen Follow-up-Zeiträume von bis zu 125 Monaten Grund zur Annahme, dass auch bei den Patienten mit ABC-DLBCL eine stabile Remission erreicht werden konnte.

Alle bis auf einen bzw. zwei Fälle in dieser Subgruppe exprimierten immunohistochemisch MUM1 bzw. BCL6. CD10 wurde nur von den drei Fällen exprimiert, die mittels des Algorithmus nach Hans et al. (2004) als GCB klassifiziert worden waren. Von diesen drei Fällen waren zwei Fälle als DLBCL-AE-Fälle mit aberranter Expression aller drei immunohistochemischer Marker des Hans-Algorithmus zu klassifizieren. Diese Fälle werden in Abschnitt 4.10 detailliert diskutiert.

In der Subgruppe der ABCs wurde in keinem Fall eine Translokation von *IRF4* oder *BCL2* nachgewiesen, lediglich in vier Fällen zeigten sich IGH-Translokationen. Somit war in dieser Subgruppe kein Fall als LBCL-*IRF4* zu klassifizieren.

In 50 % der Fälle in dieser Subgruppe traten Mutationen in *CARD11*, *CD79B*, *MYD88* und *TNFAIP3* auf, welche alle dem NF- $\kappa$ B-Pathway zuzuordnen sind und typisch für ABC-DLBCL sind (Davis et al., 2001). Ein gleichzeitiges Vorliegen einer Translokation von *CD79B* und *MYD88*, wie es charakteristisch für MCD-Subtyp nach Schmitz et al. (2018) ist, konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Allerdings waren in drei Fällen *CD79B*- und in zwei Fällen *MYD88*<sup>p.L265P</sup>-Mutationen nachweisbar, welche einen starken Hinweis auf den MCD-Subtyp geben. Insbesondere die *MYD88*<sup>p.L265P</sup>-Mutation ist hierbei mit einem schlechten klinischen Outcome assoziiert (Rovira et al., 2016). Drei der fünf Fälle mit *CD79B*/*MYD88*-Mutation waren sowohl mittels GEP als auch IHC als ABC/Non-GCB klassifiziert worden und zeigten außer den beschriebenen Mutationen in *CD79B* und *MYD88* keine weiteren Mutationen.

Einer der Fälle mit diskrepanter COO-Klassifikation mittels GEP und IHC zeigte neben der kanonischen *MYD88*-Mutation zusätzliche Mutationen in *PIM1* und *PRDM1*, dieser Fall wird in Abschnitt 4.9 detailliert diskutiert.

Ein weiterer Fall mit konkordanter COO-Klassifikation mittels GEP und IHC zeigte ein überaus ungewöhnliches genetisches Muster: Neben einer *CD79B*-Mutation trat auch eine für ABC-DLBCL untypische *BCL2*-Mutation bei gleichzeitiger immunhistochemischer *BCL2*-Expression auf, ohne dass eine *BCL2*-Translokation nachweisbar gewesen wäre. Außerdem zeigte dieser Fall eine Mutation in *PIM1*. Mittels FISH war in diesem Fall lediglich eine IGH-Translokation nachweisbar. Aus der Literatur sind insbesondere Fälle von follikulären Lymphomen mit kryptischen *BCL2*-Translokationen bekannt, die mittels herkömmlichen FISH-Sonden nicht nachweisbar sind (Baró et al., 2011, Horsman et al., 2003). Aufgrund der starken immunhistochemischen *BCL2*-Expression und der *BCL2*-Mutation ist daher in diesem Fall von einer kryptischen *BCL2*-Translokation auszugehen, die mit den verwendeten Methoden nicht detektierbar war. Dieser Fall ist aufgrund des Mutationsspektrums nicht klar in die von Schmitz et al. (2018) definierten Subgruppen einzuordnen: Einerseits liegt eine MCD-typische *CD79B*-Mutation vor, jedoch ohne gleichzeitig vorliegende *MYD88*<sup>p.L265P</sup>-Mutation. Andererseits liegt eine *BCL2*-Mutation vor, die als Hinweis für eine kryptische *BCL2*-Translokation gelten kann, was wiederum ein Kriterium für den EZB-Subtyp ist. Klinisch präsentierte sich dieser Fall unauffällig, es lag bei Diagnose ein Stadium IA, IPI LOW vor, und nach Chemotherapie mit R-CHOP und zusätzlichem Rituximab lag auch nach 74 Monaten Follow-up eine Komplettremission vor. Somit bleibt die genaue Pathogenese in diesem Fall unklar, und eine umfangreichere

molekularpathologische Diagnostik bspw. nach den Algorithmen von Chapuy et al. (2018), Wright et al. (2020) könnte in diesem Fall weitere Klärung bringen.

### 4.6.3 Unklassifizierbare Fälle als heterogene Subgruppe

In zwei Fällen war mittels GEP keine COO-Klassifikation möglich, sodass diese Fälle unklassifizierbar (UNC) verblieben.

Ein Fall exprimierte immunhistochemisch BCL6, MUM1 und BCL2 und wurde daher als Non-GCB klassifiziert. Mittels FISH waren in diesem Fall keine Translokationen nachweisbar. Die Mutationsanalyse erbrachte in diesem Fall eine nicht-kanonische *MYD88*-Mutation (p.S243N). Diese Mutation ist in der Literatur als dritthäufigste *MYD88*-Mutation nach p.L265P und p.S219C bekannt und tritt vor allem in GCB-DLBCLs auf (Jiang et al., 2020, Ngo et al., 2011, Rovira et al., 2016). Diese Variante ist im Gegensatz zur kanonischen *MYD88*<sup>p.L265P</sup>-Mutation nicht mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Rovira et al., 2016).

Der andere Fall zeigte eine immunhistochemische Expression von CD10 und BCL6 und wurde daher als GCB klassifiziert. Mittels FISH und NGS ließen sich in diesem Fall keinerlei genomische Alterationen nachweisen, sodass die Pathogenese dieses Fall unklar bleibt.

In der Literatur sind Raten von 7 bis 15 % an mittels GEP unklassifizierbaren Fällen beschrieben (Balasubramanian et al., 2021, Frauenfeld et al., 2022, Plaça et al., 2022, Wright et al., 2003), sodass die Rate von 7 % in dieser Studie genau im erwartungsgemäßen Bereich liegt. Aufgrund der geringen Fallanzahl in dieser Studie und der Literatur sind Aussagen zu klinischer Präsentation, Therapieansprechen und Prognose dieser Fälle schwierig. Neue, auf Methoden wie der Mutationsanalyse basierende, Klassifikationen wie nach Chapuy et al. (2018), Schmitz et al. (2018) und Wright et al. (2020) könnten in diesen Fällen zu Klärung der Pathogenese beitragen und damit auch klinische Implikationen geben.

## 4.7 LBCL-*IRF4* als definite Entität

In dieser Studie sollte die Prävalenz des LBCL-*IRF4* innerhalb des WR bei erwachsenen Patienten bestimmt werden. Mittels FISH konnte in zwei Fällen die charakteristische *IRF4*-Translokation nachgewiesen werden, sodass die Prävalenz in diesem Fallkollektiv bei 7 % liegt. Damit liegt das Ergebnis im Rahmen der in der Literatur zu findenden Prävalenz von 8 % für WR-DLBCL bei Erwachsenen (de Leval et al., 2012), 2 % bei Erwachsenen unabhängig von der Lokalisation (Hesius et al., 2023), 6 bis 21 % bei Kindern unabhängig von der Lokalisation (Au-Yeung et al., 2020, Chisholm et al., 2019) bzw. 13 % bei Erwachsenen und Kindern unabhängig von der Lokalisation (Salaverria et al., 2011). Die Altersverteilung der Fälle in der Literatur und in dieser Studie ist auch Abbildung 15 zu entnehmen.

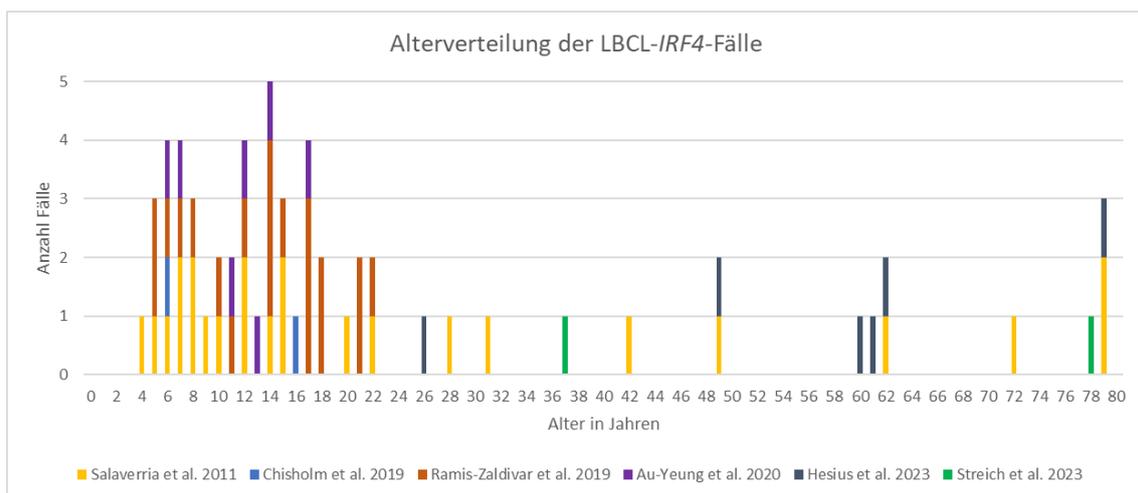


Abbildung 15: Altersverteilung der LBCL-*IRF4*-Fälle in der Literatur (Au-Yeung et al., 2020, Chisholm et al., 2019, Ramis-Zaldivar et al., 2020, Salaverria et al., 2011) und in dieser Studie (Hesius et al., 2023, Streich et al., 2023). Auf der X-Achse ist das Alter in Jahren aufgetragen, auf der Y-Achse die Anzahl der Fälle in diesem Alter, farbkodiert nach Studie. Beachten ist hierbei, dass die Daten verzerrt sein können, da Au-Yeung et al. (2020), Chisholm et al. (2019) und Ramis-Zaldivar et al. (2020) nur Kinder bzw. junge Erwachsene in ihre Studien eingeschlossen haben.

Hierbei fällt auf, dass der Großteil der Fälle des LBCL-*IRF4* Kinder und junge Erwachsene bis 22 Jahre betrifft, und danach nur noch sporadische Fälle auftreten. Die beiden in dieser Studie berichteten Patienten mit LBCL-*IRF4* sind 37 und 78 Jahre alt, damit bildet der 78-jährige Patient einen der ältesten Patienten mit LBCL-*IRF4* überhaupt, die in der Literatur bekannt sind. Allerdings haben Au-Yeung et al. (2020), Chisholm et al. (2019) und Ramis-Zaldivar et al. (2020) nur Kinder bzw. junge Erwachsene in ihre Studien eingeschlossen, sodass die Verteilung verzerrt sein könnte.

## Diskussion

In Abbildung 16 sind daher diese Daten nur für die Studien aufgetragen, die sowohl Erwachsene als auch Kinder eingeschlossen haben. Auch nach Ausschluss der rein pädiatrischen Studien fällt auf, dass weiterhin eine Häufung an LBCL-*IRF4*-Fällen bei Kindern vorhanden ist.

