

**Detektion von geringfrequenten
Varianten in B-Zell-Lymphomen zur
genomischen Charakterisierung
pädiatrischer Hodgkin-Lymphome mit
primär erhöhter
Chemotherapieresistenz**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

M. Sc. Desch, Ann-Kathrin

aus Bad Soden-Salmünster

Gießen 2019

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

Erster Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Dammann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Andreas Bräuninger

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.20

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	vi
Tabellenverzeichnis.....	vii
Abkürzungsverzeichnis	viii
1. Einleitung.....	1
1.1 Lymphome.....	1
1.2 B-Zell-Entwicklung und Aktivierung.....	1
1.3 Non-Hodgkin-Lymphome	4
1.4 Hodgkin-Lymphome	5
1.4.1 Pädiatrische Hodgkin-Lymphome	6
1.5 Pathogenese	8
1.5.1 Differenzierungsassoziierte Pathogenese bei Lymphomen.....	8
1.5.2 Pathogenese bei HL.....	9
1.6 Nachweis von genomischen Aberrationen durch <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS)...	13
1.6.1 NGS-Anwendung beim HL.....	16
1.7 Zirkulierende zellfreie DNA (<i>circulating cell free DNA</i> : ccfDNA).....	17
1.8 Zielsetzung der Arbeit	18
2. Material.....	21
2.1 Patientenproben	21
2.2 Geräte	21
2.3 Verbrauchsmaterialien	23
2.4 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	24
2.5 Lösungen und Puffer.....	25
2.6 Verwendete Kits	26
2.7 Primerliste (Anhang: Tab. 1).....	27
2.8 Antikörper.....	27
2.9 Softwares	27
2.10 Statistik.....	28
3. Methoden	29
3.1 DNA- und RNA-Isolation aus den Patientenproben.....	29
3.1.1 DNA-Isolation für das Amplikon-basierte Verfahren	29
3.1.2 DNA-Isolation für das <i>hybrid-capture</i> -basierte Verfahren.....	29
3.1.3 RNA-Isolation für die RNA-Sequenzierung.....	30
3.1.4 Konzentrationsbestimmung.....	31
3.1.5 Qualitätskontrolle der DNA- und RNA-Proben.....	31
3.2 <i>Targeted Next Generation Sequencing</i> (tNGS) mittels MiSeq/NextSeq550	33

3.2.1	Verschiedene Bibliothek-Präparationen.....	35
3.2.2	Klonale Amplifikation und Sequenzierung	52
3.2.3	Auswertung der NGS-Daten	56
3.3	Validierungen der SNVs, Indels, TLs und VDJs	62
3.3.1	Anreicherung der HRS-Zellen	62
3.3.2	PCR-Amplifikation	63
3.3.3	Sequenzierungen	66
3.4	Immunhistochemische Färbungen	74
3.4.1	CD30-Färbung.....	76
3.5	Histologische Färbung	77
3.5.1	Pikrosiriusrot-Färbung	77
4	Ergebnisse	79
4.1	Targetierte <i>Next Generation Sequencing</i> -Analysen (tNGS)	79
4.1.1	Amplikon-basiertes Verfahren	79
4.1.2	<i>Hybrid-capture</i> -basierte Methode.....	85
4.1.3	Untersuchungen der ccfDNAs von pHL mit einem qPET >3 und <3	101
4.1.4	Therapiemonitoring mit ccfDNA der pHL-Patienten	109
4.2	Pikrosiriusrot-Färbungen bei qPET >3 und <3-Patienten	112
4.3	Ganz-Exom-Sequenzierungen (WES) mit ccfDNA der pHL-Patienten.....	115
4.3.1	RNA-Sequenzierung am Ganzschnitt zur Verifizierung	119
4.3.2	WES-Daten-Auswertung	120
5	Diskussion	123
5.1	Untersuchungen pHL	123
5.2	Targetierte <i>Next Generation Sequencing</i> Analysen (tNGS)	124
5.2.1	Amplikon-basiertes Verfahren	124
5.2.2	<i>Hybrid-capture</i> -basiertes Verfahren	125
5.3	Histologische Untersuchung pHL	144
5.4	Ganz-Exom-Sequenzierung (WES)	146
6	Zusammenfassung	154
7	Summary	156
	Literaturverzeichnis	158
	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Publikationen	270
	Danksagung	271
	Selbstständigkeitserklärung	272

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Immunhistochemische Färbung (CD20) eines MZL	5
Abb. 2: Immunhistochemische Färbung (CD30) eines HL (NS)	5
Abb. 3: Anlagerung der beiden Oligo-Pools an die Targetregion in getrennten Reaktionen	35
Abb. 4: Verlängerung und Ligation der gebundenen Oligos	37
Abb. 5: Anlagerung der Index-Adapter	37
Abb. 6: Vorbehandlung der Schnittpräparate für die histologischen und immunhistochemischen Färbungen	76
Abb. 7: Anzahl der Mutationen je Fall und Allelfrequenzen der potenziellen Varianten mit Keimbahn-Varianten, die im FFPE-Gewebe der 37 HL mittels Amplikon-basiertem tNGS-Verfahren detektiert wurden	82
Abb. 8: Übersicht aller identifizierter somatischer und Keimbahn-Varianten sowie Translokationen und VDJ-Rekombinationen der 95 Non-HL (FFPE-Gewebe), die durch das <i>hybrid-capture</i> -Verfahren untersucht wurden.	89-90
Abb. 9: Anzahl der Mutationen je Fall (a) und Allelfrequenzen (b) der identifizierten somatischen und Keimbahn-Varianten, die in der gDNA aus FFPE-Gewebe bzw. ccfDNA aus Blut der 12 Non-HL-Patienten durch das <i>hybrid-capture</i> -basierte tNGS-Verfahren identifiziert wurden.	96
Abb. 10: Anzahl der Mutationen je Fall und Allelfrequenzen der identifizierten somatischen Varianten, die in den gDNAs aus FFPE-Gewebe bzw. ccfDNAs aus Blut der 11 pHL-Patienten durch das <i>hybrid-capture</i> -basierte tNGS-Verfahren identifiziert wurden.	101
Abb. 11: Übersicht aller identifizierter somatischer Varianten, sowie Translokationen und VDJ/DJ-Rekombinationen der 22 pHL (ccfDNA aus Blut), die durch das <i>hybrid-capture</i> Verfahren untersucht wurden	104
Abb. 12: IgH- <i>Switch-Region gamma 2/AICDA</i> -Translokation in einem der 22 untersuchten pHL-Patienten, detektiert mittels <i>hybrid-capture</i> -basiertem tNGS-Verfahren	105
Abb. 13: Anzahl der Mutationen je Fall und Allelfrequenzen der identifizierten Varianten, die in den ccfDNAs aus Blut der 22 pHL-Patienten mittels <i>hybrid-capture</i> -basiertem tNGS-Verfahren identifiziert wurden.	107

Abb. 14: Prozentualer Anteil der Patienten, die Varianten in Genen tragen, die in unterschiedlichen Signalwegen und zellulären Funktionen eine Rolle spielen, unterteilt in qPET <3 (n=13)- und >3- (n=9) Patienten..	108
Abb. 15: Detektion von somatischen Varianten in ccfDNA bei 6 qPET <3 pHL-Patienten vor Therapie und im Therapieverlauf.	110
Abb. 16: Detektion von somatischen Varianten in ccfDNA bei 6 qPET >3 pHL-Patienten vor Therapie und im Therapieverlauf.	111
Abb. 17: PSR-Färbungen von jeweils zwei pHL-Patienten mit einem qPET <3 und >3.	114
Abb. 18: Allelfrequenzen der Varianten, die durch tNGS und WES von 11 pHL-Patienten mittels ccfDNA aus Blut identifiziert wurden.	117
Abb. 19: Identifizierte putative Varianten in 11 ccfDNAs von pHL-Patienten, die mittels WES/RNA-Seq untersucht wurden.	121
Abb. 20: Anzahl der Varianten und durchschnittliche VAF sowie der VAF-Bereich der identifizierten Varianten, die durch das <i>hybrid-capture</i> -basierte tNGS-Verfahren in gDNA aus FFPE-Gewebe bzw. ccfDNA aus Blut in 12 Non-HL-Patienten identifiziert wurden.	132
Abb. 21: Vergleich der detektierten Indels und SNVs der pHL-Patienten	141
Abb. 22: Vergleich der prozentualen Anteile der pHL-Patienten, bei denen Gene mehrfach von Varianten betroffen waren.	141
Abb. 23: Darstellung der Variantenzahlen und Filterungen, die in den 11 mittels WES untersuchten pHL-Patienten (ccfDNA) detektiert wurden.	149
Abb. 24: Prozentualer Anteil der 441 nicht bestätigten Varianten der 11 mittels <i>hybrid-capture</i> -basierter WES-Methode untersuchten pHL-Patienten (ccfDNA), unterteilt in inaktivierende- und Austausch-Varianten.	151

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Patientendaten der 37 untersuchten HL	80
Tab. 2: Laufcharakteristika der 37 mittels des Amplikon-basierten Verfahrens untersuchten gDNAs von HL-Patienten. Die Auswertung erfolgte mittels BaseSpace mit dem <i>Amplicon DS v1.2</i> - (Illumina) und <i>TruSeq Amplicon</i> -Programm (Illumina) durch den <i>Smith Waterman Algorithmus</i>	81
Tab. 3: Laufcharakteristika der 95 mittels des <i>hybrid-capture</i> -basierten Verfahrens untersuchten gDNAs von Non-HL-Patienten. Die Auswertung erfolgte mittels BaseSpace mit dem <i>Enrichment v3.0</i> Programm (Illumina) durch den <i>Isaac Aligner</i>	87
Tab. 4: Übersicht der Varianten bei den unterschiedlichen Entitäten, die in den gDNAs der 95 Non-HL durch das <i>hybrid-capture</i> Verfahren mit dem <i>Enrichment v3.0</i> -Programm detektiert wurden.	91
Tab. 5: Vergleich zwischen tNGS- und FISH-Analyse sowie weitere detektierte TL-Bruchpunkte, die mittels gDNA aus FFPE-Gewebe durch die <i>hybrid-capture</i> -basierte Methode detektiert wurden.	93
Tab. 6: Laufcharakteristika der 12 mittels des <i>hybrid-capture</i> -basierten Verfahrens untersuchten gDNAs und ccfDNAs von Non-HL-Patienten. Die Auswertung erfolgte mittels BaseSpace mit dem <i>Enrichment v3.0</i> Programm (Illumina) durch den <i>Isaac Aligner</i>	95
Tab. 7: Übersicht zur Validierungsuntersuchung von insgesamt 40 Varianten in 25 Patienten, die zuvor mittels <i>hybrid-capture</i> -basiertem Verfahren in Non-HL detektiert und durch NGS (Kapa-Library Prep Kit) (n =7) und Sanger Sequenzierung (n =18) validiert wurden.	98
Tab. 8: Laufcharakteristika der 11 mittels des <i>hybrid-capture</i> -basierten Verfahrens untersuchten gDNAs und ccfDNAs der gleichen pHL-Patienten. Die Auswertung erfolgte mittels BaseSpace mit dem <i>Enrichment v3.0</i> Programm (Illumina) durch den <i>Isaac Aligner</i>	100
Tab. 9: Patientendaten der 22 untersuchten pHL-Patienten.	102
Tab. 10: Laufcharakteristika der 22 mittels des <i>hybrid-capture</i> -basierten Verfahrens untersuchten ccfDNAs von pHL-Patienten. Die Auswertung erfolgte mittels BaseSpace mit dem <i>Enrichment v3.0</i> Programm (Illumina) durch den <i>Isaac Aligner</i>	103
Tab. 11: Übersicht zur durchschnittlichen Anzahl der Mutationen je Fall sowie der VAFs der qPET <3 (n= 13) und >3 (n= 9) pHL-Patienten, die mittels ccfDNA durch das <i>hybrid-capture</i> -basierte Verfahren untersucht wurden.	107

Tab. 12: Patientendaten der 11 untersuchten pHL-Patienten.	115-116
Tab. 13: Laufcharakteristika der 11 mittels des <i>hybrid-capture</i> -basierten WES-Verfahrens untersuchten ccfDNAs von pHL-Patienten. Die Auswertung erfolgte mittels BaseSpace mit dem <i>Enrichment v3.0</i> Programm (Illumina) durch den <i>Isaac Aligner</i>	116
Tab. 14: Laufcharakteristika der RNA-Seq-Untersuchungen der 8 makrodissektierten FFPE-Gewebe-Proben von pHL-Patienten, die mittels BaseSpace durch das Programm <i>RNA-Seq Alignment</i> und durch den <i>STAR Aligner</i> ausgewertet wurden.....	120
Tab. 15: Vergleich der 9 qPET >3 und 13 <3 pHL-Patienten in Bezug auf die identifizierten Varianten und mutierten Gene.	140
Tab. 16: Durchschnittliche ccfDNA-Konzentration in Plasma von 10 qPET <3 und 6 qPET >3 pHL-Patienten.	143

Tabellenverzeichnis (Anhang, siehe CD)

Tab. 1: Primerliste.	1-11
Tab. 2: Gene, die das <i>hybrid-capture</i> -basierte Panel beinhaltet (Version 1).....	11
Tab. 3: Gene, die in Version 2 zusätzlich für die pHL-Analysen im <i>hybrid-capture</i> -Panel integriert wurden.....	11
Tab. 4: Patientendaten der HL, die für das Amplikon-basierte Verfahren verwendet wurden (Archivfälle, qPET >3 und qPET <3), NS: Nodulär-sklerosierender Subtyp, MC: Mischtyp, LR: lymphozytenreicher Subtyp.....	12-13
Tab. 5: Lauf- und Bibliothekencharakteristika der HL (FFPE-Gewebe), die durch die Amplikon-basierte Methode sequenziert wurden (Archiv, qPET >3 und qPET <3). PF: Passing Filter, A: Pool A, B: Pool B.....	13-16
Tab. 6: Verifizierte Varianten der HL-Patienten (Amplikon-basiertes Verfahren), die mittels Sanger-Sequenzierung und NGS (Kapa-Fragment-Kit) überprüft wurden. VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode.....	17
Tab. 7: Laufcharakteristika des <i>hybrid-capture</i> -basierten Verfahrens der FFPE-Gewebe der Non-HL-Patienten. PF: Passing Filter.....	17-18

Tab. 8: Patientendaten, Bibliotheken- und Laufcharakteristika der FFPE-Gewebe-Proben der Non-HL-Patienten, die mittels <i>hybrid-capture</i> -basierter Methode untersucht wurden (FL: Follikuläre Lymphome, DLBCL: Diffus großzellige Lymphome, BL: Burkitt Lymphome, B-CLL: B-chronische lymphatische Leukämie, MCL: Mantelzell-Lymphome, MM: Multiple Myelome, MZL: Marginalzonen-Lymphom)	19-23
Tab. 9: Identifizierte Varianten, die in den Non-HL durch Untersuchungen von gDNAs aus FFPE-Gewebe mittels <i>hybrid-capture</i> Methode detektiert wurden. VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode	23-45
Tab. 10: Identifizierte Translokationen bei Non-HL, die mittels <i>hybrid-capture</i> -basierter Methode detektiert wurden und FISH Ergebnisse (FFPE-Gewebe) (FL: Follikuläre Lymphome, DLBCL: Diffus großzellige Lymphome, BL: Burkitt Lymphome, B-CLL: B-chronische lymphatische Leukämie, MCL: Mantelzell-Lymphome, MM: Multiple Myelome, MZL: Marginalzonen-Lymphom), pos: positiv, neg: negativ, n.a: kein Tumormaterial mehr vorhanden, k. Sig.: keine Signale	45-46
Tab. 11: Identifizierte VDJ-Rekombinationen, die in den Non-HL aus FFPE-Gewebe-Proben mittels <i>hybrid-capture</i> Methode identifiziert wurden.....	46-47
Tab. 12: Lauf- und Bibliothekenstatistik (Non-HL aus ccfDNAs).....	47
Tab. 13: Varianten in Non-HL: Vergleich der ccfDNA-Proben (Fall-Nr. LB) mit Primärgewebe (FFPE-Gewebe); grün markiert sind die Varianten, die sowohl im FFPE-Gewebe, als auch in der ccfDNA detektiert wurden. KM: Keimbahn-Varianten, HS: HotSpot-Variante, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode	48-57
Tab 14: Varianten der Non-HL, die durch das NGS-basierte Kapa Fragment Kit überprüft wurden. * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode	57
Tab. 15: Validierte somatische- und Keimbahn-Varianten der Non-HL (Sanger-Sequenzierung). VAF: Varianten-Allelfrequenz, KM: Keimbahn-Variante, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode.....	58-60
Tab. 16: Validierte Translokationen in Non-HL, die mittels Sanger-Sequenzierung untersucht wurden.....	60-61
Tab. 17: VDJ-Rekombinationen der Non HL, die durch Sanger-Sequenzierung verifiziert wurden.....	61
Tab. 18: Patientendaten der pHL, die mittels <i>hybrid-capture</i> Methode sequenziert wurden (FFPE und ccfDNA), NS: nodulär-sklerosierender Subtyp, MC: Mischtyp	61

Tab. 19: Laufcharakteristika der gDNAs von pHL-Patienten (FFPE-Gewebe), die durch das <i>hybrid-capture</i> Verfahren generiert wurde. PF: Passing Filter.....	62
Tab. 20: Lauf- und Bibliothekencharakteristika der gDNAs von pHL-Patienten (FFPE-Gewebe), die mittels <i>hybrid-capture</i> Methode und durch den MiSeq/NextSeq550 generiert und durch das <i>Enrichment v3.0</i> -Programm ausgewertet wurde.....	62-63
Tab. 21: Laufcharakteristika der ccfDNAs von 11 pHL-Patienten, die mittels <i>hybrid-capture</i> -basierter Methode untersucht wurden. PF: Passing Filter).....	63
Tab. 22: Lauf- und Bibliothekcharakteristika der ccfDNAs von pHL-Patienten, die mittels <i>hybrid-capture</i> Methode durch das <i>Enrichment v3.0</i> -Programm ausgewertet wurde.	63-64
Tab. 23: Varianten (HL; ccfDNA), die mittels <i>hybrid-capture</i> -basiertem Verfahren detektiert wurden. KM: Keimbahn-Varianten, x: Variante wurde auch im FFPE-Gewebe detektiert, VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode).	64-67
Tab. 24: Patientendaten der pHL-Patienten (ccfDNA). NS: nodulär-sklerosierender Subtyp, MC: Mischtyp	67-68
Tab. 25: Laufcharakteristika der ccfDNAs von pHL-Patienten, die durch das <i>hybrid-capture</i> -basierte Verfahren untersucht wurde. PF: Passing Filter	68
Tab. 26: Bibliotheken- und Laufcharakteristika der ccfDNAs von pHL-Patienten, die mittels <i>hybrid-capture</i> -basierter Methode untersucht und durch das <i>Enrichment v3.0</i> -Programm ausgewertet wurden	69-70
Tab. 27: Varianten der 22 pHL-Patienten (ccfDNA), die mittels <i>hybrid-capture</i> Methode detektiert wurden. VAF: Varianten-Allelfrequenz, KM: Keimbahn-Varianten, x: durch Sanger-Sequenzierung validierte Varianten, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode.....	70-75
Tab. 28: VDJ-Rekombinationen (pHL-Patienten, ccfDNA), die mittels <i>hybrid-capture</i> -basiertem Verfahren detektiert wurden. R/S: <i>Replacement-/silent mutations</i> , FR: <i>Framework-Region</i> , CDRIII: <i>complementary-determining-region-III</i>	75-76
Tab. 29: Auswertung der PSR-Färbungen (qPET >3 und <3-Patienten) mittels des Programmes QuPath. NS: Nodulär-sklerosierender Subtyp, MC: Mischtyp	76

Tab. 30: Patientendaten der 11 untersuchten pHL-Patienten, deren ccfDNAs für das WES verwendet wurden.....	76-77
Tab. 31: Laufcharakterika der ccfDNAs von 11 pHL-Patienten, die mittels WES untersucht wurden. PF: Passing Filter).....	77
Tab. 32: Bibliotheken- und Laufcharakteristika der ccfDNAs von 11 untersuchten pHL-Patienten (ccfDNA), die mittels <i>hybrid-capture</i> -basierter Methode (WES) untersucht wurden	77-78
Tab. 33: Varianten (tNGS) der 11 pHL-Patienten, die durch WES untersucht wurden. X: Varianten, die auch im WES ungefiltert bzw. gefiltert vorkamen, VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode	78-82
Tab. 34: Laufcharakteristika der gDNAs der 8 untersuchten pHL-Patienten (FFPE-Gewebe; RNA-Seq). PF: Passing Filter	82-83
Tab 35: Indels und SNVs der ccfDNAs von 11 untersuchten pHL-Patienten (WES). VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode).	83-84
Tab. 36: Austausch-Varianten der ccfDNAs von 11 pHL-Patienten (WES). VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode).....	84-85
Tab. 37: Variantenliste der putativen Varianten, die durch WES detektiert und durch RNA Seq bestätigt wurden. VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode.....	85-87
Tab: 38: Varianten der pHL-Patienten (WES), die durch die NGS-basierte Methode mittels KAPA-Fragment-Kit verifiziert wurden. KM: Keimbahn-Varianten, VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode	87

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	<i>activated B-cell</i>
AG	Antigen
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zellen
aq. dest.	Aqua destillata
B-CLL	chronischen lymphatischen Leukämie
BCR	<i>B-cell receptor</i>
BL	Burkitt-Lymphom
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BND	<i>translocation breakend</i>
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
C	Cytosin
ccfDNA	zirkulierende zellfreie DNA (<i>circulating cell free DNA</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
ctDNA	zirkulierende tumor DNA (<i>circulating tumor DNA</i>)
CDR	komplementaritätsbestimmende Region (<i>complementary determining region</i>)
cHL	klassisches Hodgkin Lymphom
COPDAC	<i>cyclophosphamide, vincristine, prednisone, dacarbazine</i>
COPP	<i>cyclophosphamide, vincristine, prednisone, procarbazine</i>
CSR	Klassenwechsel (<i>class switch recombination</i>)
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DECOPDAC	<i>doxorubicin, etoposide, cyclophosphamide, vincristine, prednisone, dacarbazine</i>
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom

DLSO	<i>downstream-Oligo</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EFS	<i>event free survival</i>
ERA	<i>early response assessment</i>
EtOH	Ethanol
EuroNet-PHL	<i>European Network of Pediatric Hodgkin Lymphoma</i>
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
fDC	follikuläre dendritische Zelle
FDG-PET	2-Fluor-2-Desoxy-D-Glucose-Positronen-Emissions-Tomographie
FFPE	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FL	follikuläres Lymphom
fs	<i>frameshift</i>
fT _H -Zellen	follikuläre T-Helfer Zellen
G	Guanin
GC	Keimzentrum (<i>germinal center</i>)
gDNA	genomische DNA
H ₂ O	Wasser
HIER	hitzeinduzierte Epitop-Demaskierung
HL	Hodgkin-Lymphome
HPSF	<i>High Purity Salt Free</i>
HRS	Hodgkin-Reed-Sternberg
HT-NGS	<i>high-throughput-NGS</i>
if	<i>inframe</i>
Ig	Immunglobulin

IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
IMGT	<i>The International Immunogenetics Information System</i>
Indels	Insertionen und Deletionen
IS	Immunsystem
ISP	<i>Ion Sphere Particle</i>
Kb	Kilo-Basenpaare
kLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop
LD	lymphozytenarm
LR	lymphozytenreich
LRA	<i>late response assessment</i>
LS	<i>lower strand</i>
MC	Mischtyp
MCL	Mantel-Zell-Lymphom
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mind.	mindestens
MM	Multipl. Myelom
MZL	Marginalzonen-Lymphom
n	Anzahl
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLPHL	nodulär lymphozyten-prädominantes Hodgkin Lymphom
Non-HL	Non-Hodgkin-Lymphome
NS	noduläre Sklerose
OEPA	Vincristin, Etoposid, Prednison und Doxorubicin
OS	<i>overall survival</i>
PBMC	mononukleären Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)

PEG	Polyethylenglykol
pHL	pädiatrische Hodgkin-Lymphome
PMP	paramagnetische Partikel
PSR	Pikrosiriusrot
qPET	quantitativer Positronen-Emissions-Tomographie
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RSS	<i>recombination signal sequences</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SBS	<i>sequencing-by-synthesis</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SHM	somatische Hypermutation (<i>somatic hypermutation</i>)
SPRI	<i>Solid Phase Reversible Immobilization</i>
SN	Sekundärneoplasie
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SNV	<i>single nucleotide variants</i>
SV	<i>structure variants</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TF	Transkriptionsfaktor
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
TL	Translokation
TSS	Transkriptionsstartstelle (<i>transcription start site</i>)
tNGS	<i>targeted Next Generation Sequencing</i>
ULSO	<i>upstream-Oligo</i>
UMI	<i>unique molecular identifiers</i>
VAF	Varianten-Allelfrequenz
VDJ-Segmente	Variable-Diversitäts-Verbindungs-Segmente
WGS	Ganz-Genom-Sequenzierung
WES	Ganz-Exom-Sequenzierung

WHO

Weltgesundheitsorganisation (*world health organization*)

z.B.

zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Lymphome

Lymphome sind heterogene Tumore des lymphatischen Systems, die von transformierten, klonal proliferierenden Lymphozyten abstammen (1). Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden maligne Lymphome in Non-Hodgkin-Lymphome (Non-HL) und Hodgkin-Lymphome (HL) unterteilt (1). Die Einteilung hat historische Hintergründe. Als Thomas Hodgkin 1832 das HL zum ersten Mal beschrieb, nannte er es zunächst *Hodgkin Disease*, da er annahm, dass es sich um eine neue Tumorentität handelt (2). Erst 1996 stellte sich durch weitere Untersuchungen heraus, dass diese Erkrankung dem lymphatischen System zuzuordnen ist, weshalb der Name in HL geändert wurde (3).

Das HL stellt mit 11% aller malignen Lymphome einer der häufigsten Lymphome weltweit dar und macht 1% aller Tumore aus (4). Es ist eine gut therapierbare Erkrankung, wobei die jährliche Inzidenz konstant bei 2,8/100.000 Personen (1) und die Mortalität durch ein Rezidiv oder eine Sekundärneoplasie (SN) bei den Lymphom-Patienten bei 0,2% pro Jahr liegt (4). Die Anzahl der Menschen, die an Non-HL erkranken, nimmt dagegen jährlich zu und macht aktuell 4,3% aller diagnostizierten Tumore aus. Die Inzidenz der Non-HL liegt bei 19,4/100.000 Personen im Jahr und die Mortalitätsrate der Lymphom-Patienten bei 3,3% pro Jahr (5). Die Wahrscheinlichkeit an einem Non-HL zu erkranken, nimmt mit steigendem Alter kontinuierlich zu, wobei die meisten Personen im Alter von über 60 Jahren erkranken. HL sind durch eine bimodale Altersverteilung gekennzeichnet. Kinder unter 5 Jahren erkranken selten, wohingegen das HL bei jungen Erwachsenen zwischen 20 bis 30 Jahren und älteren Menschen über 55 Jahren vermehrt auftritt (1).

1.2 B-Zell-Entwicklung und Aktivierung

B-Lymphozyten werden in der fetalen Leber bzw. im Knochenmark gebildet und dienen der adaptiven Immunantwort. B-Zellen prägen für die spezifische Immunantwort gegen Pathogene einen Antigen (AG)-Rezeptor (*B-cell-receptor*: BCR) auf der Zelloberfläche aus. Die unreife B-Zelle bildet zunächst einen funktionellen, nicht autoreaktiven BCR aus, der aus zwei identischen schweren (H)- und aus zwei identischen leichten (L) Immunglobulin (Ig)-Ketten besteht. Die wiederum setzen sich jeweils aus einer konstanten (C)- und einer variablen (V) Region zusammen. Die C-Region der schweren Kette legt den Isotyp des Antikörpers (AK) fest und übernimmt Effektor- und Signalfunktionen, währenddessen die V-Region für die spezifische AG-Erkennung zuständig ist. Die Ig-Domänen dieser V-Regionen enthalten drei Schleifen, die drei hypervariablen Regionen oder komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR) umfassen (6). Jede B-Zelle prägt einen einzigartigen BCR aus, weshalb die CDR-III-Region als klonaler Marker für die Identifizierung von B-Zell-Klonen fungieren kann.

Das Ig-Repertoire beim Menschen umfasst mindestens 10^{11} verschiedene AK-Moleküle. Bei der somatischen Rekombination (*Rearrangement*) kommt es zu Genumlagerungen von Variablen (V)-, Diversitäts (D)- und Verbindungs (J)-Segmenten der V-Region der schweren Ig-Kette (V_H -Region). Für die schwere Kette gibt es im Menschen etwa 40 V_H -, 25 D_H - und 6 J_H -Gen-Segmente auf Chromosom 14 (6). Die zufällige Auswahl eines Gensegmentes während der somatischen Rekombination und die große Anzahl an unterschiedlichen Kombinationen sorgen für die Vielfalt des Rezeptor-Repertoires (7, 8). Bei der VDJ-Rekombination kommt es zu kontrollierten Doppelstrangbrüchen an bestimmten Signalsequenzen und einer darauf folgenden Neuverknüpfung. Die zu rekombinierten V-, D-, J-Segmente besitzen Signalsequenzen, die sogenannten *Recombination Signal Sequences* (RSS), welche von *recombination activating gene 1/2* (RAG1 und -2) (lymphozyten-spezifische Rekombinasen) erkannt und geschnitten werden, wodurch es zum Doppelstrangbruch kommt (9). Eine zusätzliche Variantenvielfalt der Ig wird durch die Ungenauigkeit des anschließenden Verknüpfungsprozesses selbst gewährleistet. Das geschieht, indem die Haarnadelstruktur durch die Endonuklease *Artemis* an einer zufälligen Stelle geöffnet wird, sodass es zu überhängenden Nukleotiden kommt, die durch komplementäre Basen aufgefüllt werden. Diese entstandenen, palindromischen Sequenzen nennt man P-Nukleotide. Durch den zusätzlichen Abbau von Basen durch Exonukleasen, sowie das Einfügen sogenannter N-Nukleotide (nicht-keimbahnkodierende Nukleotide) durch die *Terminale Desoxynukleotidyltransferase* (TDT) kommt es zur zusätzlichen junktionalen Vielfalt. Diese Vorgänge führen zu einer kombinatorischen Diversität (6).

Im Anschluss folgt die Genumlagerung der leichten Ig-Kette, die synonym zur VDJ-Rekombination abläuft, mit dem Unterschied, dass bei der leichten Ig-Kette das D-Gensegment fehlt. Die leichte Kette wird vom κ -Lokus auf Chromosom 2 und dem λ -Lokus auf Chromosom 22 kodiert, wobei eine Genumlagerung auf dem λ -Lokus nur erfolgt, wenn die VJ-Rekombination beider Allele des κ -Lokus nicht erfolgreich war (9). Das menschliche Genom besteht aus 40 funktionellen $V\kappa$ -, 5 $J\kappa$ -, 30 $V\lambda$ und 4 $J\lambda$ -Gensegmenten, die für die leichten Ketten kodieren (6).

Kommt eine naive prä-Keimzentrums (GC)-B-Zelle (reife B-Zelle, die noch keinen Kontakt zum AG hatte) in der Peripherie mit einem AG in Kontakt, wandert sie in die sekundären lymphatischen Organe (z.B. Lymphknoten, Milz), wo sie mit AG-präsentierenden Zellen (APC) und T-Helferzellen (T_H -Zellen) interagiert. Durch die Interaktion mit AG-spezifischen T_H -Zellen werden Proliferationssignale und die Expression anderer Gene in B-Zellen ausgelöst, die zur Entstehung der GC in den Lymphknoten beitragen. Die GC bestehen aus einer hellen und dunklen Zone. In der dunklen Zone findet die B-Zelldifferenzierung in Zentroblasten und deren massive Proliferation statt, währenddessen in der hellen Zone die Selektionsprozesse stattfinden. Die Affinitätsreifung wird mit der sogenannten somatischen Hypermutation (SHM)

eingeleitet (6). Die SHM verursacht Einzelnukleotid-Austausche, sowie Deletionen und Insertionen in den V-Regionen und beschränkt sich auf einen Bereich über 2 Kilobasen (kb) stromabwärts von der Transkriptionsstartstelle (TSS) der IgV-Gene. Dabei liegt die Mutationsrate bei 10^{-3} bis 10^{-4} Mutationen je Basenpaar (bp) und Zellteilung (10). Nach der SHM gelangen die Zentroblasten als Zentrozyten in die helle Zone, wo sie eine Selektion durch Interaktion mit follikulären T_H -Zellen (fT_H) und follikulären dendritischen Zellen (fDC) erfahren. Zentrozyten können durch den BCR unprozessierte AG auf den fDC erkennen und durch ihren *major histocompatibility complex* (MHC)-II-Komplex das prozessierte AG den fT_H -Zellen präsentieren. Zentrozyten, die einen hoch affinen BCR besitzen, erhalten durch die CD40/CD40L-Interaktion Überlebenssignale und werden positiv selektioniert, währenddessen Zentrozyten mit einer geringen Bindungsaffinität negativ selektioniert werden und durch Apoptose eliminiert werden (6). Nach positiver Selektionierung wandert die B-Zelle meist wieder in die dunkle Zone, um weiter zu proliferieren und weitere SHM-Runden zu durchlaufen, um die BCR-Affinität weiter zu erhöhen.

Zudem kommt es im weiteren Verlauf zu einem sogenannten Klassenwechsel (CSR) der konstanten Regionen der Ig-Gene in der hellen Zone. Der Klassenwechsel oder Isotypenwechsel genannt, ist für die funktionelle Vielfalt verantwortlich, indem die C_μ -Region des Ig-Gens, die zuerst exprimiert wird, durch die konstante Region einer anderen schweren Kette ersetzt wird und so IgG-, IgA- oder IgE-AK entstehen können. In Folge dessen können beim Klassenwechsel AK mit den gleichen AG-Spezifitäten entstehen, die jedoch unterschiedliche Effektorfunktionen haben. Für die Initiierung der SHM und des CSR ist die sogenannte *activation-induced-cytidine deaminase* (AID) verantwortlich, die bei der SHM und bei dem CSR Cytidinreste zu Uracil desaminiert. Durch diesen Vorgang werden Reparaturmechanismen in Gang gesetzt, die den Nukleotid-Austausch, aber auch Deletionen bewirken. Beim Klassenwechsel ist AID zudem an den Doppelstrangbrüchen in den sogenannten Switch-Regionen beteiligt. Switch-Regionen sind DNA-Bereiche, die aus vielfach wiederholten 10-80 bp langen Sequenzen bestehen und sich vor allen Gensegmenten für konstante Regionen, bis auf IgD, Pseudo-IgG und Pseudo-IgE, befinden. Durch diesen Vorgang wird der Austausch der konstanten Regionen hervorgerufen.

Nach positiver Selektionierung können einige Zellen unter Kontrolle des regulatorischen Proteins *B-lymphocyte-induced maturation protein 1* (*BLIMP-1*) zu Plasmazellen differenzieren. *BLIMP-1* ist ein Repressor für B-zellspezifische Gene. Das Protein unterdrückt die Expression von Genen, die für die Proliferation, den Isotypwechsel und die Affinitätsreifung der B-Zellen in den GC notwendig sind. B-Zellen können sich durch Expression von *BLIMP-1* zu Plasmazellen entwickeln. Sie proliferieren nicht mehr, verstärken ihre Synthese und Freisetzung der Ig und verändern die Eigenschaften ihrer Zelloberfläche. Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 wird heruntergefahren, der das Chemokin CXCL13 erkennt, das

von fDCs zur Anlockung der B-Zellen im GC freigesetzt wird. Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 und des Integrins $\alpha_4\beta_1$ nimmt dagegen zu, sodass die Plasmazellen die GC verlassen (post-GC-Zellen) und in die peripheren Gewebe einwandern können. Andere GC-Zellen können zu Gedächtniszellen differenzieren. Diese Zellen sind Abkömmlinge von Zellen, die sich nach der Stimulation durch ein AG im GC vermehrt haben. Diese Zellen teilen sich nur sehr langsam, exprimieren Ig auf ihrer Oberfläche, sezernieren allerdings keine AK bzw. nur in geringen Mengen. Die Gedächtniszellen erben die genetischen Veränderungen, die in GC-Zellen stattgefunden haben, einschließlich der SHM und der Genumlagerung, die zum CSR führen, sodass sie bei erneutem Kontakt mit dem AG leichter aktiviert und einen hoch affinen AK produzieren können. Die langlebigen Gedächtniszellen stellen somit das immunologische Gedächtnis dar, da es das adaptive Immunsystem (IS) in die Lage versetzt, schneller und effektiver auf Pathogene zu reagieren, denen es zuvor bereits begegnet ist (6).

Es ist bekannt, dass 90% aller Lymphome einen B-Zell-Ursprung haben und einige von ihnen somatisch mutierte IgV-Gene aufweisen (1). Auf die differenzierungsassoziierte Pathogenese bei Lymphomen wird unter 1.5.1 genauer eingegangen.

1.3 Non-Hodgkin-Lymphome

Die Non-HL werden aufgrund ihres Phänotyps, den genetischen, sowie klinischen Merkmalen in unterschiedliche Subtypen unterteilt. Die Unterteilung der Subtypen erfolgt durch deren zellulären Ursprung. Non-HL können ihren Ursprung in Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), T- und B-Zellen haben, wobei nur 10% aller Non-HL ihren Ursprung in T- und NK-Zellen haben. B-Zell assoziierte Non-HL stammen von prä-GC-B-Zellen, GC-B-Zellen und post-GC-B-Zellen ab. Zu den prä-GC assoziierten Non-HL zählen das Mantel-Zell-Lymphom (MCL) und die unmutierte Form der chronischen lymphatischen Leukämie (B-CLL), die 7% aller Non-HL ausmachen. Burkitt-Lymphome (BL), folliculäre Lymphome (FL) und diffus großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) vom GC- und ABC (*activated B-cell*)-Typ stammen von GC-B-Zellen ab und machen mit insgesamt zirka 67% den größten Anteil der Non-HL aus. Zu den Non-HL, die von post-GC-B-Zellen abstammen, zählen Marginalzonen-Lymphome (MZL), Multiple Myelome (MM) und die mutierte Form der B-CLL. Sie machen zirka 26% aller Non-HL-Patienten aus. Bei Non-HL machen die Tumorzellen den überwiegenden Teil des zellulären Infiltrates aus (Abb. 1), wobei der Phänotyp der Zellen weitgehend erhalten bleibt (1, 11).

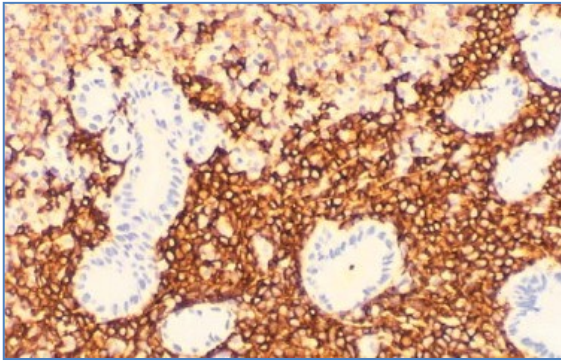


Abb. 1: Immunhistochemische Färbung (CD20) eines MZL

Durch die Färbung des B-Zell-Oberflächenmarkers CD20 können Tumorzellen in Non-HL dargestellt werden; abgebildet ist ein MZL.

1.4 Hodgkin-Lymphome

Die HL zeichnen sich durch mononukleäre Hodgkin- und multinukleäre Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) aus, die nur 1-5% des zellulären Infiltrates ausmachen (2, 12, 13) (Abb. 2). HL werden je nach Immunphänotyp, Morphologie und des zellulären Ursprungs in die klassischen HL (cHL) (90%) und die nodulär lymphozyten-prädominaten HL (NLPHL) (10%) unterteilt. Das cHL wird wiederum in vier Subtypen klassifiziert: nodulär-sklerosierendes cHL (NS) (70%), gemischt-zelliges cHL (MC) (20-25%), lymphozyten-reiches cHL (LR) (5%) und den lymphozyten-armen-(LD) Subtyp (<2%). Der NS-Typ zeichnet sich durch umfangreiche fibrotische Kollagen-Bänder und verdickte Kapseln aus. Charakteristisch für den MC-Typ ist ein gemischt-zelliger Anteil aus Lymphozyten, eosinophiler- und neutrophiler Granulozyten, sowie Histiozyten und Plasmazellen. Bei dem LR-Typ sind vermehrt B-Zellen vorzufinden, währenddessen das Mikromilieu beim LD-Subtyp von HRS-Zellen dominiert wird (1).

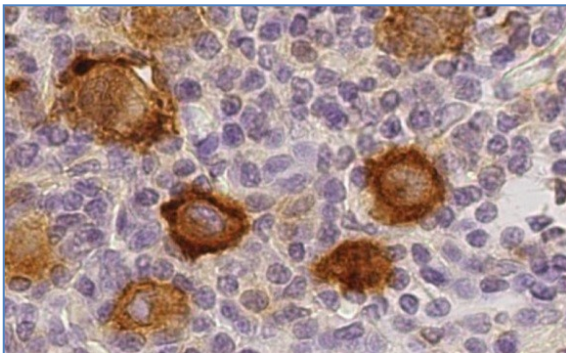


Abb. 2: Immunhistochemische Färbung (CD30) eines HL (NS)

Durch die Färbung des CD30-Oberflächenmarkers können HRS-Zellen dargestellt werden; abgebildet ist ein Lymphknoten (NS).

Die Ätiologie der Erkrankung ist weitgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass eine Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion die Entstehung von cHL begünstigt. So konnte in zirka 75% der

MC- und LD-Patienten eine EBV-Positivität der HRS-Zellen festgestellt werden. EBV scheint daher eine signifikante Rolle in der Pathogenese einiger Subtypen zu spielen (1).

Klinisch präsentiert sich das HL durch schmerzlose Lymphadenopathie in allen Altersgruppen und geht meist mit B-Symptomen (Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust) einher. Männer haben ein erhöhtes Risiko an cHL zu erkranken, wobei auch ein erblich bedingtes Risiko nicht ausgeschlossen werden kann. Die 5 Jahre Überlebensrate liegt bei HL-Patienten, die eine Stadien adaptive Therapie erhalten, bei >90% (1).

1.4.1 Pädiatrische Hodgkin-Lymphome

HL machen 7,4% aller Kinderkrebserkrankungen aus und sind die häufigste Lymphom-Erkrankung im Kindes- und Jugendalter. In Deutschland erkranken pro Jahr etwa 180 Kinder und Jugendliche unter 18 Jahren (14). Die Erkrankung ist bei Kindern unter 5 Jahren selten anzutreffen, aber ist einer der meist diagnostizierten Krebs-Erkrankungen bei Jugendlichen zwischen 15 und 19 Jahren (15). Bis zu einem Alter von 10 Jahren erkranken deutlich mehr Jungen (73%) als Mädchen (27%), während sich das Verhältnis im späteren Alter ausgleicht (16).

Adulte- und pädiatrische HL (pHL) wurden in Untersuchungen zur Pathogenese meist nicht getrennt voneinander untersucht, da man annahm, dass die Pathogenese-Mechanismen gleich sind. Bei einem Vergleich zwischen adulten- und pHL konnte jedoch gezeigt werden, dass sich das Mikromilieu beider Gruppen unterscheidet. Das Mikromilieu bei pHL wird durch eine erhöhte Anzahl an cytotoxischen T-Zellen und T_H-1 -Zellen geprägt. Außerdem zeigt es eine höhere Anzahl an $CD3^+$ -T-Zellen im Vergleich zu den $CD20^+$ -B-Zellen. Der Anteil an $CD20^+$ -B-Zellen ist bei pHL jedoch höher als der Anteil an $CD4^+$ - T_H -Zellen. Im Gegensatz dazu sind im Mikromilieu der adulte HL mehr $CD4^+$ - T_H -Zellen als $CD20^+$ -B-Zellen zu finden. Außerdem wurde gezeigt, dass auch bei pHL-Patienten die Pathogenese unter anderem von EBV-Infektionen abhängig ist (17, 18).

Wurde durch die histopathologische Begutachtung einer Exzisionsbiopsie von Lymphknoten oder anderen primär involvierten Organen ein HL diagnostiziert, folgt die Stadien-Einteilung nach Ann-Arbor, die den genauen Ausbreitungsgrad feststellt (19, 20). Zudem wird für die Beurteilung des Therapieansprechens und der weiteren Therapieplanung nach den ersten 2 Blöcken Induktions-OEPA-Chemotherapie (Vincristin, Etoposid, Prednison und Doxorubicin) (ERA: *early response assessment*) und nach der Therapie (LRA: *late response assessment*) die 2-Fluor-2-Desoxy-D-Glucose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) bzw. der qPET-Wert verwendet (21–25). Die FDG-PET dient der Visualisierung der tumorösen Bereiche (26), indem sie die FDG-Aufnahme der Leber und des Mediastinums mit der verbleibenden FDG-Tumoraufnahme verrechnet (23). Seit 2014 wird der Deauville Score als quantitatives Verfahren der FDG-PET-Antwort bei HL verwendet, wobei der Deauville Score in eine 5-

Punkte-Skala unterteilt wird (27, 28). Der qPET stellt eine semi-quantitative Erweiterung der Deauville Skala dar, der die Glukoseaufnahme im Tumorgewebe durch den FDG-PET-Scans beurteilt. Die semi-quantitative Methode des qPET detektiert das PEAK PET Signal (SUV) im Tumor und den Mittelwert des PET-Signals in der Leber. Der Quotient dieser Messungen ergibt den finalen qPET-Wert. Die Deauville Kategorien 3, 4, 5 korrespondieren mit den qPET-Werten 0,95, 1,3 und 2, wobei ab einer Kategorie von 4 ($qPET \geq 1,3$) von einer inadecuaten metabolischen Antwort ausgegangen wird (29). Je nach anschließend festgelegtem Stadium und Risikofaktor werden die Patienten in die jeweiligen Therapielevel (EuroNet-PHL-C2-Studie) (TL 1-3) bzw. -gruppen (EuroNet-PHL-C1-Studie) (TG 1-3) eingeteilt (30) und der Behandlungsplan je nach Therapielevel/-gruppe angepasst.

Seit den 1970ern konnten pHL in unterschiedlichen klinischen Studien erfolgreich behandelt werden (31–35). Ein großes Problem bei der Behandlung von pHL ist bislang das Risiko von therapieinduzierten SN durch die erhöhte Strahlenbelastung, die in zirka 5% der pHL-Patienten auftritt (36). 22% aller Patienten mit einer SN erliegen der Erkrankung, was die Notwendigkeit einer besseren Patientenstratifizierung aufzeigt, um einer Überbehandlung zu entgehen (37–39). Zudem können pHL ein Rezidiv erleiden, bei denen die Heilungsrate bei 50% liegt (40). Außerdem kam es nach der Chemotherapie durch Einsatz von Procarbazin vermehrt zur Unfruchtbarkeit der Probanden. Um die bestmögliche Therapie zu entwickeln, schlossen sich 2005 die meisten europäischen Gruppen unter dem Schirm der *European Network for Pediatric Hodgkin Lymphoma*- Studie (EuroNet-PHL) zusammen (41). Ziel dieser Studie war die Minimierung der Strahlentherapie durch eine Polychemotherapie. In der EuroNet-PHL-C1-Studie sollte Procarbazin aus der pHL-Chemotherapie eliminiert und die Strahlentherapie reduziert werden. Bei dieser Studie wurde nach den Blöcken Induktions-OEPA-Chemotherapie randomisiert mit *cyclophosphamide, vincristine, prednisone, procarbazine* (COPP) und *cyclophosphamide, vincristine, prednisone und dacarbazine* (COPDAC) behandelt, wobei nur Patienten mit einer inadecuaten metabolischen qPET-Antwort ($qPET \geq 1,3$) bestrahlt wurden. In den COPDAC-Blöcken ist Procarbazin durch Dacarbazin ersetzt worden.

Das Studienziel der darauf folgenden EuroNet-PHL-C2-Studie war es, eine Reduktion der Radiotherapie-Induktion bei Patienten mit einem neu diagnostizierten pHL ohne Beeinträchtigung der Heilungsraten zu generieren. Es sollte geprüft werden, ob eine Reduktion des *event free survival* (EFS) bei Verzicht auf die Radiotherapie durch eine Chemotherapie-Intensivierung kompensiert werden kann. Hierbei sollte die Wirksamkeit einer intensiveren Chemotherapie mit *doxorubicin, etoposide, cyclophosphamide, vincristine, prednisone und dacarbazine* (DECOPDAC) randomisiert mit COPDAC getestet und die Radiotherapie reduziert werden (42, 43).

Bei Patienten in der EuroNet-PHL-C1-Studie lag das 5-Jahre *overall survival* (OS) und EFS bei 97,4% und 89% (42, 44). Jedoch kommt es in seltenen Fällen trotz intensiver Therapie mit

Strahlentherapie zu einem unglücklichen klinischen Verlauf und es konnten bislang keine prognostischen Faktoren für diese Patienten identifiziert werden. Diese Patienten zeichnen sich durch ein hohes inadäquates Therapieansprechen nach 2 Zyklen OEPA (qPET ≥ 3 , Deauville Score=5) und eine primär reduzierte Sensitivität auf die Chemotherapie aus. Das 2. Jahres EFS lag bei diesen Patienten bei 50% trotz intensiver Therapie (41). Biopsien dieser Patienten wurden bislang noch nicht auf ihren morphologischen Phänotyp und den genomischen Aberrationen hin untersucht. Ein Vergleich zwischen qPET >3 - und <3 -Patienten sollte daher Teil dieser Arbeit sein.

1.5 Pathogenese

1.5.1 Differenzierungsassoziierte Pathogenese bei Lymphomen

B-Zell-Lymphome sind durch Aberrationen, die ihren Ursprung unter anderem in der B-Zelldifferenzierung haben, gekennzeichnet. Durch die genetische Instabilität, die durch die VDJ-Rekombination, die SHM in den IgV-Regionen des BCR und den CSR begünstigt wird, kann die maligne Transformation von GC-B-Zellen gefördert werden. So konnten chromosomale Translokationen (TL), die charakteristisch für B-Zell-Lymphome sind, als Folge einer fehlerhaften VDJ-Rekombination beschrieben werden (45). Meist sind in Non-HL TL zu finden, die Gene unter Kontrolle von Promotoren oder *Enhancern* des aktiven Ig-Lokus positionieren, was zu einer deregulierten Expression des Gens führt (46). Typische TL bei MCL stellen die Ig-assoziierten *cyclin D1 (CCND1)*-TL dar (47). Außerdem sind FL meist durch Fusionen zwischen *B-cell lymphoma 2 (BCL2)* und dem JH-Lokus geprägt. Sowohl *CCND1*-TL bei MCL, als auch *BCL2*-TL bei FL können mit der Differenzierung der B-Zelle in Verbindung gebracht werden, da sie direkt mit den RSS der JH-Loci assoziiert sind (48, 49). Charakteristisch für BL sind *Ig-myelocytomatosis oncogene (MYC)*-TL, die in fast allen BL-Patienten vorkommen und direkt mit der IgH-Switch-Region assoziiert sind (1). Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine aberrante Switch-Rekombination zu der Entstehung von TL mit *B cell CLL/Lymphoma 6 (BCL6)*, *MYC* und *BCL2* in DLBCL führt (50).

Außerdem kommt es durch die massive Proliferation der Zentroblasten und durch aberrante SHM zu SNVs (*single nucleotide variants*). Unter SNVs versteht man Einzelnukleotid-Varianten, wie Missense- und Stop-Varianten. Durch die starke Proliferation der Zentroblasten im GC häufen sich Varianten auch in Nicht-Ig-Genen an, wie z.B. Varianten in dem GC-Regulator *BCL6*. Varianten in *BCL6* können zur geringen Expression mehrerer Gene, wie bspw. *tumor protein P53 (TP53)*, *ATR Serine/Threonine Kinase (ATR)* oder *ATM Serine/Threonine Kinase (ATM)*, die an der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*) beteiligt sind, führen (51). Bei DLBCL wurden SHM z.B. bei *Proto-Oncogene Serine/Threonine Kinase (PIM1)*, *MYC* oder *paired-box-gene-5 (PAX5)* beschrieben (52).

1.5.2 Pathogenese bei HL

Da HRS-Zellen nur 1-5% des zellulären Infiltrates ausmachen, wurden bislang nur *in situ*-Untersuchungen oder Analysen zu genomischen Aberrationen mit Hilfe von zuvor mikrodisssektierten HRS-Zellen an Gefrierschnitten durchgeführt. Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE)-Gewebe ist durch die Formalinfixierung und die dadurch entstandene Degradation der DNA nicht geeignet. Da jedoch nur bei 5% der FFPE-Gewebe zusätzlich Gefriergewebe vorliegt, konnten bislang nur eine geringe Anzahl an Patienten für molekulargenetische Untersuchungen an mikrodisssektierten Tumorzellen herangezogen werden. Durch hypothesengetriebene Untersuchungen an bestimmten Genen konnten verschiedenen Aberrationen identifiziert werden, die unterschiedliche zelluläre Funktionen betreffen. Auf die genomweiten Untersuchungen wird unter 1.6.1 genauer eingegangen.

Ursprung der HRS-Zellen

Aufgrund des aberranten Phänotyps war der Ursprung der HRS-Zellen lange unbekannt. Durch Etablierung der IgV-Gen-*polymerase chain reaction* (PCR) (3, 53) konnte zum ersten Mal an zuvor mikrodisssektierten HRS-Zellen gezeigt werden, dass HL von prä-apoptotischen-GC-B-Zellen abstammen (54). Fast alle HRS-Zellen zeichnen sich durch umgelagerte, somatisch mutierte IgV-Gene aus, wobei 25% der Patienten destruktive somatische Varianten (z.B.: nonsense Varianten) der IgV-Gene vorweisen, die zur Verhinderung der BCR-Ausbildung beitragen. Dies würde normalerweise zur negativen Selektion von GC-Zellen mittels Apoptose führen (3, 55). Man nimmt daher an, dass die HRS-Zellen durch transformierende Ereignisse der Apoptose entkommen können (54).

Verlust des B-Zell Phänotyps

Charakteristisch für HRS-Zellen ist der Verlust des B-Zell-Phänotyps. Im Gegensatz zu den Tumorzellen der Non-HL werden bei den HRS-Zellen die typischen B-Zell-Marker herunterreguliert. Der Verlust des B-Zell Phänotyps geht einher mit einer aberranten Expression transkriptionaler Regulatoren. *Transcription factor 3 (E2A)*, *early B cell factor 1 (EBF)* und *PAX5* fungieren als entscheidende B-Zell-Faktoren. Die Transkriptionsfaktoren (TF) *E2A* und *EBF* der frühen Pro-B-Zellen induzieren die Expression von mehreren Proteinen, die für die Umlagerung der Ig-Gene essentiell sind, wie bspw. *RAG1* und *-2*. *E2A* und *EBF* ermöglichen somit die Initiation der VDJ-Rekombination am Locus der schweren Kette und die Expression der schweren Kette. Außerdem wird der TF *PAX5* durch *E2A* und *EBF* induziert. *PAX5* ist der entscheidende B-Zellfaktor, der für die Festlegung und Aufrechterhaltung der allgemeinen linienspezifischen Architektur der B-Zelle verantwortlich ist. Er induziert unter anderem die Expression des B-Linker-Proteins (BLNK). Dieses Signalmolekül ist für die weitere Entwicklung der Pro-B-Zelle und für die Signalgebung des reifen BCR erforderlich (6). *PAX5* kontrolliert durchgehend die Genomstruktur und die Entwicklung der B-Zellen bis zum Plasmablasten-Stadium, der Vorläuferzelle der Plasmazelle. Im Plasmablasten-Stadium ist

PAX5 normalerweise stillgelegt und B-zellspezifische Genomstrukturen gehen in diesem Stadium verloren (56). Es konnte gezeigt werden, dass *inhibitor of binding/differentiation 2 (ID2)* und *activated B-cell factor 1 (ABF1)*, welche *E2A* und *PAX5* inaktivieren, eine hohe Expression in HRS-Zellen zeigten. Diese aberrante Expression von *ID2* und *ABF1* führt zum Verlust von B-zell-spezifischen Genexpressionen in HRS-Zellen (57, 58). Außerdem können DNA-Methylierungen von Promotoren, die B-Zell spezifisch sind, zum Verlust des Phänotyps von HRS-Zellen führen (59, 60).

Genomische Instabilität

In zyto- und molekulargenetischen Analysen konnte gezeigt werden, dass HL eine starke genetische Instabilität aufweisen (61). Die RS-Zellen zeichnen sich durch eine Mehrkernigkeit aus, die durch die genomische Instabilität hervorgerufen wird. Im Gegensatz zu den Tumorzellen der Non-HL gibt es bei den Tumorzellen der HL von Zelle zu Zelle starke Unterschiede, die auf die genomische Instabilität zurückzuführen sind.

Zudem konnten strukturelle chromosomale Aberrationen (TL) in 20% der HL- Patienten im Ig-Lokus der HRS-Zellen nachgewiesen werden, wobei ihre TL-Partner, wie *BCL2*, *REL-proto-oncogene (REL)*, *Glutaryl-tRNA amidotransferase-subunit A (GATA)* oder *myelocytomatosis oncogene (MYC)* nur in einzelnen Fällen nachgewiesen werden konnten, sodass weiterhin unklar bleibt, welche Rolle diese TL in der Entwicklung des HL einnehmen (62, 63).

Genomische Aberrationen, die unterschiedliche Signalwege betreffen:

JAK/STAT-Signalweg

Der JAK/STAT-Signalweg ist ein Signaltransduktionsweg, bei dem Zytokine durch Rezeptoren, die mit zytoplasmatischen Janus-Kinasen (*JAK*) assoziiert sind, auf *signal transducers and activators of transcription (STATs)* einwirken. Die STAT-Proteine können an eine Anzahl verschiedener Promotoren binden, die für die adaptive Immunität essentiell sind, und ihre Transkription aktivieren (6). Co-Amplifikationen von *JAK2* und dem *cell death-1 (PD-1)* Ligand, die in Region 9p24 lokalisiert sind, konnten in HL identifiziert werden und führen zu einer erhöhten Expression von *JAK2*. Die erhöhte Expression von *JAK2* führt zu einer erhöhten Aktivität des JAK/STAT-Signalweges (64). Weiterhin wurden beispielsweise durch Untersuchungen an mikrodisezierten HRS-Zellen somatische Varianten in *suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1)*, ein negativer Regulator des JAK/STAT-Signalweges, in 42% der cHL- Patienten entdeckt (65,66). Die Aberrationen in *SOCS1* führen zur konstitutiven *STAT*-Aktivierung in den HRS-Zellen. Es konnte zudem ein Zusammenhang zwischen den *SOCS1*-Varianten und der Zunahme von *phospho-STAT5* in HRS Zellen festgestellt werden (65). Ein weiteres Gen, das eine entscheidende Rolle im JAK/STAT-Signalweg spielt ist *STAT6*, das in HL in zirka 40% der Patienten von Varianten betroffen ist. Die identifizierten Varianten sind meist an den gleichen Positionen anzutreffen und stellen typische Hotspot- Varianten in *STAT6* dar (67, 68). Durch Ganz-Exom-Sequenzierungen (WES) konnten zudem inaktivierende

1. Einleitung

Varianten und *frameshift*-Varianten im *colony stimulating factor 2 receptor beta common subunit (CSF2RB)* identifiziert werden, der auch im Zusammenhang mit dem JAK/STAT-Signalweg gebracht werden kann (69).

NFκB-Signalweg

Nuclear factor kappa B (NFκB) ist eine Familie von TF, die die Expression bestimmter Gene induzieren, die antiapoptotisch wirken. Der NFκB-Signalweg ist durch mehrere genetische Aberrationen bei HL verändert. *REL*, ein Mitglied der NFκB-TF-Familie, zeigt genomische Zugewinne und Amplifikationen in 30% aller HL-Patienten (70–72). *NFκB Inhibitor Alpha (NFKBIA)* inhibiert den NFκB-Signalweg durch Bindung an NFκB-Faktoren im Zytoplasma und ist in rund 20% aller HL-Patienten somatisch mutiert (73–75). Zudem wurden in 15% der HL-Patienten Varianten gefunden, die *NFκB Inhibitor Epsilon (NFKBIE)* betreffen (76), der auch als Inhibitor des NFκB-Signalweges fungiert. Inaktivierende Varianten in *NFKBIA* und *NFKBIE* führen zum Funktionsverlust dieser Gene und zu einer aberranten Aktivierung von NFκB. Außerdem konnten inaktivierende Varianten in *TNFα-induced protein 3 (TNFAIP3)* in 44% aller HL-Patienten festgestellt werden. *TNFAIP3* codiert A20, das die Funktion einer Ubiquitinase im NFκB-Signalweg einnimmt und als negativer Regulator der NFκB-Aktivität gilt (77). Es wird vermutet, dass eine Deregulation des NFκB-Signalweges der Grund dafür sein könnte, dass HRS-Zellen, trotz fehlender Expression des BCR, der Apoptose entgehen können (78).

PI3K/AKT-Signalweg

Der *phosphoinositide-3-kinase (PI3K)*-AKT-Signalweg zeigt eine konstitutive Aktivität in HRS-Zellen (79, 80), die durch SNVs in *Inositol-Trisphosphate 3-Kinase B (ITPKB)* und *G Protein Subunit Alpha 13 (GNA13)* hervorgerufen werden (69).

Immunevasion

Unter Immunevasion versteht man den Vorgang, bei dem Tumore durch unterschiedliche Mechanismen der IS-Erkennung entkommen können. Tumore sind durch Expression von Neo-AG, die durch die SHM entstehen, immunogen. Daher mussten sie unterschiedliche Strategien entwickeln, um den Abwehrmechanismen des IS zu entgehen. Ein wichtiges Kennzeichen von HRS-Zellen ist die fehlende Ausprägung von MHC-I und –II auf der Oberfläche der Zellen. Das Fehlen von MHC-I und –II begünstigt die Immunevasion und wird durch unterschiedliche genetische Aberrationen hervorgerufen. So konnten unter anderem TL in dem *MHC-II-Transaktivator-Gen (CIITA)* in 15% der HL-Patienten identifiziert werden. *CIITA* ist der Hauptregulator der MHC-II Expression. Es konnte gezeigt werden, dass eine TL in diesem Gen zur Runterregulation von MHC-II auf der Oberfläche der HRS-Zellen führt (81). Ohne MHC-II kann keine AG-Präsentation auf der HRS-Zelle stattfinden und die T_H-Zellen können nicht aktiviert werden (82). Außerdem konnten in WES-Analysen inaktivierende Varianten in *β-2-Mikroglobulin (B2M)*, einer Untereinheit des MHC-I-Komplexes, als meist verändertes Gen in

HRS-Zellen in 7 von 10 untersuchten Patienten identifiziert werden (69). *B2M*-Varianten bewirken eine Inhibierung der Ausprägung des MHC-I-Komplexes an der Oberfläche der HRS-Zellen. MHC-I dient der AG-Präsentation für zytotoxische T-Zellen. Fehlt MHC-I auf der Oberfläche der HRS-Zellen, können die zytotoxischen T-Zellen die Tumorzellen nicht mehr erkennen. Sie entgehen somit durch das Fehlen von MHC-I den Abwehrmechanismen des adaptiven IS (82).

Außerdem exprimieren HRS-Zellen *programmed cell death ligand 1* (PDL1) und -2. PDL1 und -2 sind Oberflächenmoleküle auf den HRS-Zellen. HRS-Zellen können durch PDL1 und -2 an die PD1-Rezeptoren auf T-Zellen und myeloiden Zellen binden und damit die Signalübertragung vom AG-Rezeptor hemmen (6). Eine erhöhte Expression hat zur Folge, dass die T-Zell-vermittelte Immunantwort abgeschwächt und die HRS-Zellen so der Erkennung durch die Immunzellen entkommen können (64, 83). Durch dieses Wissen konnte in den letzten Jahren eine neue Therapiemöglichkeit für HL-Patienten entwickelt werden. Nivolumab, ein anti-PD1-Wirkstoff zeigte ein Ansprechen bei HL-Patienten bei 87% (83). Nivolumab ist in der Lage an den PD1-Rezeptor auf T-Zellen zu binden und hemmt damit die Interaktion mit den Liganden PDL1 und -2 auf den HRS-Zellen. Dadurch wird das adaptive IS stimuliert, sodass T-Zellen aktiviert und HRS-Zellen eliminiert werden können (84).

Mikromilieu in HL

HRS-Zellen sind in der Lage durch Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine und Chemokine andere Immunzellen zu rekrutieren. Dadurch entsteht ein Mikromilieu, dass förderlich ist für das Überleben der HRS-Zellen. Das Mikromilieu wird unter anderem durch $CD4^+$ - T_H -Zellen, eosinophile Granulozyten, B-Zellen, regulatorische $CD4^+$ -T-Zellen, tumor-assoziierte Makrophagen und Mastzellen bestimmt. Durch Sekretion von *thymus and activation-regulated chemokine* (TARC) und *regulation upon activation normal T-cell expressed, and secreted* (RANTES) werden beispielsweise $CD4^+$ - T_H -Zellen von HRS-Zellen angelockt (85). $CD4^+$ - T_H -Zellen machen einen großen Anteil des Mikromilieus aus und versorgen durch die Interaktion zwischen CD40L auf der $CD4^+$ - T_H -Zellen und CD40 auf der HRS-Zelle die HRS-Zellen mit Überlebenssignalen. Regulatorische $CD4^+$ -T-Zellen werden durch die Ausschüttung von *chemokine-ligand 5* (CCL5), -7 und -22 von den HRS-Zellen angelockt und können die Proliferation der zytotoxischen T-Zellen durch Ausschüttung von *interleukin-10* (IL-10) inhibieren (78, 86). Zudem können HRS-Zellen CCL-5, -28, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und IL-5 sekretieren, woraufhin eosinophile Granulozyten, tumor-assoziierte Makrophagen und Mastzellen angelockt werden (82). Dieses Zusammenspiel der unterschiedlichen Immunzellen mit den HRS-Zellen zeigt die essentielle Funktion des Mikromilieus für die HRS-Zellen auf. Außerdem wurde festgestellt, dass das Mikromilieu von HRS-Zellen eine entscheidende Rolle für das Ansprechen auf eine Therapie hat (87–89). Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Anzahl an tumor-assoziierten Makrophagen (89),

zytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen (90) und eine geringe Anzahl an regulatorischen T-Zellen (91) und B-Zellen mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (88, 89).

Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs)

Für das Überleben der HRS-Zellen spielen zudem RTKs eine Rolle. RTKs übernehmen allgemein wichtige Funktionen in der Regulation der Zellproliferation, dem Überleben und Wachstum sowie der Differenzierung von Zellen (92). Multiple RTKs zeigen eine konstitutive Aktivität in HRS-Zellen. RTKs, die eine aberrante Expression in HRS-Zellen zeigen, sind *platelet-derived growth factor receptor α* (PDGFRA), *discoidin domain receptor 2* (DDR2), *Ephrin Type-B Receptor 1* (EPHB1), *recepteur d'origine nantais* (RON), *tropomyosin-receptor-kinase A* (TRKA) und TRKB (93). Kollagen I-III und V stellen die Liganden von DDR2 dar (94). Varianten in Genen der RTKs konnten bislang nicht identifiziert werden, jedoch sind sie in HRS-Zellen durch autokrine und parakrine Mechanismen aktiviert (93).

Nukläärer Transporter *Exportin 1* (XPO1)

Es konnten in 24% der HL-Patienten die Hotspot-Varianten in dem Transporterprotein XPO1 p.E571K identifiziert werden, wobei Patienten mit dieser Variante zu einem kürzeren *progression-free survival* (PFS) nach der Chemotherapie tendierten (57% der Patienten) (95).

1.6 Nachweis von genomischen Aberrationen durch Next Generation Sequencing (NGS)

Bis vor wenigen Jahren standen für die Identifikation von SNVs und Indels (kurzen Insertionen und Deletionen) nur Sanger Sequenzierungen zur Verfügung. Bei der Sanger Sequenzierung werden die Sequenzen durch eine Kettenabbruch-Methode generiert. Dabei werden Farbstoff-markierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) unter Verwendung von Primern durch eine Taq DNA-Polymerase in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut, um den Kettenabbruch hervorzurufen. Die entstandenen Kettenabbruchprodukte werden anschließend mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur jeweiligen Fluoreszenz angeregt. Die Abfolge der Fluoreszenz-Farbsignale, die am Detektor angezeigt werden, gibt anschließend direkt die Sequenz der Basen des DNA-Stranges wieder. Bei der Sanger Sequenzierung wird von mehreren Molekülen eines PCR-Produktes ausgegangen, weshalb Mischsequenzen generiert werden. Die Sequenzierung findet in getrennten Reaktionsräumen durch Glaskapillaren statt. Die leistungsstärksten Geräte enthalten 96 Kapillaren, wobei jede Kapillare ein DNA-Fragment beinhaltet. Durch diese Limitierung werden meist nur hypothesengetriebene Untersuchungen an einzelnen Genen vorgenommen, von denen man aufgrund der zellulären Funktion vermutet, dass sie pathogeneserlevant sind. Ein bekanntes Beispiel wäre das Gen *TP53*, das als Tumorsuppressor fungiert und in 50% aller bislang untersuchten Tumoren inaktivierende Varianten trägt (96).

Unter dem Begriff *Next Generation Sequencing* (NGS) versteht man Hochdurchsatz-Sequenzierungen, bei denen Millionen bzw. Milliarden DNA-Fragmente parallel in einem nicht separierten Raum sequenziert werden. Dieser Art der Sequenzierung kann für genomweite Analysen verwendet werden und zur Identifikation von SNVs, Indels und strukturellen Varianten (SVs) dienen (97).

Es stehen verschiedene NGS-Plattformen zur Verfügung, die sich hinsichtlich der Sequenzierungstechnik und des Durchsatzes unterscheiden. Für diese Arbeit wurde eine NGS-Plattform von Illumina verwendet, bei der die massive parallele Sequenzierung verschiedener Sequenzier-Templates durch das *sequencing-by-synthesis* (SBS)-Verfahren generiert wird. Die klonale Amplifikation und die Sequenzierung finden auf der sogenannten Flusszelle statt, die eine Art Objektträger darstellt. Einzelne DNA-Fragmente werden durch zuvor ligierte Adapter an der Flusszelle gebunden, woraufhin zunächst die Brücken-Amplifikation eingeleitet wird. Bei der Brücken-Amplifikation fungieren auf der Flusszelle gebundene Oligos als Primer. Für jedes DNA-Fragment können durch diese Art der Amplifikation voneinander getrennte Klone, sogenannte Cluster, entstehen. Dadurch können parallel eine Millionen (MiSeq, Nano) bis 10 Milliarden (NovaSeq6000, S4) Cluster gleichzeitig synthetisiert werden (98).

Die Sequenzierung basiert auf den Einbau von reversiblen Terminatoren (*Cyclic Reversible Termination*). Alle 4 Nukleotide werden hierbei mit einer Terminator-Gruppe modifiziert und mit unterschiedlichen Farbstoffen (Fluorophoren) versehen. Während eines Reaktionszyklus werden der Polymerase gleichzeitig alle 4 Nukleotide zur Strangsynthese angeboten. Nachdem ein komplementäres Nukleotid eingebaut wird, ist eine Strangverlängerung durch die blockierende Wirkung der Terminator-Gruppe nicht mehr möglich. Das Fluoreszenz-Signal der unterschiedlichen Farbstoffe jedes Nukleotids wird mittels hoch auflösender Bildaufnahmen durch ein 4 Kanal- bzw. 2 Kanal-System detektiert. Anschließend werden die Fluorophore und die Terminator-Gruppe enzymatisch abgespalten, woraufhin ein weiteres Nukleotid eingebaut werden kann und ein neuer Zyklus beginnt. Nach diesem Prinzip wird Base für Base die Sequenz eines jeden Clusters auf der Flusszelle gleichzeitig generiert. Zudem kann durch die sogenannte *paired-end*-Sequenzierung, bei der die zu sequenzierenden DNA-Fragmente an beiden Enden mit unterschiedlichen Primern versehen sind, von beiden Seiten durch Drehen mit einer vorher festgelegten Leseweite sequenziert werden. Durch diese Art der Sequenzierung kann eine höhere Genauigkeit generiert werden (99).

Im Gegensatz zur Sanger Sequenzierung, bei der in 2 h 96 Sequenzen generiert werden, können mit NGS-basierten Illumina-Geräten in 44 h 10 Milliarden (Novaseq6000, S4) Sequenzen produziert werden (98). Durch die erhöhte Sequenzierkapazität sind NGS-basierte Illumina Geräte im Stande alle Varianten im Genom zu erfassen und bietet damit die Möglichkeit, Genom-weite, offene Hypothesen zu überprüfen. Durch Verwendung von patientenspezifischen Sequenz-Barcodes ist es zudem möglich, mittels NGS nicht nur tausende Gene eines Patienten

parallel zu analysieren, sondern durch den Einsatz verschiedener Indexe auch unterschiedliche Patientenproben simultan zu untersuchen.

Bei der Sanger Sequenzierung gibt es keine Möglichkeit ein individuelles Signal von jedem DNA-Molekül zu generieren. Dies hat zur Folge, dass bei somatischen Varianten, die nur einen Teil der Allele betreffen, Mischsequenzen entstehen. Aus diesem Grund ist die Sensitivität niedrig. Während bei der Sanger Sequenzierung die Varianten-Allelfrequenz (VAF) bei mindestens 30% liegen sollte, um eine Variante detektieren zu können, können durch NGS Varianten noch bei einer VAF von 5% detektiert werden. Die Verwendung von Sanger Sequenzierung ist für Einzelgen-Analysen weiterhin vorteilhaft, bei denen man eine hohe Mutationsfrequenz erwartet. Sanger Sequenzierung kann zudem zur Validierung von durch NGS detektierten niederfrequenten Varianten, nach vorheriger Mikrodissektion von HRS-Zellen, dienen.

Je nach Fragestellung stehen verschiedene NGS-Applikationen zur Verfügung. Ganz-Genom-Sequenzierungen (WGS) werden durchgeführt, um das gesamte Genom zu untersuchen. Bei diesem Verfahren können Varianten im codierenden und Aberrationen im nicht codierenden Bereich detektiert werden (100). Der Vorteil liegt in der Identifikation von SNVs, Indels und SVs, die Promotoren-Bereiche und regulatorische Regionen mit einbeziehen (101). Für WGS muss die genomische DNA (gDNA) zunächst durch zufälliges Scheren mittels Ultraschall fragmentiert werden. Anschließend werden Adapter an die entstandenen DNA-Fragmente ligiert, denaturiert und im Anschluss durch die Adapter an komplementäre Oligonukleotide hybridisiert, die sich an der Oberfläche der Flusszelle befinden. Die Sequenzierung erfolgt wie oben beschrieben (102). Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass durch die Größe des Genoms die Abdeckung (20-30x) gering ist und daher SNVs und Indels mit einer VAF von <5% nicht detektiert werden können.

Eine weitere Möglichkeit bietet die WES, bei der nur die codierenden Bereiche, die 1,5% des gesamten Genoms entsprechen, untersucht werden (100, 103). Sie ist die am häufigsten eingesetzte NGS-Applikation, da meist nur Varianten in codierenden Bereichen interpretierbar sind. Außerdem ist WES im Vergleich zu WGS kostengünstiger. Das Verfahren von WES basiert auf der sogenannten *hybrid-capture*-Methode, bei der gDNA mittels Ultraschall zufällig fragmentiert wird. Daraufhin werden die DNA-Fragmente an zum Exom komplementäre Sequenzen (Sonden) hybridisiert. Nach mehrstufigen Aufreinigungs-Schritten folgt die Sequenzierung wie oben beschrieben (104).

Um hypothesengetriebene Untersuchungen mit DNA durchzuführen, bei denen sich die untersuchten Bereiche auf bestimmte Gene beschränken, wurde das sogenannte targetierte NGS (tNGS) entwickelt. Anhand dieser Methode können z.B. gezielt Gene, die zur Tumorentstehung beitragen, auf genetische Aberrationen hin untersucht werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass durch den im Vergleich zum WES und WGS kleinen abzudeckenden Bereich, eine höhere

Abdeckung und dadurch eine hohe Sensitivität erzielt werden kann. Daher können durch tNGS auch niederfrequente Varianten nachgewiesen werden. Außerdem stellt es eine kostengünstigere Analyse im Vergleich zu WES und WGS dar.

Bei der Illumina-Technologie kann zwischen zwei verschiedenen tNGS-Verfahren gewählt werden. Das erste Prinzip stellt das sogenannte Amplikon-basierte Verfahren, bei dem es zur Anreicherung kurzer DNA-Fragmente durch spezifische Primer-Gemische kommt, dar. Hierfür werden zunächst die Primer an die spezifischen Bereiche an den gleichen Strang hybridisiert. Anschließend synthetisiert eine DNA-Polymerase den Strang vom stromaufwärts gelegenen Oligo durch die Zielregion, gefolgt von der Ligation am 5'-Ende des stromabwärts gelegenen Oligos mit einer DNA-Ligase. Nach einer längenspezifischen Selektion folgen die Ligierung an Adaptoren, sowie die Amplifikation mittels PCR. Anschließend erfolgt die Sequenzierung wie oben beschrieben (104).

Das zweite Prinzip ist das *hybrid-capture*-basierte Verfahren, bei dem die Zielregionen durch spezifische einzelsträngige Sonden durch Streptavidin-gekoppelte *beads* vom Rest des Genoms getrennt werden. Dabei wird zunächst die DNA mittels Ultraschall zufällig fragmentiert und mit Adaptoren versehen. Anschließend werden die DNA-Fragmente an spezifische biotinylierte Sonden hybridisiert und durch Streptavidin-gekoppelte *beads* selektioniert. Nach Amplifikation der Zielregionen und mehrstufigen Aufreinigungsschritten folgt die Sequenzierung wie oben beschrieben.

Durch das Amplikon-basierte Verfahren können SNVs und Indels detektiert werden, während bei dem *hybrid-capture* Verfahren zusätzlich SVs nachgewiesen werden können.

Zudem können mittels NGS auch RNA-Sequenzierungen für Genexpressions-Analysen durchgeführt werden. Bei dem auf *hybrid-capture*-basierten Verfahren muss die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Anschließend wird sie, wie beim WES, an zum Exom komplementäre biotinylierte Sonden hybridisiert, durch Streptavidin-gekoppelte *beads* selektioniert, amplifiziert und aufgereinigt. Im Anschluss folgt die Sequenzierung wie oben beschrieben (105).

1.6.1 NGS-Anwendung beim HL

HL zeichnen sich durch einen geringen Anteil an HRS-Zellen (1-5%) im zellulären Infiltrat aus, weshalb die Detektion von SNVs und Indels mittels DNA aus Ganzschnitten sehr schwierig ist (12, 13). Zu Beginn und während dieser Arbeit wurden daher nur *in situ*-Untersuchungen oder Analysen zu genomischen Aberrationen durch WES mit Hilfe von zuvor mikrodissektierten HRS-Zellen oder durch Anreicherung der HRS-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS: *fluorescence-activated cell sorting*) an Gefrierschnitten durchgeführt (68, 69). FFPE-Gewebe hat den Nachteil, dass die DNA durch die Formalinfixierung meist degradiert ist und Desaminierungsartefakte bildet, die zu Sequenzierfehlern führen (106). Da jedoch nur bei 5%

der FFPE-Gewebe zusätzlich Gefrierewebe vorliegt, konnten bislang nur eine geringe Anzahl an Fällen für molekulargenetische Untersuchungen an mikrodisssektierten Tumorzellen verwendet werden. Erschwerend kommt hinzu, das in dieser Arbeit mit qPET >3- Patienten gearbeitet wurde, die nur 5% aller pHL darstellen. Aufgrund dessen sollte eine Möglichkeit gefunden werden, zum einen FFPE-Gewebe für die molekulargenetischen Untersuchungen nutzbar zu machen und zum anderen die Sensitivität zu erhöhen, um im Ganzschnitt Varianten mit einer VAF <5% nachweisen zu können. Mit tNGS-Methoden ist es aufgrund der Generierung kurzer DNA-Fragmente (100-250 bp) zum ersten Mal möglich, FFPE-Gewebe für die Untersuchungen zu verwenden.

Um die Sensitivität weiter zu erhöhen, musste eine Methode entwickelt werden, Taq-Polymerase-Fehler, deren Fehlerrate bei 8×10^{-6} Fehler pro Basenpaar liegt (107), sowie weitere falsch-positive Varianten, die durch technische Fehler verursacht werden, von echten Varianten zu unterscheiden. Dies sollte mit dem sogenannten *dual-strand*-Verfahren bei der Amplikon-basierten Methode unter Verwendung von FFPE-Gewebe realisiert werden. Bei diesem Verfahren werden die zu untersuchenden Bereiche in zwei unterschiedlichen Reaktionsansätzen mit zwei verschiedenen Primerpools abgedeckt. Hierbei wird durch den einen Pool der eine Strang und mit dem anderen Pool der andere Strang abgedeckt, sodass immer nur ein Strang Template für die PCR ist und die gesamten PCR-Amplifikate jeweils von einem der beiden DNA-Stränge ausgeht. Varianten, die im Anschluss in beiden Strängen detektiert werden, werden als reale Varianten gewertet.

Bei dem *hybrid-capture*-basierten Verfahren kann bei hoher Abdeckung eine höhere Sensitivität durch die zufällige Fragmentierung mittels Ultraschallbehandlung und das Binden der Sonden an unterschiedlich lange Fragmente erreicht werden. Zudem wird seit Kurzem zur Unterscheidung von Fragment-Duplikaten, die aus einer PCR hervorgehen, mit *unique molecular identifiers* (UMIs) gearbeitet, die aus zufälligen kleinen Sequenzen bestehen, die als molekulare Marker fungieren, die sich an die einzelnen Fragmente anlagern und zur Fehlerminimierung beitragen (108). Da zum Zeitpunkt dieser Arbeit die UMIs erst in der Entwicklung waren, konnten sie aber für diese Arbeit nicht verwendet werden.

1.7 Zirkulierende zellfreie DNA (*circulating cell free DNA: ccfDNA*)

Zirkulierende zellfreie DNA (ccfDNA) ist im Blutplasma zu finden. Sie wurde erstmals vor zirka 40 Jahren nachgewiesen (109). CcfDNA wird durch abgestorbene Zellen in den Blutstrom freigesetzt. Die ccfDNA-Konzentration bei gesunden Menschen liegt bei 30 ng/ml Plasma (110), während bei Tumorpatienten die Konzentration der ccfDNA 4-10fach erhöht sein kann (111). CcfDNAs stellen kurze DNA-Fragmente (zirka 160 bp) dar, die einer Wicklung um ein Histon entsprechen (112). Die Halbwertszeit von ccfDNA liegt bei 30 Min.. Bei Patienten mit Tumoren kann ein geringer Anteil der ccfDNA vom Tumor abstammen und wird als

zirkulierende Tumor DNA (ctDNA) bezeichnet (113). Durch ctDNA können tumorassoziierte Varianten in der ccfDNA identifiziert werden, wobei der Anteil an ctDNA mit der VAF der tumorassoziierten Varianten korreliert. Durch die geringe Allelfrequenz der ctDNA in der ccfDNA müssen für die Untersuchung von ctDNA NGS-basierte Verfahren angewendet werden.

In den letzten Jahren wurde in unterschiedlichen Studien für solide Tumore gezeigt, dass durch die Bestimmung der VAF im Blutplasma ctDNA nachgewiesen werden kann (114–123), weshalb sie zum Therapiemonitoring bei Lymphomen geeignet sein könnte. Eine Studie konnte bereits zeigen, dass ccfDNA für molekulares Monitoring von B-Zell-Erkrankungen geeignet ist (124) und im Vergleich zu gDNA aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) in multiplen Myelomen oder DLBCL für Ig-*high-throughput*-NGS (HT-NGS) eine höhere Sensitivität verspricht (125–127). Außerdem konnte bei DLBCL-Patienten gezeigt werden, dass die Identifizierung von Varianten aus ccfDNA durch tNGS eine valide Methode für das Monitoring darstellt (128, 129).

Vor Beginn dieser Arbeit konnten in ccfDNA von HL-Patienten durch Ig-HT-NGS genomische Imbalancen durch NGS identifiziert werden und die *XPO1* HotSpot-Mutation mit Hilfe von ccfDNA detektiert werden, was aufzeigt, dass von HRS-Zellen abstammende ctDNA im Blutplasma detektiert werden kann (95,130,131). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob ccfDNA von pHL für NGS-Techniken und für das Therapiemonitoring dieser Patienten geeignet ist.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund des geringen HRS-Zell-Anteils (1-5%) im zellulären Infiltrat der HL, ist die Detektion von SNVs und Indels im Ganzschnitt erschwert (12, 13). Bislang wurden daher nur *in situ*-Untersuchungen oder Analysen zu genomischen Aberrationen durch WES mit Hilfe von zuvor mikrodisezierten HRS-Zellen oder durch Anreicherung der HRS-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) an Gefrierschnitten durchgeführt (68, 69). DNA aus FFPE-Gewebe ist durch die Formalinfixierung desaminierungsartefaktanfällig, weshalb es zu Sequenzierfehlern kommen kann (106). Aufgrund dessen, dass bei nur ca. 5% der FFPE-Gewebe zusätzlich Gefriergewebe vorliegt, konnten bislang nur wenige Proben für molekulargenetische Untersuchungen an mikrodisezierten HRS-Zellen verwendet werden. Außerdem wurde in dieser Arbeit mit qPET >3-Patienten gearbeitet, die nur 5% aller pHL darstellen. Aufgrund dieser limitierten Anzahl an Patienten sollte eine Möglichkeit gefunden werden, FFPE-Gewebe für die molekulargenetischen Analysen verwenden zu können und außerdem die Sensitivität zu erhöhen, damit im Ganzschnitt Varianten mit einer VAF <5% detektiert werden können.

Dies ist durch neue NGS-Verfahren möglich, sodass untersucht werden sollte, ob Ganzschnitt-DNA aus FFPE-Gewebe und ccfDNA für den Mutationsnachweis in HL geeignet ist.

Ein Bestandteil der Arbeit sollte daher die Etablierung einer validen Methode zur Identifikation geringfrequenter Varianten aus Ganzschnitt-DNA und ccfDNA sein. Hierfür sollte im ersten Schritt ein tNGS-Verfahren entwickelt werden, das die Detektion dieser Varianten in gDNA aus FFPE-Biopsaten ohne vorherige Mikrodissektion und ccfDNA von pHL ermöglicht. Ein Problem bei der Detektion von Varianten im niederfrequenten Bereich ist die Generierung von falsch-positiven Varianten, die im gleichen Allelfrequenz-Bereich liegen. Diese Fehler werden durch die Taq-Polymerase hervorgerufen, deren Fehlerrate bei 8×10^{-6} Fehler pro Basenpaar liegt (107). Außerdem kann es durch weitere technische Fehler, wie bspw. bei dem Varianten Calling durch das Programm *Pisces* zu falsch-positiven Varianten kommen. Diese Fehler sollten durch unterschiedliche Techniken minimiert werden.

Zum einen sollte ein Amplikon-basiertes Panel für tNGS, das die 20 am häufigsten mutierten Gene in HL beinhaltet, mit dem *dual-strand*-Verfahren zur Detektion von niederfrequenten Varianten in Ganzschnitt-DNA aus FFPE-Gewebe von HL verwendet werden. Bei dieser Methode werden die zu untersuchenden Bereiche in zwei unterschiedlichen Reaktionsansätzen mit zwei verschiedenen Primerpools abgedeckt. Hierbei wird durch den einen Pool der eine Strang und mit dem anderen Pool der andere Strang abgedeckt. Varianten, die im Anschluss in beiden Strängen detektiert werden, werden als reale Varianten gewertet.

