

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

Umfangreiche Gesamtexomsequenzierung der zirkulierenden Tumor-DNA zur Identifizierung von genetischen Veränderungen beim klassischen Hodgkin Lymphom

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Laman Mammadova
aus Baku, Aserbaidshan

promoviert am 14. August 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Druckjahr 2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Professor Dr. med. P. Borchmann
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. medic. M. Nothnagel

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Dr. Sven Borchmann (Betreuer und Mentor im Labor; Gruppenleiter der Arbeitsgruppe Borchmann im Labor der Translationalen Tumorgenetik und Immuntherapie)

Herr Prof. Dr. Reiner Frank (Lektorat und Beratung bezüglich der Herstellung der Monografie)

Frau Elisabeth Ruschenburg (Lektorat und Beratung bezüglich der Herstellung der Monografie)

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Blutproben wurden von der Blutbank der German Hodgkin Study Group zur Verfügung gestellt. Die DNA-Extraktion aus diesen Blutproben wurde von mir, Frau Sophia Sobesky und Frau Julia Mattlener durchgeführt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Rohdaten der Gesamtexomsequenzierung wurden im Cologne Center for Genomics erstellt.

Die bioinformatischen Auswertungen wurden gemeinsam von Herrn Dr. Borchmann und mir durchgeführt.

Die in dieser Arbeit gezeigten Figuren und Ergebnisse sind ebenfalls gemeinsam von Dr. Borchmann und mir erstellt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 07.05.2024

Unterschrift:.....

Danksagung

Mein tiefster Dank gebührt meinem wissenschaftlichen Betreuer und Leiter der Arbeitsgruppe Translationale Tumorgenetik und Immuntherapie, Dr. Sven Borchmann. Seine kontinuierlich freundliche Haltung und seine inspirierenden Ideen waren während meiner Forschungstätigkeit im Labor von unschätzbarem Wert. Seine geduldige und aufmerksame Betreuung hat einen enormen Beitrag zur Entstehung dieser Dissertation geleistet. Dr. Borchmann war nicht nur permanent für mich erreichbar, sondern verkörperte auch ein vorbildliches Streben nach wissenschaftlicher Exzellenz und unermüdlicher Hingabe.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Peter Borchmann, für seine fachliche Führung während meiner Promotionszeit.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Reiner Frank für seine großzügige Hilfsbereitschaft und die väterliche Fürsorge, die er mir entgegengebracht hat. Seine fachliche Hilfe und sein sorgfältiges Lektorat haben maßgeblich dazu beigetragen, diese Arbeit zu vervollständigen.

Darüber hinaus möchte ich Elisabeth Ruschenburg von Herzen danken, denn sie hat eine warme und familiäre Atmosphäre geschaffen, die mir in schwierigen Zeiten eine wohltuende Zuflucht bot. Ihr umfassendes und professionelles Lektorat meiner Arbeit trug maßgeblich zur Qualität dieser Dissertation bei. Ohne ihren wertvollen Beitrag wäre diese Arbeit nicht vollendet worden.

Des Weiteren möchte ich Julia Mattlener für ihre Unterstützung im Labor danken.

Ein besonderer Dank gebührt meinen Eltern, Vafa Mammadova und Farrukh Mammadov und meinem Bruder, Hajagha Mammadov. Insbesondere danke ich meiner Mutter, die mir stets beigestanden hat und alles in ihrer Kraft Stehende gegeben hat, damit ich meine Ziele erreichen konnte. Mein herzlicher Dank gilt auch meinen Onkeln, Fuad Mammadov und Kamran Abdurazagov, sowie meiner Großmutter, Solmaz Tagiyeva, für ihren entscheidenden Beitrag zu meiner hochqualitativen Ausbildung.

Darüber hinaus möchte ich meinen lieben Freundinnen Sevinc Yusifli, die mir seit mehreren Jahren in jeder Entscheidung Beistand geleistet hat und nie von meiner Seite gewichen ist, Hafiza Alirzayeva, die während meines Werdegangs ihre unerschütterliche Freundschaft gezeigt hat, und Alida Selimovic, die mich in den letzten Zügen meiner Promotion mit ihren aufmunternden Gesprächen und ihrem Beisein gestärkt hat, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Diese Arbeit widme ich meiner lieben Mutter, Vafa Mammadova.
Ihre bedingungslose Unterstützung hat mich durch Höhen und Tiefen getragen
und mich dazu ermutigt, meinen Träumen zu folgen.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. EINLEITUNG.....	10
2.1. Was ist das Hodgkin Lymphom?.....	10
2.1.1. Klassifikation des Hodgkin Lymphoms	11
2.1.2. Stadien des Hodgkin Lymphoms und stadienadaptierte Therapieregimen	12
2.2 Flüssigbiopsien – neuer Ansatz zur präzisionsmedizinischen Forschung der hämato-onkologischen Erkrankungen	15
2.3. Herausforderungen der umfangreichen molekularen Analyse des Hodgkin Lymphoms und Ansatz der Flüssigbiopsien zur Überwindung dieser Problematik	17
2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit.....	18
3. MATERIAL UND METHODEN	20
3.1. Patienteneinschluss und Probengewinnung	20
3.2. Ethische Überlegungen	21
3.3. Stichprobensammlung und Verarbeitung	21
3.4. DNA-Extraktion.....	21
3.5. DNA-Verarbeitung, Qualitätskontrolle und Sequenzierung	23
3.6. Grundlegende Datenverarbeitung	24
3.7. Bestimmung der somatischen Kopienzahlvariationen	25
3.8. Bestimmung der somatischen Einzelbasen-Substitutionen.....	26
3.9. Bestimmung der somatischen kleinen Insertionen und Deletionen (InDel).....	27
3.10. Zusätzliche Variantenfilterung	28
3.11. Gruppierung der Mutationen innerhalb der dreidimensionalen Proteinstrukturen.....	29
3.12. Bestimmung der Mutationssignaturen	30

3.13.	Validierung.....	30
3.14.	Statistische Methoden	30
3.15.	Mutationslast	31
4.	ERGEBNISSE	32
4.1.	Patienteneigenschaften.....	32
4.2.	Sequenzierung	33
4.3.	Validierung.....	34
4.4.	Die genetische Landschaft des Hodgkin Lymphoms.....	36
4.4.1.	Onkogene und Tumorsuppressorgene.....	39
4.4.2.	Mutationssignaturen.....	41
4.4.3.	Somatische Kopienzahlvariationen.....	43
5.	DISKUSSION	46
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	55
7.	ANHANG.....	66
7.1.	Abbildungsverzeichnis.....	69
7.2.	Tabellenverzeichnis	69
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	70