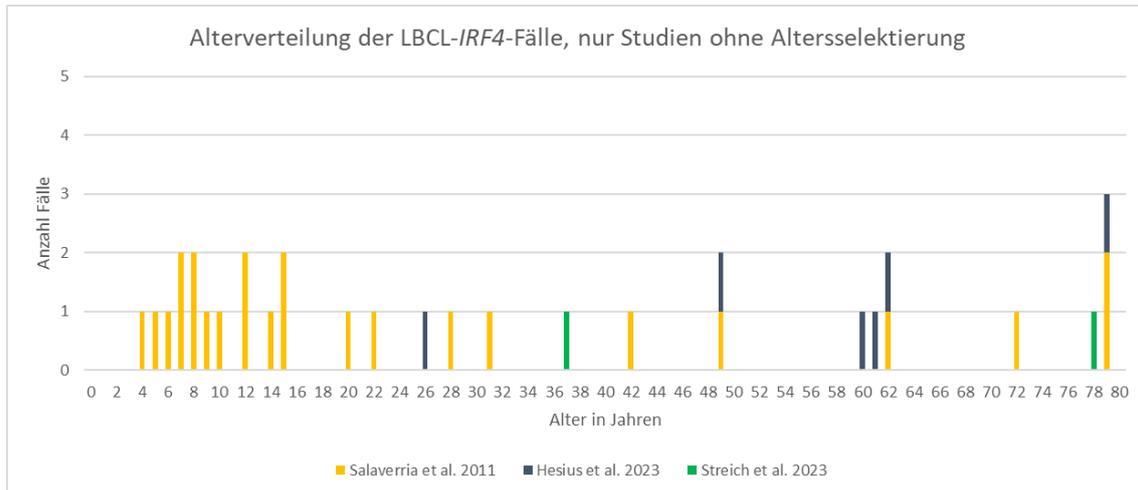


Abbildung 16: Altersverteilung der LBCL-*IRF4*-Fälle in nicht-altersselektierten Studien (Salaverria et al., 2011) und in dieser Studie (Streich et al., 2023). Auf der X-Achse ist das Alter in Jahren aufgetragen, auf der Y-Achse die Anzahl der Fälle in diesem Alter, farbkodiert nach Studie.

Beide LBCL-*IRF4*-Fälle in dieser Studie wurden mittels GEP und IHC als GCB klassifiziert, wobei beide Fälle eine aberrante Expression von CD10, BCL6 und MUM1 (DLBCL-AE) zeigten. Aus der Literatur ist bekannt, dass das LBCL-*IRF4* bei Erwachsenen gehäuft als DLBCL-AEs auftritt (Frauenfeld et al., 2022, Ramis-Zaldivar et al., 2020).

Beide LBCL-*IRF4*-Fälle zeigten auch *IRF4*-Mutationen, welche am ehesten im Rahmen der aberranten somatischen Hypermutation zu erklären waren (Burkhard et al., 2015, Hadj Khodabakhshi et al., 2012, Pasqualucci et al., 2001). Diese Vermutung wird durch die ebenfalls in beiden Fällen vorhandenen IGH-Translokation unterstützt. Mutationen in *IRF4* wurden nur in den beiden Fällen mit *IRF4*-Rearrangement gefunden, sodass der Nachweis von Mutationen in *IRF4*, und insbesondere im Fall von aSHM-typischen Mutationen, als Hinweis auf ein *IRF4*-Rearrangement gewertet werden kann.

## 4.8 FL 3B/FLBL als Lymphom mit ungewöhnlichen Eigenschaften

In der fünften Edition der WHO-Klassifikation werden die folliculären Lymphome Grad 3B in die folliculären großen B-Zell-Lymphome (FLBL) umbenannt, während die ICC-Klassifikation die Einteilung nach histologischem Grading beibehält (Alaggio et al., 2022, Campo et al., 2022). In dieser Studie konnten zwei Fälle von FL 3B/FLBLs im WR identifiziert werden.

Beide Fälle zeigten sowohl in der Immunhistochemie als auch in der Genexpressionsprofil-Analyse den für Low-Grade-FL ungewöhnlichen, in High-Grade-FL aber durchaus bekannten ABC/Non-GCB-Subtyp (Borovecki et al., 2008). Die Untersuchung der Proliferationsrate zeigte ein dahingehend interessantes Ergebnis, dass einer der Fälle eine sehr hohe Proliferationsrate von über 75 % zeigte, der andere jedoch mit unter 25 % die niedrigste Proliferationsrate im gesamten Fallkollektiv. In keinem der Fälle konnte die für folliculäre Lymphome charakteristische t(14;18)-*BCL2*:*IGH*-Translokation nachgewiesen werden. Trotz fehlender *BCL2*-Translokation zeigte sich in beiden Fällen eine kräftige immunhistochemische *BCL2*-Expression, welche in ABC-DLBCL aus der Aktivierung von *BCL2* über den NF- $\kappa$ B-Pathway resultiert (Davis et al., 2001, Hu et al., 2013, Iqbal et al., 2006, Lenz et al., 2008c, Lim et al., 2012). Einer der Fälle zeigte eine Mutation in *CARD11*, der andere in *TNFAIP3*, welches beides Gene aus dem NF- $\kappa$ B-Pathway sind. Somit konnten in diesen beiden t(14;18)-negativen FL 3B/FLBL-Fällen für klassische folliculäre Lymphome ungewöhnliche Eigenschaften nachgewiesen werden, was in der Literatur vorbekannt ist (Campo et al., 2022, Nann et al., 2020).

## 4.9 Nicht-übereinstimmende COO-Klassifikation

Die COO-Klassifikationen mittels GEP und IHC stimmten in 83 % der Fälle überein. Hierbei ist anzumerken, dass zwei Fälle mittels GEP unklassifizierbar waren, was in der immunhistochemischen Klassifikation nicht vorgesehen ist. Unter Ausschluss dieser beiden Fälle lag die Übereinstimmung somit bei 25/28 Fällen (89 %), was die Immunhistochemie als Surrogatmarker für die Genexpressionsprofilanalyse bestätigte (Hans et al., 2004).

Unter den Fällen mit nicht-übereinstimmender COO-Klassifikation waren zwei Fälle mit aberranter Expression von CD10, BCL6 und MUM1, welche aufgrund der Positivität für CD10 immer als GCB klassifiziert werden. Einer dieser Fälle zeigte jedoch eine für ABC-DLBCL charakteristische *MYD88*<sup>p.L265P</sup>-Mutation, und auch mittels GEP wurde dieser Fall als ABC klassifiziert. Somit sollte in Fällen von DLBCL-AE eine Überprüfung der COO-Klassifikation mittels GEP erfolgen (s.u.).

Ein weiterer Fall wurde bei Positivität für BCL6, MUM1 und BCL2 mittels IHC als Non-GCB klassifiziert, mittels GEP war dieser Fall UNC. Interessanterweise zeigte sich in diesem Fall eine nicht-kanonische *MYD88*<sup>p.S243N</sup>-Mutation, welche vor allem für GCBs typisch ist (Jiang et al., 2020, Rovira et al., 2016).

### 4.10 DLBCL-AE als heterogene Gruppe

Fünf Fälle des Fallkollektivs waren immunhistochemisch positiv für CD10, BCL6 und MUM1 und waren daher der Gruppe der DLBCL-AE zuzuordnen. Hiervon wurden mittels GEP drei Fälle als GCB klassifiziert, die verbleibenden zwei Fälle als ABC. Auf die Fälle mit nicht-übereinstimmender COO-Klassifikation wurde bereits in Abschnitt 4.9 eingegangen. Weiterhin waren unter den DLBCL-AE-Fällen beide LBCL-*IRF4*-Fälle aus diesem Fallkollektiv, auf welche in Abschnitt 4.7 eingegangen wurde. In der Literatur sind hierbei Anteile von *IRF4*-translozierten Fällen an DLBCL-AE-Fallkollektiven von 22 % beschrieben, sodass der Anteil in dieser Studie mit 40 % deutlich darüber liegt, was aber am ehesten der kleinen Fallanzahl geschuldet ist (Frauenfeld et al., 2022). Die Fälle von DLBCL-AE zeigten im Fall der beiden *IRF4*-translozierten Fälle auch *IRF4*-Mutationen, ein Fall zeigte eine *MYD88*<sup>p.L265P</sup>-Mutation, weiterhin zeigten sich einige Mutationen in *PIM1* und *PRDM1*. Insbesondere der Fall mit der *MYD88*<sup>p.L265P</sup>-Mutation zeigt somit deutliche Hinweise auf ein ABC/MCD-typisches molekulares Muster, was auch die GEP bestätigte (Wright et al., 2020).

### 4.11 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Studie wurden 30 Fälle von WR-DLBCLs bei erwachsenen Patienten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die klinisch-pathologischen Eigenschaften der Fälle in dieser Studie den Angaben zu WR-DLCBL und DLBCL außerhalb des WR in der Literatur entsprechen (de Leval et al., 2012, Jing et al., 2017). Die WR-DLBCL

stellten sich hierbei als genetisch heterogene Gruppe mit v.a. molekular definierten Subgruppen mit charakteristischen Eigenschaften dar. Etablierte Methoden wie die Immunhistochemie und die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung sind valide Methoden zur Initialdiagnostik bei WR-DLBCL, sollten aber im Fall von Auffälligkeiten durch Methoden wie die Genexpressionsprofilanalyse und *Next Generation Sequencing* ergänzt werden, da durch Ergebnisse dieser Methoden sowohl therapeutische als auch prognostische Implikationen möglich sind (Wright et al., 2020).

Diese Studie konnte die Prävalenz von LBCL-*IRF4*-Fällen innerhalb der WR-DLBCL und -FL 3B/FLBL bei erwachsenen Patienten bestätigen (de Leval et al., 2012). Beide Fälle in dieser Studie zeigen ein niedriges klinisches Stadium und gutes Therapieansprechen auf herkömmliche R-CHOP-Chemotherapie. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass LBCL-*IRF4* häufig eine aberrante Expression von CD10, BCL6 und MUM1 zeigen. Somit konnten die Angaben zu den klinisch-pathologischen und genetischen Eigenschaften der LBCL-*IRF4* aus der Literatur, die v.a. von pädiatrischen Patienten stammen, in dieser Studie für erwachsene Patienten bestätigt werden (Chisholm et al., 2019, Ramis-Zaldivar et al., 2020, Salaverria et al., 2011). Die Einordnung der LBCL-*IRF4* als eigenständige Entität innerhalb der DLBCL und FL 3B/FLBL in der fünften Edition der WHO-Klassifikation sowie der ICC-Klassifikation konnte somit durch die Ergebnisse dieser Studie bestätigt werden (Alaggio et al., 2022, Campo et al., 2022). Auch konnten zwei Fälle von WR-FLBL identifiziert werden, die sich durch für FL ungewöhnliche genetische Eigenschaften charakterisierten (Alaggio et al., 2022).

Die Fälle mit nicht-übereinstimmender COO-Klassifikation zeigten sich als heterogene Subgruppe. In manchen Fällen ergaben sich mittels NGS deutliche Hinweise auf einen der beiden COO-Subtypen. Somit könnten diese Fälle von komplexeren und differenzierteren Klassifikationssystem wie nach Schmitz et al. (2018), Chapuy et al. (2018) oder Wright et al. (2020) profitieren. Ähnliches gilt für die Fälle der DLBCL-AE, die sich als heterogene Gruppe präsentierten (Frauenfeld et al., 2022).

Die detektierten genomischen Alterationen stellen bereits heute Ansatzpunkte für im Rahmen von Studien durchgeführte zielgerichtete Therapien dar, wobei die R-CHOP-basierte Chemotherapie nach wie vor die Standardtherapie darstellt (Bartlett et al., 2019, Coiffier et al., 2010, Nowakowski et al., 2021, Salles et al., 2020, Wilson et al., 2021, Younes et al., 2019). Mit den in dieser Studie angewendeten und weiteren molekularpathologischen Methoden wie *Whole Genome Sequencing* oder *Copy Number Variation*-Analysen könnte es in größeren, prospektiv angelegten Studien möglich sein,

## Diskussion

geeignete Patienten für eine Therapie mit zielgerichteten Substanzen zu identifizieren, welche als deeskalative Initialtherapie oder im Fall von therapieresistenten Lymphomen oder Rezidiven angewendet werden könnte.