Zum anderen sollte ein *hybrid-capture*-basiertes Panel etabliert werden, das eine andere Möglichkeit der Detektion niederfrequenter Varianten darstellt. Außerdem konnten durch diese Methode zusätzlich SVs detektiert werden, die wahrscheinlich auch bei pHL eine Rolle spielen. Dieses Panel umfasste insgesamt 106 (Version 1) bzw. 121 (Version 2) Lymphom-spezifische Gene. Zur Fehlerreduktion wurde zunächst die gDNA zufällig durch eine Ultraschallbehandlung fragmentiert. Anschließend wurden biotinylierte Sonden an die einzelnen Fragmente hybridisiert. Anschließend wurden die *uniquen* Fragmente durch Streptavidin-gekoppelte *beads* selektioniert. Durch dieses Verfahren entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die jedoch die gleichen Bereiche abdecken.

Zur Etablierung dieser Methode sollten zunächst FFPE-Gewebe von Non-HL auf genomische Aberrationen- SNVs, Indels und TL- untersucht werden. Non-HL wurden für die Etablierung ausgewählt, da sie zum einen eine hohe VAF aufweisen und zum anderen meist TL beinhalten.

Im Anschluss daran sollte zunächst ccfDNA von Non-HL als weitere Quelle in Bezug auf das *hybrid-capture* Verfahren untersucht werden. Danach sollte untersucht werden, ob ccfDNA für die Detektion niederfrequenter Varianten der pHL mittels tNGS geeignet ist. Hierfür sollte das FFPE-Gewebe von pHL mit den dazugehörigen ccfDNAs aus Blut durch das *hybrid-capture*-basierte Verfahren verglichen und die detektierten Varianten durch Mikrodissektion von HRS-

Zellen überprüft werden. Da DNA aus FFPE-Gewebe desaminierungsartefaktanfälliger ist, könnte ccfDNA für molekulargenetische Untersuchungen geeigneter sein.

Diese Techniken sollten im Anschluss auf ccfDNA bei pHL-Patienten mit einem qPET ≥ 3 (primär chemotherapieresistent) und qPET < 3 (chemotherapiesensibel) angewendet werden. Die beiden Gruppen sollten hinsichtlich ihrer genomischen Veränderungen verglichen werden, um herauszufinden, ob es spezifische qPET ≥ 3 Aberrationen in Kandidatengenen gibt. Im Zuge dessen sollte der Therapieverlauf der qPET < 3 und qPET ≥ 3 -Patienten durch zeitlich versetzte Blutentnahme der Patienten vor, während und nach einer Therapie aufgezeigt werden. Die identifizierten Aberrationen in der ccfDNA sollten im Anschluss stichprobenartig durch Sanger Sequenzierung der zuvor mikrodissektierten HRS-Zellen aus den FFPE-Geweben überprüft werden.

Da bei pHL der zelluläre Ursprung bislang unbekannt ist, sollte außerdem anhand der Identifizierung von VDJ-Rekombinationen der zelluläre Ursprung der pHL ermittelt werden.

Eine weitere Hypothese ist, dass die primär chemotherapieresistenten Patienten mit einem qPET ≥ 3 eine andere Morphologie besitzen, die sie vor der Chemotherapie schützen. Daher sollten qPET ≥ 3 und qPET < 3 -Patienten mit Hilfe von Kollagenfärbungen (Pikrosiriusrot-Färbungen) untersucht werden, um Unterschiede aufzuzeigen.

Um neue genomische Aberrationen zu identifizieren, sollten zudem pHL unter Verwendung von ccfDNAs durch eine offene, Exom-weite Analyse mit Hilfe von WES untersucht und durch RNA-Sequenzierung überprüft werden.

2. Material

2.1 Patientenproben

Die diagnostischen Biopsate aus Lymphknoten (n=48) und die Blutproben (n=22) der pHL stammen von Patienten ab, die an der EuroNet-PHL-C1- (2007-2012) und -C2-Studie (2015-2017) teilgenommen haben. 36 der 48 diagnostischen Biopsate wurden bei den Referenz- und Konsultationszentren für Lymphknotenpathologie in Deutschland (Berlin, Frankfurt, Kiel, Lübeck, Ulm und Würzburg) angefordert. 12 der 48 Biosate waren Archivfälle der Pathologie des Universitätsklinikums Gießen, die zur diagnostischen Beurteilung entnommen wurden. Das Gewebe lag als FFPE-Gewebe vor. Die Blutproben wurden von verschiedenen Kliniken zugesandt.

Die diagnostischen Biopsate aus Lymphknoten, Bronchial-PE (Probeexzizat), Milz, Bauchraum, Knochenmark-Stanze (n=95) der Non-HL-Patienten lagen als FFPE-Gewebe im Archiv der Pathologie des Universitätsklinikums Gießen vor. Die untersuchten Blutproben (n=12) der Non-HL wurden durch die Hämatologie (Med. Klinik IV) des Universitätsklinikums Gießen zur Verfügung gestellt.

Als Referenzgewebe für die NGS-Analysen wurden für die HL Tonsillen (n=6) und für die Non-HL Lymphadeniten (n=4) und lymphofollikuläre Hyperplasien (n=3) verwendet. Außerdem wurde Blut von gesunden Probanden (n=24) des Instituts für Pathologie in Gießen herangezogen.

Durch Ethikvoten wurde der Verwendung der Proben für diese wissenschaftliche Arbeit zugestimmt.

2.2 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller, Firmensitz
Autoklav	2540EL	Tuttnauer, Breda (NL)
Bioanalyser	2100	Agilent Technologies, Santa Clara (CA)
Gelkammer	Agagel Standard-G45/1	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Genetic Analyser	ABI 9600	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Inkubator	Hybex-Microsample-Incubator	SciGene, Sunnyvale (CA)
Kamera	Leica SCN400	Leica, Wetzlar (DE)
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop	LSM800	Zeiss, Oberkochen (DE)

2. Material

Laser Capture Mikroskop	PALM Micro Beam HAL100	Zeiss, Oberkochen (DE)
Lichtmikroskop	Leica DM IL	Leica, Wetzlar (DE)
Magnetständer	Invitrogen Dyna- Mag2	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
	AdnaMagL	Qiagen, Hilden (DE)
Maxwell System	Maxwell 16	Promega, Madison (WI)
Mikrotom	SM2000R	Leica, Wetzlar (DE)
Next Generation Sequencer	MiSeq	Illumina, San Diego (CA)
	NextSeq550	Illumina, San Diego (CA)
	Ion OneTouch	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
	Ion OneTouch ES	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
	Ion PGM System	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Pipetten	0,5-10/10- 100/100-1000µl	Biohit, Helsinki (FIN)
Präzisionswaage	PM480 Delta Range	Mettler-Toledo, Greifensee (CHE)
Fluorometer	Qubit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
	Qubit 2.0- EasyCalculator	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Rad (zum Invertieren der Proben)	LLG UniLoop- Mix 2	Neolab, Heidelberg (DE)
Real-Time PCR System	Step One	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Reinstwassersystem	Direct-Q3	Merck Millipore, Billerica (MA)
Schüttler	BioShake iQ	Analytik Jena AG, Jena (DE)
Thermomixer	C 5436 F1.5	Eppendorf, Hamburg (DE) Eppendorf, Hamburg (DE) Eppendorf, Hamburg (DE)
Thermozykler	Flex Cyclor2 T3000 Veriti 96 well Fast-Thermal- Cyclor	Biometra GmbH, Göttingen (DE) Biometra GmbH, Göttingen (DE) Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
UV-Gerät	HP120	Opsytec Dr. Gröbel GmbH, Ettlingen (DE)
Ultra-Sonifizierer	M220	Covaris, Woburn, (MA)
Vortexer	Reax 2000	Heidolph, Schwabach (DE)

2. Material

	Fuge Vortex 2400	Kisker, Mühlhausen (DE)
	VF2	IKA, Staufen (DE)
	MS1 Minishaker	IKA Work Inc., Wilmington, (NC)
Wasserbad	WB 693	Vogel, Fernwald (DE)
Zentrifugen	Biofuge pico	Heraeus Instruments, Osterode (DE)
	CombiSpin	Kiscer Biotech, Steinfurt (DE)
	5417R	Eppendorf, Hamburg (DE)
	5415R	Eppendorf, Heidelberg (DE)
	Rotana/TRC	Hettich, Tuttingen (DE)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller, Firmensitz
6-, 12-, 24-, 96- Well Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen (DE)
AdhesiveCap 200 clear	Zeiss, Göttingen (DE)
Amicon Ultra 0,5 ml Centrifugal Filters	Merck, Darmstadt (DE)
Cell-free DNA BCT CE (10 ml) (enthält K ₃ EDTA und ein Zellpreservativ in Flüssigmedium)	STRECK, La Vista (NE)
Deckgläschen (24 x 26 mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen (DE)
DNA LoBind Tubes (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg (DE)
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden (DE)
Einweg-Skalpell	Pfm medical ag, Köln (DE)
Entellan	Merck, Darmstadt (DE)
Eppendorf Safe-Lock Tubes (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg (DE)
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen (DE)
Filterspitzen PP (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	nerbePlus, Winsen, Luthé (DE)
High Sensitivity DNA Chip	Agilent Technologies, Santa Clara (CA)
Index Tube Caps	Illumina, San Diego (CA)
Kanülen (1,2 x 40 mm)	BD Bioscience, Heidelberg (DE)
MembraneSlide 1.0 PEN Membran, 1 mm	Zeiss, Göttingen (DE)
MicroAmp Clear Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,1 ml, 0,2 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
microTubes 50 AFA Fiber Screw-Cap	Covaris, Woburn (MA)
microTubes AFA Fiber Pre-Slit Snap-Cap (6 x 16	Covaris, Woburn (MA)

2. Material

mm)

Objektträger, Super Frost	R. Langenbrinck, Emmendingen (DE)
Pipettenspitze (200 µl) gelb	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Pipettenspitzen (2,5 µl) Safe Seal-Tips Premium	Biozym, Wien (AUT)
Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Röhrchen,(12 ml), PS, 16,8/ 100 mm, konischer Boden	Greiner bio-one, Frickenhausen (DE)
Serologische Pipette steril (5 ml, 10 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen (DE)
Store plate (0,8 ml) 96 well	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
TruSeq Customer Amplicon Filterplate	Illumina, San Diego (CA)

2.4 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Substanz	Hersteller, Firmensitz
10x PCR Gold Puffer (1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Agancourt AMPure XP Reagent	Beckman Coulter, Brea (CA)
Amplitaq Gold DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Aq. dest. (Aqua ad injectabilia)	B Braun, Melsungen (DE)
Betain (5 M)	Merck, Darmstadt (DE)
Borsäure (H ₃ BO ₃) ≥99,5% ACS,ISO,Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt (DE)
Corbit Balsam	Hecht, Kiel-Hassee (DE)
Dako Antibody Diluent	Dako, Glostrup (DNK)
DNA Loading Dye (6x)	Thermo Scientific, Waltham (MA)
EDTA, Disodium Salt, Dihydrate, Molecular Biology Grade	Merck, Darmstadt (DE)
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂) 100%, ACS,ISO,Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt (DE)
Ethanol (absolut) (C ₂ H ₆ O) ACS	Merck, Darmstadt (DE)
Ethidiumbromid (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃) ≥98%	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
ExoSAP-IT	Affymetrix, Santa Cruz (CA)
GeneRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Hämatoxylin	Dako, Glostrup (DNK)
Hi-Di™ Formamide	Thermo Fisher Scientific, Waltham

2. Material

	(MA)
Isopropanol	Merck, Darmstadt (DE)
Mineralöl	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumcitrat ($\text{NaC}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumhydroxid (NAOH)	Merck, Darmstadt (DE)
Nuclease-freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
PhiX	Illumina, San Diego (CA)
Pikrosiriusrot (F3B, C.I. 35780, Direct red 80)	Merck, Darmstadt (DE)
Poly-L-Lysin (0,1% in H_2O)	Merck, Darmstadt (DE)
Proteinase K (20 mg/ml)	Merck, Darmstadt (DE)
Sieve 3:1 Agarose	Biozym Biotech, Wien (AUT)
Tris Base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), Molecular Biology Grade	Merck, Darmstadt (DE)
Tris Hydrochloride ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$), Molecular Biology Grade	Merck, Darmstadt (DE)
Tween 20, Ph.Eur.	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Xylol, ACS	Merck, Darmstadt (DE)
Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), Ph Eur,BP,JP,USP,E 330,FCC	Merck, Darmstadt (DE)

2.5 Lösungen und Puffer

Agarose (2% w/v)

1 g Sieve 3:1 Agarose
ad 50 ml TBE (0,5x)

Citratpuffer

Stammlösung A:
0,1M Zitronensäure
aq. dest.

Stammlösung B:
0,1 M Natriumcitrat
aq. dest.

Citratpuffer:
1,8 ml Stammlösung A
+ 8,2 ml Stammlösung B
+ 90 ml aq. dest.

2. Material

TBE (5x)	54,5 g Tris Base + 27,8 g Borsäure + 2,9 g EDTA ad 1000 ml aq. dest.
----------	---

2.6 Verwendete Kits

Kit	Hersteller, Firmensitz
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Dako REAL Detection System AP/RED Rabbit/Mouse	Dako, Glostrup (DNK)
GeneAmp Fast PCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
High Sensitivity DNA Analysis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara (CA)
Ion OneTouch 200 Template Kit v2	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Ion Plus Fragment Library Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Kapa HiFi Hot Start Ready Mix	Roche, Basel (CHE)
Kapa Library Prep Kit	Roche, Basel (CHE)
Maxwell 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit	Promega, Madison (WI)
Maxwell 16 FFPE Tissue LEV RNA Purification Kit	Promega, Madison (WI)
MiSeq Reagent Kit v3	Illumina, San Diego (CA)
MiSeq Reagent Kit Nano v2	Illumina, San Diego (CA)
NextSeq Reagent Kit v2.5	Illumina, San Diego (CA)
Nextera Rapid Capture Oligos (Projekt-Nr.: 81390 (v1), Projekt-Nr.: 129960 (v2))	Illumina, San Diego (CA)
RNeasy FFPE-Kit	Qiagen, Hilden (DE)
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
TruSeq Custom Amplicon Kit	Illumina, San Diego (CA)
TruSeq Exome Kit	Illumina, San Diego (CA)
TruSeq RNA Exome Kit	Illumina, San Diego (CA)
TruXTRAC FFPE DNA Kit	Covaris, Woburn (MA)
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)

2. Material

Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
Qubit RNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)
QIAamp MinElute ccfDNA Midi Kit	Qiagen, Hilden (DE)

2.7 Primerliste (Anhang: Tab. 1)

Die Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg (DE) mit HPSF (*High Purity Salt Free*)-Aufreinigung bezogen.

2.8 Antikörper

Name	Spezies	Verdünnung	Hersteller, Firmensitz	Klon	Anwendung
CD30	mouse mAB	1:100	Dako, Grafath (DE)	Ber-H2	Immunhistochemie

2.9 Softwares

Für die Erstellung der Graphen wurden die Programme *GraphPad Prism 6* (GraphPad Prism Software Inc., La Jolla (CA)) und *CorelDRAW 2018* (Corel GmbH, München (DE)) verwendet. Zur 3-dimensionalen Darstellung der HRS-Zellen wurde mit dem 3D-Renderer (Arivis Vision 4D, arivis AG, München (DE)) gearbeitet.

Zur Visualisierung der Sanger-Elektropherogramme wurde mit dem Programm *Sequence Scanner Software v1.0* (Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA)) gearbeitet. Die Editierung der Sequenzen wurde mit dem Programm *CLC Sequence Viewer* (Qiagen, Hilden (DE)) durchgeführt. Anschließend konnten die Sequenzen mit der BLAST-Software (*Basic Local Alignment Search Tool*) des NCBI (*National Center of Biotechnology Information*, Bethesda (MD)) mit Datenbanken abgeglichen werden.

Zur Überprüfung der NGS-Sequenzen wurde das Programm *Integrative Genomics Viewer* (Broad Institute, Cambridge (MA)) (IGV) herangezogen. Für die Auswertung der NGS-Daten wurde die Plattform *BaseSpace Sequence Hub* (Illumina, San Diego (CA)) verwendet. Je nach Datensatz wurden unterschiedliche Analysen in *BaseSpace* durchgeführt. Für die Auswertung des Amplikon-basierten Verfahrens wurden die Programme *Amplicon DS v1.2* und *TruSeq Amplicon* verwendet. Bei dem *hybrid-capture*-basierten Verfahren (tNGS) und den WES wurde mit dem Programm *Enrichment v3.0* gearbeitet. Für die RNA-Sequenzierungsdaten musste ein *Alignment* gegen die genomische Sequenz für Homo Sapiens (hg19) durch das Programm *RNA-*

Seq Alignment erstellt werden. Für die Detektion von Varianten wurde das Programm *Variant Studio Software 3.0* verwendet.

Zur Interpretation der Varianten wurde mit ExAC (*Exome Aggregation Consortium*, Broad Institute, Cambridge (MA)) gearbeitet. TL konnten durch den IGV überprüft werden.

Die VDJ-Gen-Sequenzen wurden mit der IMGT/V-Quest-Datenbank (*The International Immunogenetics Information System*, Montpellier, (FRA)) ausgewertet.

Für die Mikrodissektion wurde mit dem Programm *PALM Robo v4.2* (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried (DE)) gearbeitet. Die Quantifizierung der Pikrosiriusrot-Färbungen wurde mit dem Programm QuPath (GitHub, San Francisco (CA)) vorgenommen.

2.10 Statistik

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Programm *GraphPad Prism 6* (GraphPad Prism Software Inc., La Jolla (CA)) verwendet. Zur Anwendung kam ein gepaarter zweiseitiger t-Test. Bei der Quantifizierung der Pikrosiriusrot-Färbung wurde für die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney U-Test gearbeitet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Proben sind dargestellt durch *p < 0.05, **p < 0.01 und ***p < 0.001.

3. Methoden

3.1 DNA- und RNA-Isolation aus den Patientenproben

3.1.1 DNA-Isolation für das Amplikon-basierte Verfahren

Für die DNA-Isolation wurde zur schonenden Entparaffinierung mit einem Ultra Sonifizierer (M220, Covaris) und dem TruXTRAC FFPE DNA Kit (Covaris) gearbeitet. Um die DNA aus den Gewebeproben, die in Form von FFPE Gewebe vorlagen, zu isolieren, wurde zunächst ein 20 µm Schnitt angefertigt, der in ein mit 100 µl SDS-Lösung versetztes Sonifizierungsgefäß (microTube AFA Fiber Pre-Slit Snap-Cap (6x16 mm)) überführt wurde. Daraufhin wurden die Proben in den Ultra Sonifizierer gestellt und die Entparaffinierung, sowie der Proteinase K-Verdau nach Angaben des Herstellers (Option B) durchgeführt, mit dem Unterschied, dass der Proteinase K-Verdau über Nacht, statt für eine Stunde, vollzogen wurde. Durch diese schonende Entparaffinierung des Gewebes sollte eine höhere Ausbeute und Qualität der DNA erreicht werden.

Die Extraktion und Aufreinigung der DNA wurde anschließend mit dem Maxwell 16 System (Promega) und dem FFPE LEV DNA Purification Kit durch paramagnetische Partikel (PMPs) automatisiert vorgenommen. Die DNA lagerte sich an die PMPs an. Die Bindung der DNA an die PMPs kam durch ionische Wechselwirkungen zustande. Die an die PMPs gebundene DNA wurde anschließend in unterschiedliche Aufreinigungs-Reagentien getaucht und zuletzt von den PMPs eluiert.

Hierfür wurde 400 µl Lyse Puffer zu 180 µl Inkubationspuffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und 50 µl Nuklease-freies Wasser in ein 1 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurde die gesamte Reaktionslösung aus dem Sonifizierungsgefäß in das 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss darauf erfolgte die DNA-Extraktion durch das automatisierte Maxwell 16 System mit dem Programm (DNA; FFPE). Nach der 25-minütigen Extraktionsphase wurde die Konzentration der DNA mittels Qubit (3.1.4) gemessen.

Die Konzentrationen der gDNAs lagen durchschnittlich bei 302 ng/µl (9,8 ng/µl–675 ng/µl).

3.1.2 DNA-Isolation für das *hybrid-capture*-basierte Verfahren

Die Patientenproben lagen in Form von FFPE-Gewebe und Blut vor. Zur Extraktion der gDNA aus FFPE-Gewebe wurde mit dem FFPE LEV DNA Purification Kit (Promega) gearbeitet. Zunächst mussten mit dem Mikrotom 2-10 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt werden, welche anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 180 µl Inkubationspuffer und 20 µl (20 mg/ml) Proteinase K-Lösung versetzt wurden. Nachdem die Gewebeschnitte über Nacht bei 70°C inkubierten, wurde 400 µl Lyse Puffer hinzugegeben und durch kurzes Vortexen gemischt. Im Anschluss daran konnte die DNA automatisiert mit dem Maxwell 16 System extrahiert werden (3.1.1). Anschließend konnte die Konzentration mit Hilfe des Qubits

gemessen werden. Die Konzentrationen der gDNAs lagen durchschnittlich bei 196,6 ng/μl (3,06 ng/μl–611 ng/μl) (Non-HL) und 339 ng/μl (93,5 ng/μl–511 ng/μl) (HL).

Für die Extraktion der ccfDNA wurden von den Non-HL-Patienten 20 ml und von den HL-Patienten 2-8 ml Blut in ein 1-2 Cell-free DNA BCT CE (Streckröhrchen) entnommen. Das im Streckröhrchen enthaltene Additiv dient als Stabilisator und führt zur Fixierung der Zellen. Den HL-Patienten konnte nur 2-8 ml Blut entnommen werden, da es sich um Kinder handelte. Nach spätestens 24 h wurde das Blut im Streckröhrchen für 10 Min. bei 1.800 rpm zentrifugiert und das Plasma in ein Zentrifugen-Röhrchen (15 ml) pipettiert. Im Anschluss daran wurde das Zentrifugen-Röhrchen für 15 Min. bei 2.200 rpm zentrifugiert, das Plasma in ein Falcon-Röhrchen pipettiert und die zellfreie DNA aus dem Plasma durch das QIAamp MinElute ccfDNA Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangabe mittels *beads* extrahiert. Entsprechend des Protokolls wurde das *bead*-, Proteinase K- und Puffervolumen den Plasmamengen angepasst. Zum Eluieren wurden 30 μl Nuklease-freies Wasser verwendet.

Aus zu Anfang 5-10 ml Plasma (Non-HL) bzw. 1-6 ml Plasma (HL) wurden 30 μl ccfDNA isoliert. Die Konzentrationen der ccfDNAs, die mit Hilfe des Qubits gemessen wurden, lagen im Mittel bei 2,9 ng/μl (0,5 ng/μl–9,61 ng/μl) (Non-HL) und 3,9 ng/μl (0,75 ng/μl–15,9 ng/μl) (HL).

3.1.3 RNA-Isolation für die RNA-Sequenzierung

Um aus dem FFPE-Gewebe RNA zu isolieren wurde mit dem RNeasy FFPE Kit (Qiagen) gearbeitet. Das Prinzip basiert auf der Lyse der Proben mit anschließendem Proteinase K-Verdau, gefolgt von einer DNase-Behandlung, um gDNA zu entfernen und einer finalen Aufreinigung durch Säulen. Zunächst mussten hierfür mit dem Mikrotom 2-10 3 μm dicke Gewebeschnitte angefertigt werden, welche anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 300 μl Mineralöl beschichtet und 10 Sek. durch Vortexen gemischt wurden. Danach erfolgte eine 2-minütige Inkubation bei 80°C, um das Paraffin zu lösen. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur (RT) (15 Min.) abgekühlt waren, wurden je Probe 224 μl Lyse Puffer, 25 μl Proteinase K und 1 μl Blue Dye hinzugegeben, woraufhin sie 5 Sek. durch Vortexen gemischt und 20 Sek. bei 10.000 g zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Proben 15 Min. bei 56°C und danach für 60 Min. bei 80°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben auf RT abgekühlt (15 Min.) und zu jeder Probe 26 μl MnCl₂ (0,09 M), 14 μl DNase Puffer und 10 μl DNase I zur wässrigen (blauen) Phase hinzugegeben und 10mal auf- und ab pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurden die Proben für 2 Min. bei 16.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige (blaue) Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem Maxwell 16 System und dem FFPE LEV RNA Purification Kit (Promega) automatisiert extrahiert. Hierfür wurde 400 μl Lyse Puffer zu 180 μl Inkubationspuffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Danach wurde die gesamte

Reaktionslösung in das 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss daran erfolgte die RNA-Extraktion durch das automatisierte Maxwell 16 System (Vorgehensweise s. 3.1.1, Abweichung zum Vorgehen: Es wurde das Programm RNA; FFPE ausgewählt).

3.1.4 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA und RNA wurde mit Hilfe eines Fluorometers (Qubit, Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die Verwendung eines Eichstandards ermöglicht eine exakte Konzentrationsbestimmung. Es wurden das Qubit dsDNA HS Assay Kit (10 pg/μl–100 ng/μl) (Thermo Fisher Scientific), das Qubit dsDNA BR Assay Kit (0,1 ng/μl–1000 ng/μl) (Thermo Fisher Scientific) und das Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Je nach Kit und Geräteeinstellung kann doppelsträngige DNA oder einzelsträngige RNA detektiert werden. Ein im Qubit-Reagenz enthaltener fluoreszierender Farbstoff, der je nach Kit variiert, interkaliert spezifisch zwischen die Basen der doppelsträngigen DNA bzw. einzelsträngigen RNA und kann daraufhin mit einem Fluorometer detektiert werden. Die Stärke des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Konzentration der DNA- bzw. RNA Probe. Es wurde 1 μl DNA bzw. RNA für die Messung verwendet.

3.1.5 Qualitätskontrolle der DNA- und RNA-Proben

Da gDNA und RNA aus FFPE-Gewebe durch die Formalin-Fixierung degradiert sein kann, sollte zusätzlich zur Quantifizierung eine Qualitätsbestimmung der Proben erfolgen. Um die Qualität der DNA und RNA zu testen, wurde eine β-Globin (DNA) und HPRT (RNA) Amplifikation durchgeführt.

Als Positivkontrolle wurde eine 1:10 verdünnte DNA aus Tonsille für die DNA-Qualitätskontrolle und cDNA einer Tonsille für die RNA-Qualitätskontrolle verwendet. Als Negativkontrolle diente H₂O.

β-Globin wird mittels Fast-PCR amplifiziert. HPRT ist ein „*Housekeeping-Gen*“ und wird auch mittels Fast-PCR amplifiziert.

Der Fast-PCR-Ansatz mit β-Globin wurde wie folgt in ein 0,1 ml PCR-Gefäß pipettiert:

Nuklease-freies Wasser	4 μl
β -Globin-US-Primer (5 pmol/μl)	2 μl
β -Globin-LS-Primer (5 pmol/μl)	2 μl
GeneAmp Fast PCR Master Mix (2x)	10 μl

Zu dem Ansatz wurden 2 μl DNA (50 ng/μl) hinzugegeben und mit Mineralöl überschichtet. Anschließend erfolgte die Amplifikation im Thermozykler:

3. Methoden

PCR Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 Sek.	
Denaturierung	94°C	10 Sek.	} 40
Annealing + Elongation	63°C	20 Sek.	
	4°C	∞	

Für die Beurteilung wurden 5 µl der PCR-Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen, wobei eine Länge von 268 bp erwartet wurde.

Für die RNA-Qualitätskontrolle musste zunächst die RNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben werden, welche für die HPRT-Analyse verwendet wurde. Hierfür wurde ein Mix (je Probe) wie folgt hergestellt:

10x RT Buffer	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4.4 µl
dNTPs Mixture (2.5 mM)	4 µl
Random Hexamere (50 µM)	1 µl
RNase inhibitor (20 U/L)	0.4 µl
MultiScribe Reverse Transkriptase (50 U/L)	0.5 µl

Anschließend wurden zu dem Mix 7.7 µl RNA (max. 1 µg) hinzupipettiert und folgendes Programm im Thermozykler gestartet:

Temperatur	Zeit
25°C	10 Min.
48°C	30 Min.
95°C	5 Min.
4°C	∞

Nach der cDNA-Herstellung wurde für die HPRT-Fast-PCR folgender Fast-PCR-Mix hergestellt:

H ₂ O	5 µl
HPRT1-Ex4-US2 Primer (10 pmol/µl)	2 µl
HPRT1-Ex6-LS1N Primer (10 pmol/µl)	2 µl
GeneAmp Fast PCR Master Mix (2x)	10 µl

3. Methoden

Zu diesem Fast-PCR-Mix wurde 1 µl cDNA (unverdünnt) hinzupipettiert und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Im Anschluss wurde folgendes PCR-Programm im Thermozykler gestartet:

PCR Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 Sek.	
Denaturierung	94°C	10 Sek.	} 30
Annealing + Elongation	64°C	20 Sek.	
	4°C	∞	

Zur Beurteilung wurde 5 µl der PCR-Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen, wobei die Länge bei 90 bp liegen sollte.

3.2 Targeted Next Generation Sequencing (tNGS) mittels MiSeq/NextSeq550

Unter dem Begriff *Next Generation Sequencing* (NGS) versteht man Hochdurchsatz-Sequenzierungen, bei denen Millionen bzw. Milliarden DNA-Fragmente parallel in einem nicht separierten Raum sequenziert werden. Durch den millionenfachen Ablauf der gleichzeitigen Sequenzierreaktionen in einem Raum mit hochauflösender Detektion und dem automatisierten Vorgehen, stellt es eine äußerst effiziente Sequenziermethode dar, mit der im Vergleich zur Sanger Sequenzierung 10^6 x mehr Sequenzen im gleichen Zeitraum generiert werden können. Außerdem können Varianten im 5% VAF-Bereich detektiert werden, die durch die konventionelle Sanger Sequenzierung, bei der die VAF bei mind. 30% liegen sollte, nicht erkennbar wären. Durch Verwendung von patientenspezifischen Sequenz-Barcodes ist es zudem möglich mittels NGS nicht nur tausende Gene eines Patienten parallel zu analysieren, sondern durch den Einsatz verschiedener Indexe auch unterschiedliche Patientenproben simultan in einem Lauf zu untersuchen.

Es gibt unterschiedliche NGS-Applikationen. Während bei WGS Varianten im codierenden und nicht codierenden Bereich detektiert werden, werden durch WES nur die codierenden Bereiche (1,5% des gesamten Genoms), untersucht (100).

In dieser Arbeit wurde mit tNGS gearbeitet. Bei dieser Methode können bestimmte Regionen bzw. gezielt Gene, die zur Tumorentstehung beitragen auf genetische Aberrationen untersucht werden. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass durch den im Vergleich zum WGS und WES kleinen abgedeckten Bereich, eine höhere Sensitivität durch die erhöhte Abdeckung erzielt werden kann. Damit könnte es auch möglich sein, Varianten in Geweben mit sehr geringem Tumorzellanteil, wie HL, ohne vorherige Anreicherung der Tumorzellen nachzuweisen.

Es wurden zwei unterschiedliche Techniken des tNGS angewendet und miteinander verglichen: Bei der Amplicon-basierten Methode kommt es zu einer Anreicherung der Zielregionen durch spezifische Primer-Gemische und anschließender Amplifikation durch PCR. Es ist ein hoch multiplextes Verfahren mit zirka 100 Primern pro Reaktion. Zunächst werden die Primer an die spezifischen Bereiche je eines Stranges hybridisiert. Anschließend synthetisiert eine DNA-Polymerase den Strang vom stromaufwärts gelegenen Oligo durch die Zielregion, gefolgt von der Ligation am 5'-Ende des stromabwärts gelegenen Oligos, sodass immer nur ein Strang das Template für die PCR darstellt. Anschließend werden die Bereiche von Interesse mit Adaptoren versehen und mittels PCR amplifiziert. Dabei gehen die gesamten PCR-Amplifikate jeweils von einem der beiden DNA-Stränge aus. Anschließend wurden die amplifizierten PCR-Produkte durch eine Größenselektion mittels *beads* von überschüssigen Primern, Salzen, Adaptoren und der restlichen gDNA getrennt. Darauf folgt die klonale Amplifikation und Sequenzierungsreaktion (132). Da Varianten im niederfrequenten Bereich (<5%) erwartet werden und die Taq Polymerase Fehlerrate bei 8×10^{-6} Fehler pro Basenpaar liegt (107), sowie weitere technische Fehler, wie bspw. bei dem Varianten Calling durch das Programm *Pisces*, zu falsch-positiven Varianten führen können, musste eine Methode entwickelt werden, um die Sensitivität weiter zu erhöhen. Dies sollte mit dem sogenannten *dual-strand*-Verfahren realisiert werden. Bei diesem Verfahren werden die zu untersuchenden Bereiche in zwei unterschiedlichen Reaktionsansätzen mit zwei verschiedenen Primerpools abgedeckt, wobei durch den ersten Reaktionsansatz der eine Strang und durch den zweiten Reaktionsansatz der zweite Strang abgedeckt wird. Die Varianten, die in beiden Strängen detektiert werden, werden als reale Varianten gewertet.

Bei dem *hybrid-capture*-basierten Verfahren wird dagegen mit ca. 80 Nukleotid langen einzelsträngigen biotinylierten Sonden gearbeitet, die den zu untersuchenden Bereich abdecken. Dabei wird zunächst die DNA durch eine Ultraschallbehandlung zufällig fragmentiert und mit Adaptoren versehen. Anschließend werden die DNA-Fragmente an spezifische biotinylierte Sonden hybridisiert und mittels Streptavidin-gekoppelter *beads* vom Rest der gDNA separiert. Danach folgen eine Amplifikation der selektierten Zielregionen und mehrstufige Aufreinigungsschritte. Zuletzt findet die klonale Amplifikation und Sequenzierung statt. Durch die zufällige Fragmentierung mittels Ultraschallbehandlung und das Binden der Sonden an unterschiedlich lange Fragmente, kann eine höhere Sensitivität generiert werden.

Zur Bestimmung der niederfrequenten SNVs und Indels in den pHL (FFPE-Gewebe) wurde für das Amplicon-basierte Verfahren mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit (Illumina) gearbeitet. Für diese Analyse wurde ein Panel designet, das die 20, zu diesem Zeitpunkt bekannten, meist mutierten Gene in HL beinhaltet (*B2M*; *BCL7A*; *CDK3*; *CIITA*; *CSF2RB*, *EBF1*; *EEF1A1*, *EGR1*, *GNA13*, *HIST1H1E*, *ITPKB*, *MYB*; *NFKBIA*; *PTPNI*; *SEN7*, *SOC1*, *TNFAIP3*;

3. Methoden

UBE2A; *WEE1*, *ZNF217*), die durch zwei unterschiedliche Oligopools (CATA und CATB) abgedeckt wurden. Das Panel umfasste 439 Amplikons, mit einer durchschnittlichen Länge von 177 bp und 42 kb Sequenzen.

Zur Analyse der Non-HL und pHL (ccfDNA) wurde für das *hybrid-capture*-basierte Verfahren mit dem TruSeq Exome Kit (Illumina) gearbeitet. Das designte Panel deckte die 106 meist mutierten Gene (Version 1) (Anhang Tab. 2) bzw. die 121 meist mutierten Gene (Version 2) (Anhang Tab. 3) in Non-HL und HL ab. Es umfasste 1.103 Target-Regionen, die insgesamt 273 kb abdeckten (Version 1). Die erweiterte Version enthielt 1.387 Target-Regionen, die 325 kb abdeckten (Version 2). Im Gegensatz zum Amplikon-basierten Verfahren, kann man durch die *hybrid-capture* Methode zusätzlich strukturelle Veränderungen, wie TL oder Zugewinne und Verluste nachweisen.

Die tNGS-basierte Sequenzierung wird in drei Abschnitte gegliedert: 1) Die Herstellung der DNA-Bibliothek, 2) die klonale und parallele Amplifikation der Zielregionen und 3) die Sequenzierung.

3.2.1 Verschiedene Bibliothek-Präparationen

Amplikon-basierte Methode

Hybridisierung des Oligo-Pools

Im ersten Schritt wurden zwei Oligo-Pools (CAT A und CAT B), die sowohl *upstream*- als auch *downstream*-Oligos (ULSO und DLSO) für den gleichen Strang für die spezifisch abzudeckenden Regionen beinhalteten, in zwei getrennten Reaktionen an die Ausgangs-DNA hybridisiert (Abb. 3). Durch das anschließende Auffüllen und die Ligation geht die PCR nur von einem der beiden Stränge aus.

Reaktion 1: Pool A



Reaktion 2: Pool B



Abb. 3: Anlagerung der beiden Oligo-Pools an die Targetregion in getrennten Reaktionen

Für die Hybridisierung wurde die gDNA auf 25 ng/µl verdünnt und je 10 µl in zwei MicroAmp Fast PCR-Gefäße (0,2 ml) pipettiert. Anschließend wurden 5 µl Custom Amplicon Oligo Tube (CAT A) in das eine PCR-Gefäß und 5 µl Custom Amplicon Oligo Tube (CAT B) in das zweite PCR-Gefäß mit der Probe gegeben. Beide PCR-Gefäße wurden daraufhin bei 1000 g für 1 Min. an zentrifugiert und mit 35 µl Oligo Hybridization for Sequencing 2 (OHS2) versetzt. Nach fünfmaligem Resuspendieren wurden die Reaktionsgefäße nochmals für 1 Min. bei 1000 g an zentrifugiert, bevor sie im vorgeheizten Heizblock für 1 Min. bei 97°C erhitzt wurden. Im Anschluss wurde der Heizblock auf 40°C gestellt und das Reaktionsgemisch weitere 80 Min. inkubiert. Somit nahm die Temperatur von 97°C-40°C stetig ab, um eine spezifische Hybridisierung der Oligos an die DNA zu ermöglichen.

Depletion der ungebundenen Oligos

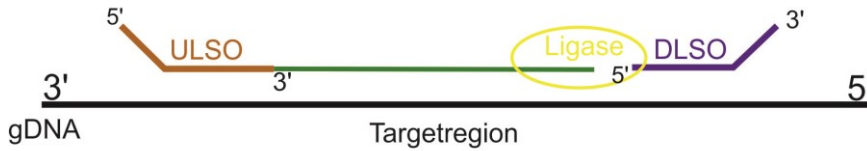
Bei diesem Waschschrift wurden die ungebundenen Oligos durch einen größenspezifischen Filter von der gDNA entfernt. Hierfür wurde eine TruSeq Customer Amplicon Filterplate verwendet. Die Filterplatte musste zunächst mit 45 µl Stringent Wash 1 (SW1) je Well versehen werden. Anschließend wurde die Filterplatte für 10 Min. bei 2.400 g und 20°C zentrifugiert. Als Waschpuffer-Auffangbehälter diente eine 96-Well (0,8 ml) Mikrotiter Platte (MIDI), die unter die Filterplatte positioniert wurde.

Nachdem das Reaktionsgemisch nach 80 Min. auf 40°C abgekühlt war, konnte jede Probe in je ein Well der Filterplatte pipettiert werden. Im Anschluss daran wurde die Filterplatte für 4 Min. bei 2.400 g und 20°C zentrifugiert, um die ungebundenen Oligos zu entfernen. Darauf folgte ein Waschschrift, um die restlichen ungebundenen Oligos zu entfernen. Hierfür wurde in jedes Well 45 µl Stringent Wash 1 (SW1) gegeben und 4 Min. bei 2.400 g und 20°C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine SW1-Lösung nach der Zentrifugation in der Filterplatte verblieb. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus der MIDI-Platte entfernt und 45 µl Universal Buffer 1 (UB1) je Well auf die Filterplatte gegeben. Danach wurde die Filterplatte für 4 Min. bei 2.400 g und 20°C zentrifugiert, sodass keine Flüssigkeit mehr in der Filterplatte verblieb.

Verlängerung und Ligation der gebundenen Oligos

In diesem Schritt wurden die *upstream*-Oligos durch eine DNA-Polymerase vom 3' zu 5' verlängert. Die Verknüpfung des neuen Stranges mit dem *downstream*-Oligo wurde durch eine Ligase hergestellt (Abb. 4).

Reaktion 1: Pool A



Reaktion 2: Pool B



Abb. 4: Verlängerung und Ligation der gebundenen Oligos

Hierfür wurden 45 µl Extension-Ligation Mix 4 (ELM4) je Well auf die Filterplatte pipettiert. Anschließend wurde die Filterplatte mit MicroAmp Clear Adhesive Film luftdicht verschlossen und für 45 Min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Filterplatte 4 Min. bei 2.400 g für 20°C zentrifugiert.

Denaturierung und Amplifikation

Um die DNA-Fragmente maximal zu eluieren, musste 25 µl 50 nM NaOH je Well hinzupipettiert werden. Anschließend folgte eine 5-minütige Inkubationszeit.

Daraufhin wurde je ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) mit 5 µl Index i5 Adapter (A5XX) und 5 µl Index i7 Adapter (A7XX) versehen (Abb. 5). Diese Adapter sind in der Lage an alle Oligos zu binden. Für jede Probe wurden spezifische Indexe verwendet, damit man sie im späteren Verlauf zusammenfügen (Poolen), gemeinsam sequenzieren und die detektierten Varianten nach der Sequenzierung den jeweiligen Patienten zuordnen kann.

Reaktion 1: Pool A



Reaktion 2: Pool B



Abb. 5: Anlagerung der Index-Adapter

3. Methoden

Im Anschluss daran wurde ein Mix für die Amplifikation der DNA-Fragmente aus 29,16 µl PCR Master Mix 2 (PMM2) und 0,58 µl TruSeq DNA Polymerase 1 (TDP1) (je Probe) hergestellt. 22 µl des PMM2/TDP1-Gemisches wurden in je 1 Reaktionsgefäß mit Indexen pipettiert. Anschließend wurden 20 µl des Reaktionsgemisches von der Filterplatte in die MicroAmp Fast PCR Röhren (0,2 ml) mit dem Mastermix und den Indexen überführt und durch folgendes PCR-Programm amplifiziert:

PCR Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	3 Min.	
Denaturierung	95°C	30 Sek.	} 27
Annealing	66°C	30 Sek.	
Elongation	72°C	60 Sek.	
	72°C	5 Min.	
	10°C	∞	

Anschließend wurden die amplifizierten PCR-Produkte durch ein Agencourt AMPure XP Reagent (*beads*) mittels Größenselektion von überschüssigen Primern, Adaptern sowie Salzen und der restlichen gDNA getrennt. Dabei wird mit der sogenannten *Solid Phase Reversible Immobilization* (SPRI)-Technologie gearbeitet. Es werden paramagnetische Partikel verwendet, um die DNA selektiv nach ihrer Größe zu binden. Diese paramagnetischen Partikel (*beads*) bestehen aus einem Polystyren-Kern, der von einer dünnen Schicht Magnetiten umgeben ist. Die Magnetite sind für die paramagnetische Wirkung der *beads* verantwortlich. Die Oberfläche der *beads* ist mit Carboxylgruppen beschichtet, die für die DNA-Bindung verantwortlich sind. In Anwesenheit von einem Puffer, der u.a. Polyethylenglykol (PEG) enthält, wird eine Größensabhängige Bindung der DNA ermöglicht. Je höher die Konzentration an PEG bzw. je mehr *beads* eingesetzt werden, umso kürzer sind die Fragmente, die an die *beads* binden können. Je geringer die Konzentration ist bzw. je weniger *beads* eingesetzt werden, desto größer sind die Fragmente, die an die *beads* binden können (133, 134).

Zunächst wurden DNA-Fragmente, die mindestens 100 bp lang sind, an die *beads* gebunden. Hierfür mussten 30 Min. vor der Verwendung die *beads* auf RT gebracht, 80% EtOH hergestellt und die *beads* 1 Min. durch Vortexen gemischt werden, woraufhin 60 µl *beads* in jeweils 1 Well einer MIDI-Platte pipettiert werden und 60 µl des PCR-Produktes hinzugegeben wurde. Anschließend wurde das Gemisch in der MIDI-Platte für 2 Min. im Thermomixer bei 1.800 rpm vermischt und danach für 10 Min. bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurde die MIDI-Platte für 2 Min. auf einen Magnetständer gestellt. Sobald die *beads* gebunden waren, wurde der Überstand verworfen. Hieran folgte ein Waschschriff auf dem Magnetständer: Hierfür wurden 200 µl 80% EtOH in jedes Well pipettiert, 30 Sek. inkubiert und anschließend wieder

verworfen. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Nachdem das EtOH vollständig aus dem jeweiligen Well entfernt wurde, mussten die *beads* mit den DNA-Fragmenten für 10 Min. auf dem Magnetständer lufttrocknen. Zum Eluieren der *beads* von den DNA-Fragmenten wurden im Anschluss 30 µl Elution Buffer mit Tris (EBT) je Well hinzu gegeben, das Gemisch für 10 Sek. durch Vortexen gemischt und für 2 Min. bei 1.800 rpm zentrifugiert. Nachdem die *beads* vollständig gelöst waren, wurde die Lösung 2 Min. inkubiert und weitere 2 Min. auf einen Magnetständer positioniert. Anschließend wurden 20 µl des Überstandes, der die DNA-Fragmente beinhaltet, in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) pipettiert.

Überprüfung der Bibliothek

Um die Amplifikate zu überprüfen, wurde zunächst die Konzentration mittels Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) mit dem Fluorometer (Qubit, Thermo Fisher Scientific) (3.1.4) gemessen und anschließend mit dem Bioanalyser (2100, Agilent Technologies) untersucht. Der Bioanalyser basiert auf dem traditionellen Gelelektrophorese-Prinzip, wobei dieses Prinzip auf ein Chip-Format übertragen wurde. Er trennt die DNA der Länge nach auf und visualisiert die Längenverteilung in einem Elektropherogramm und einem virtuellen Gelbild durch fluoreszenzmarkierte Farbstoffe, die in die DNA interkalieren und durch einen Laser (10 mW) zur Fluoreszenz angeregt und detektiert werden. Für die Analyse sollten maximal 500 pg/µl DNA verwendet werden. Für die Messung benötigte man 1 µl DNA, die laut Herstellerangabe bearbeitet wurde. Das Elektropherogramm sollte bei der Analyse der DNA-Fragmente Peaks bei etwa 350 bp abbilden. Diese Peaks stellen die Amplifikate der PCR-Reaktion dar.

Normalisierung der hergestellten Bibliothek

Nachdem die Quantität und Qualität der Bibliothek überprüft wurde, konnte sie im Anschluss durch Streptavidin-*beads* (LNB) normalisiert werden. Das Prinzip basiert auf der spezifischen Bindekapazität der Streptavidin-*beads*. Die *beads* können nur eine bestimmte Menge an DNA-Fragmenten binden. Das genaue Prinzip geht auf ein patentiertes Verfahren von Illumina zurück, welches ein Firmengeheimnis ist. Die überschüssigen DNA-Fragmente, die nicht an den *beads* gebunden waren, wurden entfernt. Es folgten ein Waschschriff mit Normalization Wash 1 (LNW1) und die anschließende Denaturierung durch NaOH, sodass jede Probe nach diesem Schritt in der gleichen Konzentration vorlag.

Hierfür wurde zunächst ein Gemisch aus 45,8 µl Library Normalization Additives 1 (LNA) und 10,4 µl Library Normalization Beads 1 (LNB) (je Bibliothek) hergestellt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Library Normalization Additives 1 (LNA) und Library Normalization Beads 1 (LNB) 30 Min. vor Verwendung auf RT gebracht und die Library Normalization Beads 1

(LNB) mind. 1 Min. durch vortexen gemischt werden, bevor sie zu dem LNA-Mix gegeben werden.

Nachdem das LNA/LNB-Gemisch hergestellt wurde, wurden 45 µl des Gemisches zu jeder Bibliothek pipettiert und für 30 Min. bei 1.800 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 2 Min. auf den Magnetständer gestellt, bis das Gemisch klar war. Der Überstand wurde verworfen. Daraufhin folgte ein Waschschrift mit der Library LNWI-Lösung. LNWI sollte 30 Min. vor Verwendung auf RT gebracht werden. Nachdem die Flüssigkeit aus den Eppendorf Safe-Lock Tubes (1,5 ml) entfernt wurde, wurden 45 µl LNWI hinzupipettiert, im Anschluss 5 Min. bei 1.800 rpm auf dem Thermomixer inkubiert, anschließend 2 Min. auf den Magnetständer positioniert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden die Eppendorf Safe-Lock Tubes (1,5 ml) mit der an die *beads* gebundenen Bibliothek zum Denaturieren mit 30 µl 0,1 N NaOH versehen, 5 Min. bei 1.800 rpm inkubiert und weitere 2 Min. auf den Magnetständer gestellt. In der Zwischenzeit wurde 30 µl Library Normalization Storage Buffer 2 (LNS2) in ein weiteres Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) vorgelegt. Nachdem das Bibliothek/*Bead*-Gemisch klar war, konnten 30 µl abgenommen und in das mit LNS2 vorgelegte Reaktionsgefäß überführt werden. Im Anschluss wurde die Bibliothek 1 Min. bei 1.000 rpm zentrifugiert. Die Bibliotheken lagen nun einzelsträngig vor und sollten eine Konzentration von 4 nM aufweisen.

Poolen von Bibliotheken

Bevor die Bibliotheken auf den MiSeq (Illumina) geladen wurden, wurden sie gepoolt und denaturiert. Beim Poolen werden alle Proben im gleichen Verhältnis zusammen gefügt. Zur Poolherstellung wurden pro Lauf 6 Bibliotheken (3 Proben je Pool A und Pool B) verwendet. Die Anzahl der Bibliotheken pro Lauf richtet sich nach der gewünschten Abdeckung, die je Probe erreicht werden sollte und nach der verwendeten Kartusche. Kartuschen sind die jeweiligen illuminaspezifischen Behältnisse, in denen alle notwendigen Reagenzien für die klonale Amplifikation und Sequenzierung enthalten sind. Beim Amplikon-basierten Verfahren wurde mit dem MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) gearbeitet, das auf 25-30 Mio. *reads* ausgelegt war.

Um den Pool herzustellen, wurde von jeder Bibliothek 5 µl abgenommen und in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) zusammen pipettiert.

Hybrid-capture-basierte Methode

Fragmentierung der gDNA

In diesem Schritt wurde die DNA durch einen Ultra-Sonifizierer (M220, Covaris) auf eine Länge von durchschnittlich 150 bp fragmentiert.

Zunächst wurde hierfür ein *Shearing*-Puffer in einem Falcon-Röhrchen (15 ml) hergestellt, der je nach DNA-Konzentration variierte.

DNA-Konzentration	<i>Shearing</i> -Puffer Ansatz
>20 ng/µl	10 µl EDTA+5 ml Resuspension Buffer (RSB)
10–20 ng/µl	20 µl EDTA+5 ml Resuspension Buffer (RSB)
<10 ng/µl	100 µl EDTA+5 ml Resuspension Buffer (RSB)

Es sollten 200 ng DNA je Probe eingesetzt werden, die zu einem Volumen von insgesamt 50 µl mit dem *Shearing*-Puffer aufgefüllt werden mussten.

Die 50 µl DNA-Proben wurden in ein microTube AFA Fiber Pre-Slit Snap-Cap (6 x 16 mm) (Covaris) überführt, für 1 Min. bei 280 g zentrifugiert, in den Ultra-Sonifizierer positioniert und die Fragmentierung (Arbeitsfaktor: 20%, Peak Leistung: 50 Watt, Zyklen pro Stoß: 200 Zyklen, Behandlungsdauer: 270 Sek.) gestartet.

Nachdem die Fragmentierung der DNA-Proben abgeschossen war, wurden die Proben für 1 Min. bei 280 g zentrifugiert und in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt.

Die ccfDNA der *Liquid Biopsy* Proben (Blutproben) lag bereits fragmentiert vor, weshalb sie ohne Fragmentierung direkt für die Aufreinigung eingesetzt werden konnte. Nach Ermittlung der Konzentration wurden sie entweder unverdünnt verwendet bzw. wenn die Konzentration über 4 ng/µl lag mit *Shearing*-Puffer auf 200 ng in 50 µl verdünnt. Bei den unverdünnten ccfDNA-Proben wurden in die 30 µl ccfDNA 20µl RSB pipettiert, sodass das finale Volumen 50 µl betrug.

Um Fragmente, die nicht im richtigen Längenbereich fragmentiert wurden zu entfernen, wurden die gDNA-Fragmente/ccfDNAs durch Sample Purification Beads (SPB) (*beads*) aufgereinigt. Man kann mit SPBs Fragmente nach ihrer Länge selektionieren. Hierfür musste die SPB-Lösung 30 Min. auf RT gebracht werden, bevor sie für die weitere Verwendung 1 Min. durch Vortexen gemischt wurde. Anschließend wurde 100 µl SPB zu den Proben gegeben, welche 5 Min. bei RT mit der fragmentierten gDNA/ccfDNA inkubierten. Danach wurden die Proben für 8 Min. auf einen Magnetständer gestellt, bis die Flüssigkeit klar wurde. Der Überstand konnte abgenommen und verworfen werden. Die *beads* mit der fragmentierten gDNA/ccfDNA wurden anschließend wie folgt gewaschen: Zunächst wurde 200 µl frisch angesetzter 80% EtOH zu der *bead*/DNA-Mischung pipettiert, im Magnetständer 30 Sek. inkubiert und der

Überstand im Anschluss verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Danach wurden die Proben für 1 Min. bei 280 g an zentrifugiert, für 30 Sek. auf den Magnetständer gestellt und mit einer 20 µl Pipette das restliche EtOH abgenommen. Die *beads* wurden anschließend im Magnetständer 5 Min. luftgetrocknet, bevor 62,5 µl RSB zum Eluieren der DNA/ccfDNA von den *beads* hinzugegeben wurde und die Proben von dem Magnetständer entfernt wurden. Nachdem das Proben/*bead*-Gemisch mit dem RSB resuspendiert wurde, folgte eine 2-minütige Inkubationszeit bei RT. Danach wurden die Proben für 5 Min. auf den Magnetständer positioniert, bis die Flüssigkeit klar wurde. Anschließend konnte 60 µl vom Überstand in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt werden.

End Repair und Selektionierung nach Größe

Um die Überhänge der DNA-Fragmente, die durch die Fragmentierung entstanden sind, in glatte Enden zu konvertieren, wurde eine 3'-5' Exonuklease verwendet, die die 3' Überhänge entfernt, und eine 5'-3' Polymerase benutzt, um die 5' Überhänge aufzufüllen. Beide Enzyme befanden sich im End Repair Mix (ERP3).

Hierfür wurden 40 µl ERP3 zur fragmentierten DNA/ccfDNA gegeben (MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml)), durch auf- und ab pipettieren gemischt und für 1 Min. bei 280 g an zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Min. bei 30°C im Heizblock inkubiert. Nach der Inkubationsphase mussten die Proben direkt auf Eis gestellt werden. Anschließend wurden die Fragmente der Länge nach mittels Sample Purification Beads (SPB) (*beads*) selektioniert. Dafür musste die SPB-Lösung 1 Min. durch Vortexen gemischt werden, bevor 90 µl SPB zu dem Reaktionsgemisch gegeben wurde, um die ungewünschten DNA-Fragmente an den *beads* zu binden. Danach wurden die Reaktionsgemische resuspendiert und 5 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 Min. auf einen Magnetständer gestellt, bis die Flüssigkeit klar wurde und 180 µl vom Überstand, der die DNA-Fragmente der richtigen Länge enthielt, in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt. Anschließend folgte ein Aufreinigungsschritt. Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 120 µl SPB hinzupipettiert wurden, 20 µl RSB zum Eluieren verwendet, und zuletzt 17,5 µl vom Überstand in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt wurden.

3'-Adenylierung

Bei dieser Reaktion wurde ein einzelnes ,A'-Nukleotid an die 3' Enden der glatten Enden der Fragmente angehängt, um bei der Adapter-Ligation zu verhindern, dass die Fragmente selbst miteinander ligieren. An den Adaptern befand sich am 3'-Ende ein ,T'-Nukleotid, wodurch ein komplementärer Überhang für die Adapter-Ligation vorhanden war, um Konkatemere zu reduzieren.

3. Methoden

Hierfür wurde 12,5 µl A Tailing Mix (ATL) zu den DNA-Fragmenten gegeben und durch resuspendieren gemischt. Im Anschluss daran wurde folgendes Adenylierungsprogramm im Thermozykler gestartet:

Schritt	Temperatur	Zeit
Adenylierung	37°C	30 Min.
Enzym-Inaktivierung	70°C	5 Min.
	4°C	5 Min.
	4°C	∞

Adapter-Ligation

Bei diesem Schritt wurden je Probe 2 Index-Adapter, durch die die Fragmente auf der Flusszelle während des Sequenzierungsverlaufs im MiSeq/NextSeq (Illumina) hybridisiert werden können, an die Enden der DNA-Fragmente ligiert.

Die Adapter Indexe befanden sich in einer DNA-Adapter-Platte (DAP), die zunächst für 1 Min. bei 280 g an zentrifugiert wurde. Anschließend wurden 2,5 µl Resuspension Buffer (RSB), 2,5 µl Ligation Mix 2 (LIG2) und je 2,5 µl DNA-Adapter zu den DNA-Fragmenten pipettiert, durch resuspendieren gemischt und 1 Min. bei 280 g an zentrifugiert.

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei 30°C für 10 Min. in einem zuvor vorgeheizten Heizblock inkubiert. Danach wurden die Proben direkt auf Eis gestellt, woraufhin 5 µl Stop Ligation Buffer (STL) zu jeder Probe hinzupipettiert, durch Resuspendieren gemischt und in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt wurde. Anschließend folgten zwei hintereinander folgende größenspezifische Aufreinigungsschritte mittels *beads*. Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass bei der ersten Aufreinigung 42,5 µl SPB hinzupipettiert wurden, 52,5 µl RSB zum Eluieren verwendet und zuletzt 50 µl vom Überstand in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt wurden. Für die zweite Aufreinigung wurden 50 µl SPB hinzupipettiert, 27,5 µl RSB zum Eluieren verwendet und 25 µl vom Überstand in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt.

Amplifikation der DNA-Fragmente

Bei diesem Vorgang wurden die mit Index-Adaptoren versehenen DNA-Fragmente amplifiziert, um die DNA-Fragmente, an denen zwei verschiedene Adapter gebunden haben, anzureichern. Hierfür wurde ein PCR Primer Cocktail (PPC) verwendet. Die Primer waren komplementär zu den Enden der Adapter. Sie hybridisierten an DNA-Fragmente, an deren Enden sich ein oder zwei Adapter befanden, wobei nur die Fragmente amplifiziert wurden, die zwei verschiedene Adapter trugen.

3. Methoden

Zunächst mussten die Proben auf Eis gestellt werden, bevor 5 µl PPC und 20 µl Enhanced PCR Mix (EPM) zu jeder Probe pipettiert wurden. Das Gemisch wurde anschließend durch Resuspendieren gemischt und durch folgendes PCR-Programm amplifiziert:

PCR Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	3 Min.	
Denaturierung	98°C	20 Sek.	} 12
Annealing	60°C	15 Sek.	
Elongation	72°C	30 Sek.	
	72°C	5 Min.	
	4°C	∞	

Anschließend folgte ein weiterer Aufreinigungsschritt durch *beads*, weshalb die PCR-Produkte in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt wurden. Es mussten zunächst die *beads* 1 Min. durch Vortexen gemischt werden, bevor 35 µl zu dem Reaktionsgemisch gegeben wurde. Danach wurden die Reaktionsgemische resuspendiert und 5 Min. bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben 5 Min. auf einen Magnetständer gestellt, bis die Flüssigkeit klar wurde. Danach konnten 82 µl vom Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt werden. Daraufhin folgte ein weiterer Aufreinigungsschritt. Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 82 µl SPB hinzupipettiert wurden, 17,5 µl RSB zum Eluieren verwendet und zuletzt 15 µl vom Überstand in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt wurden.

Überprüfung der Bibliothek

Die Methode entspricht der unter 3.2.1, Amplikon-basierten Methode, Überprüfung der Bibliothek, beschriebenen Quantitätskontrolle, mit dem Unterschied, dass die PCR-Produkte 250-350 bp lang sein sollten. Um Ungenauigkeiten zu vermeiden, wurde der Pool zweimal gemessen und der Mittelwert gebildet.

Hybridisierung der spezifischen Sonden

Bei diesem Schritt wurden zunächst die DNA-Bibliotheken mit den unterschiedlichen Indexen zu gleichen Teilen vereint (Pool). Da jede Probe mit zwei spezifischen Indexen versehen war, konnte gewährleistet werden, dass trotz des Poolens die detektierten Varianten den jeweiligen Proben nach der Sequenzierung zugeordnet werden konnten. Zur Poolherstellung wurden pro Lauf je nach Sequenzierungs-Kit und Illumina-NGS-Gerät 10-40 Bibliotheken zusammen

3. Methoden

gefügt. Anschließend wurden einzelsträngige spezifische biotinylierte Sonden an die Zielregionen der DNA hybridisiert.

Zunächst wurden die Bibliotheken gepoolt, wobei bei den FFPE-Proben je 500 ng und bei den ccfDNA-Proben je 600 ng eingesetzt wurden. Der Pool sollte eine Gesamtmenge von 6 µg nicht überschreiten und ein Endvolumen von 40 µl besitzen. Wies der Pool ein geringeres Volumen auf, wurde das Volumen auf 40 µl mit RSB (Resuspension Buffer) aufgefüllt. Überschreitet der Pool die 40 µl Endvolumen musste der Pool durch Amicon Ultra Zentrifugalfilter (0,5 ml, 30kDa, Merck) aufkonzentriert werden, bis das Volumen auf 40 µl absank. Für das Aufkonzentrieren musste der gesamte Pool in das Zentrifugalfiltrerröhrchen, das laut Herstellerangabe zusammen gesteckt wurde, überführt werden. Darauf folgte der erste Zentrifugationsschritt bei 14.000 g für 30 Min.. Beim zweiten Zentrifugationsschritt wurde der Filter umgedreht und in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) gesteckt. Es folgte eine 2 minütige Zentrifugation bei 1.000 g.

Anschließend wurde der Pool in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt und mit 50 µl Capture Target Buffer (CT3) und 10 µl Custom Oligo Pool (spezifische Sonden (Illumina-ID: 81390 (v1), 129960 (v2))) versehen. Darauf folgte die Hybridisierung im Thermozykler mit folgendem Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	10 Min.
Hybridisierung	94°C-58°C	je 1 Min., danach Verringerung der Temperatur um 2°C
	58°C	90 Min.

Aufreinigung mittels Streptavidin-beads

Streptavidin hat die Fähigkeit mit sehr hoher Affinität an Biotin zu binden. In diesem Schritt wurden Streptavidin-gekoppelte magnetische *beads* (SMB) verwendet, um die DNA-Fragmente, an denen die spezifischen biotinylierten Sonden gebunden haben, zu selektionieren. Zwei darauffolgende Waschschrte sorgten dafür, dass unspezifische Bindungen von den *beads* entfernt wurden.

Für die Waschschrte wurde zunächst ein Thermomixer (5436, Eppendorf) auf 50°C vorgeheizt und die *beads* und die Streptavidin Wash Solution (SWS) 30 Min. vor der Verwendung auf RT gebracht.

Nachdem die *beads* für 1 Min. durch Vortexen gemischt wurden, konnten 250 µl *beads* in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt werden. Direkt danach wurde das gesamte Volumen des Pools vom Thermozykler in das mit *beads* bestückte 1,5 ml Tube gegeben und durch Resuspendieren gemischt. Um die Bindung der *beads* an den Sonden zu ermöglichen,

3. Methoden

musste das Gemisch für 25 Min. bei RT inkubieren. Anschließend wurden die Reaktionsgemische für 3 Min. auf einen Magnetständer positioniert, bis die Lösung klar wurde. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und das Tube von dem Magnetständer entfernt. Um die DNA-Fragmente zu entfernen, die nicht spezifisch an die Sonden gebunden haben, wurde 200 µl SWS in das Tube pipettiert und durch Resuspendieren gemischt. Darauf folgte eine 30 Min. Inkubationszeit bei 50°C im Thermomixer. Nach der 30-minütigen Inkubationszeit wurde der Pool für maximal 2 Min. auf einen Magnetständer positioniert, bis die Lösung klar wurde. Danach musste der Überstand verworfen werden, das Tube von dem Magnetständer entfernt und der Waschschrift mit 200 µl SWS und 30 Min. bei 50°C wiederholt werden. Nachdem der Pool nach der 30-minütigen Inkubationszeit auf einen Magnetständer positioniert und nach maximal 2 Min. der klare Überstand abgenommen wurde, konnte aus dem zuvor angesetzten Mix (28,5 µl Enrichment Elution Buffer 1 (EE1) und 1,5 µl 2 N NaOH (HP3)) 23 µl zu dem Pool pipettiert werden. Nach einer 2-minütigen Inkubationszeit bei RT wurde die Lösung für 1 Min. abzentrifugiert und für 5 Min. auf einen Magnetständer positioniert, bis die Lösung klar wurde. Danach wurden 21 µl der klaren Lösung in ein neues MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt, 4 µl Elute Target Buffer 2 (ET2) hinzugegeben und die zweite Hybridisierung eingeleitet.

Rehybridisierung

Um die Spezifität zu erhöhen, wurden die Zielregionen der angereicherten DNA durch die spezifischen Sonden ein weiteres Mal gebunden.

Hierfür wurden zu dem Pool 15 µl RSB, 50 µl CT3 und 10 µl Custom Oligo Pool (spezifische Sonden (Illumina-ID: 81390 (v1), 129960 (v2))) hinzupipettiert und folgendes Hybridisierungs-Programm gestartet:

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	10 Min.
Hybridisierung	94°C-58°C	je 1 Min., danach Verringerung der Temperatur um 2°C
	58°C	16,5 Std.

Aufreinigung mittels Streptavidin-beads

Das Verfahren entspricht der ersten Aufreinigung mittels Streptavidin-*beads* unter 3.2.1 *hybrid-capture*-basierte Methode.

Aufreinigung der angereicherten Bibliothek

Mittels Sample Purification Beads (SPB) wurde der Pool vor der anschließenden Amplifikation durch einen gröbenselektionierenden Schritt aufgereinigt. Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 45 µl SPB hinzupipettiert wurden, 27,5 µl RSB zum Eluieren verwendet, und zuletzt 25 µl vom Überstand in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt wurden.

Amplifizierung der angereicherten Bibliothek und anschließende Aufreinigung

Um die Bibliotheken zu vervielfachen, fand noch eine Amplifikation statt.

Zunächst wurde der Enrichment Amp Mix (NEM) und der PCR Primer Cocktail (PPC) auf Eis aufgetaut.

Anschließend wurden 20 µl NEM und 5 µl PPC zu dem Pool gegeben, für 1 Min. bei 280 g anzentrifugiert und folgendes PCR-Programm gestartet:

PCR Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	30 Sek.	
Denaturierung	98°C	10 Sek.	} 14
Annealing	60°C	30 Sek.	
Elongation	72°C	30 Sek.	
	72°C	5 Min.	
	4°C	∞	

Nach der Amplifikation wurde der Pool durch Sample Purification Beads (SPB) nochmals aufgereinigt. Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 45 µl SPB hinzupipettiert wurden, 22 µl RSB zum Eluieren verwendet, und zuletzt 20 µl vom Überstand in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt wurden.

Überprüfung des angereicherten Bibliotheken-Pools

Die Methode entspricht der unter 3.2.1, Amplikon-basierten Methode, Überprüfung der Bibliothek, beschriebenen Quantitätskontrolle, mit dem Unterschied, dass das erwartete PCR-Produkt 250-350 bp lang sein sollte. Um Ungenauigkeiten zu vermeiden, wurde der Pool zweimal gemessen und der Mittelwert gebildet.

Anschließend wurde die Molarität durch folgende Formel anhand der gemessenen ng/μl Konzentration ausgerechnet:

$$\text{Konzentration (nM)} = \frac{(\text{Konzentration in } \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}})}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot \emptyset \text{ Bibliothekengröße (bp)}} \cdot 10^6$$

Ganz-Exom-Sequenzierung

Die Methode entspricht der in 3.2.1 beschriebenen *hybrid-capture*-basierten Methode mit dem Unterschied, dass vorgefertigte Coding Exome Oligos (TruSeq Exome Kit, Illumina) verwendet wurden und die letzte Amplifikation der angereicherten Bibliothek mit 7 Zyklen durchgeführt wurde. Für die erste Hybridisierung wurden 40 μl Bibliotheken-Pool und für die zweite Hybridisierung 25 μl Bibliotheken-Pool verwendet, zu denen je 10 μl Coding Exome Oligos hinzugegeben wurden. Pro Lauf konnten 4 Bibliotheken gepoolt werden (NextSeq, High-Output v2.5, Illumina). Außerdem wurde für die klonale Amplifikation und Sequenzierung der NextSeq 550 (NextSeq Reagent Kit v2.5, High-Output, 300 bp *paired end reads*) verwendet.

RNA-Sequenzierung

Es wurde mit dem TruSeq RNA Exome Kit (Illumina) gearbeitet. Die Methode basiert auf dem gleichen Prinzip wie die in 3.2.1 beschriebene *hybrid-capture*-basierte Methode, wobei bei diesem *hybrid-capture*-basierten Verfahren die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden muss. Anschließend wird sie in gleicher Weise an zum Exom komplementäre Sonden hybridisiert, aufgereinigt, sowie klonal amplifiziert und sequenziert (105).

Für den RNA-Seq wurde makrodissektiertes Gewebe verwendet. Hierfür wurden CD30-Färbungen der zu untersuchenden Patienten angefertigt (3.4.1). Anschließend wurde die Makrodissektion durchgeführt (3.3.1).

Synthese des ersten Stranges der cDNA

Zunächst wurde die RNA in Nuklease-freiem H₂O zu einem finalen Volumen von 8,5 μl, das 100 ng RNA beinhalten sollte, verdünnt. Zu diesem Volumen wurden 8,5 μl „Elute-Prime-Fragment-High-Mix“ hinzupipettiert, für 20 Sek. bei 1.600 rpm in einem Thermomixer gemischt und anschließend für 1 Min. bei 280 g zentrifugiert. Anschließend wurden Random Hexamer Primer als Startpunkte für die Reverse Transkriptase hinzu gegeben. Das Actinomycin D im First Strand Synthesis Act D Mix (FSA) verhinderte unspezifische DNA-abhängige Synthesen und förderte die RNA-abhängige Synthese, um eine Verbesserung der Strang-Spezifität zu erreichen.

Hierfür musste FSA für 5 Sek. bei 600 g zentrifugiert werden. Anschließend wurde ein Mix aus 9 μl FSA und 1 μl Super Script II (Reverse Transkriptase) in einem MicroAmp Fast PCR

Röhrchen (0,2 ml) hergestellt. Das gesamte Volumen der RNA wurde danach in MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt und 8 µl von dem FSA/Super Script II-Mix hinzupipettiert, 20 Sek. bei 1.600 rpm im Thermomixer gemischt und folgendes Inkubationsprogramm im Thermozykler gestartet:

Temperatur	Zeit
25°C	10 Min.
42°C	15 Min.
70°C	15 Min.
4°C	∞

Synthese des zweiten Stranges der cDNA

Die Strang-Spezifität bei der zweiten Strangsynthese der cDNA wurde durch das Ersetzen von dTTP durch dUTP mit dem Second Strand Marking Mix (SMM) ermöglicht.

Hierfür wurden 5 µl Resuspension Puffer (RSB) in die Reaktionsgefäße hinzupipettiert. Danach wurde SMM 5 Sek. bei 600 g anzentrifugiert und 20 µl in jedes MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) pipettiert. Anschließend mussten die Proben für 20 Sek. bei 1.600 rpm gemischt und anschließend 1 Min. bei 280 g anzentrifugiert werden. Daraufhin wurden die cDNA-Proben für 60 Min. bei 16°C in den Thermozykler gestellt.

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße aus dem Thermozykler entnommen und das gesamte Volumen in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt. Um die unerwünschten Produkte zu entfernen, wurde eine größenspezifische Aufreinigung mittels des Agancourt AMPure XP Reagents (*beads*) vorgenommen. Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 90 µl *beads* hinzupipettiert wurden, 17,5 µl RSB zum Eluieren verwendet und zuletzt 15 µl vom Überstand in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt wurden.

Adenylierung des 3' Endes

Um die cDNA vor gegenseitiger Ligation während der Adapter-Ligation zu schützen, wurde ein ,A'-Nukleotid an das 3' Ende des glatten Fragmentes gehängt. Ein korrespondierendes ,T'-Nukleotid am 3' Ende des Adapters lieferte den komplementären Überhang für die Ligation der Adapter an die Fragmente. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Entstehung von Konkatemeren verringert wurde.

Zunächst musste der A-Tailing Mix (ATL) für 5 Sek. bei 600 g zentrifugiert werden. Anschließend wurden 2,5 µl RSB und 12,5 µl ATL zu den Proben gegeben, 2 Min. bei 1.800 rpm im Thermomixer gemischt und 1 Min. bei 280 g anzentrifugiert, bevor sie 30 Min. bei 37°C und danach 5 Min. bei 70°C im Heizblock inkubiert wurden.

Anschließend mussten die Proben auf Eis gestellt werden, um die Inkubation zu stoppen.

Adapter-Ligation

Im Gegensatz zum Amplikon- und *hybrid-capture*-basierten Verfahren wurden bei dieser Methode Einzelindex-Adapter verwendet. Die Index-Adapter wurden an die Enden der doppelsträngigen cDNA-Fragmente ligiert, um die Fragmente an die Flusszelle, vor der klonalen Amplifikation und Sequenzierung, zu binden.

Zunächst mussten die RNA Adapter auf Eis aufgetaut und 5 Sek. bei 600 g anzentrifugiert werden. Anschließend wurde 2,5 µl RSB, 2,5 µl Ligation Mix (LIG) und 2,5 µl RNA Index-Adapter zu jeder Probe pipettiert. Um die detektierten Varianten nach der Sequenzierung den jeweiligen Proben zuordnen zu können, wurden die Proben mit unterschiedlichen Index-Adaptoren versehen. Nach einer 2-minütigen Vermischung bei 1.800 rpm und einer 1-minütigen Zentrifugation bei 280 g wurden die Proben für 10 Min. bei 30°C in einen Heizblock gestellt, um die Ligation zu ermöglichen. Anschließend mussten die Proben direkt auf Eis gestellt und 5 µl Stop Ligation Buffer (STL) hinzupipettiert werden, um die Ligation zu stoppen. Zuletzt wurden die Proben für 2 Min. bei 2.800 rpm gemischt und 1 Min. bei 280 g anzentrifugiert.

Aufreinigung der ligierten Fragmente

Anschließend wurde eine größenspezifische Aufreinigung mit dem Agencourt AMPure XP Reagent (*beads*) vorgenommen. Die Methode entspricht der unter 3.2.1 *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 42 µl *beads* hinzupipettiert wurden, 52,5 µl RSB zum Eluieren verwendet und zuletzt 50 µl vom Überstand in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube (2 ml) überführt wurden. Anschließend wurde der Aufreinigungsschritt noch ein weiteres Mal wiederholt. Hierfür wurden 50 µl *beads* zu den ligierten Fragmenten pipettiert, 22 µl RSB zum Eluieren verwendet und 20 µl vom Überstand in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt.

Amplifikation der cDNA-Fragmente

Bei diesem Schritt wurden die cDNA-Fragmente selektioniert, die Adapter-Moleküle an beiden Enden beinhalten, da nur solche amplifiziert werden konnten. Hierfür wurde ein PCR Primer Cocktail (PPC) verwendet, der sich an die Enden der Adapter anlagert. Da die hinzugegebene Polymerase (PCR Master Mix (PMM)) keine dUTPs erkennt, ging der zweite Strang während der Amplifikation verloren. Es entstanden doppelsträngige finale cDNA-Bibliotheken.

Zu den Proben wurden 25 µl PCR Master Mix (PMM) und 5 µl PPC pipettiert, 20 Sek. bei 1.600 rpm gemischt und 1 Min. bei 280 g anzentrifugiert, bevor folgendes Thermozykler-Programm gestartet wurde:

3. Methoden

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	30 Sek.	
Denaturierung	98°C	10 Sek.	} 15
Annealing	60°C	30 Sek.	
Elongation	72°C	30 Sek.	
	72°C	5 Min.	
	4°C	∞	

Aufreinigung der cDNA-Bibliotheken

Die Reaktionsgefäße wurden anschließend aus dem Thermozykler entnommen und das gesamte Volumen in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt. Um die unspezifischen Reaktionsprodukte zu entfernen, wurde eine größenspezifische Aufreinigung durch das Agencourt AMPure XP Reagent (*beads*) vorgenommen. Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 50 µl *beads* hinzupipettiert wurden, 17,5 µl RSB zum Eluieren verwendet und zuletzt 15 µl vom Überstand in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube (2 ml) überführt wurden.

Überprüfung der Bibliothek

Das Vorgehen entspricht der unter 3.2.1 Amplikon-basierten Methode, Überprüfung der Bibliothek, beschriebenen Quantitätskontrolle, mit dem Unterschied, dass das erwartete PCR-Produkt 250-300 bp lang sein sollte.

Hybridisierung

Die Methode entspricht der unter 3.2.1 *hybrid-capture*-basierten Methode, Hybridisierung der spezifischen Sonden und Aufreinigung mittels Streptavidin-*beads*, mit dem Unterschied, dass insgesamt 5 Bibliotheken gepoolt, je Probe 200 ng cDNA eingesetzt und als Endvolumen 45 µl, sowie 5 µl Coding Exome Oligos (TruSeq Exome Kit, Illumina) verwendet wurden. Bei der zweiten Hybridisierung wurde zudem die Inkubationszeit bei 58°C auf 90 Min. gekürzt. Bei den zwei hintereinander folgenden Aufreinigungsschritten mit Streptavidin-*beads* wurden die zwei Inkubationszeiten bei 50°C im Thermomixer für 20 Min. eingehalten. Es wurde anstelle von SWS, Enrichment Wash Solution (EWS) verwendet.

Aufreinigung der Bibliothek

Durch Sample Purification *beads* wurde der Pool vor der anschließenden Amplifikation aufgereinigt. Die Methode entspricht der unter 3.2.1 *hybrid-capture*-basierten Methode,

Fragmentierung der gDNA beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 45 μl *beads* hinzupipettiert wurden, 27,5 μl RSB zum Eluieren verwendet und zuletzt 25 μl vom Überstand in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt wurden.

Amplifizierung der angereicherten Bibliothek und anschließende Aufreinigung

Das Verfahren entspricht dem unter 3.2.1 *hybrid-capture*-basierten Methode, Amplifizierung der angereicherten Bibliothek und anschließende Aufreinigung, aufgeführten Verfahren, mit dem Unterschied, dass für 10 Zyklen amplifiziert wurde und die Temperatur zuletzt von 4°C auf 10°C erhöht wurde. Die anschließende Aufreinigung wurde mit 90 μl *beads* vorgenommen. Zum Eluieren wurden 32 μl RSB verwendet und zuletzt 30 μl vom Überstand in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt.

Überprüfung des Bibliotheken-Pools

Die Durchführung entspricht dem unter 3.2.1 *hybrid-capture*-basierten Methode, Überprüfung des Bibliotheken Pools, aufgeführten Verfahren.

3.2.2 Klonale Amplifikation und Sequenzierung

Vorbereitung der Bibliotheken für die klonale Amplifikation und Sequenzierung

MiSeq

Amplikon-basierte Methode

Nachdem die Proben auf 4 nM gebracht und gepoolt wurden, wurde der Pool auf 10 pM verdünnt. Hierfür wurde zunächst 798 μl Hybridization Buffer (HT1) in einem Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) vorgelegt. Anschließend wurden 2 μl des Bibliotheken-Pools und 2 μl PhiX (12,5 pM) zu dem vorgelegten HT1 pipettiert. PhiX (Illumina) ist eine adapter-ligierte Bibliothek, die als interne Laufkontrolle diente. Die Bibliothek ist abgeleitet vom kleinen, gut charakterisierten PhiX-Genom, einem Bakteriophagen, und fungiert als Qualitätskontrolle für die Clustergenerierung, Sequenzierung und das *Alignment*. Danach wurde der Bibliotheken-Pool für 2 Min. bei 96°C und 5 Min. im Eisbad denaturiert.

Hybrid-capture Verfahren (tNGS)

Nachdem die Molarität des Pools bestimmt wurde, musste der Bibliotheken-Pool auf 4 nM mit H₂O verdünnt werden. Anschließend folgte die Denaturierung. Hierfür wurden in einem Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) 5 μl des Pools (4 nM) zu 5 μl 0,2 M NaOH gegeben. Die 0,2 M NaOH-Lösung musste zuvor frisch angesetzt werden. Nach einer 5-minütigen

Inkubationsphase wurde der Pool für 1 Min. bei 280 g an zentrifugiert. Anschließend wurde der Pool auf 10 pM verdünnt. Die Durchführung entspricht dem unter 3.2.2 Vorbereitung der finalen Bibliothek für die klonale Amplifikation und Sequenzierung, Amplikon-basierte Methode, aufgeführten Verfahren, mit dem Unterschied, das der Pool zunächst auf 20 pM durch 990 µl HT1 verdünnt wurde und anschließend 300 µl vom Pool (20 pM) zu 300 µl HT1 pipettiert wurden, um den Pool auf 10 pM zu verdünnen. Zudem wurden 6 µl PhiX (12,5 pM) zu dem finalen Pool hinzugegeben.

NextSeq

Hybrid-capture Verfahren (tNGS, WES, RNA Seq)

Die Methode entspricht der unter 3.2.2 Vorbereitung der finalen Bibliothek für die klonale Amplifikation und Sequenzierung, *hybrid-capture* Verfahren (tNGS), beschriebenen Durchführung mit dem Unterschied, dass bei vereinzelt Proben des tNGS Verfahrens, beim WES und beim RNA Seq mit dem NextSeq550 gearbeitet wurde und deshalb der Pool auf 1,2 pM (Mid Output v2.5) bzw. 1,5 pM (High Output v2.5) verdünnt werden musste. Nachdem der Pool auf 20 pM mit HT1 verdünnt wurde, sollten 77,6 µl des Pools (20 pM) in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt und 1.222,4 µl HT1 hinzu gegeben werden, um den Pool auf 1,2 pM zu verdünnen. Danach wurden 1,287 ml des Pools (1,2 pM) in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) vorgelegt und 13 µl PhiX (1,2 pM) hinzugegeben. Zuletzt wurde der finale Bibliotheken-Pool für 1 Min. bei 280 g zentrifugiert. Nach dem gleichen Prinzip wurde eine Verdünnung von 1,5 pM hergestellt, wenn mit dem High Output v2.5 Kit gearbeitet wurde.

MiSeq/NextSeq Vorbereitungen

MiSeq

Vor jedem Lauf wurde ein Waschschrift (*Maintenance Wash*, siehe Herstellerangabe) vorgenommen. Im Anschluss daran konnte ein *Sample Sheet* (Amplikon-basiert: Library Prep Kit: TruSeq Amplicon, 2 Index reads, Read Type: Paired End, Cycles read 1: 151, Cycles read 2: 151, Index: I7/I5, Manifest: CATA/CATB, Genome Folder: Homo_sapiens\ UCSC\ hg19\ Sequence\ WholeGenomeFasta; *hybrid-capture*-basiert: Library Prep Kit: Enrichment, 2 Index reads, Read Type: Paired End, Cycles read 1: 151, Cycles read 2: 151 Index: I7/I5, Manifest: Lymphompanel, Genome Folder: Homo_sapiens\ UCSC\ hg19\ Sequence\ WholeGenomeFasta) erstellt werden, das beim Starten des Laufs ausgewählt wurde.

NextSeq

Vor dem Lauf musste im BaseSpace Sequence Hub durch die Prep-Plattform ein *Sample Sheet* kreiert werden (3.2.2: MiSeq Vorbereitungen), welches vor dem Starten des Gerätes angewählt

werden konnte. Bei der RNA-Sequenzierung wurde das *Sample Sheet* folgendermaßen angepasst: Library Prep Kit: TruSeq LT, 1 Index *read*, *Read Type*: Paired End, *Cycles Read 1*: 76, *Cycles Read 2*: 76, *Index*: AR, *Manifest*: ExomeTargetsManifest, *Genome Folder*: Homo_sapiens\UCSC\hg19\Sequence\WholeGenomeFasta.

Beladen der Kartusche und Vorbereitung der Flusszelle

Für die Sequenzierung wurde beim MiSeq mit dem Reagent Kit v3 gearbeitet (25-30 Mio. *reads*, 2x151 Zyklen (300 bp *paired end reads*)). Wenn mit dem NextSeq550 gearbeitet wurde, wurde das Reagent Kit Mid Output v2.5 (zirka 130 Mio. *reads*, 2x151 Zyklen (300 bp *paired end reads* bzw. 75 bp *paired end reads* für den RNA Seq)) oder das Reagent Kit High Output v2.5 (zirka 400 Mio. *reads* 2x151 Zyklen (300 bp *paired end reads*)) verwendet.

Um die Kartusche beladen zu können, musste sie zunächst 120 Min. (MiSeq v3) bzw. 60 Min. (NextSeq, Mid/High Output v2.5) vor der Sequenzierung im Wasserbad bei etwa 20°C aufgetaut werden. Im Wasserbad wird wegen der größeren Wärmeleitfähigkeit von Wasser ein schnellerer Auftauvorgang ermöglicht als an der Luft. Vor der Verwendung wurde die Kartusche 10mal gedreht, um die Reagenzien in der Kartusche zu vermischen. Anschließend konnte 600 µl (MiSeq, v3) bzw. 1,3 ml (NextSeq, Mid/High Output v2.5) des finalen Bibliotheken-Pools in das dafür vorgesehene Well der Kartusche pipettiert werden.

Anschließend musste die Flusszelle vorbereitet werden, indem sie mit aq. dest. gespült und mit einem fussselfreien Tuch gesäubert wurde. Dann wurde das Glas der Flusszelle mit einem in 70% EtOH getränkten Tuch gereinigt und mit einem fussselfreien Tuch trocken gewischt. Anschließend wurde die Flusszelle laut Vorgabe in den MiSeq/NextSeq gelegt, der Abfallbehälter gereinigt und der Inkubationspuffer auf die vorgesehene Position gestellt. Zuletzt wurde die Kartusche mit dem Bibliotheken-Pool in den MiSeq/NextSeq550 gestellt, das jeweilige *Sample Sheet* ausgewählt und die Amplifikation und Sequenzierung durch Starten des Gerätes eingeleitet.

Klonale Amplifikation

Die klonale Amplifikation der DNA-Bibliothek findet voll automatisiert im MiSeq statt. Sie basiert auf dem Prinzip der Brücken-Amplifikation. Diese spezielle PCR erfolgt auf einer sogenannten Flusszelle. Die Flusszelle ist eine Art Objektträger, auf der die eigentliche Sequenzierung stattfindet. Die DNA-Fragmente werden hierfür durch die zuvor ligierten Adapter an die Flusszelle gebunden, woraufhin die Brücken-Amplifikation eingeleitet wird, bei der die auf der Flusszelle gebundenen Oligos als Primer fungieren. Für jedes DNA-Fragment wird durch diese Art der Amplifikation ein Cluster klonaler DNA-Fragmente generiert.

Sequenzierungsreaktion

MiSeq

Die angewandte Art der Sequenzierung wird „Sequenzierung durch Synthese“ (SBS) genannt, basierend auf reversiblen Terminatoren (*Cyclic Reversible Termination*). Alle vier Nukleotide werden hierbei mit einer Terminator-Gruppe modifiziert und mit unterschiedlichen Farbstoffen (Fluorophore) versehen. Während eines Reaktionszykluses werden der Polymerase gleichzeitig alle vier Nukleotide zur Strangsynthese angeboten. Nachdem ein komplementäres Nukleotid eingebaut wurde, ist eine Strangverlängerung durch die blockierende Wirkung der Terminator-Gruppe nicht mehr möglich.