Abkürzungsverzeichnis

cfDNA	Zellfreie-DNA
cHL	Klassisches Hodgkin Lymphom
CNV	Kopienzahlvariationen
ctDNA	Zirkulierende Tumor-DNA
EBV	Epstein-Barr Virus
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group (Performance Status)
hGE	Haploide Genomäquivalente
HL	Hodgkin Lymphom
HRS	Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen
IS-RT	Involved-Site Radiatio
LP	Lymphozyten prädominante Zellen
NLPHL	Noduläres Lymphozyten prädominantes Hodgkin Lymphom
OG	Onkogene
SBS	Einzelnen Basensubstitutionen
TGP	Tiefe zielgerichtete Sequenzierung (Deep Targeted Sequencing)
TSG	Tumorsuppressorgene
UMI	Eindeutige molekulare Identifikatoren
WES	Gesamtexomsequenzierung (Whole-Exome-Sequencing)

1. Zusammenfassung

Das Hodgkin Lymphom (HL) entsteht aus B-Zellen und ist genetisch charakterisiert durch Mutationsveränderungen in mehreren Signalwegen wie NF- κ B, JAK/STAT, AP-1, PI3K/AKT, Mutationen in der TNF-Rezeptorfamilie sowie Veränderungen in MHC-Klasse-II-Expression, und PD-1/PD-L1-Koinhibitionsweg¹⁻¹⁰. Es ist eine der häufigsten bösartigen Erkrankungen bei jungen Erwachsenen mit erheblicher Morbidität und Mortalität¹¹. Mit der derzeitigen Erstlinientherapie von HL bestehend aus einer Chemotherapie häufig in Kombination mit Strahlentherapie, kann eine langfristige Heilung erzielt werden¹²⁻¹⁴. Patienten sind jedoch regelmäßig mit frühen und späten Toxizitäten konfrontiert, die die Gesundheit der Patienten und die damit verbundene Lebensqualität beeinträchtigen¹⁵⁻¹⁸. Tatsächlich wird das Hodgkin Lymphom (HL) aufgrund des Mangels an genauer Risikostratifizierung häufig über- oder unterbehandelt¹⁹.

Mit dieser Arbeit soll ein besseres Verständnis der Biodiversität des Hodgkin Lymphoms erzielt werden, damit man die Therapie möglichst individualisieren und das damit verbundene Outcome verbessern kann. Dafür wurde eine Gesamtexomsequenzierung (WES) von zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA) von zuvor unbehandelten Patienten mit klassischem HL (cHL) durchgeführt, um eine breite Palette der Mutationen zu generieren. Es zeigte sich eine starke Korrelation der Allelhäufigkeiten, Kopienzahlvariationen, Mutationslast und der EBV-Detektion mit der zuvor veröffentlichten zielgerichteten Sequenzierungsplattform der AG Borchmann (Sobesky et al.)²⁰. Die für das cHL charakteristischen Mutationen (z.B. B2M, CSF2RB, GNA13, SOCS1, STAT6, TNFAIP3) konnten mit hoher Sensitivität auch in diesem Ansatz erkannt werden. Eine mit anderen Studien vergleichbare Mutationsrate der oben genannten Mutationen zeigte Nichtunterlegenheit dieses Ansatzes^{21,22}.

Zudem wurden in dieser Arbeit neue, vorher nicht beschriebene Onkogene, Tumorsuppressorgene und Kopienzahlvariationen definiert, die einen prognostischen Wert in der Behandlung der HL haben könnten. Zu den häufigen und potenziell für HL wichtigen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen gehörten APOB, FLG2, ZNF806, TYRO3, SEL1L3, PLXNC1, RP1L1, IGFN1, CISH, FREM2, KCNJ8, RFTN1, HLA-B. Es wurden ebenfalls funktionell verbundene Cluster in folgenden Genen identifiziert: STAT6, XPO1, OR10G7, KCNJ8, EEF1A1. Einige von diesen Mutationsclustern wurden in vorherigen HL-Studien bereits beschrieben^{20,22,23}.

Um zu einem besseren Verständnis der mutationalen Prozesse zu gelangen, wurden in der Analyse mutationale Signaturen basierend auf einzelnen Basensubstitutionen (SBS) identifiziert. Eine zuvor lediglich in HL-Zelllinien entdeckte und bereits von AG Borchmann in dem

vorherigen Sequenzierungsansatz beschriebene Signatur SBS25 konnte in 13% der Kohorte reidentifiziert werden²⁰.

Zusätzlich zu den einzelnen Mutationen und der mutationalen Landschaft wurden Kopienzahlvariationen mit betroffenen Gen-Loci identifiziert. Die häufigsten Amplifikationen zeigten sich in folgenden Loci: 19q13.42, 17q12, 4q13.2, 8p23.1, 22q11.1, 16q23.1, 4p16.1, 7q35. Diese umfassten solche Gene, wie Rezeptoren der KIR-Familie (KIR2DL1, KIR2DL4, KIR3DL1), TBC1D3, UGT2B15, POTEH, CLEC18, USP17. Die häufigsten Deletionen waren in den Gen-Loci: 13q34, 22q11.22, 16p13.3, 10q11.23, 4q13.2, 20q13.13, 12q13.12, 9p11.2 und 5p15.33. Diese Loci trugen solche Gene wie IGLL5, FAM21, ASAH2, UGT2B2, PTPN1, CEBPB, UBE2V1, MLL2, RHEBL1, ZDHHC11.

Schließlich konnte mit diesem Ansatz gezeigt werden, dass mit einem breiteren Ansatz (Whole-Exome) und weniger Sequenziertiefe trotzdem mit hoher Sensitivität sequenziert werden kann. Dies ermöglicht es, neue Gene und Gen-Loci zu identifizieren und somit das Verständnis der Biodiversität des Hodgkin Lymphoms zu erweitern.

2. Einleitung

2.1. Was ist das Hodgkin Lymphom?

Das Hodgkin Lymphom, benannt nach dem englischen Pathologen Thomas Hodgkin (1798-1866), ist eine bösartige Erkrankung des lymphatischen Systems. In seiner historischen Abhandlung "On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen" beschrieb er den Obduktionsbefund von Patienten aus dem Guy's Hospital in London, die an einem Hodgkin Lymphom erkrankt waren²⁴. Dabei postulierte er, dass die Lymphknotenveränderungen und massive Milzvergrößerung der Patienten höchstwahrscheinlich nicht auf Infektionserkrankungen zurückzuführen sind, sondern eine Tumorerkrankung darstellen²⁴. Die erste Zeichnung der pathognomonischen Hodgkin Reed-Sternberg-Zellen des Hodgkin Lymphoms reichte William Smith Greenfield im Jahr 1878 ein²⁵. Eine definitive und gründliche Beschreibung der Histopathologie des Hodgkin-Lymphoms wurde Jahre später durch Carl Sternberg²⁶ und Dorothy Reed Mendenhall²⁷ verfasst. Aus diesem Grund wurden die für das Hodgkin Lymphom charakteristischen mehrkernigen Zellen Hodgkin Reed-Sternberg-Zellen genannt²⁸.