## 5 Zusammenfassung

Diffus großzellige B-Zell-Lymphome und folliculäre Lymphome sind die häufigsten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome bei erwachsenen Patienten. Durch neue Erkenntnisse hinsichtlich der Pathogenese und molekularer Charakteristika wurden in aktuellen Klassifikationssystemen neue (Sub-)Entitäten der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome definiert, bzw. bestehende Entitäten abgeändert. Eine dieser neuen Entitäten ist das großzellige B-Zell-Lymphom mit *IRF4*-Rearrangement, das im Vergleich zu klassischen DLBCLs und FLs einige typische klinische und molekulare Eigenschaften zeigt, unter anderem eine charakteristische *IRF4*-Translokation sowie ein prädominantes Auftreten im Waldeyer'schen Rachenring sowie bei Kindern und Jugendlichen. Ziel dieser Studie war daher eine umfassende molekularpathologische Charakterisierung von DLBCLs und FLs 3B/FLBLs des Waldeyer'schen Rachenrings bei erwachsenen Patienten, um Charakteristika von Lymphomen des Waldeyer'schen Rachenrings und insbesondere die Eigenschaften und Prävalenz von LBCL-*IRF4* zu untersuchen.

Hierzu wurden 30 Fälle von DLBCLs und FLs 3B/FLBLs des Waldeyer'schen Rachenrings bei erwachsenen Patienten mittels eines umfassenden (molekular-) pathologischen Methodenspektrums, bestehend aus Immunhistochemie für CD10, BCL6, MUM1, BCL2, MYC und Ki-67, Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung für *IRF4*, *BCL2* und IGH, *Next Generation Sequencing* mit einem zehn Gene umfassenden DLBCL-Panel sowie Einzelamplikons und Genexpressionsprofilanalyse mittels HTG EdgeSeq DLBCL Cell of Origin Assay untersucht.

Im Fallkollektiv zeigte sich ein mittleres Alter bei Diagnose von 69,5 Jahren. Insgesamt wurden 28 Fälle von DLBCLs und 2 Fälle von FLs 3B/FLBLs identifiziert, im Großteil der Fälle lag ein niedriges klinisches Stadium bei Diagnose vor, und es konnte ein exzellentes Therapieansprechen auf die Standardtherapie mit R-CHOP-Chemotherapie gezeigt werden. Mittels GEP konnten jeweils 14 Fälle vom GCB- und ABC-Subtyp identifiziert werden, während zwei Fälle unklassifizierbar waren. Die Übereinstimmung mit der Immunhistochemie lag bei 83 %. In der Gruppe der GCBs war die Übereinstimmung des GEP mit der IHC bei 100 %, und es konnten zwei Fälle mit *IRF4*-Translokation sowie -Mutation und sechs Fälle mit *BCL2*-Translokation und -Mutation identifiziert werden. Weiterhin wurden in dieser Subgruppe Mutationen in den Genen *EZH2*, *CARD11* und *PIM1* häufig identifiziert. Die beiden Fälle mit *IRF4*-Translokation und -Mutation waren die einzigen im gesamten Fallkollektiv, sodass die Prävalenz von

## Zusammenfassung

LBCL-*IRF4* in diesem Fallkollektiv auf 7 % bestimmt werden konnte. Für die Gruppe der ABCs stimmte die COO-Klassifikation durch GEP und IHC in 11/14 Fällen überein; in diesen Fällen konnten keine Translokationen oder Mutationen von *IRF4* oder *BCL2* nachgewiesen werden, stattdessen zeigten sich Mutationen von *CD79B*, *MYD88* und *PIM1* häufig. Je ein Fall der mittels GEP unklassifizierbaren Fälle zeigte sich immunhistochemisch als GCB bzw. Non-GCB, und es zeigten sich weder Translokationen noch charakteristische Mutationen. Mit der Genexpressionsprofilanalyse konnten insgesamt 29 Gene bzw. deren Transkripte identifiziert werden, welche zwischen den Subgruppen GCB und ABC signifikant ( $p < 0,05$ ) exprimiert waren. Unter diesen Genen waren unter anderem die drei Gene *CD10*, *BCL6* und *IRF4*. Für jedes dieser Gene und das entsprechende Protein (*MME/CD10*, *BCL6/BCL6* und *IRF4/MUM1*) konnte außerdem ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem immunhistochemischen Expressionsstatus und den Genexpressionsleveln nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Einordnung der LBCL-*IRF4* als neue Entität, die klinischen, morphologischen und molekularpathologischen Eigenschaften der Fälle in diesem Fallkollektiv aus erwachsenen Patienten stimmen mit denen in der Literatur berichteten Daten, welche meist von pädiatrischen Patienten stammen, in großen Teilen überein. Allerdings zeigen die Daten aus dem hier berichteten, relativ kleinen Fallkollektiv eine niedrigere Prävalenz von LBCL-*IRF4* als teilweise in der Literatur berichtet. Für großzellige B-Zell-Lymphome des Waldeyer'schen Rachenrings konnte eine gleichmäßige Verteilung über die COO-Subtypen gezeigt werden, welche jeweils charakteristische molekulare Muster zeigen, die in dieser Form ebenfalls bereits in der Literatur für nodale und extranodale Lymphome beschrieben sind. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die etablierte und weit verbreitete Immunhistochemie eine sehr gute Übereinstimmung mit der Genexpressionsprofilanalyse zeigt, wobei insbesondere Fälle mit einer aberranten Expression von allen drei immunhistochemischen Markern eine Herausforderung für die Immunhistochemie darstellen. Gleiches gilt für Fälle mit einer nicht-übereinstimmenden COO-Klassifikation, bei denen eine wie hier berichtete umfassende molekularpathologische Aufarbeitung Implikationen für die Prognosestellung und die Therapieentscheidung geben kann. Gerade für Fälle mit unklaren oder uneindeutigen Eigenschaften können neue, molekular basierte Klassifikationssysteme, welche zum Teil auf den in dieser Studie angewandten Methoden basieren, als Grundlage für zielgerichtete Therapien dienen, die die Therapie dieser Erkrankung in Zukunft grundlegend verändern könnten. Abschließend konnte

## Zusammenfassung

durch diese Arbeit eine umfassende Charakterisierung großzelliger B-Zell-Lymphome des Waldeyer'schen Rachenrings bei erwachsenen Patienten erreicht werden, wodurch sich prognostische und therapeutische Hinweise ergeben können, wobei sich insbesondere die LBCL-*IRF4* als Entität mit typischen Eigenschaften zeigte; die Ergebnisse aus dem hier berichteten, relativ kleinen Fallkollektiv sollten jedoch in größeren Studien bestätigt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Araujo, I. B. d. O., et al. 2022. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, 36, 1720-1748. DOI: 10.1038/s41375-022-01620-2.
- Alduaij, W., Collinge, B. J., Ben-Neriah, S., Jiang, A., Hilton, L. K., et al. 2022. Molecular Determinants of Clinical Outcomes In a Real-World Diffuse Large B-cell Lymphoma Population. *Blood*. DOI: 10.1182/blood.2022018248.
- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., et al. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403, 503-11. DOI: 10.1038/35000501.
- Au-Yeung, R. K. H., Arias Padilla, L., Zimmermann, M., Oschlies, I., Siebert, R., et al. 2020. Experience with provisional WHO-entities large B-cell lymphoma with IRF4-rearrangement and Burkitt-like lymphoma with 11q aberration in paediatric patients of the NHL-BFM group. *British Journal of Haematology*, 190, 753-763. DOI: <https://doi.org/10.1111/bjh.16578>.
- Bain, G., Maandag, E. C., Izon, D. J., Amsen, D., Kruisbeek, A. M., et al. 1994. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell*, 79, 885-92. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90077-9.
- Balasubramanian, S., Wang, S., Major, C., Hodgkinson, B., Schaffer, M., et al. 2021. Comparison of immunohistochemistry and gene expression profiling subtyping for diffuse large B-cell lymphoma in the phase III clinical trial of R-CHOP ± ibrutinib. *Br J Haematol*, 194, 83-91. DOI: 10.1111/bjh.17450.
- Baldwin, A. S. 2001. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-κB. *The Journal of Clinical Investigation*, 107, 241-246. DOI: 10.1172/JCI11991.
- Barnes, J. A., Jacobsen, E., Feng, Y., Freedman, A., Hochberg, E. P., et al. 2013. Everolimus in combination with rituximab induces complete responses in heavily pretreated diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*, 98, 615-9. DOI: 10.3324/haematol.2012.075184.
- Baró, C., Espinet, B., Salido, M., García, M., Sánchez, B., et al. 2011. Cryptic IGH/BCL2 rearrangements with variant FISH patterns in follicular lymphoma. *Leuk Res*, 35, 256-9. DOI: 10.1016/j.leukres.2010.09.011.
- Bartlett, N. L., Wilson, W. H., Jung, S. H., Hsi, E. D., Maurer, M. J., et al. 2019. Dose-Adjusted EPOCH-R Compared With R-CHOP as Frontline Therapy for Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Clinical Outcomes of the Phase III Intergroup Trial Alliance/CALGB 50303. *J Clin Oncol*, 37, 1790-1799. DOI: 10.1200/jco.18.01994.

- Basso, K. & Dalla-Favera, R. 2012. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunological Reviews*, 247, 172-183. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01112.x>.
- Batten, M., Groom, J., Cachero, T. G., Qian, F., Schneider, P., et al. 2000. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med*, 192, 1453-66. DOI: 10.1084/jem.192.10.1453.
- Béguelin, W., Popovic, R., Teater, M., Jiang, Y., Bunting, K. L., et al. 2013. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell*, 23, 677-92. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.04.011.
- Berg, H. E., Peterson, J. F., Lee, H. E. & McPhail, E. D. 2023. Large B-cell lymphoma with IRF4 gene rearrangements: Differences in clinicopathologic, immunophenotypic and cytogenetic features between pediatric and adult patients. *Human Pathology*, 131, 108-115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2022.10.011>.
- Berglund, M., Thunberg, U., Amini, R.-M., Book, M., Roos, G., et al. 2005. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Modern Pathology*, 18, 1113-1120. DOI: <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800396>.
- Bodo, J., Zhao, X., Durkin, L., Souers, A. J., Phillips, D. C., et al. 2016. Acquired resistance to venetoclax (ABT-199) in t(14;18) positive lymphoma cells. *Oncotarget*, 7, 70000-70010. DOI: 10.18632/oncotarget.12132.
- Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M. & Speed, T. P. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19, 185-193. DOI: 10.1093/bioinformatics/19.2.185.
- Borovecki, A., Korać, P., Nola, M., Ivanković, D., Jaksić, B., et al. 2008. Prognostic significance of B-cell differentiation genes encoding proteins in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma grade 3. *Croat Med J*, 49, 625-35. DOI: 10.3325/cmj.2008.5.625.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., et al. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, 394-424. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Burkhard, R., Bhagat, G., Cogliatti, S. B., Rossi, D., Gaidano, G., et al. 2015. BCL2 mutation spectrum in B-cell non-Hodgkin lymphomas and patterns associated with evolution of follicular lymphoma. *Hematol Oncol*, 33, 23-30. DOI: 10.1002/hon.2132.
- Cadera, E. J., Wan, F., Amin, R. H., Nolla, H., Lenardo, M. J., et al. 2009. NF-kappaB activity marks cells engaged in receptor editing. *J Exp Med*, 206, 1803-16. DOI: 10.1084/jem.20082815.