Das Fluoreszenz-Signal der unterschiedlichen Farbstoffe jedes Nukleotids kann mittels „Imaging“ durch das 4-Kanal-System des MiSeqs detektiert werden. Hierbei wird die Flusszelle gescannt und ausgelesen. Beim 4-Kanal-System werden je Zyklus 4 Bilder generiert, die jeweils für einen anderen Wellenlängenbereich stehen. So kann A (gelb), T (grün), C (rot) und G (blau) je nach Fluoreszenz-Signal unterschiedlich abgebildet werden. Anschließend werden die Fluorophore und die Terminator-Gruppe enzymatisch abgespalten, woraufhin ein weiteres Nukleotid eingebaut werden kann und ein neuer Zyklus beginnt. Nach diesem Prinzip wird Base für Base die Sequenz eines jeden Clusters auf der Flusszelle gleichzeitig generiert. Spezifisch für diese Methode ist die sogenannte *paired-end*-Sequenzierung. Diese Art der Sequenzierung basiert auf einer enzymatischen Reaktion, bei der die zu sequenzierenden DNA-Fragmente an beiden Enden mit unterschiedlichen Primern versehen sind, sodass von beiden Seiten nach Drehen des Klons nach Erreichen der voreingestellten Leseweite sequenziert wird, die zwischen 100-250 bp liegt. Durch diese Art der Sequenzierung kann eine höhere Genauigkeit generiert werden (135).

Im Anschluss daran werden computergestützt die einzelnen Basen-Sequenzen (*reads*) zusammengesetzt und mit dem Referenzgenom (hg19) abgeglichen. Durch die probenspezifischen Indexe können die detektierten Sequenzen den jeweiligen Proben zugeordnet werden.

NextSeq

Die klonale Amplifikation und das Prinzip der Sequenzierung (SBS) sind synonym zum MiSeq mit dem Unterschied, dass für die Detektion der Nukleotide mit einem 2-Kanal-System gearbeitet wird. Das 2-Kanal-System basiert auf der Anfertigung zweier Bilder je Zyklus. Jedes der Bilder steht für einen anderen Wellenlängen-Bereich (rot und grün). T wird grün und C rot dargestellt. Da A ein Lichtsignal im gelben Wellenlängenbereich emittiert, wird es in beiden Bildern (rot und grün) dargestellt. G emittiert im blauen Wellenlängenbereich, welcher von dem 2-Kanal-System nicht abgedeckt wird, weshalb Cluster ohne detektiertes Lichtsignal als G gewertet werden.

3.2.3 Auswertung der NGS-Daten

Die Auswertung der NGS-Daten wurde initial mit der im Gerät selbst vorliegenden Software *MiSeq Reporter* (Illumina) und durch die Plattform *BaseSpace Sequence Hub* (Illumina) vorgenommen. BaseSpace ist eine *cloud*-basierte Plattform und dient der Archivierung und Auswertung der NGS-Daten mittels verschiedener Softwares.

Zunächst mussten die Daten durch den *MiSeq-Reporter* „*demultiplexed*“ werden. Die Demultiplexierung trennt Daten von gepoolten Proben auf Basis der unterschiedlichen Indexsequenzen, die während der Bibliothek-Herstellung spezifisch für jede Probe an die DNA-Fragmente ligiert wurden. Anschließend wurden Dateien im FASTQ-Dateiformat generiert, die als Format für die Darstellung und weitere Auswertung von Sequenzen fungieren. Sie enthielten sowohl die Information der Read-Anzahl, als auch die Qualitäts-Scores und stellten den Ausgangspunkt für alle weiteren Analysen dar. Die FASTQ-Dateien wurden auf die Plattform *BaseSpace Sequence Hub* hochgeladen und im Anschluss bei dem Amplikon-basierten Verfahren durch die Programme *Amplicon DS v1.2* (Illumina) und *TruSeq Amplicon* (Illumina) mittels des *Smith Waterman Algorithmuses* mit einer Referenz, der genomischen Sequenz für *Homo Sapiens* (hg19) verglichen. Bei dem *hybrid-capture*-basierten Verfahren wurde mit dem *Enrichment v3.0* Programm (Illumina) gearbeitet, bei dem der Abgleich mit hg19 mit Hilfe des *Isaac Aligners* erfolgte. Durch Vergleich der spezifischen Zielregionen, die durch das Manifest festgelegt wurden, wurden Unterschiede zu hg19 in der Basenfolge detektiert und in Form einer Exceltabelle (*Variant Caller Files*) und Dateien im BAM (*Binary Alignment Map*)-Format bereitgestellt. Das Manifest war eine Datei im Textformat, die alle zu detektierenden Zielregionen beinhaltete, auf die das Programm zurückgreifen konnte, um sich auf einen bestimmten Bereich bei der Analyse zu beschränken. Zudem konnten durch den *Isaac Aligner* PCR-Duplikate entfernt werden. Anschließend konnten durch das im *Enrichment v3.0* Programm integrierte *Picard Metrics* Programm Varianten in AT/GC-reiche Regionen identifiziert und entfernt werden. Die Generierung der *Variant Caller Files* (vcf) erfolgte bei dem Amplikon-basierten und *hybrid-capture*-basierten Verfahren mit Hilfe des *Illumina Somatic Variant Callers* (*Pisces*). Die Resultate wurden in einer Exceltabelle zur Verfügung gestellt. Bei dem *hybrid-capture*-basierten Verfahren konnten zudem mit dem *Enrichment v3.0* Programm durch das integrierte Programm *Manta* SVs detektiert und in Form einer Exceltabelle bereitgestellt werden. Für die Zusammenfassung der Daten wurde das Programm *PUMA* (*Pluggable Universal Metrics Analyzer*) *Metrics* und für die Annotierung der Gene, in denen die Varianten zu finden waren, das Programm *Illumina Annotation Engine* (IAE) verwendet.

Auswertung der Amplikon-basierten Daten

Mit dem Amplikon-basierten Verfahren wurden Ganzschnitt-DNAs aus FFPE-Gewebe von HL-Patienten untersucht. Da niederfrequente Varianten, aufgrund des geringen Tumoranteils (1-

5%), bei den HL erwartet wurden und durch die Formalinfixierung des FFPE-Gewebes falsch positive Varianten entstehen können, musste eine hohe Sensitivität gewährleistet werden. Für die Auswertung wurden daher nur Proben verwendet, die eine durchschnittliche Target-Abdeckung von mind. 4.500x aufwiesen. Die Abdeckung zeigt an, wie oft die Probe sequenziert wurde, indem die durchschnittliche Anzahl der Basen für jede Position der Referenz gemessen wird. Da bei dem Programm *TruSeq Amplicon* als Standardeinstellung nur Varianten über einer 5%igen VAF detektiert werden, musste vor dem Starten des Programmes dieser Grenzwert auf 1 gesetzt werden, um die erwarteten niederfrequenten Varianten detektieren zu können.

Varianten-Filterkriterien

SNV und Indel Analyse

Um SNVs und Indels zu annotieren und zu filtern, wurde mit dem Programm *Variant Studio Software 2.2* (Illumina) (VS) gearbeitet. Hierfür mussten die vcf-Dateien in die VS-Software geladen und gefiltert werden.

Zunächst wurden die detektierten Varianten mit unterschiedlichen Datenbanken (*Variant Effect Predictor (VEP)*, *1000 Genomes Project*, *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC)*, *ClinVar*, *National Center for Biotechnology (NCBI)*, *National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)*, *Exome Variant Server (UCSC)*, *Exome Aggregation Consortium, (Broad Institute)*) verglichen und annotiert. Je nach Fragestellung konnten im Anschluss folgende Filter-Einstellungen gewählt werden: Der Qualitäts-Score, der durch das *Variant Calling* mit *Pisces* generiert wurde, musste >30 sein. Der Qualitäts-Score nimmt Bezug auf den sogenannten *Phred Quality Score* und das *Poisson model*, und gibt die geschätzte Wahrscheinlichkeit eines fehlerhaften Baseneinbaus an. Ein hoher Wert impliziert eine hohe Glaubwürdigkeit der Variante und eine erniedrigte Fehlerrate. Bei dem Q30-Wert, der standardmäßig als Untergrenze verwendet wird, liegt die Fehlerwahrscheinlichkeit bei 0,001 (1 in 1.000 Sequenzen). Zur Variantendetektion von somatischen Varianten ist eine Lesetiefe von mindestens 100 Sequenzen notwendig, weshalb zunächst eine Lesetiefe von ≥ 100 Sequenzen eingestellt wurde (136,137). Außerdem wurden die stillen Varianten und Varianten in nicht codierenden Bereichen durch anwählen von *Consequences* herausgefiltert, da sie nicht interpretierbar waren. Im Anschluss wurden die gefilterten Varianten in einer Exceltabelle dargestellt und die Varianten, die in der ExAC Datenbank (*Exome Aggregation Consortium, Broad Institute*) mit einer Populations-Allelfrequenz in der europäischen Bevölkerung von >0,1% vorkamen als SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), sogenannte Einzelnukleotid-Polymorphismen, von der weiteren Beurteilung ausgeschlossen.

Zur Überprüfung der NGS-Varianten wurde das Programm *Integrative Genomics Viewer (IGV, Broad Institute)* herangezogen. Mit diesem Programm können die detektierten Sequenzen visualisiert werden. Durch dieses Programm wird ersichtlich, wie oft, welcher Strang

sequenziert wurde. Außerdem zeigt es die Abdeckung der jeweiligen Bereiche an, sowie zweifelhaft annotierte Varianten (blasse Sequenzen) (138). Varianten, die 1) einen *Strand Bias* (Abweichung $\pm 50\%$) hatten, 2) am Rande von nur einem PCR-Produkt im überlappenden Bereich mehrerer PCR-Produkte mehrfach zu finden waren (innerhalb der ersten oder letzten 10 Nukleotide) bzw. 3) am Rande eines Homopolymers (ab 7 gleichen Nukleotiden) lagen oder 4) durch eine nicht eindeutige Annotation im IGV durch die Darstellung blasser Sequenzen gekennzeichnet waren, wurden als potenzielle Fehler aus der weiteren Beurteilung herausgenommen. Unter „*Strand Bias*“ versteht man die Tatsache, dass in manchen Fällen die Anzahl der Reads aus dem positiven Strang und dem negativen Strang signifikant unterschiedlich sind. Ein „*Strand Bias*“ kann durch Sequenzierfehler, Fehler beim Mappen oder Fehler während der Herstellung der Bibliothek verursacht werden (135,139). Zuletzt konnten Panel-typische Fehler, die auf sequenzabhängige Taq-Fehler oder Annotationsproblemen beruhen, durch Vergleich mehrerer Patienten im IGV herausgefiltert werden. Kam eine Variante in mehr als zwei Patienten vor, war keine bekannte HotSpot-Mutation und wurde auch in gesunden Probanden detektiert, wurde sie von der weiteren Bewertung ausgeschlossen.

Da Varianten im niederfrequenten Bereich erwartet wurden und die Taq Polymerase Fehlerrate bei 8×10^{-6} Fehler pro Basenpaar liegt (107), sowie weitere technische Fehler, wie bspw. bei dem Varianten Calling durch das Programm *Pisces*, zu falsch-positiven Varianten führen können, musste eine Methode angewandt werden, die die Sensitivität weiter erhöht. Dies sollte mit dem sogenannten *dual-strand*-Verfahren realisiert werden.

Hierfür wurden die zu untersuchenden Bereiche in zwei unterschiedlichen Reaktionsansätzen mit zwei verschiedenen Primerpools abgedeckt, wobei durch den ersten Reaktionsansatz der eine Strang und durch den zweiten Reaktionsansatz der zweite Strang abgedeckt wurde. Im Anschluss wurden beide Pools getrennt voneinander analysiert. Daraufhin wurden die detektierten Varianten je Pool in Exceltabellen dargestellt, die beiden Exceltabellen je Patient miteinander verglichen und nur solche Varianten als real angesehen, die in beiden Exceltabellen vorkamen. Zuletzt wurden zur Kontrolle nochmals die bam-files der beiden Pools des jeweiligen Patienten in den IGV geladen und die Varianten, die in beiden Exceltabellen vorkamen inspiziert.

Auswertung der *hybrid-capture*-basierten Daten

Mit dem *hybrid-capture*-basierten Verfahren wurden Ganzschnitt-DNAs und ccfDNAs von Non-HL-Patienten und pHL-Patienten untersucht.

Für die Auswertung der *hybrid-capture*-basierten Daten wurden unterschiedliche Qualitätsparameter für die Bewertung der Sequenzierdaten der Non-HL und HL herangezogen: Die durchschnittliche Target-Abdeckung, die Uniformität der Abdeckung, die Anreicherung

und die 100x-Abdeckung. Die Uniformität gibt an, welcher Anteil der Targets mit mindestens 20% der durchschnittlichen Abdeckung abgedeckt wurde und ist somit ein Maß für die Gleichmäßigkeit der Sequenzierung. Die Anreicherung gibt den Anteil der erzeugten *reads* an, die mit den zu detektierenden Zielregionen, die im Manifest aufgeführt sind, abgedeckt wurden und der Wert der 100x-Abdeckung gibt den prozentualen Anteil der Targets wieder, die eine Abdeckung über 100x haben.

Da bei den Non-HL-Patienten eine höhere VAF erwartet wurde, konnten die Parameter weiter gefasst werden. Die durchschnittliche Target-Abdeckung sollte bei den Non-HL mind. 100x betragen. Bei den HL, bei denen der Tumoranteil bei 1-5% im Gewebe liegt, werden niederfrequente Varianten erwartet, weshalb die durchschnittliche Target-Abdeckung mind. 200x sein sollte. Die Uniformität der Abdeckung sollte bei den Non-HL mind. 80% und bei den HL mind. 90% betragen. Die Anreicherung sollte bei den Non-HL bei mind. 35% und bei den HL bei mind. 55% und die 100x-Abdeckung bei den Non-HL bei mind. 40% und bei den HL bei mind. 90% liegen. Nur Proben, die die Parameter erfüllten, wurden für diese Arbeit verwendet.

Da bei dem Programm *Enrichment v3.0* als Standardeinstellung nur Varianten über einer 5%igen VAF detektiert wurden, musste vor dem Starten des Programmes bei den Untersuchungen der pHL diese Einstellung deaktiviert werden, um die erwarteten niederfrequenten Varianten detektieren zu können. Durch diese Änderung wurden auch andere Qualitäts-Scores ausgeschaltet, sodass viele Fehler angezeigt wurden, die durch manuelle Filterung beseitigt werden mussten.

Varianten-Filterkriterien

SNV und Indel Analyse

Das Vorgehen durch die *VS-Software* und die Filtereinstellungen sind synonym zum Amplikon-basierten-Verfahren (3.2.3: Auswertung der Amplikon-basierten Daten).

Anschließend wurden die gefilterten Varianten in einer Exceltabelle dargestellt. Da durch das Ausschalten der VAF-Filterung bei den pHL weitere Filterungen deaktiviert wurden, mussten weitere Fehler manuell entfernt werden. Diese wurden mit „SB“ und „R5x9“ gekennzeichnet.

„SB“ kennzeichnet die Varianten, die einen zu hohen *Strand Bias* haben oder zeigt an, dass nur ein Strang abgedeckt wurde. Unter „R5x9“ sind die Varianten angegeben, die aus maximal 5 Nukleotiden bestehen und in repetitiven Sequenzen liegen, die sich mindestens 9mal im Referenzgenom wiederholen müssen. Da diese Bereiche anfällig für PCR-Artefakte sind, wurden diese Bereiche aussortiert.

Varianten, die den spezifischen Varianten Calling-Qualitätsfilter des *Pisces Varianten Callers* mit „PASS“ oder „LowFrequency“ passierten, konnten dagegen für die weitere Analyse verwendet werden. „PASS“ bedeutet, dass die Variante den *Varianten Calling-Qualitätsfilter*

des *Pisces Varianten Callers* passieren konnte und „LowFrequency“ bedeutet, dass eine VAF von <1% vorliegt.

Zur Überprüfung der NGS-Varianten wurde das Programm IGV herangezogen. Die festgelegten Filterkriterien entsprechen denen unter 3.2.3 Auswertung der Amplikon-basierten Daten, Varianten-Filterkriterien, SNV und Indel Analyse, mit dem Unterschied, dass das 2. Filterkriterium bei dem *hybrid-capture*-basierten Verfahren nicht relevant war, da durch die zufällige Fragmentierung bei der Ultraschallbehandlung mit dem Ultra-Sonifizierer unterschiedlich lange Fragmente entstehen und durch die anschließende Kollapsierung nur *unique reads* bei der Analyse berücksichtigt wurden.

SV-Analyse

Um strukturelle Varianten, wie TL nachzuweisen, wurde die *Manta*-Analyse des *Enrichment v3.0*-Programmes verwendet. Die Daten wurden als SV.vcf.gz-Dateien zur Verfügung gestellt. Das Programm verglich die spezifischen Zielregionen mit einer Referenz (hg19) und erkannte *reads*, die nur partiell passten. Der Teil, der in diesem Bereich nicht passend zu hg19 war, wurde abgeschnitten und als eigene Sequenz ein weiteres Mal mit hg19 abgeglichen. Anschließend wurden die detektierten Bereiche in einer Exceltabelle dargestellt. Die Spalte ID gab Informationen darüber, ob es sich bei der angegebenen Variante um eine potenzielle TL handelte, gekennzeichnet mit BND (*Translocation Breakend*).

Anschließend konnten die potenziellen TL mit dem IGV visualisiert und überprüft werden.

Da das Programm in der Detektion von TL limitiert ist, wurden die JH-Loci, sowie die *BCL11-2/-6* und *MYC*-Gene zusätzlich bei den Non-HL-Patienten per Auge im IGV inspiziert. Es wurden speziell diese Gene zur Inspektion ausgewählt, da in Non-HL viele bekannte Bruchpunkte dieser Gene bekannt sind. Wurden potenziell translozierte Gen-Abschnitte durch visuelle Inspektion gefunden, konnten sie mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) von NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) mit unterschiedlichen Datenbanken verglichen werden.

VDJ-Rekombinations-Analyse

Um das Differenzierungsstadium der HRS-Zellen zu klassifizieren, wurden die pHL auf VDJ-Rekombinationen untersucht. Die Identifikation von Fragmenten von klonalen VDJ-Rekombinationen wurde durch visuelle Inspektion der JH-Loci mit dem IGV durch die *hybrid-capture*-basierten Daten (3.2.1) vorgenommen. Hierfür wurden die JH-Loci auf *reads* untersucht, die nur partiell passten. Wurden Teile identifiziert, die in diesem Bereich nicht passend zu hg19 waren und die gleichen Veränderungen in mindestens zwei unterschiedlich langen DNA-Fragmenten vorkamen, wurden sie mit der IMGT/V-Quest-Datenbank (*The International Immunogenetics Information System*) auf VDJ-Rekombinationen hin untersucht.

Die IMGT/V-Quest-Datenbank ist eine spezifische Software zur Analyse von VDJ-Rekombinationen.

Auswertung der WES-Daten

Mit dem WES-Verfahren wurden ccfDNAs von pHL-Patienten untersucht. Da niederfrequente Varianten erwartet wurden, sollte die durchschnittliche Target-Abdeckung mind. 300x betragen, die Uniformität der Abdeckung bei mind. 80% und die 100x-Abdeckung bei mind. 50% liegen.

SNV und Indel Analyse

Um SNVs und Indels zu annotieren und zu filtern, wurde das Programm *VS-Software 3.0* verwendet. Hierfür mussten die vcf-files in die *VS-Software* geladen und gefiltert werden.

Die Filtereinstellungen der *VS-Software* wurden synonym zu 3.2.3 Auswertung der *hybrid-capture*-basierten Daten, Varianten-Filterkriterien, SNV und Indel Analyse, gewählt.

Anschließend wurden für die weitere Analyse die Varianten näher untersucht, die eine VAF zwischen 5-35% aufwiesen. Diese VAFs wurden aufgrund der zuvor durch das tNGS-Verfahren detektierten Varianten definiert, die eine VAF von 5% nicht unterschritten. Da keine normale Referenz miteinbezogen wurde, wurden viele Keimbahn-Varianten angezeigt. Da die Keimbahn-Varianten jedoch nicht mit einbezogen werden sollten, wurde die obere Grenze bei 35% VAF gesetzt. Zudem wurden die gleichen Filterkriterien, wie in 3.2.3 Auswertung der *hybrid-capture*-basierten Daten, Varianten-Filterkriterien, SNV und Indel Analyse, für die Überprüfung der Daten im IGV festgelegt. Zusätzlich wurden Varianten, die in Bereichen mit mehr als 3 Varianten innerhalb von 10 bp lagen, als Fehler gewertet. Die umgebenden Varianten sind durch eine geringe Frequenz gekennzeichnet und resultieren aus Sequenzierfehlern, die beim Varianten *Calling* aufgrund der geringen Frequenz nicht in der vcf-Datei angegeben wurden.

Auswertung der RNA-Seq-Daten

RNA-Seq wird normalerweise verwendet, um Genexpressions-Analysen durchzuführen. In dieser Arbeit wurde RNA-Seq genutzt, um niederfrequente Varianten zu bestätigen, die zuvor mittels WES detektiert wurden. Hierfür wurde makrodissektiertes FFPE-Gewebe der pHL-Patienten verwendet.

Nachdem der Sequenzier-Lauf abgeschlossen war, konnten die FASTQ-Dateien auf BaseSpace hochgeladen werden. Da keine Varianten *Caller*-App in BaseSpace zur Detektion niederfrequenter Varianten zur Verfügung stand, musste ein „RNA *Alignment*“ kreiert werden. Hierfür stand in BaseSpace das Programm „RNA-Seq *Alignment*“ (Illumina) zur Verfügung. Das Programm nutzte für das *Mappen* der *reads* den „*STAR Aligner*“. Als Referenzgenom diente die genomische Sequenz für Homo Sapiens (hg19). Da kein Varianten-*Calling* im

niederfrequenten Bereich durch die von BaseSpace zur Verfügung gestellten Programme durchgeführt werden konnte, wurde der Vergleich mit den WES-Daten durch die „bam-files“ im IGV vorgenommen. Zur Überprüfung der Varianten wurden hierfür die „bam-files“ in den IGV geladen und mit den mittels WES generierten Varianten abgeglichen. Varianten, die sowohl in den WES-Daten, als auch in den RNA-Sequenzierungs-Daten ersichtlich waren, wurden als putative Varianten angenommen. Es mussten >10 Sequenzen unterschiedlicher Länge für die jeweilige Variante durch RNA-Seq detektiert werden, damit sie in die Bewertung mit eingeflossen ist.

3.3 Validierungen der SNVs, Indels, TLs und VDJs

Die Validierung der mit Hilfe von NGS detektierten SNVs, Indels, TLs und VDJs erfolgte durch PCR und anschließender konventioneller Sanger Sequenzierung bzw. NGS-basierter Sequenzierung durch das IonTorrent System (Thermo Fisher Scientific).

Für die Validierung musste auf makrodissektiertes bzw. mikrodissektiertes Gewebe zurückgegriffen werden, da der Tumoranteil im Gewebe der pHL bei durchschnittlich 1-5% liegt und durch Sanger Sequenzierung ausschließlich Varianten bei einem Tumoranteil über 30% detektiert werden können. Außerdem konnte dadurch die Abstammung der Varianten den HRS-Zellen zugeordnet werden. Bei der NGS-basierten Methode wurde mit dem sogenannten „Fragment-Kit“ gearbeitet, um Varianten unter einer VAF von 30% zu detektieren. Um eine höhere Sensitivität zu generieren und niederfrequente Varianten auch im Ganzschnitt der pHL identifizieren zu können, wurde außerdem der „KAPA-Fragment-Kit“ verwendet. Bei diesem Kit wird mit einer speziellen Polymerase gearbeitet, die eine 100x höhere Genauigkeit als die konventionelle Taq-Polymerase aufweist. Die Fehlerrate der KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase liegt bei einem Fehler in $3,6 \times 10^6$ bp, während dessen bei der konventionellen Taq-Polymerase die Fehlerrate bei einem Fehler in 1×10^5 bp liegt (140). Die spezielle Polymerase ist an einen AK gebunden, der die Polymerase zunächst stilllegt und so unspezifische Amplifikationen während des Pipettierens verhindert. Dadurch werden die Sensitivität und die Reaktionseffizienz erhöht.

3.3.1 Anreicherung der HRS-Zellen

Makrodissektion am FFPE-Gewebe

Zunächst wurden 10 Gewebeschnitte auf Super-Frost-Objektträger gezogen. Im Anschluss wurden CD30-Färbungen des 1. und 10. Schnittes je Probe angefertigt (3.4.1), um die HRS-Zellen von den restlichen Zellen besser unterscheiden zu können. Danach wurden Tumorzellcluster von einem Pathologen markiert und diese Bereiche in den Leerschnitten (Schnitt 2-9) mit Hilfe einer Kanüle (1,2x40 mm) abgekratzt und in ein Eppendorf Safe-Lock

Tube (1,5 ml) überführt. Danach wurde das Reaktionsgefäß mit 180 µl Inkubationspuffer und 20 µl (20 mg/ml) Proteinase K-Lösung (Promega) versetzt. Daraufhin folgte der Proteinase K-Verdau über Nacht bei 70°C. Anschließend wurde 400 µl Lyse Puffer hinzugegeben und durch kurzes Vortexen gemischt. Im Anschluss daran konnte die DNA mittels FFPE LEV DNA Purification Kit (Promega) automatisiert mit dem Maxwell 16 System (Promega) extrahiert werden (3.1.1).

Mikrodissektion am FFPE-Gewebe

Für die Mikrodissektion mussten Objektträger mit einer speziellen Membran (MembraneSlide 1.0 PEN Membran, 1 mm, Zeiss) verwendet werden. Vor der Nutzung wurden die Objektträger mit 2 Tropfen Poly-L-Lysin (Merck) überschichtet, das mit einem Pinsel auf der Membran verteilt wurde. Nachdem die Gewebeschnitte im Anschluss auf die zuvor präparierten Objektträger überführt wurden, konnten CD30-Färbungen (3.4.1) hergestellt werden. Danach wurden die HRS-Zellen am nächsten Tag mit Hilfe eines *Laser Capture* Mikroskops (PALM Micro Beam HAL100, Zeiss) mikrodissektiert. Hierfür wurden 30 CD30⁺-HRS-Zellen zunächst durch einen Laser ausgeschnitten und mit Druck in den Deckel eines speziellen Reaktionsgefäßes (AdhesiveCap 200 clear, Zeiss) katapultiert. Um die Zellen auszuschneiden, wurde mit dem Programm PalmRobo v4.2 (PALM Microlaser Technologies) gearbeitet. Als Negativkontrolle wurden 30 CD30⁻-Zellen verwendet und gleichermaßen behandelt. Anschließend wurden 16 µl 10x PCR Gold Puffer und 4 µl Proteinase K (20 mg/ml) zu den Zellen in den Deckel hinzupipettiert und mit dem Deckel nach unten über Nacht bei 50°C inkubiert, um den Proteinase K-Verdau einzuleiten. Danach folgte eine Hitzedeaktivierung für 5 Min. bei 95°C. Anschließend wurden die Lysate bis zum Verbrauch bei -20°C gelagert.

3.3.2 PCR-Amplifikation

Um die SNVs, Indels, TLs und VDJs zu verifizieren, mussten zunächst Primer für die entsprechenden Regionen designt werden (Oligo Analysis Tool, Eurofins Genomics (<https://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/oligo-analysis/>)). Bei dem Primer designen wurde darauf geachtet, dass der zu untersuchende Bereich maximal 100 bp lang war, die Schmelztemperatur zwischen 65-67°C lag und das in den letzten 5 Basen der Primer nicht mehr als 3 GCs (Guanine, Cytosine) vorkamen. Anschließend wurden die Primer von Eurofins Genomics synthetisiert. Für jede Variante wurden 2 Primerpaare (2 Vorwärtsprimer (US) und 2 Rückwärtsprimer (LS)) kreiert, da eine semi-genestete bzw. genestete PCR durchgeführt wurde. Bei den VDJ-Primern wurde darauf geachtet, dass ein Primer in der CDR-III-Region und der andere in dem JH-Lokus designt wurden.

Konventionelle PCR für Sanger Sequenzierung und Fragment-Kit

Fast-PCR Reaktion

Zunächst wurde die Konzentration der DNA aus dem makrodissektierten Gewebe durch ein Fluorometer (Qubit dsDNA HS Assay Kit) laut Herstellerangabe gemessen und auf 50 ng/μl mit H₂O verdünnt. Die Lysate der zuvor mikrodissektierten HRS-Zellen konnten unverdünnt verwendet werden.

Für die Amplifikation wurde der GeneAmp Fast PCR Master Mix (2x) verwendet und ein Mastermix wie folgt hergestellt (Angaben je MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml)):

H ₂ O	4,4 μl
Betain (5 M)	4,4 μl
US-Primer (5 pmol/μl)	4,4 μl
LS-Primer (5 pmol/μl)	4,4 μl
GeneAmp Fast PCR Master Mix (2x)	22,4 μl

Anschließend wurden 40 μl des Mastermixes zu 10 μl DNA pipettiert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde der PCR-Ansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und anschließend folgendes PCR-Programm im Thermozykler gestartet:

PCR Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 Sek.	
Denaturierung	94°C	10 Sek.	} 30
Annealing + Elongation	64°C*	20 Sek.	
	4°C	∞	

*Die Annealing/Elongations-Temperatur beim „Fragment-Kit“ lag bei 63°C.

Es fand eine 2 Runden-PCR mit 30 Zyklen statt, bei der eine semi- bzw. genestete PCR durchgeführt wurde. Dabei wurden bei der zweiten PCR entweder ein Primer (semigenestet) oder beide Primer (genestet) ausgetauscht. Für die zweite PCR wurde von der ersten Amplifikation 10 μl des PCR-Produktes in 40 μl Mastermix pipettiert und das PCR-Programm noch ein weiteres Mal wiederholt, um eine höhere, stärkere und spezifischere Amplifikation zu erreichen.

Agarose-Gelelektrophorese

Um die PCR-Reaktion im Anschluss zu kontrollieren, wurden die PCR-Produkte durch eine Agarose-Gelelektrophorese visualisiert. Hierfür wurde ein 2% Agarose-Gel aus 50 ml 0,5x TBE-Puffer, 1 g Agarose und 2 µl Ethidiumbromid gegossen. Das Agarose-Gel wurde in die entsprechende Gelelektrophorese-Kammer gesetzt, welche mit 0,5 TBE-Puffer befüllt wurde. 5 µl des PCR-Produktes wurden danach in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt und mit 10 µl Loading Dye (6x) versetzt. Als Längenmarker wurde der GeneRuler Low Range DNA Marker (25-700 bp) verwendet. Die Auftrennung des PCR-Produktes erfolgte bei 130 V für 20 Min..

KAPA-Fragment-Kit

Für die Amplifikation der abzudeckenden Bereiche wurde bei dem KAPA-Fragment-Kit mit dem KAPA HiFi HotStart ReadyMix gearbeitet. Die DNAs wurden zunächst auf 50 ng/µl mit Nuklease-freiem H₂O verdünnt und der PCR-Ansatz wie folgt hergestellt (Angabe je MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml)):

Nuklease-freies H ₂ O	7,5 µl
KAPA HiFi HotStart Ready Mix	12,5 µl
US-Primer (5 pmol/µl)	1,5 µl
LS-Primer (5 pmol/µl)	1,5 µl
DNA (50 ng/µl)	2 µl

Im Anschluss wurde das folgende PCR-Programm gestartet:

PCR Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	3 Min.	
Denaturierung	98°C	20 Sek.	} 40
Annealing	65°C*	15 Sek.	
Elongation	72°C	30 Sek.	
	72°C	1 Min.	
	4°C	∞	

*Die Annealing-Temperatur wurde Primer-spezifisch festgelegt und konnte daher variieren.

Danach wurde die PCR-Reaktion kontrolliert, indem die PCR-Produkte durch eine Agarose-Gelelektrophorese visualisiert wurden (3.3.2).

3.3.3 Sequenzierungen

Sanger Sequenzierung

Aufreinigung des PCR-Produktes und Sequenzierungs-PCR

Zur Entfernung der freien Nukleotide und überschüssigen Primer folgte eine enzymatische Aufreinigung mit ExoSap-IT (Affymetrix). Hierfür wurden zu 5 µl PCR-Produkt 2 µl ExoSap-IT pipettiert und für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte die Inaktivierung der Enzyme bei 80°C für 15 Min.. Die Inkubationsschritte wurden im Thermozykler vorgenommen. Der Sequenzier-PCR-Ansatz wurde mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit hergestellt. Der PCR-Ansatz stellte sich wie folgt zusammen (Angaben je MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml)):

Nuklease-freies Wasser	4,5 µl
5x BigDye Puffer	2 µl
BigDye Mix 3.1	1 µl
US-Primer (5 pmol/µl) bzw.	
LS-Primer (5 pmol/µl)	1,5 µl

Anschließend wurden 9 µl von dem Mix in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) vorgelegt und 1 µl PCR-Produkt hinzu pipettiert.

Die Sequenzierungs-PCR wurde im Anschluss im Thermozykler wie folgt durchgeführt:

PCR Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	96°C	1 Min.	
Denaturierung	96°C	10 Sek.	} 25
Annealing	50°C	5 Sek.	
Elongation	60°C	75 Sek.	
	4°C	∞	

Nach der Sequenzierungs-PCR wurden die PCR-Produkte durch DyeEx 2.0 Spin Säulen (Qiagen) aufgereinigt. Hierfür wurden die DyeEx 2.0 Spin Säulen nach Herstellerangaben vorbereitet. Im Anschluss wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 10 µl aq. dest. verdünnt und auf die Säule pipettiert. Diese wurde daraufhin in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) positioniert und für 4 Min. bei 2.800 rpm zentrifugiert. Danach wurden 10 µl des Durchflusses in ein Well der Sequenzierplatte pipettiert, das zuvor mit 10 µl Hi-Di Formamid (Thermo Fisher Scientific) versehen wurde und anschließend im ABI 9600 Genetik Analyzer (Thermo Fisher Scientific) durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch die

farbstoffmarkierten Nukleotide, die durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt wurden. Zur Visualisierung der Sanger-Elektropherogramme wurde das Programm Sequence Scanner Software v1.0 (Thermo Fisher Scientific) und für die Editierung der Sequenzen das Programm CLC Sequence Viewer (Qiagen) verwendet. Anschließend konnten die Sequenzen mittels der BLAST-Software (*Basic Local Alignment Search Tool*) des NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) mit Datenbanken abgeglichen werden.

Fragment-Kit

Beim sogenannten „Fragment-Kit“ wurde mit dem Ion Plus Fragment Library Kit gearbeitet. Bei diesem Verfahren wurden relevante Bereiche, die durch spezifische Primer mittels konventioneller PCR vervielfältigt wurden durch NGS analysiert. Hierfür wurden die einzelnen PCR-Produkte mit Adaptoren versehen und durch das NGS-basierte Verfahren der Ion Torrent Plattform sequenziert.

Aufreinigung der DNA-Fragmente

Nachdem die spezifischen DNA-Fragmente amplifiziert und durch die Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert wurden, folgte eine Größenspezifizierung mit Agancourt AMPure XP Beads (*beads*). Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 15 µl PCR-Produkt verwendet wurden, 30 µl *beads* hinzupipettiert, 150 µl 70% EtOH beim Waschschrift, 15 µl Nuklease-freies H₂O zum Eluieren verwendet und zuletzt 14 µl vom Überstand in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt wurden.

End-Repair

Bei diesem Schritt wurden die Proben für die anschließende Adapter-Ligation vorbereitet. Hierfür wurden durch das End Repair Enzym glatte Enden hergestellt, um die nachfolgende Ligation der Adapter zu gewährleisten. Hierfür musste zunächst die DNA-Konzentration jeder Probe durch ein Fluorometer (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) gemessen werden. Für die End-Repair-Reaktion wurde 100 ng PCR-Produkt verwendet und auf 79 µl mit H₂O aufgefüllt.

Anschließend wurden 20 µl 5x End Repair Buffer und 1 µl End Repair Enzym zu dem PCR-Produkt pipettiert und 10mal resuspendiert, um die Lösung zu mischen. Es folgte eine 25-minütige Inkubationszeit bei RT. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt ein weiteres Mal mittels Agancourt AMPure XP Beads (*beads*) aufgereinigt. Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 180 µl *beads* hinzupipettiert, 500 µl 70% EtOH beim

Waschschritt und 25 µl Low TE zum Eluieren verwendet wurden. Zuletzt wurden 24 µl vom Überstand in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt.

Ligation der Adapter

Im Anschluss wurden die Adapter mit unterschiedlichen Barcodes an die spezifischen DNA-Fragmente ligiert, um die Sequenzierung zu ermöglichen. Durch die unterschiedlichen Barcodes konnten die einzelnen Proben später gepoolt werden und nach der Sequenzierung die einzelnen DNA-Fragmente den jeweiligen Proben zugeordnet werden.

Hierfür wurde folgender PCR-Ansatz hergestellt (Angaben je MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml)):

10x Ligase Buffer	10 µl
Ion Xpress P1 Adapter	2 µl
Ion Xpress Barcode X (1 Barcode Adapter je Probe)	2 µl
dNTP Mix	2 µl
Nuklease freies H ₂ O	49 µl
DNA Ligase	2 µl
Nick Repair Polymerase	8 µl

Zu diesem Ansatz wurden 25 µl PCR-Produkt pipettiert. Anschließend folgte eine 15-minütige Inkubationszeit bei 25°C und 5 Min. bei 72°C im Thermozykler.

Anschließend wurden 100 µl des PCR-Produktes in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt und die Proben mittels *beads* aufgereinigt. Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 140 µl *beads* hinzupipettiert, 500 µl 70% EtOH beim Waschschritt und 25 µl Low TE zum Eluieren verwendet wurden. Zuletzt wurden 24 µl vom Überstand in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt.

Amplifikation

Nach der Adapter-Ligation sind Fragmente mit Adapter entstanden, die im nächsten Schritt amplifiziert wurden, um die Fragmente mit Adapter zu vervielfältigen.

Für die Amplifikation wurden 25 µl der Fragmente in ein Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt, mit 100 µl Platinum PCR SuperMix High Fidelity, sowie 5 µl Library Amplification Primer Mix versetzt und durch 10maliges Resuspendieren gemischt.

Anschließend wurden je Probe 130 µl aus dem Reaktionsgefäß entnommen und je 65 µl in zwei MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt.

Darauf folgte die Amplifikation durch folgende PCR:

PCR Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 Min.	
Denaturierung	95°C	15 Sek.	} 7
Annealing	58°C	15 Sek.	
Elongation	70°C	1 Min.	
	4°C	∞	

Im Anschluss wurden das Reaktionsgemisch in ein DNA LoBind Tube (1,5 ml) überführt und nochmals mittels *beads* aufgereinigt. Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 195 µl *beads* hinzupipettiert, 500 µl 70% EtOH beim Waschschriff und 20 µl Low TE zum Eluieren verwendet wurden. Zuletzt wurden 19 µl vom Überstand in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt.

Überprüfung der amplifizierten PCR-Produkte

Die Methode entspricht der unter 3.2.1, Amplikon-basierten Methode, Überprüfung der Bibliothek, beschriebenen Quantitätskontrolle, mit dem Unterschied, dass das erwartete PCR-Produkt 100-200 bp lang sein sollte.

Anschließend wurde die Molarität durch den Bioanalyser bestimmt und die Proben auf 100 pmol verdünnt. Danach wurden maximal 10 Proben zu gleichen Teilen gepoolt. Im Anschluss wurden 2 µl aus dem Pool in 23 µl H₂O verdünnt.

Darauf folgte die klonale Amplifikation, die Sequenzierung und die Auswertung der NGS Daten (siehe 3.3.3 Klonale Amplifikation und Sequenzierung beim Fragment-Kit und KAPA-Fragment-Kit).

KAPA-Fragment-Kit

End Repair und Aufreinigung der PCR-Produkte

Nachdem die spezifischen DNA-Fragmente mittels KAPA HiFi HotStart ReadyMix amplifiziert und durch die Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert wurden, konnten sie für die NGS-basierte Analyse mit Hilfe des Kapa Library Prep Kits vorbereitet werden. Da meist mehrere Varianten in unterschiedlichen Bereichen innerhalb eines Falles untersucht wurden, konnten je 5 µl der jeweiligen PCR-Produkte in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) je Fall gepoolt und auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit Nuklease-freiem H₂O aufgefüllt werden.

Um den Probenpool für die anschließende Adapter-Ligation vorzubereiten, folgte eine End-Repair-Reaktion. Hierfür wurden zu jedem Pool 8 µl Nuklease freies H₂O, 7 µl End Repair Buffer und 5 µl End Repair Enzyme Mix zu dem 50 µl Pool pipettiert, resuspendiert und für 30 Min. bei 20°C im Thermozykler inkubiert.

Anschließend folgte eine Aufreinigung durch *beads*. Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 120 µl *beads* hinzupipettiert, 35 µl 10 nM Tris-HCL, pH 8-8,5 zum Eluieren verwendet und 30 µl vom Überstand in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt wurden.

Adapter-Ligation und Aufreinigung der Proben

Um die Adapter an die DNA-Fragmente zu binden, wurde zu dem PCR-Produkt 14 µl Ligation and Nick Repair Buffer (5x), 6 µl Ligation and Nick Repair Enzyme, 10 µl Adapter (P1) und 10 µl der jeweiligen Barcodes (1:10 verdünnt) pipettiert. Jeder patientenspezifische Pool bekam einen anderen Barcode. Durch die unterschiedlichen Barcodes konnten die einzelnen Fälle später gepoolt und gemeinsam sequenziert werden. Nach der Sequenzierung konnten durch die unterschiedlichen Barcodes die Sequenzen den jeweiligen Patienten zugeordnet werden.

Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch 15 Min. bei 20°C und 5 Min. bei 65°C im Thermozykler inkubiert.

Die anschließende Aufreinigung der Proben erfolgte wieder mittels *beads*. Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 70 µl *beads* hinzupipettiert, 25 µl 10 nM Tris-HCL, pH 8-8,5 zum Eluieren verwendet und 20 µl vom Überstand in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt wurden.

Amplifikation und finale Aufreinigung

Um die Fragmente zu vervielfältigen, folgte eine Amplifikation, bei der zunächst 20 µl der Fragmente zu 25 µl Kapa HiFi Start Ready Mix (10x) und 5 µl Primer Premix (10x) (5 µM) in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) pipettiert wurden, 5mal resuspendiert und folgendes PCR-Programm im Thermozykler gestartet wurde:

3. Methoden

PCR Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	45 Sek.	
Denaturierung	98°C	15 Sek.	} 7
Annealing	65°C	30 Sek.	
Elongation	72°C	30 Sek.	
	72°C	1 Min.	
	4°C	∞	

Anschließend wurden die Proben wieder durch *beads* nach ihrer Größe selektioniert. Die Methode entspricht der unter 3.2.1, *hybrid-capture*-basierten Methode, Fragmentierung der gDNA, beschriebenen Aufreinigung, mit dem Unterschied, dass 70 µl *beads* hinzupipettiert, 20 µl 10 nM Tris-HCL, pH 8-8,5 zum Eluieren verwendet und 18 µl vom Überstand in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube (1,5 ml) überführt wurden.

Überprüfung der PCR-Produkte

Die Methode entspricht der unter 3.2.1, Amplikon-basierten Methode, Überprüfung der Bibliothek, beschriebenen Quantitätskontrolle, mit dem Unterschied, dass das erwartete PCR-Produkt 150-200 bp lang sein sollte.

Danach wurde die Molarität durch den Bioanalyser ermittelt und auf 100 pmol verdünnt.

Anschließend folgte die klonale Amplifikation, Sequenzierreaktion und die Auswertung der NGS Daten.

Klonale Amplifikation und Sequenzierung beim Fragment-Kit und KAPA-Fragment-Kit

Klonale Amplifikation

Die klonale Amplifikation findet beim Ion Torrent im Ion OneTouch in einem Öl umschlossenen Wassertropfen (Mikroreaktionsraum) statt. Die Mikroreaktionsräume werden durch Vermischung von DNA-Fragmenten und kleinen Klügelchen, den sogenannten Ion Sphere Particles (ISPs), erschaffen, sodass sich im Durchschnitt ein ISP und ein DNA-Fragment in einem Mikroreaktionsraum befinden. Die Art dieser PCR nennt man Emulsions-PCR, bei der durch die Emulsion Milliarden Mikroreaktionsräume entstehen können, in denen die unterschiedlichen DNA-Fragmente gleichzeitig amplifiziert werden können (141). Um die klonale Amplifikation durchzuführen, werden die DNA-Fragmente durch den Adapter (P1) an die ISPs ligiert. An den ISPs befindet sich eine komplementär zum Adapter (P1) befindliche kurze Sequenz (P1-Oligo), die die Bindung an den Adapter (P1) gewährleistet und als Primer

für die klonale Amplifikation dient. Die Synthese des neuen Stranges fängt somit am P1-Oligo an. Die DNA-Fragmente können nach der Denaturierung an ein neues P1-Oligo am selben ISP binden und die Synthese kann von neuem beginnen. Der entstandene Strang bindet weiterhin am ISP und wird durch einen Rückwärtsprimer, der an die Sequenz von Adapter A ligiert, synthetisiert, sodass zuletzt die Kügelchen komplett von DNA-Fragmenten bedeckt sind.

Die an ISPs gebundenen DNA-Fragmente (pos. ISPs) können durch Streptavidin-gekoppelte magnetische *beads*, mit Hilfe des am Rückwärtsprimer befindlichen Biotins, von den ungebundenen Fragmenten getrennt werden. Nach der Amplifikation liegen Millionen ISPs vor, die ein spezifisches DNA-Molekül in Milliarden Kopien gebunden haben. Durch die klonale Amplifikation der DNA-Fragmente an den *beads* wird eine Signalverstärkung bewirkt, durch die eine Signalgenerierung ermöglicht werden kann.

Für die Amplifikation mussten die ISPs zunächst 1 Min. durch Vortexen gemischt werden. Der Ion OneTouch (Thermo Fisher Scientific) wurde laut Herstellerangabe vorbereitet und die Lösung in einem DNA LoBind Tube (1,5 ml) wie folgt angesetzt:

Nuklease-freies Wasser	25 µl
Ion OneTouch 2x Reagent Mix	800 µl
Ion OneTouch Enzym Mix	50 µl
Verdünnte Bibliothek (100 pM)	25 µl
Ion OneTouch 200 Ion Sphere Particle	100 µl

Anschließend wurde der Ansatz 5 Sek. durch Vortexen gemischt, anzentrifugiert und in den Ion OneTouch Plus Reaction Filter pipettiert. Dieser Filter ist mit 1,7 ml Reaktionsöl beschichtet und wurde laut Herstellerangabe in das Ion OneTouch Instrument eingesetzt, woraufhin die Emulsions-PCR gestartet werden konnte.

Aufreinigung der positiven ISPs

Nach der Emulsions-PCR wurden die ISPs in zwei *Recovery tubes* im Ion OneTouch durch Zentrifugation gesammelt. Anschließend wurden die *Recovery tubes* aus dem Ion OneTouch genommen und der Überstand beider *tubes* bis auf 50 µl abgenommen, die ISP-Pellets in diesen 50 µl resuspendiert und die gesplittete Probe wieder in ein DNA LoBind Tube (1,5 ml) pipettiert. Durch Zugabe von 1 ml OneTouch Wash Solution wurden die ISPs gewaschen und anschließend bei 15.000 g für 2 ½ Min. abzentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand bis auf 100 µl abgenommen und die ISP-Pellets durch 10-sekündiges Vortexen resuspendiert.

Die anschließende Aufreinigung erfolgte voll automatisiert mit dem Gerät Ion OneTouch ES Instrument (Thermo Fisher Scientific) und führte dazu, dass die ISPs ohne DNA entfernt wurden. Hierfür wurde ein 8-Well Streifen laut Herstellerangabe beladen.

Die MyOne *beads* sind Streptavidin-gekoppelte *beads*, die vor der Beladung des 8-Well Streifens gewaschen werden mussten. Hierfür wurden 13 µl *beads* in 130 µl MyOne *beads* Wash Solution pipettiert und resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung für 2 Min. auf einen Magnetständer gestellt. Der klare Überstand wurde entfernt. Daraufhin wurden 130 µl MyOne *beads* Wash Solution zu den *beads* gegeben und resuspendiert. Außerdem musste eine Melt-off Solution mit 40 µl 1 M NaOH und 280 µl 10% Tween 20 frisch angesetzt werden, die im Anschluss, wie auch die *beads* laut Herstellerangabe in den 8-Well Streifen pipettiert wurde. Anschließend wurde der Ion OneTouch ES laut Herstellerangabe gestartet. Nach 30 Min. wurden die aufgereinigten DNA-Fragmente voll automatisiert in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt. Im Anschluss darauf musste die Probe bei 15.500 g für 1 ½ Min. an zentrifugiert werden und der Überstand bis auf 50 µl abgenommen werden. Anschließend folgte ein Waschschriff, um die restliche Melt-off Solution zu entfernen. Hierfür wurden zur Probe 200 µl Ion OneTouch Wash Solution hinzugegeben und die Probe bei 15.500 g für 1 ½ Min. an zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss bis auf 50 µl entfernt und anschließend mit Ion OneTouch Wash Solution auf 100 µl aufgefüllt.

Qualitätskontrolle

Mit dem Ion Sphere Quality Control Kit konnte die Ausbeute der pos. ISPs kontrolliert werden. Das Kit basierte darauf, dass die pos. ISPs durch zwei fluoreszierende Farbstoffe (Alexa Fluor 488 gekoppeltes Oligonukleotid an Adapter P1/ Alexa Fluor 647 gekoppeltes Oligonukleotid an Adapter A) markiert wurden. Da Alexa Fluor 488 an alle ISPs und Alexa Fluor 647 nur an pos. ISPs binden kann, konnte durch Fluoreszenzbestimmung mittels Qubit 2.0 (EasyCalculator, Thermo Fisher Scientific) der prozentuale Anteil der pos. ISPs kalkuliert werden.

Um die Konzentration der pos. ISPs zu bestimmen, musste vor der Aufreinigung mit dem Ion OneTouch ES 2 µl und nach der Aufreinigung 10 µl der Probe in ein MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) überführt werden. Das Marker-*Annealing* und die Konzentrationsbestimmung durch den Qubit 2.0 erfolgten laut Herstellerangabe. Vor der Aufreinigung wird die optimale pos. ISP-Menge mit 10-30% angegeben. Nach der Aufreinigung sollte die ISP-Menge bei >50% liegen.

Sequenzierungsreaktion

Beim Ion Torrent basiert die Sequenzierung, wie auch bei Illumina, auf der „Sequenzierung durch Synthese“ (SBS) und findet im Ion PGM statt. Die anschließende Detektierung der eingebauten Nukleotide erfolgt durch die sogenannte Halbleiter-Technologie, bei der die Änderung des pH-Wertes gemessen wird, die bei der Freisetzung von Protonen beim Einbau eines Nukleotids während der Sequenzierungsreaktion entsteht (142). Die pH-Wert-Änderung wird detektiert und in die Sequenz übersetzt. Die Detektion wird durch Chips ermöglicht, auf

denen die aufgereinigten ISPs geladen werden. Diese Chips sind mit Millionen Mikrowells ausgestattet, in die je ein ISP hinein gelangen kann, sodass in jedem Well mit ISP eine Sequenzierung stattfinden kann. Unter den Wells befindet sich eine protonensensitive Platte, die die pH-Wert-Änderungen detektieren kann. Für die Sequenzierung wird der Chip in einer bestimmten Reihenfolge mit den einzelnen Nukleotiden befüllt. Dadurch ist gewährleistet, dass eine Unterscheidung der eingebauten Nukleotiden erfolgen kann. Nachdem die Lösung mit einem Nukleotid auf die Wells gegeben wurde, folgt ein Waschschrift, um diese Lösung wieder zu entfernen. Anschließend wird die nächste Nukleotid-Lösung hinzugegeben. Dies wiederholt sich zirka 500mal, sodass die Sequenzierung von zirka 200 bp langen DNA-Fragmenten gewährleistet wird, was einer Datenmenge von zirka 10^9 bp entspricht (141,143).

Die Sequenzierung wurde durch die Ion Torrent Plattform mit dem Ion PGM (Thermo Fisher Scientific) getätigt. Das Ion PGM-System musste zunächst vor der Sequenzierung nach Herstellerangabe vorbereitet werden. Hierfür wurden die ISPs mit einem Sequenzierungsprimer versetzt und anschließend das *Annealing* gestartet. Hierfür wurde ein Ansatz aus 100 µl aufgereinigten pos. ISPs, 5 µl Control Ion Sphere Particel und 100 µl Annealing Buffer je MicroAmp Fast PCR Röhrchen (0,2 ml) angesetzt. Anschließend wurde der Ansatz für 2 Min. bei 15.500 g zentrifugiert, bevor der Überstand bis auf 15 µl abgenommen wurde. Daraufhin wurden 12 µl Sequenzierungsprimer hinzugegeben und der Ansatz im Thermozykler für 20 Min. bei 95°C und 2 Min. bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Chip laut Herstellerangaben vorbereitet. Nach der *Annealing*-Reaktion wurde 3 µl PGM Sequenzierungs-Polymerase zu den ISPs pipettiert und für 5 Min. bei RT inkubiert. Zuletzt wurde der Chip laut Angaben des Herstellers beladen und der Sequenzierungslauf gestartet.

Auswertung der NGS-Daten

Für die Auswertung der Sequenzen wurden zunächst die Rohdaten durch den Ion Torrent Server prozessiert. Anschließend wurden die sequenzierten DNA-Fragmente mit dem Referenzgenom (hg19) durch ein *plugin* der Ion Torrent Plattform (Variant Caller) abgeglichen. Daraufhin erfolgte ein Abgleich der Positionen, die durch tNGS als mutiert identifiziert worden waren, durch den IGV.

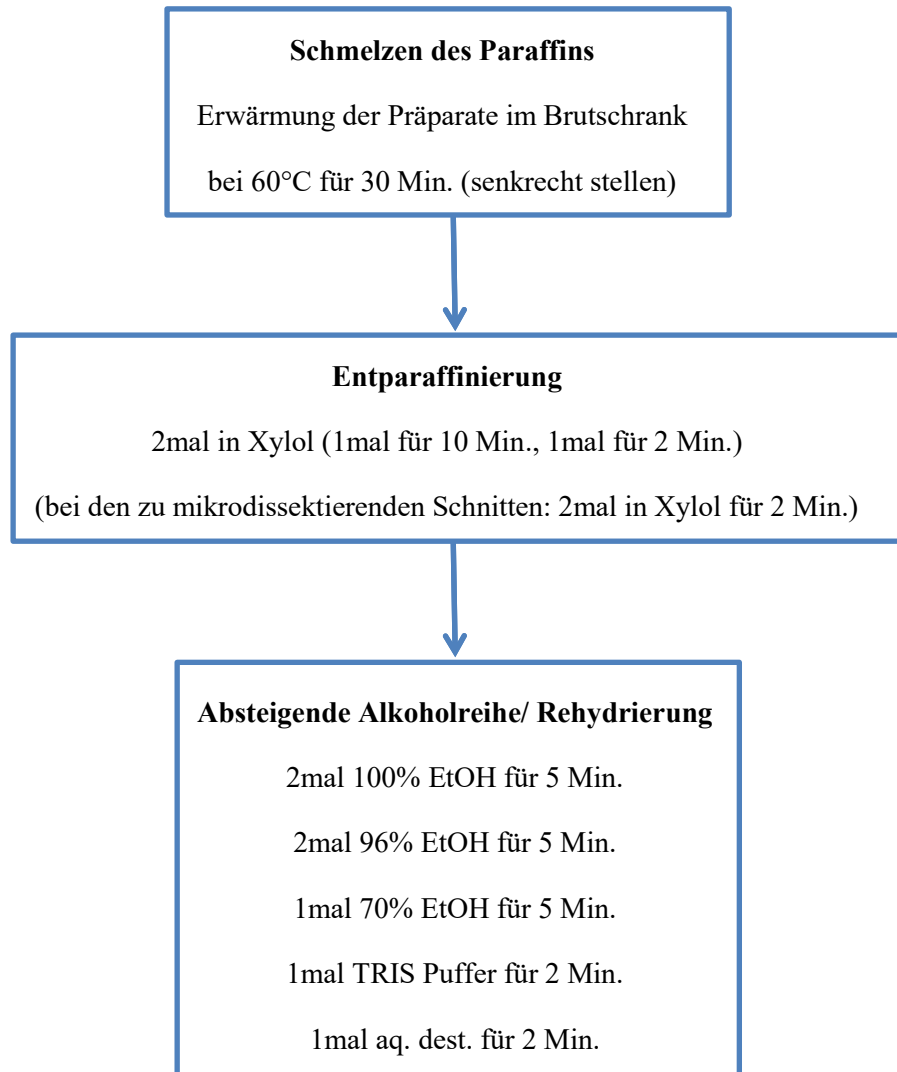
3.4 Immunhistochemische Färbungen

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde das Färbe-Kit Dako REAL Detection System (Dako) verwendet. Das Dako REAL Detection System (Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse) basiert auf der indirekten Streptavidin-Biotin-Methode, die durch ein Drei-Schritt-Verfahren eingesetzt wurde. Der erste Schritt stellt die Primär-AK-Inkubation dar, der zweite die Inkubation des biotinylierten Sekundär-AK und zuletzt die Behandlung mit der

Streptavidin gekoppelten Phosphatase. Durch den biotinylierten Sekundär-AK wird die Empfindlichkeit der Detektion erhöht, da an jedes biotinylierte AK-Molekül mehrere mit alkalischen Phosphatasen konjugierte Streptavidin-Moleküle binden können. Zur Visualisierung wurde ein Substratsystem verwendet, das aus Fast Red Chromogen besteht. Um die endogenen alkalischen Phosphatasen zu blockieren, wurde Levamisol verwendet. Chromogen wurde durch die Phosphatase zu unlöslichem Salz umgesetzt, das einen Niederschlag am Ort des Ziel-AGs bildete. Als Gegenfärbung wurde Hämatoxylin verwendet. Hämatoxylin bewirkt eine Blaufärbung des Zellkerns. Das Hämatoxylin wurde 1:4 mit H₂O verdünnt.

Im ersten Schritt wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt, die anschließend im Wasserbad gestreckt und auf Objektträger (Super Frost) aufgebracht wurden. Bei den Färbungen der zu mikrodissektierenden Schnitte wurden die Schnitte auf Spezial-Objektträgern aufgebracht, die mit einer speziellen Membran beschichtet sind (MembraneSlide 1.0 PEN Membran, 1 mm, Zeiss). Daraufhin wurden die Schnitte bei 60°C für 30 Min. im Brutschrank erhitzt, sodass das Paraffin schmelzen konnte. Vor den jeweiligen Färbungen mussten die Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert werden (Abb. 6). Die Entparaffinierung bewirkte, dass die Schnittpräparate die wässrigen Farbstoffe aufnehmen konnten, indem das hydrophobe Paraffin durch das Erwärmen im Brutschrank auf den Objektträgern schmolz und ablaufen konnte. Durch die anschließende Behandlung mit Xylol wurde ein vollständiges Herauslösen des Paraffins erreicht. Xylol diente als Intermedium zwischen Paraffin und Ethanol. Durch die anschließende Rehydrierung wurden die Schnittpräparate wieder an einen höheren Wassergehalt angeglichen.

Abb. 6: Vorbehandlung der Schnittpräparate für die histologischen und immunhistochemischen Färbungen



Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung konnten die unterschiedlichen Färbungen direkt im Anschluss durchgeführt werden.

3.4.1 CD30-Färbung

Um HRS-Zellen anzufärben, wurde eine CD30-Färbung verwendet. Ausgangsmaterial stellten, auf beschichteten Objektträgern angefertigte Schnittpräparate der pHL dar, die wie oben beschrieben zunächst entparaffiniert und anschließend rehydriert wurden (Abb. 6). Die Rehydrierung schloss mit einem 2-minütigen aq. dest.-Bad ab. Es folgte eine hitzeinduzierte Epitop-Demaskierung (HIER), die bei den CD30 zu färbenden Präparaten mit EDTA (pH 8) durchgeführt wurde. Diese Vorbehandlung lief durch ein Wasserbad bei 96°C für 20 Min. ab. Nachdem die Schnitte auf RT abgekühlt waren, wurden sie 3mal mit 1x TRIS-Puffer für 2 Min. gewaschen, bevor der CD30-Primär-AK auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Nach der Inkubation des Primär-AK wurden die Schnitte 3mal für 2 Min. in 1x TRIS-Puffer gewaschen und mit dem biotinylierten Sekundär-AK für 30 Min. bei RT behandelt.

Nach der Inkubation des Sekundär-AK wurden die Schnitte 3mal mit 1x TRIS-Puffer gewaschen, bevor sie mit der Streptavidin konjugierten alkalischen Phosphatase für 15 Min. bei RT versehen wurden. Nach anschließendem 3mal 2-minütigen Waschen mit 1x TRIS-Puffer wurden die Schnitte lichtgeschützt für 10 Min. mit der Substrat-Chromogen-Lösung bedeckt. Nachdem die Schnitte 3mal für 2 Min. mit 1x TRIS-Puffer gewaschen wurden, folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (1:4 verdünnt) für 30 Sek., bevor die Schnitte in fließendem warmen H₂O für 5 Min. gebläut wurden. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Min. in H₂O und 2 Min. in 1x TRIS-Puffer gewaschen, bevor sie durch die aufsteigende Alkoholreihe (1mal 1 Min. in 70% EtOH, 2mal 1 Min. in 96% EtOH, 1mal 1 Min. in 100% EtOH, 2mal 1 Min. in Xylol) dehydriert wurden. Zuletzt wurden die Schnitte in Entellan eingedeckt. Bei den zu mikrodissektierenden Färbungen entfiel der letzte Xylol-Schritt und es erfolgte auch keine Eindeckelung in Entellan.

3.5 Histologische Färbung

3.5.1 Pikrosiriusrot-Färbung

Um Kollagene innerhalb eines Gewebes anzufärben, wurde mit der Pikrosiriusrot-Färbung (PSR) gearbeitet. Die PSR-Färbelösung besteht aus Siriusrot in einer gesättigten wässrigen Lösung von Pikrinsäure. Die Methodik der PSR-Färbung beruht auf der elongierten anionischen Struktur des Siriusrot-Farbstoffes, der die Fähigkeit besitzt, kationische Kollagenfasern zu binden (144). Die PSR-Färbung erweitert die natürliche Doppelbrechung der Kollagenbündel. Unter linear polarisiertem Licht stellt sich Kollagen Rot, Orange, Gelb oder Grün dar. Unter polarisiertem Licht beeinflusst die Probenausrichtung den Farbton und die Signalstärke der PSR-Färbung (145). Diese Einschränkung kann unter zirkulierendem polarisiertem Licht minimiert werden (146), wofür jedoch eine spezialisierte Ausrüstung benötigt wird. Als Alternative konnten bei PSR-Färbungen Fluoreszenz-Darstellungen etabliert werden, die ein starkes rotes Fluoreszenz-Signal liefert, das sensitiv und spezifisch für Kollagene ist und anders als bei der linear polarisierten Lichtmikroskopie, nicht von der Probenausrichtung beeinflusst wird. Die Pikrinsäure dient dagegen als Detektionsfarbstoff der vitalen Zellen, die eine grüne Autofluoreszenz anzeigt (147–149).

Zunächst wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt, die anschließend im Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgebracht wurden. Anschließend wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert (Abb. 6). Die Rehydrierung schloss mit einem 5-minütigen-H₂O-Bad ab, woraufhin die Schnitte 10 Min. mit dem PSR-Farbstoff überschichtet wurden. Anschließend wurden die Schnitte 3mal für 2 Min. mit Essigsäure (100%) (1:200 mit H₂O verdünnt; 0,01 mol/L) gewaschen, um die nicht gebundenen Farbstoffreste zu entfernen. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit maximal abgezogen, bevor die Schnitte durch 3mal 1 minütiges Waschen in 100%

EtOH und 1 Min. in Xylol dehydriert wurden. Zuletzt konnten die Schnitte in Eukitt eingedeckt und durch das Konfokale Laser Scanning Mikroskop (kLSM) ausgewertet werden. Hierfür wurde von einigen HRS-Zellen eine konfokale Aufnahme erstellt. Für die Anfertigung des Bildes wurden die aus der Literatur gängigen Einstellungen (Laser: 561 nm und Filter: 635 nm-685 nm) verwendet (17-19). Das *Pinhole* wurde zur Z-Stapel-Aufnahme auf 1 Airy Unit eingestellt. Die Auflösungseinstellung des Bildes in X- und Y-Achse erfolgte mittels *Nyquist-Sampling*, welches automatisch von der Software berechnet wurde. Um den Z-Stapel zu generieren, musste zunächst der zu scannende Bereich mittels Fokusebene festgelegt werden. Die Anzahl der „optimalen“ Ebenen wurde von der Software berechnet und liegt durchschnittlich zwischen 40-90 Ebenen bei einer Schnittdichte von durchschnittlich 12-28 μm . Durch Verschieben des Fokuspunktes des Objektivs wurden die Ebenen einzeln abgefahren und mittels Scanner aufgenommen. Die so entstandenen Stapel konnten in 3D-Renderer (Arivision 4D) zu einem Bild zusammengestellt und visualisiert werden.

Auf diese Weise konnten die HRS-Zellen 3-dimensional dargestellt werden, um die Kollagen-Ummantelung der HRS-Zellen zu visualisieren. Zur Quantifizierung wurde das Programm QuPath (GitHub) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Targetierte *Next Generation Sequencing*-Analysen (tNGS)

Der Tumoranteil bei HL ist sehr gering (1-5%), weshalb die Detektion von genetischen Aberrationen im Ganzschnitt sehr aufwendig ist (12, 13). Bislang konnten daher nur *in-situ*-Untersuchungen oder Analysen zu genomischen Aberrationen durch WES mit Hilfe von zuvor mikrodisektierten HRS-Zellen aus Gefrierschnitten durchgeführt werden (68, 69). Die DNA aus FFPE-Gewebe hat durch die Formalinfixierung Desaminierungsartefakte. Die Fixierungsartefakte führen wiederum zu Sequenzierfehlern (106). In der klinischen Routine wird Gewebe normalerweise direkt in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE-Gewebe). In nur 5% der FFPE-Gewebe liegt zusätzlich Gefrierewebe vor, weshalb bislang nur eine geringe Anzahl an Patienten für molekulargenetische Untersuchungen an mikrodisektierten Tumorzellen herangezogen werden konnten. Zudem sollten Patienten mit einem qPET >3 untersucht werden, die nur 5% aller pHL ausmachen. Aufgrund dieser Limitierung sollte ein Verfahren etabliert werden, degradierte DNA aus FFPE-Gewebe für molekulargenetische Analysen verwenden zu können und die Sensitivität zu erhöhen, damit im Ganzschnitt Varianten mit einer VAF <5% detektiert werden können. Durch neue NGS-Verfahren besteht die Möglichkeit, die Sensitivität zu erhöhen und durch die Sequenzierung kurzer DNA-Fragmente (100-250 bp) DNA aus FFPE-Gewebe für die Untersuchungen zu verwenden.

Zunächst sollte daher ein tNGS-Verfahren entwickelt werden, das die Detektion gering-frequenter Varianten in gDNA aus FFPE-Biopsaten und damit ohne vorherige Mikrodisektion von HRS-Zellen ermöglicht. Nach Etablierung eines geeigneten tNGS-Verfahrens sollten qPET >3 (chemotherapieresistent) und <3 (chemotherapiesensibel)- pHL-Patienten untersucht werden, um zu vergleichen, ob sich das Mutationsmuster dieser beiden Gruppen unterscheidet.

Es wurden zwei unterschiedliche Methoden etabliert, um Varianten nachzuweisen; zum einen das Amplikon-basierte- und das *hybrid-capture*-basierte Verfahren.

4.1.1 Amplikon-basiertes Verfahren

Mit dem Amplikon-basierten tNGS-Verfahren sollten niederfrequente SNVs und Indels in gDNA aus FFPE-Gewebe von Ganzschnitten detektiert werden. Dieses Panel beinhaltete die am häufigsten mutierten Gene in HL. Um den Fehlerhintergrund, der auf Desaminierungsartefakte und Taq-Fehler zurückzuführen ist, zu minimieren, fand das sogenannte *dual-strand*-Verfahren Anwendung. Bei diesem Verfahren werden die zu untersuchenden Bereiche in zwei unterschiedlichen Reaktionsansätzen mit zwei verschiedenen Primerpools abgedeckt (Pool A und B). Hierbei wird mittels des einen Pools der eine Strang und mit dem anderen Pool der andere Strang als Template verwendet. Zur Fehlerminimierung wurde anschließend Pool A mit

4. Ergebnisse

Pool B verglichen und nur die Varianten, die in beiden Pools zu finden waren, als real angesehen.

Es wurden insgesamt 37 HL und 6 Tonsillen mit Hyperplasie als Negativkontrollen in Form von DNA aus FFPE-Gewebe mit dem Amplikon-basierten Verfahren untersucht. Die Negativkontrollen wurden für die Erstellung der Fehlerliste verwendet, die sich aus den rekurrenten Varianten zusammenstellt, die in allen Proben zu finden waren und den detektierten Varianten in den Negativkontrollen, von denen auszugehen war, dass sie normalerweise keine Varianten beinhalten sollten. Bei den 37 HL-Patienten handelte es sich bei 11 pHL und einem adulten HL-Fall um Archivfälle, die für die Etablierung verwendet wurden, währenddessen die restlichen 25 pHL der C1- und C2-Studie (EuroNet-PHL) angehörten. Davon hatten 13 Patienten einen qPET <3 (Mittelwert: 0,6, Bereich: 0-1,9) und 12 einen qPET >3 (Mittelwert: 4,5, Bereich: 3,5-5,8). Das Alter der pHL lag durchschnittlich bei 13 Jahren (6-18 Jahren). Das Geschlecht, der Subtyp und der EBV-Status werden für jede Gruppe tabellarisch dargestellt (Tab. 1). Bei den 25 Patienten der C1- und C2-Studie wurde zusätzlich eine Stadien-Einteilung vorgenommen und das Bulkvorkommen dokumentiert (Tab. 1), um die Therapiegruppe (C1-Studie) beziehungsweise das Therapielevel (C2-Studie) für jeden Patienten festzulegen. Ein Bulk liegt dann vor, wenn die größte zusammenhängend befallene Lymphknotenregion im Körper ein Volumen von ≥ 200 ml erreicht hat. Alle klinischen Daten werden im Anhang je Fall aufgelistet (Anhang: Tab. 4).

Tab. 1: Patientendaten der 37 untersuchten HL

Patientendaten		Anzahl der Patienten		
		qPET <3	qPET >3	Archiv
Anzahl der Patienten	insg.	13	12	12
Geschlecht	m	6	6	9
	w	7	6	3
Histologie Subtyp	NS	7	7	4
	MC	5	3	8
	LR		1	
EBV-Status	na	1	1	
	neg	8	10	7
	pos	5	2	5
Stadium nach Ann Arbor	IB		1	
	IIA	7		
	IIAE	1	4	
	IIB	2		
	IIBE		2	
	IIIA	1	3	
	IVA	2	1	
IVB		1		
Bulk	ja	2	3	
	nein	11	9	

4. Ergebnisse

Zunächst wurden die Gewebeschnitte mit Hilfe des TruXTRAC FFPE DNA Kit (Covaris) entparaffiniert und mit dem FFPE LEV DNA Purification Kit (Promega) die gDNA aus den Schnitten extrahiert (3.1.1). Die extrahierte gDNA hatte eine Durchschnittskonzentration von 306 ng/μl in 50 μl (Konzentrationsspanne: 9,8-675 ng/μl). Da die optimale einzusetzende Menge an DNA für die Bibliothek-Herstellung bei 25 ng/μl und das einzusetzende Volumen bei 20 μl liegt, mussten einige Proben verdünnt werden.

Mittels TruSeq Custom Amplicon Kit (Illumina) wurden anschließend je Probe zwei Fragment Bibliotheken (Pool A und B) generiert, bei denen die finale Konzentration in Pool A durchschnittlich bei 27,5 ng/μl (Konzentrationsspanne: 1,5-96,8 ng/μl) und bei Pool B bei 28 ng/μl (Konzentrationsspanne: 1,7-97,8 ng/μl) lag. Die Sollwerte liegen bei Pool A und B bei mindestens 2 ng/μl. Die genauen Bibliotheken- und Laufcharakteristika sind in Tab. 2 und im Anhang dokumentiert (Anhang: Tab. 5). Für das tNGS mit dem *dual-strand*-Verfahren wurden alle Sequenzierungen mit dem MiSeq (MiSeq Reagent Kit v3, 300 bp *paired end reads*) durchgeführt.

Die Cluster-Dichte, die ein wichtiger Parameter für die richtige Beladung und für eine erfolgreiche Durchführung essentiell ist, sollte beim MiSeq zwischen $1,2 \times 10^6$ und $1,4 \times 10^6$ Cluster pro mm^2 liegen, während der Q30-Wert $>80\%$ liegen sollte. Die Target-Abdeckung zeigt an, wie oft der entsprechende Bereich sequenziert wurde, indem die durchschnittliche Anzahl der Basen für jede Position der Referenz gemessen wird. Da niederfrequente Varianten, aufgrund des geringen Tumoranteils (1-5%), bei den HL erwartet wurden und durch die Formalinfixierung des FFPE-Gewebes falsch positive Varianten entstehen können, musste eine hohe Sensitivität gewährleistet werden. Für die Auswertung wurden daher nur Proben verwendet, die eine durchschnittliche Target-Abdeckung von mind. 4.500x aufwiesen und bei denen mindestens 1×10^6 Sequenzen generiert wurden.

Tab. 2: Laufcharakteristika der 37 mittels des Amplicon-basierten Verfahrens untersuchten gDNAs von HL-Patienten. Die Auswertung erfolgte mittels BaseSpace mit dem *Amplicon DS v1.2*- (Illumina) und *TruSeq Amplicon*-Programm (Illumina) durch den *Smith Waterman Algorithmus*.

Laufcharakteristika	Pool A Werte (Bereich)	Pool B Werte (Bereich)
Cluster-Dichte	$1,5 \times 10^6$ Cluster pro mm^2 ($5,8 \times 10^5$ - $1,9 \times 10^6$ Cluster pro mm^2)	
Q30	92,1% (87,8-96,35%)	
Anzahl der Sequenzen/Probe	$3,9 \times 10^6$ Sequenzen ($1,1 \times 10^6$ - $7,9 \times 10^6$ Sequenzen)	$3,7 \times 10^6$ Sequenzen ($1,1 \times 10^6$ - $7,4 \times 10^6$ Sequenzen)
Durchschnittliche Target Abdeckung/Base	16.692x (4.746-30.745x)	16.494x (4.562-21.128x)

Das Verfahren wurde zunächst an Tonsillen mit einer Hyperplasie getestet. Bei den Tonsillen traten in fast jeder Probe konstant die gleichen Varianten im niederfrequenten Bereich auf, die deshalb als Fehler identifiziert werden konnten, die panelspezifisch waren und auf Taq-Fehler,

schlecht zu sequenzierende Bereiche (GC-reiche Regionen oder repetitive Sequenzen) oder falsche Annotationen zurückzuführen sind. Auf Basis dieser detektierten „Varianten“ wurde eine Fehlerliste erstellt, die für die Bewertung der HL-Proben verwendet wurde.

Mittels des Amplikon-basierten Verfahrens konnten mit Pool A in den 37 Patienten 8.786 Varianten und in Pool B 9.687 Varianten identifiziert werden. Nach Abgleich der beiden Pools konnten in 24 von 37 Patienten insgesamt 61 potenzielle Varianten nachgewiesen werden, wobei nur potenzielle Varianten mit einbezogen wurden, die eine Konsequenz auf Proteinebene hatten. In den 13 anderen Patienten konnten keine Varianten identifiziert werden. Die detektierten potenziellen Varianten waren sowohl somatische als auch Keimbahn-Varianten. Als Keimbahn-Varianten wurden alle Varianten bezeichnet, die eine VAF >35% hatten, da somatische Varianten bei HLs im niederfrequenten Bereich erwartet werden. Zudem wurden Keimbahn-Varianten zuvor ausgeschlossen, die mit einer Populations-Allelfrequenz in der europäischen Bevölkerung von >0,1% in der ExAC-Datenbank zu finden waren. Von den potenziellen Varianten waren 56 somatische und 5 Keimbahn-Varianten. Die Anzahl der potenziellen Varianten je Fall lag durchschnittlich mit Keimbahn-Varianten bei 1,73 Varianten (1-6 Varianten) (Abb. 7 a). Die Allelfrequenz betrug im Mittel 8,3% (Bereich: 1,23-50,7%) (Abb. 7 b). Die Anzahl der potenziellen Varianten bezogen auf die Fälle mit Varianten lag ohne Keimbahn-Varianten bei durchschnittlich 2,5 Varianten (1-6 Varianten). Die Allelfrequenz betrug im Mittel 4,42% (Bereich: 1,2-15,4%).

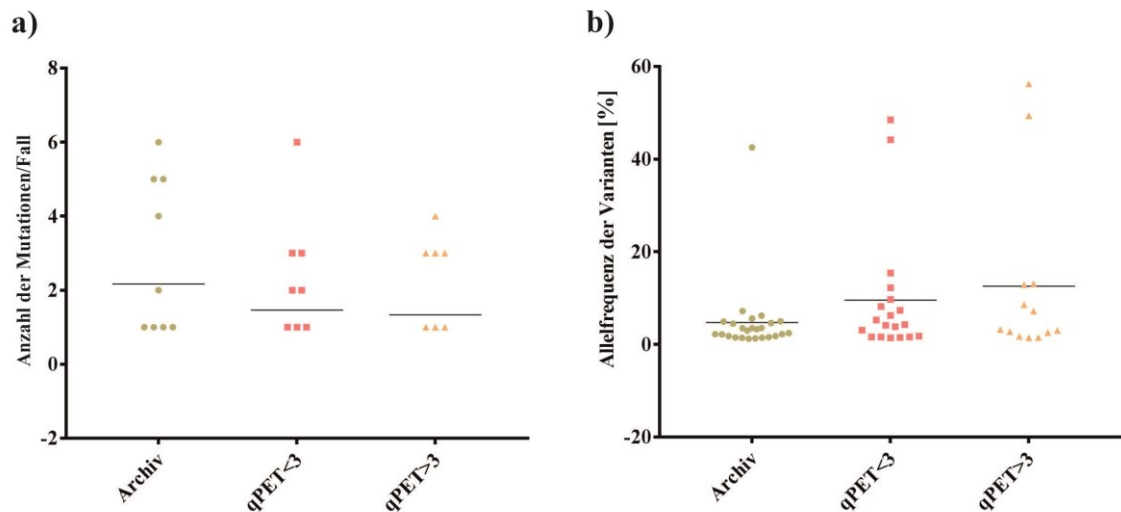


Abb. 7: Anzahl der Mutationen je Fall und Allelfrequenzen der potenziellen Varianten mit Keimbahn-Varianten, die im FFPE-Gewebe der 37 HL mittels Amplikon-basiertem tNGS-Verfahren detektiert wurden.

Es standen FFPE-Gewebe-Proben von insgesamt 12 Archivfällen und 25 pHL-Patienten aus der EuroNet-PHL-C1 und C2 Studie zur Verfügung, die in qPET < 3 (n = 13) und > 3 (n = 12)-Patienten unterteilt wurden. Patienten, bei denen keine Variante identifiziert wurde, waren unter a) und b) nicht inkludiert. Die Varianten wurden zuvor durch die *Variant Studio Software 2.2* (Illumina) gefiltert, wobei folgende Filterparameter eingestellt wurden: Qualitäts-Score >30 und Lesetiefe \geq 100 Sequenzen. Außerdem wurden die stillen Varianten und Varianten in nicht codierenden Bereichen herausgefiltert, da sie nicht interpretierbar waren. Im Anschluss wurden die gefilterten Varianten in einer Exceltabelle dargestellt und die Varianten, die in der ExAC Datenbank (*Exome Aggregation*

4. Ergebnisse

Consortium, Broad Institute) mit einer Populations-Allelfrequenz in der europäischen Bevölkerung von >0,1% vorkamen als SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), sogenannte Einzelnukleotid-Polymorphismen, von der weiteren Beurteilung ausgeschlossen. Zur Überprüfung der NGS-Varianten wurde das Programm *Integrative Genomics Viewer* (IGV, Broad Institute) herangezogen (3.2.3). In den 12 Archivfällen konnten insgesamt 24 Varianten, in den 13 qPET <3-Patienten insgesamt 19 Varianten und in den 12 qPET >3-Patienten insgesamt 13 Varianten identifiziert werden. Es konnten keine erheblichen Unterschiede zwischen den Archivfällen, den qPET <3 und den qPET >3-Patienten in Bezug auf die Anzahl der Mutationen je Fall (a) und der VAFs (b) identifiziert werden.

Da die Detektion von niederfrequenten Varianten problematisch ist, sollten die potenziellen Varianten validiert werden, um ihre Echtheit zu überprüfen. Für die Validierung wurden Sanger Sequenzierungen durchgeführt. Hierfür wurde auf einzelne HRS-Zellen zurückgegriffen, da der Tumoranteil im Gewebe der pHL bei durchschnittlich 1-5% liegt und durch Sanger Sequenzierung ausschließlich Varianten bei einem Tumoranteil >30% detektiert werden können. Außerdem konnte dadurch die Abstammung der Varianten den HRS-Zellen zugeordnet werden. Zunächst wurden hierfür je 30 einzelne CD30⁺-HRS-Zellen mikrodisssektiert, gepoolt und einem Proteinase K-Verdau unterzogen (3.4.1). Als Negativkontrollen wurden 30 einzelne CD30⁻-Zellen je Fall mikrodisssektiert, die in gleicher Weise behandelt wurden, wie die CD30⁺-HRS-Zellen. Anschließend wurden für jede Variante 2 Primerpaare (2 Vorwärtsprimer (US) und 2 Rückwärtsprimer (LS)) für die entsprechenden Regionen kreiert, da eine semi-genestete bzw. genestete PCR durchgeführt wurde (3.4.2). Im Anschluss daran fand mittels GeneAmp Fast PCR Master Mix eine 2 Runden-PCR mit je 30 Zyklen statt, bei der eine semi- bzw. genestete PCR durchgeführt wurde. Um die PCR-Reaktion im Anschluss zu kontrollieren, wurden die PCR-Produkte durch eine Agarose-Gelelektrophorese visualisiert. Vom Rest der PCR-Produkte wurden die freien Nukleotide und überschüssigen Primer durch eine enzymatische Aufreinigung mit ExoSap-It (Affymetrix) entfernt und die Sequenzierungs-PCR mittels BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt (3.4.3). Im Anschluss daran wurden die Sequenzierreaktionsprodukte durch DyeEx 2.0 Spin Säulen (Qiagen) aufgereinigt und in eine Sequenzierplatte, die zuvor mit Hi-Di Formamid (Thermo Fisher Scientific) versehen wurde, pipettiert, woraufhin sie im ABI 9600 Genetik Analyzer (Thermo Fisher Scientific) durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt wurden. Die Detektion erfolgte mittels farbstoffmarkierter Nukleotide, die durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt wurden. Zur Visualisierung der Sanger-Elektropherogramme wurde das Programm Sequence Scanner Software v1.0 (Thermo Fisher Scientific) und für die Editierung der Sequenzen das Programm CLC Sequence Viewer (Qiagen) verwendet. Anschließend konnten die Sequenzen mittels der BLAST-Software (*Basic Local Alignment Search Tool*) des NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) mit Datenbanken abgeglichen werden.

Für 12 der 26 zu validierenden Varianten konnten Banden im richtigen Längenbereich in der Gelelektrophorese visualisiert werden. Von diesen 12 Banden konnten von 7 auswertbare

Sequenzen generiert werden, wobei in drei der 7 Sequenzen keine Variante identifiziert werden konnte. Insgesamt konnten also 4 Varianten verifiziert werden, die 4 Gene betrafen: *B2M*, *CSF2RB*, *SOCSI* und *TNFAIP3*. Die Varianten sind im Anhang zusammengefasst (Anhang: Tab. 6).

Da nur 7 von 26 Proben, die mittels 30 mikrodisezierten HRS-Zellen aus FFPE-Gewebe und konventioneller Sanger Sequenzierung generiert wurden, auswertbar waren, musste davon ausgegangen werden, dass die Quantität und Qualität der DNA für die PCR nicht ausreichend war, weshalb 11 weitere Patienten mit 25 Varianten im Ganzschnitt mittels des Kapa Library Prep Kits mittels NGS (Ion Torrent, Ion PGM System) untersucht wurden. Bei dieser NGS-basierten Methode wurde mit dem sogenannten „KAPA-Fragment-Kit“ gearbeitet, um eine höhere Sensitivität zu generieren und niederfrequente Varianten auch im Ganzschnitt der pHL identifizieren zu können. Bei diesem Kit wird mit einer speziellen Polymerase gearbeitet, die eine 100x höhere Genauigkeit als die konventionelle Taq-Polymerase aufweist. Die Fehlerrate der KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase liegt bei einem Fehler in $3,6 \times 10^6$ bp, während dessen bei der konventionellen Taq-Polymerase die Fehlerrate bei einem Fehler in 1×10^5 bp liegt (107). Die spezielle Polymerase ist an einen AK gebunden, der die Polymerase zunächst stilllegt und so unspezifische Amplifikationen während des Pipettierens verhindert. Dadurch werden die Sensitivität und die Reaktionseffizienz erhöht.

Um die Sequenzierung von PCR-Produkten mittels NGS zu erlauben und Varianten im 1%-Bereich auch in Ganzschnitt-DNA detektieren zu können, musste hierfür zunächst für jede Variante 1 Primerpaar (1 Vorwärtsprimer (US) und 1 Rückwärtsprimer (LS)) für die entsprechenden Bereiche kreiert werden. Anschließend fand mittels Kapa HiFi Hot Start Ready Mix eine PCR mit Ganzschnitt-DNA mit 40 Zyklen statt. Um die PCR-Reaktion im Anschluss zu kontrollieren, wurden die PCR-Produkte durch eine Agarose-Gelelektrophorese visualisiert (3.4.2). Im Anschluss daran konnten die PCR-Produkte für die NGS-basierte Analyse mit Hilfe des Kapa Library Prep Kit vorbereitet werden (3.4.3). Nachdem die klonale Amplifikation im Ion OneTouch in einem Öl umschlossenen Wassertropfen (Mikroreaktionsraum) stattgefunden hatte, folgte die Sequenzierung, die auf der „Sequenzierung durch Synthese“ (SBS) basierte und im Ion PGM stattfand. Die Detektierung der eingebauten Nukleotide erfolgte durch die sogenannte Halbleiter-Technologie, bei der die Änderung des pH-Wertes gemessen wird, die bei der Freisetzung von Protonen beim Einbau eines Nukleotids während der Sequenzierungsreaktion entsteht (142). Für die anschließende Auswertung der Sequenzen wurden zunächst die Rohdaten durch den Ion Torrent Server prozessiert. Anschließend wurden die sequenzierten DNA-Fragmente mit dem Referenzgenom (hg19) durch ein *plugin* der Ion Torrent Plattform (Variant Caller) abgeglichen. Daraufhin erfolgte ein Abgleich der Positionen, die durch tNGS als mutiert identifiziert worden waren, mittels des IGVs (3.4.3).

Für alle 25 zu validierenden Varianten konnten Banden im richtigen Längenbereich in der Gelelektrophorese visualisiert werden. Von diesen 25 Banden konnten 25 auswertbare Sequenzen generiert werden, wobei in 21 der 25 Sequenzen keine Variante identifiziert werden konnte. Insgesamt konnten 4 Varianten durch das NGS-basierte Verfahren verifiziert werden, die 4 Gene betrafen: *SOCS1*, *B-cell CLL/lymphoma 7 protein family member A (BCL7A)*, *Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 3 (ITPR3)* und *Early Growth Response 1 (EGR1)* (Anhang: Tab. 6).