Die Beschaffenheit, Ätiologie und Pathogenese des Hodgkin Lymphoms waren über ein Jahrhundert Gegenstand von Kontroversen. Bis zum heutigen Tag wurden verschiedene mögliche Ursachen und Auslöser für die Entstehung des Hodgkin Lymphoms diskutiert²⁹. Bekannte sozioökonomische oder umweltbedingte Risikofaktoren sind zum Beispiel ein hoher Lebensstandard, eine geringe Anzahl von Geschwistern oder ein verzögerter Kontakt mit häufigen Infektionen in der Kindheit³⁰. Bei Zigarettenrauchern wird ebenfalls ein erhöhtes Risiko für HL vermutet³¹. Es gibt auch überzeugende Hinweise darauf, dass HL in einer Reihe von Fällen mit dem Epstein-Barr-Virus assoziiert ist, insbesondere im Kindesalter und bei älteren Erwachsenen^{30,32}. Daher wird vermutet, dass das HL in verschiedenen Altersgruppen eine unterschiedliche Krankheitsentität aufweist³². Zudem ist bekannt, dass die Patienten mit einer HIV-Infektion und einem beeinträchtigten Immunsystem ein 5- bis 26-fach erhöhtes Risiko haben, am Hodgkin Lymphom zu erkranken als die Allgemeinbevölkerung³³.

Das Hodgkin Lymphom kann auf unterschiedliche Weise in der klinischen Praxis in Erscheinung treten. Dazu gehören Symptome, die durch wachsende Tumormasse verursacht werden, sowie die zytokin-assoziierten systemischen Symptomen wie Fieber über 38°C, Nachtschweiß, Gewichtsverlust und Müdigkeit³⁴. Die bei weitem häufigste Erscheinungsform des Hodgkin Lymphoms ist die Vergrößerung der Lymphknoten, die in der Regel schmerzlos und fortschreitend ist³⁵. Obwohl sich die Lymphknoten am häufigsten im Nacken und in der supraklavikulären Region befinden, kann jeder lymphknotenführende Bereich betroffen sein³⁶.

Zudem gibt es einige bevorzugten Regionen bei Männern und Frauen. Zum Beispiel zeigen Frauen häufig eine mediastinale Lymphadenopathie, die meistens mit thorakalen Schmerzen und Atemnot einhergeht³⁰. Eine Lymphadenopathie, die eher subdiaphragmal auftritt, ist charakteristisch für männliches Geschlecht und ältere Menschen³⁰. Ein extranodaler Befall des Hodgkin Lymphoms ist ziemlich uncharakteristisch, Organe wie Milz, Leber, Lungen, Pleura und Knochenmark können jedoch ebenfalls befallen werden^{30,37}.

Laborchemisch kann sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Leukozytose oder Leukopenie zeigen³⁸. Die häufigste haematologische Manifestation eines fortgeschrittenen Hodgkin Lymphoms ist eine normochrome normozytäre Anämie, die einerseits mit Tumorlyse assoziiert sein kann oder im Rahmen einer autoimmunen oder mikroangiopatischen Hämolyse auftritt³⁹. Mit einer schlechten Prognose sind laborchemisch eine Lymphozytopenie und erhöhte Erythrozytensedimentationsrate assoziiert³⁸.

Die Inzidenz von Hodgkin Lymphom liegt weltweit bei zwei bis drei Fällen pro 100.000 Menschen pro Jahr, mit zwei Altersgipfeln bei jungen Erwachsenen im Alter von 20-30 Jahren und älteren Menschen über 60 Jahren¹³. Das Verhältnis von Männern zu Frauen zeigt eine leichte Prädominanz des männlichen Geschlechts (3:2)³⁰. Trotz der Tatsache, dass das Hodgkin Lymphom eine seltene Lymphom-Art ist, gehört es zu den häufigsten bösartigen Erkrankungen bei jungen Erwachsenen³⁰.

2.1.1. Klassifikation des Hodgkin Lymphoms

Anhand der Morphologie und Immunhistochemie wird das Hodgkin Lymphom in das klassische Hodgkin Lymphom (cHL) und das noduläre Lymphozyten prädominante Hodgkin Lymphom (NLPHL) unterteilt⁴⁰. In über 90% der Fälle handelt es sich um cHL, das sich als aggressives Neoplasma verhält, während NLPHL in den meisten Fällen eine indolente Biologie aufweist³⁵. Während cHL durch das Vorhandensein von CD30 und CD15-exprimierenden Hodgkin Reed-Sternberg-Zellen (HRS) gekennzeichnet ist, die von einer Vielzahl von Entzündungszellen umgeben sind, werden die pathognomonischen Zellen bei NLPHL als Lymphozyten prädominante Zellen (LP) bezeichnet, die von reifen Lymphozyten umgeben sind¹³. Sie sind positiv für CD20 und CD45, aber weisen kein CD30 auf³⁵.

Darüber hinaus gibt es beim klassischen Hodgkin Lymphom vier histologische Subtypen: nodulär sklerosierender, lymphozytenreicher, lymphozytendepletierter Subtyp und Mischtyp⁴⁰. Nodulär sklerosierender Subtyp (NSCHL) ist der häufigste Subtyp, der etwa 70% der cHL-Fälle in den Industrieländern ausmacht und durch neoplastische HRS-Zellen auf einem entzündlichen Hintergrund mit bandförmiger Sklerose gekennzeichnet ist³⁵. Das klassische

Hodgkin Lymphom mit gemischter Zellularität (MCCHL) macht 20-25 % der cHL aus und kommt oft bei Patienten mit HIV-Infektion und in Entwicklungsländern vor³⁵. Das lymphozytenreiche klassische Hodgkin Lymphom (LRCHL) macht etwa 5 % aller cHL aus. Die Patienten befinden sich in der Regel in einem frühen Stadium der Erkrankung und zeigen keinen ausgedehnten mediastinalen Befall^{13,35}. Das lymphozytendepletierte klassische Hodgkin Lymphom (LDCHL) ist der seltenste cHL-Subtyp in den Industrieländern und macht <1% der Fälle aus. Er tritt häufig in Verbindung mit einer HIV-Infektion auf und hat im Vergleich zu den anderen cHL-Subtypen einen aggressiveren Krankheitsverlauf^{35,41}.

Insgesamt haben Patienten mit Depletion der Lymphozyten und gemischter Zellularität im Vergleich zu Patienten mit sklerosierendem Subtyp eine deutlich schlechtere Prognose, während Patienten mit Prädominanz der Lymphozyten die beste Prognose zeigen⁴¹.