- Callén, E., Jankovic, M., Difilippantonio, S., Daniel, J. A., Chen, H.-T., et al. 2007. ATM Prevents the Persistence and Propagation of Chromosome Breaks in Lymphocytes. *Cell*, 130, 63-75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.016>.
- Campo, E., Jaffe, E. S., Cook, J. R., Quintanilla-Martinez, L., Swerdlow, S. H., et al. 2022. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood*, 140, 1229-1253. DOI: 10.1182/blood.2022015851.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., et al. 2002. Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing. *Science*, 298, 1039-1043. DOI: 10.1126/science.1076997.
- Carbone, P. P., Kaplan, H. S., Musshoff, K., Smithers, D. W. & Tubiana, M. 1971. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Research*, 31, 1860-1861.
- Cerhan, J. R., Krickler, A., Paltiel, O., Flowers, C. R., Wang, S. S., et al. 2014. Medical History, Lifestyle, Family History, and Occupational Risk Factors for Diffuse Large B-Cell Lymphoma: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *JNCI Monographs*, 2014, 15-25. DOI: 10.1093/jncimonographs/lgu010.
- Cesta, M. F. 2006. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol*, 34, 599-608. DOI: 10.1080/01926230600865531.
- Chapuy, B., Stewart, C., Dunford, A. J., Kim, J., Kamburov, A., et al. 2018. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med*, 24, 679-690. DOI: 10.1038/s41591-018-0016-8.
- Chen, L., Al-Kzayer, L. a. F. Y., Liu, T., Kobayashi, N., Nakazawa, Y., et al. 2017. IFR4/MUM1-positive lymphoma in Waldeyer ring with co-expression of CD5 and CD10. *Pediatric Blood & Cancer*, 64, 311-314. DOI: <https://doi.org/10.1002/pbc.26236>.
- Chi, X., Li, Y. & Qiu, X. 2020. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology*, 160, 233-247. DOI: 10.1111/imm.13176.
- Chisholm, K. M., Bangs, C. D., Bacchi, C. E., Molina-Kirsch, H., Cherry, A., et al. 2015. Expression profiles of MYC protein and MYC gene rearrangement in lymphomas. *Am J Surg Pathol*, 39, 294-303. DOI: 10.1097/pas.0000000000000365.
- Chisholm, K. M., Mohlman, J., Liew, M., Termuhlen, A., Cairo, M. S., et al. 2019. IRF4 translocation status in pediatric follicular and diffuse large B-cell lymphoma patients enrolled in Children's Oncology Group trials. *Pediatric Blood & Cancer*, 66, e27770. DOI: <https://doi.org/10.1002/pbc.27770>.
- Choi, J. W., Kim, Y., Lee, J. H. & Kim, Y. S. 2013. MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol*, 44, 1375-81. DOI: 10.1016/j.humpath.2012.10.026.

- Choi, W. W., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Piris, M. A., Banham, A. H., et al. 2009. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*, 15, 5494-502. DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-09-0113.
- Ci, W., Polo, J. M., Cerchiatti, L., Shaknovich, R., Wang, L., et al. 2009. The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood*, 113, 5536-5548. DOI: 10.1182/blood-2008-12-193037.
- Cleary, M. L., Smith, S. D. & Sklar, J. 1986. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*, 47, 19-28. DOI: 10.1016/0092-8674(86)90362-4.
- Coiffier, B., Lepage, E., Brière, J., Herbrecht, R., Tilly, H., et al. 2002. CHOP Chemotherapy plus Rituximab Compared with CHOP Alone in Elderly Patients with Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 346, 235-242. DOI: 10.1056/NEJMoa011795.
- Coiffier, B., Thieblemont, C., Van Den Neste, E., Lepeu, G., Plantier, I., et al. 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, 2040-2045. DOI: 10.1182/blood-2010-03-276246.
- Colomo, L. s., López-Guillermo, A., Perales, M. a., Rives, S., Martínez, A., et al. 2003. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 101, 78-84. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1286>.
- Copie-Bergman, C., Gaulard, P., Leroy, K., Briere, J., Baia, M., et al. 2009. Immuno-Fluorescence In Situ Hybridization Index Predicts Survival in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With R-CHOP: A GELA Study. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 5573-5579. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.7058.
- Cunningham, D., Hawkes, E. A., Jack, A., Qian, W., Smith, P., et al. 2013. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *The Lancet*, 381, 1817-1826. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60313-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60313-X).
- Davis, R. E., Brown, K. D., Siebenlist, U. & Staudt, L. M. 2001. Constitutive Nuclear Factor  $\kappa$ B Activity Is Required for Survival of Activated B Cell-like Diffuse Large B Cell Lymphoma Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 194, 1861-1874. DOI: 10.1084/jem.194.12.1861.
- Davis, R. E., Ngo, V. N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R. M., et al. 2010. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, 463, 88-92. DOI: 10.1038/nature08638.
- de Leval, L., Bonnet, C., Copie-Bergman, C., Seidel, L., Baia, M., et al. 2012. Diffuse large B-cell lymphoma of Waldeyer's ring has distinct clinicopathologic features:

- a GELA study. *Annals of Oncology*, 23, 3143-3151. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mds150>.
- de Leval, L. & Jaffe, E. S. 2020. Lymphoma Classification. *The Cancer Journal*, 26.
- Delarue, R., Tilly, H., Mounier, N., Petrella, T., Salles, G., et al. 2013. Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 14, 525-533. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70122-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70122-0).
- Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D. & Staudt, L. M. 1997. Control of Inflammation, Cytokine Expression, and Germinal Center Formation by BCL-6. *Science*, 276, 589-592. DOI: 10.1126/science.276.5312.589.
- Desai, S. H., Mwangi, R., Smith, A. N., Maurer, M. J., Farooq, U., et al. 2023. Cell of origin is not associated with outcomes of relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma. *Hematological Oncology*, 41, 39-49. DOI: <https://doi.org/10.1002/hon.3098>.
- Dickinson, M., Briones, J., Herrera, A. F., González-Barca, E., Ghosh, N., et al. 2021. Phase 1b study of the BET protein inhibitor RO6870810 with venetoclax and rituximab in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv*, 5, 4762-4770. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021004619.
- Dodero, A., Guidetti, A., Marino, F., Tucci, A., Barretta, F., et al. 2022. Dose-adjusted EPOCH and rituximab for the treatment of double expressor and double-hit diffuse large B-cell lymphoma: impact of TP53 mutations on clinical outcome. *Haematologica*, 107, 1153-1162. DOI: 10.3324/haematol.2021.278638.
- Dunleavy, K. 2021. Double-hit lymphoma: optimizing therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2021, 157-163. DOI: 10.1182/hematology.2021000247.
- Ennishi, D., Jiang, A., Boyle, M., Collinge, B., Grande, B. M., et al. 2019. Double-Hit Gene Expression Signature Defines a Distinct Subgroup of Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*, 37, 190-201. DOI: 10.1200/jco.18.01583.
- Falini, B., Fizzotti, M., Pucciarini, A., Bigerna, B., Marafioti, T., et al. 2000. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood*, 95, 2084-92.
- Fischer, T., Zing, N. P. C., Chiatton, C. S., Federico, M. & Luminari, S. 2018. Transformed follicular lymphoma. *Ann Hematol*, 97, 17-29. DOI: 10.1007/s00277-017-3151-2.
- Frauenfeld, L., Castrejon-de-Anta, N., Ramis-Zaldivar, J. E., Streich, S., Salmerón-Villalobos, J., et al. 2022. Diffuse large B-cell lymphomas in adults with aberrant coexpression of CD10, BCL6, and MUM1 are enriched in IRF4 rearrangements. *Blood Advances*, 6, 2361-2372. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021006034.

- Freedman, A. & Jacobsen, E. 2020. Follicular lymphoma: 2020 update on diagnosis and management. *American Journal of Hematology*, 95, 316-327. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajh.25696>.
- Fu, K., Weisenburger, D. D., Choi, W. W. L., Perry, K. D., Smith, L. M., et al. 2008. Addition of Rituximab to Standard Chemotherapy Improves the Survival of Both the Germinal Center B-Cell-Like and Non-Germinal Center B-Cell-Like Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 4587-4594. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.9277.
- Gallagher, S. R. & Desjardins, P. R. 2006. Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. *Current Protocols in Molecular Biology*, 76. DOI: 10.1002/0471142727.mba03ds76.
- Gascoyne, R. D., Adomat, S. A., Krajewski, S., Krajewska, M., Horsman, D. E., et al. 1997. Prognostic Significance of Bcl-2 Protein Expression and Bcl-2 Gene Rearrangement in Diffuse Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, 90, 244-251. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V90.1.244>.
- Gaudio, F., Giordano, A., Perrone, T., Pastore, D., Curci, P., et al. 2011. High Ki67 Index and Bulky Disease Remain Significant Adverse Prognostic Factors in Patients with Diffuse Large B Cell Lymphoma before and after the Introduction of Rituximab. *Acta Haematologica*, 126, 44-51. DOI: 10.1159/000324206.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., et al. 1994. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell*, 79, 143-56. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90407-3.
- Gerard-Marchant, R., Hamlin, I., Lennert, K., Rilke, F., Stansfeld, A., et al. 1974. Classification of non-Hodgkin's lymphomas. *The Lancet*, II, 406-408.
- Geyer, S. M., Morton, L. M., Habermann, T. M., Allmer, C., Davis, S., et al. 2010. Smoking, alcohol use, obesity, and overall survival from non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*, 116, 2993-3000. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncr.25114>.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 182, 319-326. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90602-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90602-7).
- Giordano, D., Kuley, R., Draves, K. E., Elkon, K. B., Giltiay, N. V., et al. 2023. B cell-activating factor (BAFF) from dendritic cells, monocytes and neutrophils is required for B cell maturation and autoantibody production in SLE-like autoimmune disease. *Front Immunol*, 14, 1050528. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1050528.
- Goy, A., Ramchandren, R., Ghosh, N., Munoz, J., Morgan, D. S., et al. 2019. Ibrutinib plus lenalidomide and rituximab has promising activity in relapsed/refractory non-germinal center B-cell-like DLBCL. *Blood*, 134, 1024-1036. DOI: 10.1182/blood.2018891598.
- Greeve, J., Philipsen, A., Krause, K., Klapper, W., Heidorn, K., et al. 2003. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood*, 101, 3574-80. DOI: 10.1182/blood-2002-08-2424.

- Gu, H., He, J., Li, Y., Mi, D., Guan, T., et al. 2022. B-cell Lymphoma 6 Inhibitors: Current Advances and Prospects of Drug Development for Diffuse Large B-cell Lymphomas. *J Med Chem*, 65, 15559-15583. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.2c01433.
- Guan, Q., Hong, Y., Hu, G., Zhou, Q., Li, L., et al. 2021. Reduced radiotherapy clinical benefit for primary Waldeyer's ring diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Hematological Oncology*, 39, 490-497. DOI: <https://doi.org/10.1002/hon.2869>.
- Haberman, A. M., Gonzalez, D. G., Wong, P., Zhang, T. T. & Kerfoot, S. M. 2019. Germinal center B cell initiation, GC maturation, and the coevolution of its stromal cell niches. *Immunol Rev*, 288, 10-27. DOI: 10.1111/imr.12731.
- Hadj Khodabakhshi, A., Morin, R. D., Fejes, A. P., Mungall, A. J., Mungall, K. L., et al. 2012. Recurrent targets of aberrant somatic hypermutation in lymphoma. *Oncotarget*, 3.
- Hans, C. P., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Gascoyne, R. D., Delabie, J., et al. 2004. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103, 275-82. DOI: 10.1182/blood-2003-05-1545.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Stein, H., Banks, P. M., Chan, J. K., et al. 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84, 1361-92.
- He, X., Chen, Z., Fu, T., Jin, X., Yu, T., et al. 2014. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: evidence from a systematic meta-analysis. *BMC Cancer*, 14, 153. DOI: 10.1186/1471-2407-14-153.
- Hermine, O., Haioun, C., Lepage, E., d'Agay, M.-F., Briere, J., et al. 1996. Prognostic Significance of bcl-2 Protein Expression in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, 87, 265-272. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V87.1.265.265>.
- Herold, G. 2019. *Innere Medizin 2019*, Köln, Eigenverlag.
- Hesius, E. A. M., van Laar, L., Oosterveld, M., van Spriel, A. B., Scheijen, B., et al. 2023. Reclassification of diffuse large B cell lymphoma to large B cell lymphoma with IRF4 rearrangement in an adult population. *Histopathology*, n/a. DOI: <https://doi.org/10.1111/his.14885>.
- Hodgson, D. C. & Mikhaeel, N. G. 2015. Consolidative Radiation in DLBCL: Evidence-Based Recommendations. *Curr Oncol Rep*, 17, 49. DOI: 10.1007/s11912-015-0472-y.
- Horsman, D. E., Okamoto, I., Ludkovski, O., Le, N., Harder, L., et al. 2003. Follicular lymphoma lacking the t(14;18)(q32;q21): identification of two disease subtypes. *Br J Haematol*, 120, 424-33. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04086.x.