Es konnten also von insgesamt 32 potenziellen Varianten nur 8 Varianten validiert werden, weshalb der Fehler trotz des *dual-strand*-Verfahrens bei 75% lag.

Da bei allen Patienten eine hohe *read*-Anzahl bei den Sequenzierungsläufen generiert wurde, konnten die Fehler nicht auf eine schlechte Abdeckung zurückzuführen sein (Anhang: Tab. 5). Da die Abdeckung bereits sehr hoch war, ist zudem keine weitere Verbesserung möglich. Die Methode ist also trotz des *dual-strand*-Verfahrens zu fehleranfällig und eignet sich daher nicht zur Detektion niederfrequenter Varianten bei HL-Patienten aus DNA von Ganzschnitt-FFPE-Geweben.

4.1.2 Hybrid-capture-basierte Methode

Ein weiteres tNGS-Verfahren stellt die *hybrid-capture*-basierte Methode dar. Im Gegensatz zum Amplikon Verfahren basiert diese Methode auf der Generierung *unique reads*, die zu einer höheren Sensitivität beitragen. Außerdem werden bei der finalen Amplifikation statt 27 Zyklen (Amplikon-basiert) nur 14 Zyklen beim *hybrid-capture*-basierten Verfahren benötigt. Durch dieses Verfahren werden daher weniger PCR-Fehler generiert. Zudem können durch das *hybrid-capture*-basierte Verfahren zusätzlich genomische Translokations-Bruchpunkte und VDJ-Rekombinationen identifiziert werden. Anhand von Rekombinationsprodukten in Vorläuferzellen ist es möglich, das Differenzierungsstadium der Tumorzellvorläufer zu klassifizieren. Das für das *hybrid-capture*-basierte Verfahren selbst designte Panel war außerdem umfangreicher. Es beinhaltet eine Auswahl an Genen, die in Non-HL und HL am häufigsten mutiert sind. Da bekannt ist, dass einige Gene sowohl in Non-HL, als auch in HL mutiert sind, konnte durch dieses Panel untersucht werden, ob weitere Gene, die bereits in Non-HL als mutiert beschrieben wurden, auch in HL von Varianten betroffen sein könnten, um neue Pathogenese-Mechanismen der HL zu identifizieren.

In HL sind bislang kaum mutierte Gene bekannt. Da Non-HL besser erforscht sind und eine Vielzahl von mutierten Genen bekannt ist, wurden sie für die Etablierung der *hybrid-capture*-basierten Methode ausgewählt. Außerdem beinhalten sie generell viele Varianten und weisen einen hohen Tumorzellanteil auf. Zudem enthalten sie charakteristische Translokationen, die durch dieses Verfahren detektiert werden können.

Etablierung des Verfahrens mit Non-HL an FFPE-Gewebe

Zunächst wurde eine retrospektive Untersuchung von Non-HL durchgeführt, indem eine Auswahl unterschiedlicher Entitäten für die Identifizierung von SNVs, Indels, TLs und VDJ-Rekombinationen herangezogen wurden. Es wurde für die Etablierung und Testung der *hybrid-capture*-basierten Methode FFPE-Gewebe von insgesamt 95 Non-HL-Patienten verwendet, bei denen es sich um 34 DLBCL, 22 FL, 10 MM, 8 MZL (MALT), 7 BL, 8 MCL und 6 B-CLL handelte. Die Patienten wurden zufällig ausgewählt und repräsentieren das Vorkommen der Entitäten innerhalb des typischen Probeneingangs. Als Negativkontrollen wurden Biopsate von drei Patienten mit lymphofollikulärer Hyperplasie und 4 mit Lymphadenitis herangezogen.

Zunächst wurde die gDNA mit Hilfe des FFPE LEV DNA Purification Kit (Promega) isoliert (3.1.2). Die extrahierte gDNA hatte eine Durchschnittskonzentration von 158 ng/μl (Konzentrationsspanne: 3,1-611 ng/μl) und lag in einem Volumen von 50 μl vor. Für das *hybrid-capture*-basierte Verfahren sollten 4 ng/μl gDNA bzw. 200 ng DNA je Probe zu einem Volumen von insgesamt 50 μl mit einem Puffer aufgefüllt werden. Lag die Konzentration unter 4 ng/μl, wurden die Proben unverdünnt verwendet. Mittels TruSeq Exome Kit (Illumina) wurden anschließend Bibliotheken hergestellt, bei denen die finale Konzentration bei durchschnittlich 64 ng/μl (Konzentrationsspanne: 8-100 ng/μl) lag. Der Sollwert liegt bei mindestens 2 ng/μl.

Für das tNGS basierte *hybrid-capture* Verfahren wurden für die Etablierung der Methode alle Sequenzierungen mit dem MiSeq (MiSeq Reagent Kit v3, 300 bp *paired end reads*) durchgeführt. In Tab. 3, Anhang Tab. 7 und 8 sind die Laufcharakteristika für die untersuchten gDNA-Proben aufgeführt.

Je Lauf konnten 12 Proben untersucht werden. Relevante Parameter beim *hybrid-capture*-basierten Verfahren sind die mittlere Target Abdeckung der Basen durch unique Fragmente, für die je nach zu detektierender VAF unterschiedliche Werte angestrebt werden und bei den Non-HLs, bei denen eine hohe VAF erwartet wird, bei mindestens 100x liegen sollte. Die Anreicherung ist der prozentuale Anteil der erzeugten *reads*, die mit den zu detektierenden Zielregionen abgedeckt wurden. Die Zielregionen sind im Manifest definiert, die eine Datei im Textformat darstellt, die alle zu detektierenden Zielregionen beinhaltet, auf die das Programm zurückgreifen konnte, um sich auf einen bestimmten Bereich bei der Analyse zu beschränken. Die Anreicherung sollte mindestens 35% betragen. Die Uniformität der Abdeckung ist der prozentuale Anteil der Targets mit mindestens 20% der durchschnittlichen Abdeckung, die abgedeckt wurden, und sollte bei mindestens 80% liegen. Die >100x-Abdeckung der Targets wiederum gibt den prozentualen Anteil der Targets an, die eine Abdeckung >100x haben. Der Wert der >100x-Abdeckung sollte mindestens 90% betragen.

4. Ergebnisse

Tab. 3: Laufcharakteristika der 95 mittels des *hybrid-capture*-basierten Verfahrens untersuchten gDNAs von Non-HL-Patienten. Die Auswertung erfolgte mittels BaseSpace mit dem *Enrichment v3.0* Programm (Illumina) durch den *Isaac Aligner*.

Laufcharakteristika	Ø Werte (Bereich)
Cluster-Dichte	$1,3 \times 10^6$ Cluster pro mm^2 ($1,1 \times 10^6$ - $1,6 \times 10^6$ Cluster pro mm^2)
Q30	95,5% (92,4-96,7%)
Anzahl der Sequenzen/Probe	$2,3 \times 10^6$ Sequenzen (351.392- $4,4 \times 10^6$ -Sequenzen)
Durchschnittliche Target Abdeckung/Base	652x (101-1.479x)
Anreicherung	72% (44-81%)
Uniformität der Abdeckung	97% (83-99%)
>100x-Abdeckung der Targets	96% (43-99%)

Das Verfahren wurde zunächst an drei Patienten mit lymphofollikulärer Hyperplasie und 4 mit Lymphadenitis getestet. Die Krankheitsbilder sind eine Immunreaktion ohne Neoplasie, die nicht auf Varianten beruhen. Auch bei dieser Methode traten jedoch panelspezifische Varianten auf, die als Fehler gewertet wurden, die auf Taq-Fehler, schlecht zu sequenzierende Bereiche (GC-reiche Regionen oder repetitive Sequenzen) oder falschen Annotationen zurückzuführen sind. Anschließend konnte für das *hybrid-capture*-basierte Verfahren eine Fehlerliste erstellt werden, die für die Bewertung der Non-HL-Proben verwendet wurde.

Alle 95 untersuchten Non-HL-Patienten erfüllten die Qualitätsanforderungen. Es konnten in 93 von 95 untersuchten Patienten insgesamt 514 Varianten im Vergleich zu hg19 nachgewiesen werden.

Im nächsten Schritt sollte eine Unterscheidung zwischen somatische und Keimbahn-Varianten getroffen werden. Da Non-HL eine hohe VAF aufweisen, konnte aufgrund der VAF kein Ausschluss der Keimbahn-Varianten erfolgen. Daher wurde für die Keimbahn-Varianten-Bestimmung auf tumorfreies Material zurückgegriffen (3.4.1). Da nicht von allen Patienten tumorfreies Material zur Verfügung stand, konnten nur 26 von insgesamt 84 Patienten, die Varianten mit einer VAF von mindestens 35% hatten, auf Keimbahn-Varianten untersucht werden. Bei den restlichen 11 Patienten lagen alle identifizierten Varianten unter einer VAF von 35%. Von diesen 26 Patienten wurden alle Varianten untersucht, die eine VAF von mindestens 35% hatten.

Anschließend konnten die Bereiche mit den identifizierten Varianten mit den gleichen Bereichen des tumorfreien Materials verglichen werden, die mittels zuvor extrahierter gDNA mittels spezifischer Primer mit der Sanger-Sequenzierung generiert wurden (4.1.2).

Es konnten 18 von insgesamt 47 untersuchten Varianten als Keimbahn-Varianten im jeweiligen Referenz-Gewebe identifiziert werden (Anhang: Tab. 9, 10).

Da insgesamt 194 Varianten mit einer VAF von mindestens 35% identifiziert werden konnten und in 47 untersuchten Varianten mit einer VAF von mindestens 35% insgesamt 18 als Keimbahn-Varianten bestätigt wurden, ist abzuschätzen, dass ca. 74 Varianten der

194 Varianten, mit einer VAF von mindestens 35%, Keimbahn-Varianten sind, sodass der Anteil der Keimbahn-Varianten in den identifizierten Varianten bei ca. 14% liegt. Es sollte daher berücksichtigt werden, dass unter den 467 nicht auf Keimbahn-Varianten hin untersuchten Varianten nicht nur somatische Varianten, sondern auch ein nicht unerheblicher Teil Keimbahn-Varianten mit eingeschlossen sind.

Die Anzahl der Varianten lag ohne die identifizierten Keimbahn-Varianten je Fall mit Variante bei durchschnittlich 5,6 Varianten (1-30 Varianten) je Fall. Die Allelfrequenz der Varianten ohne die identifizierten Keimbahn-Varianten betrug im Mittel 34,3% (Bereich: 3,9-90,5%). *KMT2D* (40 Varianten), *CREBBP* (37 Varianten), *PIMI* (34 Varianten), *BCL2* (32 Varianten) und *MYC* (18 Varianten) waren die am meisten von Varianten betroffenen Gene dieses Kollektivs (Abb. 8 a, b), Anhang: Tab. 9).

Abb. 8: Übersicht aller identifizierter somatischer und Keimbahn-Varianten sowie Translokationen und VDJ-Rekombinationen der 95 Non-HL (FFPE-Gewebe), die durch das *hybrid-capture*-Verfahren untersucht wurden.

Die Varianten wurden mittels der *Variant Studio Software 2.2* (Illumina) gefiltert (Filterparameter: Qualitäts-Score >30, Lesetiefe ≥ 100 Sequenzen, Ausschluss der stillen Varianten und Varianten in nicht codierenden Bereichen). Daraufhin wurden die gefilterten Varianten, die in der ExAC Datenbank mit einer Populations-Allelfrequenz in der europäischen Bevölkerung von >0,1% vorkamen als SNP gewertet und von der weiteren Beurteilung ausgeschlossen. Zuletzt wurden die Varianten im IGV überprüft (3.2.3). Unter a) sind die Gene dargestellt, die insgesamt >3 fach von Varianten betroffen waren und unter b) die Gene, die <3 fach von Varianten betroffen waren.

Um die TL nachzuweisen, wurde die *Manta*-Analyse des *Enrichment v3.0*-Programmes verwendet. Die Identifikation von Fragmenten von klonalen VDJ-Rekombinationen wurde durch visuelle Inspektion der JH-Loci mit dem IGV durch die *hybrid-capture*-basierten Daten (3.2.1) vorgenommen. Gelb dargestellt sind die Austausch-Varianten, Rot die inaktivierenden Varianten (frameshift- und in-frame-Indels, Stop-Varianten, Varianten in Spleiß-Regionen) wobei eine erhöhte Intensität der Rotfärbung mit einer erhöhten Anzahl an inaktivierenden Varianten korreliert und Grün stellen die Hotspot-Varianten dar.

In BL, DLBCL, MCL und MZL konnten bei allen Patienten Varianten identifiziert werden, während in B-CLL, FL und MM jeweils ein Patient keine Variante beinhaltete. Die durchschnittliche Anzahl der Varianten bezogen auf die Patienten mit Varianten lag bei DLBCL mit 8,1 Varianten am höchsten, während die Anzahl der Varianten bei MM mit durchschnittlich 1,9 Varianten am geringsten war. Die durchschnittliche VAF war wiederum mit 47,5% beim MCL am höchsten, während die geringste durchschnittliche VAF mit 25,5% bei FL zu finden war. Der prozentuale Anteil der Fälle mit Varianten, die durchschnittliche Anzahl der Varianten und die durchschnittliche VAF werden je Entität in Tab. 4 aufgezeigt (Anhang: Tab. 9).

Tab. 4: Übersicht der Varianten bei den unterschiedlichen Entitäten, die in den gDNAs der 95 Non-HL durch das *hybrid-capture* Verfahren mit dem *Enrichment v3.0*-Programm detektiert wurden.

Non-HL Entität	Patienten mit Varianten (%)	Ø Zahl der Varianten (Bereich)	Ø VAF (Bereich) (%)
B-CLL	83	3 (1-6)	36 (10,9-90,5)
BL	100	5,7 (3-9)	41,6 (6,3-88,7)
DLBCL	100	8,1 (1-30)	32,8 (5-93,8)
FL	95	5,8 (1-16)	25,5 (7,7-78,5)
MCL	100	3 (2-5)	47,5 (10,4-79,9)
MM	90	1,9 (1-5)	43,9 (13,8-90)
MZL	100	2,3 (1-6)	38,9 (10,5-62,3)

Außerdem konnten insgesamt 24 typische HotSpot-Varianten in unterschiedlichen Genen (*EZH2*, *BRAF*, *NRAS*, *KRAS*, *MYD88*, *STAT6* und *ID3*) identifiziert werden (Abb. 8 a, b).

Zudem können durch das *hybrid-capture*-basierte Verfahren TL detektiert werden, was ein Vorteil gegenüber dem Amplikon-basierten Verfahren darstellt. Die TL konnten durch die im *Enrichment v.3.0* Programm integrierte *Manta*-Analyse detektiert werden. Das Programm erkennt durch Vergleich mit hg19 *reads*, die nur partiell passten, schnitt den nicht passenden Bereich aus und verglich diesen Bereich ein weiteres Mal mit hg19. Die detektierten TL-Bruchpunkte wurden anschließend in einer Tabelle aufgelistet. Da das Programm in der Detektion von TL limitiert ist, wurden die JH-Loci, sowie die *BCL11-2/-6* und *MYC*-Gene zusätzlich per Auge im IGV inspiziert. Es wurden speziell diese Gene zur Inspektion ausgewählt, da in Non-HL viele Cluster-Regionen, in denen diese Bruchpunkte mehrfach auftreten, bekannt sind. Wurden potenziell translozierte Gen-Abschnitte durch visuelle Inspektion gefunden, konnten sie mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) von NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) mit unterschiedlichen Datenbanken verglichen werden.

Außerdem wurden alle untersuchten Patienten zuvor durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) auf die für die jeweilige Entität typischen TL untersucht. Durch die FISH-Untersuchung werden routinemäßig Untersuchungen durchgeführt, bei der Fluoreszenz-markierte DNA-Sonden verwendet werden, die spezifisch an bestimmte DNA-Bereiche auf den Chromosomen binden und mittels Mikroskop ausgewertet werden können, um TL zu identifizieren. Es konnte daher die konventionelle FISH-Untersuchung mit dem tNGS-Verfahren verglichen werden.

Insgesamt wurden durch die tNGS-Analyse 59 TL-Bruchpunkte bei 56 untersuchten Patienten der 95 untersuchten Non-HL (Anhang: Tab. 10) identifiziert. 57 der identifizierten TL-Bruchpunkte wurden durch die Software ausgewertet und 2 Bruchpunkte per Auge identifiziert. Bei 52 TL handelte es sich um, für die jeweiligen Lymphome, typischen TL-Bruchpunkte, von denen 43 TL-Bruchpunkte mit der FISH-Analyse auswertbar waren. 9 Patienten, bei denen TL-Bruchpunkte durch tNGS identifizierten wurden, konnten durch die FISH-Analyse nicht ausgewertet werden, da aufgrund eines zu geringen Tumoranteils auf den Schnitten keine Signale generiert wurden. Außerdem konnte ein TL-Bruchpunkt, der zuvor mittels tNGS identifiziert wurde, nicht mittels FISH-Analyse detektiert werden. Dabei handelte es sich um eine *BCL2/IgH*-TL eines FL. Zudem konnten in 6 weiteren Patienten TL durch FISH identifiziert werden, die beim tNGS negativ waren (Tab. 5).

Außerdem traten zwei *BCL2*-TL (*IgHJ5/BCL2* und *IgHD2-21/BCL2*) in einem B-CLL-Lymphom auf, die nicht typisch ist für diese Entität. In den DLBCL wurden zwei seltene TL (*HSP90AA1/BCL6* und *IKZK1/BCL6*), sowie eine bislang noch nicht bekannte TL (*PAPSS2/chr14IgG3*) in den DLBCL und zwei bislang unbekannt TL (*IgH-Sm/IDH2*, *BCL6/MEF2C*) in FL identifiziert (Tab. 5).

4. Ergebnisse

Tab. 5: Vergleich zwischen tNGS- und FISH-Analyse sowie weitere detektierte TL-Bruchpunkte, die mittels gDNA aus FFPE-Gewebe durch die *hybrid-capture*-basierte Methode detektiert wurden.

Entität	Zahl der Fälle	Typische-TL	NGS				tNGS		
			NGS pos FISH pos	NGS pos FISH neg	NGS pos FISH n.a.	NGS neg FISH pos	Nicht typische TL	Seltene TL*	Neue TL
FL	22	BCL2/IgH	14	1	3	2			IgH-Sm/IDH2 IgH-BCL6/MEF2C
DLBCL	34	BCL2/IgH MYC/IgH BCL6/IgH	10 2 2		2 1	1 1 2		HSP90AA1/BCL6 IKZK1/BCL6	PAPSS2/chr14IgG3
BL	7	MYC/IgH	6		1				
B-CLL	6								IgHJ5/ BCL2 IgHD2- 21/ BCL2
MCL	8	BCL1/IgH	8						
MM	10								
MZL (MALT)	8	MALT1/ BIRC3			2				

*: seltene TL stellen TL dar, die in nicht mehr als einem Manuskript beschrieben wurden.

Zusammenfassend stellt die TL-Identifizierung durch tNGS ein effizientes Verfahren dar und scheint für Patienten, bei denen eine geringe Materialmenge zur Verfügung steht, geeigneter zu sein, als die konventionelle FISH-Untersuchung. Bei HL wurden bislang nur vereinzelt inaktivierende TL in IgH-Loci entdeckt. Diese tNGS-TL-Untersuchung stellt damit auch eine neue Möglichkeit dar, nicht bekannte TL-Partner in HL zu identifizieren.

Um den Differenzierungsstatus der Tumorzellen in Non-HL zu klassifizieren, wurden IgH-VDJ-Rekombinationen detektiert. Die Identifikation von Fragmenten von klonalen VDJ-Rekombinationen wurde durch visuelle Inspektion der JH-Loci mit dem IGV durch die *hybrid-capture*-basierten Daten (3.2.1) vorgenommen. Hierfür wurden die JH-Loci auf *reads* untersucht, die nur partiell passten. Wurden *reads* identifiziert, die in diesem Bereich nicht passend zu hg19 waren und die gleichen Veränderungen in mindestens zwei unterschiedlich langen DNA-Fragmenten vorkamen, wurden sie mit der IMGT/V-Quest-Datenbank (*The International Immunogenetics Information System*) auf VDJ-Rekombinationen hin

untersucht. Die IMGT/V-Quest-Datenbank ist eine spezifische Software zur Analyse von VDJ-Rekombinationen. Die Analyse konnte nicht mit der *Enrichment v.3.0*-Software vorgenommen werden, aufgrund der kurzen D- und J-Segmente, sowie der N-/P-Nukleotide in der CDR-III-Region. Die Analyse diente perspektivisch bzw. als Übung für die anschließende Untersuchung der HL und kann zudem durch Detektion der VDJ-Rekombinationen zum Grad der minimalen residuellen Resterkrankung (MRD: *minor residual disease*) bei Non-HL beitragen.

Es wurden alle 95 Non-HL-Patienten auf VDJ-Rekombinationen hin untersucht. Insgesamt konnten 35 klonale IgH-VDJ-Rekombinationen in 17% der B-CLL-, 86% der BL-, 32% der DLBCL-, 87,5% der MCL-, 10% der MM-, 50% der MZL- und 23% der FL-Patienten (Anhang: Tab. 11) identifiziert werden.

Da die Untersuchungen mit den Non-HL der Etablierung des *hybrid-capture*-basierten Verfahrens diente, wird an dieser Stelle nicht näher auf die Auswirkungen der Varianten und TL in Bezug auf die unterschiedlichen Pathogenese-Mechanismen eingegangen. Es konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass die *hybrid-capture*-basierte Methode ein sehr effizientes Verfahren darstellt, um SNVs, Indels, TLs und VDJ-Rekombinationen zu detektieren.

Etablierung des *hybrid-capture*-basierten tNGS an ccfDNA verglichen mit FFPE-Gewebe bei Non-HL

Da man bei den HL Varianten in gDNA, ohne vorherige Mikrodissektion, nur im sehr niederfrequenten Bereich (0,5-5% Mutationsfrequenz) erwartete und bei HL-Patienten ctDNA in ccfDNA bereits nachgewiesen wurde, wurde ausgetestet, ob ccfDNA zur Detektion von Varianten mittels *hybrid-capture*-basierter Methode ebenfalls geeignet ist.

Zur Etablierung wurde zunächst ccfDNA von Non-HL-Patienten verwendet, von denen bereits das jeweilige FFPE-Gewebe zur Etablierung des *hybrid-capture*-basierten Verfahrens genutzt wurde, sodass die Ergebnisse der gDNA aus FFPE-Gewebe mit der ccfDNA aus dem jeweiligen Blut der Patienten verglichen werden konnte, um zu untersuchen, wie effizient dieses Verfahren mit ccfDNA-Proben ist.

Es wurden insgesamt 12 Non-HL-Patienten untersucht, von denen sowohl gDNA, als auch ccfDNA vor Therapiebeginn zur Verfügung stand. Es handelte sich um 7 DLBCL, zwei FL, zwei MZL und ein MCL. Als Negativkontrollen wurde aus 12 Blutproben gesunder Probanden ccfDNA extrahiert.

Um die ccfDNA aus dem Blut zu extrahieren wurde mit dem QIAamp MinElute ccfDNA Midi Kit (Qiagen) gearbeitet. Die extrahierte ccfDNA hatte eine Durchschnittskonzentration von 4 ng/μl (Konzentrationsspanne: 0,5-6,6 ng/μl) in insgesamt je 30 μl Eluat, wobei keine Unterschiede zwischen den gesunden Probanden und den Patienten in Bezug auf die Konzentration der jeweiligen ccfDNA bestand. Es wurden durchschnittlich 25 ng/ml Plasma (Bereich: 2,5-57,3 ng/ml Plasma) gewonnen.

4. Ergebnisse

Es sollten 4 ng/μl für das *hybrid-capture*-basierte Verfahren verwendet werden bzw. 200 ng DNA je Probe zu einem Volumen von insgesamt 50 μl mit einem Puffer aufgefüllt werden. Lag die Konzentration unter den 4 ng/μl, wurde die ccfDNA unverdünnt verwendet. Mittels des TruSeq Exome Kits (Illumina) wurden anschließend Bibliotheken hergestellt. Die finale Konzentration bei den gDNA-Bibliotheken lag bei durchschnittlich 65 ng/μl (Konzentrationsspanne: 8-87 ng/μl) im Vergleich zu den ccfDNA-Bibliotheken, die bei 54 ng/μl (Konzentrationsspanne: 14,2-88,7 ng/μl) lagen. Der Sollwert der finalen Konzentration der gDNA und der ccfDNA liegt bei mindestens 2 ng/μl. Bei dem Vergleich der finalen Konzentrationen der Bibliotheken konnte gezeigt werden, dass ccfDNA für diese Analyse gut geeignet ist, da sie je Probe eine ausreichende finale Bibliothek-Konzentration enthielt.

Für das tNGS basierte *hybrid-capture* Verfahren wurden für die Etablierung der Methode alle Sequenzierungen mit dem MiSeq (MiSeq Reagent Kit v3, 300 bp *paired end reads*) durchgeführt. In Tab. 6 sind die Laufcharakteristika für die untersuchten gDNA und ccfDNA-Proben aufgeführt. Im Anhang sind die Lauf- und Bibliothekstatistik, sowie die klinischen Daten je Patient beschrieben (Anhang: Tab. 12).

Tab. 6: Laufcharakteristika der 12 mittels des *hybrid-capture*-basierten Verfahrens untersuchten gDNAs und ccfDNAs von Non-HL-Patienten. Die Auswertung erfolgte mittels BaseSpace mit dem *Enrichment v3.0* Programm (Illumina) durch den *Isaac Aligner*.

Lauf- charakteristika	gDNA Ø Werte (Bereich)	ccfDNA Ø Werte (Bereich)
Cluster-Dichte	1,3×10 ⁶ Cluster pro mm ² (1,1×10 ⁶ - 1,4×10 ⁶ Cluster pro mm ²)	1,4×10 ⁶ Cluster pro mm ² (1,3×10 ⁶ - 1,5×10 ⁶ Cluster pro mm ²)
Q30	95% (94,02-96,07%)	94,5% (93,4-95,2%)
Anzahl der Sequenzen/Probe	2,7×10 ⁶ (1,5×10 ⁶ -4,5×10 ⁶)	2,1×10 ⁶ (8×10 ⁵ -4,3×10 ⁶)
Durchschnittliche Target Abdeckung/Base	900x (478-1.157x)	609x (164-1.208x)
Anreicherung	77% (69-80,4%)	71% (50,5-80%)
Uniformität der Abdeckung	96,75% (93-98%)	97% (96-98%)
>100x- Abdeckung der Targets	97,5% (93-99%)	96% (85,5-98%)

Das Verfahren wurde zunächst an Negativkontrollen (12 ccfDNAs von Probanden ohne bekannte Varianten, Durchschnittsalter: 34,3 Jahre) getestet. Auch bei dieser Methode traten panelspezifische Fehler in den Negativkontrollen auf, die teilweise mit den zuvor durch FFPE-identifizierten Fehlern übereinstimmten, die auf Taq-Polymerase-Fehler, schlecht zu sequenzierende Bereiche (GC-reiche Regionen oder repetitive Sequenzen) oder falschen Annotationen zurückzuführen sind. Mittels dieser detektierten Varianten wurde auch für das

4. Ergebnisse

hybrid-capture-basierte Verfahren an ccfDNA eine Fehlerliste erstellt, die für die Bewertung der Non-HL-Proben verwendet wurde.

In allen 12 untersuchten Patienten wurden Varianten, sowohl in den FFPE-Geweben, die zuvor bereits untersucht wurden, als auch in den ccfDNAs identifiziert. Mittels FFPE-Gewebe konnten 115 und in den ccfDNAs 95 Varianten identifiziert werden. Die Anzahl der Varianten je Patient lag bei den FFPE-Geweben bei durchschnittlich 9,6 Varianten (Bereich: 3-28 Varianten) und bei den ccfDNAs bei 7,9 Varianten (Bereich: 2-28 Varianten) (Abb. 9 a). Insgesamt konnten bei dem Vergleich der 12 Patienten mit FFPE-Gewebe und ccfDNA 93 Varianten sowohl in den FFPE-Geweben (durchschnittliche VAF: 34,4% (Bereich: 0,1-84,5%)), als auch in den ccfDNAs (durchschnittliche VAF: 23,7% (Bereich: 0,1-53,2%)) detektiert werden (Abb. 9 b). 22 Varianten (durchschnittliche VAF: 34,1% (Bereich: 15,3-71,5%)) konnten nur in den FFPE-Geweben und zwei Varianten (VAF: 7% und 8,6%) nur in den ccfDNAs nachgewiesen werden. Eine genaue Gegenüberstellung der identifizierten Varianten von den FFPE-Geweben und den ccfDNAs ist für jeden Patient im Anhang aufgeführt (Anhang: Tab. 13). In den FFPE-Geweben konnten drei TL-Bruchpunkte nachgewiesen werden, während in den ccfDNAs zwei der drei TL-Bruchpunkte nachgewiesen werden konnten.

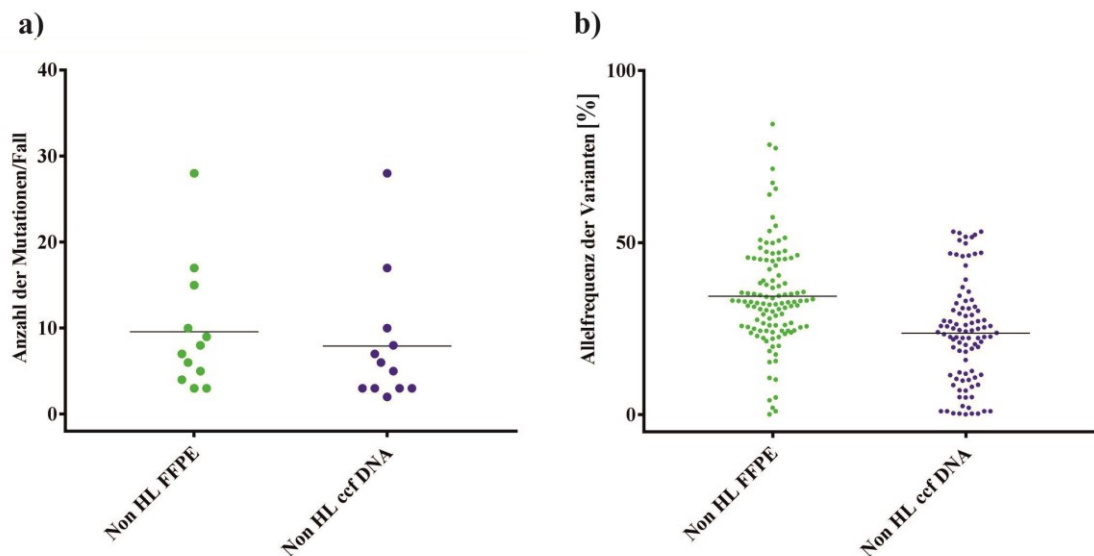


Abb. 9: Anzahl der Mutationen je Fall (a) und Allelfrequenzen (b) der identifizierten somatischen und Keimbahn-Varianten, die in der gDNA aus FFPE-Gewebe bzw. ccfDNA aus Blut der 12 Non-HL-Patienten durch das *hybrid-capture*-basierte tNGS-Verfahren identifiziert wurden.

Es konnte anhand dieses Vergleiches gezeigt werden, dass ein erheblicher Teil der Varianten, die bereits im FFPE-Gewebe detektiert wurden, auch durch die jeweiligen ccfDNAs identifiziert werden konnten. Das *hybrid-capture*-basierte Verfahren konnte somit als geeignete Methode für die Untersuchung der ccfDNA bei Non-HL-Patienten etabliert werden. Aufgrund der hohen

Erfolgsrate bei Non-HL, könnte das Verfahren auch bei HL aussichtsreich sein, weshalb dieses Verfahren in der Folge an ccfDNA von pHL-Patienten getestet wurde.

Validierung der Varianten, die durch FFPE-Gewebe und ccfDNA identifiziert wurden (Non-HL)

Da das *hybrid-capture*-basierte Verfahren bislang noch nicht an gDNA aus FFPE-Gewebe und ccfDNA aus Blut getestet wurde, sollten exemplarisch mittels *hybrid-capture*-basierten Verfahrens detektierter Varianten, trotz der für Non-HL typischen hohen VAF mit einem anderen Verfahren, verifiziert werden.

Zur Validierung der Varianten, die durch das *hybrid-capture*-basierte Verfahren in den Non-HL (eine stichprobenhafte Auswahl der untersuchten FFPE-Fälle, die für die Etablierung zuvor und bei dem Vergleich zwischen gDNA und ccfDNA verwendet wurden) identifiziert wurden, wurde mit dem NGS basierten Kapa-Library Prep Kit (Roche) und mit der konventionellen Sanger Sequenzierung gearbeitet. Beide Verfahren wurden bereits unter 4.1.1 genauer erläutert. Mit dem NGS-basierten Kapa-Library Prep Kit wurden insgesamt 12 Varianten aus 7 FFPE-Gewebe Fällen untersucht (Anhang: Tab. 14). 11 von 12 Varianten konnten durch die NGS-basierte Sequenzierung durch den Ion Torrent validiert werden.

Bei der Sanger Sequenzierung wurde mit dem GeneAmp Fast PCR Master Mix und dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit gearbeitet (3.4.1-3.4.3). Es wurden mittels Sanger Sequenzierung 29 Varianten von 18 Patienten untersucht. Es konnten alle untersuchten 29 Varianten validiert werden (Anhang: Tab. 15). Von den 18 mittels Sanger Sequenzierung untersuchten Patienten wurden insgesamt 17 Varianten in 6 Patienten mittels FFPE-Gewebe, sowie ccfDNA untersucht. Alle 17 Varianten konnten durch Sanger Sequenzierung im FFPE-Gewebe validiert werden. Von den 17 validierten Varianten wurden 16 Varianten sowohl in FFPE-Gewebe, als auch in ccfDNA nachgewiesen (Tab. 7).

Tab. 7: Übersicht zur Validierungsuntersuchung von insgesamt 40 Varianten in 25 Patienten, die zuvor mittels *hybrid-capture*-basiertem Verfahren in Non-HL detektiert und durch NGS (Kapa-Library Prep Kit) (n =7) und Sanger Sequenzierung (n =18) validiert wurden.

	NGS (Kapa Lib. Prep Kit)	Sanger Sequenzierung			
	FFPE- Gewebe aus Etablierung	insgesamt	FFPE- Gewebe aus Etablierung	Zuvor in FFPE/ ccfDNA identifiziert	Nur in FFPE- Gewebe und nicht in ccfDNA identifiziert
Anzahl der Fälle	7	18	12	6	1
Mutationen	11	29	12	16	1

Es konnte somit gezeigt werden, dass sich das *hybrid-capture*-basierte Verfahren für die Detektion von SNVs und Indels, sowohl für FFPE-Gewebe, als auch für ccfDNA-Analysen eignet.

Es wurden 27 durch tNGS detektierte TL von 21 Patienten für die Validierungsuntersuchung an gDNA aus Ganzschnitten herangezogen. Diese 27 TL wurden alle durch Sanger Sequenzierung untersucht. Dabei wurde mit dem GeneAmp Fast PCR Master Mix und dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit gearbeitet (3.4.1-3.4.3). Zuvor mussten spezifische Primer, die sich in den Bereichen der jeweiligen TL-Bruchpunkten befanden kreiert werden und es wurde eine 40 Zyklen PCR vorgenommen. Insgesamt konnten alle untersuchten 27 TL in den Non-HL validiert werden (Anhang: Tab. 16).

Außerdem wurden in drei Patienten, drei von drei VDJ-Rekombinationen mittels klonotypischer Primern in den VDJ-Regionen mittels 40 Zyklen PCR durch Sanger Sequenzierung in gDNA aus Ganzschnitten validiert (Anhang: Tab. 17).

Es konnten mittels Sanger Sequenzierung und dem NGS-basierten Kapa-Library Prep Kit insgesamt 97,5% der untersuchten Varianten und alle untersuchten TL und VDJ-Rekombinationen validiert werden. Damit wurde gezeigt, dass das *hybrid-capture*-basierte Verfahren für die Detektion von Varianten sowohl aus FFPE-Gewebe und auch indirekt für ccfDNA geeignet ist.

Vergleich zwischen FFPE und prä-therapeutischer ccfDNA bei pHL

Da das Amplikon-basierte Verfahren für pHL nicht geeignet war und die *hybrid-capture*-Methode bei den Non-HL an FFPE-Gewebe und ccfDNAs erfolgreich etabliert wurde, sollte

dieses Verfahren bei pHL angewendet werden und zunächst für gDNA aus FFPE-Gewebe und ccfDNA verglichen werden. Da bei den pHL, aufgrund des geringen Tumoranteils, eine geringe Allelfrequenz der Varianten erwartet wurde, wurde eine höhere Anzahl an Sequenzen generiert und damit eine höhere durchschnittliche Abdeckung erreicht. In aktuellen Publikationen wurden weitere von Varianten betroffene Gene identifiziert, weshalb das Panel um weitere Gene erweitert wurde (*CSF2RB, FOXO1, IGLL5, ITPR3, MYB, NFKBIA, NFKBIE, NUP214, PTPNI, TET, BTK, CXCR4, PLCG2, CIITA*) (75, 150). Die ältere Version wurde als „Version 1“ (Anhang: Tab. 2) und die neuere mit den zusätzlichen Genen als „Version 2“ bezeichnet (Anhang: Tab. 3).

Es wurden 12 Negativkontrollen in Form von ccfDNA aus Blut gesunder Probanden, bei denen keine Varianten erwartet wurden, mit der Version 2 mit Hilfe des *hybrid-capture*-basierten Verfahrens untersucht. Die Negativkontrollen wurden für die Erstellung der Fehlerliste des neu designten Panels, das zusätzliche Bereiche mit einschloss, benötigt, um im Anschluss diese Liste für die Bewertung der Varianten der pHL zu nutzen.

Es wurden insgesamt 11 Lymphknoten-Biopsate (FFPE-Gewebe) und 11 Blutproben (ccfDNA) von gleichen pHL-Patienten untersucht. Alle Patienten gehörten der C2-Studie (EuroNet-PHL) an. Das Alter der Patienten lag durchschnittlich bei 15 Jahren (Bereich: 8-18 Jahre) und der qPET lag durchschnittlich bei 2,3 (0-8,8). Die biologischen und klinischen Charakteristika wurden im Anhang dokumentiert (Anhang: Tab. 18).

Zunächst wurde die gDNA mit Hilfe des FFPE LEV DNA Purification Kit (Promega) aus FFPE-Ganzschnitten isoliert (3.1.2). Die extrahierte gDNA hatte eine Durchschnittskonzentration bei den FFPE-Geweben von 253,3 ng/μl (Konzentrationsspanne: 93,5-511 ng/μl) und lag in einem Volumen von je 50 μl vor. Um die ccfDNA aus dem prätherapeutischen Blut der gleichen Patienten zu extrahieren, wurde mit dem QIAamp MinElute ccfDNA Midi Kit (Qiagen) gearbeitet. Die extrahierte ccfDNA hatte eine Durchschnittskonzentration von 3,9 ng/μl (Konzentrationsspanne: 0,8-15,9 ng/μl) und umfasste je Probe 30 μl. Es wurden durchschnittlich 35,1 ng/ml Plasma (Bereich: 7,5-159 ng/ml Plasma) gewonnen. Es sollten 4 ng/μl für das *hybrid-capture*-basierte Verfahren verwendet werden bzw. 200 ng DNA je Probe zu einem Volumen von insgesamt 50 μl mit einem Puffer aufgefüllt werden. Lag die Konzentration unter den 4 ng/μl, wurde die ccfDNA unverdünnt verwendet. Mittels des TruSeq Exome Kits (Illumina) wurden anschließend Bibliotheken hergestellt, bei denen die finale Konzentration bei den gDNA-Bibliotheken bei durchschnittlich 61,7 ng/μl (Konzentrationsspanne: 27,6-85,7 ng/μl) und bei den ccfDNA-Bibliotheken bei 69,1 ng/μl (Konzentrationsspanne: 37,2-89,7 ng/μl) lag. Der Sollwert der finalen Konzentration der ccfDNA-Bibliothek liegt bei mindestens 2 ng/μl.

Für das tNGS basierte *hybrid-capture*-Verfahren wurden für den Vergleich Sequenzierungen mit dem MiSeq (MiSeq Reagent Kit v3, 300 bp *paired end reads*) und dem NextSeq (NextSeq

4. Ergebnisse

Reagent Kit v2.5, Mid- und High-Output, 300 bp *paired end reads*) durchgeführt. Die Laufcharakteristika sind für die untersuchten gDNAs und ccfDNAs in Tab. 8 aufgelistet. Im Anhang sind die Bibliothek- und Laufstatistiken je Fall beschrieben (Anhang: FFPE: Tab. 19, 20 und ccfDNA Tab. 21, 22).

Tab. 8: Laufcharakteristika der 11 mittels des *hybrid-capture*-basierten Verfahrens untersuchten gDNAs und ccfDNAs der gleichen pHL-Patienten. Die Auswertung erfolgte mittels BaseSpace mit dem *Enrichment v3.0* Programm (Illumina) durch den *Isaac Aligner*.

Lauf- charakteristika	gDNA Ø Werte (Bereich)	ccfDNA Ø Werte (Bereich)
Cluster-Dichte	$1,4 \times 10^6$ Cluster pro mm^2 ($1,2 \times 10^6$ - $1,5 \times 10^6$ Cluster pro mm^2)	$1,3 \times 10^6$ Cluster pro mm^2 ($1,1 \times 10^6$ - $1,5 \times 10^6$ Cluster pro mm^2)
Q30	94% (90-95%)	94% (92,5-96%)
Anzahl der Sequenzen/Probe	$2,7 \times 10^6$ ($1,2 \times 10^6$ - $3,4 \times 10^6$)	$2,5 \times 10^6$ ($1,5 \times 10^6$ - $4,3 \times 10^6$)
Durchschnittliche Target Abdeckung/Base	710x (338-1.128x)	690x (211-1.202x)
Anreicherung	68,8% (57-77%)	65,5% (35-80%)
Uniformität der Abdeckung	96,71% (92-98,1%)	96,5% (96-97%)
>100x- Abdeckung der Targets	97,55% (93-99%)	96,8% (92-98%)

Es konnten in 11 der 11 untersuchten Patienten im FFPE-Gewebe und in ccfDNA Varianten identifiziert werden. In den ccfDNAs wurden 67 Varianten und in den FFPE-Geweben 51 Varianten identifiziert.

Für die Bestimmung der Keimbahn-Varianten wurden zusätzlich konsekutive ccfDNA-Proben herangezogen, die aus Blutproben extrahiert wurden, die von den Patienten unter Therapie stammten. Es konnte beobachtet werden, dass niederfrequente Varianten unter Therapie in den konsekutiven ccfDNA-Proben wegfielen, während die Varianten mit hoher VAF weiterhin bestehen blieben. Unter der Annahme, dass die Therapie anschlägt, können durch den Vergleich der prä-therapeutischen ccfDNA und der konsekutiven ccfDNA des gleichen Patienten Keimbahn-Varianten von somatischen Varianten unterschieden werden. Somatische Varianten zeigen unter Therapie in den konsekutiven ccfDNAs einen Abfall der VAF. Keimbahn-Varianten persistierten wiederum bei 50%, weshalb Keimbahn-Varianten durch die konsekutiven ccfDNA-Proben im gleichbleibend hohen Allelfrequenz-Bereich identifiziert werden konnten. Dadurch konnten 14 der 67 Varianten in den ccfDNAs als Keimbahn-Varianten detektiert werden.

Die Anzahl der Mutationen je Fall mit Varianten betrug bei den FFPE-Geweben ohne Keimbahn-Varianten durchschnittlich 3,7 Varianten (1-5 Varianten) und bei den ccfDNAs im

Mittel 4,8 Varianten (1-9 Varianten). Die Allelfrequenz der Varianten lag ohne die Keimbahn-Varianten bei den FFPE-Geweben im Mittel bei 1,4% (0,1-4%) und den ccfDNAs aus Blut bei durchschnittlich 9,8% (1-42,3%) (Abb. 10 a, b). Im Anhang sind alle Varianten je Patient beschrieben (Anhang: Tab. 23).

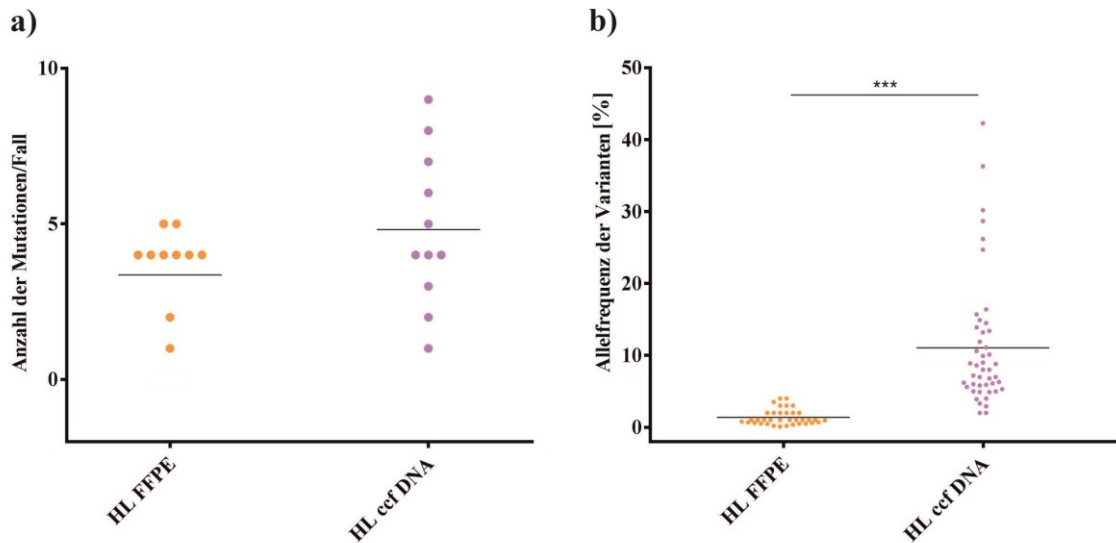


Abb. 10: Anzahl der Mutationen je Fall und Allelfrequenzen der identifizierten somatischen Varianten, die in den gDNAs aus FFPE-Gewebe bzw. ccfDNAs aus Blut der 11 pHL-Patienten durch das *hybrid-capture*-basierte tNGS-Verfahren identifiziert wurden.

Die Abbildung beinhaltet ausschließlich somatische Varianten. Proben, bei denen keine Variante identifiziert wurde, wurden unter a) und b) nicht dargestellt. In den FFPE-Geweben konnten insgesamt 37 somatische Varianten und in den ccfDNAs 53 somatische Varianten identifiziert werden (b) ***: $p < 0.001$: höchst signifikant). Durch den Vergleich zwischen gDNA aus FFPE-Gewebe und ccfDNA aus Blut der gleichen Patienten ist ersichtlich, dass in den ccfDNAs der pHL-Patienten mehr Varianten je Fall (a) mit einer höheren VAF (b) als in den jeweiligen FFPE-Geweben detektiert werden konnten.

Da durch die ccfDNAs bei pHL mehr Varianten mit einer signifikant höheren Allelfrequenz detektiert werden konnten, scheint ccfDNA die geeignetere Quelle zur Detektion somatischer Varianten bei pHL zu sein. Daher wurden alle weiteren Untersuchungen der pHL mit ccfDNA durchgeführt.

4.1.3 Untersuchungen der ccfDNAs von pHL mit einem qPET >3 und <3

Nachdem die *hybrid-capture* Methode als valide Methode mit ccfDNA bei pHL etabliert wurde, konnten qPET >3 und <3-Patienten auf ihre Varianten und dementsprechend auf ihre Pathogenese-Mechanismen untersucht werden.

Da in Deutschland pro Jahr etwa 180 Kinder und Jugendliche unter 18 Jahren an einem HL erkranken (14) und qPET >3- Patienten nur 5% aller pHL darstellen, sowie nur frisches Blut aus aktuell diagnostizierten Fällen, verwendet werden konnte, standen für diese prospektive Studie

4. Ergebnisse

insgesamt nur 22 Blutproben von pHL-Patienten zur Verfügung (inklusive der 11 Patienten aus dem Vergleich ccfDNA/FFPE-Gewebe der pHL), von denen 9 Patienten einen qPET >3 und 13 Patienten einen qPET <3 hatten. Der durchschnittliche qPET-Wert lag bei den qPET >3-Patienten bei 4,9 (3,3-8,8) und bei den qPET <3-Patienten bei 1 (0-1,8). Alle Patienten gehörten der C2-Studie (Euro-Net-PHL) an. Die Patienten mit einem qPET >3 hatten ein Durchschnittsalter von 12 Jahren (5-17 Jahren) und die qPET <3-Patienten ein Durchschnittsalter von 16 Jahren (11-18 Jahren). Das Geschlechtsverhältnis, der Subtyp, der EBV-Status, die Stadien-Einteilung und das Bulkvorkommen sind für die qPET <3- und >3-Patienten in Tab. 9 zusammengefasst (Anhang: Tab. 24).

Tab. 9: Patientendaten der 22 untersuchten pHL-Patienten

Patientendaten		Anzahl der Patienten	
		qPET <3	qPET >3
Anzahl der Patienten	insg.	13	9
Geschlecht	m	4	5
	w	9	4
Histologie Subtyp	NS	10	6
	MC	3	3
EBV-Status	neg	11	6
	pos	2	3
Stadium nach Ann Arbor	IIA	4	2
	IIIA	1	
	IIB	3	1
	IIIB	2	2
	IIBE	1	2
	IVAE	1	
	IVBE	1	2
Bulk	ja	7	8
	nein	6	1

Um die ccfDNA aus dem Blut zu extrahieren wurde mit dem QIAamp MinElute ccfDNA Midi Kit (Qiagen) gearbeitet. Die extrahierte ccfDNA hatte eine Durchschnittskonzentration von 2,3 ng/µl (Konzentrationsspanne: 0,2-15,9 ng/µl) und lag in einem Volumen von je 30 µl vor. Es wurden durchschnittlich 30 ng/ml Plasma (Bereich: 6,9-159 ng/ml Plasma) gewonnen.

Es sollten 4 ng/µl für das *hybrid-capture*-basierte Verfahren verwendet werden bzw. 200 ng DNA je Probe zu einem Volumen von insgesamt 50 µl mit einem Puffer aufgefüllt werden.

Lag die Konzentration unter den 4 ng/µl, wurde die ccfDNA unverdünnt verwendet.

Mittels TruSeq Exome Kit (Illumina) wurden anschließend Bibliotheken hergestellt, bei denen die finale Konzentration bei den ccfDNA-Bibliotheken im Mittel bei 66,4 ng/µl (Konzentrationsspanne: 20,8-137 ng/µl) lag. Der Sollwert der finalen Konzentration der ccfDNA-Bibliothek liegt bei mindestens 2 ng/µl.

4. Ergebnisse

Die Laufcharakteristika sind in Tab. 10 aufgeführt. Im Anhang befinden sich die Lauf- und Bibliothekstatistiken pro Fall (Anhang: Tab. 25-26).

Tab. 10: Laufcharakteristika der 22 mittels des *hybrid-capture*-basierten Verfahrens untersuchten ccfDNAs von pHL-Patienten. Die Auswertung erfolgte mittels BaseSpace mit dem *Enrichment v3.0* Programm (Illumina) durch den *Isaac Aligner*.

Laufcharakteristika	Ø Werte (Bereich)
Cluster-Dichte	$1,3 \times 10^6$ Cluster pro mm^2 ($1,1 \times 10^6$ Cluster pro mm^2 - $1,5 \times 10^6$ Cluster pro mm^2)
Q30	95% (93-96%)
Anzahl der Sequenzen/Probe	$2,8 \times 10^6$ ($5,5 \times 10^5$ - $4,7 \times 10^6$)
Durchschnittliche Target Abdeckung/Probe	741x (147-1.455x)
Anreicherung/Probe	67% (35-80%)
Uniformität der Abdeckung/Probe	97% (95-98%)
>100x-Abdeckung der Targets/Probe	96% (84-99%)

In den ccfDNAs konnten insgesamt in 19 von 22 Patienten 124 Varianten detektiert werden, bei denen es sich um 40 Indels und 84 SNVs handelte. 21 Varianten konnten als Keimbahn-Varianten, durch den gleichbleibend hohen Allelfrequenz-Bereich, in den jeweiligen konsekutiven ccfDNAs identifiziert werden, während somatische Varianten durch Wegfall in den konsekutiven ccfDNAs bzw. abnehmender Allelfrequenzen gekennzeichnet waren. Die Anzahl der Mutationen je Fall mit Varianten lag durchschnittlich bei 5,4 Varianten (1-12 Varianten). Die Allelfrequenz betrug im Mittel 17,3%, wobei der Allelfrequenzbereich bei 1-57,6% lag (Anhang Tab. 23).

Von Varianten betroffene Gene

SOCSI (65), *B2M* (69) und *TNFAIP3* (77) waren mit 26, 10 und 8 Varianten die am häufigsten mutierten Gene in 13, 6 und 8 Patienten (Abb. 11, Anhang: Tab. 27). Sie spielen sowohl in der Immunevasion, als auch in unterschiedlichen Signalwegen eine wichtige Rolle. Zudem wurden HotSpot-Varianten in insgesamt drei Patienten identifiziert. Die bekannten HotSpot-Varianten betrafen zwei Gene: *STAT6* und *XPO1*. Die *XPO1*-HotSpot-Variante lag auf AS 571, während die HotSpot-Varianten in *STAT6* AS 417, 419 und 421 betrafen.

4. Ergebnisse

Subtyp	Nodulär-sklerosierender Subtyp											Mischtyp						n				
	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos		neg	pos	neg	neg
EBV	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg	pos
Alter	17	11	17	15	16	18	16	15	16	16	14	14	10	15	16	13	8	17	5	17	17	14
Geschlecht	w	w	w	m	w	w	w	m	w	w	w	w	m	m	m	w	w	m	m	m	w	m
Stadium	IIBE	IIA	IIA	IIIB	IVAE	IIB	IIA	IIB	IIIB	IIB	IIA	IIA	IVBE	IIB	IVBE	IIIB	IIBE	IIIB	IIBE	IIIA	IVBE	IIA
Bulk	ja	nein	ja	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	nein	ja
qPET	1,1	0,8	1,1	1,1	1,4	0,9	0	1,2	1,2	1,3	7,7	4,3	4,7	3,9	3,3	3,8	8,8	4,1	3,3	0	1,8	1,2
Fall-Nr.	100	101	105	106	107	108	110	113	115	116	102	112	117	119	120	121	103	114	118	104	109	111
VDJ oder DJ	1						1	1	1								1			1	1	7
TL																	1					1
SOCS1	2										2	2			2	3	2					2
B2M	2														2		2					
TNFAIP3																						
STAT6															2							
IGLL5															4							
ITPKB																						
GNAI3																						
BTG1																					3	4
ARID1A																						
HLA-A																						
HIST1H1E																						
LTB															2							
TBL1XR1																						
TMEM30A																						
XPO1																						
IRF4																						
IRF8																						
MAP2K																						
PIM1																						
CD83																						
CDH2																						
KLHL6																						
TP53																						
ACTG1																						
BIRC3																						
KMT2D																						
PRDM1																						
SPEN																						
CDK4																						
NOTCH1																						
KLF2																						
n	5	3	4	4	2	1	4	5	2	0	7	10	0	0	12	11	8	4	3	6	9	3

Abb. 11: Übersicht aller identifizierter somatischer Varianten, sowie Translokationen und VDJ/DJ-Rekombinationen der 22 pHL (ccfDNA aus Blut), die durch das *hybrid-capture* Verfahren untersucht wurden. Es konnten insgesamt 103 somatische Varianten, eine Translokation und 7 VDJ/DJ-Rekombinationen in den 22 untersuchten pHL-Patienten detektiert werden. Gelb dargestellt sind die Austausch-Varianten, Rot die inaktivierenden Varianten, wobei eine erhöhte Intensität der Rotfärbung mit einer erhöhten Anzahl an inaktivierenden Varianten korreliert und Grün stellen die Hotspot-Varianten dar. Die Zahlen geben die Anzahl der Varianten an, wenn ein Gen mehrfach in einem Patient vom gleichen Variantentyp betroffen war. Die qPET >3-Patienten sind rot markiert.

4. Ergebnisse

HLs sind durch einen geringen Tumoranteil gekennzeichnet, weshalb eine Verifizierung der Varianten, die in den ccfDNAs identifiziert wurden auch nochmals bei den pHL durchgeführt wurde, nachdem eine Verifizierung in gleicher Form bereits bei den Non-HL-Patienten vorgenommen wurde. Zur Validierung der Varianten wurde mit der konventionellen Sanger Sequenzierung gearbeitet (3.4.1-3.4.3). Dieses Verfahren wurde bereits unter 4.1.1 genauer erläutert. Es wurde für die Verifizierung der Varianten 11 Patienten, bei denen 23 Varianten in der ccfDNA identifiziert wurden, herangezogen. Alle Varianten wurden mindestens mittels zwei unterschiedlicher Aliquots durch Mikrodissektion validiert. Es konnten alle 23 Varianten in den 11 Patienten durch die mikrodisssektierten HRS-Zellen validiert werden. Eine detaillierte Beschreibung der identifizierten somatischen- und Keimbahn-Varianten, sowie der validierten Varianten je Patient befindet sich im Anhang (Anhang: Tab. 27).

Nachweis eines TL-Bruchpunktes

Es konnten TL-Bruchpunkte durch die im *Enrichment v.3.0* Programm integrierte *Manta*-Analyse nachgewiesen werden. Das Vorgehen wurde bereits unter 4.1.2 genauer beschrieben. Es konnte in einem der 22 untersuchten Patienten ein TL-Bruchpunkt identifiziert werden (Abb. 12). Dabei handelte es sich um eine TL zwischen *IgH-Switch-Region gamma 2* und *AICDA* (t(12;14)(8.763.761;106.329.978)), die wahrscheinlich inaktivierend ist, da das Leseraster von *AICDA* durch den TL-Bruchpunkt zerstört wurde.

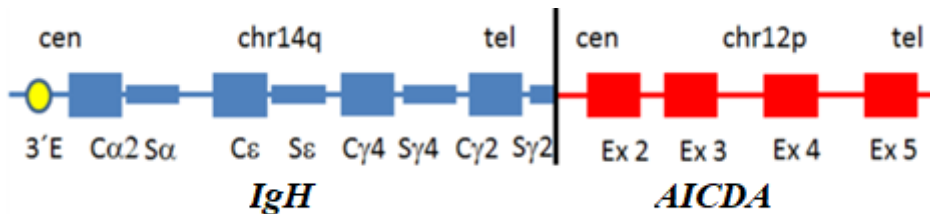


Abb. 12: *IgH-Switch-Region gamma 2/AICDA*-Translokation in einem der 22 untersuchten pHL-Patienten, detektiert mittels *hybrid-capture*-basiertem tNGS-Verfahren

Translokationen konnten mittels der *Manta*-Analyse des *Enrichment v3.0*-Programmes identifiziert werden. Die Daten wurden als SV.vcf.gz-Dateien zur Verfügung gestellt. Durch den Vergleich der spezifischen Zielregionen mit einer Referenz (hg19) konnte das Programm *reads* erkennen, die nur partiell passten. Der nicht zu hg19 passende Bereich, wurde abgeschnitten und als getrennte einzelne Sequenz ein weiteres Mal mit hg19 abgeglichen. Zuletzt wurden die detektierten Bereiche mit dem IGV visualisiert. Es konnte durch dieses Verfahren eine TL (*IgH-Switch-Region gamma 2/AICDA*) in einer der 22 untersuchten ccfDNAs der pHL-Patienten identifiziert werden.

Zur Validierung der TL, die mittels ccfDNA identifiziert wurde, wurde mit der konventionellen Sanger Sequenzierung gearbeitet (3.4.1-3.4.3). Dieses Verfahren wurde bereits unter 4.1.1 genauer erläutert. Die TL wurde durch mikrodisssektierte HRS-Zellen mittels zwei

unterschiedlicher Aliquots validiert. Somit stellt dieses Verfahren auch eine geeignete Möglichkeit dar, um TL in HL zu identifizieren.

VDJ-Rekombinationen in den pHL-Patienten

Um den Differenzierungsstatus der Vorläuferzelle der HRS-Zellen zu beschreiben, wurden die pHLs auf VDJ-Rekombinationen untersucht. Das Verfahren wurde bereits unter 4.1.2 genauer erläutert, wobei sowohl für kurze, als auch für lange Amplifikate klonotypische Primer designt wurden. Es wurden insgesamt in 7 pHL-Patienten 5 VDJ und zwei DJ-Rekombinationen identifiziert, die alle durch mikrodissektierte HRS-Zellen durch Sanger Sequenzierung verifiziert werden konnten. Das Verfahren wurde bereits unter 4.1.1 genauer erläutert. Die Tabelle der detektierten VDJ/DJ-Rekombinationen ist im Anhang abgebildet (Anhang: Tab. 28). Sowohl kurze, 14-27 bp lange Amplifikate als auch 34-72 bp lange Amplifikate der VDJ-Rekombinationen trugen Anzeichen von SHM bei einer durchschnittlichen VAF von 7,6%. Durch das Verhältnis von Austausch- zu stillen Varianten konnte zudem gezeigt werden, ob die VDJ-Umlagerungen selektiert sind. Ein Verhältnis von 1,5 und kleiner spricht für selektierte VDJ-Umlagerungen. In den identifizierten VDJ-Umlagerungen der untersuchten pHL-Patienten lag das Verhältnis bei 2,1 (29/14) von Austausch- zu stillen Varianten in den *Framework*-Regionen. Zudem wurde eine Stop-Variante in einer *Framework*-Region in den 5 potenziell funktionalen VDJ-Umlagerungen identifiziert. Dies weist darauf hin, dass die VDJ-Umlagerungen der pHLs nur partiell selektiert sind. Es konnte somit gezeigt werden, dass die HRS-Zellen der pHLs von partiell selektierten GC-Zellen abstammen.

Vergleich zwischen qPET >3 und <3-Patienten

Bei den qPET >3-Patienten konnten in insgesamt 7 von 9 Patienten 55 somatische Varianten identifiziert werden, bei denen es sich um 16 Indels und 39 SNVs handelte. Bei den qPET <3-Proben wurden in 12 von 13 Patienten 48 somatische Varianten detektiert, bei denen es sich um 9 Indels und 39 SNVs handelte. In Tab. 11 wurden die qPET >3- und <3-Patienten in Bezug auf die durchschnittliche Anzahl der Varianten und die durchschnittliche VAF verglichen. Es fiel auf, dass die Anzahl der Varianten je Patient bei den qPET >3-Patienten höher war (Abb. 13 a). Die Allelfrequenzen bei den qPET >3 und <3-Patienten waren ähnlich verteilt und zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 13 b).

4. Ergebnisse

Tab. 11: Übersicht zur durchschnittlichen Anzahl der Mutationen je Fall sowie der VAFs der qPET <3 (n= 13) und >3 (n= 9) pHL-Patienten, die mittels ccfDNA durch das *hybrid-capture*-basierte Verfahren untersucht wurden.

	qPET <3	qPET >3
Durchschnittliche Anzahl der Mutationen/Fall	4 Mutationen (1-9 Mutationen)	7,8 Mutationen (3-12 Mutationen)
Durchschnittliche VAF	11,1% (0,1-42,3%)	10,4% (1-34,2%)

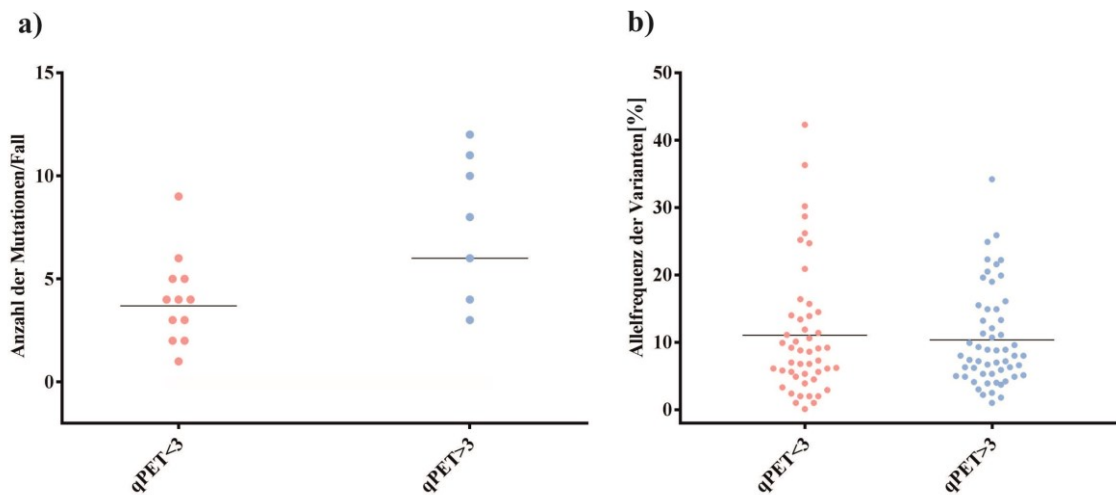


Abb. 13: Anzahl der Mutationen je Fall und Allelfrequenzen der identifizierten Varianten, die in den ccfDNAs aus Blut der 22 pHL-Patienten mittels *hybrid-capture*-basiertem tNGS-Verfahren identifiziert wurden.

Proben, bei denen keine Variante identifiziert wurde, waren unter a) und b) nicht inkludiert. In den ccfDNAs der qPET >3-Patienten (n =9) konnten insgesamt 55 Varianten und in den ccfDNAs der qPET <3-Patienten (n =13) insgesamt 48 Varianten identifiziert werden. Es ist ersichtlich, dass die Anzahl der Mutationen je Fall bei den qPET >3-Patienten durchschnittlich tendenziell höher war, als bei den qPET <3-Patienten (a). Die durchschnittlichen VAFs bei den qPET >3 und <3-Patienten wiesen dagegen keine erheblichen Unterschiede auf (b).

Es ist bereits bekannt, dass bei HL der JAK/STAT-, PI3K/AKT- und der NFκB-Signalweg durch Varianten in Genen, die in den unterschiedlichen Signalwegen eine Rolle spielen, verändert ist. Zudem wurden unterschiedliche Varianten mit einer veränderten AG-Präsentation und aberranten epigenetischen Modifikationsmechanismen in Verbindung gebracht. Es konnten sowohl in den qPET <3, als auch in den qPET >3-Patienten Varianten in *SOCS1* und *STAT6* identifiziert werden, die eine Rolle im JAK/STAT-Signalweg spielen. Zudem konnten in qPET <3 und >3-Patienten Varianten in *GNAI3* und *ITPKB* identifiziert werden, die ein Bestandteil des PI3K/AKT-Signalweges darstellen. Außerdem wurden in qPET < 3 und >3-Patienten Varianten in *TNFAIP3* und in einem qPET <3-Patienten eine *BIRC3*-Mutation, die im Zusammenhang mit dem NFκB-Signalweg stehen, detektiert. Bei der AG-Präsentation spielen unter anderem die Gene *B2M*, *HLA-A* und *CD83* eine entscheidende Rolle. *B2M*- und *HLA-A*-

4. Ergebnisse

Varianten konnten sowohl in qPET >3, also auch in qPET <3-Patienten identifiziert werden, während eine *CD83*-Variante nur in einem qPET >3-Fall detektiert werden konnte. Zudem konnten Varianten in dem Gen *ARID1A* in den qPET >3 und <3-Patienten identifiziert werden, sowie jeweils eine Variante in *KMT2D* und *TBL1XR1* in den qPET <3 und eine Variante in *HIST1H1E* in einem qPET >3-Fall, die im Zusammenhang mit epigenetischen Modifikationsmechanismen stehen. Es konnte durch den Vergleich des prozentualen Anteils der qPET <3 und >3-Patienten, die Varianten tragen, die in den unterschiedlichen Signalwegen und zellulären Funktionen eine Rolle spielen, gezeigt werden, dass die meisten identifizierten Varianten an der AG-Präsentation und dem JAK/STAT-Signalweg beteiligt sind, wobei in den qPET >3-Patienten, im Vergleich zu den qPET <3-Patienten vermehrt Patienten Varianten tragen, die eine Rolle bei der AG-Präsentation spielen (Abb. 14).

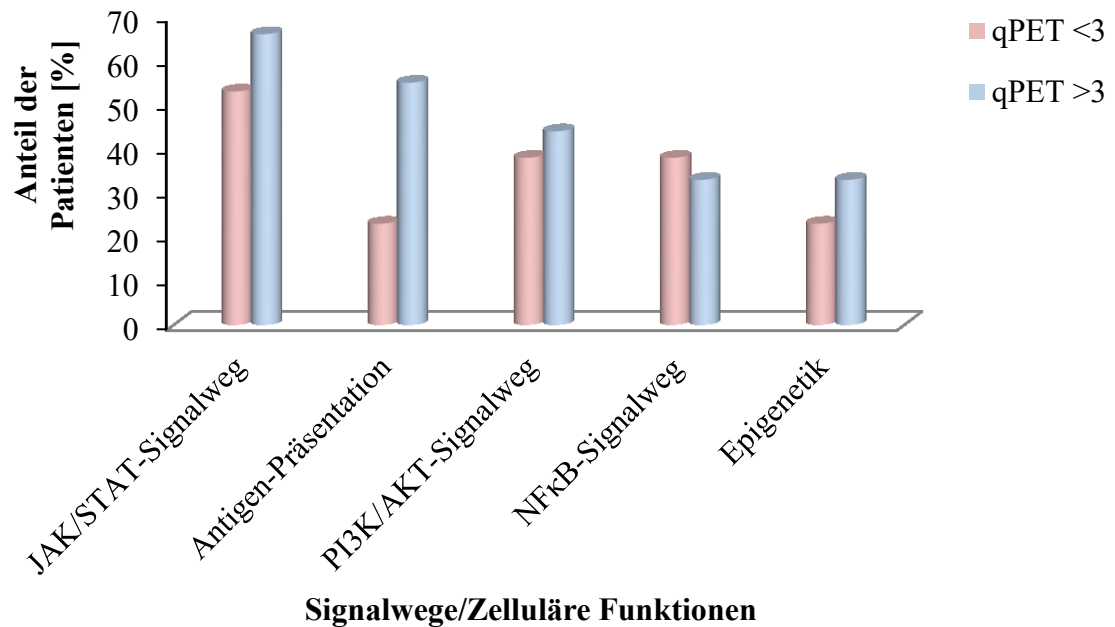


Abb. 14: Prozentualer Anteil der Patienten, die Varianten in Genen tragen, die in unterschiedlichen Signalwegen und zellulären Funktionen eine Rolle spielen, unterteilt in qPET <3 (n=13)- und >3- (n=9) Patienten.

Bei dem JAK/STAT-, PI3K/AKT- und NFκB-Signalweg, sowie in epigenetischen Modifikationsmechanismen (Epigenetik) traten keine erheblichen Unterschiede in Bezug auf den prozentualen Anteil der Patienten, die Varianten in den jeweiligen Genen tragen, zwischen qPET <3 und >3-Patienten auf. Allerdings konnte ein Unterschied zwischen den qPET <3 und >3-Patienten in Bezug auf den prozentualen Anteil der Patienten, die Varianten in Genen tragen, die mit der AG-Präsentation zusammenhängen, identifiziert werden. Rosa dargestellt sind die qPET <3- und Blau die qPET >3-pHL-Patienten.

JAK/STAT-Signalweg (*SOC31*, *STAT6*), AG-Präsentation (*B2M*, *HLA-A*, *CD83*), PI3K/AKT-Signalweg (*GNA13*, *ITPKB*), NFκB-Signalweg (*TNFAIP3*, *BIRC3*) und Epigenetik (*ARID1A*, *KMT2D*, *HIST1H1E*, *TBL1XR1*).

4.1.4 Therapiemonitoring mit ccfDNA der pHL-Patienten

In einer Studie konnte bereits gezeigt werden, dass ccfDNA für molekulares Monitoring von B-Zell-Lymphomen geeignet ist (124) und im Vergleich zu gDNA aus PBMC in multiplen Myelomen oder DLBCL für Ig-HT-NGS (*immunoglobulin-high-throughput-Next Generation Sequencing*) eine höhere Sensitivität verspricht (125–127). Außerdem konnte bei DLBCL-Patienten gezeigt werden, dass die Identifizierung von Varianten aus ccfDNA durch tNGS eine valide Methode für das Monitoring darstellt (128,129). Daher wurde untersucht, ob ccfDNA aus pHL auch für das Therapiemonitoring dieser Patienten geeignet ist. Hierfür wurden die ccfDNAs aus Blutproben vor, während und nach der Chemotherapie von 10 qPET <3 und 6 qPET >3-Patienten verwendet. Um die Sensitivitätsgrenze festzulegen, wurden Hintergrundfehler-Sequenzen von 90 ccfDNA-Varianten vor der Therapie in ccfDNA von 10 gesunden Probanden untersucht und deren Hintergrundlevel bestimmt. Dieses Level lag bei durchschnittlich 0,09% (0,007%-0,16%) und wurde anschließend mit 5 multipliziert, um einen ausreichenden Sicherheitsabstand zu erhalten, sodass die Sensitivitätsgrenze letztlich auf >0,5% VAF festgelegt wurde. Es fiel auf, dass bei den 10 qPET <3-Patienten die 48 Varianten nach dem ersten Zyklus der Chemotherapie unter der Nachweisgrenze waren (Abb. 15), während 30 der 55 Varianten nach dem ersten Block der Chemotherapie (Tag 29 und Tag 57) bei 4 der 6 qPET >3-Patienten weiterhin bestehen blieben (Abb. 16). Die VAF lag bei den qPET <3-Patienten vor der Therapie bei durchschnittlich 11% (0,6-42,3%), während bei den qPET >3-Patienten die VAF vor der Therapie bei 10,4% (1-34,2%) und an Tag 29 bei 1,4% (0,6-2,55%) lag.

4. Ergebnisse

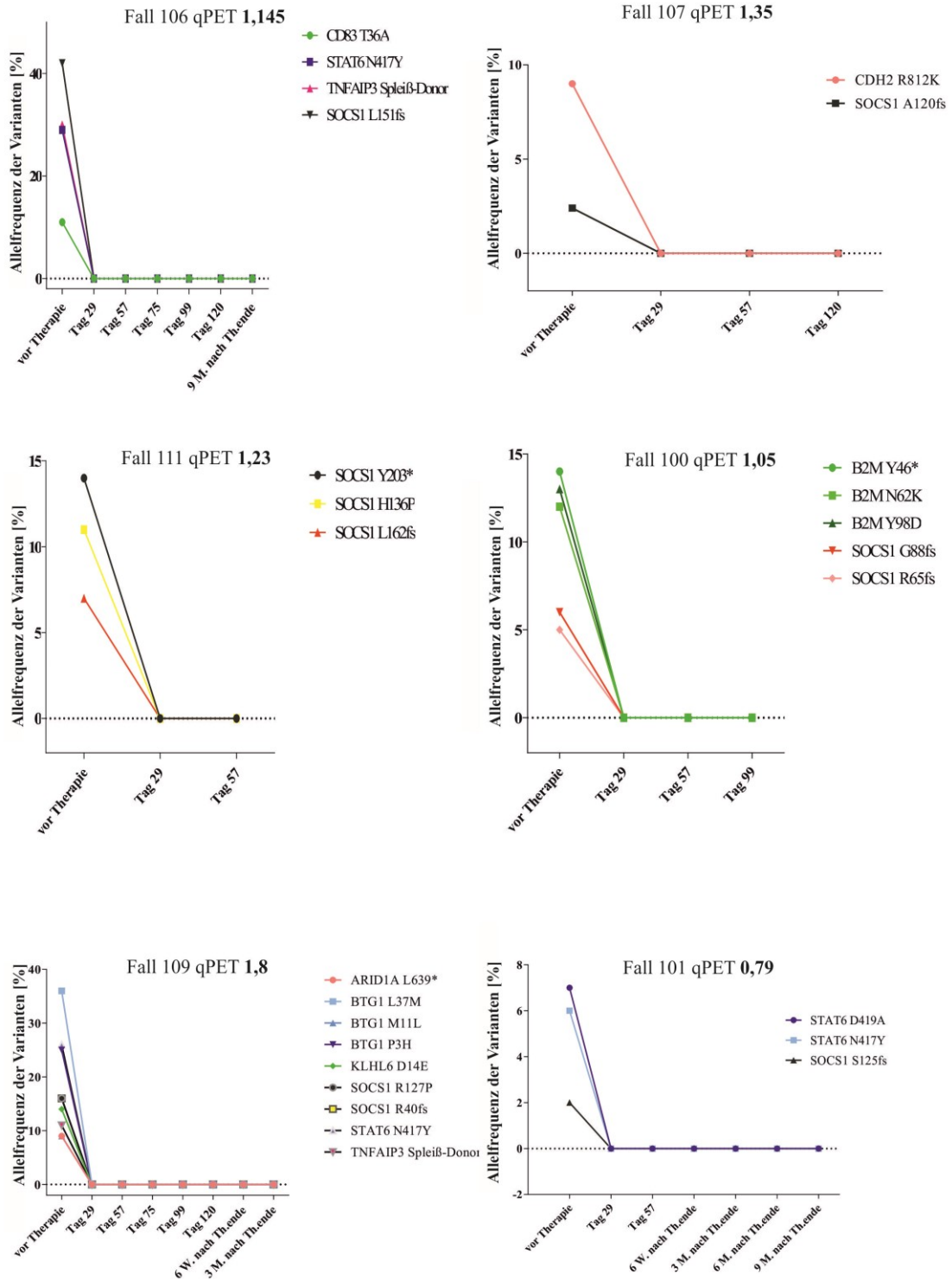


Abb. 15: Detektion von somatischen Varianten in cfDNA bei 6 qPET <3 pHL-Patienten vor Therapie und im Therapieverlauf.

Die unterschiedlichen VAFs wurden mittels *hybrid-capture*-basiertem-tNGS-Verfahren in aufeinanderfolgenden Proben einzelner Patienten mit dem gleichen Panel bestimmt, das auch für Proben vor der Therapie verwendet wurde. Die Nachweisgrenze lag bei 0,5% für alle Varianten. Zudem wurden nur Varianten mit einer mindestens 200x Abdeckung in aufeinander folgenden cfDNA-Proben als informative Variante angesehen. Die verschiedenen Varianten werden in unterschiedlichen Farben dargestellt.

4. Ergebnisse

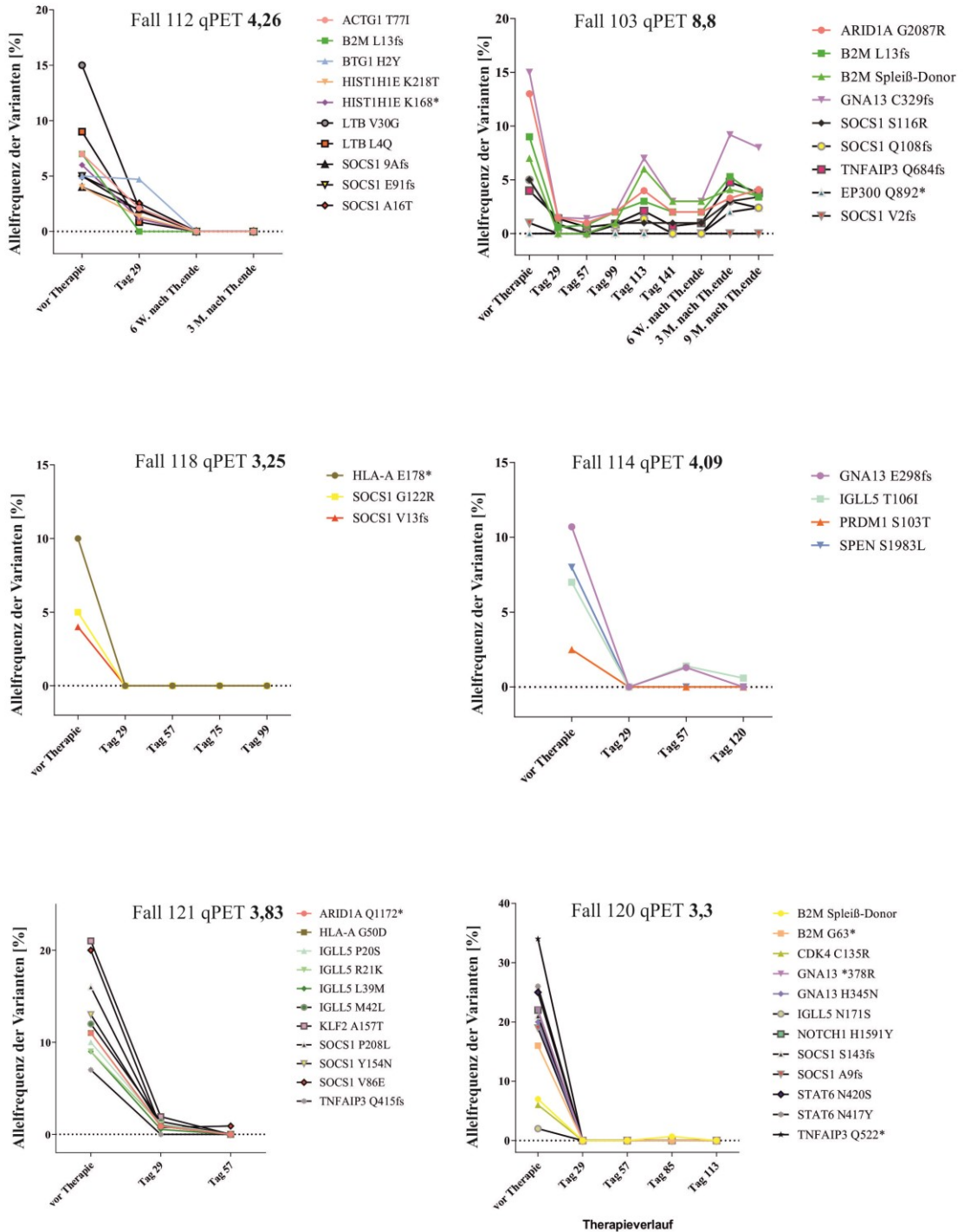


Abb. 16: Detektion von somatischen Varianten in ccfDNA bei 6 qPET >3 pHL-Patienten vor Therapie und im Therapieverlauf.

Es konnte gezeigt werden, dass ccfDNA für das Therapiemonitoring bei pHL-Patienten wahrscheinlich geeignet ist und der qPET-Wert ein valider Faktor darstellt, um bereits frühzeitig das Therapieansprechen vorherzusagen.

4.2 Pikrosiriusrot-Färbungen bei qPET >3 und <3-Patienten

Das Mikromilieu der HRS-Zellen ist wichtig für das Ansprechen einer Therapie (88), weshalb eine histologische Untersuchung der qPET >3 und <3-Patienten vorgenommen wurde. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass ein hoher Anteil an Kollagen in Malignomen im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose stehen. In Adenokarzinomen der Bauchspeicheldrüse und in Mammakarzinomen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine erhöhte Produktion von Kollagenen zu einer Chemotherapieresistenz führen kann (151,152).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die Kollagen-Ablagerungen in den qPET >3 und <3-Patienten untersucht. Hierfür wurden histologische PSR-Färbungen von FFPE-Gewebe asservierten Lymphknoten-Biopsaten angefertigt. Die PSR-Färbung wurde zuvor an Nieren-Präparaten getestet und die Färbezeiten so angepasst, dass das Färbemuster mit dem in der Literatur beschriebene Färbemuster übereinstimmte (147–149). Anschließend wurde die Färbung an HL-Schnitten angewendet. Es wurden insgesamt 4 qPET >3 und 5 qPET <3-Patienten durch das Programm QuPath (GitHub) ausgewertet und der Anteil der PSR positiven und negativen Zellen quantifiziert. Bei den 4 qPET >3-Patienten waren 3 Patienten dem MC-Typ und ein Fall dem NS-Subtyp zuzuordnen, während bei den 5 qPET <3-Patienten 4 Patienten dem MC-Typ und ein Patient dem NS-Subtyp zugeordnet wurden. Beim MC-Typ ist in konventionellen Färbungen kein Kollagen im Lymphknotengewebe erkennbar, während beim NS-Typ das befallene Lymphknotengewebe durch Kollagenfasern durchsetzt ist und es in ein nodulär geprägtes Muster unterteilen. Sobald ein Follikel durch Kollagenbänder umschlossen ist, handelt es sich um ein NS-cHL (1). Aufgrund des generell hohen Kollagenanteils der NS-Patienten, wurden für die Auswertung die MC-Typen getrennt von den NS-Typen untersucht.

Durch die QuPath (GitHub)-Software können einzelne Zellen identifiziert und die Kollagenfasern um die Zellen herum quantifiziert werden. Zunächst müssen die Schnitte mit Pikrosiriusrot (PSR) gefärbt werden, um die Zellkerne und die Kollagenfasern anzufärben. Durch einen zuvor festgelegten Radius um den Zellkern ist die Software in der Lage die Bereiche um die Zellen quantitativ zu erfassen. Die Unterscheidung zwischen PSR positiven und negativen Zellen wurde durch die verschiedenen Färbeintensitäten mittels eines *Cutoff*-Wertes, der für jeden Schnitt neu ermittelt wurde, festgelegt. Dieser *Cutoff*-Wert orientierte sich an die jeweils eindeutig als Kollagenen identifizierten Randbereiche der Lymphknotenkapseln, sodass für jeden Schnitt Werte für eine positiv zu wertende Zelle durch Vergleich der Kollagenen zuzuordnenden Bereiche festgelegt wurden.

Für die Quantifizierung wurde pro Fall jeweils ein repräsentativer Bereich ausgewertet, wobei alle Zellen in diesem Bereich gezählt wurden. Zudem wurden bei den NS-Subtypen nur die Bereiche begutachtet, die keine noduläre Sklerose beinhalteten. Zeigten die Zellen im Pseudolobuli (Bereiche, die nicht von nodulärer Sklerose betroffen waren) Kollagenfaserungen

um die Zelle, wurden sie als PSR positive Zelle angenommen und gezählt. Bei den PSR negativen Zellen konnten wiederum keine Kollagenfaserungen um die Zellen identifiziert werden.

Bei den drei qPET >3-Patienten des MC-Typs wurden durchschnittlich 16.370 Zellen (Bereich: 12.735-22.029 Zellen) je Schnitt detektiert, von denen im Mittel 28,8% (Bereich: 22,03-36,59%) PSR positiv waren. Bei dem einen qPET >3-Patient, der dem NS-Typ zuzuordnen war, konnten 213.022 Zellen in dem untersuchten Bereich identifiziert werden, von denen 22,9% der Zellen PSR positiv waren.

Bei den 4 untersuchten qPET <3-Patienten des MC-Typs konnten durchschnittlich 19.723 Zellen (Bereich: 7.043-37.786 Zellen) je Schnitt identifiziert werden, von denen im Mittel 0,4% der Zellen (Bereich: 0,06-1,13%) PSR positiv waren. Bei dem einen qPET <3-Patient, der dem NS-Typ zuzuordnen war, konnten 55.850 Zellen in dem untersuchten Bereich identifiziert werden, von denen 0,01% der Zellen PSR positiv waren.