Zusätzlich zur Subtypisierung wurden Klassifizierungssysteme entwickelt, die andere Tumormerkmale wie das Vorhandensein einer großen mediastinalen Masse, eine erhöhte Erythrozytensedimentationsrate, die Beteiligung mehrerer Lymphknoten oder eine extranodale Beteiligung berücksichtigen⁴². Alternativ dazu ist der Internationale Prognostische Score (IPS) ein umfassenderes prognostisches Scoring-System für HL. Der IPS identifiziert sieben Variablen (Alter \geq 45 Jahre, Vorhandensein von Ann-Arbor-Stadium IV, männliches Geschlecht, Anzahl der weißen Blutkörperchen \geq 15 000 Zellen/ μ L, Lymphozytenzahl <600 Zellen/ μ L, Albumin <4,0 g/dL, Hämoglobin <10,5 g/dL), die den Therapieerfolg vorhersagen³⁸.

2.1.2. Stadien des Hodgkin Lymphoms und stadienadaptierte Therapieregimen

Patienten mit klassischem Hodgkin Lymphom (HL) werden in der Regel in eine von drei Risikogruppen eingeteilt: Frühstadium mit günstiger Prognose, Frühstadium mit ungünstiger Prognose oder fortgeschrittenes Stadium¹³. Die Kriterien zur Bestimmung des Stadiums umfassen nicht nur das klinische Stadium nach der Ann-Arbor-Klassifikation (Tab. 1), sondern auch das Vorhandensein oder Fehlen verschiedener Risikofaktoren (Tab. 2), darunter:

- extranodale Beteiligung
- Befall von drei oder mehr Lymphknotenarealen
- großer Mediastinaltumor (\geq 1/3 des maximalen Thoraxdurchmessers im konventionellen Röntgen-Thorax)
- erhöhte Erythrozytensedimentationsrate (ESR) von 50 mm/Std oder 30 mm/Std bei Patienten mit B-Symptomen^{42,43}.

Tabelle 1: Ann-Arbor Klassifikation (nach Pschyrembel)

Ann-Arbor Klassifikation	
Stadium	Lokalisation
I	einzelne Lymphknotenregion
I (E)	einzelnes extralymphatisches Organ/Bezirk
II	≥ 2 Lymphknotenregionen auf einer Zwerchfellseite
II (E)	einzelne Lymphknotenregion und lokalisierter Befall eines einzelnen extralymphatischen Organs/Bezirks
III	Lymphknotenregionen auf beiden Zwerchfellseiten befallen
III (E)	zusätzlicher Befall eines einzelnen extralymphatischen Organs/Bezirks
III (S)	Milzbefall
III (ES)	beides
IV	diffuser Befall von extralymphatischem Organ/Bezirk mit oder ohne Befall der Lymphknotenregionen
Alle Stadien werden zusätzlich durch Parameter A und B bezeichnet	
A: ohne Gewichtsverlust, Fieber oder Nachtschweiß	
B: mit Gewichtsverlust, Fieber oder Nachtschweiß	

Wegen seiner Effektivität und vergleichsweise geringer Nebenwirkungsrate wird bei der Erstdiagnose von HL im Frühstadium mit günstiger Prognose und Alter ≤ 60 Jahre empfohlen, die Patienten mit zwei Zyklen ABVD (Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastin und Dacarbazin) in Kombination mit Involved-Site Radiatio (IS-RT) mit 20 Gy zu behandeln⁴⁴. Involved-Site-Radiatio ist eine Form der Strahlentherapie, in der die initial befallenen Lymphknoten inklusive eines Sicherheitsabstands bestrahlt werden. Es wurde festgestellt, dass auf diese Weise eine wirksame Behandlung mit einer geringeren Toxizität erreicht werden kann^{44,45}. Bei einer PET-CT-Positivität im Rahmen des Interim-Stagings wird eine Therapieeskalation mit zwei Zyklen eBEACOPP (Bleomycin, Etoposid, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbazine und Prednison) und anschließender IS-RT erwogen⁴⁶. Im Falle einer PET-CT-Negativität kann der Verzicht auf eine konsolidierende Strahlentherapie unter Abwägung des Risikos eines Rezidivs und einer strahlentherapie-assoziierten Sekundärneoplasie oder Organtoxizität als Individualentscheidung erwogen werden⁴⁶.

Eine signifikant höhere Rate an Tumorkontrolle wird bei der Erstdiagnose von HL im Frühstadium mit ungünstiger Prognose und Alter ≤ 60 Jahre durch die intensivierete Polychemotherapie mit Kombination von zwei Zyklen eBEACOPP und zwei Zyklen ABVD, gefolgt von IS-RT mit 30 Gy erreicht⁴⁷. Als nächstbeste Option bei Kontraindikation oder Ablehnung von eBEACOPP werden vier Zyklen ABVD empfohlen⁴⁸. Eine PET-CT-Negativität im Rahmen des Interim-Stagings ermöglicht bei Patienten im intermediären Stadium nach zwei + zwei Polychemotherapie den Verzicht auf eine konsolidierende Strahlentherapie ohne klinisch relevanten Wirksamkeitsverlust⁴⁹.

Im fortgeschrittenen Stadium bei Patientenalter ≤ 60 Jahre richtet sich die Gesamtzahl der Chemotherapie-Zyklen nach dem frühen Ansprechen auf zwei Zyklen eBEACOPP⁵⁰. Patienten, die nach zwei Zyklen komplette Remission in PET-CT erreicht haben, sollten mit weiteren zwei Zyklen eBEACOPP therapiert werden⁵⁰. Dagegen sollten die Patienten, die keine Remission erreicht haben und PET-CT-Positivität aufweisen, weitere vier Zyklen eBEACOPP erhalten⁵⁰. Einer Polychemotherapie folgt die Bestrahlung von Resttumorgewebe mit 30Gy⁴⁴.

Tabelle 2: Modifizierte Ann-Arbor Klassifikation unter Berücksichtigung der von German Hodgkin Study Group (GHSG) definierten Risikofaktoren

Modifizierte Ann-Arbor Klassifikation		Ann-Arbor Stadium			
		IA, IB, IIA	IIB	IIIA, IIIB	IVA, IVB
keine Risikofaktoren		Frühstadium mit günstiger Prognose		Fortgeschrittenes Stadium	
Risikofaktoren	ESR > 50 mm/Std (A) oder 30 mm/Std (B)	Frühstadium mit ungünstiger Prognose			
	Befall von ≥ 3 Lymphknotenbereichen				
	Mediastinaler Tumor				
	Extranodale Beteiligung				

Patienten über 60 Jahre sollten aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit der schweren Toxizitäten keine Chemotherapie auf eBEACOPP-Basis erhalten⁴⁵. Im frühen Stadium sollen zwei Zyklen ABVD gefolgt von IS-RT mit 20 Gy eingesetzt werden⁴⁵. Im intermediären Stadium sollten diese Patienten mit zwei Zyklen ABVD, gefolgt von zwei Zyklen AVD (Doxorubicin, Vinblastin und Dacarbazin) und einer Radiatio mit 30 Gy behandelt werden. Im fortgeschrittenen Stadium sollte bei gesunden älteren Patienten Polychemotherapie mit zwei

Zyklen ABVD, gefolgt von vier bis sechs Zyklen AVD und einer IS-RT behandelt werden^{44,51}. Alternativ können diese Patienten sechs bis acht Zyklen PVAG (Prednison, Vinblastin, Doxorubicin und Gemcitabin) erhalten, gefolgt von einer lokalen Behandlung mittels Radiotherapie⁵².