- Horvat, M., Zadnik, V., Južnič Šetina, T., Boltežar, L., Pahole Goličnik, J., et al. 2018. Diffuse large B-cell lymphoma: 10 years' real-world clinical experience with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone. *Oncol Lett*, 15, 3602-3609. DOI: 10.3892/ol.2018.7774.
- Hu, S., Xu-Monette, Z. Y., Tzankov, A., Green, T., Wu, L., et al. 2013. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*, 121, 4021-31; quiz 4250. DOI: 10.1182/blood-2012-10-460063.
- Hua, Z. & Hou, B. 2013. TLR signaling in B-cell development and activation. *Cell Mol Immunol*, 10, 103-6. DOI: 10.1038/cmi.2012.61.
- Iqbal, J., Meyer, P. N., Smith, L. M., Johnson, N. A., Vose, J. M., et al. 2011. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res*, 17, 7785-95. DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-11-0267.
- Iqbal, J., Neppalli, V. T., Wright, G., Dave, B. J., Horsman, D. E., et al. 2006. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 24, 961-8. DOI: 10.1200/jco.2005.03.4264.
- Iqbal, J., Sanger, W. G., Horsman, D. E., Rosenwald, A., Pickering, D. L., et al. 2004. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*, 165, 159-66. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)63284-1.
- Italiano, A., Soria, J.-C., Toulmonde, M., Michot, J.-M., Lucchesi, C., et al. 2018. Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, phase 1 study. *The Lancet Oncology*, 19, 649-659. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30145-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30145-1).
- Izumi, K., Kanda, J., Nishikori, M., Arai, Y., Ishikawa, T., et al. 2019. Outcomes of allogeneic stem cell transplantation for DLBCL: a multi-center study from the Kyoto Stem Cell Transplantation Group. *Ann Hematol*, 98, 2815-2823. DOI: 10.1007/s00277-019-03835-3.
- Jiang, S., Qin, Y., Gui, L., Liu, P., Jiang, H., et al. 2020. Genomic Alterations and MYD88(MUT) Variant Mapping in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Response to Ibrutinib. *Target Oncol*, 15, 221-230. DOI: 10.1007/s11523-020-00710-4.
- Jing, X.-m., Yu, J.-r., Luo, Y.-k., Zhang, S.-c., Liu, J.-f., et al. 2017. Clinical characteristics and prognosis of primary Waldeyer's ring and lymph node diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Leukemia Research*, 60, 89-93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.07.006>.
- Jones, G., Plastaras, J. P., Ng, A. K. & Kelsey, C. R. 2022. The Evolving Role of Radiation Therapy in DLBCL: From Early-Stage to Refractory Disease. *Oncology (Williston Park)*, 36, 718-727. DOI: 10.46883/2022.25920980.

- Karube, K., Guo, Y., Suzumiya, J., Sugita, Y., Nomura, Y., et al. 2007. CD10-MUM1+ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features. *Blood*, 109, 3076-9. DOI: 10.1182/blood-2006-09-045989.
- Khodabakhshi, A. H., Morin, R. D., Fejes, A. P., Mungall, A. J., Mungall, K. L., et al. 2012. Recurrent targets of aberrant somatic hypermutation in lymphoma. *Oncotarget*, 3, 1308-19. DOI: 10.18632/oncotarget.653.
- Kim, C. J., Freedman, D. M., Curtis, R. E., de Gonzalez, A. B. & Morton, L. M. 2013. Risk of non-Hodgkin lymphoma after radiotherapy for solid cancers. *Leukemia & Lymphoma*, 54, 1691-1697. DOI: 10.3109/10428194.2012.753543.
- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., et al. 2006. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nature Immunology*, 7, 773-782. DOI: 10.1038/ni1357.
- Kondo, M., Weissman, I. L. & Akashi, K. 1997. Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell*, 91, 661-672. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80453-5.
- Kresse, S. H., Namløs, H. M., Lorenz, S., Berner, J.-M., Myklebost, O., et al. 2018. Evaluation of commercial DNA and RNA extraction methods for high-throughput sequencing of FFPE samples. *PLOS ONE*, 13, e0197456. DOI: 10.1371/journal.pone.0197456.
- Lacy, S. E., Barrans, S. L., Beer, P. A., Painter, D., Smith, A. G., et al. 2020. Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report. *Blood*, 135, 1759-1771. DOI: 10.1182/blood.2019003535.
- Lee, C. H., Melchers, M., Wang, H., Torrey, T. A., Slota, R., et al. 2005. Regulation of the germinal center gene program by interferon (IFN) regulatory factor 8/IFN consensus sequence-binding protein. *Journal of Experimental Medicine*, 203, 63-72. DOI: 10.1084/jem.20051450.
- Lennert, K. & Mohri, N. 1974. [Histological classification and occurrence of Hodgkin's disease]. *Internist (Berl)*, 15, 57-65.
- Lennert, K., Stein, H. & Kaiserling, E. 1975. Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br J Cancer Suppl*, 2, 29-43.
- Lenz, G., Davis, R. E., Ngo, V. N., Lam, L., George, T. C., et al. 2008a. Oncogenic CARD11 Mutations in Human Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Science*, 319, 1676-1679. DOI: 10.1126/science.1153629.
- Lenz, G., Nagel, I., Siebert, R., Roschke, A. V., Sanger, W., et al. 2007. Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Journal of Experimental Medicine*, 204, 633-643. DOI: 10.1084/jem.20062041.

- Lenz, G., Wright, G., Dave, S. S., Xiao, W., Powell, J., et al. 2008b. Stromal Gene Signatures in Large-B-Cell Lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 359, 2313-2323. DOI: 10.1056/NEJMoa0802885.
- Lenz, G., Wright, G. W., Emre, N. C. T., Kohlhammer, H., Dave, S. S., et al. 2008c. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 13520-13525. DOI: 10.1073/pnas.0804295105.
- Li, S., Wang, Z., Lin, L., Wu, Z., Yu, Q., et al. 2019. BCL6 Rearrangement Indicates Poor Prognosis in Diffuse Large B-cell Lymphoma Patients: A Meta-analysis of Cohort Studies. *J Cancer*, 10, 530-538. DOI: 10.7150/jca.25732.
- Li, Z.-M., Huang, J.-J., Xia, Y., Zhu, Y.-J., Zhao, W., et al. 2012. High Ki-67 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients with non-germinal center subtype indicates limited survival benefit from R-CHOP therapy. *European Journal of Haematology*, 88, 510-517. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2012.01778.x>.
- Liang, Y., Liu, X., Yang, J., Wang, H., Piao, Y., et al. 2023. Dose-adjusted EPOCH-R vs. R-CHOP in frontline management of Waldeyer's ring diffuse large B-cell lymphoma: a retrospective study from a single institution. *Chinese Medical Journal*, 136.
- Lim, K.-H., Yang, Y. & Staudt, L. M. 2012. Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF- $\kappa$ B in lymphoid malignancies. *Immunological Reviews*, 246, 359-378. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01105.x>.
- Locke, F. L., Ghobadi, A., Jacobson, C. A., Miklos, D. B., Lekakis, L. J., et al. 2019. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1–2 trial. *The Lancet Oncology*, 20, 31-42. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30864-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30864-7).
- Locke, F. L., Neelapu, S. S., Bartlett, N. L., Siddiqi, T., Chavez, J. C., et al. 2017. Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CAR T Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma. *Molecular Therapy*, 25, 285-295. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.10.020>.
- Lockmer, S., Ren, W., Brodtkorb, M., Østenstad, B., Wahlin, B. E., et al. 2020. M7-FLIPI is not prognostic in follicular lymphoma patients with first-line rituximab chemotherapy. *Br J Haematol*, 188, 259-267. DOI: 10.1111/bjh.16159.
- López-Guillermo, A., Colomo, L., Jiménez, M., Bosch, F., Villamor, N., et al. 2005. Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Clinical and Biological Characterization and Outcome According to the Nodal or Extranodal Primary Origin. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 2797-2804. DOI: 10.1200/JCO.2005.07.155.
- Lossos, I. S., Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Chan, W. C., Brown, P. O., et al. 2000. Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 10209-10213. DOI: 10.1073/pnas.180316097.

## Literaturverzeichnis

- Lu, J., Liang, T., Li, P. & Yin, Q. 2023. Regulatory effects of IRF4 on immune cells in the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 14. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1086803.
- Lu, R., Medina, K. L., Lancki, D. W. & Singh, H. 2003. IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development. *Genes Dev*, 17, 1703-8. DOI: 10.1101/gad.1104803.
- Ma, Z., Shi, Y., Pang, X., Li, X., Cui, W., et al. 2020. Clinicopathologic features and prognostic analysis of Waldeyer ring B-cell lymphoma. *Medicine*, 99.
- Mansson, R., Welinder, E., Åhsberg, J., Lin, Y. C., Benner, C., et al. 2012. Positive intergenic feedback circuitry, involving EBF1 and FOXO1, orchestrates B-cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 21028-21033. DOI: 10.1073/pnas.1211427109.
- Martín-Subero, J. I., Harder, L., Gesk, S., Schlegelberger, B., Grote, W., et al. 2002. Interphase FISH assays for the detection of translocations with breakpoints in immunoglobulin light chain loci. *Int J Cancer*, 98, 470-4. DOI: 10.1002/ijc.10169.
- Masago, K., Fujita, S., Oya, Y., Takahashi, Y., Matsushita, H., et al. 2021. Comparison between Fluorimetry (Qubit) and Spectrophotometry (NanoDrop) in the Quantification of DNA and RNA Extracted from Frozen and FFPE Tissues from Lung Cancer Patients: A Real-World Use of Genomic Tests. *Medicina*, 57, 1375. DOI: 10.3390/medicina57121375.
- Masqué-Soler, N., Szczepanowski, M., Kohler, C. W., Spang, R. & Klapper, W. 2013. Molecular classification of mature aggressive B-cell lymphoma using digital multiplexed gene expression on formalin-fixed paraffin-embedded biopsy specimens. *Blood*, 122, 1985-6. DOI: 10.1182/blood-2013-06-508937.
- McKelvey, E. M., Gottlieb, J. A., Wilson, H. E., Haut, A., Talley, R. W., et al. 1976. Hydroxyldaunomycin (adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. *Cancer*, 38, 1484-1493. DOI: [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197610\)38:4<1484::AID-CNCR2820380407>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197610)38:4<1484::AID-CNCR2820380407>3.0.CO;2-I).
- Meyer, P. N., Fu, K., Greiner, T. C., Smith, L. M., Delabie, J., et al. 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. DOI: 10.1200/jco.2010.30.0368.
- Migliazza, A., Martinotti, S., Chen, W., Fusco, C., Ye, B. H., et al. 1995. Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 12520-12524. DOI: 10.1073/pnas.92.26.12520.
- Mittrücker, H.-W., Matsuyama, T., Grossman, A., Kündig, T. M., Potter, J., et al. 1997. Requirement for the Transcription Factor LSIRF/IRF4 for Mature B and T Lymphocyte Function. *Science*, 275, 540-543. DOI: 10.1126/science.275.5299.540.
- Mondala, P. K., Vora, A. A., Zhou, T., Lazzari, E., Ladel, L., et al. 2021. Selective antisense oligonucleotide inhibition of human IRF4 prevents malignant myeloma