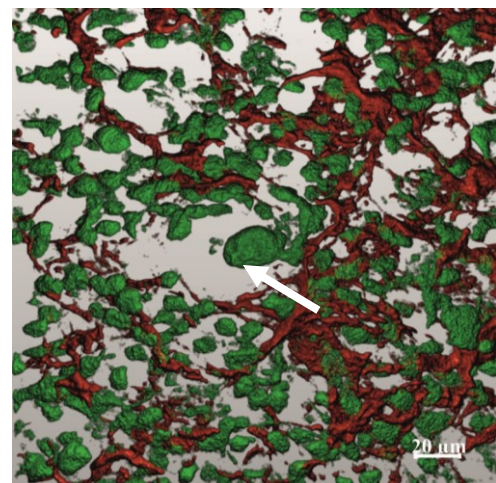
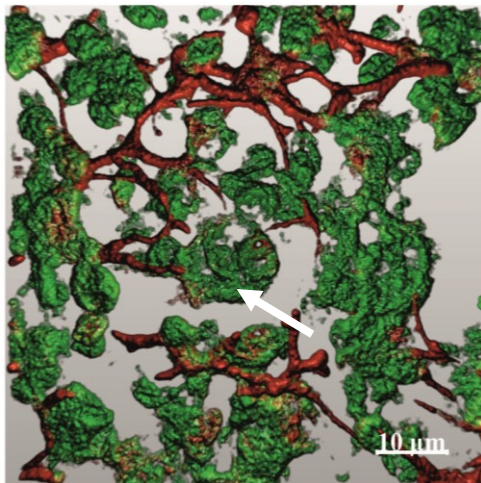
Der prozentuale Anteil an PSR positiven Zellen bezogen auf die MC-Typen lag bei 28,8% (qPET >3) zu 0,4% (qPET <3), und ist damit hoch signifikant unterschiedlich (Anhang: Tab. 29).

Um zu untersuchen, ob die HRS-Zellen zu den PSR positiven Zellen gehören, wurden insgesamt 12 HRS-Zellen in den 4 qPET >3 und insgesamt 14 HRS-Zellen in den 5 qPET <3-Patienten untersucht und mittels Konfokalem Laser Scanning Mikroskop (kLSM) und den 3D-Renderer (Arivis vision 4D) visualisiert. Die verblindete Begutachtung wurde von einem Pathologen durchgeführt, um die korrekte Identifizierung der HRS-Zellen gewährleisten zu können.

Da PSR eine rote Fluoreszenz für Kollagene und eine grüne Autofluoreszenz für vitale Zellen aufweist, konnten Kollagene und vitale Zellen durch Fluoreszenz-Darstellungen mit Hilfe des kLSM visualisiert werden (3.7.1).

Unter dem kLSM war ersichtlich, dass die HRS-Zellen der qPET <3-Patienten nicht von Kollagen ummantelt im Gewebe vorlagen (Abb. 17 a), während die HRS-Zellen bei den qPET >3-Patienten anscheinend von Kollagen ummantelt waren (Abb. 17 b).

a)



b)

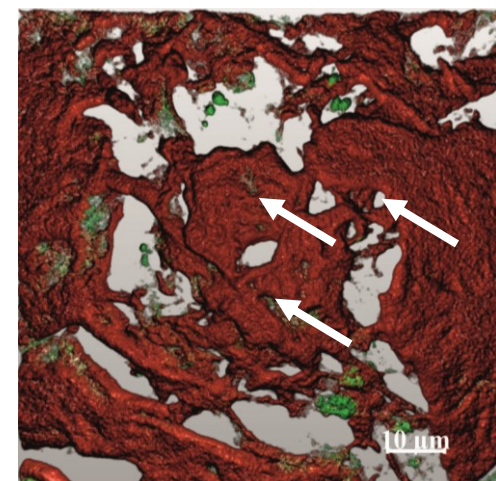
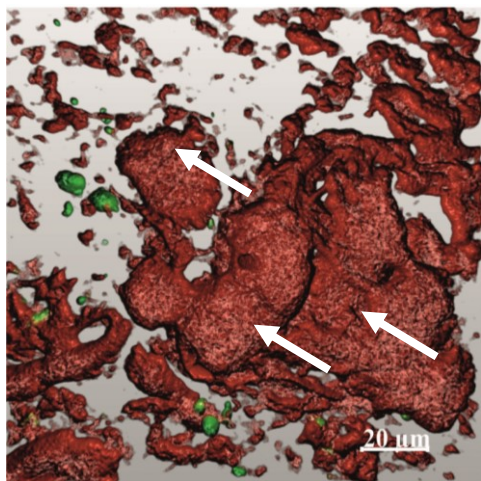


Abb. 17: PSR-Färbungen von jeweils zwei pHL-Patienten mit einem qPET <3 und >3

Exemplarische Fluoreszenz-Darstellungen der PSR-Färbungen von zwei qPET <3-Patienten (a) und zwei qPET >3-Patienten (b), die mittels Konfokalem Laser Scanning Mikroskop und dem 3D-Renderer visualisiert wurden. Abgebildet sind Ausschnitte der Lymphknoten von pHL-Patienten des MC-Typs. Rot sind Kollagene, während alle vitalen Zellen grün dargestellt sind. Die vollständig von Kollagen ummantelten Zellen sind HRS-Zellen, gekennzeichnet durch weiße Pfeile.

In den 12 untersuchten HRS-Zellen konnten in allen qPET >3-Patienten ausschließlich von Kollagen ummantelte HRS-Zellen identifiziert werden, während in den 14 untersuchten HRS-Zellen der qPET <3-Patienten die HRS-Zellen nicht von Kollagen ummantelt waren.

4.3 Ganz-Exom-Sequenzierungen (WES) mit ccfDNA der pHL-Patienten

Die tNGS-Untersuchungen waren auf bekannte mutierte Gene durch die Art der Methode beschränkt. Um jedoch bislang unbekannt Variaten in pHLs in qPET >3 und <3-Patienten identifizieren zu können, sollte mittels WES das ganze Exom untersucht werden. Da die exomweite Mutationsanalyse sehr anspruchsvoll ist und die VAFs im Ganzschnitt der FFPE-Gewebeproben der pHL-Patienten zu gering ist, wurden Patienten ausgewählt, die bereits durch tNGS mit Hilfe der ccfDNA untersucht wurden und deren durchschnittliche VAF für alle in der ccfDNA identifizierten Varianten bei mindestens 5% lag. Zudem mussten von den Bibliotheken der zu untersuchten ccfDNAs nach dem tNGS noch mindestens 500 ng vorhanden sein, um sie für die WES-Untersuchung verwenden zu können. Insgesamt standen Bibliotheken von 11 pHL-Patienten, die diese Kriterien erfüllten, zur Verfügung, von denen 10 Patienten einen qPET <3 und ein Patient einen qPET >3 hatten.

Die Problematik bei diesem Vorgehen bestand darin, dass die zu erwartenden niederfrequenten Varianten zum Teil im Fehlerbereich liegen, weshalb eine sehr gute Fehlerliste nötig wäre, um die realen Varianten von den Fehlern auseinander halten zu können. Hierfür müsste man viele Patienten untersuchen. Da jedoch nur 11 Patienten zur Verfügung standen, wurde eine stringente Filterung gewählt, bei der wahrscheinlich auch reale Varianten herausgefiltert werden.

Das Durchschnittsalter der 10 untersuchten qPET <3-Patienten lag bei 13,6 Jahren und war im Bereich zwischen 3 und 17 Jahren. Der qPET >3-Patient war 14 Jahre alt. Bei den qPET <3-Patienten lagen die qPET-Werte bei durchschnittlich 1,1 (0,6-1,8). Der qPET >3-Patient hatte einen qPET-Wert von 7,7. Das Geschlecht, der Subtyp und der EBV-Status sind für jede Gruppe tabellarisch dargestellt (Tab. 12). Zudem wurde zusätzlich eine Stadien-Einteilung vorgenommen und das Bulkvorkommen dokumentiert (Tab. 12, Anhang: Tab. 30).

Tab. 12: Patientendaten der 11 untersuchten pHL-Patienten

Patientendaten		Anzahl der Patienten
Anzahl der Patienten	insg.	11
Geschlecht	m	4
	w	7
Histologie Subtyp	NS	11
EBV-Status	neg	8
	pos	3
Stadium nach Ann	IIA	3
	IIAE	2

4. Ergebnisse

Arbor	IIB	1
	IIBE	2
	IIIA	2
	IIIB	1
Bulk	ja	7
	nein	4

Für die 11 ccfDNA-Proben lag eine Durchschnittskonzentration von 4 ng/μl (Konzentrationsspanne: 0,35-18,1 ng/μl) ccfDNA in einem Volumen von 30 μl vor. Es sollten 4 ng/μl für das WES verwendet werden bzw. 200 ng ccfDNA je Probe zu einem Volumen von insgesamt 50 μl mit einem Puffer aufgefüllt werden. Lag die Konzentration unter den 4 ng/μl, wurde die ccfDNA unverdünnt verwendet. Es wurden insgesamt durchschnittlich 28,4 ng ccfDNA/ml Plasma gewonnen.

Die Methode entspricht der in 3.2.2 beschriebenen *hybrid-capture* tNGS-basierten Methode mit dem Unterschied, dass vorgefertigte Coding Exome Oligos (TruSeq Exome Kit, Illumina) verwendet wurden und die letzte Amplifikation der angereicherten Bibliothek mit weniger Zyklen durchgeführt wurde. Die finalen Bibliotheken, die durch das TruSeq Exome Kit (Illumina) hergestellt wurden, lagen bei durchschnittlich 89 ng/μl (Konzentrationsspanne: 74,2-116 ng/μl). Der Sollwert liegt bei mindestens 2 ng/μl.

Für die WES wurde mit dem NextSeq550 (NextSeq Reagent Kit v2.5, Mid- und High-Output, 300 bp *paired end reads*) gearbeitet. Die Laufcharakteristika sind für die untersuchten ccfDNAs in Tab. 13 aufgelistet. Im Anhang sind die Bibliothek- und Laufstatistiken je Fall beschrieben (Anhang: Tab. 31-32).

Tab. 13: Laufcharakteristika der 11 mittels des *hybrid-capture*-basierten WES-Verfahrens untersuchten ccfDNAs von pHL-Patienten. Die Auswertung erfolgte mittels BaseSpace mit dem *Enrichment v3.0* Programm (Illumina) durch den *Isaac Aligner*

Laufcharakteristika	Ø Werte (Bereich)
Cluster-Dichte	$0,2 \times 10^6$ Cluster pro mm^2 ($0,1 \times 10^6$ - $0,2 \times 10^6$ Cluster pro mm^2)
Q30	92% (90,1-93,8%)
Anzahl der Sequenzen/Probe	$1,7 \times 10^8$ ($6,9 \times 10^7$ - $2,9 \times 10^8$)
Durchschnittliche Target Abdeckung/Base	371x (314-508x)
Anreicherung	72% (58-83%)
Uniformität der Abdeckung	91% (88-93%)
>100x-Abdeckung der Targets	82% (57-91,5%)

Die durch das *Enrichment v3.0* Programm generierten vcf-Dateien wurden zunächst durch die *Variant Studio Software 2.2* (Illumina) gefiltert. Der Qualitäts-Score musste >30 sein. Zur Variantendetektion von somatischen Varianten ist eine Lesetiefe von mindestens 100 Sequenzen notwendig, weshalb zunächst eine Lesetiefe von ≥ 100 Sequenzen eingestellt

wurde. Zudem sollte jede Base durch *unique* Fragmente mindestens 300x abgedeckt sein. Außerdem wurden die stillen Varianten und Varianten in nicht codierenden Bereichen durch anwählen von *Consequences* herausgefiltert, da sie nicht interpretierbar waren. Im Anschluss wurden die gefilterten Varianten in einer Exceltabelle dargestellt und die Varianten, die in der ExAC Datenbank (*Exome Aggregation Consortium*, Broad Institute) mit einer Populations-Allelfrequenz in der europäischen Bevölkerung von $>0,1\%$ vorkamen als SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), sogenannte Einzelnukleotid-Polymorphismen, von der weiteren Beurteilung ausgeschlossen. Aufgrund der geringen Patientenzahl wurde eine stringente Filterung gewählt und die Varianten, die mehr als 2x rekurrent in den 11 untersuchten Patienten vorkamen aussortiert, da bei HL bislang nur zwei Gene mit HotSpot-Varianten bekannt sind und damit rekurrente Varianten, die mehr als 2x vorkommen, wahrscheinlich auf Fehler zurückzuführen sind.

Um im Anschluss zu überprüfen, ob die WES-Methode mit ccfDNA zur Detektion niederfrequenter Varianten geeignet ist und eine Abdeckung von mind. 300x ausreichend ist, wurden die WES-Varianten mit den zuvor durch das *hybrid-capture*-basierte-Verfahren (tNGS) detektierten Varianten, im IGV visuell verglichen (Abb. 18).

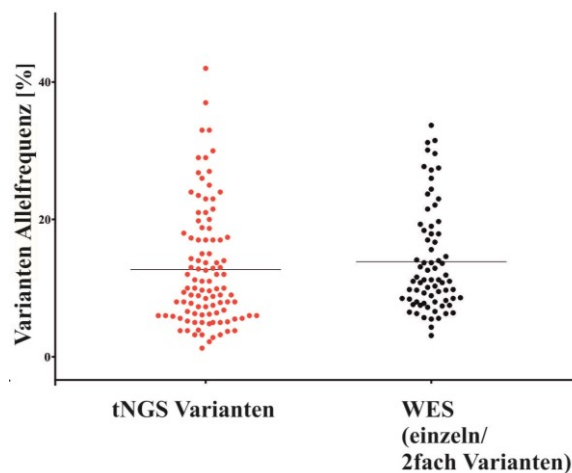


Abb. 18: Allelfrequenzen der Varianten, die durch tNGS und WES von 11 pHL-Patienten mittels ccfDNA aus Blut identifiziert wurden.

Die Varianten der tNGS- und WES-Untersuchungen wurden mittels der *Enrichment 3.0*-Software detektiert und durch die *Variant Studio Software 2.2* (Illumina) (Qualitäts-Score >30 , Lesetiefe ≥ 100 Sequenzen sowie Ausschluss der stillen Varianten und Varianten in nicht codierenden Bereichen) vorgefiltert. Zudem sollte jede Base durch *unique* Fragmente mindestens 300x abgedeckt sein. Anschließend wurden die Varianten, die in der ExAC Datenbank mit einer Populations-Allelfrequenz in der europäischen Bevölkerung von $>0,1\%$ vorkamen als SNP gewertet und von der weiteren Beurteilung ausgeschlossen. Zur Überprüfung der Varianten wurde das Programm IGV verwendet (3.2.3).

Bei dem Vergleich zwischen den WES- und tNGS-Varianten, wurden nur die WES-Varianten dargestellt, die aus dem tNGS bekannt sind. Rosa dargestellt sind die mittels tNGS detektierten Varianten und Schwarz die einzeln vorkommenden und 2x rekurrenten Varianten in den 11 mittels WES untersuchten ccfDNAs der pHL-Patienten. Die

stringente Filterung der >2x rekurrenten Varianten wurde aufgrund der geringen Patientenanzahl gewählt und weil in HL bislang nur zwei Gene mit HotSpot-Varianten bekannt sind und damit rekurrente Varianten, die mehr als 2x vorkommen, wahrscheinlich auf Fehler zurückzuführen sind. Es wurden vor der Filterung der >2x rekurrenten Varianten 75 der 102 Varianten, die zuvor durch tNGS detektiert wurden, mittels WES identifiziert, wobei 72 der 75 Varianten auch nach der Filterung der >2x rekurrenten Varianten weiterhin detektiert werden konnten. Durch den Vergleich zwischen den detektierten Varianten, die durch die tNGS- und WES-Analyse der gleichen Patienten identifiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass eine 300x Abdeckung zur Variantendetektion mittels WES wahrscheinlich ausreichend ist und die Vorfilterung mittels *Variant Studio Software 2.2* (Illumina) und der Ausschluss der >2x rekurrenten Varianten für die WES-Analysen-Filterung wahrscheinlich geeignet ist, wobei zu beachten ist, dass 25% der Varianten nicht detektierbar waren.

Es konnten insgesamt 75 Varianten von den 102 zuvor durch tNGS identifizierten Varianten im WES mittels *Enrichment 3.0*-Software nachgewiesen werden. Bei den 27 nicht mittels WES detektierten Varianten handelte es sich bei 14 Varianten um SOCS1 Varianten, die auch alle nicht im IGV identifiziert werden konnten. Von den 75 Varianten wurden 72 Varianten nach der Filterung der >2x rekurrenten Varianten weiterhin detektiert (Anhang: Tab. 33). Bei den drei Varianten, die durch WES nach der Filterung nicht mehr detektiert wurden, handelte es sich um die *STAT6*-Hotspot-Variante N417Y/D.

Nachdem alle Varianten, die mehr als 2x rekurrent vorkamen aussortiert wurden, konnten weitere Eingrenzungen vorgenommen werden, um die restlichen identifizierten Varianten auszuwerten. Es wurden nur die Varianten begutachtet, die in einem VAF-Bereich von 5-35% lagen. VAF unter 5% wurden als potenzielle Fehler aussortiert, da durch die Vorauswahl anhand der tNGS-Analyse für die WES-Analyse nur Patienten einbezogen wurden, die VAF von durchschnittlich mindestens 5% aufzeigten und daher auch in den zuvor unbekanntem Varianten VAF von durchschnittlich mindestens 5% erwartet wurden. Außerdem treten Fehler meist in niederfrequenten Bereichen auf. Zudem wurden Varianten >35% VAF ausgeschlossen, da angenommen wurde, dass es sich, wie bereits in den tNGS-Analysen gezeigt, hierbei meist um Keimbahn-Varianten handelte.

Außerdem wurden nur Gene beurteilt, die in den 11 Patienten in mindestens zwei Patienten vorkamen, um relevante und interessante Gene zu identifizieren, die therapierelevant sein könnten und als Kandidatengene fungieren könnten.

Nach Durchführung dieser Eingrenzungen konnten in den 11 mittels ccfDNA untersuchten pHL-Patienten insgesamt 2.900 Varianten in 725 Genen detektiert werden, wobei 424 potenziell inaktivierende Varianten und 2.476 potenzielle Austausch-Varianten identifiziert wurden. Aufgrund der hohen Variantenanzahl bei den Austausch-Varianten wurden nur Gene in die weitere Auswertung mit einbezogen, die in 2-3 Patienten 3x von Varianten betroffen waren, da diese Gene potenziell rekurrent von Varianten betroffen sind. Nach dieser Filterung konnten noch 300 potenzielle Austausch-Varianten identifiziert werden. Insgesamt konnten somit 724 potenziell inaktivierende- und Austausch-Varianten identifiziert werden.

4.3.1 RNA-Sequenzierung am Ganzschnitt zur Verifizierung

Da für die WES-Analyse nur 11 Patienten zur Verfügung standen und die Problematik der niederfrequenten Varianten bei den pHL-Patienten bestand, wurde als weiteres Filterkriterium und zur Verifizierung der WES-Varianten eine RNA-Seq-Untersuchung von 8 Patienten mit dem TruSeq RNA Exome Kit (Illumina) durchgeführt. RNA-Seq wird normalerweise verwendet, um Genexpressions-Analysen durchzuführen. In dieser Arbeit sollte RNA-Seq genutzt werden, um niederfrequente Varianten zu bestätigen, die zuvor durch WES detektiert wurden. Für die RNA-Seq-Untersuchung wurde makrodissektiertes, HRS-zellreiches Gewebe aus FFPE-Material der zuvor durch WES untersuchten Patienten verwendet (3.3.1). Zudem stellt der „*nonsense mediated decay*“ als Kontrollmechanismus eine weitere Problematik bei dem RNA-Seq dar, da er dafür verantwortlich ist, dass unerwünschte Stopcodons in der mRNA erkannt und deren Expression als verkürzte Proteine verhindert wird, sodass viele potenziell putative Varianten im RNA-Seq nicht angezeigt wurden.

Für die RNA-Isolation wurde mit dem RNeasy FFPE Kit (Qiagen) gearbeitet. Das Prinzip basiert auf der Lyse der Proben mit anschließendem Proteinase K-Verdau, gefolgt von einer DNase-Behandlung, um gDNA zu entfernen und einer finalen Aufreinigung durch Säulen. Anschließend konnte mit dem Maxwell 16 System und dem FFPE LEV RNA Purification Kit (Promega) die RNA automatisiert extrahiert werden. Für die RNA-Seq-Untersuchung werden mindestens 100 ng RNA benötigt. Drei der 11 mittels WES untersuchten Patienten konnten nicht für die RNA-Seq-Untersuchung verwendet werden, da keine ausreichende Menge RNA vorhanden war oder die RNA-Qualität, die durch die HPRT-Amplifikation ermittelt wurde (3.1.5), unzureichend war für die RNA-Seq Analyse.

Für die RNA-Seq-Untersuchung wurde mit dem TruSeq RNA Exome Kit (Illumina) gearbeitet. Die Methode basiert auf dem gleichen Prinzip wie die in 3.2.2 beschriebene *hybrid-capture*-basierte Methode, wobei bei diesem *hybrid-capture*-basierten Verfahren die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden muss, anschließend mit Adaptoren versehen wird und in gleicher Weise an zum Exom komplementäre Sonden hybridisiert, aufgereinigt, sowie amplifiziert und sequenziert wird. Für die RNA-Seq-Untersuchung wurde mit dem NextSeq550 (NextSeq Reagent Kit v.2,5, Mid-Output, 150 bp *paired end reads*) gearbeitet. Nachdem ein „*RNA Alignment*“ durch das Programm „*RNA-Seq Alignment*“ (Illumina) in BaseSpace erstellt wurde, wurde für das *Mappen* der *reads* der „*STAR Aligner*“ benutzt. Als Referenzgenom diente die genomische Sequenz für Homo Sapiens (hg19). Anschließend wurde ein Abgleich mit den WES-Daten durch die „bam-files“ im IGV vorgenommen. Es mussten >10 unique *reads* mit unterschiedlichen Start-/Stoppunkten für die jeweilige Variante mittels RNA-Seq detektiert werden, damit sie in die Bewertung mit eingeflossen ist. Die Laufcharakteristika sind für die untersuchten RNAs aus FFPE-Gewebe in Tab. 14 aufgelistet. Im Anhang ist die Laufstatistik je Fall beschrieben (Anhang: Tab. 34).

Tab. 14: Laufcharakteristika der RNA-Seq-Untersuchungen der 8 makrodissektierten FFPE-Gewebe-Proben von pHL-Patienten, die mittels BaseSpace durch das Programm *RNA-Seq Alignment* und durch den *STAR Aligner* ausgewertet wurden.

Laufcharakteristika	Ø Werte (Bereich)
Cluster-Dichte	$0,2 \times 10^6$ Cluster pro mm^2 ($0,1 \times 10^6$ - $0,2 \times 10^6$ Cluster pro mm^2)
Q30	94,6% (92,5-96%)
Identifizierte <i>reads</i> (<i>passing filter</i>)/Patient	$2,7 \times 10^8$ ($1,3 \times 10^8$ - $5,6 \times 10^8$)

Anschließend folgte der Abgleich der RNA-Seq-Daten mit den WES-Daten. Insgesamt wurden mittels WES nach den Filterungen 724 Varianten detektiert. Da nur 8 Patienten für die RNA-Seq-Analyse in Frage kamen, konnten die 176 Varianten, die in den drei weiteren Patienten identifiziert wurde, für die weiteren Analysen nicht verwendet werden. Die 548 Varianten, die in den 8 Patienten mittels WES identifiziert wurden, konnten mit den RNA-Seq Daten abgeglichen werden. Von diesen 548 Varianten konnten 107 Varianten mit einer Abdeckung von >10 *reads* im RNA-Seq identifiziert werden und anschließend von diesen 107 Varianten 46 Varianten im IGV bestätigt werden. (Anhang: Tab. 35 und 36). Es konnten keine direkten Unterschiede zwischen den 441 nicht mittels RNA-Seq bestätigten Varianten und den 46 bestätigten Varianten gefunden werden. Der VAF-Bereich lag bei den nicht bestätigten Varianten zwischen 5,1% und 35% und bei den bestätigten Varianten zwischen 5,1% und 34,7%. Auch in Bezug auf die Art der Varianten konnten keine signifikanten Unterschiede beider Gruppen identifiziert werden.

4.3.2 WES-Daten-Auswertung

Von den 46 identifizierten potenziellen Varianten wurden 26 putative inaktivierende Varianten identifiziert, bei denen es sich um 9 frameshift Deletionen, zwei frameshift-Insertionen, 10 Stop Varianten und 5 Varianten in der Spleiß-Region handelte (Anhang: Tab. 35). Die VAF betrug im Mittel 19,1%, wobei der VAF-Bereich bei 5,6-33,9% lag. Zudem konnten 20 putative Austausch-Varianten identifiziert werden (Anhang: Tab. 36). Die VAF betrug im Mittel 14,8%, wobei der VAF-Bereich bei 5,1-34,7% lag.

Von den 46 identifizierten Varianten waren drei Gene 2x betroffen, wobei zwei Gene in unterschiedlichen Patienten von putativen Varianten betroffen vorlagen. Dabei handelte es sich um die Gene *NUTM2F* (*NUT Family Member 2F*) und *LRRC37A3* (*Leucine Rich Repeat Containing 37 Member A3*), die bislang nicht als mutiert in HL bekannt waren (Anhang: Tab. 37, Abb. 19).

4. Ergebnisse

Subtyp	Nodulär-sklerosierender Subtyp											n
	neg	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	
EBV	neg	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	
Alter	17	14	15	10	16	11	17	17	17	13	3	
Geschlecht	w	w	m	w	m	w	m	w	w	w	m	
Stadium	IIBE	IIA	IIIB	IIIA	IIA	IIBE	IIB	IIA	IIAE	IIIA	IIAE	
Bulk	ja	ja	ja	nein	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	
qPET	1,05	7,7	1,145	0,6	1,8	1,07	1,56	0,96	1,19	1,03	1,08	
Fall-Nr.	100	102	106	122	123	124	125	126	127	128	129	n
<i>A2M</i>												1
<i>ADRM1</i>												1
<i>ANKRD17</i>												1
<i>ANKRD36</i>												1
<i>ANKRD36B</i>												1
<i>ARL17A</i>												1
<i>BCL7A</i>												1
<i>CBWD3</i>												1
<i>CBWD6</i>												1
<i>CCBL2</i>												1
<i>CES1</i>												1
<i>CHRNA7</i>												1
<i>CNTNAP3B</i>												1
<i>DCPS</i>												1
<i>DHRS4</i>												1
<i>FADS2</i>												1
<i>FOXD4L6</i>												1
<i>GSE1</i>												1
<i>HERC2</i>												1
<i>HYDIN</i>												1
<i>LILRA1</i>												2
<i>LILRA6</i>												1
<i>LRRC37A3</i>												2
<i>LTBP2</i>												1
<i>ME2</i>												1
<i>MMP19</i>												1
<i>NUTM2F</i>												2
<i>PIEZO1</i>												1
<i>PTPN1</i>												1
<i>RGP1</i>												1
<i>RIC1</i>												1
<i>RPL29</i>												1
<i>SENP5</i>												1
<i>SHPRH</i>												1
<i>SIRPA</i>												1
<i>SPANXA1</i>												1
<i>SPATA31C2</i>												1
<i>SYNE1</i>												1
<i>TMEM120B</i>												1
<i>TPSB2</i>												1
<i>TRAF1</i>												1
<i>WDR55</i>												1
<i>ZNF302</i>												1
n	3	7	10	3	0	8	0	0	0	6	4	5

Abb. 19: Identifizierte putative Varianten in 11 ccDNAs von pHL-Patienten, die mittels WES/RNA-Seq untersucht wurden.

Es wurden folgende Filterungskriterien verwendet: 1) >2x rekurrente Varianten in den 11 Patienten wurden aussortiert, 2) VS-Software-Filterung (3.2.3), 3) Beschränkung auf VAF 5-35%, 4) Beschränkung auf Gene, die in mindestens 2 Patienten vorkamen, 5) Abgleich mit RNA-Seq Daten, 6) IGV-Kontrolle (3.2.3). Zusätzlich wurde bei den Austausch-Varianten eine weitere Filterung vorgenommen: 7) Beschränkung auf Gene, die in 2-3 Patienten 3x von Varianten betroffen waren. Gelb dargestellt sind die Austausch-Varianten und Blass-Rot die inaktivierenden Varianten. Die Zahlen geben die Anzahl der Varianten an, wenn ein Gen mehrfach in einem Patient betroffen war.

Zusätzlich zum RNA-Seq wurden zur Überprüfung der putativen Varianten anschließend 5 detektierte Austausch-Varianten mit dem NGS basierten Kapa-Library Prep Kit (Roche) mittels gDNA aus Ganzschnitten untersucht. Das Verfahren wurde bereits unter 4.1.1 genauer erläutert. Als Negativkontrolle diente tonsilläre DNA aus FFPE-Gewebe. Es konnten alle 5 Austausch-Varianten durch das NGS basierte Kapa Library Prep Kit bestätigt werden, wobei zwei der 5 Varianten als Keimbahn-Varianten identifiziert werden konnten, da sie eine VAF im Ganzschnitt von 35% hatten (Anhang: Tab. 38).

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, das ccfDNA von pHL für die Variantendetektion mittels WES geeignet ist. Jedoch ist bei der Verifizierung der Varianten durch den RNA-Seq zu beachten, dass viele potenziell putative Varianten im RNA-Seq nicht angezeigt wurden, da sie, aufgrund des „*nonsense mediated decays*“, nicht exprimiert wurden oder weil die Abdeckung zu gering war, sodass sie, obwohl sie auf DNA-Ebene durch die visuelle Inspektion im IGV als reale Varianten detektiert wurden, nicht als putative Varianten im RNA-Seq gewertet werden konnten.

5. Diskussion

5.1 Untersuchungen pHL

Aufgrund des geringen Anteils an HRS-Zellen (ca. 1-5%) in den befallenen Geweben, ist die Detektion von genetischen Aberrationen und damit die genetische Charakterisierung von HRS-Zellen außerordentlich schwierig. Aus diesem Grund wurden bislang nur wenige genomische Veränderungen identifiziert und eine geringe Anzahl an Patienten untersucht, weshalb die Pathogenese dieser Erkrankung weitgehend unklar ist. Zudem werden zu Beginn dieser Arbeit HL nur durch *in situ*-Verfahren oder durch Anreicherung der HRS-Zellen mittels FACS an Gefrierschnitten durch WES untersucht (69) oder die Analyse von einzelnen Genen vorgenommen (153). FFPE-Gewebe hat den Nachteil, dass die DNA durch die Formalinfixierung meist degradiert, sowie modifiziert ist und Desaminierungsartefakte bildet, die zu Sequenzierfehlern führen (106). Da jedoch nur bei 5% der Patienten zusätzlich zum FFPE-Gewebe Gefrierewebe vorliegt, konnten bislang nur wenige Patienten für molekulargenetische Untersuchungen an mikrodisssektierten Tumorzellen herangezogen werden. Durch neue NGS-Verfahren ist es möglich, eine hohe Sensitivität der Variantendetektion zu erreichen. Diese Verfahren könnten es ermöglichen pHL mit DNA aus Ganzschnitten von FFPE-Gewebe und ccfDNA molekulargenetisch zu analysieren. Damit könnte man auch kleinere Patientengruppen untersuchen, die durch spezifische Eigenschaften gekennzeichnet sind und von denen nicht genug Gefriermaterial zur Verfügung steht.

Es ist bekannt, dass 5% der pHL-Patienten eine hohe Wahrscheinlichkeit haben, trotz intensiver Therapie, der Krankheit zu erliegen. Diese Patienten zeichnen sich durch eine primär reduzierte Sensitivität auf die Chemotherapie aus, sodass ihr 2 Jahres EFS bei 50% liegt (43) und sie sind häufig durch einen qPET >3 im ERA charakterisiert. Biopsien dieser Patienten wurden bislang noch nicht auf ihre genomischen Aberrationen untersucht, was im Zuge dieser Arbeit durch einen Vergleich zwischen qPET <3 und >3-Patienten vorgenommen wurde, um neue Therapieansätze der qPET >3-Patienten zu finden und neue Pathogenese-Mechanismen der pHL zu identifizieren.

Es wurden hierfür zwei Methoden für die Durchführung von tNGS etabliert, das Amplikonbasierte- und das *hybrid-capture*-basierte Verfahren. Dafür wurde eine Zusammenstellung der Gene vorgenommen, die am häufigsten in HL und Non-HL mutiert sind. Die qPET <3 und >3-Patienten wurden sowohl auf ihre strukturellen Varianten, Indels und SNVs, sowie auf VDJ-Rekombinationen untersucht.

In dieser Arbeit wurde tNGS erfolgreich an ccfDNA von HL-Patienten etabliert und gezeigt, dass ccfDNA eine gute Quelle für die genomische Charakterisierung von HRS-Zellen darstellt. Aufgrund dessen wurden exomweite Untersuchungen bei pHL an ccfDNA vorgenommen, die

zur Detektion neuer Varianten beitragen und die Pathogenese-Mechanismen dieser Erkrankung aufzeigen sollten.

5.2 Targetierte Next Generation Sequencing Analysen (tNGS)

5.2.1 Amplikon-basiertes Verfahren

Da Fehler beim NGS im geringfrequenten VAF-Bereich zu finden sind und in diesem Bereich auch die VAF der Varianten bei Untersuchungen an Ganzschnitten bei HL zu erwarten sind, wurde zur Fehlerreduktion bei der Amplikon-basierten Methode mit dem sogenannten *dual-strand*-Verfahren gearbeitet. Bei diesem Verfahren wurden die zu untersuchenden Bereiche in zwei unterschiedlichen Reaktionsansätzen mit zwei verschiedenen Primer-Pools abgedeckt. Dabei wurde mittels des einen Pools der eine DNA-Strang und mit dem anderen Pool der andere DNA-Strang als Template verwendet. Anschließend wurden die in beiden Strängen detektierten Varianten miteinander verglichen. Es wurden nur die Varianten als real angesehen, die in beiden Pools vorkamen, um die technischen Fehler zu reduzieren (154,155).

Mit dem Amplikon-basierten Verfahren sollten SNVs und Indels detektiert werden. Für das *dual-strand*-Verfahren wurde ein selbst designtes Panel kreiert, das Abschnitte, oder die vollständigen codierenden Bereiche von insgesamt 20 Genen beinhaltet, die bei HL häufig von SNVs und Indels betroffen sind. Es bestand aus 439 Amplikons, mit einer Länge von durchschnittlich 177 bp und es umfasste 42 kb Sequenzen.

Es wurden 37 FFPE-Gewebe von HL-Patienten mit dem Amplikon-basierten Verfahren untersucht. Bei 12 der 37 HL-Patienten handelte es sich bei 11 pHL und einem adulten HL-Patient um Archivfälle, bei denen der qPET-Wert nicht bekannt war, die für die Etablierung verwendet wurden, währenddessen 25 pHL der C1- und C2-Studie (EuroNet-PHL) eingeschlossen wurden, von denen 13 Patienten einen qPET <3 und 12 Patienten einen qPET >3 hatten.

Bei diesem Verfahren wurde jede Base in Pool A durchschnittlich 16.692x und in Pool B durchschnittlich 16.494x abgedeckt, wodurch eine hohe Sensitivität erreicht werden sollte, um die Detektion von Varianten mit einer geringen Frequenz zu gewährleisten.

Als Negativkontrollen dienten 6 FFPE-Gewebe von Tonsillen mit einer Hyperplasie. Bei den Negativkontrollen wurden in fast jeder Probe konstant die gleichen Varianten im niederfrequenten Bereich in beiden Pools gefunden. Auf Basis dieser Resultate wurde eine Fehlerliste erstellt, die für die Filterung der HL-Patienten verwendet wurde.

Es wurden nach Ausschluss der „Varianten“ der Fehlerliste mit Pool A bei den 37 untersuchten Patienten 8.786 Varianten und mit Pool B 9.687 Varianten identifiziert. Nach Abgleich beider Pools konnten bei 24 von 37 Patienten insgesamt 61 potenzielle Varianten identifiziert werden. Bei den 13 weiteren Patienten wurden keine Varianten detektiert. Da somatische Varianten bei

HL im niederfrequenten Bereich zu erwarten waren, wurden alle Varianten, die eine VAF >35% hatten als Keimbahn-Varianten angesehen. Bei den 61 potenziellen Varianten handelte es sich daher um 56 somatische und 5 Keimbahn-Varianten.

Durch Untersuchungen an mikrodisssektierten HRS-Zellen konnten mittels PCR-Amplifikation der potenziell mutierten Bereiche und anschließender konventioneller Sanger Sequenzierung, sowie Untersuchungen am Ganzschnitt durch den Kapa Library Prep Kit, der durch eine spezielle Polymerase, die durch eine 100x höhere Genauigkeit als die konventionelle Taq-Polymerase gekennzeichnet ist und sich durch einen Fehler in $3,6 \times 10^6$ bp im Gegensatz zu einem Fehler in 1×10^5 bp bei der konventionellen Taq-Polymerase auszeichnet (140), mittels NGS (Ion Torrent, Ion PGM System) insgesamt 32 potenzielle somatische Varianten überprüft werden, von denen 8 Varianten bei 5 Patienten bestätigt und 24 Varianten nicht validiert werden konnten. 4 der 8 Varianten waren SNVs, während es sich bei den anderen 4 Varianten um Deletionen handelte (Anhang: Tab. 6).

Die Varianten wurden in 7 Genen identifiziert: *B2M*, *CSF2RB*, *TNFAIP3*, *SOCS1*, *BCL7A*, *ITPR3* und *EGR1*. Varianten in *B2M* (69), *CSF2RB* (153), *TNFAIP3* (77) und *SOCS1* (65) sind bei HL bereits bekannt und spielen bei dem JAK/STAT-Signalweg (*SOCS1*, *CSF2RB*), sowie bei dem NFκB-Signalweg (*TNFAIP3*) eine wichtige Rolle. Bei *B2M*, eine Untereinheit des MHC-I-Komplexes, können Varianten zum Verlust der Expression von MHC-I führen, was zur Immunevasion der HRS-Zellen beiträgt (69). Varianten in *BCL7A* und *EGR1* sind in Non-HL bereits bekannt (156,157), jedoch sind Varianten in diesen Genen bei HL bislang nicht beschrieben worden. Varianten im *ITPR3*-Gen wurden bislang noch nicht bei Non-HL und HL publiziert.

Es konnte mittels der Validierung der Varianten gezeigt werden, dass trotz des *dual-strand*-Verfahrens weiterhin 75% der Varianten Fehler waren, weshalb die Amplikon-basierte Methode nicht für die Detektion niederfrequenter Varianten in FFPE-Gewebe, aufgrund von Taq-Fehlern, geeignet ist. Da bereits eine hohe Abdeckung generiert wurde, gibt es mit diesem Verfahren keine Möglichkeit die Variantendetektion zu verbessern, weshalb eine andere Methode etabliert wurde.

5.2.2 Hybrid-capture-basiertes Verfahren

B-Zell-Non-HL

Im Gegensatz zur Amplikon-basierten Methode sind die zu untersuchenden Bereiche beim *hybrid-capture*-Verfahren durch überlappende, aber *unique* Fragmente mit unterschiedlichen Start- und Endpunkte gekennzeichnet, die durch zufälliges Scheren oder durch ccfDNAs, die bereits als kurze Fragmente vor der Amplifikation vorliegen, entstehen. Durch die

Kollapsierung der Fragmente, bei der Fragmente der gleichen Länge zusammengefasst werden, können zudem Taq-Fehler, die bei der Amplifikation der Fragmente entstehen, ausgeschlossen werden. Außerdem werden bei der Amplifikation statt 27 Zyklen beim Amplikon-basierten Verfahren nur 14 Zyklen beim *hybrid-capture*-basierten Verfahren benötigt. Dadurch werden weniger PCR-Fehler generiert. Zusätzlich können durch das *hybrid-capture*-basierte Verfahren genomische Translokations-Bruchpunkte und VDJ-Rekombinationen identifiziert werden.

Das selbst designte Panel, das für das *hybrid-capture*-basierte Verfahren verwendet wurde, war umfangreicher als bei der Amplikon-basierten Methode. Es beinhaltete 106 Gene, die in HL und Non-HL am häufigsten mutiert sind und deckte insgesamt 273 kb ab. Da bekannt ist, dass bei Lymphomen zu erheblichen Teilen überlappende Gene mutiert in den unterschiedlichen Entitäten anzutreffen sind, konnte durch ein neues generelles Non-HL Panel untersucht werden, ob weitere Gene, die bereits in Non-HL als mutiert beschrieben wurden, auch in HL von Varianten betroffen sein könnten (69,77,156,158). Dadurch sollten neue Pathogenese-Mechanismen der HL identifiziert werden.

Zunächst sollte durch die Untersuchung von Non-HL (FFPE) das *hybrid-capture*-basierte Verfahren etabliert werden. Bei Non-HL wurde generell eine erhöhte Anzahl an Varianten festgestellt (156,158). Sie weisen einen hohen Tumorzellanteil auf und enthalten charakteristische Translokationen sowie VDJ-Rekombinationen, die durch dieses Verfahren detektiert werden können. Daher sind Non-HL (FFPE) für die Etablierung des *hybrid-capture*-basierten Verfahrens besonders gut geeignet.

Es wurde FFPE-Gewebe von insgesamt 95 Non-HL unterschiedlicher Entitäten und 7 Negativkontrollen von lymphofollikulären Hyperplasie- und Lymphadenitis-Patienten zur Etablierung der Methode verwendet. Da eine hohe VAF erwartet wurde, wurde eine 100x Abdeckung angestrebt. Die Anreicherung sollte bei mindestens 35% liegen. Es wurde jede Base durch *unique* Fragmente durchschnittlich 652x abgedeckt, wobei die Anreicherung bei durchschnittlich 72% lag. Die Uniformität, die ein Maß für die Gleichmäßigkeit der Sequenzierung ist und angibt, welcher Anteil der Targets mit mindestens 20% der durchschnittlichen Abdeckung abgedeckt wurde, sollte bei mind. 80% liegen und lag bei den untersuchten Patienten bei durchschnittlich 97%. Die Resultate ergeben daher, dass aus technischer Sicht das Panel für die Untersuchungen der Non-HL geeignet ist.

Bei der Untersuchung der Negativkontrollen wurden in fast jeder Probe konstant die gleichen Varianten im niederfrequenten Bereich gefunden. Es konnten insgesamt 274 Varianten als Fehler, die entweder am Rande eines Homopolymers lagen, einen *Strand Bias* aufwiesen, nicht eindeutig annotiert werden konnten oder aus sequenzabhängigen Taq-Fehlern resultierten, identifiziert werden. 13 Varianten konnten als Keimbahn-Varianten identifiziert werden, da sie in einem VAF-Bereich von 36-80% lagen. Die detektierten Varianten wurden zu einer

Fehlerliste zusammengefasst, die für die Bewertung der Non-HL-Patienten verwendet wurde. Da außer den Keimbahn-Varianten keine Varianten detektiert werden konnten, die nicht auf den identifizierten Fehlern beruhen, scheint das Panel für die Variantendetektion der Non-HL geeignet zu sein.

Nach Ausschluss der „Varianten“ der Fehlerliste konnten bei 93 von 95 untersuchten Patienten insgesamt 514 Varianten in 76 Genen nachgewiesen werden, bei denen es sich um 447 SNVs und 67 Indels handelte (Abb. 8 a, b). Da Non-HL eine hohe VAF aufweisen, konnte aufgrund der VAF kein Ausschluss der Keimbahn-Varianten erfolgen. Daher wurde für die Keimbahn-Varianten-Bestimmung auf tumorfreies Material zurückgegriffen (3.3.1). Da nicht von allen Patienten tumorfreies Material zur Verfügung stand, konnten nur 26 von insgesamt 84 Patienten, die Varianten mit einer VAF von mindestens 35% hatten, auf Keimbahn-Varianten untersucht werden. Bei den restlichen 11 Patienten lagen alle identifizierten Varianten unter einer VAF von 35%. Von diesen 26 Patienten wurden alle Varianten mittels spezifischer Primer mit der Sanger-Sequenzierung untersucht, die eine VAF von mindestens 35% hatten. Es konnten 18 von insgesamt 47 untersuchten Varianten als Keimbahn-Varianten im jeweiligen Referenz-Gewebe identifiziert werden (Anhang: Tab. 15). Da 194 der insgesamt 514 Varianten mit einer VAF von mindestens 35% identifiziert werden konnten, ist abzuschätzen, dass ca. 74 Varianten der 194 Varianten mit einer VAF von mindestens 35% Keimbahn-Varianten sind, sodass der Anteil der Keimbahn-Varianten bei ca. 14% liegt. Es ist daher zu berücksichtigen, dass unter den restlichen 467, nicht auf Keimbahn-Varianten hin untersuchten Varianten, nicht nur somatische, sondern auch Keimbahn-Varianten mit eingeschlossen sind.

Die VAF der Varianten ohne die identifizierten Keimbahn-Varianten betrug im Mittel 34,3%. Es konnten in insgesamt 76 der 106 Gene Varianten detektiert werden.

In allen BL, DLBCL, MCL und MZL-Patienten konnten Varianten detektiert werden, wobei in B-CLL, FL und MM jeweils ein Patient keine identifizierte Variante aufwies. Bei dem Vergleich der durchschnittlichen Anzahl der Varianten bezogen auf die Patienten, in denen Varianten identifiziert werden konnten, fiel auf, dass bei DLBCL die durchschnittliche Anzahl der Varianten mit 8,1 Varianten am höchsten war, gefolgt von FL (durchschnittlich 5,8 Varianten), BL (durchschnittlich 5,7 Varianten) und B-CLL und MCL mit jeweils durchschnittlich 3 Varianten je Patient. Bei MZL und MM wurde die geringste Anzahl an Varianten je Patient mit durchschnittlich 2,3 Varianten und 1,9 Varianten identifiziert (Tab. 4).

KMT2D (40 Varianten), *CREBBP* (37 Varianten), *PIMI* (34 Varianten), *BCL2* (32 Varianten) und *MYC* (18 Varianten) waren die am meisten von Varianten betroffenen Gene dieses Kollektivs.

In DLBCL war mit insgesamt 29 identifizierten Varianten in 20,6% der Patienten *PIMI* das am häufigsten mutierte Gen. Es konnten bereits bei Nijland et al. in 5 von 6 untersuchten Patienten

PIMI-Varianten bei DLBCL identifiziert werden (159) und Schmitz et al. konnte in 40% der ABC und in 14% der GCB DLBCL *PIMI*-Varianten detektieren (160), sodass diese Ergebnisse mit den Resultaten von Schmitz et al. korrelierten. Am zweit häufigsten war das Gen *CREBBP* mit 17 Varianten in 38,2% der DLBCL-Patienten zu finden, das bereits in dem *Review* der Übersichtsarbeit von Pasqualucci eines der am häufigsten mutierten Gene in insgesamt 20% der Patienten darstellte (158). Es konnte außerdem bei DLBCL bereits gezeigt werden, das mehr als 50% der mutierten Varianten in Genen vorkommen, die mit Transkriptionsfaktoren oder mit Chromatin-Modifikationen zusammenhängen, wie beispielsweise *KMT2D*, *CREBBP*, *EP300* oder *EZH2* (156,158). Varianten in diesen Genen wurden auch in dieser Arbeit in 26% (*KMT2D*), 38,2% (*CREBBP*) und 15% (*EP300* und *EZH2*) der DLBCL-Patienten identifiziert.

Das am häufigsten mutierte Gen bei FL stellte in dieser Arbeit mit 21 detektierten Varianten in 59% der Patienten *KMT2D* dar, das bereits in dem *Review* der Übersichtsarbeit von Pasqualucci in 70-80% der Patienten das am häufigsten mutierte Gen in FL darstellte, gefolgt von *CREBBP*, das in 55% der Patienten mutiert vorkam (158). *CREBBP* war auch in dieser Arbeit mit 17 identifizierten Varianten in 54,4% der Patienten das am zweit häufigsten vorkommende mutierte Gen in FL.

Bei BL waren in dieser Arbeit mit 8 Varianten in 71% der Patienten *MYC*-Varianten am häufigsten anzutreffen. Love et al. fand in 40,7% der BL *MYC*-Varianten vor (161), sodass sich prinzipiell die Ergebnisse mit den bereits beschriebenen Resultaten deckten, jedoch lag der Anteil an *MYC*-Varianten in BL in dieser Arbeit um fast 50% höher, als in der Publikation. *ID3* war in dieser Arbeit das am zweit häufigsten mutierte Gen in BL mit 5 Varianten in 43% der Patienten und wurde bereits in dem *Review* der Übersichtsarbeit von Pasqualucci als meist mutiertes Gen in 35-58% der BL-Patienten beschrieben (158).

Es konnte somit gezeigt werden, dass Entitäten-typische Varianten in den untersuchten Non-HL auch durch das *hybrid-capture*-basierte Verfahren identifiziert werden konnten und das Panel für die Variantendetektion geeignet zu sein scheint.

Aufgrund der erwarteten hohen VAF, die außerhalb des Fehlerbereichs liegt, musste keine Validierung der identifizierten SNVs und Indels vorgenommen werden.

Als diagnostisches Merkmal zur Identifikation der unterschiedlichen Lymphom-Entitäten wird außerdem die Detektion von Entitäten-typischen TL herangezogen, die beispielsweise in FL, MCL und BL in fast 100% der Patienten zu erwarten sind. Daher wurden auch in dieser Arbeit die Non-HL im Hinblick auf ihre TL-Bruchpunkte mittels des *hybrid-capture*-basierten Verfahrens untersucht. Insgesamt konnten 59 TL-Bruchpunkte identifiziert werden (Tab. 5), wobei es sich bei 52 TL um, für die jeweiligen Lymphome, typischen TL-Bruchpunkte handelte. FL sind durch Fusionen zwischen *BCL2* und dem JH-Lokus gekennzeichnet (48,49), was auch in dieser Arbeit in 81,8% (18/22 Patienten) gezeigt werden konnte. Charakteristisch für BL sind *MYC*-TL, die in fast allen BL vorkommen und mit der IgH-Switch-Region

fusioniert sind (1). In dieser Arbeit konnten in allen 7 untersuchten BL *MYC*-TL-Bruchpunkte identifiziert werden. Typische TL bei MCL stellen die Ig-assoziierten *CCND1 (BCL1)* -TL dar (47), die in allen 8 untersuchten MCL detektiert wurden. Außerdem konnten bereits TL-Bruchpunkte in *BCL2* bei 34% der Patienten, in *MYC* bei 10-14% der Patienten und in *BCL6* bei 33% der Patienten bei DLBCL beschrieben werden (158), die in dieser Arbeit in 35% (*BCL2*, 12/34 Patienten), 8,8% (*MYC*, 3/34 Patienten) und 5,8% (*BCL6*, 2/34 Patienten) der DLBCL identifiziert wurden. Zudem konnten *MALT1/BIRC3* TL in 25% (2/8 Patienten) der MZL identifiziert werden, die in MZL bereits in 15-50% beschrieben wurden (162).

In der Diagnostik stellt die FISH-Analyse den Goldstandard dar, um TL zu identifizieren, weshalb die Resultate, die mittels *hybrid-capture*-basiertem Verfahren generiert wurden auch alle mittels FISH-Analyse untersucht und mit den tNGS-Daten verglichen wurden.

Es konnten 81% der TL, die mit dem tNGS-Verfahren identifiziert wurden auch in der FISH-Analyse detektiert werden. 17% der mittels tNGS detektierten TL konnten aufgrund der zu geringen Materialmenge auf den Schnitten durch die FISH-Analyse nicht ausgewertet werden. Bei den restlichen 2% handelte es sich um TL, die mittels tNGS, jedoch nicht mittels FISH-Analyse, trotz ausreichender Materialmenge, detektiert wurden.

Bei 6 Patienten konnten TL, die durch FISH identifiziert wurden, nicht mittels tNGS detektiert werden. Durch den Vergleich der FISH-Analysen konnte somit aufgezeigt werden, dass die TL-Identifizierung durch tNGS ein effizientes Verfahren darstellt, um typische TL nachzuweisen. Zudem scheint das tNGS-Verfahren für Patienten, bei denen eine geringe Materialmenge vorliegt, geeigneter zu sein, als die FISH-Analyse.

Neben den bereits bekannten Entitäten-typischen TL-Bruchpunkten konnten 7 bislang seltene bzw. unbekannte TL-Bruchpunkte mittels des Panels identifiziert werden. Die zwei nicht typischen *IgHJ5/BCL2* und *IgHD2-21/BCL2* TL bei einem B-CLL-Patienten wurden bereits in Publikationen beschrieben (163–165). Außerdem konnten zwei seltene TL in DLBCL identifiziert werden. Die *IKZF1/BCL6*-TL wurde bereits beschrieben (166) und auch die Fusion zwischen *HSP90AA1*- und des *BCL6*-Gens ist bereits in seltenen Fällen in DLBCL dokumentiert worden (167). Die identifizierte TL von *PAPSS2* und *chr14IgG3* in einem DLBCL und die zwei TL (*IgH-Sm/IDH2*, *BCL6/MEF2C*) in FL wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben. Zusammenfassend konnten mit dem *hybrid-capture*-basierten Verfahren zusätzlich zu den Entitäten-typischen TL-Bruchpunkten seltene, sowie neue TL-Bruchpunkte identifiziert werden, die man mit der FISH-Analyse nicht erkennen konnte.

Zudem konnte der Differenzierungsstatus der Tumorzellen in Non-HL mittels der Detektion von IgH-VDJ-Rekombinationen klassifiziert werden. IgH-VDJ-Rekombinationen werden normalerweise zum Klonalitätsnachweis zur Unterscheidung von Tumoren und gesundem

Gewebe durch Längenfragmentanalysen sowie zur Identifikation des Grades der minimalen residuellen Resterkrankung (MRD: *minor residual disease*) bei Non-HL genutzt.

Die Identifikation von Fragmenten von klonalen VDJ-Rekombinationen wurde in dieser Arbeit durch visuelle Inspektion der JH-Loci mit dem IGV durch die *hybrid-capture*-basierten Daten (3.2.1) vorgenommen. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass es durch die visuelle Inspektion und die fehlende automatisierte Auswerte-Software aufwendiger ist, als die routinegängige Längenfragmentanalyse.

Es konnten insgesamt 35 klonale IgH-VDJ-Rekombinationen in den 95 untersuchten Non-HL identifiziert werden. 35 klonale IgH-VDJ-Rekombinationen konnten in 17% der B-CLL-, 86% der BL-, 32% der DLBCL-, 87,5% der MCL-, 10% der MM-, 50% der MZL- und 23% der FL-Patienten (Anhang: Tab. 11) identifiziert werden.

Verglichen mit den routinegängigen Daten, die durch die Längenfragmentanalyse erhoben wurden, bei denen erfahrungsgemäß in rund 80% der Non-HL klonale IgH-VDJ-Rekombinationen identifiziert werden können, konnten mittels des *hybrid-capture*-basierten Verfahrens nur in 37% der Non-HL klonale IgH-VDJ-Rekombinationen identifiziert werden. Somit ist die routinegängige Längenfragmentanalyse für die Identifikation von klonalen IgH-VDJ-Rekombinationen bei Non-HL geeigneter als das *hybrid-capture*-basierte Verfahren. Allerdings ist zu beachten, dass durch die routinegängige Längenfragmentanalyse die Sequenzen im Gegensatz zum *hybrid-capture*-basierten Verfahren nicht bekannt sind, weshalb keine Mutationsanalysen vorgenommen werden können und sie auch nicht zur MRD-Marker-Identifikation genutzt werden können.

Zusammenfassend stellt die *hybrid-capture*-basierte Methode ein geeignetes Verfahren dar, um SNVs, Indels, TL-Bruchpunkte und VDJ-Rekombinationen bei Lymphomen simultan nachzuweisen. Dafür mussten bislang unterschiedliche Techniken verwendet werden, sodass dieses Verfahren zeit- und ressourcensparender ist, als die bisherigen Methoden.

Aufgrund der hohen erreichten Abdeckung der *uniquen* Fragmente, die bei 652x liegt, könnte dieses Verfahren daher auch für HL geeignet sein, bei denen Varianten im 1% Bereich erwartet werden.

Vergleich zwischen gDNA aus FFPE-Gewebe und ccfDNA aus Blut bei Non-HL

Da in einigen Studien bereits nachgewiesen wurde, dass von HRS-Zellen abstammende ctDNA in ccfDNA von HL-Patienten zu finden ist (130,131) und die bisherigen Untersuchungen der HL-Patienten in dieser Arbeit mittels gDNA aus Ganzschnitten durch das Amplikon-basierte Verfahren erfolglos waren, wurde ein Vergleich zwischen gDNA aus FFPE-Gewebe und ccfDNA aus Blut von Non-HL-Patienten vorgenommen, um zu untersuchen, ob das Panel

generell auch für prä-therapeutische ccfDNA geeignet ist, bevor das Panel an pHL ausgetestet wurde.

12 Blutproben von gesunden Probanden dienten als Negativkontrollen. Insgesamt wurden 12 Non-HL, bei denen sowohl prä-therapeutische ccfDNA, als auch FFPE-Gewebe vorlag, auf SNVs, Indels, TL und VDJ-Rekombinationen untersucht.

Es wurden im Durchschnitt 25 ng/ml Plasma gewonnen. Die Konzentration nach der finalen Amplifikation lag bei den gDNA-Bibliotheken bei durchschnittlich 65 ng/µl im Vergleich zu den ccfDNA-Bibliotheken, die bei 54 ng/µl lagen. Der Sollwert der finalen Konzentration der gDNA und der ccfDNA liegt bei mindestens 2 ng/µl, sodass eine ausreichende Menge an gDNA- und ccfDNA-Bibliotheken generiert werden konnten.

Zudem wurde bei den mittels ccfDNA untersuchten Non-HL jede Base durch *unique* Fragmente durchschnittlich 609x abgedeckt, wobei die Anreicherung im Mittel bei 71% lag. Im Vergleich zu den FFPE-Proben, bei denen die Abdeckung der *uniquen* Fragmente in Durchschnitt bei 900x und die durchschnittliche Anreicherung bei 77% lag, ist das *hybrid-capture*-basierte tNGS-Verfahren mit dem verwendeten, umfangreichen Panel für die Untersuchung von ccfDNA aus technischer Sicht gleichermaßen gut geeignet wie gDNA aus FFPE-Gewebe.

Bei den Negativkontrollen wurden in fast jeder Probe konstant die gleichen Varianten im niederfrequenten Bereich gefunden. Diese panelspezifischen Fehler stimmten teilweise mit den zuvor mittels gDNA aus FFPE-Gewebe identifizierten Fehlern überein, die auf Taq-Polymerase-Fehler, schlecht zu sequenzierende Bereiche (GC-reiche Regionen oder repetitive Sequenzen) oder falschen Annotationen zurückzuführen sind. Mittels dieser detektierten „Varianten“ konnte für das *hybrid-capture*-basierte Verfahren an ccfDNA eine Fehlerliste erstellt werden, die für die Filterung der detektierten Varianten der Non-HL-Patienten verwendet wurde.

Bei der Untersuchung der 12 Non-HL konnten insgesamt in allen 12 FFPE-Geweben insgesamt 115 Varianten und in allen 12 untersuchten ccfDNAs insgesamt 95 Varianten nach Ausschluss der „Varianten“ der Fehlerliste identifiziert werden. Bei dem Vergleich der 12 Non-HL mit FFPE-Gewebe und ccfDNAs konnten 93 Varianten sowohl im FFPE-Gewebe (durchschnittliche VAF: 34,4%), als auch in den ccfDNAs (durchschnittliche VAF: 23,7%) detektiert werden (Anhang: Tab. 13). 22 Varianten (durchschnittliche VAF: 34,1%) konnten nur im FFPE-Gewebe und zwei Varianten (VAF: 7% und 8,6%) nur in den ccfDNAs nachgewiesen werden (Abb. 20). Die Anzahl der Varianten je Fall mit Variante lag bei den FFPE-Geweben bei durchschnittlich 9,6 Varianten und bei den ccfDNAs bei 7,9 Varianten (Abb. 9 a). Da kein tumorfreies Gewebe zur Verfügung stand und Non-HL eine hohe VAF aufweisen, konnte aufgrund der VAF und des fehlenden tumorfreien Gewebes kein Ausschluss der Keimbahn-Varianten erfolgen.

Im FFPE-Gewebe konnten drei TL detektiert werden, während in den ccfDNAs zwei der drei TL nachgewiesen werden konnten.

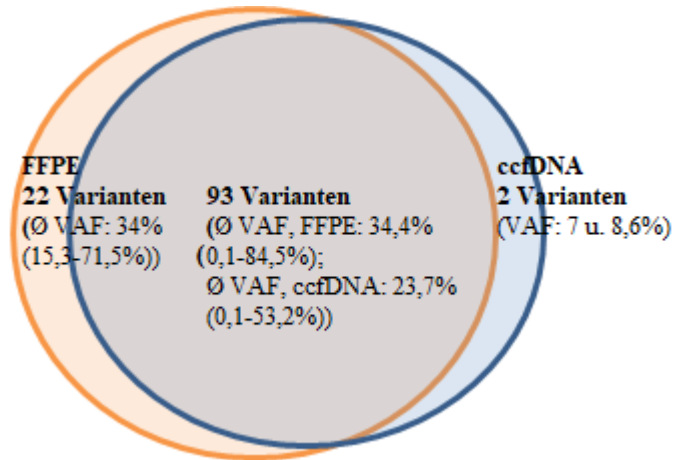


Abb. 20: Anzahl der Varianten und durchschnittliche VAF sowie der VAF-Bereich der identifizierten Varianten, die durch das *hybrid-capture*-basierte tNGS-Verfahren in gDNA aus FFPE-Gewebe bzw. ccfDNA aus Blut in 12 Non-HL-Patienten identifiziert wurden.

Es wurden insgesamt 17 detektierte Varianten aus 6 Patienten für die Validierungsuntersuchungen herangezogen, die alle mittels konventioneller Sanger Sequenzierung validiert werden konnten. Von den 17 validierten Varianten wurden 16 Varianten sowohl im FFPE-Gewebe, als auch in der jeweiligen ccfDNA nachgewiesen. Eine der validierten Varianten wurde nur im FFPE-Gewebe und nicht in der ccfDNA detektiert.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass 81% der Varianten, die mittels gDNA aus FFPE-Gewebe (VAF: 34,4%) detektiert wurden, auch in den jeweiligen ccfDNAs (VAF: 23,7%) identifiziert werden konnten. Zudem konnten 22 Varianten nur in den FFPE-Geweben und nicht in den ccfDNAs detektiert werden. Die durchschnittliche VAF von 34% der Varianten, die ausschließlich im FFPE-Gewebe detektiert wurden, unterschied sich im Vergleich zu der durchschnittlichen VAF von 34,4% bei den Varianten, die sowohl im FFPE-Gewebe, als auch in der ccfDNA identifiziert wurden, nur geringfügig voneinander. Die Gründe hierfür könnten in der geringen basalen Autophagozytoserate der Non-HL liegen (168), weshalb ein geringer ctDNA-Gehalt in den ccfDNAs der Non-HL vorliegen könnte und daher einige Varianten unter der Detektionsgrenze liegen könnten. Außerdem konnten zwei Varianten ausschließlich mittels ccfDNA identifiziert werden. Im Vergleich zu der durchschnittlichen VAF von 23,7% bei den Varianten, die in den FFPE-Geweben und ccfDNAs detektiert wurden, waren die VAFs der beiden detektierten Varianten, die nicht mittels FFPE-Gewebe detektiert wurden mit 7 und 8,6% deutlich geringer. Die zwei neuen Varianten, die ausschließlich in der ccfDNA detektiert wurden, könnten aufgrund der interklonalen Diversität zustande kommen. Währenddessen man

beim FFPE-Gewebe nur ein kleines Areal eines Lymphknotengewebes der Non-HL untersuchen kann, kann man mittels ccfDNA einen Ausschnitt aus allen Lymphknoten erhalten, weshalb sie für die Variantendetektion geeigneter ist (169–171).

Es konnte somit gezeigt werden, dass ccfDNA für die tNGS-basierte *hybrid-capture* Methode geeignet ist und auch für die Variantendetektion der HL im niederfrequenten Bereich aufgrund ihrer höheren Qualität geeignet sein könnte. Im nächsten Schritt wurde daher ein Vergleich zwischen gDNA aus FFPE-Gewebe und ccfDNA aus Blut bei pHL vorgenommen, um die Methode an den pHL zu etablieren, die sich durch ihren geringen Tumoranteil (1-5% HRS-Zellen im Gewebe), der mit einer geringen VAF einhergeht, auszeichnen.

Vergleich zwischen gDNA aus FFPE-Gewebe und prä-therapeutischer ccfDNA bei pHL

Durch Untersuchungen der ccfDNA bei Non-HL konnte gezeigt werden, dass ccfDNA für die tNGS-basierte *hybrid-capture* Methode geeignet ist. Daher sollte im Anschluss untersucht werden, wie sich ccfDNA im Vergleich zu gDNA aus pHL-Patienten für die Variantendetektion eignet.

Da während der Durchführung dieser Arbeit weitere von Varianten betroffene Gene in HL publiziert wurden (153,172), wurde das Panel um einige HL-typische Gene erweitert (*CSF2RB*, *FOXO1*, *IGLL5*, *ITPR3*, *MYB*, *NFKBIA*, *NFKBIE*, *NUP214*, *PTPNI*, *TET*, *BTK*, *CXCR4*, *PLCG2*, *CIITA*) (Panel Version 2 (v2)). Es beinhaltete insgesamt 121 Gene und es wurden insgesamt 325 kb abgedeckt.

Als Negativkontrolle diente Blut von 12 gesunden Probanden zur Generierung einer neuen Fehlerliste für das erweiterte Panel. Die als Fehler identifizierten Varianten wurden zur Filterung der detektierten Varianten der pHL-Patienten verwendet.

Daraufhin wurde prä-therapeutische ccfDNA von 11 pHL-Patienten mittels *hybrid-capture*-basierten Verfahrens untersucht und im Anschluss mit den gDNAs aus FFPE-Gewebe der gleichen Patienten verglichen.

Es wurden durchschnittlich 35,1 ng/ml Plasma gewonnen. Für das *hybrid-capture*-basierte Verfahren sollten 200 ng DNA je Probe eingesetzt werden, sodass die isolierte Menge an DNA für die Bibliothek-Herstellung ausreichend war. Die finale Konzentration nach Amplifikation lag bei den ccfDNA-Bibliotheken bei 69,1 ng/μl. Der Sollwert der finalen Konzentration der ccfDNA-Bibliothek liegt bei mindestens 2 ng/μl, sodass eine ausreichende Menge an ccfDNA generiert werden konnte. Im Vergleich zu den ccfDNAs der adulten Non-HL, bei denen durchschnittlich 25 ng/ml Plasma gewonnen und die Konzentration nach finaler Amplifikation bei 54 ng/μl lag, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen der ccfDNA der pHL und der ccfDNA der adulten Non-HL ersichtlich.

Durch das tNGS basierte *hybrid-capture* Verfahren konnten mittels der ccfDNA untersuchten Proben jede Base durch *unique* Fragmente durchschnittlich 690x abgedeckt werden. Die Anreicherung lag im Mittel bei 65,5%.

Verglichen mit den gDNA-Proben der gleichen Patienten, bei denen die Abdeckung im Durchschnitt bei 710x und die durchschnittliche Anreicherung bei 68,8% lag, ist das *hybrid-capture*-basierte Verfahren für die Untersuchung von ccfDNA (pHL) aus technischer Sicht genauso gut geeignet wie gDNA aus FFPE-Gewebe. Auch im Vergleich zu den untersuchten ccfDNAs der Non-HL, bei denen jede Base durch *unique* Fragmente durchschnittlich 609x abgedeckt und die Anreicherung im Mittel bei 71% lag, unterscheiden sich die Werte nicht signifikant voneinander, sodass gezeigt werden konnte, dass das *hybrid-capture*-basierte tNGS-Verfahren unter Verwendung von ccfDNA von pHL-Patienten für die Herstellung von Bibliotheken geeignet ist und eine gute Effizienz aufzeigte.

Es konnten in 11 der 11 untersuchten pHL in den gDNAs aus Ganzschnitten von FFPE-Geweben und in den ccfDNAs Varianten detektiert werden. Es wurden insgesamt 67 Varianten in den ccfDNAs in 27 der 121 untersuchten Gene identifiziert, von denen 51 Varianten auch in den jeweiligen FFPE-Geweben nachgewiesen werden konnten.

Zur Bestimmung der Keimbahn-Varianten wurden zusätzlich konsekutive ccfDNA-Proben herangezogen, die aus Blutproben extrahiert wurden, die von den Patienten unter Therapie stammten.

Es wurde beobachtet, dass niederfrequente Varianten unter Therapie in den konsekutiven ccfDNA-Proben verschwanden, während Varianten mit einer hohen VAF bei ca. 50% persistierten. Da somatische Varianten in niederfrequenten Bereich zu finden sind und unter der Annahme, dass die Therapie anschlägt, wegfallen sollten und Keimbahn-Varianten im höheren VAF-Bereich ab 35% anzutreffen sind und auch nach der Therapie weiterhin zu finden sein sollten, konnten durch die konsekutiven ccfDNA-Proben eine Unterscheidung zwischen somatischen- und Keimbahn-Varianten vorgenommen werden.

Dadurch konnten 14 der 67 Varianten als Keimbahn-Varianten detektiert werden, die alle sowohl in den ccfDNAs, als auch im FFPE-Gewebe identifiziert werden konnten (Anhang: Tab. 23). Die VAF der Keimbahn-Varianten lag bei den ccfDNAs bei durchschnittlich 49,6% (Bereich: 41-57,6%) und bei den FFPE-Geweben im Mittel bei 46,4% (Bereich: 36-53%). Wie zu erwarten war, lagen somit keine erheblichen Unterschiede zwischen den VAFs der Keimbahn-Varianten der FFPE-Gewebe und ccfDNAs vor.

Nach Ausschluss der Keimbahn-Varianten konnten weiterhin in allen 11 ccfDNAs und in 10 der 11 FFPE-Gewebe-Proben Varianten detektiert werden. Es wurden insgesamt 53 Varianten in den ccfDNAs in 19 von 121 untersuchten Genen identifiziert, von denen 37 Varianten auch in den jeweiligen FFPE-Geweben nach Ausschluss der Keimbahn-Varianten nachgewiesen werden konnten. Die durchschnittliche VAF lag bei den ccfDNAs bei 9,8% und bei den FFPE-

Gewebe im Mittel bei 1,4%, sodass eine deutlich höhere VAF bei den mittels ccfDNA identifizierten Varianten vorlag (Abb. 10 b). Die Anzahl der Varianten je Patient lag bei den ccfDNAs im Mittel bei 4,8 Varianten (1-9 Varianten) und bei den mittels gDNA untersuchten FFPE-Gewebe bei durchschnittlich 3,7 Varianten (1-5 Varianten) (Abb. 10 a). In den ccfDNAs der pHL konnten somit insgesamt mehr Varianten mit einer höheren VAF als in den jeweiligen FFPE-Gewebe identifiziert werden.

Bei den pHL stellte sich daher heraus, dass ccfDNA für die Variantendetektion mittels *hybrid-capture*-basierten Verfahrens besser geeignet ist als FFPE-Gewebe, da einige Varianten ausschließlich in der ccfDNA detektiert wurden.

Im Vergleich zu den Non-HL konnten bei den pHL sowohl in den FFPE-Gewebe, als auch in den ccfDNAs durchschnittlich eine geringere Anzahl an Varianten je Fall detektiert werden.

Begründet liegt dies im verwendeten Panel, das vor allem Gene beinhaltete, die in Non-HL bereits als mutiert beschrieben wurden. Die VAF der untersuchten pHL war wie erwartet, aufgrund des geringen Tumoranteils, sowohl bei den untersuchten ccfDNAs, als auch im FFPE-Gewebe niedriger als bei den Non-HL. Wie zu erwarten war, war bei den Non-HL-Patienten die durchschnittliche VAF der mittels ccfDNA untersuchten Proben geringer als bei den FFPE-Gewebeproben der gleichen Patienten. Im Gegensatz dazu konnte durch die untersuchten pHL gezeigt werden, dass die durchschnittliche VAF der untersuchten ccfDNA-Proben deutlich höher war, als in den FFPE-Gewebeproben. Birkenmeier et al. konnten bereits zeigen, dass in cHL eine höhere basale Autophagozytoserate im Vergleich zu den Non-HL vorherrscht (168). Dies könnte die erhöhte durchschnittliche VAF der ccfDNAs im Vergleich zu den FFPE-Gewebe in den pHL erklären.

HL sind durch einen geringen Tumoranteil gekennzeichnet. Da die niederfrequenten Varianten im Fehlerbereich liegen, wurde eine Validierung der Varianten mittels PCR-Amplifikation der potenziell mutierten Bereiche und anschließender konventioneller Sanger Sequenzierung vorgenommen (3.3.1-3.3.3).

Zur Validierung der Varianten wurde mit mikrodisssektierten HRS-Zellen gearbeitet (4.1.1). Es wurden 9 Patienten mit 21 detektierten Varianten für die Validierung herangezogen, die alle verifiziert werden konnten.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das *hybrid-capture*-basierte Verfahren für die Variantendetektion bei pHLs mittels ccfDNA und gDNA aus FFPE-Gewebe geeigneter ist als das *dual-strand* Verfahren. Daher wurde mit dem *hybrid-capture*-basierten Verfahren für die weiteren Untersuchungen der pHL gearbeitet.

Es konnte zudem durch den Vergleich zwischen ccfDNA und gDNA aus FFPE-Gewebe von pHL-Proben gezeigt werden, dass sich die *hybrid-capture* Methode unter Verwendung von ccfDNA für die Variantendetektion bei pHL-Patienten besser eignet, als gDNA aus FFPE-

Ganzschnitten, weshalb die anschließenden Untersuchungen der qPET >3 und <3 Patienten (pHL) mit ccfDNA vorgenommen wurden.

Untersuchungen von ccfDNAs aus qPET >3 und <3 pHL-Patienten

Pro Jahr erkranken etwa 180 Kinder und Jugendliche unter 18 Jahren in Deutschland an einem HL, wobei qPET >3-Patienten nur 5% aller pHL-Patienten darstellen. Zudem konnte für die Untersuchungen der ccfDNAs nur frisches Blut aus aktuell diagnostizierten Fällen verwendet werden und nicht auf asserviertes FFPE-Gewebe zurückgegriffen werden. Daher standen für die Analyse der qPET >3- und <3-Patienten der pHL nur insgesamt 22 prä-therapeutische Blutproben zur Verfügung. 9 Patienten hatten einen qPET >3 und 13 Patienten einen qPET <3. Es konnte durchschnittlich 30 ng/ml Plasma gewonnen werden. Da die einzusetzende DNA-Menge je Probe bei 200 ng lag, war die isolierte Menge an DNA für die Bibliothek-Herstellung ausreichend. Die finale Konzentration nach Amplifikation lag bei den ccfDNA-Bibliotheken im Mittel bei 66,4 ng/ μ l. Es sollte insgesamt 2 ng/ μ l ccfDNA-Bibliothek eingesetzt werden, sodass auch bei den qPET >3 und <3-Patienten die ccfDNA Menge ausreichend war, um mit dem *hybrid-capture*-basierten Verfahren zu arbeiten.

Durch das tNGS basierte *hybrid-capture* Verfahren konnte bei den mittels ccfDNA untersuchten Proben jede Base durch *unique* Fragmente durchschnittlich 741x abgedeckt werden, wobei die Anreicherung bei durchschnittlich 67% lag.

Es konnten insgesamt in 19 von 22 Proben 124 Varianten in 42 Genen der 121 untersuchten Gene detektiert werden. Da von 16 Patienten konsekutive ccfDNA vorlag, konnten 18 von 110 Varianten als Keimbahn-Varianten durch die jeweiligen konsekutiven ccfDNAs im gleichbleibenden Allelfrequenz-Bereich identifiziert werden. Bei den 6 Patienten, bei denen keine konsekutive ccfDNA vorlag, wurden 14 Varianten detektiert, von denen 11 Varianten in einem VAF-Bereich zwischen 2,2-10% und drei Varianten zwischen 44-58% lagen, sodass davon auszugehen war, dass es sich bei diesen drei detektierten Varianten, aufgrund der hohen VAF >40%, um Keimbahn-Varianten handelte.

Zudem konnte in einer der 22 untersuchten ccfDNA-Proben ein TL-Bruchpunkt identifiziert werden (Abb. 12), der mit Hilfe von mikrodisssektierten HRS-Zellen mittels Bruchpunkte-spezifischer PCR-Amplifikation und anschließender Sanger Sequenzierung bestätigt wurde (3.3.1-3.3.3). IgH-fusionierte TL stellen bei Non-HL keine Seltenheit dar, bei HL wurden sie allerdings bislang noch nicht beschrieben. Es handelt sich bei der TL um eine *IgH-Switch-Region gamma 2*-Fusion mit *AICDA (AID)*, die wahrscheinlich inaktivierend ist, da das Leseraster von *AICDA* durch den TL-Bruchpunkt zerstört wurde.

Außerdem wurden die ccfDNAs der pHL auf VDJ-Rekombinationen untersucht, um den Differenzierungsstatus der Vorläuferzelle der HRS-Zellen zu beschreiben. Hierfür wurden sowohl für kurze, als auch für lange Amplifikate klonotypische Primer designt (4.1.2). Es

konnten insgesamt in 7 von 22 pHL-Patienten 5 VDJ- und zwei DJ-Rekombinationen identifiziert werden (Anhang: Tab. 28), die alle mittels mikrodissektierter HRS-Zellen durch PCR-Amplifikation und anschließender Sanger Sequenzierung verifiziert werden konnten. Sowohl kurze als auch lange Amplifikate der VDJ-Rekombinationen trugen Anzeichen von SHM bei einer durchschnittlichen VAF von 7,6%. Es kann zudem durch das Verhältnis von Austausch- zu stillen Varianten gezeigt werden, ob die VDJ-Umlagerungen selektiert sind. Ein Verhältnis von 1,5 und kleiner spricht für selektierte VDJ-Umlagerungen (173). Das Verhältnis von Austausch- zu stillen Varianten in den identifizierten VDJ-Umlagerungen lag bei 2,1 (29/14) in den *Framework*-Regionen. Außerdem konnte eine Stop-Variante in einer *Framework*-Region in den 5 potenziell funktionalen VDJ-Umlagerungen identifiziert werden. Dies weist darauf hin, dass die VDJ-Umlagerungen der pHLs nur partiell selektiert sind. Es ist daher wahrscheinlich, dass die HRS-Zellen der pHL von prä-apoptischen GC-Zellen abstammen.

Pathogenese-Mechanismen bei pHL

Identifizierte Varianten betreffen unterschiedliche Signalwege

pHL wurden als eigene Gruppe bislang noch nicht abgegrenzt von den adulten HL im Hinblick auf die Pathogenese untersucht, was im Zuge dieser Arbeit durch die Betrachtung aller pHL (qPET $>$ und $<$ 3-Patienten) vorgenommen wurde. Der JAK/STAT-, NF κ B- und der PI3K-AKT-Signalweg sind die Signalwege, bei denen bereits in unterschiedlichen Publikationen mutierte Gene bei nicht nach Alter vorselektierten HL-Patienten beschrieben wurden und deren involvierte Gene in der vorliegenden Arbeit auch bei den pHL als mutiert vorgefunden wurden.

Mit insgesamt 33 detektierten Varianten im *SOCS1*- und im *STAT6*-Gen stellt der JAK/STAT-Signalweg den Signalweg dar, der in diesem untersuchten Kollektiv am stärksten von Varianten betroffen war. Es konnten in dieser Arbeit in 13 von 22 untersuchten Patienten (59%) insgesamt 26 *SOCS1*-Varianten detektiert werden, wobei in 5 der 13 Patienten, bei denen *SOCS1*-Varianten identifiziert wurden, zusätzlich 7 Varianten in *STAT6* detektiert werden konnten (Abb. 11). *SOCS1*-Varianten wurden bereits von Weniger et al. (65) und *STAT6*-Varianten von Spina et al. und Tiacchi et al. bei nicht nach Alter vorselektierten HL-Patienten beschrieben (67,68). Somit scheinen vor allem mutierte Gene, die im JAK/STAT-Signalweg eine Rolle spielen, an der Pathogenese der pHL beteiligt zu sein.

TNFAIP3, ein Gen, das im Zusammenhang mit dem NF κ B-Signalweg steht und ein negativer Regulator der NF κ B-Aktivität ist, wurde bereits von Schmitz et al. bei HL als mutiert beschrieben (77) und lag in dieser Studie in 8 von 22 Patienten (36%) mutiert vor, bei denen insgesamt 8 Varianten detektiert wurden (Abb. 11).

ITPKB und *GNAI3* sind Gene, die im PI3K/AKT-Signalweg eine Rolle spielen. *ITPKB* war in der vorliegenden Arbeit in 5 von 22 pHL-Patienten (23%) 6mal und *GNAI3* in 4 von 22 Patienten (18%) 5mal mutiert (Abb. 11). Beide Gene wurden bereits bei Tiacci et al. als mutierte Gene in HL beschrieben (68). Außerdem konnte ein doppelt so hoher Anteil an *ITPKB*-Varianten im NS-Subtyp (31,2% der untersuchten NS-pHL-Patienten (5/16 Patienten)) im Vergleich zum MC-Subtyp (16,6% der untersuchten MC-pHL-Patienten (1/6 Patienten)) detektiert werden.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Deregulation durch multiple Gene des JAK/STAT-, NF κ B- und des PI3K-AKT-Signalweges wahrscheinlich einen Einfluss auf die Pathogenese der pHL hat. Bezüglich der aktivierten Signalwege sind in dieser Arbeit keine Unterschiede zwischen den adulten HL und pHL ersichtlich.

Identifizierte Varianten, die eine Immunevasion begünstigen

Es konnten in 6 von 22 Patienten (27%) insgesamt 10 *B2M*-Varianten, von denen drei Stop-Varianten waren, identifiziert werden (Abb. 11). Varianten in diesem Gen können zu einer Inhibierung der Ausprägung des MHC-I-Komplexes an der Oberfläche der HRS-Zellen führen und wurden bereits mittels WES-Analysen im Jahre 2015 bei HL in 70% der Patienten beschrieben (69). MHC-I dient der AG-Präsentation für zytotoxische T-Zellen. Aufgrund des Fehlens von MHC-I auf der Oberfläche der HRS-Zellen können die zytotoxischen T-Zellen die Tumorzellen nicht mehr erkennen. Sie entgehen somit den Abwehrmechanismen des adaptiven IS (1.5.2) (82).

Nukläärer Transporter *Exportin 1* (*XPO1*)

Varianten im Transporterprotein *XPO1* wurden bereits in mehreren Publikationen in HL-Patienten beschrieben, in denen der Anteil an *XPO1*-Varianten bei 31% (174) und 57% lag (95) und konnte auch in dieser Arbeit in einem Patient einmal mutiert detektiert werden (Abb. 11).

Identifizierte Varianten, die bislang bei HL nicht bekannt waren

Es konnte eine Variante in dem Gen *BIRC3*, das auch mit dem NF κ B-Signalweg assoziiert ist, identifiziert werden. *BIRC3* konnte in früheren Publikationen nur im Zusammenhang mit TL in MZL gebracht werden (175), eine Varianten in diesem Gen war jedoch bislang bei HL nicht bekannt.

Zudem konnten mutierte Gene (*HLA-A*, *CD83*), die im Zusammenhang mit der AG-Präsentation stehen, in dieser Arbeit identifiziert werden. *HLA-A*-Varianten, die bislang nicht bei HL beschrieben wurden, konnten in 3 von 22 Patienten (14%) einmal mutiert detektiert werden (Abb. 11). *CD83* wird als potenzieller Biomarker und therapeutisches Werkzeug bei HL diskutiert und konnte in einem Patient einmal mutiert identifiziert werden (Abb. 11) (176).

Außerdem wurden in dieser Arbeit 4 mutierte Gene (*ARID1A*, *HIST1H1E*, *TBL1XR1*, *KMT2D*) in pHL identifiziert, die eine Rolle in der Regulation des Chromatins spielen und zu Chromatin-Modifikationen führen können. Im *ARID1A*-Gen wurden insgesamt drei Varianten in drei

Patienten (14%), in *HIST1H1E* und *TBL1XR1* zwei Varianten in einem Fall (je 5%), sowie in *KMT2D* (*MLL2*) eine Variante in den 22 untersuchten pHL-Patienten detektiert (Abb. 11). *ARID1A* ist ein Bestandteil des SWI/SNF-Chromatin-Modifikations-Komplexes, während *TBL1XR1* ein Teil eines *histone deacetylase 3* (HDAC 3)-Komplexes und *KMT2D* eine H3K4-Histonmethyltransferase darstellt (177–179). *HIST1H1E* ist ein Histon, das für die Nukleosomenstruktur der chromosomalen Faser in Eukaryonten verantwortlich ist, im großen Histon-Gencluster auf Chromosom 6 liegt und im Zusammenhang mit dem Rahman-Syndrom steht (180,181). Bei DLBCL ist bereits bekannt, dass mehr als 50% der mutierten Varianten in Genen vorkommen, die mit Transkriptionsfaktoren oder Chromatin-Modifikationen im Zusammenhang stehen (156). Li et al. fand *ARID1A*-Varianten in 11% und *HIST1H1E*-Varianten in 27% der insgesamt 102 untersuchten FL (182). Mareschal et al. und Braggio et al. beschrieben bereits *TBL1XR1*-Varianten in DLBCL (183,184). Morin et al. publizierte *KMT2D*-Varianten in 32% der untersuchten DLBCL und in 89% der FL-Patienten (185). Pasqualucci wiederum beschrieb in ihrem *Review* *KMT2D*-Varianten in 70-80% der FL-Patienten (158) und Mlynarczyk et al. im *Review* in 30-80% der Patienten mit einem DLBCL und FL (156). Varianten in diesen Genen wurden bei HL bislang noch nicht beschrieben und zeigen, dass epigenetische Vorgänge und Chromatin-Modifikationen nicht nur bei Non-HL, sondern auch bei HL eine Rolle spielen.

Zudem konnten weitere mutierte Gene in den pHL detektiert werden, die bislang noch nicht bei HL beschrieben wurden, wie beispielsweise *BTG1*, *IGLL5*, *LTB*, *TMEM30A*, *IRF4*, *IRF8*, *MAP2K*, *PIMI*, *CDH2*, *KLHL6*, *ACTG1*, *SPEN*, *CDK4*, *NOTCH1* und *KLF2*. *IRF8*-Varianten wurden bislang nur in FL mutiert beschrieben (182) und *PIMI*-Varianten sind bislang nur bei DLBCL bekannt (186). *IGLL5*-Varianten konnten bereits im Zusammenhang mit Progressionen bei Myelomen beschrieben werden (187) und *NOTCH1*-Varianten wurden bereits in MCL detektiert (188). In splenischen MZL wurden außerdem bereits *KLF2*-Varianten beschrieben (189).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die bei nicht altersselektionierten HL von mutierten Genen betroffenen bekannten Signalwege auch bei pHL am häufigsten betroffen waren. Es konnten zudem Varianten in neuen Genen identifiziert werden, die in HL derzeit noch nicht beschrieben wurden. Um zu ermitteln, ob die detektierten Varianten in den neuen Genen spezifisch für pHL-Patienten sind, müssten vergleichende Untersuchungen mit adulten HL vorgenommen werden.

Vergleich der qPET >3 und <3-Patienten

Vergleicht man die durchschnittliche Abdeckung jeder Base durch *unique* Fragmente zwischen den 9 qPET >3 und 13 qPET <3-Patienten, fiel auf, dass bei den qPET <3-Patienten die durchschnittliche Abdeckung der *unique* Fragmente mit 612x etwas geringer war, als bei den

qPET >3-Patienten, bei denen jede Base durch *unique* Fragmente durchschnittlich 877x abgedeckt wurde. Die Anreicherungen unterschieden sich in den beiden Gruppen mit durchschnittlich 67,8% bei den qPET <3-Patienten und durchschnittlich 66% bei den qPET >3-Patienten, nur geringfügig voneinander.

Es wurden bei den qPET >3-Patienten in insgesamt 7 von 9 Patienten 55 somatische Varianten identifiziert, bei denen es sich um 16 Indels und 39 SNVs handelte. Bei den qPET <3-Patienten wurden insgesamt in 12 von 13 Patienten 48 somatische Varianten detektiert, bei denen es sich um 9 Indels und 39 SNVs handelte (Abb. 21).