2.2 Flüssigbiopsien – neuer Ansatz zur präzisionsmedizinischen Forschung der hämato-onkologischen Erkrankungen

Ein breites Spektrum an Möglichkeiten im Bereich der Onkologie bietet die Analyse der Tumorzellen oder Tumorzellprodukte, die aus Blut oder anderen Körperflüssigkeiten gewonnen werden, weshalb sie auch als „liquid biopsies“ oder „Flüssigbiopsien“ bezeichnet werden⁵³. Da die Tumorzellen oder Tumorzellprodukte aus allen schnell proliferierenden Tumorstellen freigesetzt werden, liefern die Flüssigbiopsien Echtzeitinformationen über die Tumorentwicklung und können in sehr unterschiedlichen Gebieten angewendet werden: für die Früherkennung von Krebs und Tumorrezidiven, die individuelle Risikoabschätzung und die Therapieüberwachung mit früher Detektion der Therapieresistenzen⁵⁴. Es gibt verschiedene Arten von Flüssigbiopsien wie z. B. zirkulierende Tumorzellen (CTCs), zirkulierende Tumor-Ribonukleinsäuren (ctDNA, ctRNA), Exosomen, Proteine, Antikörper und Blutplättchen (tumor-educated platelets – TEPs)⁵⁵.

Der Begriff "zellfreie DNA" (cfDNA) bezieht sich auf fragmentierte DNA, die außerhalb von Zellen im Blut gefunden wird, und erstmals im Jahr 1948 beschrieben wurde⁵⁶. Die cfDNA ist ein normales Produkt des Zellumsatzes, die bei gesunden Personen auch nachweisbar ist und größtenteils von hämatopoetischen Zellen freigesetzt wird⁵⁷. Bei bestimmten physiologischen oder pathologischen Bedingungen wie z.B. bei Schwangerschaft, Krebserkrankung, Sepsis, Schlaganfall oder Trauma, können die entsprechenden bzw. betroffenen Gewebe zusätzliche DNA in den peripheren Kreislauf abgeben⁵⁸⁻⁶⁰. Obwohl Krebspatienten höhere cfDNA-Spiegel aufweisen als gesunde Kontrollpatienten, variieren die Konzentrationen der gesamten cfDNA in Plasma- oder Serumproben in beiden Gruppen erheblich⁵⁷. Basierend auf einigen quantitativen Studien wurde festgestellt, dass die Konzentration von cfDNA bei gesunden Probanden zwischen 0 und 100 ng/ml Blut (Mittelwert von 30 ng/ml) beträgt, wohingegen die Krebspatienten eine Konzentration von cfDNA zwischen 0 und 1000 ng/ml (Mittelwert von 180 ng/ml) aufweisen^{57,58,61}. Darüber hinaus ist eine starke Fragmentierung für cfDNA aus dem Tumorgewebe sehr charakteristisch, die auch mit der Tumorgroße positiv korreliert⁶². Bei Krebspatienten wird zellfreie DNA (cfDNA) als zirkulierende Tumor-DNA bezeichnet (ctDNA)⁹.

Im Vergleich zu einer klassischen Gewebebiopsie wird bei Flüssigbiopsien eine Blut- oder Urinprobe entnommen. Flüssigbiopsien sind weniger invasiv und stellen ein minimales

prozedurales Risiko für den Patienten dar, was zu einer kostengünstigeren und patientenfreundlicheren Probenentnahme im Vergleich zu chirurgischen Biopsien führt⁵⁴. Darüber hinaus können die Flüssigbiopsien seriell wiederholt werden, um den Erfolg der Behandlung oder das Fortschreiten des Tumors genau zu überwachen und bessere Informationen für therapeutische Entscheidungen zu erhalten. Somit kann man mit Flüssigbiopsien ein umfassenderes Verständnis der Krankheit erhalten und die räumlichen Beschränkungen einer Gewebebiopsie überwinden⁶³.

Zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) ist ein Biomarker mit zunehmend breiter Anwendung in der gesamten Onkologie, einschließlich der Erforschung von hämato-onkologischer Erkrankungen⁵³. Einige bisherige Studien haben das Potenzial von ctDNA für den nicht-invasiven Nachweis tumorspezifischer Mutationen und die molekulare Subtypisierung erforscht^{21,64-67}. In der Erforschung des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms mittels Flüssigbiopsien konnten beispielweise Rossi et al. zeigen, dass die Genotypisierung von cfDNA im Plasma genauso akkurat sein kann, wie die Genotypisierung der konventionellen Biopsien, um somatische Mutationen mit einer Allelhäufigkeit von >20% zu erkennen⁶⁷. Darüber hinaus zeigten Rossi et al., dass die Mutationen, die in Gewebebiopsien nicht nachweisbar sind, weil möglicherweise die Klone nicht im Biopsat mitenthalten sind, mit Flüssigbiopsien besser entdeckt werden können⁶⁷. Außerdem hat sich gezeigt, dass die Genotypisierung von cfDNA eine nicht-invasive Echtzeit-Methode darstellt, um das Auftreten von behandlungsresistenten Klonen und die klonale Evolution zu verfolgen⁶⁷.

Des Weiteren haben Manier et al. einen umfangreichen Vergleich von angereicherten zirkulierenden Tumorzellen (CTCs), cfDNA und dazugehörigen Tumorbiopsien bei Patienten mit Multiplem Myelom (MM) durchgeführt⁶⁶. Mittels Anwendung von Gesamtexomsequenzierung konnte festgestellt werden, dass die Mehrheit der in der Tumorbiopsie entdeckten somatischen Einzelnukleotidvarianten (SSNVs) und somatischen Kopienzahlvariationen (SCNAs) auch in CTCs und cfDNAs nachweisbar sind⁶⁶. Darüber hinaus gab es eindeutige Hinweise, dass die Nachweise von Mutationen in CTCs und cfDNA sich gegenseitig ergänzen können, so dass man auf die Verwendung von Knochenmarksbiopsien zur Verfolgung der klonalen Heterogenität bei MM verzichten kann⁶⁶.

Durch den Einsatz einer hochsensitiven tiefen Sequenzierung von ctDNA der neu diagnostizierten und therapierefraktären HL-Patienten zeigten Spina et al., dass ctDNA die Genetik der Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen widerspiegelt und somit als leicht zugängliche Tumor-DNA zur Genotypisierung der HL als neuwertiger Biomarker geeignet ist²¹. Durch eine longitudinale Profilierung der therapierefraktären Patienten konnten Spina et al.

ebenfalls Hinweise auf Vorhandensein der reservoirartigen Vorläuferpopulationen mit Resistenz gegenüber der Chemotherapie liefern²¹.