- regeneration via cell cycle disruption. *Cell Stem Cell*, 28, 623-636.e9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.12.017>.
- Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., von Burg, N., Riis, L. B., et al. 2021. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunol*, 14, 793-802. DOI: 10.1038/s41385-021-00389-4.
- Morin, R. D., Johnson, N. A., Severson, T. M., Mungall, A. J., An, J., et al. 2010. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*, 42, 181-5. DOI: 10.1038/ng.518.
- Morschhauser, F., Feugier, P., Flinn, I. W., Gasiorowski, R., Greil, R., et al. 2021. A phase 2 study of venetoclax plus R-CHOP as first-line treatment for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 137, 600-609. DOI: 10.1182/blood.2020006578.
- Mounier, N., Briere, J., Gisselbrecht, C., Emile, J.-F., Lederlin, P., et al. 2003. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2—associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood*, 101, 4279-4284. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3442>.
- Müller, J., Hart, C. M., Francis, N. J., Vargas, M. L., Sengupta, A., et al. 2002. Histone Methyltransferase Activity of a Drosophila Polycomb Group Repressor Complex. *Cell*, 111, 197-208. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00976-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00976-5).
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., et al. 2000. Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell*, 102, 553-563. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00078-7).
- Nam, S. & Lim, J.-S. 2016. Essential role of interferon regulatory factor 4 (IRF4) in immune cell development. *Archives of Pharmacal Research*, 39, 1548-1555. DOI: 10.1007/s12272-016-0854-1.
- Nann, D., Ramis-Zaldivar, J. E., Müller, I., Gonzalez-Farre, B., Schmidt, J., et al. 2020. Follicular lymphoma t(14;18)-negative is genetically a heterogeneous disease. *Blood Adv*, 4, 5652-5665. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002944.
- Natkunam, Y., Warnke, R. A., Montgomery, K., Falini, B. & van De Rijn, M. 2001. Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry. *Mod Pathol*, 14, 686-94. DOI: 10.1038/modpathol.3880373.
- Ng, A. K., Yahalom, J., Goda, J. S., Constine, L. S., Pinnix, C. C., et al. 2018. Role of Radiation Therapy in Patients With Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Guidelines from the International Lymphoma Radiation Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 100, 652-669. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2017.12.005.
- Ngo, V. N., Davis, R. E., Lamy, L., Yu, X., Zhao, H., et al. 2006. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature*, 441, 106-110. DOI: 10.1038/nature04687.

- Ngo, V. N., Young, R. M., Schmitz, R., Jhavar, S., Xiao, W., et al. 2011. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*, 470, 115-9. DOI: 10.1038/nature09671.
- Nguyen, H. T., Tatipamula, V. B., Do, D. N., Huynh, T. C. & Dang, M. K. 2022. Retrieving high-quality genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues for multiple molecular analyses. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 52, 48-55. DOI: 10.1080/10826068.2021.1923030.
- Nowakowski, G. S., Chiappella, A., Gascoyne, R. D., Scott, D. W., Zhang, Q., et al. 2021. ROBUST: A Phase III Study of Lenalidomide Plus R-CHOP Versus Placebo Plus R-CHOP in Previously Untreated Patients With ABC-Type Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 39, 1317-1328. DOI: 10.1200/JCO.20.01366.
- Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., et al. 2013. Transcriptional Regulation of Germinal Center B and Plasma Cell Fates by Dynamical Control of IRF4. *Immunity*, 38, 918-929. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.009>.
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. & Baltimore, D. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*, 248, 1517-23. DOI: 10.1126/science.2360047.
- Oh, M.-Y., Chung, J.-S., Song, M.-K., Shin, H.-J., Lee, H.-S., et al. 2013. Prognostic value of Waldeyer's ring involvement of diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *International Journal of Hematology*, 97, 397-402. DOI: 10.1007/s12185-013-1282-3.
- Ott, G., Ziepert, M., Klapper, W., Horn, H., Szczepanowski, M., et al. 2010. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood*, 116, 4916-25. DOI: 10.1182/blood-2010-03-276766.
- Parker, D. C. 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol*, 11, 331-60. DOI: 10.1146/annurev.iy.11.040193.001555.
- Pasqualucci, L. & Dalla-Favera, R. 2018. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 131, 2307-2319. DOI: 10.1182/blood-2017-11-764332.
- Pasqualucci, L., Guglielmino, R., Houldsworth, J., Mohr, J., Aoufouchi, S., et al. 2004. Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells. *Blood*, 104, 3318-3325. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1558.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., et al. 1998. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: Evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 11816-11821. DOI: 10.1073/pnas.95.20.11816.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S., et al. 2001. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*, 412, 341-6. DOI: 10.1038/35085588.

- Pastore, A., Jurinovic, V., Kridel, R., Hoster, E., Staiger, A. M., et al. 2015. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol*, 16, 1111-1122. DOI: 10.1016/s1470-2045(15)00169-2.
- Petrackova, A., Turcsanyi, P., Papajik, T. & Kriegova, E. 2021. Revisiting Richter transformation in the era of novel CLL agents. *Blood Rev*, 49, 100824. DOI: 10.1016/j.blre.2021.100824.
- Petrich, A. M., Gandhi, M., Jovanovic, B., Castillo, J. J., Rajguru, S., et al. 2014. Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Blood*, 124, 2354-2361. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-578963>.
- Plaça, J. R., Diepstra, A., Los, T., Mendeville, M., Seitz, A., et al. 2022. Reproducibility of Gene Expression Signatures in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Cancers (Basel)*, 14. DOI: 10.3390/cancers14051346.
- Qi, S.-N., Li, Y.-X., Wang, H., Wang, W.-H., Jin, J., et al. 2009. Diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer*, 115, 4980-4989. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncr.24557>.
- Quintanilla-Martinez, L., Sander, B., Chan, J. K. C., Xerri, L., Ott, G., et al. 2016. Indolent lymphomas in the pediatric population: follicular lymphoma, IRF4/MUM1+ lymphoma, nodal marginal zone lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Virchows Archiv*, 468, 141-157. DOI: 10.1007/s00428-015-1855-z.
- Raghavan, S. C., Swanson, P. C., Wu, X., Hsieh, C.-L. & Lieber, M. R. 2004. A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. *Nature*, 428, 88-93. DOI: 10.1038/nature02355.
- Ramiro, A. R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., et al. 2004. AID Is Required for c-myc/IgH Chromosome Translocations In Vivo. *Cell*, 118, 431-438. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.006>.
- Ramis-Zaldivar, J. E., Gonzalez-Farré, B., Balagué, O., Celis, V., Nadeu, F., et al. 2020. Distinct molecular profile of IRF4-rearranged large B-cell lymphoma. *Blood*, 135, 274-286. DOI: 10.1182/blood.2019002699.
- Rauch, D. A., Olson, S. L., Harding, J. C., Sundaramoorthi, H., Kim, Y., et al. 2020. Interferon regulatory factor 4 as a therapeutic target in adult T-cell leukemia lymphoma. *Retrovirology*, 17, 27. DOI: 10.1186/s12977-020-00535-z.
- Rawlings, D. J., Sommer, K. & Moreno-García, M. E. 2006. The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 6, 799-812. DOI: 10.1038/nri1944.
- Read, J. A., Koff, J. L., Nastoupil, L. J., Williams, J. N., Cohen, J. B., et al. 2014. Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-cell lymphoma survival: a meta-analysis of gene expression profiling and immunohistochemistry algorithms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 14, 460-467.e2. DOI: 10.1016/j.clml.2014.05.002.

- Reddy, A., Zhang, J., Davis, N. S., Moffitt, A. B., Love, C. L., et al. 2017. Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell*, 171, 481-494.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.027.
- Remesh, S. G., Santosh, V. & Escalante, C. R. 2015. Structural Studies of IRF4 Reveal a Flexible Autoinhibitory Region and a Compact Linker Domain\*. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 27779-27790. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.678789>.
- Riedell, P. A. & Smith, S. M. 2018. Double hit and double expressors in lymphoma: Definition and treatment. *Cancer*, 124, 4622-4632. DOI: 10.1002/cncr.31646.
- Robbiani, D. F., Bunting, S., Feldhahn, N., Bothmer, A., Camps, J., et al. 2009. AID Produces DNA Double-Strand Breaks in Non-Ig Genes and Mature B Cell Lymphomas with Reciprocal Chromosome Translocations. *Molecular Cell*, 36, 631-641. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.11.007>.
- Rosenthal, A. & Younes, A. 2017. High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6: Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood Rev*, 31, 37-42. DOI: 10.1016/j.blre.2016.09.004.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., et al. 2002. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 346, 1937-47. DOI: 10.1056/NEJMoa012914.
- Rossi, D. 2015. XIII. Molecular pathogenesis of transformed lymphomas. *Hematol Oncol*, 33 Suppl 1, 70-4. DOI: 10.1002/hon.2221.
- Roulland, S., Faroudi, M., Mamessier, E., Sungalee, S., Salles, G., et al. 2011. Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. *Adv Immunol*, 111, 1-46. DOI: 10.1016/b978-0-12-385991-4.00001-5.
- Rovira, J., Karube, K., Valera, A., Colomer, D., Enjuanes, A., et al. 2016. MYD88 L265P Mutations, But No Other Variants, Identify a Subpopulation of DLBCL Patients of Activated B-cell Origin, Extranodal Involvement, and Poor Outcome. *Clin Cancer Res*, 22, 2755-64. DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-15-1525.
- Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P. M., et al. 2007. A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell*, 12, 280-92. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.08.011.
- Salaverria, I., Martin-Guerrero, I., Burkhardt, B., Kreuz, M., Zenz, T., et al. 2013. High resolution copy number analysis of IRF4 translocation-positive diffuse large B-cell and follicular lymphomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 52, 150-155. DOI: <https://doi.org/10.1002/gcc.22014>.
- Salaverria, I., Philipp, C., Oschlies, I., Kohler, C. W., Kreuz, M., et al. 2011. Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood*, 118, 139-47. DOI: 10.1182/blood-2011-01-330795.