Vergleicht man die qPET >3 und <3-Patienten in Bezug auf die Anzahl der Varianten je Patient, fiel auf, dass die Anzahl der Varianten je Patient bei den qPET >3-Patienten mit durchschnittlich 7,8 Varianten je Patient tendenziell höher war, als bei den qPET <3-Patienten mit durchschnittlich 4 Varianten (Abb. 13 a, Tab. 15). Die durchschnittlichen VAFs bei den qPET >3 (10,4%) und <3-Patienten (11,1%) wiesen keine erheblichen Unterschiede auf (Abb. 13 b, Tab. 15). 9 Gene waren bei den qPET >3-Patienten rekurrent von Varianten betroffen und 8 Gene in den qPET <3-Patienten. Insgesamt konnten 10 Gene identifiziert werden, die sowohl bei qPET >3, als auch bei den qPET <3-Patienten mutiert vorkamen. 10 Gene lagen wiederum nur bei qPET >3-Patienten mutiert vor und 11 Gene ausschließlich bei den qPET <3-Patienten. Insgesamt konnten somit 20 mutierte Gene in den qPET >3-Patienten und 21 mutierte Gene in den qPET <3-Patienten detektiert werden (Tab. 15).

Tab. 15: Vergleich der 9 qPET >3 und 13 <3 pHL-Patienten in Bezug auf die identifizierten Varianten und mutierten Gene.

	qPET >3	qPET <3
Ø Zahl der Varianten je Patient	7,8	4
Ø VAF	10,4%	11,1%
Anzahl der Gene, die rekurrent betroffen waren	9	8
Anzahl an Genen, die in beiden Gruppen mutiert vorkamen	10	
Anzahl der Gene, die in jeweils nur einer der Gruppen vorkamen	10	11
Anzahl an betroffenen Genen insgesamt	20	21

Die Anzahl der Indels und SNVs der qPET >3 und <3-Patienten unterschied sich nur geringfügig voneinander (Abb. 11, Abb. 21). Es fiel jedoch auf, dass Varianten in *B2M* und *GNA13* bei den 13 untersuchten qPET <3-Patienten seltener detektiert wurden, als bei den 9 qPET >3-Patienten, während dessen *ITPKB*-Varianten bei den qPET >3-Patienten seltener vorkamen, als bei den qPET <3-Patienten (Abb. 22).

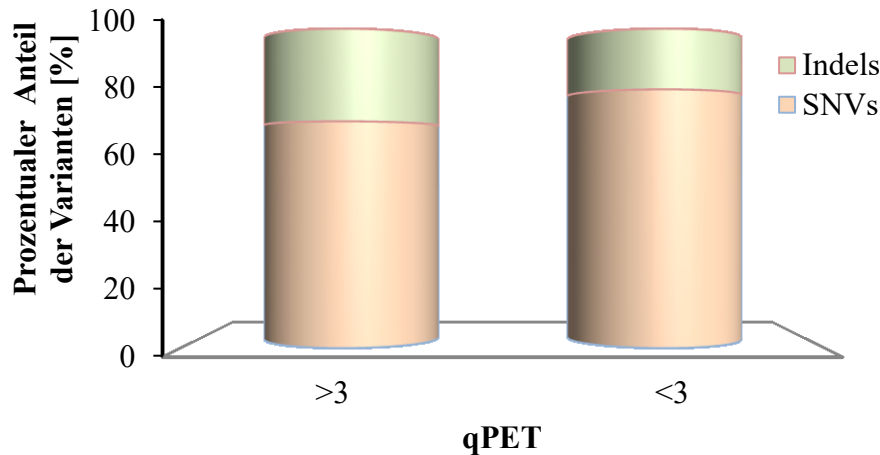


Abb. 21: Vergleich der detektierten Indels und SNVs der pHL-Patienten

Dargestellt ist der Vergleich zwischen den 13 qPET <3 und 9 qPET >3 pHL-Patienten, bezogen auf die detektierten Indels (grün)/SNVs (orange), die mittels des *hybrid-capture*-basierten Verfahrens durch tNGS identifiziert wurden.

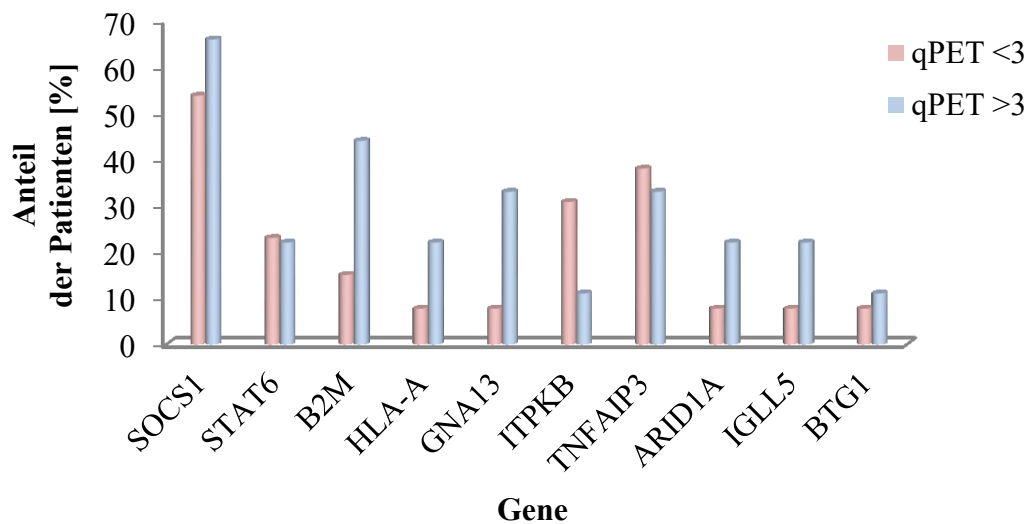


Abb. 22: Vergleich der prozentualen Anteile der pHL-Patienten, bei denen Gene mehrfach von Varianten betroffen waren.

Dargestellt ist der Vergleich zwischen den 13 qPET <3 (rosa) und 9 qPET >3 (blau) -pHL-Patienten, hinsichtlich der Gene, die mehrfach betroffen sind, in Bezug auf den prozentualen Anteil der Patienten. Es konnte gezeigt werden, dass *B2M*- und *GNA13*-Varianten bei den qPET <3-Patienten seltener detektiert wurden, als bei den qPET >3-Patienten. *ITPKB*-Varianten kamen dagegen bei den qPET >3-Patienten seltener vor, als bei den qPET <3-Patienten.

Bei dem JAK/STAT-, PI3K/AKT- und NF κ B-Signalweg, sowie in Chromatin-regulatorischen Vorgängen traten keine erheblichen Unterschiede in Bezug auf den prozentualen Anteil der Patienten, die mutierte Gene in den betroffenen Signalwegen und Chromatin-regulatorischen Vorgängen aufwiesen, zwischen qPET >3 und <3-Patienten auf (Abb. 14). Es konnten jedoch Unterschiede zwischen qPET >3 und <3-Patienten in der Anzahl der mutierten Genen identifiziert werden, die mit der AG-Präsentation im Zusammenhang stehen. 55% der qPET >3-Patienten und 23% der qPET <3-Patienten enthielten mutierte Gene, die bei der AG-Präsentation eine Rolle spielen (Abb. 14). Der erhöhte prozentuale Anteil der Patienten mit Varianten bei Genen, die bei der AG-Präsentation involviert sind, könnte bei den qPET >3-Patienten ein Indiz dafür sein, dass die HRS-Zellen bei den qPET >3-Patienten einen besseren Schutzmechanismus gegenüber dem adaptiven IS entwickelt haben, als die der qPET <3-Patienten.

Therapiemonitoring mit ccfDNA bei pHL-Patienten

Es konnte bereits in Studien gezeigt werden, dass ccfDNA im Vergleich zu gDNA aus PBMC in DLBCL für *immunoglobulin-high-throughput-Next Generation Sequencing* (Ig-HT-NGS) eine höhere Sensitivität verspricht (125,127) und für molekulares Monitoring von Non-HL geeignet ist (190). Zudem wurde bei DLBCL gezeigt, dass die Detektion von somatischen Varianten aus ccfDNA mittels tNGS eine geeignete Methode für das Monitoring darstellt (128,129) und die ctDNA-Menge mit der Tumorlast korreliert. Deshalb wurde untersucht, ob ccfDNA aus pHL auch für das Therapiemonitoring von pHL-Patienten geeignet ist.

Es standen von 10 qPET <3 und 6 qPET >3-Patienten ccfDNAs zur Verfügung, die in Form von Blut vor, während und nach der Chemotherapie den Patienten entnommen wurden. Die Sensitivitätsgrenze wurde auf >0,5% VAF durch Untersuchungen an 10 gesunden Probanden festgelegt. Das Vorgehen der Bestimmung der Sensitivitätsgrenze wurde unter 4.1.4 genauer erläutert. Detektierte Varianten, die unter diese Sensitivitätsgrenze fallen, liegen bei dieser Untersuchung unter der Nachweisgrenze und wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Bei dem Vergleich der durchschnittlich gewonnenen Plasmakonzentration im Hinblick auf den Zeitraum der Entnahme, fiel auf, dass die Konzentration des Plasmas vor Therapiebeginn mehr als dreifach so hoch war, als während und nach der Therapie (Tab. 16).

Die durchschnittliche Abdeckung jeder Base durch *unique* Fragmente lag bei den prä-Therapie untersuchten ccfDNAs bei den qPET <3-Patienten bei 784x und bei den qPET >3-Patienten bei 1099x. Bei den untersuchten ccfDNAs aus Blut, die während der Therapie entnommen wurden, wurde jede Base durch *unique* Fragmente bei beiden Gruppen durchschnittlich ca. 700x abgedeckt. Auch in ccfDNAs aus Blut, die nach der Therapie entnommen wurden, konnte weiterhin eine ausreichend hohe durchschnittliche Abdeckung jeder Base durch *unique*

5. Diskussion

Fragmente mit 586x bei den qPET <3 und 1043x bei den qPET >3-Patienten generiert werden, sodass gezeigt werden konnte, dass auch nach der Therapie die ccfDNAs für die Bibliotheken-Herstellung geeignet sind.

Tab. 16: Durchschnittliche ccfDNA-Konzentration in Plasma von 10 qPET <3 und 6 qPET >3 pHL-Patienten

Zeitraum (Therapie)	Ø ccfDNA-Konz. in Plasma (ng/ml)	
	qPET	
	<3	>3
vor	38,5	31,8
während	10,9	10,5
nach	5,7	11,2

Insgesamt wurden in allen 10 qPET <3-Patienten vor der Therapie Varianten detektiert, die in den 34 zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Therapie untersuchten ccfDNAs unter der Nachweisgrenze lagen. Es konnten insgesamt bei den 10 qPET <3-Patienten 48 Varianten vor Therapiebeginn mit einer durchschnittlichen VAF von 11% detektiert werden, die bereits an Tag 29 und Tag 57, das heißt, nachdem die Patienten den ersten Block OEPA-Induktions-Chemotherapie erhalten haben, unter der Nachweisgrenze lagen und im weiteren Verlauf der Therapie nicht über der Nachweisgrenze auftraten (Abb. 15).

In allen 6 qPET >3-Patienten konnten in den ccfDNAs vor der Therapie 55 Varianten detektiert werden, wobei bei 4 der 6 Patienten in den konsekutiven ccfDNAs weiterhin Varianten identifiziert werden konnten. Es blieben 30 der insgesamt 55 vor Therapiebeginn detektierten Varianten noch bis nach dem ersten Block OEPA-Induktions-Chemotherapie in den insgesamt 19 zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Therapie untersuchten ccfDNAs über der Nachweisgrenze weiterhin bestehen (Abb. 16). Vor Therapiebeginn lag die durchschnittliche VAF aller Varianten bei den qPET >3-Patienten bei 10,4% und an Tag 29 bei durchschnittlich 1,4%. Bei den 30 verbliebenen Varianten handelte es sich um 23 SNVs und 7 Indels in 13 von insgesamt 121 untersuchten Genen.

Es konnte also gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den ccfDNAs der qPET <3-Patienten, bei denen keine Varianten mehr oberhalb der Nachweisgrenze nach dem ersten Block OEPA-Induktions-Chemotherapie zu finden waren, die Varianten bei 4 der 6 qPET >3-Patienten nach dem ersten Block OEPA-Induktions-Chemotherapie weiterhin bestehen blieben, wobei die durchschnittliche VAF bereits an Tag 29 abfiel. Die weitere Detektion der Varianten nach Therapieende bei einem von zwei qPET >3-Patienten, bei denen insgesamt 5 ccfDNAs nach dem Therapieende zur Verfügung standen, verdeutlichte das schlechte Ansprechen auf die Chemotherapie bei den qPET >3-Patienten.

Es konnte gezeigt werden, dass ccfDNA von pHL-Patienten für das Therapiemonitoring wahrscheinlich geeignet ist. Die ccfDNA-Analyse der pHL-Patienten scheint daher ein geeigneter Ansatz zu sein, um das Ansprechen der Therapie bereits zu einem frühen Zeitpunkt zu überwachen und eine optimierte patientenspezifische Therapie zu gewährleisten. Es konnte beobachtet werden, dass durch die Analyse der ccfDNA der pHL-Patienten Unterschiede zwischen den qPET <3 und >3 -Patienten ersichtlich waren und ccfDNA im Gegensatz zum indirekten Nachweis der Tumorzellen mittels qPET den Vorteil hat, einen direkten Nachweis des Vorhandenseins von HRS-Zellen in kurzer Zeit zu gewährleisten.

5.3 Histologische Untersuchung pHL

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Kollagene im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose bei unterschiedlichen Krankheitsbildern stehen. So wurde in Adenokarzinomen der Bauchspeicheldrüse bereits festgestellt, dass eine erhöhte Produktion von Kollagenen zu einer Chemotherapieresistenz führen kann (152). In einer weiteren Publikation konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Kollagen-Ablagerung zur gesteigerten Brustdichte beiträgt und Frauen mit einer vermehrten Brustdichte ein erhöhtes Risiko haben, an Brustkrebs zu erkranken (191). Außerdem bewirkt eine erhöhte Kollagen-Ablagerung die strukturelle Veränderung des Kollagen-Fibrillen-Verbandes. Die daraus resultierenden Veränderungen in den mechanischen Eigenschaften der Stromazellen des Brusttumors sind korreliert mit einem aggressiven Verlauf und einer schlechten Prognose bei Brustkrebs-Patientinnen (151).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die Kollagen-Ablagerungen bei pHL-Patienten in 4 qPET >3 und 5 qPET <3 -Patienten untersucht. Hierfür wurden histologische PSR-Färbungen von Lymphknoten-Biopsaten aus FFPE-Gewebe angefertigt. PSR wird für Kollagenfärbungen verwendet und kann mit Polarisationsmikroskopen (144) und Fluoreszenzmikroskopen visualisiert werden (149).

In dieser Arbeit wurde mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop gearbeitet, mit Hilfe dessen man rot fluoreszierende Kollagene, sowie vitale Zellen, die eine grüne Autofluoreszenz anzeigten, darstellen konnte. Die Quantifizierung des Kollagenanteils wurde durch das Programm QuPath (GitHub) vorgenommen. Der MC-Typ weist normalerweise keinen erkennbaren Kollagenanteil im Lymphknotengewebe auf, währenddessen im NS-Typ das Lymphknotengewebe von Kollagenbändern durchzogen ist und es in ein nodulär geprägtes Muster unterteilen. Sobald ein Follikel durch Kollagenbänder umschlossen ist, handelt es sich um ein NS-cHL (1). Aufgrund des generell hohen Kollagenanteils in NS-Patienten ist daher die Auswertung der NS-Typen und damit ein Vergleich von qPET <3 und >3 -Patienten schwierig, weshalb die MC-Typen getrennt von den NS-Typen untersucht wurden (4.2).

In den 4 MC qPET <3 -Patienten wurden 0,4% und in den 3 MC qPET >3 -Patienten 28,8% PSR positive Zellen in Bezug auf die Gesamt-Zellzahl detektiert. Die qPET >3 -Patienten wiesen

somit einen signifikant höheren Anteil ($p < 0.01$) an PSR positiven Zellen auf, als die qPET < 3 -Patienten, auch wenn nur insgesamt 7 MC-pHL-Patienten untersucht wurden. Durch die anschließende stichprobenartige 3-dimensionale Begutachtung von insgesamt 12 HRS-Zellen in den 4 qPET > 3 und insgesamt 14 HRS-Zellen in den 5 qPET < 3 -Patienten fiel auf, dass alle untersuchten HRS-Zellen der qPET > 3 -Patienten von Kollagen ummantelt waren. Die HRS-Zellen in den qPET < 3 -Patienten hingegen lagen nicht von Kollagen ummantelt im Gewebe vor (Abb. 17 a, b).

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass sich die HRS-Zellen der qPET > 3 -Patienten im Vergleich zu den qPET < 3 -Patienten im Hinblick auf den Anteil an Kollagen im gesamten Gewebe unterscheiden. Die bereits in Bauchspeicheldrüsen- und Brustkrebs festgestellte Beobachtung, dass eine erhöhte Expression von Kollagen zu einer Chemotherapieresistenz führt, konnte somit auch in dieser Arbeit bei den pHL beobachtet werden und könnte zur Chemotherapieresistenz beitragen.

In wie weit die umliegenden Zellen einen Einfluss auf die Kollagenproduktion haben oder ob die HRS-Zellen das Kollagen selbst produzieren, ist unklar. Eine weitere offene Frage ist, ob das Kollagen an der HRS-Zelle bindet und es daher zur Ummantelung kommt oder ob eine zufällige Anordnung von Kollagen ohne Bindung an der HRS-Zelle bei den qPET > 3 -Patienten vorherrscht.

DDR2 ist eine RTK, deren Ligand fibrilläres Kollagen ist. Anhand von immunhistochemischen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass DDR2 in HRS-Zellen exprimiert wird (93) und damit als potentieller Rezeptor für Kollagen auf der HRS-Zelle fungieren könnte. In einer Studie konnte bereits die Expression von DDR2 anhand von RNA-Expressionsdaten in HL-Zelllinien aufgezeigt werden (93). Außerdem konnte in einer anderen Studie dieser Arbeitsgruppe (persönliche Kommunikation: Dr. Theresa Jox) eine erhöhte relative Expression von DDR2 und Integrin- α -11, ein weiterer Rezeptor von Kollagen, in HL-Zelllinien im Vergleich zu Non-HL-Zelllinien durch RNA-Seq-Untersuchungen beobachtet werden, sodass es sein könnte, dass durch die erhöhte relative Expression und die daraus resultierende erhöhte Ausprägung von DDR2 und Integrin- α -11 an der Oberfläche der HRS-Zellen, Kollagen durch diese Rezeptoren an den HRS-Zellen direkt binden kann.

Eine Studie hat zudem gezeigt, dass WRG-28, ein DDR2-Inhibitor, der die DDR2-Kollagen-Interaktion in allosterischer Weise inhibiert, die Metastasierung der Brusttumorzellen in die Lunge bei Brusttumoren verhindert (192). Sollte sich herausstellen, dass Kollagen durch die Ummantelung der HRS-Zellen für die Chemotherapieresistenz, durch die dadurch hervorgerufene Blockierung des Chemotherapeutikums, verantwortlich ist und die Kollagenummantelung durch die Bindung von Kollagen an DDR2 auf der Oberfläche der HRS-Zellen resultiert und zur Aktivierung von DDR2 führt, könnte dies ein neuer Ansatz für pHL mit einem qPET > 3 darstellen, um der Chemotherapieresistenz zu entgehen. Um dies zu testen,

könnte man beispielsweise durch das immunzytochemische *Duolink*-Verfahren die Interaktion zwischen DDR2 und Kollagen auf den HRS-Zellen untersuchen. Mit diesem Verfahren kann die Interaktion von zwei Proteinen innerhalb einer Zelle detektiert und quantifiziert werden.

Man sollte außerdem weitere Gene mittels RNA-Sequenzierung untersuchen, die für das Vorkommen von Kollagen/DDR2/Integrine verantwortlich sind, wie beispielsweise der *transforming growth factor beta* (TGF β), Matrix-Metalloproteinasen (MMP1, -2, -8, -9, -13) und *tissue inhibitor of metalloproteinases 1* (TIMP1).

5.4 Ganz-Exom-Sequenzierung (WES)

Da die tNGS-Untersuchungen durch die Art der Methode auf bereits bekannte mutierte Gene beschränkt war, wurde eine Machbarkeitsstudie mittels WES vorgenommen, um das ganze Exom zu untersuchen. Es konnte bereits in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das *hybrid-capture*-basierte Verfahren für tNGS-Untersuchungen an ccfDNA besser geeignet ist als gDNA aus FFPE-Gewebe und da das WES-Verfahren auf dem gleichen *hybrid-capture* Verfahren beruht, wurde untersucht, ob sich ccfDNA auch für die WES-Analysen eignet. Dadurch sollten bislang unbekannte Varianten identifiziert und damit neue Pathogenese-Mechanismen der pHL aufgezeigt werden.

Bisher wurden nur wenige WES-Analysen an HL durch vorherige Mikrodissektion der HRS-Zellen oder durch Anreicherung der HRS-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) an Gefrierschnitten unter Verwendung von gDNA vorgenommen (68,69). Da diese Art der Untersuchung zum einen sehr zeitaufwendig ist und zum anderen nur eine geringe Menge an Gefrierschnitten zur Verfügung stehen, wäre die WES-Analyse mittels ccfDNA geeigneter, da mehr Patienten ohne Mikrodissektion untersucht werden könnten. Dies würde eine neue Möglichkeit darstellen, um Subgruppen von Patienten mit spezifischen Eigenschaften zu untersuchen und die Pathogenese-Mechanismen der HL zu erforschen.

Eine besondere Herausforderung bei den Untersuchungen von ctDNA stellten die geringen VAFs dar, die zum Teil im Fehlerbereich liegen, weshalb eine geeignete Filterung notwendig war, um diese Fehler von den somatischen Varianten unterscheiden zu können. Bei den Untersuchungen wurden Varianten im niederfrequenten VAF-Bereich betrachtet, weshalb Keimbahn-Varianten, die im höheren VAF-Bereich zu finden waren, ohne Vergleich zu normalem Gewebe identifiziert und ausgeschlossen werden konnten.

Aufgrund dessen, dass im niederfrequenten VAF-Bereich mehr Fehler vorkamen und die Zunahme der Fehler mit der Abnahme der VAF korrelierte, wurde für die exomweite Untersuchung eine Vorselektion von Patienten mit einer hohen VAF vorgenommen, deren ccfDNAs bereits mittels tNGS untersucht wurden und bei denen die VAF der Varianten bei durchschnittlich mindestens 5% lag. Zudem sollte die Abdeckung bei mindestens 300x liegen, um eine höhere Sensitivität zu erreichen. Außerdem wurden ausschließlich Varianten

begutachtet, deren VAF zwischen 5 und 35% lagen, da niederfrequente Varianten erwartet wurden. Nach Detektion der Varianten durch die WES-Analyse von ccfDNA wurde ein Vergleich zwischen den bereits durch tNGS identifizierten Varianten zur Evaluation des Verfahrens vorgenommen, um zu untersuchen, ob eine mindestens 300x Abdeckung ausreicht, um die bereits durch tNGS bekannten Varianten im WES zu detektieren. Anschließend wurden RNA-Sequenzierungen der gleichen Patientenproben vorgenommen, um die detektierten Varianten, die durch WES identifiziert wurden, mit den durch die RNA-Seq-Analysen exprimierten Varianten abzugleichen. Da die zu erwartenden VAF im Fehlerbereich liegen, wäre eine sehr gute Fehlerliste nötig, um reale Varianten von Fehlern zu unterscheiden. Hierfür müssten ausreichend viele Patienten untersucht werden. Da jedoch nur 11 pHL-Patienten in Form von ccfDNA aus Blut für die WES-Analysen zur Verfügung standen, musste eine stringente Filterung gewählt werden, bei der wahrscheinlich auch reale Varianten herausgefiltert werden.

Es wurden von den 11 untersuchten pHL-Patienten durchschnittlich 28,4 ng ccfDNA/ml Plasma gewonnen und die Konzentration nach finaler Amplifikation lag bei den ccfDNA-Bibliotheken bei durchschnittlich 89 ng/µl. Da der Sollwert der finalen Konzentration bei 2 ng/µl liegt, konnte eine ausreichende Menge an ccfDNA für die Bibliothek-Herstellung isoliert werden.

Es wurde jede Base durch *unique* Fragmente durchschnittlich 371x abgedeckt, wobei die Anreicherung bei durchschnittlich 72% lag, sodass gezeigt werden konnte, dass die Herstellung exomweiter Bibliotheken mittels ccfDNAs aus technischer Sicht möglich ist.

Nachdem die WES-Analyse durch das *Enrichment v3.0* Programm abgeschlossen war und durch die *Variant Studio Software 2.2* (Illumina) vorgefiltert wurde (4.3), wurde aufgrund der geringen Patientenanzahl eine weitere stringente manuelle Filterung gewählt und die Varianten, die mehr als 2x rekurrent in den 11 Patienten vorkamen, entfernt. Der Hintergrund für diese Filterung ist, dass bei HL bislang nur zwei Gene mit HotSpot-Varianten bekannt sind und damit rekurrente Varianten, die mehr als 2x vorkommen, wahrscheinlich auf Fehler zurückzuführen sind.

Vergleich mit tNGS

Zur Überprüfung, ob ccfDNA für die exomweite Analyse zur Detektion niederfrequenter Varianten geeignet ist, wurden die WES-Varianten, die nach WES-Analyse durch das *Enrichment v3.0* Programm und nach der Vorfilterung durch die *Variant Studio Software 2.2* (Illumina), detektiert wurden, mit den zuvor durch tNGS detektierten Varianten im IGV visuell verglichen. Es konnte durch den Vergleich gezeigt werden, dass 75 von 102 Varianten im WES weiterhin detektiert werden konnten (Abb. 18). Bei den 27 nicht mittels WES detektierten Varianten handelte es sich bei 14 Varianten um *SOCS1*-Varianten, was sich durch die GC-reichen Regionen in *SOCS1* und die daraus resultierende schlechte „*Capturekeit*“ erklären lässt

und bereits beim tNGS durch die geringe Abdeckung (<20%) aufgefallen ist, obwohl für diesen Bereich eine besonders hohe Sondendichte vorlag. 72 der 75 durch WES detektierten Varianten konnten auch nach der Filterung der >2x rekurrenten Varianten weiterhin detektiert werden. Bei den drei Varianten, die nach dieser Filterung nicht mehr detektiert werden konnten, handelte es sich bei allen um die *STAT6*-Hotspot-Variante N417Y/D.

Es konnte durch den Vergleich gezeigt werden, dass sich nach Ausschluss der nicht detektierten *SOCSI*-Varianten 85% der zuvor im tNGS detektierten Varianten auch mittels WES nachweisen lassen konnten. Daher konnte gezeigt werden, dass eine 300x Abdeckung für die WES-Analyse zur Variantendetektion ausreichend war, um wahrscheinlich einen erheblichen Anteil der somatischen Varianten zu detektieren. Außerdem scheint die Vorfilterung mittels *Variant Studio Software 2.2* (Illumina) und der Ausschluss der >2x rekurrenten Varianten für die WES-Analysen-Filterung geeignet zu sein.

Weitere Filterungen

Nachdem gezeigt wurde, dass der Ausschluss der >2x rekurrenten Varianten für die WES-Analysen-Filterung geeignet ist, wurden alle durch WES detektierten Varianten nach diesem Kriterium gefiltert. Insgesamt wurden nach dieser Filterung weiterhin 6.225 Varianten in den 11 untersuchten Patienten identifiziert. Anschließend wurde eine weitere Eingrenzung vorgenommen, bei der nur Gene in die weitere Begutachtung eingeschlossen wurden, die in den 11 Patienten in mindestens zwei Patienten mutiert vorkamen, um rekurrent betroffene Gene, die pathogeneserelevant sein könnten und als Kandidatengene fungieren könnten, zu identifizieren. Insgesamt konnten nach dieser Filterung in den 11 untersuchten pHL-Patienten 2.900 Varianten in 725 Genen detektiert werden, wobei 424 potenziell inaktivierende Varianten (frameshift- und in-frame-Deletionen, Stop-Varianten, Varianten in Spleiß-Regionen) und 2.476 potenzielle Austausch-Varianten identifiziert wurden. Inaktivierende Varianten waren besonders interessant, da sie pathogeneserelevant sein könnten und mit Auswirkungen zu rechnen ist. Aufgrund der hohen detektierten Variantenanzahl bei den Austausch-Varianten wurde eine weitere Eingrenzung bei den Austausch-Varianten vorgenommen und nur Gene in die weitere Auswertung mit einbezogen, die in 2-3 Patienten 3x von Varianten betroffen waren, da diese Gene potenziell rekurrent von Varianten betroffen sind und daher für die Pathogenese der HL interessant sein könnten. Nach dieser Filterung wurden noch 300 potenzielle Austausch-Varianten detektiert, sodass sich auf insgesamt 724 potenziell inaktivierende- und Austausch-Varianten beschränkt wurde (Abb. 23).

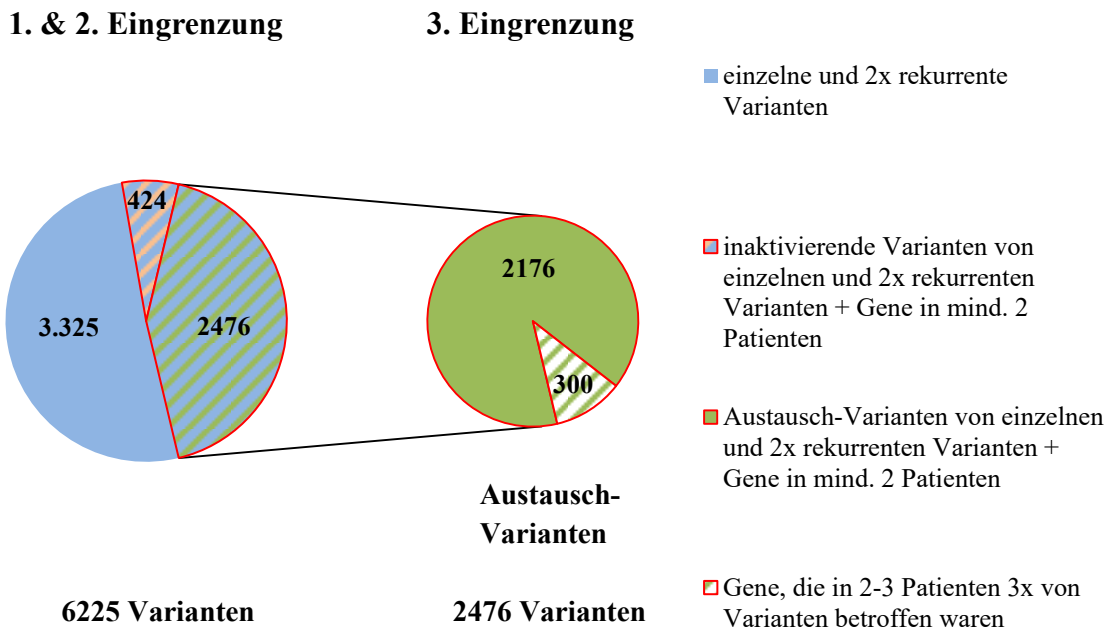


Abb. 23: Darstellung der Variantenzahlen und Filterungen, die in den 11 mittels WES untersuchten pHL-Patienten (ccfDNA) detektiert wurden.

Im ersten Kreisdiagramm (1. & 2. Eingrenzung) wurden zwei unterschiedliche Eingrenzungen vorgenommen (Eingrenzung auf alle Varianten, die einzeln und 2x rekurrent vorkamen (blaue und schraffierte Bereiche) und Gene, die in mind. zwei Patienten mutiert waren (rote Umrandung)). Nach Eingrenzung aller, in den 11 untersuchten Patienten detektierten Varianten, die einzeln und 2x rekurrent vorkamen, verblieben insgesamt noch 6.225 Varianten. Nach der anschließenden Eingrenzung auf Varianten, die das gleiche Gen in mind. zwei Patienten betrafen, blieben noch insgesamt 2.900 der 6.225 Varianten übrig, von denen 2.476 Austausch-Varianten (grün/blau schraffiert und rot umrandet) und 424 inaktivierende Varianten (rosa/blau schraffiert und rot umrandet) waren. Im zweiten Kreisdiagramm (3. Eingrenzung) sind die Austausch-Varianten dargestellt, die nach den ersten Eingrenzungen übrig blieben (grüne und schraffierte Bereiche). Diese wurden nochmals gefiltert, indem nur Gene berücksichtigt wurden, die 3x in 2-3 Patienten von Varianten betroffen waren (grün/weiß schraffiert). Nach dieser Eingrenzung blieben 300 Austausch-Varianten von zuvor insgesamt 2.476 Austausch-Varianten übrig.

Abgleich mit RNA-Seq-Daten

Nach Filterung der Varianten auf DNA-Ebene wurden die Varianten im Anschluss durch eine andere Methode auf RNA-Ebene durch die RNA-Seq-Daten mit dem IGV abgeglichen. Normalerweise werden RNA-Sequenzierungen für Genexpressions-Analysen verwendet, wobei in dieser Arbeit die RNA-Seq Daten zur Verifizierung der niederfrequenten Varianten, die zuvor mittels WES detektiert wurden, verwendet wurden, um eine Strategie zu entwickeln, genomweit Varianten mit VAFs im kritischen Bereich zu überprüfen.

Für die RNA-Seq-Untersuchung standen 8 FFPE-Gewebeblöcke von den 11 durch WES untersuchten pHL-Patienten mit insgesamt 548 mittels WES detektierten Varianten zur Verfügung.

Für die RNA-Seq Analysen wurde makrodissektiertes, HRS-zellreiches Gewebe aus FFPE-Gewebe (mind. 20% Tumorzellanteil im makrodissektierten Gewebe) der zuvor mittels WES untersuchten Patienten verwendet, um die HRS-Zellen anzureichern (3.2.1). Da jedoch trotz Anreicherung der HRS-Zellen, der Anteil an gesunden Zellen im makrodissektierten Gewebe höher war als der HRS-Zell-Anteil, ist davon auszugehen, dass der Anteil der HRS-Zell-RNAs weiterhin gering ist, weshalb dadurch die Expressionsstärke vieler Varianten zu gering war, um sie detektieren zu können. Eine weitere Problematik beim RNA-Seq stellt der „*nonsense mediated decay* (NMD)“ dar, der als Kontrollmechanismus fungiert und Stopcodons, die durch Varianten entstanden sind, in der mRNA erkennt und deren Expression als verkürzte Proteine verhindert, weshalb viele Stop-Varianten im RNA-Seq nicht angezeigt werden. Von den 548 durch WES detektierten Varianten konnten 107 Varianten mit einer Abdeckung >10 reads in den 8 untersuchten Patienten im RNA-Seq detektiert werden.

Visuelle Inspektion der Varianten durch den IGV

Durch die visuelle Inspektion der Varianten im IGV konnten 46 der 107 Varianten, die mit einer Abdeckung >10 reads in den 8 untersuchten Patienten im RNA-Seq detektiert wurden, bestätigt werden. 61 der 107 Varianten konnten durch die visuelle Inspektion im IGV ausgeschlossen werden, da sie als potenzielle Fehler identifiziert werden konnten, die auf Sequenzierungsfehler zurückzuführen sind. Der Grund hierfür ist, dass beide Methoden nur zum Teil unterschiedlich sind, sodass Taq-Polymerase-Fehler bei beiden Verfahren auftreten können. Demzufolge ist das RNA-Seq-Verfahren für die Verifizierung der Varianten ungeeignet, da es nicht die visuelle Inspektion der Varianten im IGV ersetzen kann.

Der VAF-Bereich der nicht verifizierten Varianten (Bereich: 5,1-35%) im Vergleich zu den verifizierten Varianten (Bereich: 5,1-34,7%) wies keine deutlichen Unterschiede auf und auch die Art der Varianten unterschied sich innerhalb der beiden Gruppen nicht stark voneinander.

Bei den 441 nicht bestätigten Varianten, die als potenzielle Fehler gewertet wurden, war ersichtlich, dass mit $>50\%$ vor allem potenzielle Fehler detektiert wurden, die auf Sequenzierungsfehler zurückzuführen sind, bei denen mehr als drei Varianten innerhalb eines Bereiches von 10 bp durch den IGV optisch erkennbar waren, die jedoch aufgrund zu geringer Frequenzen nicht in den vcf-files als Varianten detektiert wurden. Der geringe Anteil der *Strand Bias*-Fehler in den inaktivierenden Varianten ist auf die Indels zurückzuführen, bei denen durch den IGV nicht ersichtlich war, ob ein *Strand Bias*-Fehler vorliegt, weshalb dieser Parameter bei den inaktivierenden Varianten zu vernachlässigen ist (Abb. 24).

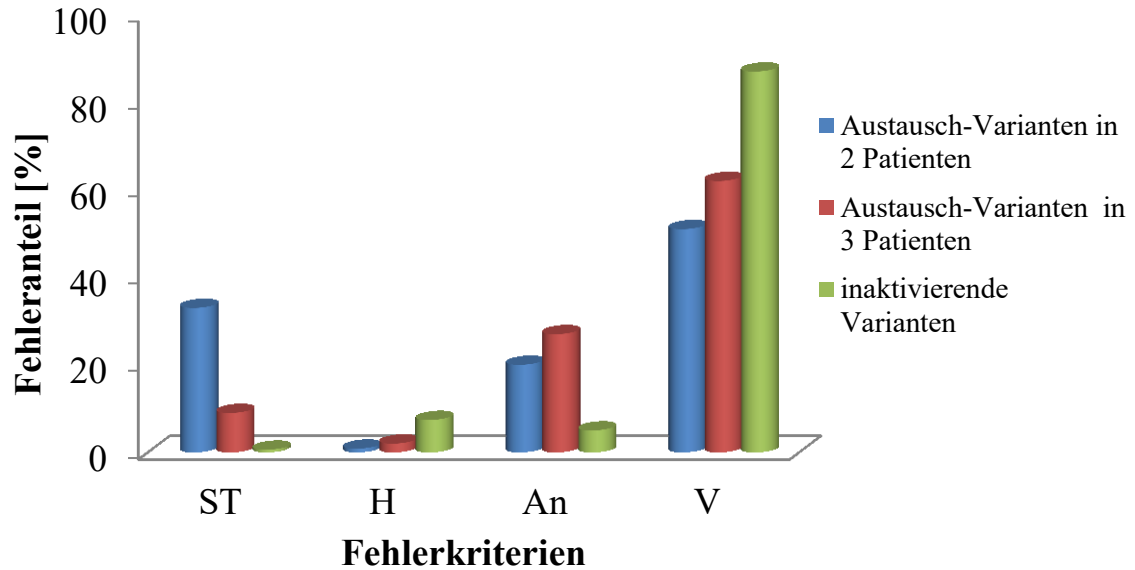


Abb. 24: Prozentualer Anteil der 441 nicht bestätigten Varianten der 11 mittels *hybrid-capture*-basierter WES-Methode untersuchten pHL-Patienten (cfDNA), unterteilt in inaktivierende- und Austausch-Varianten.

Insgesamt wurden 441 nicht bestätigte Varianten, die als potenzielle Fehler bewertet wurden, mittels IGV auf die Art der Fehler untersucht. Bei den 441 potenziellen Fehlern wurden bereits zuvor unterschiedliche Vorfilterungen bzw. Eingrenzungen vorgenommen. Es wurden nur die Varianten, die einzeln und 2x rekurrent vorkamen und die Gene, die in mind. zwei Patienten mutiert vorkamen für die WES-Analyse verwendet. Außerdem wurden bei den Austausch-Varianten nur die Gene begutachtet, die 3x in 2-3 Patienten von Varianten betroffen waren. Zudem wurden die Varianten mit den jeweiligen RNA-Seq Daten abgeglichen. Die Art der Fehler und den prozentualen Anteil an Fehlern für inaktivierende Varianten und Austausch-Varianten, die in zwei und drei Patienten detektiert wurden, wurden graphisch dargestellt.

In der Graphik sind die inaktivierenden Varianten grün, die Austausch-Varianten, die auf Gene beschränkt sind, die in zwei Patienten 3x von Varianten betroffen waren blau und die Austausch-Varianten, die auf Gene beschränkt sind, die in drei Patienten 3x von Varianten betroffen waren rot dargestellt. ST: *Strand Bias* (Abweichung $\pm 50\%$), H: Rand eines Homopolymers (ab 7 gleichen Nukleotiden), An: falsche Annotation (Pseudogene), V: mehr als drei Varianten innerhalb von 10 bp. ST-Fehler konnten nicht durch die Software gefiltert werden, da die Filterparameter für die Auswertung der niederfrequenten Varianten ausgeschaltet wurden und bei der manuellen Filterung nur Varianten als SB für „*Strand Bias*“ angezeigt wurden, bei denen nur ein Strang abgedeckt wurde.

Zusammenfassend stellte der tNGS-Vergleich eine geeignete Methode dar, um einzelne Varianten zu bestätigen und kann zur Methoden-Etablierung dienen. Die RNA-Sequenzierung stellte sich bei diesem untersuchten Kollektiv als ungeeignet heraus, da zwar potenziell putativen Varianten bei ausreichender Expression bestätigt werden konnten, durch die ähnliche Methode allerdings weiterhin Taq-Polymerase-Fehler auftraten. Zudem konnten Varianten, die im RNA-Seq nicht angezeigt wurden, nicht prinzipiell als Fehler gewertet werden, da sie aufgrund des NMDs oder des geringen RNA-Anteils der HRS-Zellen und der damit

resultierenden geringen Expressionsstärke möglicherweise nicht als Varianten angezeigt wurden.

Identifizierte putative Varianten der WES-/RNA-Seq-Analyse

Bei den insgesamt 46 der 107 durch visuelle Inspektion im IGV identifizierten putativen Varianten, die nicht durch tNGS detektiert wurden, wurden nach den Filterungen und der visuellen Inspektion im IGV keine rekurrenten Varianten und nur noch drei Gene, die 2x von Varianten betroffen waren, identifiziert. Es wurden insgesamt 26 inaktivierende- und 20 Austausch-Varianten in insgesamt 43 Genen detektiert. Bei den inaktivierenden Varianten handelte es sich um 9 *frameshift*-Deletionen, zwei *frameshift*-Insertionen, 10 Stop-Varianten und 5 Varianten in Spleiß-Regionen mit einer durchschnittlichen VAF von 19,1% (Bereich: 5,6-33,9%) (Anhang: Tab. 35). Die durchschnittliche VAF der 20 identifizierten putativen Austausch-Varianten lag bei 14,8% (Bereich: 5,1-34,7%).

Varianten in Genen, die in für HL bekannten Signalwegen involviert sind

Es wurde eine putative Variante in *Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 1* (*PTPNI*) identifiziert (Abb. 19), das als negativer Regulator im JAK/STAT-Signalweg fungiert und bereits in HL von Tiacci et al. und Zahn et al. als mutiert beschrieben wurde (68,172). Außerdem konnte eine putative Variante in *TNF-Receptor Associated Factor 1* (*TRAF1*) identifiziert werden (Abb. 19), das eine Rolle im NFκB-Signalweg spielt, indem es als Adapter-Molekül die Aktivität von NFκB und JNK reguliert (193). Eine Überexpression von *TRAF1* wurde bereits von Wang et al. in HL-Zelllinien dokumentiert (194).

Rekurrent betroffene Gene, die bislang bei HL nicht bekannt waren

Von den 46 putativen Varianten waren drei Gene 2x von Varianten betroffen, wobei zwei Gene in unterschiedlichen Patienten betroffen waren (Abb. 19). Dabei handelte es sich um das Gen *NUT Family Member 2F* (*NUTM2F*) und *Leucine Rich Repeat Containing 37 Member A3* (*LRRC37A3*). Über *NUTM2F* ist bislang nur eine Fusion mit *Bromodomain-containing protein 4* (*BRD4*) in Karzinomen bekannt (195) und *LRRC37A3* fungiert als Membranbestandteil und hat neuronale Funktionen. Eine Deregulation dieses Gens wurde bereits im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen, wie Parkinson und Demenz, gebracht (196).

Es konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass ccfDNA von pHL für die Variantendetektion mittels WES geeignet ist. Der Vergleich der RNA-Seq-Daten hatte nur eine geringe Aussagekraft, die aufgrund der Ähnlichkeit der Methode und den geringen Anteil an HRS-Zellen und der damit einhergehende geringe RNA-Gehalt der HRS-Zellen, zurückzuführen ist. Zu beachten ist außerdem, dass viele potenziell putative Varianten im RNA-Seq, aufgrund der zu geringen Expressionsstärke oder des NMDs, nicht angezeigt werden, sodass sie, obwohl sie auf DNA-Ebene durch die visuelle Inspektion im IGV als Varianten

detektiert wurden, nicht als putative Varianten im RNA-Seq identifiziert werden konnten. Daher können durch diese Filterung nur putative Varianten detektiert werden, die eine ausreichende Expression hatten.

Prinzipiell scheint die Variantendetektion durch WES mittels ccfDNA geeignet zu sein, wobei aufgrund des geringen Patientenkollektivs nur eine sehr stringente Filterung vorgenommen werden konnte und durch die Detektion von Varianten mit einer niedrigen VAF trotz stringenter Filterung weiterhin potenzielle Fehler angezeigt werden, die manuell durch die visuelle Inspektion im IGV identifiziert werden müssen. Im nächsten Schritt müssten daher deutlich mehr Patienten untersucht werden und eine geeignete Software zur Filterung der Varianten gefunden werden, um die visuelle Inspektion aller Varianten und die zusätzliche manuelle Filterung zu vermeiden.

6. Zusammenfassung

Pädiatrische Hodgkin-Lymphome (pHL) sind gut therapierbare maligne Tumore des lymphatischen Systems, deren 5-Jahre *overall survival* (OS) und *event free survival* (EFS) bei 97,4% und 89% liegt. 5% dieser Patienten zeigen eine primär reduzierte Chemotherapie-Sensitivität, erkennbar an einem qPET >3 nach 2 Zyklen Induktions-OEPA-Chemotherapie und deren 2-Jahres EFS liegt bei 50%. Wegen des geringen Anteils an Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS)-Zellen (ca. 1-5%) in den befallenen Lymphknoten ist die Untersuchung von HL, aufgrund der zuvor notwendigen Mikrodissektion der HRS-Zellen, außerordentlich schwierig, weshalb bislang nur wenige genomische Aberrationen bekannt sind und eine geringe Anzahl an Patienten untersucht wurde. Die Pathogenese aller pHL und die Unterschiede der chemotherapiesensitiven (qPET <3) und primär chemotherapieresistenten Gruppe (qPET >3) sind daher weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit sollte deshalb zunächst eine valide Methode zur Identifikation geringfrequenter Varianten mittels *targeted Next Generation Sequencing* (tNGS) ohne vorherige Mikrodissektion der HRS-Zellen etabliert werden.

Hierfür kamen zwei tNGS-Panels zur Anwendung, die Abschnitte oder die vollständigen Bereiche von Genen abdeckten, die in HL und Non-HL häufig von *single nucleotide variants* (SNVs) und Indels betroffen sind. Es konnte durch die Untersuchung von insgesamt 22 pHL gezeigt werden, dass sich die *hybrid-capture*-basierte Methode unter Verwendung von *circulating cell free DNA* (ccfDNA), im Gegensatz zum Amplikon-basierten *dual-strand*-Verfahren mit genomischer DNA (gDNA), für die Detektion von niederfrequenten Varianten am besten eignet. Im Vergleich zwischen gDNA und ccfDNA konnte mit dem *hybrid-capture*-basierten Verfahren durch Untersuchungen an 11 pHL-Patienten gezeigt werden, dass ccfDNA für die niederfrequente Variantendetektion bei pHL geeigneter ist, als gDNA aus FFPE-Gewebe.

Es wurde bei der Untersuchung von pHL-Patienten unter Verwendung von ccfDNA deutlich, dass der JAK/STAT-Signalweg mit Varianten in 64% der untersuchten Patienten, der am häufigsten betroffene Signalweg war, gefolgt vom PI3K/AKT-Signalweg mit Varianten in 41% der Patienten und dem NFκB-Signalweg mit Varianten in 36% der Patienten. In 22,7% der pHL-Patienten konnten Varianten detektiert werden, die mit Chromatin-modifizierenden Proteinen assoziiert sind. Zudem konnten in 64% der untersuchten Patienten Varianten identifiziert werden, die eine Immunevasion der HRS-Zelle begünstigen könnten, indem sie die Neo-Antigen (AG)-Präsentation verhindern. Insgesamt konnten sowohl bereits bekannte, sowie neue mutierte Gene identifiziert werden, die in HL derzeit unbekannt sind. Zudem konnte durch Untersuchungen an ccfDNAs durch Identifikation von klonalen VDJ/DJ-Rekombinationen in 32% der Patienten durch Mutationsanalysen gezeigt werden, dass auch die HRS-Zellen der pHLs von prä-apoptotischen *germinal center* (GC)-B-Zellen abstammen. Es wurde außerdem

eine Translokation (*IgH-Switch-Region gamma 2/AICDA*) in einem pHL-Patienten identifiziert, die in HL bislang unbekannt war.

Durch den Vergleich der Varianten-Allelfrequenz (VAF) der identifizierten Varianten, die in ccfDNAs, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Behandlung (vor, während und nach der Therapie) von 6 qPET >3 und 10 qPET <3 pHL-Patienten entnommen wurden, detektiert wurden, konnte zudem gezeigt werden, dass ccfDNA von pHL-Patienten durch ersichtliche Unterschiede zwischen den qPET <3 und >3-Patienten für das Therapiemonitoring geeignet ist und ein geeigneter Ansatz zu sein scheint, um das Ansprechen der Therapie bereits zu einem frühen Zeitpunkt überwachen zu können.

Bei dem Vergleich der 9 chemotherapieresistenten- (qPET >3) mit den 13 chemotherapiesensiblen Patienten (qPET <3) fiel auf, dass der Anteil an Varianten je Patient bei den qPET >3-Patienten erhöht war. Zudem konnte beobachtet werden, dass Varianten in Genen, die mit der AG-Präsentation assoziiert sind, bei den qPET >3-Patienten mit 55%, im Gegensatz zu den qPET <3-Patienten mit 23%, stark repräsentiert wurden.

Außerdem konnte in dieser Arbeit durch eine Machbarkeitsstudie mit 11 pHL-Patienten zum ersten Mal gezeigt werden, dass sich ccfDNA von pHL für Ganz-Exom-Analysen eignet und die exomweite Detektion niederfrequenter Varianten ermöglicht.

Zudem konnte bei der histologischen Untersuchung von 4 qPET >3 und 5 qPET <3-Patienten beobachtet werden, dass der Anteil an Pikrosiriusrot (PSR) positiven Zellen in den qPET >3-Patienten signifikant erhöht war und dass tendenziell mehr kollagenummantelte HRS-Zellen in den qPET >3-Patienten vorlagen, als in den qPET <3-Patienten. Somit könnte die Feststellung bei Bauchspeicheldrüsen- und Brustkrebs-Patientinnen, dass eine erhöhte Expression von Kollagen zu einer Chemotherapieresistenz führt, auch bei den qPET >3-Patienten der pHL einer der Gründe sein, die zu einer erniedrigten Chemotherapie-Sensitivität führt.

7. Summary

Pediatric Hodgkin's lymphomas (pHL) are well-treatable malignant tumors of the lymphatic system, whose 5-years overall survival (OS) and event free survival (EFS) are 97.4% and 89%, respectively. 5% of these patients show a primary reduced chemotherapy sensitivity, indicated by a qPET >3 after 2 cycles of induction OEPA chemotherapy, and a 2-year EFS of 50%. Due to the low proportion of Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) cells (approx. 1-5%) in the affected lymph nodes, the examination of HL is extremely difficult due to the previously necessary microdissection of the HRS cells which is why only few genomic aberrations are known so far and a small number of patients have been examined. The pathogenesis of all pHL, and the differences between the chemotherapy-sensitive (qPET <3), and the primary chemotherapy-resistant group (qPET >3) are therefore mostly unknown. In this study a valid method for the identification of low-frequency variants using targeted Next Generation Sequencing (tNGS) without prior microdissection of the HRS cells should be established.

For this purpose two tNGS panels were used, covering sections or complete areas of genes frequently affected by single nucleotide variants (SNVs), and Indels in HL and Non-HL. The investigation of a total of 22 pHL showed that the hybrid-capture-based method using circulating cell free DNA (ccfDNA), contrary to the amplicon-based dual-strand method using gDNA is best suited for the detection of low-frequency variants. In a comparison of gDNA and ccfDNA, the hybrid-capture-based method was able to show that ccfDNA is more suitable for low-frequency variant detection than genomic DNA (gDNA) from FFPE tissue in 11 pHL patients.

Studying pHL patients with ccfDNA revealed that the JAK/STAT signaling pathway with variants in 64% of patients was the most frequently affected signaling pathway, followed by the PI3K/AKT signaling pathway with variants in 41% of patients, and the NFκB signaling pathway with variants in 36% of patients. Variants associated with chromatin-modifying proteins were detected in 22.7% of pHL patients. Variants could also be identified that might promote immune evasion of the HRS cell by preventing neo-antigen (AG) presentation in 64% of the pHL patients. In total, both already known and new mutant genes could be identified that are currently unknown in HL. In addition, studies on ccfDNA by identification of clonal VDJ/DJ recombination showed by mutation analysis that the HRS cells of the pHLs also originate from pre-apoptotic germinal center (GC)-B cells in 32% of the patients. Furthermore, a translocation (*IgH switch region gamma 2/AICDA*) was identified in a pHL patient that was previously unknown in HL.

By comparing the variant allele frequency (VAF) of the identified variants detected in ccfDNA taken at different times of treatment (before, during and after therapy) from 6 qPET >3 and 10 qPET <3 pHL patients, it could be shown that ccfDNA from pHL patients is suitable for therapy

7. Summary

monitoring due to obvious differences between the qPET <3 and >3 patients, and appears to be a suitable approach for monitoring the response of therapy at an early stage.

When comparing the 9 chemotherapy-resistant patients (qPET >3) with the 13 chemotherapy-sensitive patients (qPET <3), it was noticed that the proportion of variants per patient was increased in the qPET >3 patients. In addition, it was observed that variants in genes associated with the AG presentation were strongly represented in the qPET >3 patients with 55%, in contrast to the qPET <3 patients with 23%.

Furthermore, in a feasibility study with 11 pHL patients it was shown for the first time that ccfDNA of pHL is suitable for whole exom analyses and enables the exom-wide detection of low frequency variants.

In addition, the histological examination of 4 qPET >3 and 5 qPET <3 patients showed that the proportion of Sirius red (PSR) positive cells in the qPET >3 patients was significantly increased and that more collagen-coated HRS cells tended to be present in the qPET >3 patients than in the qPET <3 patients. Thus, the finding in pancreatic and breast cancer patients that increased expression of collagen leads to chemotherapy resistance may also be one of the reasons for reduced chemotherapy sensitivity in qPET >3 patients with pHL.

Literaturverzeichnis

1. Swerdlow, S.H. et al. WHO Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4. Edition, Volume 2. IARC Press, Lyon; 2017.
2. Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans.* 1832;17:68–114.
3. Kanzler, H. et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med.* 1996;184(4):1495–505.
4. Hodgkin Lymphoma - Cancer Stat Facts [Internet]. SEER. [zitiert 23. November 2018]. Verfügbar unter: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/hodg.html>
5. Non-Hodgkin Lymphoma - Cancer Stat Facts [Internet]. SEER. [zitiert 23. November 2018]. Verfügbar unter: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl.html>
6. Murphy, K. et al. *Janeway Immunologie.* Springer-Verlag; 2018. S. 1227
7. Early, P. et al. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. 1980. *J Immunol.* 2004;173(11):6503–14.
8. Tonegawa, S. et al. Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75(3):1485–9.
9. Gellert, M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:101–32.
10. Kocks, C. und Rajewsky, K. Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:537–59.
11. Küppers, R. et al. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N. Eng. J. Med.* 1999; 341(20): 1520-9.
12. Sternberg, C. Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Zeitschrift Heilkunde.* 1898;19:21–90.
13. Reed, D. On the pathological changes in Hodgkin's disease with special reference to its relation to tuberculosis. *John Hopkins Hosp Rep.* 1902;10:133–93.
14. dmh_18- Deutsches Kinderkrebsregister [Internet]. [zitiert 1. Dezember 2018]. Verfügbar unter: <http://www.kinderkrebsregister.de/dkkr/ergebnisse/auswertungen-im-detail/lymphome/hodgkin-lymphome/dmh-18.html>
15. Punnett, A. et al. Hodgkin lymphoma across the age spectrum: epidemiology, therapy, and late effects. *Semin Radiat Oncol.* 2010;20(1):30–44.
16. Ritter, J. Hodgkin-Lymphome (HL) bei Kindern und Jugendlichen. *Trillium Krebsmedizin.* 2018;27(8):536–44.
17. Barros, M. H. M. et al. Tumor-associated macrophages in pediatric classical Hodgkin lymphoma: association with Epstein-Barr virus, lymphocyte subsets, and prognostic impact. *Clin Cancer Res.* 2012;18(14):3762–71.

18. Barros, M. H. M. et al. Tumor microenvironment composition in pediatric classical Hodgkin lymphoma is modulated by age and Epstein-Barr virus infection. *Int J Cancer*. 2012;131(5):1142–52.
19. Diehl, V. et al. Hodgkin's lymphoma: biology and treatment strategies for primary, refractory, and relapsed disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003;225–47.
20. Lister, T. A. et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol*. 1989;7(11):1630–6.
21. Wirth, A. et al. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography, gallium-67 scintigraphy, and conventional staging for Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Med*. 2002;112(4):262–8.
22. Van Den Bossche, B. et al. 18FDG PET versus high-dose 67Ga scintigraphy for restaging and treatment follow-up of lymphoma patients. *Nucl Med Commun*. 2002;23(11):1079–83.
23. Gallamini, A. et al. Early interim 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography is prognostically superior to international prognostic score in advanced-stage Hodgkin's lymphoma: a report from a joint Italian-Danish study. *J Clin Oncol*. 2007;25(24):3746–52.
24. Hutchings, M. et al. FDG-PET after two cycles of chemotherapy predicts treatment failure and progression-free survival in Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107(1):52–9.
25. Zinzani, P. L. et al. Early positron emission tomography (PET) restaging: a predictive final response in Hodgkin's disease patients. *Ann Oncol*. 2006;17(8):1296–300.
26. Furth, C. et al. Evaluation of interim PET response criteria in paediatric Hodgkin's lymphoma—results for dedicated assessment criteria in a blinded dual-centre read. *Ann Oncol*. 2011;22(5):1198–203.
27. Meignan, M. et al. Report on the Third International Workshop on Interim Positron Emission Tomography in Lymphoma held in Menton, France, 26-27 September 2011 and Menton 2011 consensus. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(10):1876–81.
28. Hasenclever, D. und Diehl, V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med*. 1998;339(21):1506–14.
29. Hasenclever, D. et al. qPET - a quantitative extension of the Deauville scale to assess response in interim FDG-PET scans in lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41(7):1301–8.
30. Krankheitsstadien und Therapielevel [Internet]. [zitiert 26. Oktober 2018]. Verfügbar unter:
https://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/lymphome/pohpatinfomh120060715/diagnostik_und_therapieplanung/therapieplanung/krankheitsstadien/index_ger.html

31. Schellong, G. et al. High cure rates and reduced long-term toxicity in pediatric Hodgkin's disease: the German-Austrian multicenter trial DAL-HD-90. The German-Austrian Pediatric Hodgkin's Disease Study Group. *J Clin Oncol.* 1999;17(12):3736–44.
32. Schellong, G. et al. Combined treatment strategy in over 200 children with Hodgkin's disease: graduated chemotherapy, involved field irradiation with low dosage and selective splenectomy. A report of the cooperative therapy study DAL-HD-82. *Klin Padiatr.* 1986;198(3):137–46.
33. Weiner, M. A. et al. Intensive chemotherapy and low-dose radiotherapy for the treatment of advanced-stage Hodgkin's disease in pediatric patients: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1991;9(9):1591–8.
34. Hutchinson, R. J. et al. MOPP or radiation in addition to ABVD in the treatment of pathologically staged advanced Hodgkin's disease in children: results of the Children's Cancer Group Phase III Trial. *J Clin Oncol.* 1998;16(3):897–906.
35. Donaldson, S. S. et al. Final results of a prospective clinical trial with VAMP and low-dose involved-field radiation for children with low-risk Hodgkin's disease. *J Clin Oncol.* 2007;25(3):332–7.
36. Bhatia, S. et al. High risk of subsequent neoplasms continues with extended follow-up of childhood Hodgkin's disease: report from the Late Effects Study Group. *J Clin Oncol.* 2003;21(23):4386–94.
37. Castellino, S. M. et al. Morbidity and mortality in long-term survivors of Hodgkin lymphoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Blood.* 2011;117(6):1806–16.
38. Dörffel, W. et al. Secondary Malignancies Following Treatment for Hodgkin's Lymphoma in Childhood and Adolescence. *Dtsch Arztebl Int.* 2015;112(18):320–7, i.
39. Schaapveld, M. et al. Second Cancer Risk Up to 40 Years after Treatment for Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 2015;373(26):2499–511.
40. Kelly, K. M. Hodgkin lymphoma in children and adolescents: improving the therapeutic index. *Blood.* 2015;126(22):2452–8.
41. Körholz, D. et al. Euro-Net-Paediatric Hodgkin's lymphoma Group (Euro-Net-PHL-C1): First international inter-group study for classical Hodgkins lymphoma in children and adolescents.
42. Mauz-Körholz, C. et al. Procarbazine-free OEPA-COPDAC chemotherapy in boys and standard OPPA-COPP in girls have comparable effectiveness in pediatric Hodgkin's lymphoma: the GPOH-HD-2002 study. *J Clin Oncol.* 2010;28(23):3680–6.
43. Mauz-Körholz, C. et al. Pediatric Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):2975–85.
44. Dörffel, W. et al. Treatment of children and adolescents with Hodgkin lymphoma without radiotherapy for patients in complete remission after chemotherapy: final results of the multinational trial GPOH-HD95. *J Clin Oncol.* 2013;31(12):1562–8.

45. Basso, K. und Dalla-Favera, R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):172–84.
46. Küppers, R. und Dalla-Favera, R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene.* 2001;20(40):5580–94.
47. Li, J. Y. et al. Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol.* 1999;154(5):1449–52.
48. Horsman, D. E. et al. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 1995;103(4):472–8.
49. Rowley, J. D. Chromosome studies in the non-Hodgkin's lymphomas: the role of the 14;18 translocation. *J Clin Oncol.* 1988;6(5):919–25.
50. Lenz, G. et al. Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med.* 2007;204(3):633–43.
51. Basso, K. und Dalla-Favera, R. BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol.* 2010;105:193–210.
52. Pasqualucci, L. et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature.* 2001;412(6844):341–6.
53. Küppers, R. et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(23):10962–6.
54. Küppers, R. New insights in the biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:328–34.
55. Küppers, R. und Rajewsky, K. The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:471–93.
56. Johanson, T. M. et al. Transcription-factor-mediated supervision of global genome architecture maintains B cell identity. *Nat Immunol.* 2018;19(11):1257–64.
57. Renné C. et al. Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol.* 2006;169(2):655–64.
58. Mathas, S. et al. Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol.* 2006;7(2):207–15.
59. Ushmorov, A. et al. Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2006;107(6):2493–500.
60. Doerr, J. R. et al. Patterned CpG methylation of silenced B cell gene promoters in classical Hodgkin lymphoma-derived and primary effusion lymphoma cell lines. *J Mol Biol.* 2005;350(4):631–40.

61. Falzetti, D. et al. Genomic instability and recurrent breakpoints are main cytogenetic findings in Hodgkin's disease. *Haematologica*. 1999;84(4):298–305.
62. Martín-Subero, J. I. et al. Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res*. 2006;66(21):10332–8.
63. Martín-Subero, J. I. et al. Chromosomal rearrangements affecting the BCL6, MYC and MALT1 loci are rare events in classical Hodgkin lymphoma. *Eur J Hematol*. 2004;73.
64. Green, M. R. et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 2010;116(17):3268–77.
65. Weniger, M. A. et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*. 2006;25(18):2679–84.
66. Mottok, A. et al. Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6. *Blood*. 2007;110(9):3387–90.
67. Spina, V. et al. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2018;131(22):2413–25.
68. Tiacci, E. et al. Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2018;131(22):2454–65.
69. Reichel, J. et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2015;125(7):1061–72.
70. Barth, T. F. E. et al, Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003;101(9):3681–6.
71. Joos, S. et al. Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood*. 2002;99(4):1381–7.
72. Martín-Subero, J. I. et al. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002;99(4):1474–7.
73. Cabannes, E. et al. Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene*. 1999;18(20):3063–70.
74. Emmerich, F. et al. Overexpression of I κ B α without inhibition of NF- κ B activity and mutations in the I κ B α gene in Reed-Sternberg cells. *Blood*. 1999;94(9):3129–34.
75. Jungnickel, B. et al. Clonal deleterious mutations in the I κ B α gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med*. 2000;191(2):395–402.
76. Emmerich, F. et al. Inactivating I κ B ϵ mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J Pathol*. 2003;201(3):413–20.

77. Schmitz, R. et al. TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med.* 2009;206(5):981–9.
78. Küppers, R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(1):15–27.
79. Dutton, A. et al. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J Pathol.* 2005;205(4):498–506.
80. Georgakis, G.V. et al. Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2006;132(4):503–11.
81. Steidl, C. et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature.* 2011;471(7338):377–81.
82. Scott, D.W. und Gascoyne, R. D. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(8):517–34.
83. Ansell, S. M. et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2015;372(4):311–9.
84. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252–64.
85. Aldinucci, D. et al. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J Pathol.* 2010;221(3):248–63.
86. Wein, F. und Küppers, R. The role of T cells in the microenvironment of Hodgkin lymphoma. *J Leukoc Biol.* 2016;99(1):45–50.
87. Sánchez-Aguilera, A. et al. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2006;108(2):662–8.
88. Chetaille, B. et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood.* 2009;113(12):2765–3775.
89. Steidl, C. et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2010;362(10):875–85.
90. Alvaro, T. et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res.* 2005;11(4):1467–73.
91. Kelley, T. W. et al. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. *Am J Clin Pathol.* 2007;128(6):958–65.
92. Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000;103(2):211–25.
93. Renné, C. et al. Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2005;105(10):4051–9.

94. Fu, H. -L. et al. Discoidin Domain Receptors: Unique Receptor Tyrosine Kinases in Collagen-mediated Signaling. *J Biol Chem*. 2013;288(11):7430–7.
95. Camus, V. et al. Detection and prognostic value of recurrent exportin 1 mutations in tumor and cell-free circulating DNA of patients with classical Hodgkin lymphoma. *Haematologica*. 2016;101(9):1094–101.
96. Vogelstein, B. et al. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307–10.
97. Vogelstein, B. et al. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546–58.
98. NovaSeq System Specifications | The next era of sequencing starts now [Internet]. [zitiert 3. Januar 2019]. Verfügbar unter: <https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq/specifications.html?langsel=/il/>
99. Paired-End vs. Single-Read Sequencing Technology [Internet]. [zitiert 25. Januar 2019]. Verfügbar unter: <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/paired-end-vs-single-read-sequencing.html?langsel=/gb/>
100. van Dijk, E. L. et al. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*. 2014;30(9):418–26.
101. Guan, Y. -F. et al. Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chin J Cancer*. 2012;31(10):463–70.
102. Bentley, D. R. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008;456(7218):53–9.
103. Teer, J. K. und Mullikin J. C. Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Hum Mol Genet*. 2010;19(R2):R145-151.
104. Koboldt, D. C. et al. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*. 2013;155(1):27–38.
105. Podnar, J. et al. Next-Generation Sequencing RNA-Seq Library Construction. *Curr Protoc Mol Biol*. 2014;106:4.21.1-19.
106. Kim, S. et al. Deamination Effects in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples in the Era of Precision Medicine. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):137–46.
107. Cline, J. et al. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*. 1996;24(18):3546–51.
108. Kivioja, T. et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers | *Nature Methods*. 2012;9:72-74
109. Leon, S. A. et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977;37(3):646–50.
110. Gravina, S. et al. The dark side of circulating nucleic acids. *Aging Cell*. 2016;15(3):398–9.
111. Wu, T.-L. et al. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta*. 2002;321(1–2):77–87.

112. Wang, B. G. et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* 2003;63(14):3966–8.
113. Drew, L. Towards the better diagnosis of lymphoma. *Nature.* 2018;563:S38.
114. Bettegowda, C. et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 19. 2014;6(224):224ra24.
115. Dawson, S. -J. et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(13):1199–209.
116. Diehl, F. et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14(9):985–90.
117. Forsshew, T. et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med.* 2012;4(136):136ra68.
118. Garcia-Murillas, I. et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med.* 2015;7(302):133.
119. Gray, E. S. et al. Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. *Oncotarget.* 2015;6(39):42008–18.
120. Olsson, E. et al. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO Mol Med.* 2015;7(8):1034–47.
121. Reinert, T. et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut.* 2016;65(4):625–34.
122. Siravegna, G. et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(9):531–48.
123. Wan, J. C. M. et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(4):223–38.
124. Bohers, E. et al. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by next-generation sequencing reflect the genetic changes in both germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas at the time of diagnosis. *Haematologica.* 2015;100(7):e280-284.
125. Kurtz, D. M. et al. Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. *Blood.* 2015;125(24):3679–87.
126. Oberle, A. et al. Monitoring multiple myeloma by next-generation sequencing of V(D)J rearrangements from circulating myeloma cells and cell-free myeloma DNA. *Haematologica.* 2017;102(6):1105–11.
127. Roschewski, M. et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol.* 2015;16(5):541–9.

128. Rossi, D. et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood*. 2017;129(14):1947–57.
129. Scherer, F. et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 2016;8(364):364ra155.
130. Oki, Y. et al. Detection of classical Hodgkin lymphoma specific sequence in peripheral blood using a next-generation sequencing approach. *Br J Haematol*. 2015;169(5):689–93.
131. Vandenberghe, P. et al. Non-invasive detection of genomic imbalances in Hodgkin/Reed-Sternberg cells in early and advanced stage Hodgkin's lymphoma by sequencing of circulating cell-free DNA: a technical proof-of-principle study. *Lancet Haematol*. 2015;2(2):e55-65.
132. Koboldt, D. C. et al. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*. 2013;155(1):27–38.
133. Bronner, I.F. et al. Improved Protocols for Illumina Sequencing. *Curr Protoc Hum Genet*. 2014;80:18.2.1-42.
134. Paithankar, K. R. und Prasad, K. S. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(6):1346.
135. Ravi, R. K. et al. MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. *Methods Mol Biol*. 2018;1706:223–32.
136. Clark, M. J. et al. Performance comparison of exome DNA sequencing technologies. *Nat Biotechnol*. 2011;29(10):908–14.
137. Meynert, A. M. et al. Quantifying single nucleotide variant detection sensitivity in exome sequencing. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:195.
138. Thorvaldsdóttir, H. et al. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. 2013;Brief Bioinform.(14(2)):178–92.
139. Guo, Y. et al. The effect of strand bias in Illumina short-read sequencing data. 2012;BMC Genomics(13(666)).
140. DNA-Polymerasen - Lexikon der Biologie [Internet]. [zitiert 10. Dezember 2018]. Verfügbar unter: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/dna-polymerasen/18851>
141. Quail, M. A. et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;13(1):341.
142. Rothberg, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011;475(7356):348–52.
143. Loman, N. J. et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature Biotechnology*. 2012;30(5):434–9.
144. Junqueira, L. C. et al. Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11(4):447–55.

145. Lattouf, R. et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem.* 2014;62(10):751–8.
146. Whittaker, P. et al. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol.* 1994;89(5):397–410.
147. Dolber, P. C. und Spach, M. S. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J Histochem Cytochem.* 1993;41(3):465–9.
148. Borges, L. F. et al. Simultaneous observation of collagen and elastin in normal and pathological tissues: analysis of Sirius-red-stained sections by fluorescence microscopy. *Cell Tissue Res.* 2005;320(3):551–2.
149. Vogel, B. et al. Determination of collagen content within picrosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. *MethodsX.* 2015;2:124–34.
150. Lake, A. et al. Mutations of NFKBIA, encoding I κ B α , are a recurrent finding in classical Hodgkin lymphoma but are not a unifying feature of non-EBV-associated cases. *Int J Cancer.* 2009;125(6):1334–42.
151. Conklin, M. W. et al. Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am J Pathol.* 2011;178(3):1221–32.
152. Drifka, C. R. et al. Highly aligned stromal collagen is a negative prognostic factor following pancreatic ductal adenocarcinoma resection. *Oncotarget.* 2016;7(46):76197–213.
153. Mata, E. et al. Analysis of the mutational landscape of classic Hodgkin lymphoma identifies disease heterogeneity and potential therapeutic targets. *Oncotarget.* 2017;8(67):111386–95.
154. Balendran, S. et al. Next-Generation Sequencing-based genomic profiling of brain metastases of primary ovarian cancer identifies high number of BRCA-mutations. *J Neurooncol.* 2017;133(3):469–76.
155. Pulignani, S. et al. Targeted Next-Generation Sequencing in Patients with Non-syndromic Congenital Heart Disease. *Pediatr Cardiol.* 2018;39(4):682–9.
156. Mlynarczyk, C. et al. Germinal center-derived lymphomas: The darkest side of humoral immunity. *Immunol Rev.* 2019;288(1):214–39.
157. Krysiak, K. et al. Recurrent somatic mutations affecting B-cell receptor signaling pathway genes in follicular lymphoma. *Blood.* 2017;129(4):473–83.
158. Pasqualucci, L. Molecular pathogenesis of germinal center-derived B cell lymphomas. *Immunological Reviews.* 2019;288(1):240–61.
159. Nijland, M. et al. Mutational Evolution in Relapsed Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Cancers (Basel),* 2018;10(11):459
160. Schmitz, R. et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2018;378(15):1396–407.

161. Love, C. et al. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat Genet.* 2012;44(12):1321–5.
162. Bertoni, F. et al. Recent advances in understanding the biology of marginal zone lymphoma. *F1000Res*, 2018;7: 406
163. Dyer, M. J. et al. BCL2 translocations in leukemias of mature B cells. *Blood.* 1994;83(12):3682–8.
164. Kojima, K. et al. Trisomy 12 and t(14;18) in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Hematol.* 1998;67(2):199–203.
165. Kempf, W. et al. Cutaneous Borreliosis With a T-Cell-Rich Infiltrate and Simultaneous Involvement by B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia With t(14;18)(q32;q21). *Am J Dermatopathol.* 2015;37(9):715–8.
166. Hosokawa, Y. et al. The Ikaros gene, a central regulator of lymphoid differentiation, fuses to the BCL6 gene as a result of t(3;7)(q27;p12) translocation in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2000;95(8):2719–21.
167. Montesinos-Rongen, M. et al. Molecular characterization of BCL6 breakpoints in primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system identifies GAPD as novel translocation partner. *Brain Pathol.* 2003;13(4):534–8.
168. Birkenmeier, K. et al. Basal autophagy is pivotal for Hodgkin and Reed-Sternberg cells' survival and growth revealing a new strategy for Hodgkin lymphoma treatment. *Oncotarget.* 2016;7(29):46579–88.
169. Arko-Boham, B. et al. Circulating cell-free DNA integrity as a diagnostic and prognostic marker for breast and prostate cancers. *Cancer Genetics.* 2019; 235-236:65-71
170. Parsons, H. A. et al. Circulating Plasma Tumor DNA. *Adv Exp Med Biol.* 2016;882:259-76
171. Elshimali, Y. I. et al. The Clinical Utilization of Circulating Cell Free DNA (CCFDNA) in Blood of Cancer Patients. *Int J Mol Sci.* 2013;14(9):18925-58
172. Zahn, M. et al. A novel PTPN1 splice variant upregulates JAK/STAT activity in classical Hodgkin lymphoma cells. *Blood.* 2017;129(11):1480–90.
173. Küppers, R. et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(23):10962–6.
174. Liang, W. S. et al. Comprehensive Genomic Profiling of Hodgkin Lymphoma Reveals Recurrently Mutated Genes and Increased Mutation Burden. *Oncologist.* 2019;24(2):219-28
175. Du, M. -Q. MALT lymphoma: Genetic abnormalities, immunological stimulation and molecular mechanism. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2017;30(1–2):13–23.
176. Li, Z. et al. CD83 is a new potential biomarker and therapeutic target for Hodgkin lymphoma. *Haematologica.* 2018;103(4):655–65.

177. Lu, C. und Allis, C. D. SWI/SNF Complex in Cancer: 'Remodeling' Mechanisms Uncovered. *Nat Genet.* 2017;49(2):178–9.
178. Jang, Y. et al. H3.3K4M destabilizes enhancer H3K4 methyltransferases MLL3/MLL4 and impairs adipose tissue development. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(2):607–20.
179. Joshi, P. et al. The functional interactome landscape of the human histone deacetylase family. *Mol Syst Biol.* 2013;9:672.
180. Takenouchi, T. et al. Growth pattern of Rahman syndrome. *Am J Med Genet A.* 2018;176(3):712–4.
181. Tatton-Brown, K. et al. Mutations in Epigenetic Regulation Genes Are a Major Cause of Overgrowth with Intellectual Disability. *Am J Hum Genet.* 2017;100(5):725–36.
182. Li, H. et al. Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D, and E; OCT2 (POU2F2); IRF8; and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood.* 2014;123(10):1487–98.
183. Mareschal, S. et al. Whole exome sequencing of relapsed/refractory patients expands the repertoire of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2016;55(3):251–67.
184. Braggio, E. et al. Genome-Wide Analysis Uncovers Novel Recurrent Alterations in Primary Central Nervous System Lymphomas. *Clin Cancer Res.* 2015;21(17):3986–94.
185. Morin, R. D. et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature.* 2011;476(7360):298–303.
186. Kuo, H. -P. et al. The role of PIM1 in the ibrutinib-resistant ABC subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Cancer Res.* 2016;6(11):2489–501.
187. White, B. S. et al. A multiple myeloma-specific capture sequencing platform discovers novel translocations and frequent, risk-associated point mutations in IGLL5. *Blood Cancer J.* 2018;8(3):35.
188. Kridel, R. et al. Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood.* 2012;119(9):1963–71.
189. Clipson, A. et al. KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype. *Leukemia.* 2015;29(5):1177–85.
190. Roschewski, M. et al. Monitoring of Circulating Tumor DNA As Minimal Residual Disease in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood.* 2014;124(21):139–139.
191. Tice, J. A. et al. Benign breast disease, mammographic breast density, and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(14):1043–9.
192. Grither, W. R. und Longmore, G. D. Inhibition of tumor-microenvironment interaction and tumor invasion by small-molecule allosteric inhibitor of DDR2 extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(33):E7786–94.

193. Lavorgna, A. et al. TNF receptor-associated factor 1 is a positive regulator of the NF-kappaB alternative pathway. *Mol Immunol.* 2009;46(16):3278–82.
194. Wang, W. -J. et al. Expression and function of TRAF1 in Hodgkin's lymphoma cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2010;31(1):29–33.
195. French, C. A. et al. BRD-NUT oncoproteins: a family of closely related nuclear proteins that block epithelial differentiation and maintain the growth of carcinoma cells. *Oncogene.* 2008;27(15):2237–42.
196. Bekpen, C. et al. Primate segmental duplication creates novel promoters for the LRRC37 gene family within the 17q21.31 inversion polymorphism region. *Genome Res.* 2012;22(6):1050–8.