Das Monitoring der ctDNA ermöglicht zudem die Identifizierung von Patienten mit Tumorrezidiv, noch bevor klinische Anzeichen der Erkrankung oder Hinweise auf Rezidiv in der Bildgebung auftreten^{68,69}. Daher ist die Interim-ctDNA-Bestimmung ein vielversprechender Biomarker zur Identifizierung von Patienten mit einem hohen Risiko für einen Therapieversagen⁶⁸.

2.3. Herausforderungen der umfangreichen molekularen Analyse des Hodgkin Lymphoms und Ansatz der Flüssigbiopsien zur Überwindung dieser Problematik

HL ist eine molekular heterogene Erkrankung, deren Beschaffenheit Auswirkungen auf die Patientenstratifizierung und Behandlung haben kann²⁸. Die Charakterisierung von HL auf molekularer und genomischer Ebene stellt jedoch eine große Herausforderung dar, da die neoplastischen Sternberg-Reed-Zellen (HRS) in Tumorbiopsien nur 1-10 % des Tumorgewebes ausmachen⁷⁰. Die Lymphknotenvergrößerung bei Patienten mit HL entsteht überwiegend aus reaktiven Zellen, wie T-Suppressorzellen, Plasmazellen, Histiocyten und Epitheloidzellen sowie einer wechselnden Anzahl eosinophiler Granulozyten, die den Großteil des HL ausmachen¹³. Die Tumorzellen sind rosettenförmig von CD4+ T-Zellen umgeben⁷¹. T-Zellen in diesen Rosetten weisen einen unterschiedlichen Phänotyp im Vergleich zu den T-Zellen weit entfernt von cHL auf⁷¹. Diese T-Zellen tragen zu einer abnormalen Immunantwort aufgrund der Expression von Zytokinen wie IL-2, IL-5, IL-10, IL-13 und TGF- β bei^{71,72}. Die Zytokine zeigen eine variable Expression, die mit spezifischen klinisch-pathologischen Merkmalen des Hodgkin Lymphoms korreliert⁷². Die Expression der Zytokine führt wiederum zu einer reaktiven Infiltration von verschiedenen Immunzellen und Fibroblasten sowie zu einer lokalen Unterdrückung der Th1-Zell-vermittelten-Immunität^{71,73}. IL-13 wird in höheren Mengen bei dem nodulär sklerosierenden cHL als bei dem Mischtyp exprimiert⁷¹. Somit weist nodulär sklerosierendes cHL einen erhöhten Anteil der IL-13-Rezeptor-positiven Fibroblasten auf⁷¹. Darüber hinaus stimuliert IL-13 Kollagensynthese und die Produktion von TGF- β , einen starken Stimulator der Fibrose⁷¹. Da die Tumorzellen und das reaktive Infiltrat sich gegenseitig beeinflussen, gibt es eine umfangreiche Kommunikation zwischen diesen beiden Komponenten. Die Tumorzellen gestalten ihre Umgebung zu ihrem eigenen Vorteil und nutzen eine Reihe der Mechanismen, um der Immunabwehr auszuweichen⁷¹. All dies hat die Gewinnung von repräsentativen Proben in cHL-Patienten für lange Zeit erschwert und die Entwicklung sowie Validierung von molekularer Stratifizierung aufgehalten.

Wie bereits oben beschrieben weisen Lymphompatienten im Vergleich zu alters- und geschlechtsidentischen gesunden Probanden deutlich höhere cfDNA-Konzentrationen auf⁶⁷. Der Typ des Lymphoms, dessen Größe und Aggressivität beeinflussen die cfDNA-Konzentrationen erheblich. Somit ist die Konzentration in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung höher als in früheren Stadien, analog zu höheren Konzentrationen bei einem progredienten Krankheitsverlauf im Vergleich zu einer klinisch ansprechenden Behandlung⁷⁴. Diese Korrelation legt eine Verbindung zwischen der cfDNA-Konzentration und der Krankheitslast nahe⁷⁵. Obwohl es nicht möglich ist, eine Konzentrationsschwelle festzulegen, die den Überlebensvorteil der Patienten und das Ansprechen auf die Behandlung vorhersagen kann, deuten die bereits gewonnenen Daten darauf hin, dass der Ausgangswert der cfDNA eine Methode zur Bewertung des Gesamtrisikos der Patienten neben den standardmäßigen, biologischen und bildgebenden Prognosemerkmalen darstellt⁷⁵.

Unter Einbeziehung der hauptsächlich neu diagnostizierten HL-Patienten im Frühstadium zeigte eine in jüngster Zeit durchgeführte Studie der AG Borchmann, dass die ctDNA ebenfalls zur Detektion der minimalen Resterkrankung (MRD) verwendet werden kann²⁰. Die MRD-Levels zeigten eine hohe Korrelation zur PET-basierten Bewertung des Ansprechens und konnten bereits eine Woche nach Beginn der Behandlung eine Vorhersage über das Ansprechen auf die Behandlung treffen und auch die Rezidive in PET-negativen Fällen detektieren²⁰.

Somit ist die frühzeitige und präzise Identifizierung von Patienten mit guter Prognose, aber auch der chemotherapie-refraktären Patienten ein ungedeckter medizinischer Bedarf bei cHL. Durch die rechtzeitige Erkennung solcher Patienten kann einerseits eine Therapiereduktion erzielt werden, um langfristige Komplikationen zu vermeiden, und andererseits eine Therapieintensivierung angestrebt werden, um die Heilungschancen zu maximieren.

Durch die Überwindung der großen technischen Hürden, die die Genotypisierung von HL bisher einschränkten, hat der neuartige technische Ansatz auf der Basis von ctDNA eine umfangreiche Bewertung von Mutationen in verschiedenen klinischen Phasen der Krankheit, von neu diagnostizierter bis zur refraktären Erkrankung, sowie während der Behandlung der Krankheit, ermöglicht^{20,21}.

2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wurde ein umfassenderer Ansatz verwendet, bei dem das gesamte kodierende Genom von 165 Patienten mit zuvor unbehandeltem cHL im fortgeschrittenen Stadium mit Hilfe der Gesamtexomsequenzierung (WES) der Flüssigbiopsien (hier lediglich ctDNA) untersucht wurde.

Auf diese Weise wurde mit dieser Arbeit folgendes intendiert:

- eine umfangreiche Identifizierung der bislang unbekannt Genmutationen bei cHL im fortgeschrittenen Stadium
- die Entdeckung der bisher nicht beschriebenen Kopienzahlvariationen mit relevanten Gen-Loci
- die Erlangung eines besseren Verständnisses der mutationalen Prozesse und der möglichen Auswirkungen der neuen Erkenntnisse auf die Ätiologie des Hodgkin Lymphoms

Darüber hinaus war es wichtig, die ausreichende Sensitivität des Ansatzes zu verifizieren und damit die Nichtunterlegenheit eines Breitband-Ansatzes im Gegensatz zur zielgerichteten Sequenzierung für Forschungszwecke zu beweisen.