- Salaverria, I. & Siebert, R. 2011. Follicular lymphoma grade 3B. *Best Pract Res Clin Haematol*, 24, 111-9. DOI: 10.1016/j.beha.2011.02.002.
- Salles, G., Duell, J., González Barca, E., Tournilhac, O., Jurczak, W., et al. 2020. Tafasitamab plus lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (L-MIND): a multicentre, prospective, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 21, 978-988. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30225-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30225-4).
- Sarkozy, C., Morschhauser, F., Dubois, S., Molina, T., Michot, J. M., et al. 2020. A LYSA Phase Ib Study of Tazemetostat (EPZ-6438) plus R-CHOP in Patients with Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) with Poor Prognosis Features. *Clinical Cancer Research*, 26, 3145-3153. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3741.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A. & Baltimore, D. 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*, 59, 1035-48. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90760-5.
- Schmitz, R., Wright, G. W., Huang, D. W., Johnson, C. A., Phelan, J. D., et al. 2018. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*, 378, 1396-1407. DOI: 10.1056/NEJMoa1801445.
- Schuster, S. J., Bishop, M. R., Tam, C. S., Waller, E. K., Borchmann, P., et al. 2018. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 380, 45-56. DOI: 10.1056/NEJMoa1804980.
- Schuster, S. J., Tam, C. S., Borchmann, P., Worel, N., McGuirk, J. P., et al. 2021. Long-term clinical outcomes of tisagenlecleucel in patients with relapsed or refractory aggressive B-cell lymphomas (JULIET): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 22, 1403-1415. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00375-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00375-2).
- Scott, D. W., King, R. L., Staiger, A. M., Ben-Neriah, S., Jiang, A., et al. 2018. High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with diffuse large B-cell lymphoma morphology. *Blood*, 131, 2060-2064. DOI: 10.1182/blood-2017-12-820605.
- Scott, D. W., Mottok, A., Ennishi, D., Wright, G. W., Farinha, P., et al. 2015. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol*, 33, 2848-56. DOI: 10.1200/jco.2014.60.2383.
- Scott, D. W., Wright, G. W., Williams, P. M., Lih, C. J., Walsh, W., et al. 2014. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*, 123, 1214-7. DOI: 10.1182/blood-2013-11-536433.
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J. & Singh, H. 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, 265, 1573-7. DOI: 10.1126/science.8079170.

- Sehn, L. H., Berry, B., Chhanabhai, M., Fitzgerald, C., Gill, K., et al. 2006. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*, 109, 1857-1861. DOI: 10.1182/blood-2006-08-038257.
- Shaffer, A. L., Lin, K.-I., Kuo, T. C., Yu, X., Hurt, E. M., et al. 2002. Blimp-1 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by Extinguishing the Mature B Cell Gene Expression Program. *Immunity*, 17, 51-62. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00335-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00335-7).
- Shen, H. M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X. & Storb, U. 1998. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science*, 280, 1750-2. DOI: 10.1126/science.280.5370.1750.
- Shi, Y., Han, Y., Yang, J., Liu, P., He, X., et al. 2019. Clinical features and outcomes of diffuse large B-cell lymphoma based on nodal or extranodal primary sites of origin: Analysis of 1,085 WHO classified cases in a single institution in China. *Chin J Cancer Res*, 31, 152-161. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2019.01.10.
- Smith, S. D., Bolwell, B. J., Rybicki, L. A., Kang, T., Dean, R., et al. 2011. Comparison of outcomes after auto-SCT for patients with relapsed diffuse large B-cell lymphoma according to previous therapy with rituximab. *Bone Marrow Transplant*, 46, 262-6. DOI: 10.1038/bmt.2010.95.
- Solal-Céligny, P., Roy, P., Colombat, P., White, J., Armitage, J. O., et al. 2004. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Blood*, 104, 1258-1265. DOI: 10.1182/blood-2003-12-4434.
- Stamatopoulos, K., Kosmas, C., Belessi, C., Papadaki, T., Afendaki, S., et al. 1997. t(14;18) chromosomal translocation in follicular lymphoma: an event occurring with almost equal frequency both at the D to J(H) and at later stages in the rearrangement process of the immunoglobulin heavy chain gene locus. *Br J Haematol*, 99, 866-72. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1997.4853290.x.
- Streich, S., Frauenfeld, L., Otto, F., Mankel, B., Bonzheim, I., et al. 2023. Prevalence of IRF4 rearrangement in large B-cell lymphomas of the Waldenstrom's ring in adults. *Virchows Archiv*. DOI: 10.1007/s00428-023-03516-7.
- Sundararaj, S. & Casarotto, M. G. 2021. Molecular interactions of IRF4 in B cell development and malignancies. *Biophysical Reviews*, 13, 1219-1227. DOI: 10.1007/s12551-021-00825-6.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., et al. 2017. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., et al. 2016. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127, 2375-2390. DOI: 10.1182/blood-2016-01-643569.
- Swerdlow, S. H., International Agency for Research on Cancer & World Health Organization 2008. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Lyon, International Agency for Research on Cancer.

- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. & Tanaka, N. 2001. IRF Family of Transcription Factors as Regulators of Host Defense. *Annual Review of Immunology*, 19, 623-655. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.623.
- Tellier, J., Shi, W., Minnich, M., Liao, Y., Crawford, S., et al. 2016. Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nature Immunology*, 17, 323-330. DOI: 10.1038/ni.3348.
- The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project 1993. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 329, 987-994. DOI: 10.1056/nejm199309303291402.
- The UniProt Consortium. 1997-2023. Q15306 · IRF4\_HUMAN. The UniProt Consortium. Verfügbar unter: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q15306/entry>. Abgerufen am 05.04.2023.
- Tsapogas, P., Zandi, S., Åhsberg, J., Zetterblad, J., Welinder, E., et al. 2011. IL-7 mediates Ebf-1–dependent lineage restriction in early lymphoid progenitors. *Blood*, 118, 1283-1290. DOI: 10.1182/blood-2011-01-332189.
- Tsuboi, K., Iida, S., Inagaki, H., Kato, M., Hayami, Y., et al. 2000. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia*, 14, 449-56. DOI: 10.1038/sj.leu.2401696.
- Tsuyama, N., Sakata, S., Baba, S., Mishima, Y., Nishimura, N., et al. 2017. BCL2 expression in DLBCL: reappraisal of immunohistochemistry with new criteria for therapeutic biomarker evaluation. *Blood*, 130, 489-500. DOI: 10.1182/blood-2016-12-759621.
- Urbánek, P., Wang, Z. Q., Fetka, I., Wagner, E. F. & Busslinger, M. 1994. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell*, 79, 901-12. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90079-5.
- Vaandrager, J.-W., Schuurin, E., Philippo, K. & Kluijn, P. M. 2000. V(D)J recombinase-mediated transposition of the BCL2 gene to the IGH locus in follicular lymphoma. *Blood*, 96, 1947-1952. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V96.5.1947>.
- Van Dongen, J. J. M., Langerak, A. W., Brüggemann, M., Evans, P. A. S., Hummel, M., et al. 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, 2257-2317. DOI: 10.1038/sj.leu.2403202.
- Velichutina, I., Shaknovich, R., Geng, H., Johnson, N. A., Gascoyne, R. D., et al. 2010. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood*, 116, 5247-55. DOI: 10.1182/blood-2010-04-280149.
- Vitolo, U., Trněný, M., Belada, D., Carella, A. M., Chua, N., et al. 2016. Obinutuzumab or Rituximab Plus CHOP in Patients with Previously Untreated Diffuse Large B-

- Cell Lymphoma: Final Results from an Open-Label, Randomized Phase 3 Study (GOYA). *Blood*, 128, 470. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.470.470>.
- Vos, Q., Lees, A., Wu, Z. Q., Snapper, C. M. & Mond, J. J. 2000. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev*, 176, 154-70. DOI: 10.1034/j.1600-065x.2000.00607.x.
- Wang, J. H., Gostissa, M., Yan, C. T., Goff, P., Hickernell, T., et al. 2009. Mechanisms promoting translocations in editing and switching peripheral B cells. *Nature*, 460, 231-236. DOI: 10.1038/nature08159.
- Welinder, E., Mansson, R., Mercer, E. M., Bryder, D., Sigvardsson, M., et al. 2011. The transcription factors E2A and HEB act in concert to induce the expression of FOXO1 in the common lymphoid progenitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 17402-17407. DOI: 10.1073/pnas.1111766108.
- Welsch, U., Deller, T. & Kummer, W. 2014. *Lehrbuch Histologie*, München, Elsevier, Urban & Fischer.
- Willis, S. N., Good-Jacobson, K. L., Curtis, J., Light, A., Tellier, J., et al. 2014. Transcription Factor IRF4 Regulates Germinal Center Cell Formation through a B Cell–Intrinsic Mechanism. *The Journal of Immunology*, 192, 3200-3206. DOI: 10.4049/jimmunol.1303216.
- Wilson, W. H., sin-Ho, J., Pitcher, B. N., Hsi, E. D., Friedberg, J., et al. 2016. Phase III Randomized Study of R-CHOP Versus DA-EPOCH-R and Molecular Analysis of Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma: CALGB/Alliance 50303. *Blood*, 128, 469. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.469.469>.
- Wilson, W. H., Wright, G. W., Huang, D. W., Hodgkinson, B., Balasubramanian, S., et al. 2021. Effect of ibrutinib with R-CHOP chemotherapy in genetic subtypes of DLBCL. *Cancer Cell*, 39, 1643-1653.e3. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.10.006>.
- Witzig, T. E., Tobinai, K., Rigacci, L., Ikeda, T., Vanazzi, A., et al. 2018. Adjuvant everolimus in high-risk diffuse large B-cell lymphoma: final results from the PILLAR-2 randomized phase III trial. *Ann Oncol*, 29, 707-714. DOI: 10.1093/annonc/mdx764.
- Wong, R. W. J., Ong, J. Z. L., Theardy, M. S. & Sanda, T. 2022. IRF4 as an Oncogenic Master Transcription Factor. *Cancers*, 14, 4314.
- Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Hurt, E. H., Wiestner, A., et al. 2003. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 9991-9996. DOI: 10.1073/pnas.1732008100.
- Wright, G. W., Huang, D. W., Phelan, J. D., Coulibaly, Z. A., Roulland, S., et al. 2020. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell*, 37, 551-568.e14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.015>.

- Xing, Y., Guo, W., Wu, M., Xie, J., Huang, D., et al. 2022. An orally available small molecule BCL6 inhibitor effectively suppresses diffuse large B cell lymphoma cells growth in vitro and in vivo. *Cancer Lett*, 529, 100-111. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.12.035.
- Yamada, M., Asanuma, K., Kobayashi, D., Moriai, R., Yajima, T., et al. 2001. Quantitation of multiple myeloma oncogene 1/interferon-regulatory factor 4 gene expression in malignant B-cell proliferations and normal leukocytes. *Anticancer Res*, 21, 633-8.
- Yang, Y., Shaffer, Arthur L., Emre, N. C. T., Ceribelli, M., Zhang, M., et al. 2012. Exploiting Synthetic Lethality for the Therapy of ABC Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell*, 21, 723-737. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.024>.
- Yoon, D. H., Choi, D. R., Ahn, H. J., Kim, S., Lee, D. H., et al. 2010. Ki-67 expression as a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP. *European Journal of Haematology*, 85, 149-157. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2010.01467.x>.
- Younes, A., Sehn, L. H., Johnson, P., Zinzani, P. L., Hong, X., et al. 2019. Randomized Phase III Trial of Ibrutinib and Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Non-Germinal Center B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 37, 1285-1295. DOI: 10.1200/JCO.18.02403.
- Yunis, J. J., Oken, M. M., Kaplan, M. E., Ensrud, K. M., Howe, R. R., et al. 1982. Distinctive Chromosomal Abnormalities in Histologic Subtypes of Non-Hodgkin's Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 307, 1231-1236. DOI: 10.1056/NEJM19821113072002.
- Zandi, S., Mansson, R., Tsapogas, P., Zetterblad, J., Bryder, D., et al. 2008. EBF1 Is Essential for B-Lineage Priming and Establishment of a Transcription Factor Network in Common Lymphoid Progenitors. *The Journal of Immunology*, 181, 3364-3372. DOI: 10.4049/jimmunol.181.5.3364.
- Zelenetz, A. D., Salles, G., Mason, K. D., Casulo, C., Le Gouill, S., et al. 2019. Venetoclax plus R- or G-CHOP in non-Hodgkin lymphoma: results from the CAVALLI phase 1b trial. *Blood*, 133, 1964-1976. DOI: 10.1182/blood-2018-11-880526.
- Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. 2022. Datenbankabfrage mit Schätzung der Inzidenz, Prävalenz und des Überlebens von Krebs in Deutschland auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten. Mortalitätsdaten bereitgestellt vom Statistischen Bundesamt. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Verfügbar unter: [www.krebsdaten.de/abfrage](http://www.krebsdaten.de/abfrage). Abgerufen am 02.04.2023. DOI: 10.18444/5.03.01.0005.0017.0001.
- Zhang, H. P., Kurosaki, C., Yoshida, M., Hayashi, F., Yokoyama, S., et al. 2006. Solution structure of the IRF domain of human interferon regulator factors 4. RCSB PDB. Verfügbar unter: <https://www.rcsb.org/structure/2dll>. Abgerufen am 05.04.2023. DOI: 10.2210/pdb2dll/pdb.