Anhang

Tab. 1: Primerliste

Validierung der Varianten	Fall-Nr.	Gen, Rearrangement, Translokation	Primersequenzen
Qualitätskontrolle der DNA-Probe		β -Globin	US CCAGAAGAGCCAAGGACAGGTACG LS CCACCAACTTCATCCACG TTCACC
		<i>SOCS1</i>	US2A CACCGTGGGCCTCGAGAACC US2B CCGGCGACACGCACTTCC LS1 GCTGTCGCGCACCAGGAAGG LS2B CGAGCACGGAGCACCAAGTCC
		<i>CSF2RB</i>	US1 GTGAAGTCAGGGTTTGAGGGCTATGTG US2 AGGGTTTGAGGGCTATGTGGAGCTC LS1 CCACTTGCTGCAGGACAAGGAGG LS2 CAAGGAGGCCCTCGGGCTGT
		<i>B2M</i>	US1 TGATTGGCTGGGCACGCGTT US2 GCTGGGCACGCGTTTAATATAAGTGGAG LS1 GGGCCACAGAGGGTGCAGAGC LS2 CAGAGCGGGAGAGGAAGGACCAG
Amplikon-basierte Methode (HL, FFPE)	160	<i>TNFAIP3</i>	US1 GAATGATGAATGGGACAATCTTATCAAAATGG US2 CTTATCAAAATGGCTTCCACAGACACACC LS1 AGTGTGGTTTTCTCCAGGAGCCAAGG LS2 AGGAGCCAAGGCATAAGGCTGAAAGC
		<i>EGR1</i>	US2 CCTAGAACCATACGGAGAACGCAAGTAGC LS2 GGGACACGGGTGGAGGAAGAGG
		<i>SOCS1</i>	US1 GAAGAGGCAGTCGAAGCTCTCG LS1 ACTGGGGGCCCTGAGC
Fragment Kit Validierung (HL, FFPE)	174	<i>EGR1</i>	US2 CCTAGAACCATACGGAGAACGCAAGTAGC LS2 GGGACACGGGTGGAGGAAGAGG
	150	<i>SOCS1</i>	US1 GAAGAGGCAGTCGAAGCTCTCG LS1 ACTGGGGGCCCTGAGC

	171	<i>ITPR3</i>	US1 GCTGCCATCTGCCGTGTCC LS1 CTGCCATGCACAGGAAAATCAGG
	157	<i>BCL7A</i>	US2 GTCGGGCAGGTCCGGTTCG LS2 GCTTACCATTGCGCACTTTCTCG
		<i>MYD88</i>	US1 CAGCATGGCACCCCTTGG LS1 CAGACAGTGATGAACCTCAGGATGC
	91	<i>ATP6V1B2</i>	US1 CATTCTTTTTGTGTTTTCTTTTTGGTC LS1 ATTGGTACGCCAGAAATTCAGC
		<i>SMARCA4</i>	US1 CGCCCTGGCCCCCTTGC LS1 AAGGGCGGCCCGTTGG
	32	<i>SPEN</i>	US1 CAGTCTCTTTCCCACTCAGACTGC LS1 CTGGCTGGAATTCAGTGTGTGG
	78	<i>ARID1A</i>	US1 ACCTGGCTCAGGGGGACAGC LS1 CCGCATCATGTCCACACTAGTTGG
Hybrid-capture (Non HL FFPE & ccfDNA) Kapa Fragment Kit somatische Varianten	72	<i>ATM</i>	US1 TCCAATAGCTTGCTTTTCACAATTGTCC LS1 GCTATTTTCTAAGTCACCCTCTAACTGATAGAATAAGAGC
		<i>SMARCA4</i>	US1 GAGGCCACCTTCCCTTTTATGACC LS1 GAGCTTGTACTTGGCTGCAGCTAGG
	77	<i>TRAF 3</i>	US1 CCTCCAAAATAATGATCTTTCATTTTCAGG LS1 TTCCTTCATGTAAAAGGTTCCAGTGTCC
	81	<i>KRAS</i>	US1 ATGCATATTAACAAGATTTACCTCTATTGTTGG LS1 TGTATTAACCTTATGTGTGACATGTTCTAATATAGTCAC
		<i>PIMI</i>	US1 CGGAGACCCTGGGCTTCC LS1 CTCACCCCACTCATCC
	60	<i>CREBBP</i>	US1 GCCTTGTCAGCATCTTTTGTACC LS1 GGTATGTGACAGGGCACATCTGG
		<i>BCL2</i>	US1 ACCCCGTCCCTGAAGAGC LS1 TACCGCCGCGACTTCG

	<i>ITPKB</i>	US1 TCCCAGGGGGTTCTCCATCG LS1 CTCACTGAGCCGTCTGGGAGAGC
71	<i>ATM</i>	US1 GAGACTGTCAAGAGGTGCACAGATGC LS1 CCTCTTCTAGTTTCCGTGTTTCTCTGC
	<i>SMARCA4</i>	US1 CCCCCTGACCCTGTTCTCC LS1 GCTGAGCAGGAAGATGAAGTACTCAGAGC
25	<i>IRF8</i>	US1 GCTGCCCCGGCACCAAGC LS1 CCTGCCGGCTGCTGTGC
22	<i>NOTCH1</i>	US1 TGCCTGCAGGCTGCAGACC LS1 CCCCTTCTACCGTTGCCTGTGC
	<i>TBL1XR1</i>	US1 AAATGCTTCTACCTAAATTTAAGAGCACTTGACC LS1 GATATGCATCCATACCTTGACAAAACACC
29	<i>PTEN</i>	US1 GCAGATCCTCAGTTTGTGGTCTGC LS1 CCTTTTTTAGCATCTTGTCTGTTTGTGG
	<i>ATM</i>	US1 GTTTTTTTCAGTGTCAAAGTTTCGATCAGC LS1 GCTGGGTATTCAATAAACATTTACTTAAGAGACC
58	<i>ATM</i>	US ATTGGACTTGTTGAAATACTTAGTGATAGATAACAAGG LS CTACTATGTTCTCTAATAAAAAATAGTAGATGATGAAATTTTTATTACC
	<i>KMT2D</i>	US1 GCCACATCCACACCCAGACC LS1 CCGTCGAGCACTGAGCTTGG
30	<i>RB1</i>	US GTTCAGAATGATGTATTTATGCTCATCTCTGC LS CCTGGATGAGGTGTTTGAATAACTGC
5	<i>NCOR2</i>	US GGGCCCAGGGCAGAAGG LS CACGTGACTCGCTCCTTACTGG
	<i>DDX3X</i>	US AATATATAATTGTAATAACCTATAACAATTGTATTTGTAATTATACTAACAGC LS CCTTTGGAGGCATAGTATCTTGTTCCG
72	<i>B2M</i>	US ACTTGGTGCTGATATAGCTTGACACC LS GAAACCCAGACACATAGCAATTCAGG

Hybrid-capture (Non HL, FFPE)
Sanger Sequenzierung
somatische Varianten

	<i>CD58</i>	US AATTGTAACCTTGTTTTACATTTCAAATTGTGAACC LS TGGAAAATGATCTTCCACAAAAAATACAGTG
31	<i>PRDM1</i>	US CCTGAGAGTGCACAGTGGAGAACG LS GCTATATAGGACATGGGAGGGTGA CTAC
	<i>NOTCH1</i>	US TGGTGGGAGGGCTGGAGACG LS AGCACAGCTACTCCTCGCTGTGG
81	<i>SPEN</i>	US CTGGTGGTGGACCCCAAGG LS TGCCAGCATCTTTTCTGTACG
	<i>PTPN11</i>	US TGTCCCTCACATGTGCACTCTTCC LS CATGACCAGGTAAAAAGAATTTCTTCAGC
27	<i>CREBBP</i>	US CACCGTGGAAAAGCAGCATGC LS CCAAGTTAAAGAAGAAACAGACATAGCAGAGC
	<i>TP53</i>	US TGGGGACCCTGGGCAACC LS CAGCTGTGGGTTGATTCCACACC
	<i>ARID1A</i>	US CAGCCCCACCAAGCATGC LS CACAGGGGCAGGTGCTATGTGC
28	<i>PTEN</i>	US CCATCTCTCCTCCTTTTCTTCAGC LS CGTTCTAAGAGAGTGACAGAAAGGTAAAGAGG
	<i>ATM</i>	US GAATGAATTTATTTTCAGAGTAATTTTCCAGA ACTTACTGG LS AACATAACATGAAGATGGTTTTCTAGAGCATCC
55	<i>KLHL6</i>	US ACATAGACCTTGCCACCCAACACC LS GAGAAGCTGTATTTCTGACACATCTGATGG
	<i>TBL1XR1</i>	US TGCCGTGAGTATGAGGCTCTGAGG LS GGAATCTTAGTGAGAACAGCACCAGTGG
84	<i>KMT2C</i>	US GATGGAGCCTTGGTGGATTCTGC LS GCTTTACCAGCAGCACCTCCAGTAGC

	<i>ATM</i>	US AAAAGTATTTATTCCCATATGTCATTTTCATTTTCAGC LS AACTTCTTGATCATTGCTTGAGAATACTCAGG
77	<i>TRAF 3</i>	US CCTCCAAAATAATGATCTTTCATTTTCAGG LS TTCCTTCATGTAAAAGGTTCCAGTGTCC
80	<i>SPEN</i>	US CCCCTGTGGAACAGCTGGAAC LS ACTTTCACCGACCCATGACAGTCC
71	<i>JH4/BCL1</i>	US1 CAGCAAAACCCTTCAGAGAGTTAAAGCAGG LS GACGTGTTTGTCTGATCCAGCAGCAG
58	<i>JH4/BCL2</i>	US1 GGGCTCTCTTGGCAGGAGACC US2 TCTCTTGGCAGGAGACCCAGCAC LS1 CCGTCTATTACTGTGCGAGAGGTCC
29	<i>IgSG4/MYC</i>	US2 CGTTCACCTGGGGCCTCTCC LS2 GAAAAGTGTCAATGCGGCAGAACC
85	<i>MALT1/BIRC3</i>	US2 GAGTGACAGTTGTCAAGAGTATGTAGAACTCTGTAGG LS2 AAATGTTGAAAAAGTGCCATTCTATTCTTCC
72	<i>IgHJ6/BCL1</i>	US1 AATGCTCAGGAAACCCACAGG LS1 GGGGACACAGGCCTGAGTTCC
27	<i>IgHJ4/BCL2</i>	US2 CATATTTTCAGAAATGACTGAACGCAACG LS1 TTTTTCTAAATTCGTTCTCAGTAAGTGAGAGTGC LS2 TCTCAGTAAGTGAGAGTGCAGAATCTGACG
86	<i>MALT1/BIRC3</i>	US1 GAACCTAACTGTATTGCAAATGTATGGTACAGC LS1 CTGTTTAATAACATCATGTTCTTGTTTCATTAATAATTCC
1	<i>IgHJ5/BCL2</i>	US1 CCTCCAAGACTCTGACCCTGAGACC LS1 CCTCTCTCAACACAGACTCACCTAGTGTCC
66	<i>IgHJ4/BCL1</i>	US1 CAGCAAAACCCTTCAGAGAGTTAAAGCAGG LS1 TGGCCTCTCTCAACACAGACTCACC

Hybrid-capture (Non HL, FFPE)
Sanger Sequenzierung
Translokationen

7	<i>IgM/cMYC</i>	US1 CAGGGAGCAAACAAATCATGTGTGG LS1 CTCCTCTTGGTGCAGAAGATATGCTGC
47	<i>JgHJ6/BCL2</i>	US1 AGTAGCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGTGG LS1 CAAGGAAGCAGTCCATTATTAATTAAGTCC
	<i>IgM/IDH2</i>	US1 GACCTGGGGTCTCCTGGAGCAG LS1 TGTCTCCACCATGCATTTC
48	<i>IgHJ5/BCL2</i>	US1 GGCAAGCTGAGTCTCCCTAAGTGGACTC LS1 GGCCAGGGTCAGAGTTAAATAGAGTATATG
67	<i>IgHJ4/BCL1</i>	US1 CAGCAAACCCCTTCAGAGAGTTAAAGCAGG LS1 CTTACTCTTTATCTGAGTGGGATGAGATTAAACTGC
68	<i>IgHJ5/BCL1</i>	US1 GGCAAGCTGAGTCTCCCTAAGTGGACTC LS1 CTTGGAACCAAACACTAGGATGAGGAGG
49	<i>IgHJ6/BCL2</i>	US1 AGTAGCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGTGG LS1 CCTCCTGTGAACATTTAAAAGATGGTGGTG
	<i>IgM/RCC1</i>	US1 GCTCAGCCCAGCACAGCACG LS1 AACGTGGATACACCCGGGAGGTC
50	<i>BCL6/MEF2C</i>	US1 GTCATTAGAGTAAGGGAATGCCCATCTCC LS1 GTGTGTGTGTGTATGTGTGTACGGTGTGG
	<i>IgHJ6/BCL2</i>	US2 CCCTAGAGTGGCCATTCTTACCTGAGG LS2 CCAATAAATAGCAGCTATTGTTACTCTTGCAGG
34	<i>IKZK1/BCL6</i>	US1 GGTAAGGACCTCGGGAATCTGAAGC LS1 AGCTTACTTCTGAGGCACTCTGAAGTGTG
39	<i>HSP90AA1/BCL6</i>	US1 CAGAAGGACAGGGGAAGGGAAGG LS1 CCCGTGTTTTTCCCTCTTTTCTCG
10	<i>PELI3/IgHGP</i>	US1 TGCCCACTTGGCCTGGTAGC LS1 CCAGCCCTCAGCTGTCTGTTGC
14	<i>PAPSS2/IgG3</i>	US1 AATGGGCATTTTAAGCAGCTGGAG LS1 CGGGAGCAGGGCTGTGG

	93	<i>IgH-sA1/ITPR1</i>	US1 ATGATGCTTGGCTAACTCTATTATGATGATGG LS1 GGGCTGGGCTGGGCTTG
	92	<i>SPEN</i>	US CGCCTCTGGGGGGATCC LS GGTCCATGAGAATCTTCCTCAGG
	83	<i>TP53</i>	US GGCTCCTGACCTGGAGTCTTCC LS TCCCAAGGCGCACTGG
	95	<i>CREBBP</i>	US TGGTGCTTGCACTCGTTGC LS CCCCTGCTCAGCTGTGACC
	56	<i>KMT2C</i>	US GTCTCTCTGATGTTGGAAGAGACTGC LS CGCAGCACTCAGACCACAGTGG
	55	<i>TNFRSF14</i>	US CGCAGCAATGGCGCTGAG LS GAGGCTCGGGGGCTCACC
Hybrid-capture (Non HL, FFPE) Sanger Sequenzierung Keimbahn-Varianten	52	<i>KMT2D</i>	US AAGGGGCTCCATCAGGATGG LS GGGACAGTGACCCTGAGTCACC
	19	<i>CREBBP</i>	US CCTTGAGGCTGCTGGAAGTGG LS CAGGACACAACCCCAACATGG
	53	<i>ITPKB</i>	US CCCCAGGAGGGCACTGAGG LS GGAGGGAGGGTCCCCAACG
	69	<i>SAMHD1</i>	US TGTCAGCTTAGTATAGGCTTCCATGTCG LS GAGAAGCAGTTGTCTTTAGAACACTGTGC
	22	<i>EZH2</i>	US TTCATTTCCAATCAAACCCACAGAC LS CTATTGCTGGCACCATCTGACG
		<i>STAT6</i>	US GCCCCTGTTCCCTCCAACCTCC LS GAAAGAAAGAAAGAAAAGAAACCCCTGTCC
	45	<i>TNFAIP3</i>	US CATGGAGTGTGAGCATCCCAACC LS CTGTTTCCGGTTAGCCATACATCTGC

	<i>MEF2B</i>	US AGGAGGAATGCCTCATTACAGG LS CTGTCCCATAGACGCTGAAGC	
72	<i>ATM</i>	US GAATGATCCATTTGTGGTGGACTGC LS GCGTGAGGCCGGGAAGG	
	<i>SMARCA4</i>	US CCTTGGAGCTGTGCTCGAAGC LS GTCCATGACCCAGAACCTTCTGG	
100	<i>B2M</i>	US1 GTGTCTTTTCCCGATATTCCTCAGGTA US2 CGATATTCCTCAGGTA LS1 CTGAATGCTCCACTTTTCAATTCTCTCC	
		US2 TTCCCTCCA LS1 ACCCCTGTCCTCACCTCTTCAGG LS2 CCCTCTCAGGCCCTGTCTCTGC	
101	<i>STAT6</i>	US2 TTCCCTCCA LS1 ACCCCTGTCCTCACCTCTTCAGG LS2 CCCTCTCAGGCCCTGTCTCTGC	
Hybrid-capture (HL, ccfDNA) Sanger Sequenzierung somatische Varianten	<i>STAT6</i>	US2 TTCCCTCCA LS1 ACCCCTGTCCTCACCTCTTCAGG LS2 CCCTCTCAGGCCCTGTCTCTGC	
	102	<i>ITPKB</i>	US1 AGCCCCTTTTGTCAATTTCCATAGCTG US2 CCCTTTTGTCAATTTCCATAGCTGTGG LS2 CCCCTACAGGATCAGAGGCTCAGG
		<i>XPO1</i>	LS2 TTTTTTGAGAGCTCACTGGAAATTTCTGAAGACTG USN CAATAAAAATAAAAAGCAAAATATAGTAAAGAAAGAGATTTACCATGC LSN1 GATAATAAAGCTATTATTGCATCAAATATCATGTACATAGTAGGTC
103	<i>GNA13</i>	US2 CCGTGTTGATAGCAGTGGTGAAGTGG LS1 GTGAGCATCAAAGACTATTCCTAGAATTTGAAGG LS2 CAAAGACTATTCCTAGAATTTGAAGGGGATCC	

	<i>ARID1A</i>	US1 AACATCTCGGGGCAGTTGGACC LS1 CCAGGGTGGAAAAGGGGTCCTG LS2 GAAAAGGGGTCCTGGGCTTCAGC
	<i>B2M</i>	US1 GTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTGG US2 CTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATCC LS1 TCTTTTTTCACTGGGGGTGAATTCAGTG
105	<i>ITPBK</i>	US1 GCTGCACACCCACCCTGTCC LS1 CCAACGCTGGGCTTGCTTGG LS2 GGCAGCCCCTCAGCACAGC
	<i>PIM1</i>	US1 CCTCTGGGCACCGTCCCTG US2 CGTCCCTGCGCCGACATCC LS1 GGGCGCCAGCTTGGTGG
	<i>CD83</i>	US1 CGCGACGCCGGAGGTG LS1 GGGTATCGCAGCACCTACCTTGACC LS2 CAGCACCTACCTTGACCCAGGAGACC
	<i>SOCS1</i>	US1 GCGCTGGCGGCACAGCTC LS1 GGCCGCTTTCACCTGGATGG LS2 CCGCTTTCACCTGGATGGCAG
106	<i>TNFAIP3</i>	US1 CAGGCCACCCTGGAAAGCCAG LS1 AGCTTCATGAATGGGGATCCAGCAG LS2 CCAGCAGGCGGGAGCTATCACC
	<i>STAT6</i>	US2 TTCCCTCCA ACTCCAGGACTTTCCCTC LS1 ACCCCTGTCCTCACCTCTTCAGG LS2 CCCTCTTCAGGCCCTGTCTCTGC
107	<i>CDH2</i>	US1N GTGTGGGGCTGCAGATCGGAC US2N CTGCAGATCGGACCGGATACTGG LS2N CCTGATGCCATCAAGCCTGTGG

108	<i>GNAI3</i>	US1 CAGCAAGTCTTTTGTACATCACTGTAGCATAAGCTG US2 CTTTTGTACATCACTGTAGCATAAGCTGCTTGAGG LS2 GCCGGGACCAGCAACAGAAGC
	<i>ITPKB</i>	US2 CCAAGCCAAACCGGCTTTCTCC LS1 GAATTCCTTCTGGCAGAATGCTGGAG LS2 CTTTGCCTGTTGGGACGCTG
110	<i>TNFAIP3</i>	US1 GAACAGACAAAATGCTAAGAAGTTTGGAAATCAGG US2 GACAAAATGCTAAGAAGTTTGGAAATCAGGTTC LS1 GCCGAGAACAATGGGGTATCTGTAGC
	<i>TP53</i>	US1 ACCTGGAGTCTTCCAGTGTGATGATGG LS1 GCGCACTGGCCTCATCTTGG LS2 CCTCATCTTGGCCTGTGTTATCTCC
111	<i>SOCS1</i>	US1 GCGCCGCCACGTAGTGCTC US2 GCCACGTAGTGCTCCAGCAGCTC LS2 GGCCTCGGGACCCACGAG
115	<i>TBL1XR1</i>	US1 CATAAAAGGAAAAATGAAACAGAAGTATCACCTTGC US2 GAAACAGAAGTATCACCTTGCTAACATAAGGTTGG LS1 CAAGACAATTGTGTCCATGATTTGCAAGC LS2 TGTTTAGATATGGAGTATGAAACAAGACAATTGTGTCC
116	VH3-30/DH3-16/JH6	DJ-US2 TAGCTGAAAACAAAGGCCCTAGAGTGG DJ-LS2 GACGGGTTTAGGATTACCCCTTCTTCG VDJ-US1 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG VDJ-LS1 CGAAGAAGGGGTAATCCTAAACCCGTC
111	VH4-30/DH1-26/JH5	DJ-US1 GGGTGGTGAGGACTCACCTGAGG DJ-LS2 CGAGAGATAAGAGGTACGACTACGGTGA CTATAGTAGG VDJ-US1 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCG VDJ-LS1 ACACGGTGCGATTTTCACCGTAGC

Hybrid-capture (HL, ccfDNA)
Sanger Sequenzierung
VDJ/DJ-Rearrangements

			DJ-US2 CTGAGGAGACGGTGACCGTGGTC DJ-LS2 GAGTCACGGTGGGTATAGTGGGAGC VDJ-US1 AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG VDJ-US2 GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC VDJ-LS2N CCCC GCCATCAAGATCTTTGACAC
			US1 TTGTCCCTTGGCCCCAGACG US2 CCCTTGGCCCCAGACGAGG LS1 CCCAGGTTTCCCCAGGCCTG LS2 CCCAGGCCTGGCGGTAGG
			DJ-US1 GGACGCAGAAGGAAAGTCATCTTACCTG DJ-US2 CAGAAGGAAAGTCATCTTACCTGAAGAGACG DJ-LS1 GATGACCGCGACAAATTGACG DJ-LS2 GACGAATACAGCCTCCATGGGTCTG VDJ-US2 CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGG VDJ-LS1N GATATCAAAAGCATCCTGCAGTTTCCCATC VDJ-LS2N AAGCATCCTGCAGTTTCCCATCTAAGGTAC
			US1 GAGACGCAGCTGGTGGAGTCTGG LS1 TCGTAGTCGAAGTCCTCTACCAAGGCAG
			US1 AGCTCCAGGACAGAGGACGCTG US2 AGAGGACGCTGGGCCAGAG LS1N CCTCACAGTGACAGGAGGATTTTGTGG
Hybrid-capture (HL, ccfDNA) Sanger Sequenzierung Translokationen		103	<i>AICDA/IgHG3</i> US1 GATGTGGCATAGATAAAGGACTTTGGGTG US2 GGACTTTGGGTGGATTTTGGGTCC LS1 ATCCCAGGTCCTGCCAAAGTCTAGG LS2 CAGGTCCTGCCAAAGTCTAGGAGCTG
WES (HL, ccfDNA) Kapa-Fragment-Kit		115	<i>ADRM1</i> US CTTGTGTCTTTAACGTGTTCTAGATGTGGAAGC LS AGGGTGTGCAACGCACTGCAAGC

Austausch-Varianten

115	<i>ANKRD36</i>	US GAAGTTTGTTTAGAAATTTACATGATTTAAAAAAAATTACGTGTGAGAG LS TTCCTTTTCAGTATGACAGAAATTAAGAGATCAGC
119	<i>BCL7A</i>	US GGGCGGGCGCGAGTGTGG LS TCCGCTTACCATTTGCGCACTTTCTCG
100	<i>LTBP2</i>	US GTTCTAGAGGCCCTGCTCTTCTAGG LS CCACGGCCAGTAGCCAGCTC
102	<i>LILRA1</i>	US CTATAGTGGCCCCTGGGGAGAGC LS CACAGGGCCCAGGGTGAAGTTGG

Tab 2: Gene, die das *hybrid-capture*-basierte Panel beinhaltet (Version 1).

Sonden für	Gene/genomische Regionen
Exons mit HotSpots	<i>BRAF; CD79B; IDH1; KRAS; MYD88; NOTCH1; NRAS; SF3B1; STAT6; XPO1</i>
Gesamte codierende Bereiche	<i>ACTG1; ARID1A; ATM; ATP6AP1; ATP6V1B2; B2M; BCL2; BCL6; BIRC3; BTG1; CARD11; CCND1; CCND3; CCT6B; CD58; CD70; CD83; CDH2; CDK4; CDKN2A; CREBBP; CYLD; DDX3X; DIS3; DUSP2; EP300; ETS1; EXOSC1; EZH2; EZR; FAM46C; FBXW7; FGFR3; GNA13; HIS1H1E; HIST1H1C; HIST1H1D; HIST1H3B; HLA-A; ID3; INTS12; IRF4; IRF8; ITPKB; KLF2; KLHL6; KMT2C; KMT2D; LTB; MAP2K1; MED12; MEF2B; MYC; NCOR2; NSD2; PIM1; POT1; POU2F2; PRDM1; PTEN; PTPN11; RB1; S1PR2; SALL3; SAMHD1; SGK1; SMARCA4; SOCS1; SPEN; TBL1XR1; TCF3; TMEM30A; TNF; TNFAIP3; TNFRSF14; TP53; TRAF3</i>
Genomische Regionen für strukturelle Varianten	BCL1-MTC; BCL2-3MBR; BCL2-5mcr; BCL2-MBR; BCL2-mcr; <i>BCL6-5'UTR; CD274; CPA5; IRF5</i> ; alle IGH-DH, IGH-JH, IGK-JK und IGL-JL Gene; all IGH-Switch-Regionen; <i>LEP; MIR15A; MIR16-1; REL; MYC</i>

Tab. 3: Gene, die in Version 2 zusätzlich für die pHL-Analysen im *hybrid-capture*-Panel integriert wurden.

Sonden für	Gene/genomische Regionen
------------	--------------------------

Exons mit HotSpots	<i>BTK; CXCR4; PLCG2; CIITA</i>
Gesamte codierende Bereiche	<i>CSF2RB; FOXO1; IGLL5; ITPR3; MYB; NFKBIA; NFKBIE; NUP214; PTPN1; TET2</i>
Genomische Regionen für strukturelle Varianten	alle IGH-VH Gensegmente

Tab. 4: Patientendaten der HL, die für das Amplikon-basierte Verfahren verwendet wurden (Archivfälle, qPET >3 und qPET <3), NS: Nodulär-sklerosierender Subtyp, MC: Mischtyp, LR: lymphozytenreicher Subtyp

Fall Nr	Alter	Geschlecht	Subtyp	EBV	qPET
150	14	w	MC	neg	
151	14	m	NS	neg	
152	13	m	NS	neg	
153	7	m	MC	neg	
154	13	m	MC	pos	
155	11	w	MC	pos	
156	14	m	MC	pos	nicht bekannt
157	13	m	NS	neg	
158	13	m	MC	pos	
159	9	m	MC	neg	
160 (adult)	32	w	MC	neg	
161	5	m	NS	pos	

162	17	m	MC	neg	0
163	16	w	NS	neg	1,6
164	15	m	NS	neg	1,37
165	16	w	NS	neg	0
166	16	w	NS	neg	0,46
167	13	w	MC	pos	1,92
168	15	w	NS	neg	0,99
169	13	m	keine Subtypisierung möglich	pos	0
170	9	m	MC	pos	0
171	10	m	MC	pos	0
172	16	m	NS	neg	0
173	18	w	MC	pos	0
174	14	w	NS	neg	1,31
175	16	m	NS	neg	4,25
176	16	m	LR	pos	4,37
177	16	w	keine Subtypisierung möglich	neg	5,78
178	16	w	MC	pos	3,74
179	17	w	MC	neg	3,9
180	17	m	NS	neg	3,89
181	6	w	NS	neg	5,53
182	17	m	NS	neg	3,66
183	14	m	NS	neg	3,67
184	17	w	NS	neg	4,08
185	11	w	MC	neg	3,46
186	7	m	NS	neg	3,61

Tab. 5: Lauf- und Bibliothekencharakteristika der HL (FFPE-Gewebe), die durch die Amplikon-basierte Methode sequenziert wurden (Archiv, qPET >3 und qPET <3). PF: Passing Filter, A: Pool A, B: Pool B

Lauf	Fall Nr.	Ausgangskonz. der DNA [ng/µl]	Bibliothekenkonz. [ng/µl]		reads	reads "PF"	Cluster Dichte [K/mm ²]	Q30 [%]	Target Abdeckung (Pool A/Pool B)	Generierte reads nach Abgleich (read1/read2)
			Pool A	Pool B						
	150	593	10,2	11					16726/19047	A: 977,326 / 976,671 B: 1,073,680 / 1,066,033
1	151	364	7,31	4,79	37444196	33232540	1597	91,3	19222/26020	A: 6,467,630 / 6,405,572 B: 4,137,283 / 4,136,733
	152	114	15,3	15,9					4308/3942	A: 4,709,176 / 4,698,681 B: 4,794,678 / 4,740,187
2	153	343	41,3	39,8	14306196	13894331	582	92,8	4746/4562	A: 2,847,401 / 2,869,005 B: 2,231,622 / 2,256,975
	154	9,8	3,41	1,74					11487/9067	A: 271,317 / 273,708 B: 340,393 / 342,744
3	155	37	25,2	22,5	40235760	33307028	1746	89,7	21363/22486	A: 5,051,404 / 5,008,267 B: 4,767,548 / 4,728,863
	156	422	53,8	58					10297/15189	A: 3,437,738 / 3,373,085 B: 5,013,416 / 4,973,698
4	157	15,6	7,66	13,5	26190752	24482904	1084	95,1	23377/19240	A: 2,115,063 / 2,123,194 B: 2,227,455 / 2,238,524

Anhang

	158	663	96,8	97,8					9417/10019	A: 5,238,323 / 5,274,901 B: 4,273,790 / 4,307,463
5	159	598	75,1	80,9	28581918	26150310	1199	94,4	12700/13187	A: 2,647,231 / 2,354,975 B: 2,929,280 / 2,944,220
6	160 (adult)	83,8	54,4	58,9					20992/32128	A: 4,650,827/4,639,559 B: 7,182,716/7,129,370
	161	14,2	1,18	50	36444632	32250442	1536	92,8	25385/26499	A: 5,791,655/5,795,871 B: 5,894,089/5,923,996
7	162	513	6,45	8,41					12867/11003	A: 3,157,107/ 3,096,485 B: 2,701,656/2,646,005
	163	262	4,74	3,59	35789732	31650368	1519	92,3	13576/9617	A: 3,323,994/3,274,279 B: 2,355,633/2,318,463
8	164	285	20,8	26,6	35604484	31884942	1491	94,2	20428/23602	A: 4,976,842/ 4,950,988 B: 5,751,220/5,719,351
9	165	596	33,4	28,5					26193/21431	A: 6,361,045/6,368,767 B: 5,221,688/5,193,869
	166	258	10,7	9,54	36581203	32390874	1540	93,46	21619/21172	A: 5,263,997/5,242,884 B: 5,161,171/5,128,502
10	167	509	46,5	43	41640044	33756512	1809	89,91	17203/18064	A: 4,197,639/ 4,163,306 B: 4,443,159/4,336,090

Anhang

	168	558	36,9	37,3					18594/11807	A: 4,537,464/ 4,499,102 B: 2,897,393/ 2,840,884
	169	237	15,6	13,6					12483/8694	A: 2,751,893/ 2,772,904 B: 1,941,827/1,949,949
11	170	319	30,5	23,5	25512508	23514184	1056	92,7	14752/13614	A: 3,246,214/3,280,381 B: 3,039,215/ 3,048,469
	171	142	42,6	39,3					11215/10251	A: 2,453,854/2,483,979 B: 2,269,415/ 2,271,021
	172	675	34,7	29,2	41902920	33078616	1813	87,98	23568/13404	A: 5,237,871/5,270,383 B: 3,017,466/ 3,000,674
12	173	180	20,8	20	41902920	33078616	1813	87,98	6563/1666	A: 1,463,247/1,454,583 B: 374,087/369,005
	174	113	27,4	24,2	40235760	33307028	1746	89,7	22461/19753	A: 4,433,690 / 4,400,233 B: 2,308,231 / 2,267,187
	175	191	45,3	39,2	31970488	29038144	1337	92,4	30745/30734	A: 7,499,644/ 7,442,520 B: 7,506,455/ 7,430,035
13	176	499	13,7	14,1	35613172	31335524	1499	87,8	18230/15814	A: 4,455,728/4,404,181 B: 3,863,293/3,822,269
	177	50,3	1,46	1,86	35604484	31884942	1491	94,2	4275/5137	A: 1,040,876/1,036,558 B: 1,252,153/1,244,422

Anhang

	178	592	29,7	25,9	41640044	33756512	1809	89,91	18834/19050	A: 4,613,743/4,539,882 B: 4,675,125/4,583,430
14	179	580	59,6	56,2					21917/24187	A: 4,883,479/4,876,645 B: 5,422,771/5,382,773
					41014740	35346574	1742	92,2		
	180	163	26,1	24,7					24861/20088	A: 5,513,687/ 5,501,106 B: 4,472,431/4,440,392
	181	29,7	25,6	33,5					21749/23742	A: 4,868,090/4,831,087 B: 5,323,754/5,258,113
15	182	29,5	10,5	11,8	42922828	34601212	1853	89,4	12947/19066	A: 2,898,412/2,865,719 B: 4,280,293/4,196,015
	183	323	45,7	30,1					23560/20044	A: 5,299,422/5,217,196 B: 4,536,804/4,431,060
16	184	111	9,04	5,99					17527/11804	A: 3,861,313/3,875,399 B: 2,614,979/2,619,972
					24025738	22842270	987	96,35		
	185	61,7	5,83	3,39					12713/7322	A: 2,801,684/2,804,305 B: 1,626,833/1,629,312
17	186	255	21,5	27	41902920	33078616	1813	87,98	19862/21764	A: 4,440,627/4,446,722 B: 4,930,434/4,887,109

Tab. 6: Verifizierte Varianten der HL-Patienten (Amplikon-basiertes Verfahren), die mittels Sanger-Sequenzierung und NGS (Kapa-Fragment-Kit) überprüft wurden. VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

konventionelle Sanger-Sequenzierung (mikrodissektierte HRS-Zellen)

Fall-Nr.	Gen	Variante	Chr.	Koordinate [hg19]	VAF [%]	Lesetiefe	Art der Aberration	Aminosäure-Austausch
160	B2M	c.37_38del	15	45003780	7,19	18808	frameshift-deletion	p.L13fs
	CSF2RB	c.2368A>T	22	37334218	4,48	4178	stop	p.K790*
	SOCS1	c.15_22del	16	11349323	2,95	15208	inframe-deletion	p.AH5if
	TNFAIP3	c.600C>A	6	138196938	2,42	32546	stop	p.C200*

Kapa-Fragment-Kit (Ganzschnitt)

Fall-Nr.	Gen	Variante	Chr.	Koordinate [hg19]	VAF FK [%]	Lesetiefe	Art der Aberration	Aminosäure-Austausch
150	SOCS1	c.349_360del	16	11348975	2,2	5379	inframe-deletion	p.VKMA116if
157	BCL7A	c.199_209T>C	12	122460059	2,18	3848	missense	p.VMAA66AMAA
171	ITPR3	c.2211C>T	6	33638124	2/5	25.472	missense	p.R737C
174	EGR1	c.1311del	5	137803448	1,7/0,7	14100	frameshift-deletion	p.S437fs

Tab. 7: Laufcharakteristika des *hybrid-capture*-basierten Verfahrens der FFPE-Gewebe der Non-HL-Patienten. PF: Passing Filter

Lauf	Fall Nr.	reads	reads (PF)	Cluster Dichte [K/mm ²]	Q30 (%)
1	49;13;62;68;67;48;11;47;66;16;17;7	20,555,848	19,365,470	1068	95,23

Lauf	Fall Nr.	reads	reads (PF)	Cluster Dichte [K/mm ²]	Q30 (%)
7	72;84;43;45;44;63;64;83;57;26;77;65	34,257,860	31,094,642	1416	94,95

2	21;14;36;15;69;70 20;51;50;53;19;52	27,897,124	25,897,124	1127	96,69
3	54;55;23;37;38 22;24;39;71;40	25,882,658	24,546,624	1067	96,07
4	85;86;89;41;1;74 2;3;75;4;42;76	30,234,360	28,059,852	1264	94,86
5	61;73	34,468,052	31,388,764	1455	95,17
5	61;73	34,468,052	31,388,764	1455	95,17
6	35;60	34,619,604	31,713,214	1440	94,02

8	94;27;82;28;95	32,833,004	30,035,252	1369	95,21
9	25;56;78;86;87;93	30,544,832	28,297,636	1269	94,35
10	90;79;29;58;80;30	25,520,698	24,133,220	1055	95,69
11	5;31;92;8;6	32,930,568	30,273,854	1360	94,69
12	46	36,171,664	32,329,072	1523	93,5
13	91;12;33;18;59;34	34,516,196	31,450,672	1441	94,75

Tab. 8: Patientendaten, Bibliotheken- und Laufcharakteristika der FFPE-Gewebe-Proben der Non-HL-Patienten, die mittels *hybrid-capture*-basierter Methode untersucht wurden (FL: Follikuläre Lymphome, DLBCL: Diffus großzellige Lymphome, BL: Burkitt Lymphome, B-CLL: B-chronische lymphatische Leukämie, MCL: Mantelzell-Lymphome, MM: Multiple Myelome, MZL: Marginalzonen-Lymphom)

Fall Nr.	Subtyp	Ausgangskonz. der DNA [ng/μl]	Bibliothekenkonz. [μg/ml]	Target Abdeckung	100 fache-Abdeckung der Targets [%]	Uniformität [%]	Generierte Sequenzen	Anreicherung [%]	abgedeckten Basen aus <i>uniquen</i> Sequenzen [%]
1	B-CLL	280,8	84,1	796,4	98	97	2926571	69,27	53,46
2	B-CLL	98,6	79,6	594,3	97	96	2111108	72,8	58,17
3	B-CLL	71,6	79,9	484,4	96	96,6	1806396	69,06	54,08
4	B-CLL	60,9	74	860,4	98	97	2969573	72,52	57,22
5	B-CLL	3,06	55,5	904,3	98	96	3001215	74,9	58,68
6	B-CLL	79,3	25,9	879,6	99	97,7	2944934	74,59	58,53
7	BL	123	58,2	474	96	96	1623768	74,88	58,87
8	BL	267	40,9	516,4	98	97,7	1866795	71,18	55,61
9	BL	12,2	75,6	607,9	97	98	2636310	58,81	46,59
10	BL	19,7	48,4	166,3	98	96,5	1035610	44,19	35
11	BL	77,6	72,7	564	97	96	1903460	76	54,8
12	BL	158	52,1	349	95	96	908791	78,87	63,33
13	DLBCL	379	59,7	1337	99	97	4763381	79	56,7
14	DLBCL	301	64	396	96	97,5	1790285	56,67	43,52

Anhang

15	DLBCL	94,5	52,3	729	94	96	3192738	58,21	44,93
16	DLBCL	164,4	76,2	726	98	96	2349671	78,1	61,45
17	DLBCL	17,7	82,4	871	95	93,6	2752418	78,79	61,1
18	DLBCL	46,4	8	849	98	97	2155891	80,44	61,79
19	DLBCL	96,9	74,5	723	96	97,7	3102039	59,25	46,2
20	DLBCL	54,7	67,3	921	95	98	2344885	60,16	46,44
21	DLBCL	75,6	77,3	430	95	97,7	1809810	60,44	47,23
22	DLBCL	120	68,5	687	94	97,7	2313931	75,74	58,6
23	DLBCL	120	62,4	348	95	96,9	1259947	72,72	55,7
24	DLBCL	208	61,4	252	98	97	861928	78,51	60,04
25	DLBCL	268	88,4	792	99	95	2488006	81	62,75
26	DLBCL	234	42,8	627	97	96	2240558	72,53	56,34
27	DLBCL	387	77,4	478,5	93	93	1675346	74,79	56,78
28	DLBCL	53,9	85,2	1046,3	99	97,5	2689487	77,56	59,78
29	DLBCL	12,2	85,8	907,6	98	97	2904620	78,04	60,76
30	DLBCL	110	48,1	836,8	98	97	2742981	77,1	60,32
31	DLBCL	96	58	422,4	98	98	1564238	69,26	53,22
32	DLBCL	419	51,7	343,3	97	97,8	1931231	47,14	36,99
33	DLBCL	30,2	78,5	975	98	97	2481720	78,53	59,83
34	DLBCL	220	47,3	321	96	97,7	847587	74,84	56,52
35	DLBCL	30,4	87,1	1157	99	97,5	3620476	80,2	62,5

Anhang

36	DLBCL	26,1	52	1025	98	96,5	3300866	79	60,4
37	DLBCL	31,5	64,3	413	94	96	1430256	76	61,23
38	DLBCL	37,9	79,9	619	80,75	83	2013903	76	53,2
39	DLBCL	34,7	71	822	97	98	2708036	76	48,91
40	DLBCL	92,3	63,8	733	97	96	2576772	56	60,4
41	DLBCL	88,8	100	335	95	97	1103345	79	60,12
42	DLBCL	47,7	89,3	474	98	97,8	1609913	74	58,45
43	DLBCL	272	72,4	736	97	96	2551234	71	60,3
44	DLBCL	270	53,1	831	98	96	2681923	76	61,78
45	DLBCL	100	74	758,5	99	98	2818479	70,29	52,97
46	DLBCL	12,2	61,3	1173,4	99	98	4013119	72,62	57,65
47	FL	377	65,6	491	96	96	1712957	74,01	57
48	FL	405	38,7	153	78	95,5	617769	66,76	51,19
49	FL	317,5	46,3	206	93	98,6	867725	62,94	45,98
50	FL	50,8	71,1	835	95	96	3511994	60,64	46,96
51	FL	37,8	67,1	837	98	97	3503443	60,4	47,42
52	FL	74,1	71,9	929	99	98	3811243	62,16	47,97
53	FL	86,7	64,9	744	97	97,5	3110661	60,3	47,44
54	FL	229,5	50,8	972	99	97,6	3230457	75,37	58,8
55	FL	342,3	67,9	1144	98	96	3845135	75,78	58,03
56	FL	423	64,8	359,2	98	97	1282707	73,48	57,08

Anhang

57	FL	293	53,6	604,8	97	99	2203505	70,3	54,82
58	FL	90,8	50,6	862,3	98	97	2802748	77,04	60,87
59	FL	203	40,1	902	99	97,7	2267716	77,43	60,28
60	FL	149	12,7	101	43	97,6	351392	79,5	65,5
61	FL	29,5	67,9	362	97	98	1186696	78	61
62	FL	198,6	30,8	393	98	98	1501368	68,61	52,12
63	FL	102	62,6	501	97	96,6	1700204	76	57,34
64	FL	134	46,5	276	94	93	1119117	63	53,2
65	FL	176	94,8	579	97	96,75	1878490	77	51,45
66	MCL	611	76	693	97	95	2214425	76,78	61,55
67	MCL	499,2	61,4	333	94	96	1209609	70,98	54,37
68	MCL	138	56,3	574	97	96,6	2022350	71,73	53,35
69	MCL	40,3	49,4	681	97	98	1742828	59,35	45,01
70	MCL	97,6	51,9	593	96	97	2635659	57,86	44,61
71	MCL	324	69,8	1479	97	97	4491037	80,45	64,34
72	MCL	48,6	84,4	963	98	96	3306846	73,51	59
73	MCL	155	59,7	199	88	97,4	674820	76	60
74	MM	112	88	681,3	97	98	2506906	70,77	54,08
75	MM	239	69,6	316,1	91	94	1210363	67,69	53,22
76	MM	6,51	86,6	614,7	97	96	2253613	70,18	52,98
77	MM	30,5	72,4	167,7	82	96,8	756560	65,53	52,69

78	MM	3,66	62	523,9	99	98,7	1895780	69,99	53,87
79	MM	160	45,5	532,7	96	96	1841508	74,97	57,28
80	MM	3,93	62,7	612,8	98	97	2005676	76,82	60,47
81	MM	24,2	76,3	839,2	98	97	3698860	57,32	44,79
82	MM	108	55,2	383	92	97,1	1343869	76	51,23
83	FL	513	39,7	305,9	98	97	1249491	66,39	51,3
84	MZL (MALT)	33,3	71,5	1294	99	97	4279481	75,88	59,7
85	MZL (MALT)	85,3	70,1	881,2	98	96,8	3014417	72,98	57,62
86	MZL (MALT)	183	69,3	807,5	98	97	2892300	70,61	54,68
87	MZL (MALT)	19,5	79,7	806	97	95,5	2812724	72,8	56,73
88	MZL (MALT)	119	76	730	98	97	2264599	79	54,4
89	MZL (MALT)	256,1	59,1	639,2	97	96	2402877	68,74	54,68
90	MZL (MALT)	414	61,2	783	98	96,8	2506635	78	60,4
91	MZL (MALT)	567	93,6	931	98	96,7	2328913	77,81	61,32
92	BL	91	60	716,4	98	97	2410612	74,06	58,58
93	MM	16,9	63,9	700	99	96,5	2288752	78	59,54
94	FL	319	70,9	309,8	98	97	1105950	74,75	56,91
95	FL	269	77	306,3	98	97	1091545	76,04	59,45

Tab. 9: Identifizierte Varianten, die in den Non-HL durch Untersuchungen von gDNAs aus FFPE-Gewebe mittels *hybrid-capture* Methode detektiert wurden. VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

Fall-Nr.	Gen	Variante	Chr.	Koordinate [hg19]	VAF [%]	Lesetiefe	Art der Abberation	Aminosäure-Austausch
1	EXOSC1	c.439C>T	10	99196990	46,5	1236	missense	p.A147T
	KMT2D	c.13639del	12	49424707	29,6	850	frameshift-deletion	p.A4547fs
	KMT2D	c.2603del	12	49444862	19,9	231	frameshift-deletion	p.P868fs
	KMT2D	c.2602G>C	12	49444864	19,8	232	missense	p.P868A
	CREBBP	c.4337C>T	16	3788617	61,3	790	missense	p.R1446H
	SMARCA4	c.3580G>A	19	11143999	27,1	669	missense	p.G1194R
2	BRAF	c.1742T>C	7	140453193	35,6	753	missense	p.N581S
3	KMT2D	c.11222_11223 insTGC	12	49427265	34,9	269	inframe-insertion	p.Q3741QQ
	POU2F2	c.1038G>C	19	42599531	13,8	240	missense	p.C346W
4	SF3B1	c.2098T>C	2	198266834	19,1	1354	missense	p.K700E
	POT1	c.114G>C	7	124532330	39,5	605	missense	p.S38R
	CCT6B	c.805C>A	17	33269583	42,7	625	missense	p.D269Y
5	NCOR2	c.3542G>A	12	124839071	49	590	missense	p.P1181L
	DDX3X	c.342-1del	X	41204430	90,5	337	Spleißacceptor	
	ARID1A	c.247_249del	1	27023140	10,9	55	inframe-deletion	p.G83if
7	GNA13	c.179C>T	17	63052533	39,6	202	missense	p.G60D
	SMARCA4	c.3694G>A	19	11144113	24,6	342	missense	p.G1232S
	DDX3X	c.71C>A	X	41196686	37,9	198	stop	p.S24*
92	SPEN	c.5584G>A	1	16258319	31,2	913	missense	p.A1862T

	SPEN	c.7529C>T	1	16260264	47,1	556	missense	p.A2510V
	TBL1XR1	c.1177C>T	3	176752059	29,9	622	missense	p.E393K
	MYC	c.150G>C	8	128750613	32,7	297	missense	p.Q50H
	MYC	c.158G>C	8	128750621	33,3	255	missense	p.S53T
	GNA13	c.931C>A	17	63010578	11,4	851	stop	p.E311*
8	ID3	c.166G>A	1	23885752	42,5	473	missense	p.P56S
	KMT2C	c.8831G>T	7	151873707	49,4	619	missense	p.P2944Q
	TP53	c.584A>G	17	7578265	44,9	430	missense	p.I195T
9	ID3	c.218A>T	1	23885700	33,9	763	missense	p.V73D
	ID3	c.214G>C	1	23885704	34,1	771	missense	p.R72G
	ID3	c.166G>T	1	23885752	37,4	792	missense	p.P56T
	EZH2	c.1936A>G	7	148508728	34,6	856	missense	p.Y646H
	EZH2	c.1924A>T	7	148508740	35,6	893	missense	p.F642I
	MYC	c.55A>G	8	128750518	51,6	827	missense	p.N19D
	SMARCA4	c.2747A>T	19	11132531	36,3	537	missense	p.N916I
	KLF2	c.346C>T	19	16436297	49,3	144	missense	p.P116S
	DDX3X	c.894C>A	X	41203521	73,8	390	stop	p.C298*
10	ID3	c.233_241del	1	23885676	19,2	239	inframe-deletion	p.LDLQ78_81Q
	NOTCH2	c.7223A>T	1	120458122	50,6	89	missense	p.L2408H
	MYC	c.10T>C	8	128748849	37,8	283	missense	p.F4L
	DDX3X	c.451_452del	X	41201996	55,6	133	frameshift-deletion	p.F151fs

	MYD88	c.798T>C	3	38182641	64,7	836	missense	p.*266R
	TBL1XR1	c.1184T>C	3	176752052	70,1	835	missense	p.Y395C
	PIM1	c.356G>A	6	37138549	33,2	211	missense	p.G119D
	PIM1	c.564C>G	6	37138951	44,6	294	missense	p.S188R
11	MYC	c.791G>A	8	128751254	28,7	244	missense	p.S264N
	KMT2D	c.11954A>C	12	49426534	47,4	700	missense	p.L3985R
	BTG1	c.250C>G	12	92538122	20,3	1003	missense	p.A84P
	BTG1	c.136C>T	12	92539176	21,6	291	missense	p.E46K
	SMARCA4	c.37C>T	19	11094864	28,6	398	missense	p.R13W
	MYC	c.150G>T	8	128750613	63,6	99	missense	p.Q50H
	MYC	c.176C>T	8	128750639	57,5	73	missense	p.A59V
12	MYC	c.214C>T	8	128750677	59	78	missense	p.P72S
	CREBBP	c.2614T>C	16	3820837	45,5	343	missense	p.T872A
	TP53	c.743C>T	17	7577538	51,4	393	missense	p.R248Q
	TP53	c.524C>T	17	7578406	43,5	216	missense	p.R175H
13	PTEN	c.235G>A	10	89690828	37,6	338	missense	p.A79T
	CREBBP	c.4337C>A	16	3788617	14,3	343	missense	p.R1446L
	SPEN	c.507+1T>G	1	16245548	33,7	350	Spleißdonor	
14	ID3	c.65A>G	1	23885853	49,6	387	missense	p.L22P
	NOTCH2	c.6223C>T	1	120459122	47,5	499	missense	p.V2075M
	EZH2	c.1937T>A	7	148508727	35,7	470	missense	p.Y646F

	KMT2D	c.2269C>A	12	49445197	29,4	235	stop	p.E757*
	RB1	c.46+1G>A	13	48878186	52,7	165	Spleißdonor	
	CREBBP	c.1084+2A>T	16	3817719	41,2	257	Spleißdonor	
	TP53	c.421A>G	17	7578509	33,5	167	missense	p.C141R
	MEF2B	c.86+2A>T	19	19260033	31,1	148	Spleißdonor	
	BIRC3	c.1000G>A	11	102198829	46,4	1103	missense	p.V334I
15	KMT2D	c.10395_10396 del	12	49428409	26,9	1038	frameshift-deletion	p.P3465fs
	KMT2D	c.3290_3312del	12	49444058	17,3	556	frameshift-deletion	p.A1105fs
	CREBBP	c.4507A>C	16	3786704	29,6	560	missense	p.Y1503D
	SF3B1	c.2578C>T	2	198265579	42,8	1515	missense	p.E860K
16	BCL6	c.1760G>T	3	187443366	40,4	948	missense	p.A587D
	TP53	c.536T>C	17	7578394	70,3	172	missense	p.H179R
	GNA13	c.308TC>T	17	63049821	86,8	1326	frameshift-deletion	p.R103fs
	SPEN	c.7529C>T	1	16260264	48,5	752	missense	p.A2510V
	ARID1A	c.3002_3003insCG	1	27094294	93,4	286	frameshift-insertion	p.S1001fs
17	MYC	c.134A>G	8	128750597	50,9	324	missense	p.N45S
	MYC	c.807G>C	8	128752646	51,1	984	missense	p.E269D
	TP53	c.524C>T	17	7578406	93,8	194	missense	p.R175H
	TNFRSF14	c.77A>G	1	2489172	65,7	469	missense	p.Y26C
18	TNFRSF14	c.166A>G	1	2489261	71,5	520	missense	p.K56E
	KLHL6	c.268G>A	3	183273174	37,4	840	missense	p.L90F

Anhang

	CD83	c.247G>A	6	14131844	45,6	384	missense	p.D83N
	CARD11	c.343A>T	7	2985467	39	1386	missense	p.F115H
	KMT2C	c.8497C>T	7	151874041	39	1291	missense	p.V2833M
	ARID1A	c.1289+2T>C	1	27099989	13	839	Spleißdonor	
	KMT2D	c.3480+1C>A	12	49428364	32	971	Spleißdonor	
19	CREBBP	c.6624T>G	16	3778424	45	449	missense	p.Q2208H
	IRF8	c.250T>C	16	85942671	32,5	1042	missense	p.C84R
	TP53	c.742G>A	17	7577539	27,6	764	missense	p.R248W
	BCL2	c.179G>A	18	60985721	20,4	162	missense	p.A60V
	SPEN	c.7194T>A	1	16259929	24,1	1081	stop	p.C2398*
	CD58	c.561del	1	117078653	23,2	1055	frameshift-deletion	p.C187fs
	EZH2	c.1936A>T	7	148508728	12,1	1319	missense	p.Y646N
20	CREBBP	c.705+1C>T	16	3828011	13,3	339	Spleißdonor	
	TP53	c.524C>T	17	7578406	23,8	341	missense	p.R175H
	BCL2	c.495C>A	18	60985405	10,5	1179	missense	p.E165D
	BCL2	c.98C>G	18	60985802	12	806	missense	p.G33A
	TNFRSF14	c.289C>T	1	2489892	51	447	stop	p.Q97*
	SPEN	c.8267C>G	1	16261002	75,9	560	missense	p.T2756R
21	KMT2C	c.10763G>A	7	151859899	20,2	435	missense	p.S3588L
	CREBBP	c.1819T>A	16	3830737	24,2	351	stop	p.K607*
	BCL2	c.546G>C	18	60985354	27,4	529	missense	p.N182K

	BCL2	c.230G>A	18	60985670	42,9	70	missense	p.A77V
	BCL2	c.182G>A	18	60985718	33,3	87	missense	p.A61V
	BCL2	c.175G>C	18	60985725	30,3	109	missense	p.P59A
	EZH2	c.1937T>G	7	148508727	42	578	missense	p.Y646S
	NOTCH1	c.4307G>A	9	139400041	45,4	302	missense	p.A1436V
	ATM	c.1578A>C	11	108121770	24,6	419	missense	p.L526F
	KMT2D	c.15825_15826 insC	12	49418688	33,3	504	frameshift-insertion	p.R5275fs
	STAT6	c.1255C>T	12	57496662	42,5	579	missense	p.D419N
	CREBBP	c.3623_3624insTG	16	3807363	22,5	306	frameshift-insertion	p.P1208fs
22	CREBBP	c.1101A>T	16	3843502	24,5	245	stop	p.C367*
	SOCS1	c.514_526del	16	11348809	10,7	84	frameshift-deletion	p.E176fs
	SOCS1	c.512A>G	16	11348824	12,3	73	missense	p.V171A
	SOCS1	c.424_441del	16	11348894	20	150	inframe-deletion	p.ESFDCL148fs
	S1PR2	c.790A>T	19	10334792	36	222	missense	p.C264S
	KLF2	c.652G>A	19	16436603	27,5	51	missense	p.A218T
	EP300	c.4192C>T	22	41565526	26,5	351	missense	p.L1398F
23	ARID1A	c.114_116del	1	27023007	11,8	34	inframe-deletion	p.EA38E
	TNF	c.478G>A	6	31545090	46,8	532	missense	p.A160T
	ID3	c.100+1C>A	1	23885617	20,1	224	Spleißdonor	
24	ARID1A	c.178_188del	1	27023071	50	10	frameshift-deletion	p.E59fs
	PIM1	c.850C>T	6	37139237	24,8	137	missense	p.L284F

	TNFAIP3	c.504G>A	6	138196842	25,8	252	stop	p.W168*
	SOCS1	c.484G>C	16	11348852	24,5	53	missense	p.L162V
	SOCS1	c.73G>T	16	11349263	25,6	129	missense	p.P25T
	SOCS1	c.49C>G	16	11349287	25,7	175	missense	p.A17P
	IRF8	c.292C>T	16	85942713	49,4	360	missense	p.R98W
	GNA13	c.527T>C	17	63014405	20,5	259	missense	p.Y176C
	BCL6	c.1894A>G	3	187442812	20,5	278	missense	p.C632R
25	IRF8	c.800C>T	16	85952221	44,5	348	missense	p.T267M
	MYD88	c.818T>C	3	38182641	77,2	697	missense	p.L273P
26	PRDM1	c.1938_1939insCA	6	106554821	56,7	379	frameshift-insertion	p.L646fs
	TP53	c.261+1C>A	17	7577497	59,1	369	Spleißdonor	
	ARID1A	c.1239+1G>T	1	27099479	44,7	474	Spleißdonor	
	ARID1A	c.5542G>T	1	27105931	51,4	440	missense	p.G1848W
	KMT2D	c.6229G>A	12	49435443	45	291	stop	p.Q2077*
27	PTPN11	c.1658C>T	12	112940006	45,2	531	missense	p.T553M
	CREBBP	c.3187_3203del	16	3817767	31,1	412	frameshift-deletion	p.N1068fs
	CREBBP	c.3179T>G	16	3817792	35,1	447	missense	p.K1060T
	IRF8	c.1272del	16	85954878	38,3	446	frameshift-deletion	p.I424fs
	TP53	c.524C>T	17	7578406	84,5	103	missense	p.R175H
28	ARID1A	c.4806C>A	1	27101524	46,4	1240	missense	p.S1602R
	MYD88	c.818T>C	3	38182641	35,4	1221	missense	p.L273P

TBL1XR1	c.1109T>C	3	176755899	33,2	1111	missense	p.D370G
IRF4	c.178C>T	6	393330	35,7	1064	stop	p.Q60*
PIM1	c.328G>A	6	37138406	34,9	1008	missense	p.D110N
PIM1	c.345G>C	6	37138423	35,3	921	missense	p.K115N
PIM1	c.119+1C>G	6	37138545	33,7	775	Spleißdonor	
PIM1	c.356G>T	6	37138549	33,1	783	missense	p.G119V
PIM1	c.563G>C	6	37138950	31,4	832	missense	p.S188T
PIM1	c.676G>A	6	37139063	33,2	823	missense	p.E226K
PTEN	c.49C>T	10	89624275	50,8	2109	stop	p.Q17*
ATM	c.4468A>G	11	108163377	48,5	1126	missense	p.S1490G
KMT2D	c.12008_12017 del	12	49426470	24,4	1000	frameshift-deletion	p.Q4007fs
KMT2D	c.59-1C>T	12	49448535	35,5	625	Spleißacceptor	
BTG1	c.380G>T	12	92537992	32	1189	missense	p.A127D
CD79B	c.589A>G	17	62006799	34,3	1029	missense	p.Y197H
BCL2	c.392G>A	18	60985508	18,5	1852	missense	p.A131V
MEF2B,ME F2BNB- MEF2B	c.158C>T	19	19260135	26	1384	missense	p.R53H
ITPKB	c.794G>A	1	226924366	22,6	605	missense	p.P265L
ITPKB	c.622G>A	1	226924538	25,8	458	stop	p.Q208*
ITPKB	c.548C>G	1	226924612	21,4	309	missense	p.S183T
DUSP2	c.268C>A	2	96810826	29,2	154	missense	p.V90L

MYD88	c.818T>C	3	38182641	24,5	1155	missense	p.L273P
TBL1XR1	c.1382G>T	3	176750793	54,9	966	missense	p.S461Y
IRF4	c.208C>G	6	393360	23,5	503	missense	p.L70V
PIM1	c.277C>T	6	37138355	24,4	1136	missense	p.L93F
PIM1	c.72G>C	6	37138423	28	681	missense	p.K24N
PIM1	c.89+1G>C	6	37138440	21,7	567	Spleißdonor	
PIM1	c.111G>C	6	37138577	32,5	895	missense	p.Q37H
PIM1	c.184C>G	6	37138649	26,1	964	missense	p.N61K
PIM1	c.347+1C>T	6	37138812	24,3	791	Spleißdonor	
PIM1	c.288G>T	6	37138946	22,3	579	missense	p.V96L
PIM1	c.285C>G	6	37138951	22,1	583	missense	p.S97R
PIM1	c.597_713del	6	37138983	10,7	588	inframe-deletion	p.DWFERPDSFVLI LERPEPVQDLDFDI TERGALQEELARS F199D
PIM1	c.339C>T	6	37138997	30,7	553	missense	p.P113S
PIM1	c.453G>A	6	37139111	31,6	614	missense	p.V151M
PIM1	c.552C>T	6	37139210	24	654	missense	p.184L/F
PRDM1	c.229G>C	6	106536262	31,7	489	missense	p.V77L
CARD11	c.1081A>C	7	2977603	25,4	1143	missense	p.Y361D
PTEN	c.716T>G	10	89717691	38,2	764	missense	p.M239R
ATM	c.5262G>T	11	108172459	50,6	1017	missense	p.K1754N
BTG1	c.370G>T	12	92538002	26,7	905	missense	p.L124M

Anhang

	BTG1	c.208T>C	12	92538164	23,9	1249	missense	p.I70V
	BTG1	c.201G>C	12	92538171	26	1240	stop	p.Y67*
	SOCS1	c.197C>T	16	11349139	32,1	271	missense	p.R66H
	SOCS1	c.8G>A	16	11349328	22,9	415	missense	p.A3V
	CD79B	c.590T>C	17	62006798	25,5	1141	missense	p.Y196C
	EP300	c.4351C>T	22	41566474	23,8	1095	missense	p.H1451Y
30	RB1	c.2515T>C	13	49047521	46,1	558	missense	p.F839L
	CD58	c.210+2ins	1	117078585	25,7	257	Spleißdonor	
31	PRDM1	c.1877C>T	6	106554349	24,4	476	missense	p.T626M
	NOTCH1	c.7541_7542del	9	139390648	37,8	238	frameshift-deletion	p.P2514fs
32	SPEN	c.10391G>C	1	16264022	59,6	396	missense	p.G3464A
	ITPKB	c.1454G>A	1	226923706	57,3	1391	missense	p.A485V
	ITPKB	c.892C>G	1	226924268	23,3	1410	missense	p.A298P
	ITPKB	c.755G>A	1	226924405	22,7	779	missense	p.S252F
	ITPKB	c.306C>T	1	226924853	19,9	594	stop	p.W103*
33	DUSP2	c.623C>T	2	96810000	33	1452	missense	p.S208N
	DUSP2	c.454G>A	2	96810556	30,4	964	missense	p.P152S
	DUSP2	c.419G>A	2	96810591	30,2	912	missense	p.P140L
	CD83	c.32G>A	6	14118074	31,1	473	missense	p.S11N
	PIM1	c.272G>A	6	37138350	32,7	1388	missense	non coding area
	PIM1	c.174G>A	6	37138638	25,1	1108	missense	p.V58I

	PIM1	c.360_361del	6	37139020	26,1	842	frameshift-deletion	p.L120fs
	SGK1	c.198_207del	6	134495164	20,8	601	frameshift-deletion	p.P66_69fs
	SGK1	c.144G>A	6	134495658	46,8	530	missense	p.A48V
	MYC	c.757_766del	8	128751214	24,3	592	frameshift-deletion	p.EPLVLH253D
	SOCS1	c.289_294del	16	11349041	28	601	inframe_deletion	p.PV98-
	SOCS1	c.136G>C	16	11349200	30,2	96	missense	p.P46A
	CD79B	c.682C>T	17	62006597	35,7	926	missense	p.G227S
	GNA13	c.79G>A	17	63052633	34,6	1262	stop	p.Q27*
	KLF2	c.653C>T	19	16436604	37,5	48	missense	p.A218V
34	MYD88	c.752G>A	3	38182292	44	309	missense	p.S243N
	TBL1XR1	c.1097G>A	3	176755911	28,6	437	missense	p.S366F
	BCL6	c.2003C>T	3	187440364	28,4	324	missense	p.R668H
	CD70	c.66+1C>T	19	6590113	28,8	219	Spleißdonor	
35	MYD88	c.818T>C	3	38182641	32,8	1358	missense	p.L265P
	PIM1	c.75G>C	6	37138423	32,7	1118	missense	p.K25N
	PIM1	c.111G>C	6	37138577	33,1	1331	missense	p.Q37H
	PIM1	c.243C>T	6	37138901	32,8	874	missense	p.P81S
	PIM1	c.249G>A	6	37138908	33,9	876	missense	p.G83D
	PIM1	c.381C>T	6	37139039	35,1	984	stop	p.Q127*
	BTG1	c.168C>T	12	92538204	33,6	1418	stop	p.W56*
	BTG1	c.136C>T	12	92539174	36,9	756	missense	p.E46Q

	BTG1	c.98C>T	12	92539214	27,6	1097	missense	p.S33N
	BTG1	c.33C>T	12	92539279	24,4	814	missense	p.M11I
	CCT6B	c.703C>T	17	33269837	45,5	910	missense	p.V235I
	ACTG1	c.38C>G	17	79479343	28,8	1406	missense	p.G13A
	SALL3	c.1130T>C	18	76753121	49,9	1317	missense	p.L377P
	CD70	c.247G>A	19	6586366	32,9	805	missense	p.R83C
	MED12	c.34C>T	X	70338638	25	1014	missense	p.R12W
36	SPEN	c.971C>A	1	16235905	12,1	1584	stop	p.S324*
	CDKN2A	c.172G>A	9	21971186	15,7	338	stop	p.R58*
	SOCS1	c.289G>C	16	11349047	13,2	508	missense	p.P97A
	CD70	c.487G>A	19	6586126	16,1	739	stop	p.R163*
37	TMEM30A	c.63_72del	6	75994282	38,5	117	frameshift-deletion	p.T25fs
	ATM	c.7327C>T	11	108200960	34,6	651	stop	p.R2443*
	NCOR2	c.1236C>T	12	124911260	40,9	230	missense	p.M412I
	B2M	c.120del	15	45007672	45	404	frameshift-deletion	p.S40fs
	CREBBP	c.6593A>T	16	3778455	26,5	230	missense	p.L2198Q
	TP53	c.743C>T	17	7577538	58,5	429	missense	p.R248Q
	POU2F2	c.1042G>A	19	42599527	31	187	missense	p.R348W
38	KMT2C	c.4817G>A	7	151884538	47	149	missense	p.P1606L
	PTEN	c.610C>T	10	89711992	11,8	34	missense	p.P204S
	PTEN	c.685_686del	10	89717660	73,2	123	frameshift-deletion	p.S229Sfs

	TP53	c.646C>T	17	7578203	69,5	440	missense	p.V216M
	CDH2	c.569T>G	18	25589814	8,1	370	missense	p.N190T
	EP300	c.3610T>G	22	41556665	44	505	missense	p.C1204G
	MED12	c.6286_6288del	X	70361097	5,2	881	inframe_deletion	p.Q2096-
39	CD58	c.352_355del	1	117086941	23,6	165	frameshift-deletion	p.Y119fs
	CD58	c.3C>T	1	117113592	23,1	749	missense	p.N1fs
	ITPKB	c.1924G>A	1	226923236	25,6	902	missense	p.P642S
	ITPKB	c.271_273del	1	226924886	25,4	539	inframe_deletion	p.G91-
	ITPKB	c.251C>G	1	226924909	29,8	486	missense	p.S84T
	BCL6	c.1+1C>G	3	187463197	27,8	1535	Spleißdonor	
	IRF4	c.350A>T	6	394954	29,1	1185	missense	p.D117V
	PIM1	c.816G>C	6	37139203	30,4	877	missense	p.E272D
	MYC	c.1085C>T	8	128752924	47,4	1207	missense	p.S362F
	CD70	c.569C>T	19	6586044	44,4	331	stop	p.W190*
	SPEN	c.2014C>T	1	16254749	40,8	439	stop	p.R672*
	CARD11	c.1191T>G	7	2976821	15,3	405	missense	p.L397F
	MYC	c.218C>G	8	128750681	22,8	79	missense	p.T73M
40	MYC	c.357G>C	8	128750820	13,8	377	missense	p.E119D
	CDKN2A	c.387G>T	9	21970971	52,2	316	stop	p.Y129*
	KLF2	c.154_167del	19	16436104	12,1	140	frameshift-deletion	p.M51fs
	KLF2	c.821_832del	19	16436771	14,8	284	inframe-deletion	p.CSYAG273C

Anhang

	KLF2	c.880C>T	19	16436831	23,7	241	missense	p.R294C
	EP300	c.6406A>G	22	41574121	50,5	210	missense	p.M2136V
	NOTCH1	c.6615_6808del	9	139391382	13,8	268	frameshift-deletion	p.P2270fs
41	KMT2D	c.2789+1C>T	12	49433004	35,5	327	Spleißdonor	
	RB1	c.1862G>A	13	49030387	31,8	462	missense	p.R621H
	EZH2	c.1937T>A	7	148508727	14,3	477	missense	p.Y646F
	STAT6	c.1256T>C	12	57496661	18,8	787	missense	p.D419G
	MAP2K1	c.383G>A	15	66729175	17	575	missense	p.G128D
	CREBBP	c.6785C>T	16	3778263	28	550	missense	p.G2262D
	CREBBP	c.4508T>A	16	3786703	32,2	522	missense	p.Y1503F
42	IRF8	c.272A>C	16	85942693	19,4	707	missense	p.D91A
	CCT6B	c.1300G>A	17	33259433	54,6	339	missense	p.R434C
	BCL2	c.354C>G	18	60985546	16,5	407	missense	p.Q118H
	BCL2	c.11G>A	18	60985889	14,3	490	missense	p.A4V
	S1PR2	c.625A>C	19	10334957	8,7	483	missense	p.Y209D
	PIM1	c.561G>C	6	37138949	5	439	missense	p.V187L
	TNFRSF14	c.136G>A	1	2489231	30	434	missense	p.E46K
	SPEN	c.2396C>T	1	16255131	28,3	1007	missense	p.P799L
43	SPEN	c.5365C>T	1	16258100	33,2	975	stop	p.Q1789*
	NOTCH2	c.7198G>A	1	120458147	13	1161	stop	p.R2400*
	TNFAIP3	c.401_402del	6	138196086	15,6	1024	frameshift-deletion	p.D134fs

	TNFAIP3	c.465_466del	6	138196150	14,4	604	frameshift-deletion	p.T155fs
	CREBBP	c.3588_3589insCA	16	3807830	10,3	1054	frameshift-insertion	p.G1197fs
44	DUSP2	c.460T>C	2	96810550	4,6	885	missense	p.T154A
	KLF2	c.863A>G	19	16436814	3,9	1013	missense	p.H288R
	SPEN	c.3166A>G	1	16255901	46	771	missense	p.R1056G
	TBL1XR1	c.1339T>G	3	176750836	12,4	1175	missense	p.S447R
	FGFR3	c.2207C>T	4	1808588	50,3	604	missense	p.A736V
	B2M	c.2T>A	15	45003746	34,7	522	initiator-codon	p.M1K
	CARD11	c.548A>T	7	2983982	13,4	827	missense	p.M183K
45	CARD11	c.445G>A	7	2984085	13,4	643	missense	p.R149C
	CARD11	c.356A>G	7	2985455	16,7	843	missense	p.V119A
	CREBBP	c.4462G>T	16	3786749	19,7	736	missense	p.P1488T
	CREBBP	c.1537G>A	16	3832721	17,2	429	stop	p.Q513*
	EZH2	c.1937T>A	7	148508727	14,2	1077	missense	p.Y646F
	ITPKB	c.484G>C	1	226924676	17,4	579	missense	p.Q162E
	KMT2D	c.16342G>A	12	49416133	21,6	464	stop	p.R5448*
	KMT2D	c.15256G>A	12	49420493	17,8	690	stop	p.R5086*
	MEF2B,MEF2B	c.341C>T	19	19258559	44,5	454	missense	p.R114Q
	TNFAIP3	c.2282G>A	6	138202365	40,6	559	missense	p.R761H
	TNFRSF14	c.247T>G	1	2489850	36	698	missense	p.Y83D

	ATP6AP1	c.294T>C	X	153657465	67	909	missense	p.L78S
	BCL2	c.487T>C	18	60985413	32	496	missense	p.N163D
	BCL2	c.175G>C	18	60985725	27	68	missense	p.P59A
	BCL2	c.98C>T	18	60985802	26	239	missense	p.G33E
	BCL2	c.57T>A	18	60985845	20	1236	missense	p.Y19F
	BCL2	c.17C>G	18	60985883	17	199	missense	p.R6T
	CREBBP	c.4711A>T	16	3786704	30	1195	missense	p.Y1503N
	IRF8	c.165T>G	16	85936784	35	831	missense	p.S55A
	KMT2D	c.12820_12821insAG	12	49425667	44	1618	frameshift-insertion	p.L4274fs
	LTB	c.207G>C	6	31549600	76	51	missense	p.Q67E
46	MED12	c.5910C>T	X	70357196	97	634	missense	p.A1904V
	MYC	c.219C>A	8	128750681	37	548	missense	p.T73N
	MYC	c.459T>G	8	128750920	38	1263	missense	p.F153V
	MYC	c.567T>A	8	128751028	39	1145	missense	p.S189T
	NCOR2	c.7465C>T	12	124811994	45	1453	missense	p.A2382T
	SOCS1	c.609A>T	16	11348729	35	547	missense	p.Y203N
	SOCS1	c.390A>G	16	11348947	33	1049	missense	p.F130S
	SOCS1	c.339A>T	16	11348999	29	1213	missense	p.F113I
	STAT6	c.1257T>C	12	57496661	23	2099	missense	p.D419G
	TP53	c.405A>C	17	7578527	43	234	missense	p.C135G
	TRAF3	c.354C>T	14	103342015	47	1193	missense	p.R118W

47	KMT2D	c.11833G>A	12	49426655	26,1	387	stop	p.Q3945*
	KMT2D	c.9820G>A	12	49431319	30,4	447	stop	p.Q3274*
	CREBBP	c.4862A>G	16	3781805	31,5	346	missense	p.L1621P
	CREBBP	c.4308A>T	16	3788646	29,1	509	missense	p.S1436R
48	ARID1A	c.695del	1	27023588	21,9	105	frameshift-deletion	p.S232fs
	KMT2D	c.13606G>A	12	49424741	31,9	188	stop	p.R4536*
	KMT2D	c.9961G>A	12	49431178	26,6	79	stop	p.R3321*
	CREBBP	c.4507A>T	16	3786704	33,8	157	missense	p.Y1503N
49	PIM1	c.365A>C	6	37138558	13,3	188	missense	p.K122T
	EZH2	c.1936A>T	7	148508728	17,5	297	missense	p.Y646N
	CREBBP	c.1966del	16	3828158	20,5	166	frameshift-deletion	p.E656fs
	BCL2	c.282G>C	18	60985617	28,1	64	missense	p.HL94HV
	BCL2	c.179G>T	18	60985721	26,4	53	missense	p.A60D
	MEF2B	c.10T>C	19	19261535	19,5	226	missense	p.K4E
50	KMT2D	c.4661_4662insGAC	12	49439879	33,4	926	frameshift-insertion	p.V1554fs
51	TNFRSF14	c.163C>T	1	2489258	29,1	695	missense	p.P55S
	EZH2	c.2075G>A	7	148506437	12,3	995	missense	p.A692V
	KMT2D	c.8727_8730del	12	49432408	12,4	524	frameshift-deletion	p.E2911fs
	KMT2D	c.7411G>A	12	49434142	26,1	119	stop	p.R2471*
	STAT6	c.1246C>G	12	57496671	22,1	997	missense	p.G416R
	CREBBP	c.4305A>T	16	3788649	12,9	638	missense	p.D1435E

	CREBBP	c.947del	16	3860631	13,8	797	frameshift-deletion	p.N316fs
	SOCS1	c.140G>A	16	11349196	12,6	199	missense	p.A47V
52	KMT2D	c.2975T>C	12	49444396	49,2	130	missense	p.D992G
	MED12	c.6339_6340insACAGCA ACACCAG	X	70361151	20,2	868	inframe-insertion	p.-2113QQHQ
53	TNFRSF14	c.103_138del	1	2489197	25	708	inframe-deletion	p.YAPALPSCKEDE 35-
	ITPKB	c.1411G>C	1	226923749	51,1	916	missense	p.P471A
	CREBBP	c.3718A>T	16	3801788	19,2	582	missense	p.C1240S
54	TNFRSF14	c.206_212del	1	2489808	24,5	717	frameshift-deletion	p.E69fs
	ARID1A	c.1682A>C	1	27057974	12,2	1062	missense	p.Q561P
	EZH2	c.1936A>T	7	148508728	13,6	1259	missense	p.Y646N
	CREBBP	c.2055T>A	16	3828070	13	615	missense	p.L685F
	CREBBP	c.2036A>T	16	3828089	13,3	622	stop	p.L679*
	CREBBP	c.648-2del	16	3828185	14,1	262	Spleißacceptor	
	IRF8	c.226G>T	16	85942647	12,1	1504	missense	p.A76S
	IRF8	c.1254del	16	85954860	13	1077	frameshift-deletion	p.F418fs
55	TNFRSF14	c.1A>C	1	2488104	43,4	175	initiator-codon	p.M1L
	SPEN	c.2429G>A	1	16255164	25,4	1546	missense	p.R810Q
	KLHL6	c.1190G>A	3	183212027	47,4	1196	missense	p.S397L
	FBXW7	c.1153T>G	4	153250907	20	1957	missense	p.T385P
	MEF2B,ME F2BNB- MEF2B	c.248T>A	19	19260045	22,6	403	missense	p.D83V

	LTB	c.94+1C>A	6	31549335	23,4	418	Spleißdonor	
	SGK1	c.146+2A>T	6	134495647	23,3	834	Spleißdonor	
	SGK1	c.424A>G	6	134495662	23,7	916	missense	p.Y142H
	SGK1	c.368A>C	6	134495718	24,4	841	missense	p.M123R
	CARD11	c.1010C>T	7	2978320	17,5	1006	missense	p.R337Q
	MYC	c.110A>C	8	128750573	15,8	639	missense	p.Y37S
	GNA13	c.1083G>C	17	63010426	18,5	1971	missense	p.D361E
	GNA13	c.164C>T	17	63052548	18,5	714	Missense	p.G55D
	BCL2	c.537C>G	18	60985363	21,2	1190	Missense	p.E179D
	BCL2	c.11G>C	18	60985889	19,7	887	Missense	p.A4G
	POU2F2	c.715T>A	19	42600030	21,1	1205	Missense	p.T239S
	ATM	c.4709T>C	11	108164137	45,2	513	Missense	p.V1570A
58	KMT2D	c.8974C>A	12	49432165	30	981	Stop	p.E2992*
	KMT2D	c.2037+2A>G	12	49435870	29,3	961	Spleißdonor	
	PIM1	c.365A>G	6	37138558	19	864	missense	p.K122R
	EZH2	c.1936A>G	7	148508728	16,1	1069	missense	p.Y646H
	EZH2	c.1572G>C	7	148512106	48,9	1010	missense	p.N524K
59	CREBBP	c.3839_3840insGA	16	3795352	15,2	860	frameshift-insertion	p.F1280fs
	SOCS1	c.374C>G	16	11348962	16,3	668	missense	p.S125T
	BCL2	c.310A>C	18	60985590	15,4	409	missense	p.F104V
	BCL2	c.302C>G	18	60985598	17,2	367	missense	p.G101A

	PIM1	c.228G>T	6	37138793	36,2	138	missense	p.D76Y
60	CREBBP	c.4459G>A	16	3786752	18,6	102	missense	p.H1487Y
	BCL2	c.372G>C	18	60985526	18,5	168	missense	p.FT125FS
61	SPEN	c.10490A>G	1	16264121	44,1	392	missense	p.D3497G
	EXOSC1	c.290T>C	10	99200949	54	398	missense	p.N97S
63	CARD11	c.752A>G	7	2979495	26,8	582	missense	p.L251P
	KMT2D	c.2608_2624	12	49444841	20,9	196	frameshift-truncation	
	KMT2D	c.2607C>A	12	49444859	22,5	187	missense	p.E869D
	CREBBP	c.4337C>T	16	3788617	56	529	missense	p.R1446H
64	ARID1A	c.6632G>A	1	27107021	44,6	336	missense	p.S2211N
	KMT2D	c.12808G>A	12	49425680	20,9	234	stop	p.Q4270*
	KMT2D	c.10792T>A	12	49427696	29	321	stop	p.K3598*
	BTG1	c.380G>T	12	92537992	12,3	480	missense	p.A127D
	SOCS1	c.49C>G	16	11349287	17,3	255	missense	p.A17P
	ACTG1	c.38C>T	17	79479343	19,1	450	missense	p.G13D
	BCL2	c.140C>T	18	60985760	18,6	167	missense	p.G47D
	BCL2	c.21T>C	18	60985879	15,6	417	missense	p.T7S
	BCL2	c.10C>A	18	60985890	15,1	397	missense	p.A4S
	TCF3	c.1430C>T	19	1619130	54,5	22	missense	p.R477Q
65	KMT2D	c.13040_13041 del	12	49425446	18,1	293	frameshift-deletion	p.Q4347fs
	CREBBP	c.6624T>G	16	3778424	71,3	341	missense	p.Q2208H

	CREBBP	c.5039_5041del	16	3781323	35,6	623	inframe-deletion	p.SL1680L
	BCL2	c.386C>T	18	60985514	24,9	567	missense	p.R129H
	BCL2	c.67G>T	18	60985833	11,3	655	missense	p.L23M
	ATP6AP1	c.4_11del	X	153657041	7,7	610	frameshift-deletion	p.M1fs
	KMT2C	c.1050G>T	12	49425442	4	608	missense	p.H350N
	ARID1A	c.4824_4830del	1	27101541	56,7	527	frameshift-deletion	p.H1608fs
66	TNFAIP3	c.1294G>T	6	138199876	42,9	326	missense	p.G432C
	TP53	c.370+2A>C	17	7577017	64,7	224	Spleißdonor	
67	ATM	c.2754T>A	11	108139252	53,7	350	missense	p.F918L
	ATM	c.2759del	11	108139256	52,1	357	frameshift-deletion	p.A920fs
68	CCND1	c.102G>A	11	69456181	41,8	521	missense	p.A34T
	CCND1	c.108G>A	11	69456187	42,6	528	missense	p.E36K
	ATM	c.271C>T	11	108099990	68,7	610	stop	p.Q91*
	KMT2D	c.7631_7635del	12	49433917	41,9	160	frameshift-deletion	p.S2546fs
69	KMT2C	c.1017C>G	7	151962290	10,4	797	missense	p.K339N
	SAMHD1	c.1163T>C	20	35539728	61,1	548	missense	p.D388G
70	ATM	c.2363+1G>C	11	108198486	34,7	493	Spleißdonor	
	ETS1	c.886A>T	11	128350323	46,5	880	missense	p.F296I
71	ITPKB	c.1027C>T	1	226924133	45,3	761	missense	p.V343M
	ATM	c.8174A>T	11	108206594	50	1389	missense	p.D2725V
	SMARCA4	c.3404G>A	19	11141427	32,3	1034	missense	p.R1135Q

	ATM	c.1661_1662insCTT	11	108122617	77,2	605	frameshift-insertion	p.T554fs
72	B2M	c.23-2A>C	15	45007619	79,9	354	Spleißacceptor	
	SMARCA4	c.3583C>G	19	11144002	40,9	736	missense	p.Q1195E
	NOTCH2	c.7175_7176ins AT	1	120458169	33,5	227	frameshift-insertion	p.Y2392fs
	TRAF3	c.1126C>T	14	103369757	44,6	157	missense	p.R376W
73	SMARCA4	c.3469C>T	19	11141492	44,6	157	missense	p.R1157W
	SAMHD1	c.1543T>A	20	35526908	31,6	133	missense	p.I515F
	EP300	c.1352C>A	22	41527461	41,2	216	missense	p.P451H
	BCL6	c.850C>T	3	187447343	48,9	141	missense	p.A284T
74	CARD11	c.3061C>T	7	2951889	31,9	549	missense	p.E1021K
	TCF3	c.882_884del	19	1621907	29,8	302	inframe-deletion	p.SS295S
75	TP53	c.838T>C	17	7577100	89,9	189	missense	p.R280G
76	NOTCH1	c.4049C>A	9	139400299	39,2	572	missense	p.R1350L
77	TRAF3	c.352C>T	14	103342015	51,9	210	missense	p.R118W
78	ARID1A	c.6613G>A	1	27107002	47,5	636	missense	p.A2205T
80	SPEN	c.6064G>A	1	16258799	42,8	474	missense	p.G2022S
	SPEN	c.6064G>A	1	16258799	40,7	605	missense	p.G2022S
81	KRAS	c.35C>G	12	25398284	24,9	1009	missense	p.G12A
	NRAS	c.183T>A	1	115256528	49	545	missense	p.Q61H
82	EZR	c.910G>C	6	159192325	66,7	403	missense	p.Q304E
	KMT2C	c.6047A>C	7	151878898	51,8	411	missense	p.V2016G

	ETS1	c.589G>A	11	128355988	31,6	418	missense	p.R197C
	SAMHD1	c.1593C>G	20	35526858	46,7	456	missense	p.R531S
93	ARID1A	c.161C>T	1	27023055	54,5	22	missense	p.A54V
	TP53	c.132_147del	17	7579539	29,2	308	frameshift-deletion	p.MLSPDD44X
	ATM	c.6860G>C	11	108196837	47,1	1276	missense	p.G2287A
84	KMT2C	c.10763G>A	7	151859899	45,7	1502	missense	p.S3588L
	TBL1XR1	c.686G>T	3	176767801	47,6	1277	missense	p.T229K
85	ARID1A	c.1531C>A	1	27057823	46,4	746	missense	p.L511I
	IGLL5	c.318C>T	22	23235991	26,5	653	missense	p.T106S
86	WHSC1	c.884A>T	4	1918721	47,5	1007	missense	p.Q295L
87	SGK1	c.1463_1464del	6	134491522	46,5	475	frameshift-deletion	p.P488fs
88	EP300	c.5711A>C	22	41573426	50,3	716	missense	p.Q1904P
89	NOTCH1	c.4586T>C	9	139399762	37,2	572	missense	p.N1529S
	TP53	c.405G>T	17	7578522	62,3	130	stop	p.CQ137*
	ARID1A	c.5942G>A	1	27106331	11	746	missense	p.C1981Y
	CREBBP	c.6661T>G	16	3778387	43,7	460	missense	p.M2221L
90	IRF4	c.295T>C	6	394899	15	1207	missense	p.C99R
	KMT2C	c.9931G>A	7	151860731	48,3	1104	missense	p.L3311F
	KMT2D	c.13446del	12	49425041	15,9	528	frameshift-deletion	p.G4482fs
	NOTCH1	c.7541_7542del	9	139390648	10,5	238	frameshift-deletion	p.P2514fs
91	ATP6V1B2	c.268-1G>A	8	20070292	46,8	1085	Spleißacceptor	

	MYD88	c.818T>C	3	38182641	33,5	1285	missense	p.L265P
	SMARCA4	c.887C>T	19	11098369	48	300	missense	p.T296M
	TNFRSF14	c.35G>A	1	2488138	21,4	206	stop	p.W12*
	SPEN	c.10189A>G	1	16263820	16,2	611	missense	p.T3397A
	NOTCH2	c.7198G>A	1	120458147	24,4	795	stop	p.R2400*
	KMT2D	c.282A>T	12	49448429	13	432	stop	p.C94*
57	BCL2	c.569T>C	18	60985331	18,5	720	missense	p.Q190R
	BCL2	c.85C>A	18	60985813	19,6	624	missense	p.E29N
	S1PR2	c.60A>T	19	10335522	15	506	stop	p.Y20*
	POU2F2	c.1046C>T	19	42599523	19,6	331	missense	p.R349H
	EP300	c.4115G>A	22	41564814	15,8	590	missense	p.C1372Y
	TBL1XR1	c.944T>C	3	176756204	26	416	missense	p.D315G
	TNFAIP3	c.1677T>A	6	138200259	29,1	196	stop	p.C559*
	KMT2D	c.9811G>A	12	49431328	28,5	323	stop	p.Q3271*
	KMT2D	c.4772C>T	12	49438718	26,8	366	stop	p.W1591*
83	CREBBP	c.1618del	16	3831262	34,7	268	frameshift-deletion	p.Q540fs
	TP53	c.704A>G	17	7577575	63,6	239	missense	p.N235I
	BCL2	c.281T>A	18	60985619	15,7	108	missense	p.H94L
	BCL2	c.166T>C	18	60985734	16,5	103	missense	p.T56A
56	KMT2C	c.12655G>C	7	151848538	48,4	409	missense	p.L4219V
	KMT2D	c.6789del	12	49434763	18,6	43	frameshift-deletion	p.V2263fs

	STAT6	c.1255C>T	12	57496662	15,7	485	missense	p.D419N
	B2M	c.1A>T	15	45003745	13,6	176	initiator-codon	p.M1L
	SOCS1	c.165G>A	16	11349170	12,1	99	missense	p.F56C
	GNA13	c.791C>T	17	63010718	12,7	557	missense	p.R264H
	TBL1XR1	c.683A>T	3	176767804	29,3	314	missense	p.V228D
	KMT2D	c.5502A>T	12	49415842	29,1	374	missense	p.I5502N
94	KMT2D	c.3503+1C>A	12	49428191	10,9	183	Spleißdonor	
	BCL2	c.23C>T	18	60985877	29,1	337	missense	p.G8E
	POU2F2	c.620G>T	19	42600277	28,8	288	missense	p.A207D
	TNFRSF14	c.169T>G	1	2489264	39,2	176	missense	p.C57/G
	KLHL6	c.1376C>T	3	183210470	29,4	180	missense	p.S459N
	WHSC1	c.2273G>C	4	1955186	21,4	294	missense	p.R758P
95	FBXW7	c.1153T>G	4	153250907	21,4	453	missense	p.T385P
	EZH2	c.1936A>T	7	148508728	25,1	395	missense	p.Y646N
	ATP6V1B2	c.1199G>A	8	20074768	15,1	418	missense	p.R400Q
	CREBBP	c.5039_5041del	16	3781323	35,9	248	inframe-deletion	p.SL1642L

Tab. 10: Identifizierte Translokationen bei Non-HL, die mittels *hybrid-capture*-basierter Methode detektiert wurden und FISH Ergebnisse (FFPE-Gewebe) (FL: Follikuläre Lymphome, DLBCL: Diffus großzellige Lymphome, BL: Burkitt Lymphome, B-CLL: B-chronische lymphatische Leukämie, MCL: Mantelzell-Lymphome, MM: Multiple Myelome, MZL: Marginalzonen-Lymphom), pos: positiv, neg: negativ, n.a: kein Tumormaterial mehr vorhanden, k. Sig.: keine Signale

Fall Nr.	Subtyp	Translokationen	FISH
1	B-CLL	IgH-JH5/BCL2	neg

Fall Nr.	Subtyp	Translokationen	FISH
49	FL	IgH-JH6/BCL2	pos

7	BL	IgH-Sm/cMYC	pos
8	BL	JH4/cMYC	pos
9	BL	IgHM/cMYC	pos
10	BL	IgHM/cMYC	pos
11	BL	IgH-DH/MYC	pos
12	BL	IgH-JH3P/cMYC	k.Sig.
14	DLBCL	chr10 PAPSS2/chr 14 IgG3 Telomer IgH-JH6/BCL2 3UTR	pos
15	DLBCL	IgH-JH4/BCL2	pos
17	DLBCL	IgH-Sa1/cMYC	pos
19	DLBCL	IgH-JH6/BCL2	pos
20	DLBCL	IgH-JH6/BCL2	pos
21	DLBCL	IgH-JH6/BCL2	pos
22	DLBCL	IgH Sm/BCL2	pos
24	DLBCL	IgH-JH6/BCL2	pos
27	DLBCL	IgHJ4/BCL2	pos
29	DLBCL	IgH-SG4/MYC-Intron 1	n.a.
33	DLBCL	IgHG/BCL6	pos
34	DLBCL	IKZK1/BCL6	pos
38	DLBCL	IgH-JH6/BCL2	pos
39	DLBCL	HSP90AA1/BCL6	pos

50	FL	IgH-JH6/BCL2 chr3 BCL6/chr5 MEF2C 5UTR mit Promotor	pos
51	FL	IgH-JH6/BCL2	pos
52	FL	IgH-JH4/BCL2	pos
53	FL	IgH-JH4/BCL2	pos
55	FL	IgH-JH4/BCL2 3 UTR	pos
56	FL	BCL2/IgHD6-6	k. Sig.
57	FL	IGHJ5/BCL2	neg
58	FL	IgH-JH4/BCL2 3UTR	pos
59	FL	IgH-JH6/BCL2	pos
62	FL	IgH-JH6/BCL2	pos
63	FL	IgH-JH6/BCL2	pos
64	FL	BCL2/IgH-JH5	pos
65	FL	BCL2/IgH-DH3UTR	pos
66	MCL	IgH-JH4/BCL1	pos
67	MCL	IgH-JH4/BCL1	pos
68	MCL	IgH-JH5/BCL1	pos
69	MCL	IgH-JH4/BCL1	pos
70	MCL	IgH-JH4/BCL1	pos
71	MCL	IgH-JH4/BCL1	pos
72	MCL	IgH-JH6/BCL1	pos

40	DLBCL	IgH-sE/MYC	pos
42	DLBCL	IgH-JH6/BCL2	pos
43	DLBCL	IgH-sM/BCL6	pos
45	DLBCL	IGHJ5/BCL2	k. Sig.
46	DLBCL	IgH-JH5/BCL2	k. Sig.
47	FL	IgH-JH6/BCL2 IgH-Sm/IDH2	pos
48	FL	IgH-JH5/BCL2	pos

73	MCL	IgH-JH5/BCL1 5side	pos
83	FL	BCL2/IGHD2-15	k. Sig.
85	MZL	MALT1/BIRC3	k. Sig.
86	MZL	MALT1/BIRC3	k. Sig.
92	BL	cMYC/JH4	pos
94	FL	IGHD5-16/BCL2	k. Sig.

Tab. 11: Identifizierte VDJ-Rekombinationen, die in den Non-HL aus FFPE-Gewebe-Proben mittels *hybrid-capture* Methode identifiziert wurden.