3. Material und Methoden

Der Abschnitt „Material und Methoden“ wurde aus dem bei *Journal of Clinical Oncology* eingereichten und zur Publikation angenommenen Manuskript, bei dem ich als Miterstautorin fungiere, übernommen und von mir ins Deutsche übersetzt.

3.1. Patienteneinschluss und Probengewinnung

Für diese Studie wurden Proben von 165 Patienten verwendet. Die Patientendaten waren anonymisiert worden. Die Proben stammten aus zwei klinischen Studien der Deutschen Hodgkin Studiengruppe (GHSg): HD21 (n=151, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02661503) und NIVAHL (n=14, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03004833). Diese Proben wurden in der Kooperation mit nationalen und internationalen hämato-onkologischen Kliniken und Schwerpunktpraxen gesammelt und in das GHSg-Labor eingeschickt.

HD21 ist eine randomisiert-kontrollierte klinische Studie für neu diagnostizierte Hodgkin Lymphom Patienten im fortgeschrittenen Stadium. In dieser Phase III Studie wird die Erstlinienbehandlung eines fortgeschrittenen Hodgkin Lymphoms mittels BEACOPP eskaliert gegenüber einer anderen Polychemotherapie mit BrECADD (Brentuximab Vedotin, Etoposid, Cyclophosphamid, Adriamycin, Dacarbazin, Dexamethason) hinsichtlich der Nichtunterlegenheit und besserer Verträglichkeit der Therapie mit BrECADD verglichen. Die Studie ist aktuell noch nicht abgeschlossen.

NIVAHL ist eine randomisierte multizentrische Phase II Studie für neu diagnostizierte Hodgkin Lymphom Patienten im intermediären Stadium. In dieser Studie wurde der PD1-Antikörper Nivolumab in Kombination mit der Polychemotherapie AVD und Bestrahlung untersucht. Die Studie ist bereits abgeschlossen und publiziert⁷⁶.

Es wurden insgesamt 330 Blutproben – Probenpaare (Zellfraktion für Keimzell-DNA und Plasmafraktion für zellfreie DNA) von den 165 Patienten der Kohorte analysiert. Für 34 Patienten der Kohorte lagen Daten aus dem zielgerichteten Sequenzieren vor, die im Rahmen einer anderen Studie der AG Borchmann mittels tiefer zielgerichteter Sequenzierung ausgewählter genomischer Regionen zur Genotypisierung und Identifizierung der minimalen Resterkrankung bei den Patienten mit Hodgkin Lymphom generiert wurden (Sobesky et al.)²⁰. Die genannten Daten wurden verwendet, um die Ergebnisse in dieser Studie zu validieren.

Alle Behandlungen und radiologischen Untersuchungen wurden gemäß den Studienprotokollen durchgeführt und sind in den jeweiligen Studien und Studienprotokollen ausführlich beschrieben.

3.2. Ethische Überlegungen

Alle Patienten haben eine schriftliche Einwilligung zur Sammlung von peripherem Blut zu Forschungszwecken abgegeben. Alle Forschungsuntersuchungen an Menschen wurden gemäß genehmigten Protokollen durch die örtliche Ethikkommission und der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

3.3. Stichprobensammlung und Verarbeitung

Die Proben aus der peripheren Blutbahn wurden im Rahmen von oben genannten GHSG-Studien gesammelt. Die Proben wurden zu vorher festgelegten Zeitpunkten innerhalb jeder Studie entnommen. Die Proben wurden entweder in 9 ml EDTA-Röhrchen (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) gesammelt und innerhalb von 2 Stunden verarbeitet oder in 10 ml Streck- oder PAXgene-zellfreie-DNA-Blutentnahmeröhrchen (Streck, Omaha, NE) gesammelt und innerhalb von 3 Tagen verarbeitet. Für diese Studie wurden lediglich die prätherapeutischen Proben von unbehandelten Patienten ausgewählt. Die Streck- oder PAXgene-zellfreie-DNA-Blutentnahmeröhrchen wurden zunächst bei Raumtemperatur mit 1900g für 15 Minuten zentrifugiert, um das Plasma zu trennen. Zur weiteren Reinigung des Plasmas wurde die Plasmaschicht in ein sauberes 15 ml LoBind-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert und erneut bei 1900g für weitere 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde dann in 2-5 ml Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Zellpellet-Fraktion, die nach dem ersten Zentrifugationsschritt verblieb, wurde ebenfalls in 2-5 ml Kryoröhrchen aliquotiert und zusammen mit den Plasmaproben bei -80°C gelagert, um als Keimzellkontrolle verwendet zu werden. Falls EDTA-Röhrchen verwendet wurden, wurde das gleiche Protokoll befolgt, jedoch wurde der erste Zentrifugationsschritt bei 900g für 7 Minuten bei Raumtemperatur und der zweite Zentrifugationsschritt bei 2500g für 10 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die hier beschriebene Bearbeitung der Blutproben erfolgte nach Probeneingang im Labor von mir, Frau Sophia Sobesky und Frau Julia Mattlener.

3.4. DNA-Extraktion

Zur Extraktion von zellfreier DNA aus Plasmaproben wurde das QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Es wurden 1, 2 oder 3 ml Plasma als Ausgangsmaterial verwendet. Die entsprechende Menge von ACL-Puffer (0,8 ml, 1,6ml oder 2,4 ml entsprechend der Plasma-Menge, mit Zusatz von 1,0 µg Träger-RNA) (Qiagen) sowie 100 µl, 200 µl bzw. 300 µl Proteinase K (Qiagen) wurden gemäß dem Protokoll zugegeben (Lyse und Inaktivierung der RNasen und DNasen). Nach

dem Pulsvortexen für 30 Sekunden wurden die Proben für 2 Stunden bei 60 °C inkubiert. Der Inkubationsschritt wurde im Gegensatz zur Protokollempfehlung zur Verbesserung der Effektivität von 30 Minuten auf 2 Stunden verlängert. Im nächsten Schritt wurden 1,8 ml, 3,6 ml bzw. 5,4 ml ACB-Puffer hinzugefügt (Bindung). Nach dem Pulsvortexen wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der QIAvac 24 Plus (Qiagen, Hilden, Deutschland) für die folgenden Schritte der DNA-Extraktion verwendet. Dafür wurde die Lysat-Puffer-Mischung mithilfe der Vakuumpumpe und der QIAamp Mini-Säule (Qiagen, Hilden, Deutschland) in mehreren Schritten unter Verwendung von zwei weiteren Waschung-Puffern (600 µl ACW1 und 750 µl ACW2) sowie 750 µl Ethanol durch die Säulen gezogen. Anschließend wurde die QIAamp Mini-Säule in ein sauberes 2 ml Kryoröhrchen platziert und bei einer Geschwindigkeit von 14.000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Nach der Inkubation für 10 Minuten bei 56 °C wurden 20–150 µl AVE-Puffer in die Mitte der QIAamp Mini-Membran hinzugefügt (Elution). Nach der Inkubation bei Raumtemperatur für 3 Minuten wurde erneut bei einer Geschwindigkeit von 14.000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die Lösung mit der extrahierten DNA in 2ml Kryoröhrchen übertragen und bei -40 °C gelagert.