## Literaturverzeichnis

- Zhao, P., Zang, L., Zhang, X., Chen, Y., Yue, Z., et al. 2018. Novel prognostic scoring system for diffuse large B-cell lymphoma. *Oncol Lett*, 15, 5325-5332. DOI: 10.3892/ol.2018.7966.
- Zhou, L., Gu, B., Shen, X., Binshen, O., Dong, L., et al. 2021. B cell lymphoma with IRF4 rearrangement: A clinicopathological study of 13 cases. *Pathology International*, 71, 183-190. DOI: <https://doi.org/10.1111/pin.13067>.
- Zhou, Z., Sehn, L. H., Rademaker, A. W., Gordon, L. I., LaCasce, A. S., et al. 2014. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*, 123, 837-842. DOI: 10.1182/blood-2013-09-524108.
- Zhuang, Y., Cheng, P. & Weintraub, H. 1996. B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol Cell Biol*, 16, 2898-905. DOI: 10.1128/mcb.16.6.2898.
- Ziepert, M., Hasenclever, D., Kuhnt, E., Glass, B., Schmitz, N., et al. 2010. Standard International Prognostic Index Remains a Valid Predictor of Outcome for Patients With Aggressive CD20+ B-Cell Lymphoma in the Rituximab Era. *Journal of Clinical Oncology*, 28, 2373-2380. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.2493.
- Zotos, D. & Tarlinton, D. M. 2012. Determining germinal centre B cell fate. *Trends Immunol*, 33, 281-8. DOI: 10.1016/j.it.2012.04.003.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

### 7.1 Allgemeine Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Pathologie und Neuropathologie, Abteilung für Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie, unter Betreuung von Frau Prof. Dr. med. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. med. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend und Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld.

Die Fallsuche wurde von mir mit Unterstützung durch Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld durchgeführt.

Die histopathologische Befundung der Fälle erfolgte durch Frau Prof. Dr. med. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend, Herrn Prof. Dr. med. Falko Fend, Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld und mich.

Die histologischen und immunhistochemischen Färbungen sowie die Leerschnitte für die molekularen Analysen wurden vom medizinisch-technischen Personal des immunhistochemischen Labors der Abteilung für Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie unter Leitung von Frau Claudia Hermann angefertigt und in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. med. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend und Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld ausgewertet.

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen wurden, nach Einarbeitung durch Frau Dipl.-Biol. Barbara Mankel, von mir, mit Unterstützung durch Frau Dipl.-Biol. Barbara Mankel, angefertigt und in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld ausgewertet.

Die NGS-Panelsequenzierungen und Einzelamplikonerstellungen wurden, nach Einarbeitung durch Frau Rebecca Braun, Frau Esther Kohler und Frau Franziska Mihalik von mir, mit technischer Unterstützung durch die vorgenannten Personen, durchgeführt, wobei das Library-Pooling sowie die Bedienung des Ion Chef™ und des Ion GeneStudio S5 Prime™ durch Frau Rebecca Braun und Frau Franziska Mihalik erfolgten. Die Auswertung dieser Untersuchungen erfolgte von mir eigenständig nach Einarbeitung durch und unter Supervision von Frau Franziska Otto, M.Sc. und Frau Dr. rer. nat. Irina Bonzheim.

## Erklärung zum Eigenanteil

Die Geneexpressionsprofil-Analysen wurden nach Einarbeitung durch Mitarbeiter der Firma HTG Molecular Inc. von mir, mit Unterstützung durch Frau Esther Kohler, erstellt. Hierbei erfolgte die Bedienung des Ion Chef™ und des Ion GeneStudio S5 Prime™ durch Frau Rebecca Braun und Frau Franziska Mihalik, die Auswertung erfolgte von mir eigenständig nach Einarbeitung durch Mitarbeiter der Firma HTG Molecular Inc. und unter Supervision von Frau Franziska Otto, M.Sc.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld.

Ich versichere, dieses Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 01.11.2023

Sebastian Streich

## **7.2 Erklärung zum Eigenanteil für die Publikation Streich et al. (2023)**

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit durch Frau Prof. Dr. med. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld und mir.

Die Fallsuche wurde von mir mit Unterstützung durch Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld durchgeführt.

Die histopathologische Befundung der Fälle erfolgte durch Frau Prof. Dr. med. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend, Herrn Prof. Dr. med. Falko Fend, Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld und mich.

Die histologischen und immunhistochemischen Färbungen sowie die Leerschnitte für die molekularen Analysen wurden vom medizinisch-technischen Personal des immunhistochemischen Labors der Abteilung für Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie unter Leitung von Frau Claudia Hermann angefertigt und in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. med. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend und Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld ausgewertet.

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen wurden, nach Einarbeitung durch Frau Dipl.-Biol. Barbara Mankel, von mir, mit Unterstützung durch Frau Dipl.-Biol. Barbara Mankel, angefertigt und in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld ausgewertet.

Die NGS-Panelsequenzierungen und Einzelamplikonerstellungen wurden, nach Einarbeitung durch Frau Rebecca Braun, Frau Esther Kohler und Frau Franziska Mihalik von mir, mit technischer Unterstützung durch die vorgenannten Personen, durchgeführt, wobei das Library-Pooling sowie die Bedienung des Ion Chef™ und des Ion GeneStudio S5 Prime™ durch Frau Rebecca Braun und Frau Franziska Mihalik erfolgten. Die Auswertung dieser Untersuchungen erfolgte von mir eigenständig nach Einarbeitung durch und unter Supervision von Frau Franziska Otto, M.Sc. und Frau Dr. rer. nat. Irina Bonzheim.

Die Geneexpressionsprofil-Analysen wurden nach Einarbeitung durch Mitarbeiter der Firma HTG Molecular Inc. von mir, mit Unterstützung durch Frau Esther Kohler, erstellt. Hierbei erfolgte die Bedienung des Ion Chef™ und des Ion GeneStudio S5 Prime™ durch Frau Rebecca Braun und Frau Franziska Mihalik, die Auswertung erfolgte von mir

## Erklärung zum Eigenanteil

eigenständig nach Einarbeitung durch Mitarbeiter der Firma HTG Molecular Inc. und unter Supervision von Frau Franziska Otto, M.Sc.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld.

Das Manuskript wurde durch Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld, Frau Prof. Dr. med. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend und mich verfasst.

Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld hat erklärt, dass mein Anteil an der geteilten Erstautorschaft bei über 50 % liegt.

Alle Co-Autoren haben erklärt, dass sie mit der Verwendung der Veröffentlichung bzw. der Daten im Rahmen dieser Dissertationsschrift und mit den Erklärungen zum Eigenanteil einverstanden sind.

Tübingen, den 01.11.2023

Sebastian Streich

### **7.3 Erklärung zum Eigenanteil für die Publikation Frauenfeld et al. (2022)**

Teile der Ergebnisse zu den Fällen mit den Nummern 35 und 36 wurden bereits in der Arbeit von Frauenfeld et al. (2022), bei welcher ich als Co-Autor mitgewirkt habe, unter den dortigen Fallnummern 10 und 20 veröffentlicht. Für diese Ergebnisse gilt folgende Erklärung zum Eigenanteil:

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen für diese Fälle wurden, nach Einarbeitung durch Frau Dipl.-Biol. Barbara Mankel, von mir, mit Unterstützung durch Frau Dipl.-Biol. Barbara Mankel, angefertigt und in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld ausgewertet.

Die Geneexpressionsprofil-Analysen mittels HTG EdgeSeq-Plattform für diese Fälle wurden nach Einarbeitung durch Mitarbeiter der Firma HTG Molecular Inc. von mir, mit Unterstützung durch Frau Esther Kohler, erstellt. Hierbei erfolgte die Bedienung des Ion Chef™ und des Ion GeneStudio S5 Prime™ durch Frau Rebecca Braun und Frau Franziska Mihalik, die Auswertung erfolgte von mir eigenständig nach Einarbeitung durch Mitarbeiter der Firma HTG Molecular Inc. und unter Supervision von Frau Franziska Otto, M.Sc.

Die Erstautoren und alle Co-Autoren haben erklärt, dass sie mit der Verwendung der Veröffentlichung bzw. der Daten im Rahmen dieser Dissertationsschrift und mit den Erklärungen zum Eigenanteil einverstanden sind.

Tübingen, den 01.11.2023

Sebastian Streich

## 8 Veröffentlichungen

### Publikationen

Der Großteil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde bereits in der zugehörigen Publikation veröffentlicht (Streich et al., 2023):

**Streich, S.**, Frauenfeld, L., Otto, F., Mankel, B., Bonzheim, I., Fend, F., & Quintanilla-Martinez, L. (2023). Prevalence of *IRF4* rearrangement in large B-cell lymphomas of the Waldeyer's ring in adults. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 482(3), 551–560. <https://doi.org/10.1007/s00428-023-03516-7>

Weiterhin wurden Teile dieser Arbeit in einer weiteren Publikation veröffentlicht (Frauenfeld et al., 2022):

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>

### Kongressbeiträge

**Streich, S.**, Frauenfeld, L., Otto, F., Mankel, B., Bonzheim, I., Fend, F., Quintanilla-Martinez, L. Prevalence of *IRF4* Rearrangement in Large B-Cell Lymphomas of the Waldeyer's Ring in Adults. 20th Meeting of the European Association for Haematopathology (EAHP), Online-Kongress (2021).

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend für die Überlassung des außerordentlichen spannenden Themas und die zu jeder Zeit exzellente und konstruktive Betreuung.

Ein großer Dank gilt auch Frau Dr. med. Leonie Frauenfeld, die mich bereits im Rahmen einer Projektarbeit während des Studiums betreut hat, aus der sich diese Promotion entwickelte, und die immer bei Fragen und Nöten immer eine schnelle, unkomplizierte Lösung wusste.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Franziska Otto, M.Sc. für die exzellente Einarbeitung, Betreuung und Unterstützung bei den molekularpathologischen Methoden wie NGS und GEP bedanken.

Besonderen Dank schulde ich außerdem Frau Dipl.-Biol. Barbara Mankel, die mich bereits vor dieser Promotionsarbeit in die FISH einarbeitete und währenddessen bei Fragen und Problemen immer eine Quelle fundierten Fachwissens war.

Mein Dank gilt auch Frau Esther Kohler für die unermüdliche Unterstützung bei der zeitweise aussichtslos erscheinenden Genexpressionsanalyse und Frau Franziska Mihalik sowie Frau Rebecca Braun für die Einarbeitung und technische Unterstützung in der Mutationsanalyse.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiter\*innen des immunhistochemischen Labors der Abteilung bedanken, die auch in Zeiten großer Arbeitsbelastung immer Zeit für zusätzliche Arbeit für dieses Forschungsprojekt fanden.

Dieses Promotionsvorhaben wurde durch das IZKF-Promotionskolleg der medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen mit finanziellen und Sachmitteln unterstützt, wofür den Verantwortlichen großer Dank gebührt.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken, die mich während meines Studiums und der Promotion immer unterstützt hat. Besonderer Dank gilt meinem Großvater Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Franz Noll, ohne den ich nicht zum Medizinstudium gefunden hätte.