Fall-Nr.	Subtyp	VDJ
5	B-CLL	VH1-24/DH2-2/JH6
7	BL	VH3-11/DH6-13/JH4
8	BL	VH5-51/D3-16/JH6
10	BL	VH3-11/DH6-13/JH4
12	BL	VH1-18/DH3-22/JH1
14	DLBCL	VH3-30/DH8-19/JH3
15	DLBCL	VH3-30/DH2-21/JH6
16	DLBCL	VH3-23/DH3-16/JH4
17	DLBCL	VH1-3/DH2-8/JH6

Fall Nr.	Subtyp	VDJ
31	DLBCL	VH4-30/D2-21/JH4
33	DLBCL	VH3-11/DH2-21/JH5
34	DLBCL	VH3-15/DH3-16/JH4 VH1-58/DH3-3/JH4 VH4-39/DH6-25/JH3
51	FL	VH1-25/D2-2/JH5
52	FL	VH1-18/D6-2/JH6
55	FL	VH1-18/DH2-15/JH5
60	FL	VH4-34/D3-10/JH3
62	FL	VH1-3/DH3-16/JH6
67	MCL	VH5-51/DH3-10/JH4

Fall-Nr.	Subtyp	VDJ
71	MCL	VH4-30/DH2-2/JH3
72	MCL	VH3-11/DH5-12/JH4
73	MCL	VH3-23/DH3-22/JH5
80	MM	VH3-23/JH3
86	MZL	VH2-70/DH1-26/JH5
91	MZL	VH3-11/DH3-10/JH6 CH1-58/DH3-16/JH6 VH4-34/DH5-12/JH5
92	BL	VH3-23/D3-22/JH4 VH3-13/D4-17/JH4

18	DLBCL	VH1-18/DH4-11/JH6	68	MCL	VH1-3/DH4-11/JH4
25	DLBCL	VH1-18/DH2-15/JH3	70	MCL	VH3-11/DH6-13/JH5 VH3-23/DH3-22/JH5

Tab. 12: Lauf- und Bibliothekenstatistik (Non-HL aus ccfDNAs)

Fall-Nr	Cluster Dichte [K/mm ²]	Q30 [%]	Ausgangskonz. der DNA [µg/ml]	Bibliothekenkonz. [µg/ml]	Target Abdeckung	100fache-Abdeckung der Targets [%]	Uniformität [%]	Generierte Sequenzen	Anreicherung [%]	abgedeckte Basen aus <i>uniquen</i> Sequenzen [%]
27 LB	1440	93,4	1,6	68,3	527,9	97	97	1824931	71,76	55,51
71 LB	1360	94,69	4,3	14,2	547,4	96	96	1735436	75,96	60,31
98 LB	1360	94,69	4,39	38,8	877,7	98	96	2852105	74,93	58,82
97 LB	1360	94,69	0,541	51,3	203,2	94	98	897771	58,19	43,47
96 LB	1532	93,5	3,18	33,9	163,7	85,5	97,5	828683	50,54	37,14
28 LB	1532	93,5	6,64	52,6	1208,2	98	96	4306937	70,01	52,9
29 LB	1532	93,5	5,44	52,1	1115,2	98	96	3817580	71,83	54,75
58 LB	1455	95,17	3,16	88,7	779	97	96	2384536	80	62
31 LB	1455	95,17	1,65	69,5	866	97,8	96	2800607	77	58
35 LB	1455	95,17	0,91	58,5	402	96	97	1368364	74	55
99 LB	1455	95,17	9,61	78,6	411	97	97	1407575	74	55
18 LB	1455	95,17	2,55	41,4	203	92	98	754638	69	51

Tab. 13: Varianten in Non-HL: Vergleich der ccfDNA-Proben (Fall-Nr. LB) mit Primärgewebe (FFPE-Gewebe); grün markiert sind die Varianten, die sowohl im FFPE-Gewebe, als auch in der ccfDNA detektiert wurden. KM: Keimbahn-Varianten, HS: HotSpot-Variante, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

Fall Nr.	Gen	Variante	Chr.	Koordinate [hg19]	VAF [%]	Lesetiefe	Art der Abberation	Aminosäure Austausch	HS/KM
96	TNFRSF14	c.23+2T>C	1	2488174	30,4	191	Spleißdonor		
	CARD11	c.749A>G	7	2979499	20	972	missense	p.S250P	
	CARD11	c.747G>C	7	2979502	19,8	976	missense	p.Q249E	
	KMT2D	c.11580_11582del	12	49426905	4,2	198	inframe-deletion	p.QQ3861Q	
	STAT6	c.1256T>C	12	57496661	15,6	912	missense	p.D419G	HotSpot
	CREBBP	c.5039_5041del	16	3781323	32,4	723	inframe-deletion	p.SL1681L	
	IRF8	c.1218del	16	85954822	17,5	807	frameshift-deletion	p.M406fs	
	TP53	c.848C>T	17	7577090	46,9	851	missense	p.R283H	
SALL3	c.1746G>C	18	76753737	15,3	580	missense	p.E582D		
96 LB	TNFRSF14	c.23+2T>C	1	2488174	11,5	122	Spleißdonor		
	CARD11	c.752A>G	7	2979495	7	172	missense	p.L251P	
	KMT2D	c.11580_11582del	12	49426905	5,1	198	inframe-deletion	p.QQ3861Q	
	STAT6	c.1256T>C	12	57496661	15,9	239	missense	p.D419G	
	CREBBP	c.5039_5041del	16	3781323	7,1	141	inframe-deletion	p.SL1681L	
	TP53	C.848C>T	17	7577090	51,6	157	missense	p.R283H	
	IRF8	c.1218del	16	85954822	2,5	160	frameshift-deletion	p.M406fs	
28	ARID1A	c.4806C>A	1	27101524	46,4	1240	missense	p.S1602R	KM
	MYD88	c.818T>C	3	38182641	35,4	1221	missense	p.L273P	

	TBL1XR1	c.1109T>C	3	176755899	33,2	1111	missense	p.D370G	
	IRF4	c.178C>T	6	393330	35,7	1064	stop	p.Q60*	
	PIM1	c.328G>A	6	37138406	34,9	1008	missense	p.D110N	
	PIM1	c.345G>C	6	37138423	35,3	921	missense	p.K115N	
	PIM1	c.356G>T	6	37138549	33,1	783	missense	p.G119V	
	PIM1	c.563G>C	6	37138950	31,4	832	missense	p.S188T	
	PIM1	c.676G>A	6	37139063	33,2	823	missense	p.E226K	
	PTEN	c.49C>T	10	89624275	50,8	2109	stop	p.Q17*	keine KM
	ATM	c.4468A>G	11	108163377	48,5	1126	missense	p.S1490G	KM
	KMT2D	c.12008_12017del	12	49426470	24,4	1000	frameshift-deletion	p.L4006fs	
	KMT2D	c.59-1C>A	12	49448535	35,5	625	Spleißacceptor		
	BTG1	c.380G>T	12	92537992	32	1189	missense	p.A127D	
	CD79B	c.589A>G	17	62006799	34,3	1029	missense	p.Y197H	HotSpot
	BCL2	c.392G>A	18	60985508	18,5	1852	missense	p.A131V	HotSpot
	MEF2B	c.158C>T	19	19260135	26	1384	missense	p.R53H	
	ARID1A	c.4806C>A	1	27101524	46,8	1106	missense	p.S1602R	KM
	MYD88	c.818T>C	3	38182641	31,4	1632	missense	p.L273P	
	TBL1XR1	c.1109T>C	3	176755899	30,9	1183	missense	p.D370G	
	IRF4	c.178C>T	6	393330	20,3	566	stop	p.Q60*	
	PIM1	c.328G>A	6	37138406	29,4	374	missense	p.D110N	
28 LB	PIM1	c.345G>C	6	37138423	30,4	365	missense	p.K115N	

	PIM1	c.356G>T	6	37138549	25,8	481	missense	p.G119V	
	PIM1	c.563G>C	6	37138950	28,7	523	missense	p.S188T	
	PIM1	c.676G>A	6	37139063	29	549	missense	p.E226K	
	PTEN	c.49C>T	10	89624275	50,7	1770	stop	p.Q17*	keine KM
	ATM	c.4468A>G	11	108163377	47,1	1495	missense	p.S1490G	KM
	KMT2D	c.12008_12017del	12	49426470	21,9	1088	frameshift-deletion	p.L4006fs	
	KMT2D	c.59-1C>A	12	49448535	32,4	728	Spleißacceptor		
	BTG1	c.380G>T	12	92537992	31	567	missense	p.A127D	
	CD79B	c.589A>G	17	62006799	25,4	1132	missense	p.Y197H	
	BCL2	c.392G>A	18	60985508	9,9	584	missense	p.A131V	
	MEF2B	c.158C>T	19	19260135	22,7	1926	missense	p.R53H	
29	ITPKB	c.794G>A	1	226924366	22,6	605	missense	p.P265L	
	ITPKB	c.622G>A	1	226924538	25,8	458	stop	p.Q208*	
	ITPKB	c.548C>G	1	226924612	21,4	309	missense	p.S183T	
	DUSP2	c.268C>A	2	96810826	29,2	154	missense	p.V90L	
	MYD88	c.818T>C	3	38182641	24,5	1155	missense	p.L273P	
	TBL1XR1	c.1382G>T	3	176750793	54,9	966	missense	p.S461Y	keine KM
	IRF4	c.208C>G	6	393360	23,5	503	missense	p.L70V	
	PIM1	c.277C>T	6	37138355	24,4	1136	missense	p.L93F	
	PIM1	c.72G>C	6	37138423	28	681	missense	p.K24N	
	PIM1	c.111G>C	6	37138577	32,5	895	missense	p.Q37H	

	PIM1	c.184C>G	6	37138649	26,1	964	missense	p.N61K	
	PIM1	c.288G>T	6	37138946	22,3	579	missense	p.V96L	
	PIM1	c.285C>G	6	37138951	22,1	583	missense	p.S97R	
	PIM1	c.597_713del	6	37138983	10,7	588	inframe-deletion	p.DWFERPDS FVLILRPEP VQDLDFDITE RGALQEELA RSF199D	
	PIM1	c.339C>T	6	37138997	30,7	553	missense	p.P113S	
	PIM1	c.453G>A	6	37139111	31,6	614	missense	p.V151M	
	PIM1	c.552C>T	6	37139210	24	654	missense	p.L184F	
	PRDM1	c.229G>C	6	106536262	31,7	489	missense	p.V77L	
	CARD11	c.1081A>C	7	2977603	25,4	1143	missense	p.Y361D	
	PTEN	c.716T>G	10	89717691	38,2	764	missense	p.M239R	
	ATM	c.5262G>T	11	108172459	50,6	1017	missense	p.K1754N	KM
	BTG1	c.370G>T	12	92538002	26,7	905	missense	p.L124M	
	BTG1	c.208T>C	12	92538164	23,9	1249	missense	p.I70V	
	BTG1	c.201G>C	12	92538171	26	1240	stop	p.Y67*	
	SOCS1	c.197C>T	16	11349139	32,1	271	missense	p.R66H	
	SOCS1	c.8G>A	16	11349328	22,9	415	missense	p.A3V	
	CD79B	c.590T>C	17	62006798	25,5	1141	missense	p.Y196C	HotSpot
	EP300	c.4351C>T	22	41566474	23,8	1095	missense	p.H1451Y	
29	ITPKB	c.794G>A	1	226924366	27,3	495	missense	p.P265L	

LB	ITPKB	c.622G>A	1	226924538	26,7	378	stop	p.Q208*	
	ITPKB	c.548C>G	1	226924612	22,3	265	missense	p.S183T	
	DUSP2	c.268C>A	2	96810826	21	62	missense	p.V90L	
	MYD88	c.818T>C	3	38182641	23,8	1377	missense	p.L273P	
	TBL1XR1	c.1382G>T	3	176750793	43,4	1237	missense	p.S461Y	keine KM
	IRF4	c.208C>G	6	393360	19,2	542	missense	p.L70V	
	PIM1	c.277C>T	6	37138355	24,5	719	missense	p.L93F	
	PIM1	c.72G>C	6	37138423	20,5	503	missense	p.K115N	
	PIM1	c.111G>C	6	37138577	26,1	578	missense	p.Q128H	
	PIM1	c.184C>G	6	37138649	19,7	641	missense	p.N152K	
	PIM1	c.288G>T	6	37138946	27,2	503	missense	p.V187L	
	PIM1	c.285C>G	6	37138951	27,1	502	missense	p.S188R	
	PIM1	c.597_713del	6	37138983	11,9	496	inframe-deletion	p.DWFERPDS FVLILERPEP VQDLDFDITE RGALQEELA RSF199D	
	PIM1	c.339C>T	6	37138997	25,8	493	missense	p.P204S	
PIM1	c.453G>A	6	37139111	25,7	521	missense	p.V242M		
PIM1	c.552C>T	6	37139210	24,2	554	missense	p.L275F		
PRDM1	c.229G>C	6	106536262	22,6	477	missense	p.V77L		
CARD11	c.1081A>C	7	2977603	27,5	1209	missense	p.Y361D		
PTEN	c.716T>G	10	89717691	34,6	971	missense	p.M239R		

	ATM	c.5262G>T	11	108172459	49,8	1696	missense	p.K1754N	KM
	BTG1	c.370G>T	12	92538002	33,1	510	missense	p.L124M	
	BTG1	c.208T>C	12	92538164	22,3	1012	missense	p.I70V	
	BTG1	c.201G>C	12	92538171	22,5	969	stop	p.Y67*	
	SOCS1	c.197C>T	16	11349139	30,2	116	missense	p.R66H	
	SOCS1	c.8G>A	16	11349328	18,6	231	missense	p.A3V	
	CD79B	c.590T>C	17	62006798	24,6	1234	missense	p.Y197C	
	EP300	c.4351C>T	22	41566474	24	1407	missense	p.H1451Y	
	ARID1A	c.1239+1G>T	1	27099479	44,7	474	Spleißdonor		
	ARID1A	c.5542G>T	1	27105931	51,4	440	missense	p.G1848W	
	KMT2D	c.6229G>A	12	49435443	45	291	stop	p.Q2077*	
	PTPN11	c.1658C>T	12	112940006	45,2	531	missense	p.T553M	
27	CREBBP	c.3187_3203del	16	3817767	31,1	412	frameshift-deletion	p.N1068fs	
	CREBBP	c.3179T>G	16	3817792	35,1	447	missense	p.K1060T	keine KM
	IRF8	c.1272del	16	85954878	38,3	446	frameshift-deletion	p.I424fs	
	TP53	c.524C>T	17	7578406	84,5	103	missense	p.R175H	Hotspot keine KM
	ARID1A	c.6229G>A	1	27105931	52,3	419	missense	p.G1848W	
	PTPN11	c.5542G>T	12	112940006	46,3	624	missense	p.T553M	
27 LB	ARID1A	c.14+1G>T	1	27099479	0,1	548	Spleißdonor		
	KMT2D	c.1658C>T	12	49435443	1	348	stop	p.Q2077*	
	CREBBP	c.3187_3203del	16	3817767	0,4	524	frameshift-deletion	p.N1068fs	

	CREBBP	c.3179T>G	16	3817792	0,3	586	missense	p.K1060T	keine KM
	IRF8	c.1272del	16	85954878	1	413	frameshift-deletion	p.I424fs	
	TP53	c.524C>T	17	7578406	1	278	missense	p.R175H	HotSpot keine KM
97	TBL1XR1	c.687G>T	3	176767801	47,6	1277	missense	p.T229K	keine KM
	KMT2C	c.10763G>A	7	151859899	45,7	1502	missense	p.S3588L	Keimbahnmuta- tion
	ATM	c.6860G>C	11	108196837	47,1	1276	missense	p.G2287A	KM
97 LB	KMT2C	c.10763G>A	7	151859899	52,8	229	missense	p.S3588L	KM
	ATM	c.6860G>C	11	108196837	51,7	151	missense	p.G2287A	KM
	TBL1XR1	c.687G>T	3	176767801	2	126	missense	p.T229K	keine KM
98	TNFRSF14	c.102del	1	2489196	64	267	frameshift-deletion	p.C34fs	keine KM
	TNFAIP3	c.718del	6	138197215	57,4	383	frameshift-deletion	p.A240fs	keine KM
	KMT2C	c.3269G>A	7	151921154	10,2	773	stop	p.R1092*	
	KMT2D	c.12525G>T	12	49425964	42,3	499	missense	p.P4175Q	
	KMT2D	c.3580+1C>A	12	49427848	40,5	580	Spleißdonor		
	KMT2D	c.1302+1C>T	12	49443464	31,8	258	Spleißdonor		KM
	CREBBP	c.4298T>C	16	3788656	78,5	489	missense	p.Y1433C	
	GNA13	c.966C>T	17	63010545	26,6	578	missense	p.V322I	
	GNA13	c.751C>A	17	63010758	34,8	592	stop	p.E251*	
98	ATP6AP1	c.1234T>G	X	153664058	77,5	329	missense	p.F412V	
	TNFRSF14	c.102del	1	2489196	10,1	466	frameshift-deletion	p.C34fs	keine KM

LB	TNFAIP3	c.718del	6	138197215	12,3	1071	frameshift-deletion	p.A240fs	keine KM
	KMT2C	c.3269G>A	7	151921154	5	1167	missense	p.C1090F	
	KMT2C	c.1017C>G	7	151962290	8,6	978	missense	p.K4175N	
	KMT2D	c.12525G>T	12	49425964	46,9	747	missense	p.P4175Q	KM
	KMT2D	c.3580+1C>A	12	49427848	10,4	864	Spleißdonor		
	KMT2D	c.1302+1C>T	12	49443464	11,6	440	Spleißdonor		
	CREBBP	c.4298T>C	16	3788656	19,6	713	missense	p.Y1433C	
	GNA13	c.751C>A	17	63010758	10,8	871	stop	p.E251*	
	ATP6AP1	c.1234T>G	X	153664058	21,2	444	missense	p.F412V	
71	ITPKB	c.1027C>T	1	226924133	45,3	761	missense	p.V343M	KM
	ATM	c.8174A>T	11	108206594	50	1389	missense	p.D2725V	keine KM
	SMARCA4	c.3404G>A	19	11141427	32,3	1034	missense	p.R1135Q	keine KM
	CCND1 Trans.	IgH-JH4/BCL1	11	69.445.230					
71 LB	ITPKB	c.1027C>T	1	226924133	53,2	250	missense	p.V343M	KM
	ATM	c.8174A>T	11	108206594	22,6	605	missense	p.D2725V	keine KM
	SMARCA4	c.3404G>A	19	11141427	18,3	334	missense	p.R1135Q	keine KM
	CCND1 Trans.	IgH-JH4/BCL1	11	69.445.230					
35	MYD88	c.818T>C	3	38182641	32,8	1358	missense	p.L265P	
	PIM1	c.75G>C	6	37138423	32,7	1118	missense	p.K25N	
	PIM1	c.111G>C	6	37138577	33,1	1331	missense	p.Q37H	
	PIM1	c.243C>T	6	37138901	32,8	874	missense	p.P81S	

	PIM1	c.249G>A	6	37138908	33,9	876	missense	p.G83D
	PIM1	c.381C>T	6	37139039	35,1	984	Stop	p.Q127*
	BTG1	c.168C>T	12	92538204	33,6	1418	Stop	p.W56*
	BTG1	c.136C>T	12	92539174	36,9	756	missense	p.E46Q
	BTG1	c.98C>T	12	92539214	27,6	1097	missense	p.S33N
	BTG1	c.33C>T	12	92539279	24,4	814	missense	p.M11I
	CCT6B	c.703C>T	17	33269837	45,5	910	missense	p.V235I
	ACTG1	c.38C>G	17	79479343	28,8	1406	missense	p.G13A
	SALL3	c.1130T>C	18	76753121	49,9	1317	missense	p.L377P
	CD70	c.247G>A	19	6586366	32,9	805	missense	p.R83C
	MED12	c.34C>T	X	70338638	25	1014	missense	p.R12W
35 LB	CCT6B	c.703C>T	17	33269837	46,1	532	missense	p.V235I
	SALL3	c.1130T>C	18	76753121	39,3	318	missense	p.L377P
58	ATM	c.4709T>C	11	108164137	45,2	513	missense	p.V1570A
	KMT2D	c.8974C>A	12	49432165	30	981	Stop	p.E2992*
	KMT2D	c.2037+2A>G	12	49435870	29,3	961	Spleißdonor	
58	CREBBP	c.4464G>T	16	3786748	53,4	903	missense	p.P1488Q
	TP53	c.486T>A	17	7578446	1	317	missense	p.I162F
	IgH- JH4/ BCL2 (chr14: 106.330.459, chr18: 60.774.150)							
58	ATM	c.4709T>C	11	108164137	46,6	791	missense	p.V1570A

LB	KMT2D	c.8974C>A	12	49432165	12,7	1057	Stop	p.E2992*
	KMT2D	c.2037+2A>G	12	49435870	35,8	727	Spleißdonor	
	CREBBP	c.4464G>T	16	3786748	33,4	658	missense	p.P1488Q
	TP53	c.486T>A	17	7578446	8,1	296	missense	p.I162F
IgH- JH4/ BCL2 (chr14: 106.330.459, chr18: 60.774.150)								
31	CD58	c.210+2A>C	1	117078585	25,7	257	Spleißdonor	
	PRDM1	c.1877C>T	6	106554349	24,4	476	missense	p.T626M
	NOTCH1	c.7541_7542del	9	139390648	37,8	238	frameshift-deletion	p.P2514fs
	POT1	c.130A>G	7	124511090	5	239	missense	p.C44R
31 LB	POT1	c.130A>G	7	124511090	25,1	935	missense	p.C44R
	CD58	c.210+2A>C	1	117078585	0,3	607	Spleißdonor	
	PRDM1	c.1877C>T	6	106554349	0,3	1200	missense	p.T626M
99	ARID1A	c.6722T>A	1	27107111	43,4	136	stop	p.L2241*
	BIRC3	c.1294_1295del	11	102201942	2	51	frameshift-insertion	p.R432fs
	ATM	c.990_993del	11	108115540	34,6	81	frameshift-deletion	p.N330_331fs
	ATM	c.7257A>C	11	108199915	47,4	78	missense	p.RA2419_242 OSP
	NCOR2	c.5626G>A	12	124824613	67,4	95	missense	p.H1866Y
	MAP2K1	c.171G>C	15	66727455	30,7	137	missense	p.K57N
BCL2/MRPL21 (chr18: 60.985.460)								
99	ARID1A	c.6722T>A	1	27107111	26,3	372	Stop	p.L2241*

LB	BIRC3	c.1294_1295del	11	102201942	8,7	402	frameshift-insertion	p.R432fs
	ATM	c.990_993del	11	108115540	22,3	578	frameshift-deletion	p.N230_231fs
	ATM	c.7257A>C	11	108199915	23,4	488	Missense	p.R1419S
	NCOR2	c.5626G>A	12	124824613	53,2	355	Missense	p.H1876Y
	MAP2K1	c.171G>C	15	66727455	25	507	Missense	p.K57N
	TNFRSF14	c.77A>G	1	2489172	65,7	469	Missense	p.Y26C
	TNFRSF14	c.166A>G	1	2489261	71,5	520	Missense	p.K56E
	KLHL6	c.268G>A	3	183273174	37,4	840	Missense	p.L90F
18	CD83	c.247G>A	6	14131844	45,6	384	Missense	p.D83N
	CARD11	c.343A>T	7	2985467	39	1386	Missense	p.F115H
	KMT2C	c.8497C>T	7	151874041	39	1291	missense	p.V2833M
	EZH2	c.567_570del	7	148525888	0,1	2081	inframe-deletion	p.DG189_190 G
18 LB	CD83	c.247G>A	6	14131844	37,1	143	missense	p.D83N
	CARD11	c.343A>T	7	2985467	1	295	missense	p.F115H
	EZH2	c.567_570del	7	148525888	5,1	195	inframe-deletion	p.DG189_190 G

Tab 14: Varianten der Non-HL, die durch das NGS-basierte Kapa Fragment Kit überprüft wurden. * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

Fall-Nr.	Gen	Variante	Chr.	Koordinate [hg19]	VAF [%]	Lesetiefe	Art der Abberation	Aminosäure-Austausch
77	TRAF3	c.352C>T	14	103342015	51,9	210	missense	p.R118W
72	ATM	c.1661_1662del	11	108122617	77,2	605	frameshift-insertion	p.T554fs
	SMARCA4	c.3583C>G	19	11144002	40,9	736	missense	p.Q1195E

78	ARID1A	c.6613G>A	1	27107002	47,5	636	missense	p.A2205T
	PIM1	c.228G>T	6	37138793	36,2	138	missense	p.D76Y
60	CREBBP	c.4459G>A	16	3786752	18,6	102	missense	p.H1487Y
	BCL2	c.375G>A	18	60985526	18,5	168	missense	p.F125S
	ATP6V1B2	c.268-1G>A	8	20070292	46,8	1085	Spleißacceptor	
91	MYD88	c.818T>C	3	38182641	33,5	1285	missense	p.L265P
	SMARCA4	c.887C>T	19	11098369	48	300	missense	p.T296M
32	SPEN	c.10391G>C	1	16264022	59,6	396	missense	p.G3464A

Tab. 15: Validierte somatische- und Keimbahn-Varianten der Non-HL (Sanger-Sequenzierung). VAF: Varianten-Allelfrequenz, KM: Keimbahn-Variante, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

Fall-Nr.	Gen	Variante	Chr	Koordinate [hg19]	VAF [%]	Lese-tiefe	Art der Abberation	Aminosäure Austausch	Keimbahn-Variante
	ITPKB	c.1027C>T	1	226924133	45,3	761	missense	p.V343M	KM
71	ATM	c.8174A>T	11	108206594	50	1389	missense	p.D2725V	
	SMARCA4	c.3404G>A	19	11141427	32,3	1034	missense	p.R1135Q	
55	KLHL6	c.1190G>A	3	183212027	47,4	1196	missense	p.S397L	KM
	TNFRSF14	c.1A>C	1	2488104	43,4	175	initiator-codon	p.MIL	
	NOTCH1	c.4307G>A	9	139400041	45,4	302	missense	p.A1436V	KM
22	EZH2	c.1937T>G	7	148508727	42	578	missense	p.Y646S	
	STAT6	c.1255C>T	12	57496662	42,5	579	missense	p.D419N	
84	ATM	c.6860G>C	11	108196837	47,1	1276	missense	p.G2287A	KM

Anhang

	KMT2C	c.10763G>A	7	151859899	45,7	1502	missense	p.S3588L	KM
	TBL1XR1	c.686G>T	3	176767801	47,6	1277	missense	p.T229K	
72	ATM	c.1661_1662 insCTT	11	108122617	77,2	605	frameshift-insertion	p.T554fs	
	B2M	c.23-2A>C	15	45007619	79,9	354	Spleißacceptor		
	SMARCA4	c.3583C>G	19	11144002	40,9	736	missense	p.Q1195E	
25	IRF8	c.800C>T	16	85952221	44,5	348	missense	p.T267M	KM
	ARID1A	c.4806C>A	1	27101524	46,4	1240	missense	p.S1602R	KM
28	PTEN	c.49C>T	10	89624275	50,8	2109	stop	p.Q17*	
	ATM	c.4468A>G	11	108163377	48,5	1126	missense	p.S1490G	KM
78	ARID1A	c.6613G>A	1	27107002	47,5	636	missense	p.A2205T	
77	TRAF3	c.352C>T	14	103342015	51,9	210	missense	p.R118W	KM
	PTPN11	c.1658C>T	12	112940006	45,2	531	missense	p.T553M	KM
27	CREBBP	c.3187_3203del	16	3817767	31,1	412	frameshift-deletion	p.N1068fs	
	TP53	c.524C>T	17	7578406	84,5	103	missense	p.R175H	
	TBL1XR1	c.1382G>T	3	176750793	54,9	966	missense	p.S461Y	
29	PTEN	c.716T>G	10	89717691	38,2	764	missense	p.M239R	
	ATM	c.5262G>T	11	108172459	50,6	1017	missense	p.K1754N	KM
58	ATM	c.4709T>C	11	108164137	45,2	513	missense	p.V1570A	
	KMT2D	c.8974C>A	12	49432165	30	981	stop	p.E2992*	
80	SPEN	c.6064G>A	1	16258799	42,8	474	missense	p.G2022S	

30	RB1	c.2515T>C	13	49047521	46,1	558	missense	p.F839L	
5	NCOR2	c.3542G>A	12	124839071	49	590	missense	p.P1181L	
	DDX3X	c.342-1G>A	X	41204430	90,5	337	Spleißacceptor		
31	CD58	c.210+2A>C	1	117078585	25,7	257	Spleißdonor		
	PRDM1	c.1877C>T	6	106554349	24,4	476	missense	p.T626M	
	NOTCH1	c.7541_7542del	9	139390648	37,8	238	frameshift-deletion	p.P2514fs	
81	SPEN	c.6064G>A	1	16258799	40,7	605	missense	p.G2022S	
	KRAS	c.35C>G	12	25398284	24,9	1009	missense	p.G12A	
69	SAMHD1	c.1163T>C	20	35539728	61,1	548	missense	p.D388G	KM
53	ITPKB	c.1411G>C	1	226923749	51,1	916	missense	p.P471A	KM
19	CREBBP	c.6624T>G	16	3778424	45	449	missense	p.Q2208H	KM
45	MEF2B	c.341C>T	19	19258559	44,5	454	missense	p.R114Q	KM
	TNFAIP3	c.2282G>A	6	138202365	40,6	559	missense	p.R761H	KM
56	KMT2C	c.12655G>C	7	151848538	48,4	409	missense	p.L4219V	KM
83	TP53	c.704A>G	17	7577575	63,6	239	missense	p.N235I	
52	KMT2D	c.2975T>C	12	49444396	49,2	130	missense	p.D992G	
92	SPEN	c.7530C>T	1	16260264	47,1	556	missense	p.A2510V	KM
95	CREBBP	c.5039_5041del	16	3781323	35,9	248	inframe-deletion	p.SL1642L	

Tab. 16: Validierte Translokationen in Non-HL, die mittels Sanger-Sequenzierung untersucht wurden.

Fall Nr.	Subtyp	Translokationen
----------	--------	-----------------

Anhang

66	MCL	IgH-JH4/BCL1
7	BL	cMYC/IgH-Sm
47	FL	IgH-JH6/BCL2 IgH-Sm/IDH2
48	FL	IgH-JH5/BCL2
67	MCL	IgH-JH4/BCL1 BCL1 5side/D4-23
68	MCL	IgH-JH5/BCL1
49	FL	IgH-JH6/BCL2
50	FL	IgH-JH6/BCL2 chr3 BCL6/chr5 MEF2C 5UTR with promotor
71	MCL	IgH-JH4/BCL1 BCL1/IgH-JH4
86	MZL	MALT1/BIRC3 BIRC3/MALT1
1	B-CLL	IgH-JH5/BCL2 IgHD2-21/BCL2
27	DLBCL	IgHJ4/BCL2 BCL2/IgH-JH4
29	DLBCL	IgH-SG4/MYC-Intron 1
58	FL	IgH-JH4/BCL2 3UTR
85	MZL	MALT1/BIRC3 BIRC3/MALT1
72	MCL	IgH-JH6/BCL1
34	DLBCL	IKZK1/BCL6 BCL6/IKZK1
39	DLBCL	HSP90AA1/BCL6
14	DLBCL	chr10 PAPSS2/chr 14 IgG3 Telomer

Tab. 17: VDJ-Rekombinationen der Non HL, die durch Sanger-Sequenzierung verifiziert wurden.

Fall Nr.	Subtyp	VDJ
25	DLBCL	VH1-18/DH2-15/JH3
31	DLBCL	VH4-30/D2-21/JH4
73	MCL	VH3-23/DH3-22/JH5

Tab. 18: Patientendaten der pHL, die mittels *hybrid-capture* Methode sequenziert wurden (FFPE und ccfDNA), NS: nodulär-sklerosierender Subtyp, MC: Mischtyp

Fall Nr	Alter	Geschlecht	Subtyp	EBV	qPET	Stadium	Bulk
101	11	w	NS	neg	0,79	IIA	nein
104	18	m	NS	neg	1,12	IVBE	ja
100	17	w	NS	neg	1,05	IIBE	ja
103	8	w	MC	pos	8,8	IIBE	ja
102	14	w	NS	pos	7,7	IIA	ja
105	17	w	NS	neg	1,1	IIA	ja
106	15	m	NS	neg	1,145	IIIB	ja
108	18	w	NS	neg	0,91	IIB	nein
109	17	w	MC	neg	1,8	IVBE	nein
110	16	w	NS	neg	0	IIA	nein
115	16	w	NS	neg	1,42	IIA	nein

Tab. 19: Laufcharakteristika der gDNAs von pHL-Patienten (FFPE-Gewebe), die durch das *hybrid-capture* Verfahren generiert wurde. PF: Passing Filter

Lauf	Fall Nr	reads	reads "PF"	Identifizierte reads je Fall (PF)	Cluster Dichte [K/mm ²]	Q30 [%]
1	101	30388218	28340476	132.377.272	1252	95
	104			142.698.794		
2	100	35110923	31664192	151.268.222	1458	94
	103			75.521.157		
3	102	33390945	30596560	127.349.658	1385	94
4	105	29218686	27310836	179.215.701	1211	95
	106			157.585.868		
5	108	35533215	32298550	194.252.236	1469	90
6	109	32789995	30068250	304.791.170	1354	94
	110			290.072.022		
7	115	35552462	32229132	438.665.690	1488	93

Tab. 20: Lauf- und Bibliothekencharakteristika der gDNAs von pHL-Patienten (FFPE-Gewebe), die mittels *hybrid-capture* Methode und durch den MiSeq/NextSeq550 generiert und durch das *Enrichment v3.0*-Programm ausgewertet wurde.

Fall Nr	Ausgangs- konzentration der DNA [µg/ml]	Bibliothekenkonz. [µg/ml]	Target Abdeckung	100x Abdeckung [%]	Uniformität [%]	Generierte Sequenzen	Anreicherung [%]	abgedeckte Basen aus <i>uniquen</i> Sequenzen [%]
---------	--	------------------------------	---------------------	-----------------------	--------------------	-------------------------	---------------------	---

101	58,2	69,7	672	98	97	2167130	77	62
104	447	58,5	663	98	97	2211918	76	60
100	108	45,2	623	97,8	97	2075545	76	60
103	523	54,3	338	96	97,6	1185658	73	58
102	511	58,8	886	98	97	3822968	57	46
105	27,6	69,4	1128	99	97	4076969	70	55
106	467	72,8	717	97,6	96,6	2610870	69	55
108	197	27,6	800	97,6	96,5	2841349	73	57
109	120	85,7	723	99	98,1	3427012	54	43
110	231	67,7	674	99	98	3292719	53	41
115	93,5	69	596	93	92	1995326	74	60

Tab. 21: Laufcharakteristika der ccfdNAs von 11 pHL-Patienten, die mittels *hybrid-capture*-basierter Methode untersucht wurden. PF: Passing Filter

Lauf	Fall Nr	<i>reads</i>	<i>reads</i> "PF"	Cluster Dichte [K/mm ²]	Q30 [%]
1	102;103;100;101;108	34523255	31295024	1436	93
2	105;106;104	35110923	31664192	1458	94
3	109;110	25292903	23996146	1054	96
4	115	33146059	30458388	1367	92,5

Tab. 22: Lauf- und Bibliothekcharakteristika der ccfdNAs von pHL-Patienten, die mittels *hybrid-capture* Methode durch das *Enrichment v3.0*-Programm ausgewertet wurde.

Fall Nr.	Ausgangs- konzentration DNA [ng/μl]	Bibliothekenkonz. [ng/μl]	Target Abdeckung	100x Abdeckung [%]	Uniformität [%]	Generierte Sequenzen	Anreicherung [%]	abgedeckte Basen aus <i>uniquen</i> Sequenzen
----------	--	------------------------------	------------------	-----------------------	--------------------	----------------------	---------------------	--

									[%]
101	15,9	74,2	1113	98	96	4307223	63	49	
104	0,75	68,9	333	96	97	1732864	48	36	
100	1,14	83	506	96	96	2270750	55	42	
103	4,83	37,2	728	97	96	3068881	58	45	
102	4,56	55,7	876	98	96	2807865	77	59	
105	2,4	89,7	665	98	97	2187906	76	57	
106	5,52	78,8	1202	98	96	3697720	80	62	
108	0,91	51,6	211	92	97	1552862	35	26	
109	1,6	82,2	439	97	97	1463065	76	57	
110	3,5	73	993	98	96	3067561	78	61	
115	1,93	66,3	524	97	97	1778243	74	55	

Tab. 23: Varianten (HL; ccfDNA), die mittels *hybrid-capture*-basiertem Verfahren detektiert wurden. KM: Keimbahn-Varianten, x: Variante wurde auch im FFPE-Gewebe detektiert, VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

Fall-Nr.	Gen	Variante	Chr.	Koordinate [hg19]	VAF [%]	Lesetiefe	Art der Abberation	Aminosäure-Austausch	KM	FFPE
100	KLHL6	c.807C>G	3	183225949	45,9	1391	missense	p.W169C	KM	x
	B2M	c.138T>A	15	45007691	13,9	873	stop	p.Y46*		x
	B2M	c.186T>G	15	45007739	11,9	1127	missense	p.N62K		x
	B2M	c.292T>G	15	45007845	13,4	1503	missense	p.Y98D		x
	SOCS1	c.263_271 del	16	11349064	5,6	357	inframe-deletion	p.GAHE0E		x
	SOCS1	c.193del	16	11349142	5,3	187	frameshift-deletion	p.R65del		x

Anhang

	STAT6	c.1256T>G	12	57496661	6,8	398	missense	p.D419A		x
	STAT6	c.1249T>A	12	57496668	6,1	392	missense	p.N417Y		x
101	SOCS1	c.375_412 del	16	11348962	2	131	frameshift-deletion	p.S125fs		
	ARID1A	c.670C>A	1	27023564	51,3	158	missense	p.P224T	KM	x
	CARD11	c.2173T>C	7	2962364	46,1	269	missense	p.S725G	KM	x
	KLF2	c.606T>G	19	16436556	40	71	missense	p.F202V	KM	x
	B2M	c.64C>T	15	45003808	8	100	stop	p.Q22*		x
	ITPKB	c.778_779 del	1	226924380	4,9	203	frameshift-deletion	p.G260fs		x
102	STAT6	c.1263A>T	12	57496654	8	623	missense	p.N421K		x
	TMEM30A	c.385G>A	6	75975015	5,9	474	stop	p.Q129*		x
	XPO1	c.1711C>T	2	61719472	6,3	599	missense	p.E571K		x
	SOCS1	c.349del	16	11348985	3,9	179	frameshift-deletion	p.V117fs		
	SOCS1	c.332_338 del	16	11349005	2,2	179	frameshift-deletion	p.C111fs		
	ARID1A	c.6259G>A	1	27106648	13,2	532	missense	p.G2087R		x
	B2M	c.37_38del	15	45003780	8,9	202	frameshift-deletion	p.L13fs		x
	B2M	c.23+1G>A	15	45003812	7,2	194	Spleißdonor			x
103	GNA13	c.985_995del	17	63010513	14,9	967	frameshift-deletion	p.CFRN332fs		x
	SOCS1	c.348G>C	16	11348988	3	951	missense	p.S116R		
	SOCS1	c.324_333 del	16	11349013	5	195	frameshift-deletion	p.Q108fs		
	TNFAIP3	c.2051_2052	6	138201351	4	1684	frameshift-deletion	p.Q684fs		

Anhang

	SOCS1	c.6_532del	16	11349333	1	600	frameshift-deletion	p.V2fs		
	SPEN	c.4910T>C	1	16257645	48,2	1314	missense	p.V1637A	KM	x
	IGLL5	c.302C>A	22	23235975	2,9	763	missense	p.T101N		x
	ITPKB	c.814T>C	1	226924345	1	515	missense	p.A272T		
	IRF4	c.295T>C	6	394899	1	1233	missense	p.C99R		
104	SOCS1	c.195_199 del	16	11349136	6,1	132	frameshift-deletion	p.R65fs		x
	IRF8	c.1258G>T	16	85954865	2	644	stop	p.E420*		x
	TNFAIP3	c.99+1G>T	6	138192660	2	964	Spleißdonor			x
	FAM46C	c.113G>A	1	118165603	50,1	729	missense	p.R38Q	KM	x
	B2M	c.204A>T	15	45007757	3,3	551	missense	p.K68N		x
105	ITPKB	c.1432G>A	1	226923728	3,9	412	missense	p.P478S		x
	PIM1	c.319C>T	6	37138397	6,2	258	missense	p.P107S		x
	MAP2K1	c.653C>G	15	66774177	0,1	1006	missense	p.S218C		x
	CD83	c.106A>G	6	14118249	10,6	905	missense	p.T36A		x
	STAT6	c.1249T>A	12	57496668	28,7	1820	missense	p.N417Y		x
106	TNFAIP3	c.99+1G>T	6	138192660	30,2	1107	Spleißdonor			x
	SOCS1	c.452_457 del	16	11348878	42,3	97	inframe-deletion	p.L151_152E		x
	MAP2K1	c.653C>G	15	66774177	50,3	1818	missense	p.S218C	KM	x
108	GNA13	c.1064_1065GA>TC	17	63010444	4,9	288	missense	p.I355R		x
	KMT2C	c.4778G>A	7	151884815	52,7	222	missense	p.S1593F	KM	x

Anhang

	KMT2D	c.5821T>C	12	49436390	52,6	249	missense	p.M1941V	KM	x
	TNFAIP3	c.548G>A	6	138196886	41	212	missense	p.R183Q	KM	x
	ARID1A	c.1916T>A	1	27059279	8,8	981	stop	p.L639*		x
	BTG1	c.109G>T	12	92539203	36,3	353	missense	p.L37M		x
	BTG1	c.31T>A	12	92539281	8,6	280	missense	p.M11L		
	BTG1	c.8G>T	12	92539304	24,7	198	missense	p.P3H		
109	KLHL6	c.42A>T	3	183273400	14,5	983	missense	p.D14E		
	SOCS1	c.380C>G	16	11348956	16,4	360	missense	p.R127P		x
	SOCS1	c.119_209 del	16	11349126	15,7	198	frameshift-deletion	p.R40fs		
	STAT6	c.1249T>A	12	57496668	26,2	1413	missense	p.N417Y		x
	TNFAIP3	c.162+1G>A	6	138196174	11,1	217	Spleißdonor			
	ITPKB	c.1498C>T	1	226923662	9,9	547	missense	p.G500S		x
	ITPKB	c.566C>T	1	226924594	57,6	165	missense	p.R189K	KM	x
110	HLA-A	c.876_877 insC	6	29912155	9,2	217	frameshift-insertion	p.K292fs		x
	TNFAIP3	c.680T>A	6	138197178	5,8	501	stop	p.L227*		x
	TRAF3	c.34G>A	14	103336572	48,5	679	missense	p.A12T	KM	x
	TP53	c.707T>G	17	7577574	10,1	464	missense	p.Y236S		x
	TBL1XR1	c.1192T>A	3	176752044	6,8	411	stop	p.K398*		
115	TBL1XR1	c.1171T>C	3	176752065	7,3	385	missense	p.N391D		
	CARD11	c.3139C>T	7	2951811	50,5	390	missense	p.A1047T	KM	x

SOCS1	c.144_149 del	16	11349186	31,6	57	inframe-deletion	p.PAP50P	KM	x
-------	------------------	----	----------	------	----	------------------	----------	----	---

Tab. 24: Patientendaten der pHL-Patienten (ccfDNA). NS: nodulär-sklerosierender Subtyp, MC: Mischtyp

Fall Nr.	Alter	Geschlecht	Subtyp	EBV	Stadium	Bulk	qPET
110	16	w	NS	neg	IIA	nein	0
104	17	m	MC	neg	IIIA	nein	0
101	11	w	NS	neg	IIA	nein	0,79
108	18	w	NS	neg	IIB	nein	0,91
100	17	w	NS	neg	IIBE	ja	1,05
105	17	w	NS	neg	IIA	ja	1,1
106	15	m	NS	neg	IIIB	ja	1,145
115	16	w	NS	neg	IIIB	ja	1,2
113	15	m	NS	neg	IIB	ja	1,22
111	14	m	MC	pos	IIA	ja	1,23
116	16	w	NS	pos	IIB	nein	1,3
107	16	w	NS	neg	IVAE	ja	1,35
109	17	w	MC	neg	IVBE	nein	1,8
118	5	m	MC	pos	IIBE	ja	3,25
120	16	m	NS	neg	IVBE	ja	3,3
121	13	w	NS	neg	IIIB	ja	3,83
119	15	m	NS	neg	IIB	ja	3,91

114	17	m	MC	neg	IIIB	ja	4,09
112	14	w	NS	neg	IIA	nein	4,26
117	10	m	NS	neg	IVBE	ja	4,71
102	14	w	NS	pos	IIA	ja	7,7
103	8	w	MC	pos	IIBE	ja	8,8

Tab. 25: Laufcharakteristika der ccfdNAs von pHL-Patienten, die durch das *hybrid-capture*-basierte Verfahren untersucht wurde. PF: Passing Filter

Lauf	Fall Nr.	<i>reads</i>	<i>reads</i> „PF“	Cluster Dichte [K/mm ²]	Q30 [%]
1	102;103;100 101;108	34523255	31295024	1436	93
2	116;105 106;104	35110923	31664192	1458	94
3	117;107;115	31888813	29421398	1328	95
4	110;109	25292903	23996146	1054	96
5	112;111	34481552	31498720	1434	94
6	114;113	29661328	27672136	1224	95,5
7	119	29324206	27029246	1229	95
8	118	31701757	29270076	1313	95
9	120;121	35413608	31981152	1493	93

Tab. 26: Bibliotheken- und Laufcharakteristika der ccfDNAs von pHL-Patienten, die mittels *hybrid-capture*-basierter Methode untersucht und durch das *Enrichment v3.0*-Programm ausgewertet wurden.

Fall Nr.	Ausgangs- konzentration DNA [ng/μl]	Bibliothekenkonz. [ng/μl]	Target Abdeckung	Uniformität [%]	100x Abdeckung [%]	Generierte Sequenzen	Anreicherung [%]	abgedeckte Basen aus <i>uniquen</i> Sequenzen [%]
102	1,14	83	506	96	96	2270750	55	42
103	4,83	37,2	728	96	97	3068881	58	45
112	2,2	72,8	1455	96	98	4723468	74	58
114	2,52	81,6	1142	95	98	4431499	63	49
118	4,56	41,5	1111	98	99	4705777	71	53
120	7,97	66,5	1085	95	98	4713615	67	52
121	2,4	58	1071	96	98	4350786	74	57
117	0,23	54,4	205	97	91	730779	72	53
119	1,3	81,6	593	98	99	2953122	60	45
111	0,74	29,3	612	96	97	2038423	73	57
110	1,93	66,3	524	97	97	1778243	74	55
113	10,8	79,8	1049	95	98	3972566	64	50
116	1,21	48,4	235	98	93	870363	68	51
100	15,9	74,2	1113	96	98	4307223	63	49
101	0,75	68,9	333	97	96	1732864	48	36
105	2,4	89,7	665	97	98	2187906	76	57
106	5,52	78,8	1202	96	98	3697720	80	62

107	0,7	66,8	147	98	84	549081	69	51
108	0,91	51,6	211	97	92	1552862	35	26
115	1,6	82,2	439	97	97	1463065	76	57
104	4,56	55,7	876	96	98	2807865	77	59
109	3,5	73	993	96	98	3067561	78	61

Tab. 27: Varianten der 22 pHL-Patienten (ccfDNA), die mittels *hybrid-capture* Methode detektiert wurden. VAF: Varianten-Allelfrequenz, KM: Keimbahn-Varianten, x: durch Sanger-Sequenzierung validierte Varianten, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

Fall Nr.	Gen	Variante	Chr.	Koordinate [hg19]	VAF [%]	Lese-tiefe	Art der Abberation	Aminosäure Austausch	KM	durch Sanger Seq an mikro-dissektierten Zellen validiert
100	KLHL6	c.807C>G	3	183225949	45,9	1391	missense	p.W269C	KM	
	SOCS1	c.193del	16	11349142	5,3	187	frameshift-deletion	p.R65fs		
	SOCS1	c.263_271del	16	11349064	5,6	357	inframe-deletion	p.GAHE91E		
	B2M	c.186T>G	15	45007739	11,9	1127	missense	p.N62K		x
	B2M	c.292T>G	15	45007845	13,4	1503	missense	p.Y98D		
	B2M	c.138T>A	15	45007691	13,9	873	stop	p.Y46*		x
101	SOCS1	c.375_412del	16	11348962	2	131	frameshift-deletion	p.S125fs		
	STAT6	c.1256T>G	12	57496661	6,8	398	missense	p.D419A		x
	STAT6	c.1249T>A	12	57496668	6,1	392	missense	p.N417Y		x
	ARID1A	c.670C>A	1	27023564	51,3	158	missense	p.P224T	KM	
	CARD11	c.2173T>C	7	2962364	46,1	269	missense	p.S725G	KM	
102	ITPKB	c.778_779del	1	226924380	4,9	203	frameshift-deletion	p.G260fs		x

Anhang

	SOCS1	c.349del	16	11348985	3,9	179	frameshift-deletion	p.V117fs	
	SOCS1	c.332_338del	16	11349005	2,2	179	frameshift-deletion	p.C111fs	
	STAT6	c.1263A>T	12	57496654	8	623	missense	p.N421K	x
	XPO1	c.1711C>T	2	61719472	6,3	599	missense	p.E571K	x
	B2M	c.64C>T	15	45003808	8	100	stop	p.Q22*	
	TMEM30A	c.385G>A	6	75975015	5,9	474	stop	p.Q129*	
	B2M	c.37_38del	15	45003780	8,9	202	frameshift-deletion	p.L13fs	
	GNA13	c.985_995del	17	63010513	14,9	967	frameshift-deletion	p.CFRN332fs	x
	SOCS1	c.324_333del	16	11349013	5	195	frameshift-deletion	p.Q108fs	
	TNFAIP3	c.2051_2052del	6	138201351	4	1684	frameshift-deletion	p.Q684fs	
103	SOCS1	c.6_532del	16	11349333	1	600	frameshift-deletion	p.V2fs	
	ARID1A	c.6259G>A	1	27106648	13,2	532	missense	p.G2087R	x
	SOCS1	c.348G>C	16	11348988	3	951	missense	p.S116R	
	SPEN	c.4910T>C	1	16257645	48,2	1314	missense	p.V1637A	KM
	B2M	c.23+2A>C	15	45003812	7,2	194	Spleißdonor		
	SOCS1	c.195_199del	16	11349136	6,1	132	frameshift-deletion	p.R65fs	
	IGLL5	c.302C>A	22	23235975	2,9	763	missense	p.T101N	
104	ITPKB	c.814T>C	1	226924345	1	515	missense	p.A272T	
	IRF4	c.295T>C	6	394899	1	1233	missense	p.C99R	
	FAM46C	c.113G>A	1	118165603	50,1	729	missense	p.R38Q	KM
	TNFAIP3	c.99+1G>T	6	138192660	2	964	Spleißdonor		

Anhang

	IRF8	c.1258G>T	16	85954865	2	644	stop	p.E420*	
105	B2M	c.204A>T	15	45007757	3,3	551	missense	p.K68N	x
	ITPKB	c.1432G>A	1	226923728	3,9	412	missense	p.P478S	x
	PIM1	c.319C>T	6	37138397	6,2	258	missense	p.P107S	x
	MAP2K1	c.653C>G	15	66774177	0,1	1006	missense	p.S218C	
106	SOCS1	c.452_457del	16	11348878	42,3	97	inframe-deletion	p.L151_152E	x
	CD83	c.106A>G	6	14118249	10,6	905	missense	p.T36A	x
	STAT6	c.1249T>A	12	57496668	28,7	1820	missense	p.N417Y	x
	MAP2K1	c.653C>G	15	66774177	50,3	1818	missense	p.S218C	KM
	TNFAIP3	c.99+1G>T	6	138192660	30,2	1107	Spleißdonor		x
107	SOCS1	c.358del	16	11348977	2,4	84	frameshift-deletion	p.A120fs	
	SPEN	c.3271_3272 CT>GC	1	16256006	47,6	147	missense	p.L1091A	KM
	NOTCH2	c.7060G>C	1	120458285	47,6	126	missense	p.P2354A	KM
	KMT2C	c.8434G>A	7	151874104	50,7	144	missense	p.P2812S	KM
	CDH2	c.2435C>T	18	25543400	9,2	173	missense	p.R812K	x
108	GNA13	c.1064_1065 GA>TC	17	63010444	4,9	288	missense	p.I355R	x
	KMT2C	c.4778G>A	7	151884815	52,7	222	missense	p.S1593F	KM
	KMT2D	c.5821T>C	12	49436390	52,6	249	missense	p.M1941V	KM
	TNFAIP3	c.548G>A	6	138196886	41	212	missense	p.R183Q	KM
109	SOCS1	c.119_209del	16	11349126	15,7	198	frameshift-deletion	p.R40fs	

	BTG1	c.109G>T	12	92539203	36,3	353	missense	p.L37M	
	BTG1	c.31T>A	12	92539281	8,6	280	missense	p.M11L	
	BTG1	c.8G>T	12	92539304	24,7	198	missense	p.P3H	
	KLHL6	c.42A>T	3	183273400	14,5	983	missense	p.D14E	
	SOCS1	c.380C>G	16	11348956	16,4	360	missense	p.R127P	
	STAT6	c.1249T>A	12	57496668	26,2	1413	missense	p.N417Y	
	TNFAIP3	c.162+2G>T	6	138196174	11,1	217	Spleißdonor		
	ARID1A	c.1916T>A	1	27059279	8,8	981	stop	p.L639*	
	HLA-A	c.876_877insC	6	29912155	9,2	217	frameshift-insertion	p.K292fs	
	ITPKB	c.1498C>T	1	226923662	9,9	547	missense	p.G500S	x
110	ITPKB	c.566C>T	1	226924594	57,6	165	missense	p.R189K	KM
	TRAF3	c.34G>A	14	103336572	48,5	679	missense	p.A12T	KM
	TP53	c.707T>G	17	7577574	10,1	464	missense	p.Y236S	x
	TNFAIP3	c.680T>A	6	138197178	5,8	501	stop	p.L227*	x
	SOCS1	c.484_485dupl	16	11348851	7	57	frameshift-duplikation	p.L162fs	
111	SOCS1	c.407T>G	16	11348929	11,4	193	missense	p.H136P	x
	SOCS1	c.609G>T	16	11348727	14	143	stop	p.Y203*	
	LTB	c.90A>C	6	31550106	14,9	959	missense	p.V30G	
112	LTB	c.12A>T	6	31550184	8,8	554	missense	p.L4E	
	B2M	c.37_38del	15	45003780	6,7	464	frameshift-deletion	p.L13fs	
	SOCS1	c.22_26del	16	11349309	4,2	499	frameshift-deletion	p.AA9fs	

	SOCS1	c.259_271del	16	11349064	5,3	561	frameshift-deletion	p.HGAHE91fs	
	ACTG1	c.230G>A	17	79479062	7,2	1147	missense	p.T77I	
	HIST1H1 E	c.653A>C	6	26157271	4,1	437	missense	p.K218T	
	SOCS1	c.46C>T	16	11349290	5,3	412	missense	p.A16T	
	HIST1H1 E	c.502A>T	6	26157120	6,2	1008	stop	p.K168*	
	BTG1	c.3G>A	12	92539308	5,1	272	missense	p.M1K	
	TNFAIP3	c.338_354del	6	138196023	9,1	646	frameshift-deletion	p.WGVQDT113fs	
113	ATM	c.1464G>T	11	108121656	63	985	missense	p.W488C	KM
	BIRC3	c.445A>G	11	102195685	4,5	1187	missense	p.R149G	
	ITPKB	c.266C>G	1	226924894	25,2	147	missense	p.G89A	
	ITPKB	c.65C>T	1	226925095	20,9	201	missense	p.S22N	
	KMT2D	c.6205C>T	12	49435467	5,6	1009	missense	p.A2069T	
	GNA13	c.892_894del	17	63010614	10,7	998	inframe-deletion	p.E298-	
114	CREBBP	c.2950T>A	16	3819285	47,8	975	missense	p.N984Y	KM
	IGLL5,IG LJ1	c.317C>T	22	23235990	7	1355	missense	p.T106I	
	PRDM1	c.308G>C	6	106543506	2,5	1632	missense	p.S103T	
	SALL3	c.2306C>T	18	76754297	49,7	1398	missense	p.T769M	KM
	SPEN	c.5948C>T	1	16258683	8	1355	missense	p.S1983L	
115	SOCS1	c.144_149del	16	11349186	31,6	57	inframe-deletion	p.PAP50P	KM
	TBL1XR1	c.1171T>C	3	176752065	7,3	385	missense	p.N391D	

x

Anhang

	CARD11	c.3139C>T	7	2951811	50,5	390	missense	p.A1047T	KM
	TBL1XR1	c.1192T>A	3	176752044	6,8	411	stop	p.K398*	
117	TP53	c.847G>A	17	7577091	43,8	251	missense	p.R283C	KM
	SOCS1	c.37_38insCTGCA TTGTCGG	16	11349298	3,7	481	inframe-insertion	p.V13ADNAV	
118	SOCS1	c.364C>T	16	11348972	4,9	800	missense	p.G122R	
	HLA-A	c.532G>T	6	29911233	9,9	497	stop	p.E178*	
	CDK4	c.405A>G	12	58144825	6,3	1142	missense	p.C135R	
	SOCS1	c.429del	16	11348906	20,5	922	frameshift-deletion	p.S143fs	
	SOCS1	c.27_636+8del	16	11349309	19	781	frameshift-deletion	p.A9fs	
	EZR	c.1142C>T	6	159190925	67,1	1823	missense	p.R381Q	KM
	GNA13	c.1033G>T	17	63010476	19,9	1657	missense	p.H345N	
	IGLL5,IG LC1	c.512A>G	22	23237741	1,8	2062	missense	p.N171S	
120	NOTCH1	c.4771G>A	9	139399372	22,3	1166	missense	p.H1591Y	
	STAT6	c.1259T>C	12	57496658	24,9	1721	missense	p.N420S	
	STAT6	c.1249T>A	12	57496668	25,9	1596	missense	p.N417Y	
	B2M	c.23+2T>A	15	45003813	7,4	755	Spleißdonor		
	B2M	c.187G>T	15	45007740	16,1	483	stop	p.G63*	
	TNFAIP3	c.1564C>T	6	138200146	34,2	263	stop	p.Q522*	
	GNA13	c.1132A>G	17	63010377	22,2	735	stop	p.*378R	
121	TNFAIP3	c.1245_1248del	6	138199826	6,6	821	frameshift-deletion	p.QN415fs	

HLA-A	c.149G>A	6	29910609	11,3	868	missense	p.G50D
IGLL5	c.58C>T	22	23230291	9,6	1360	missense	p.P20S
IGLL5	c.62_63GG>AA	22	23230295	8,9	1384	missense	p.R21K
IGLL5	c.115C>A	22	23230348	9,3	1514	missense	p.L39M
IGLL5	c.124A>T	22	23230357	12,1	1606	missense	p.M42L
KLF2	c.469G>A	19	16436420	21,6	74	missense	p.A157T
SOCS1	c.623G>A	16	11348713	15,5	1202	missense	p.P208L
SOCS1	c.460A>T	16	11348876	13,3	633	missense	p.Y154N
SOCS1	c.257A>T	16	11349079	19,6	547	missense	p.V86E
ARID1A	c.3514C>T	1	27099098	11,1	1622	stop	p.Q1172*

Tab. 28: VDJ-Rekombinationen (pHL-Patienten, ccfDNA), die mittels *hybrid-capture*-basiertem Verfahren detektiert wurden. R/S: *Replacement-/silent mutations*, FR: *Framework-Region*, CDRIII: *complementary-determining-region-III*

Fall-Nr.	VDJ	Mutations- frequenz [%]	R/S FR I-III	Länge der eingefangenen/amplifizierten VH- Fragmente
Lange VH-Amplifikate, potenziell funktional (CDRIII, if, no stops) Amplifiziert mit FRI und CDRIII klonotypische Primer				
103	VH1-69/DH2-15/JH3	12,8	12/2	72/218
110	VH3-30/DH2-21/JH4	10	10/6	36/222
111	VH4-31/DH4-17/JH5	3,1	3/2	34/227
106	VH4-34/DH5-18/JH4	5,3	4/3, 1 stop	73/198
Summe			29/13	
Kurze Amplifikate, potenziell funktional (CDRIII, if, no stops) Nur eingefangene Fragmente				
113	VH3-25/DH3-9/JH3	7	0/1	14/-

Summe

0/1

Tab. 29: Auswertung der PSR-Färbungen (qPET >3 und <3-Patienten) mittels des Programmes QuPath. NS: Nodulär-sklerosierender Subtyp, MC: Mischtyp

Fall Nr.	qPET	Subtyp	ausgewertete Zellzahl	PSR pos. Zellen	proz. Anteil an PSR pos. Zellen
187		MC	12.735	4.660	36,59
189	>3	MC	14.345	4.643	32,37
186		MC	22.029	4.852	22,03
Mittelwert			16.370	4.718	28,82
190		MC	14.488	164	1,13
162	<3	MC	19.574	8	0,04
170		MC	7.043	4	0,06
173		MC	37.786	167	0,44
Mittelwert			19.723	86	0,42
188	>3	NS	213.022	48.818	22,92
200	<3	NS	55.850	6	0,01

Tab. 30: Patientendaten der 11 untersuchten pHL-Patienten, deren ccfDNAs für das WES verwendet wurden.

Fall Nr.	Alter	Geschlecht	Stadium	Bulk	qPET	Subtyp	EBV
100	17	w	IIBE	ja	1,05	NS	neg
102	14	w	IIA	ja	7,7	NS	pos
106	15	m	IIIB	ja	1,145	NS	neg
122	10	w	IIIA	nein	0.6	NS	neg
123	16	m	IIA	ja	1,8	NS	neg
124	11	w	IIBE	ja	1.07	NS	pos
125	17	m	IIB	nein	1,56	NS	neg
126	17	w	IIA	nein	0,96	NS	neg

127	17	w	IIAE	ja	1,19	NS	neg
128	13	w	IIIA	ja	1,03	NS	neg
129	3	m	IIAE	nein	1,08	NS	pos

Tab. 31: Laufcharakterika der ccfDNAs von 11 pHL-Patienten, die mittels WES untersucht wurden. PF: Passing Filter

Lauf	Fall Nr.	<i>reads</i>	<i>reads</i> PF	Identifizierte <i>reads</i> je Fall (PF)	Cluster Dichte [K/mm ²]	Q30 [%]
1	102	376431189	619827416	132.377.272	210	90,5
	100			142.698.794		
2	106	335797528	553169682	151.268.222	180	92,9
	122			75.521.157		
3	123	348789586	463089668	127.349.658	185	93,8
	124			179.215.701		
4	125	316870546	335797528	157.585.868	220	91,8
	126			194.252.236		
5	127	324880478	516764441	304.791.170	225	90,1
	128			290.072.022		
	129			438.665.690		

Tab. 32: Bibliotheken- und Laufcharakteristika der ccfDNAs von 11 untersuchten pHL-Patienten (ccfDNA), die mittels *hybrid-capture*-basierter Methode (WES) untersucht wurden.

Fall Nr.	Ausgangs- konzentration der	Bibliothekenkonz. [ng/ μ l]	Target Abdeckung	Uniformität [%]	100x Abdeckung	Generierte Sequenzen	Anreicher-ung [%]	abgedeckte Basen aus <i>uniquen reads</i>
----------	--------------------------------	------------------------------------	---------------------	--------------------	-------------------	-------------------------	----------------------	--

	DNA [ng/μl]								
102	1,14	83	369	90	82	181.378.307	58	58	
100	15,9	74,2	314	90	83	165.811.281	73	60	
106	5,52	78,8	353	90	85	164.598.407	83	68	
122	3,56	99,1	329	88	73	111.515.482	79	64	
123	6,226	83,8	328	92	88	160.441.843	79	64	
124	4,09	86,4	439	92,5	91,5	219.825.054	77	61	
125	0,345	89,5	321	93	57	69.627.573	69	70	
126	0,552	111	390	92,3	77	104.776.656	71	71	
127	2,01	116	331	92	88	193.207.849	66	53	
128	1,53	77,3	397	91	88	201.098.620	75	62	
129	1,78	79,1	508	91	91	289.653.253	67	55	

Tab. 33: Varianten (tNGS) der 11 pHL-Patienten, die durch WES untersucht wurden. X: Varianten, die auch im WES ungefiltert bzw. gefiltert vorkamen, VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

Fall- Nr.	Gen	Variante	Chr	Koordinate [hg19]	VAF [%]	Lesetiefe	Art der Abberation	Aminosäure-Austausch	WES	WES gefiltert
	BTG1	c.114C>A	12	92539198	26,8	157	missense	p.Q38H	X	X
	B2M	c.68-2A>G	15	45007619	7,8	103	Spleißacceptor		X	X
125	SOCS1	c.585_594del	16	11348754	9,9	161	frameshift-deletion	p.P195fs		
	SOCS1	c.199_209del	16	11349126	14,3	70	frameshift-deletion	p.I67fs		
	SOCS1	c.8G>T	16	11349328	8,9	79	missense	p.A3E		
	IGLL5	c.139A>T	22	23230372	27,1	251	missense	p.S47C	X	X

	TNFAIP3	c.106_112del	6	138192469	8,8	204	frameshift-deletion	p.I36fs	X	X
	STAT6	c.1262T>C	12	57496655	23,8	474	missense	p.N421S	X	X
	STAT6	c.1249T>A	12	57496668	23,3	510	missense	p.N417Y	X	
	CCND3	c.847T>C	6	41903710	29	238	missense	p.T283A	X	X
	CIITA	c.25G>A	16	10971212	9	476	missense	p.A9T	X	X
	NFKBIA	c.202G>A	14	35873649	4,9	204	stop	p.Q68*		
	NFKBIA	c.193G>A	14	35873658	5,2	213	missense	p.P65S		
126	NFKBIA	c.148G>A	14	35873703	16,6	205	stop	p.Q50*	X	X
	SOCS1	c.414_427del	16	11348908	14,6	206	frameshift-deletion	p.D138fs	X	X
	SOCS1	c.381_382del	16	11348953	9,5	242	frameshift-deletion	p.R127fs	X	X
	SOCS1	c.202T>A	16	11349134	13,2	129	missense	p.T68S	X	X
	SOCS1	c.48_192del	16	11349143	11,5	113	frameshift-deletion	p.A16fs	X	X
	SOCS1	c.174G>C	16	11349162	9,1	121	missense	p.F58L	X	X
129	SOCS1	c.533_544delins	16	11348791	9,6	697	inframe-deletion	p.C179_182IdelinsLY	X	X
	SOCS1	c.429_449delinsCA	16	11348886	12,6	793	frameshift-deletion	p.F144fs	X	X
	B2M	c.26_41del	15	45003769	6,8	279	frameshift-deletion	p.V9fs	X	X
	EZR	c.17T>C	6	159210399	33,5	782	missense	p.N6S	X	X
127	GNA13	c.44del	17	63052667	20,8	284	frameshift-deletion	p.F15fs	X	X
	GNA13	c.39_40AA>CC	17	63052672	25,8	248	missense	p.VC13_14GG	X	X
	IGLL5	c.95C>A	22	23230328	7,3	945	missense	p.A32D	X	X
	IGLL5	c.133C>T	22	23230366	7,5	935	missense	p.P45S	X	X

	IGLL5	c.166G>C	22	23230399	9,4	913	missense	p.V56L	X	X
	PTPN1	c.769C>T	20	49195771	23,5	884	missense	p.R257W	X	X
	SOCS1	c.191_257delinsGC	16	11349080	7,3	341	frameshift-deletion	p.Y64fs	X	X
	SOCS1	c.211_220del	16	11349115	15,1	305	frameshift-deletion	p.S71fs	X	X
	SOCS1	c.33A>T	16	11349303	12,9	286	missense	p.N11K	X	X
	SOCS1	c.8G>A	16	11349328	6,3	317	missense	p.A3V	X	X
	STAT6	c.1246C>A	12	57496671	18,7	1371	missense	p.G416C	X	X
	TNFAIP3	c.636+2T>C	6	138200490	23	469	Spleißdonor		X	X
	TNFRSF14	c.681A>T	1	2493241	17,3	590	missense	p.R227S	X	X
	B2M	c.23-2A>G	15	45007619	21,5	582	Spleißacceptor		X	X
	DDX3X	c.1126C>T	X	41204533	3,7	984	missense	p.R376C	X	X
	IGLL5	c.88G>C	22	23230321	13,7	2116	missense	p.G30R	X	X
	IGLL5	c.118C>T	22	23230351	19,8	2098	missense	p.R40C	X	X
	IGLL5	c.161C>T	22	23230394	11,2	2203	missense	p.A54V	X	X
128	KLF2	c.152_157del	19	16436102	13,7	983	inframe-deletion	p.G52_53if	X	X
	KMT2C	c.2765G>C	7	151932906	3,2	1550	missense	p.P922R		
	KMT2D	c.4025G>A	12	49442548	18,8	2043	missense	p.A1342V	X	X
	SOCS1	c.632A>G	16	11348704	11,1	1569	missense	p.I211T	X	X
	SOCS1	c.189_287del	16	11349048	8,5	649	inframe-deletion	p.D63_95Aif	X	X
	SOCS1	c.182_183del	16	11349152	17,4	569	frameshift-deletion	p.H61fs	X	X
	SOCS1	c.33A>T	16	11349303	14,1	730	missense	p.N11K	X	X

	ACTG1	c.268G>A	17	79479024	6	352	missense	p.F90L	X	X
	ACTG1	c.245A>C	17	79479047	6,4	392	missense	p.M82R	X	X
	ARID1A	c.2313A>T	1	27088704	5,1	983	missense	p.L771F	X	X
	ARID1A	c.2378T>C	1	27088769	5,2	923	missense	p.M793T	X	X
	CSF2RB	c.2431G>T	22	37334281	5,5	945	stop	p.E811*	X	X
	HIST1H1D	c.305G>A	6	26234857	11,9	477	missense	p.A102V	X	X
	IGLL5	c.113T>A	22	23230346	6,2	959	missense	p.L38Q	X	X
	ITPKB	c.772C>T	1	226924388	5,6	682	missense	p.E258K		
	NFKBIE	c.1099T>A	6	44229372	6,6	593	missense	p.N367Y	X	X
	NFKBIE	c.261-1C>T	6	44230400	3,2	468	Spleißacceptor		X	X
124	PTPN1	c.253C>T	20	49181604	5,6	286	stop	p.Q85*	X	X
	PTPN1	c.554C>T	20	49195018	5,9	699	missense	p.P185L	X	X
	SOCS1	c.464A>T	16	11348872	10	472	missense	p.V155E		
	SOCS1	c.396_397insG	16	11348939	6,3	539	frameshift-insertion	p.G133fs	X	X
	SOCS1	c.352T>G	16	11348984	3,8	586	missense	p.K118Q		
	SOCS1	c.272T>C	16	11349064	3,2	441	missense	p.E91G		
	SOCS1	c.197C>A	16	11349139	2,8	573	missense	p.R66L		
	SOCS1	c.346_359dup	16	11348987	3,8	598	dupl	p.F116fs		
	SPEN	c.1452T>A	1	16245477	7,9	190	stop	p.C484*	X	X
	TNFAIP3	c.401_402del	6	138196086	4,8	735	frameshift-deletion	p.D134fs		
	XPO1	c.1711C>T	2	61719472	25,3	1125	missense	p.E571K	X	X

Anhang

	B2M	c.20T>G	15	45003764	16,6	205	stop	p.L7*	X	X
	CSF2RB	c.2479G>A	22	37334329	37,4	776	missense	p.G827S	X	X
	DDX3X	c.1583G>A	X	41205843	20,9	513	missense	p.R528	X	X
	ITPKB	c.56T>C	1	226925104	8	263	missense	p.E19G	X	X
	LTB	C.131A>T	6	31550064	24,3	469	missense	p.L44Q	X	X
123	MAP2K1	c.140G>A	15	66727424	8,9	788	missense	p.R47Q	X	X
	NFKBIE	c.758_762del	6	44232738	32,6	224	frameshift-deletion	p.Y254fs	X	X
	SMARCA4	c.2575A>G	19	11130336	17,8	404	missense	p.T859A	X	X
	SOCS1	c.16G>A	16	11349320	20,5	347	stop	p.Q6*		
	STAT6	c.1256T>C	12	57496661	17,4	792	missense	p.D419G	X	X
	STAT6	c.1249T>C	12	57496668	17,7	784	missense	p.N417D	X	
	ITPKB	c.1472G>C	1	226923688	9,7	599	missense	p.P491R		
	ITPKB	c.1461_1469del	1	226923690	6,1	560	inframe-deletion	p.D487_489Kdel		
122	KMT2C	c.12642G>C	7	151848551	3,8	810	missense	p.F4214L		
	TRAF3	c.227G>A	14	103336765	12,8	721	missense	p.C76Y	X	X
	SOCS1	c.418_431del	16	11348917	1,26	139	frameshift-deletion	p.S140fs		
	ITPKB	c.778_779del	1	226924380	4,9	203	frameshift-deletion	p.G260fs		
	SOCS1	c.349del	16	11348987	3,9	179	frameshift-deletion	p.V117fs		
102	SOCS1	c.332_338del	16	11349004	2,2	179	frameshift-deletion	p.C111fs		
	STAT6	c.1263A>T	12	57496654	8	623	missense	p.N421K	X	X
	TMEM30A	c.385G>A	6	75975015	5,9	474	stop	p.Q129*	X	X

	XPO1	c.1711C>T	2	61719472	6,3	599	missense	p.E571K	X	X
	B2M	c.64C>T	15	45009807	8	100	missense	p.Q22*	X	X
100	B2M	c.138T>A	15	45007691	13,9	873	stop	p.Y46*	X	X
	B2M	c.186T>G	15	45007739	11,9	1127	missense	p.N62K	X	X
	B2M	c.292T>G	15	45007845	13,4	1503	missense	p.Y98D	X	X
	SOCS1	c.263_271del	16	11349064	5,6	357	inframe-deletion	p.G88_90Hdel		
	CD83	c.106A>G	6	14118249	10,6	905	missense	p.T36A		
106	STAT6	c.1249T>A	12	57496668	28,7	1820	missense	p.N417Y	X	
	TNFAIP3	c.99+1G>T	6	138192660	30,2	1107	Spleißdonor			

Tab. 34: Laufcharakteristika der gDNAs der 8 untersuchten pHL-Patienten (FFPE-Gewebe; RNA-Seq). PF: Passing Filter

Fall Nr.	Ausgangs-Konz. DNA [µg/ml]	Bibliotheken [µg/ml]	Konz. Bibliotheken-Pool [µg/ml]	Q30 [%]	Cluster Dichte [K/mm ²]	Identifizierte reads „PF“	Identifizierte reads [%]
102	1,14	8,12	9,04	96	155	127.749.760	41
100	8,05	69,4					56
106	17,1	74,9					33
122	21,6	55	5,4	95,5	160	131.249.578	63
127	0,1	12,1	15,8	92,5	245	558.496.432	12,9
128	6	60,6					25,7
129	4,8	65,6					14,7
124	4,4	51,6					18

Tab 35: Indels und SNVs der cfdDNAs von 11 untersuchten pHL-Patienten (WES). VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

Fall Nr	Gen	Variante	Chr.	Koordinate [hg19]	VAF [%]	Lesetiefe	Art der Abberation	Aminosäure- Austausch
---------	-----	----------	------	----------------------	------------	-----------	--------------------	--------------------------

Anhang

122	MMP19	c.112del	12	56236197	30,2	182	frameshift-deletion	p.L38fs
	RIC1	c.2061C>G	9	5762608	7,7	181	stop	p.S687*
124	CBWD3	c.144+2T>C	9	70863815	6,3	1070	Spleißdonor	
	CBWD6	c.141+2A>G	9	69255602	6,7	1078	Spleißdonor	
	HERC2	c.4128G>A	15	28479308	7,5	1370	stop	p.R1376*
	PTPN1	c.255C>T	20	49181604	5,6	216	stop	p.Q85*
128	RPL29	c.393insCCTTGG	3	52027853	33,8	145	inframe-insertion	p.D131if
	TRAF1	c.537G>A	9	123675776	29,2	216	stop	p.Q179*
127	SENP5	c.1152del	3	196613201	33,3	123	inframe-deletion	p.T384if
	NUTM2F	c.2085_2086del	9	97080926	7,3	398	inframe-deletion	p.S695if
	ZNF302	c.4-1G>A	19	35173680	26,1	238	Spleißacceptor	
	DHRS4	c.477C>T	14	24435037	6,1	374	stop	p.R159*
	ANKRD17	c.7218G>T	4	73944550	18,1	392	stop	p.S2406*
106	TMEM120B	c.669del	12	122209443	22,3	314	frameshift-deletion	p.S223fs
	SHPRH	c.1653del	6	146264850	33,4	296	inframe-deletion	p.L551if
	RGP1	c.474del	9	35750971	33,9	186	inframe-deletion	p.V158if
	HYDIN	c.685+1C>T	16	71103169	28,1	231	Spleißdonor	
	DCPS	c.456C>T	11	126201377	24	129	stop	p.R152*
	CNTNAP3B	c.3150C>T	9	43905756	10,5	627	stop	p.R1050*
129	WDR55,DND1	c.855C>T	5	140051086	11,3	780	stop	p.W285*
	GSE1	c.1041_1042del	16	85690000	33,5	406	inframe-deletion	p.E347if

	PIEZO1	c.4407_4408del	16	88789666	28,5	214	inframe-insertion	p.A1469if
	CCBL2,RBMXL1	c.771G>T	1	89448740	6,1	970	stop	p.S257*
100	FADS2	c.795del	11	61624532	5,7	140	inframe-deletion	p.Y265if
102	NUTM2F	c.2085del	9	97080926	8,7	196	inframe-deletion	p.S695if
	ME2	c.210+1G>T	18	48443879	32,8	186	Spleißdonor	

Tab. 36: Austausch-Varianten der ccfDNAs von 11 pHL-Patienten (WES). VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

Fall-Nr.	Gen	Variante	Chr.	Koordinate [hg19]	VAF [%]	Lesetiefe	Art der Abberation	Aminosäure-Austausch
122	SYNE1	c.37086C>A	6	152658141	24,6	203	missense	p.K12362S
124	ADRM1	c.3570A>C	20	60883783	12,5	337	missense	p.K1190T
	ANKRD36	c.17229A>G	2	97915323	13	779	missense	p.I5743V
	ANKRD36B	c.11937T>C	2	98124086	10,1	766	missense	p.I3979V
	CES1	c.102A>C	16	55866934	5,1	602	missense	p.S34A
	LILRA6	c.3675A>T	19	54744182	6,3	524	missense	p.F1225H
128	ARL17A	c.1221C>T	17	44634849	6,2	990	missense	p.G407D
	BCL7A	c.69C>G	12	122460020	24,3	189	missense	p.A23G
127	SIRPA	c.861T>C	20	1895952	8,2	158	missense	p.L287P
106	FOXD4L6	c.717G>A	9	69201374	9,2	218	missense	p.P239L
	SPANXA2-OT1	c.714A>T	X	140671915	6,7	404	missense	p.L238D
	SPATA31C2	c.1761G>A	9	90747365	31,7	432	missense	p.S587F
129	LRRC37A3	c.1655G>A	17	62891721	9	2055	missense	p.T1655I

100	LTBP2	c.2961C>A	14	75022240	34,7	101	missense	p.Q987H
	TPSB2	c.1188G>C	16	1279295	11,4	123	missense	p.N396K
102	A2M	c.7260G>A	12	9243846	7	329	missense	p.A2420V
	CHRNA7	c.3543G>C	15	32460244	15,8	184	missense	p.S1181T
	LILRA1	c.2349A>G	19	55107225	5,4	149	missense	p.GE783GG
	LILRA1	c.2343G>T	19	55107223	33,3	147	missense	p.G781W
	LRRC37A3	c.4962T>C	4	62891722	9,1	1057	missense	p.T1654A

Tab. 37: Variantenliste der putativen Varianten, die durch WES detektiert und durch RNA Seq bestätigt wurden. VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

Fall-Nr.	Gen	Variante	Chr.	Koordinate [hg19]	VAF [%]	Lesetiefe	Art der Abberation	Aminosäure-Austausch
122	MMP19	c.114del	12	56236197	30,2	182	frameshift-deletion	p.L38fs
	RIC1	c.2061C>G	9	5762608	7,7	181	stop	p.S687*
	SYNE1	c.12363CT>AC	6	152658141	24,6	203	missense	p.K4121S
124	ADRM1	c.1191A>C	20	60883783	12,5	337	missense	p.K397T
	ANKRD36	c.5745A>G	2	97915323	13	779	missense	p.I1915V
	ANKRD36B	c.3981T>C	2	98124086	10,1	766	missense	p.I1327V
	CBWD3	c.144+2T>C	9	70863815	6,3	1070	Spleißdonor	
	CBWD6	c.141+2A>G	9	69255602	6,7	1078	Spleißdonor	
	CES1	c.36A>C	16	55866934	5,1	602	missense	p.S12A
	HERC2	c.4128G>A	15	28479308	7,5	1370	stop	p.R1376*

Anhang

	LILRA6	c.147A>G	19	54744182	6,3	524	missense	p.F409H
128	ARL17A	c.408C>T	17	44634849	6,2	990	missense	p.G136D
	BCL7A	c.24C>G	12	122460020	24,3	189	missense	p.A8G
	RPL29	c.393_394insCCTTGG	3	52027853	33,8	145	inframe-insertion	p.D131if
	TRAF1	c.537G>A	9	123675776	29,2	216	stop	p.Q179*
127	ANKRD17	c.7218G>T	4	73944550	18,1	392	stop	p.S2406*
	DHRS4	c.477C>T	14	24435037	6,1	374	stop	p.R159*
	NUTM2F	c.2085_2086del	9	97080926	7,3	398	inframe-deletion	p.S695if
	SENP5	c.1152del	3	196613201	33,3	123	inframe-deletion	p.T384if
	SIRPA	c.288T>C	20	1895952	8,2	158	missense	p.L96P
	ZNF302	c.4+1G>A	19	35173680	26,1	238	Spleißacceptor	
106	FOXD4L6	c.240G>A	9	69201374	9,2	218	missense	p.P80L
	CNTNAP3B	c.3150C>T	9	43905756	10,5	627	stop	p.R1050*
	DCPS	c.456C>T	11	126201377	24	129	stop	p.R152*
	HYDIN	c.685+1C>T	16	71103169	28,1	231	Spleißdonor	
	PTPN1	c.798C>T	20	49195798	27,1	199	stop	p.Q266*
	RGP1	c.474del	9	35750971	33,9	186	inframe-deletion	p.V158if
	SHPRH	c.1653_1658del	6	146264850	33,4	296	inframe-deletion	p.L551if
	SPANXA2-OT1	c.240A>T	X	140671915	6,7	404	missense	p.L80D
	SPATA31C2	c.588G>A	9	90747365	31,7	432	missense	p.S196F
	TMEM120B	c.669del	12	122209443	22,3	314	frameshift-deletion	p.S223fs

	CCBL2	c.771G>T	1	89448740	6,1	970	stop	p.S257*
	GSE1	c.1041_1042del	16	85690000	33,5	406	inframe-deletion	p.E347if
129	LRRC37A3	c.1656G>A	17	62891721	9	2055	missense	p.T552I
	PIEZO1	c.4407_4409insCCTGCT	16	88789666	28,5	214	inframe-insertion	p.A1469if
	WDR55	c.855C>T	5	140051086	11,3	780	stop	p.W285*
	FADS2	c.795del	11	61624532	5,7	140	inframe-deletion	p.Y265if
100	LTBP2	c.987C>A	14	75022240	34,7	101	missense	p.Q329H
	TPSB2	c.396G>C	16	1279295	11,4	123	missense	p.N132K
	A2M	c.2421G>A	12	9243846	7	329	missense	p.A807V
	CHRNA7	c.1182G>C	15	32460244	15,8	184	missense	p.S394T
	LILRA1	c.2349A>G	19	55107225	5,4	149	missense	p.E783G
102	LILRA1	c.783A>G	19	55107223	33,3	147	missense	p.G261W
	LRRC37A3	c.1656T>C	4	62891722	9,1	1057	missense	p.T552A
	ME2	c.210+1G>T	18	48443879	32,8	186	Spleißdonor	
	NUTM2F	c.2085_2086del	9	97080926	8,7	196	inframe-deletion	p.S695if

Tab: 38: Varianten der pHL-Patienten (WES), die durch die NGS-basierte Methode mittels KAPA-Fragment-Kit verifiziert wurden. KM: Keimbahn-Varianten, VAF: Varianten-Allelfrequenz, * Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

Fall-Nr.	Gen	Variante	Chr.	Koordinate [hg19]	VAF [%]	Lesetiefe	Art der Abberation	Aminosäure-Austausch	KM
124	ADRM1	c.3570A>C	20	60883783	12,5	337	missense	p.K1190T	
	ANKRD36	c.17229A>G	2	97915323	13	779	missense	p.I5743V	

Anhang

128	BCL7A	c.69C>G	12	122460020	35,2	189	missense	p.A23G	
100	LTBP2	c.2961C>A	14	75022240	34,7	101	missense	p.Q987H	KM
102	LILRA1	c.2349A>G	19	55107225	5,4	149	missense	p.E783G	KM

Publikationen

Desch AK, Hartung K, Botzen A, Brobeil A, Rummel M, Kurch L, Georgi T, Jox T, Burdach S, Classen CF, Claviez A, Debatin KM, Ebinger M, Eggert A, Faber J, Ferrari R, Flotho C, Frühwald M, Graf N, Hofmann A, Jorch N, Knirsch S, Kontny U, Kramm C, Kulozik A, Maecker-Kolhoff B, Leipold A, Metzler M, Müller HL, Nathrath M, Paulussen M, Pekrun A, Reinhardt D, Reinhard H, Rössig C, Sauerbrey A, Schlegel PG, Schneider DT, Scheurlen W, Schweigerer L, Simon T, Suttorp M, Vorwerk P, Kluge R, Mauz-Körholz C, Körholz D, Gattenlöhner S, Bräuninger A, Genotyping circulating tumor DNA of pediatric Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. 2019;1–16

Bräuninger A, Blau W, Kunze K, Desch AK, Brobeil A, Tur MK, Etschmann B, Günther U, Körholz D, Schliesser G, Käbisch A, Kiehl M, Rummel M, Gattenlöhner S. Targeted Next-Generation Sequencing Is a Sensitive Tool for Differential Diagnosis of Myelodysplastic Syndromes in Bone Marrow Trepines. *J Mol Diagn*.2018;20(3):344-354.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich...

... Prof. Dr. Bräuninger für die engagierte Betreuung im Laufe der Forschungsarbeiten und während der Erarbeitung der Dissertation, sowie der Bereitstellung der nötigen Arbeitsmittel.

... Prof. Dr. Dammann für die Zusage der externen Betreuung durch den Fachbereich Biologie und der Anfertigung des Erstgutachtens.

... Prof. Dr. Trenczek und Prof. Dr. Menke für die Beteiligung als Prüfer bei der Disputation.

... Prof. Dr. Gattenlöhner für die Durchführung der Dissertation im Institut für Pathologie in Gießen.

... Prof. Dr. Körholz, Prof. Dr. Mauz-Körholz und Frau Avondstondt für die vielfältige Unterstützung und der Bereitstellung der Patientendaten.

... Dr. Brobeil für die tolle Zusammenarbeit, der Durchführung der histologischen Färbungen und Quantifizierung, sowie Visualisierung der Zellen.

... Frau Seipp für die Einarbeitung und der Realisierung der Mikrodissektion der HRS-Zellen durch das *Laser Capture* Mikroskop.

... allen Mitarbeitern der AG Bräuninger für das gute Arbeitsklima und der Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung der Dissertation. Ein besonderer Dank gilt Dr. Hartung, Dr. Jox und Frau Goldschmid für das Korrekturlesen der Dissertation.

... meinem Mann und meinen Eltern, die mich immer unterstützten.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Thesis selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten. Gemäß § 25 Abs. 6 der Allgemeinen Bestimmungen für modularisierte Studiengänge dulde ich eine Überprüfung der Thesis mittels Anti-Plagiatssoftware.

Ort und Datum

Unterschrift

Daten-CD

Inhalt:

- 1.0 Promotionsarbeit_Desch_Ann-Kathrin_03.09.2019
- 1.0 Anhang_Promotionsarbeit_Desch_Ann-Kathrin_03.09.2019