Zur Extraktion von Keimzell-DNA aus Zellpellets wurde das Qiagen QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers (Spin-Protokoll) verwendet. Es wurden 200 µl Zellpellet als Ausgangsmaterial verwendet. Es erfolgte die Zugabe von 20 µL Proteinase K (Qiagen). Nachdem 200 µL AL-Puffer hinzugefügt wurden, wurde die Probe gründlich für 15 Sekunden durch Pulsvortexen gemischt. Die Mischung wurde dann für 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde 200 µL Ethanol zur Probe gegeben und erneut gründlich gemischt. Die gesamte Mischung wurde dann auf die QIAamp Mini-Spin-Säule (Qiagen) übertragen, wobei darauf geachtet wurde, den Rand des Röhrchens nicht zu benetzen. Nach dem Zentrifugieren der Mini-Spin-Säule in einem 2 ml Röhrchen bei 8000 U/min für 1 Minute wurde das Filtrat verworfen und die Mini-Spin-Säule in ein neues 2 ml Röhrchen platziert. Nach der vorsichtigen Zugabe von 500 µL AW1-Puffer wurde erneut für 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert. Das verbliebene Filtrat wurde verworfen. Als nächstes wurden 500 µL AW2-Puffer hinzugefügt und bei 14000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Filtrats erfolgten die Zugabe von 200 µL AE-Puffer oder destilliertem Wasser und die Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur (Elution). Ein zweiter Elutionsschritt wurde durchgeführt. Anschließend wurde die Lösung mit der extrahierten DNA in 2ml Kryoröhrchen übertragen und bei -40 °C gelagert.

Die hier beschriebene Bearbeitung der Proben und die DNA-Extraktion erfolgte von mir, Frau Sophia Sobesky und Frau Julia Mattlener.

3.5. DNA-Verarbeitung, Qualitätskontrolle und Sequenzierung

Die DNA-Verarbeitung, Qualitätskontrolle und Sequenzierung der Proben wurden ohne meine Mitarbeit im Labor des Cologne Center for Genomics von Frau Elisabeth Kirst durchgeführt.

Für die Gesamtexomsequenzierung (WES) wurde die SureSelect Human All Exon V7-Plattform (Agilent, Santa Clara, CA) verwendet, die 35,7 Mb der humanen exonischen Regionen einbezieht. Für jede zu sequenzierende Probe wurden einzelne Bibliotheksvorbereitungen, Hybridisierungen und Captures durchgeführt. Während des Capturing-Prozesses wurden der fragmentierten DNA Adaptoren hinzugefügt, die für die anschließende Sequenzierung benötigt werden. Zur ersten Quantifizierung der Eingangs-DNA wurde der Qubit-Fluorometer (Invitrogen, Waltham, MA) verwendet. Es wurden, sofern verfügbar, 25 ng DNA für die Bibliotheksvorbereitung verwendet. Die minimal erforderliche DNA-Menge betrug 15 ng. Zur detaillierteren Quantifizierung der Eingangs-DNA wurde unter Berücksichtigung der Größenverteilung und als Teil der Qualitätskontrolle das TapeStation 2200 System (Agilent) verwendet, um die Eingangsmengen der DNA zu quantifizieren. Als Grundvoraussetzung wurde festgesetzt, dass mindestens 25% der gesamten Eingangs-DNA im richtigen Größenbereich (50-700bp) liegen. TapeStation-DNA-Quantifizierungen, die auf den Größenbereich der zellfreien DNA (50-700 bp) beschränkt waren, wurden für alle weiteren Berechnungen verwendet, die DNA-Mengen als Eingabe erforderten. Bibliotheken wurden unter Verwendung des SureSelectXT HS Automated Target Enrichment (Agilent) einschließlich der eindeutigen molekularen Identifikatoren (UMI), die mit einer zusätzlichen Index-Leseoperation sequenziert wurden, und der Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform (Agilent) für das Illumina Paired-End Multiplex-Sequenzierungsprotokoll (Illumina, San Diego, CA) vorbereitet wurden. Nach der Qualitätskontrolle mit dem 2200 TapeStation-System und der Quantifizierung mit dem Qubit-System (Thermo Fisher, Waltham, MA) wurden Bibliothekspools generiert. Diese Pools wurden dann auf einem Illumina NovaSeq6000-Sequenziersystem (Illumina, San Diego, CA) mit S4-Flow-Cells und 2 x 100 bp Ausgabe pro Flow-Cell sequenziert. Es wurde eine Datenleistung von 24 Gb für zellfreie DNA und 6 Gb für Keimzellkontrollen angestrebt.

In der Veröffentlichung der AG Borchmann mit dem Titel „In-depth cell-free DNA sequencing reveals genomic landscape of Hodgkin’s lymphoma and facilitates ultrasensitive residual disease detection“ (Sobesky et al., Med, 2021) wurden zielgerichtete Sequenzierungen der Proben durchgeführt²⁰. In diese Veröffentlichung wurden hauptsächlich die Proben aus der NIVAHL-Studie einbezogen. Die DNA-Extraktion erfolgte durch Frau Sophia Sobesky, mich und Frau Julia Mattlener. Die Verarbeitung der Proben und die zielgerichtete Sequenzierung wurden von Frau Elisabeth Kirst im Labor des Cologne Center for Genomics durchgeführt. Die

generierten Daten wurden in meiner Arbeit zu Validierungszwecken und zur Bestimmung der Korrelation zwischen beiden Ansätzen verwendet (siehe Abschnitt 3.13.).

3.6. Grundlegende Datenverarbeitung

Die in diesem Abschnitt beschriebene Datenverarbeitung wurde durch Herrn Dr. Sven Borchmann mit meiner Mithilfe durchgeführt.

Die Software Bcl2fastq2 (v2.20, Illumina) wurde verwendet, um die bcl-Rohdaten zu „demultiplexieren“. Bei der Demultiplexierung wurden die Daten von gepoolten Proben auf der Grundlage der verschiedenen Indexsequenzen getrennt, die während der Bibliotheksvorbereitung speziell für jede Probe an die DNA-Fragmente ligiert wurden. Es wurden die Standardeinstellungen, um die Forward-R1- und Reverse-R3-Reads zu „demultiplexieren“ (`--mask-short-adapter-reads 22 --minimum-trimmed-read-length 35 --barcode-mismatches 1 --adapter-stringency 0.9`) verwendet. Die Fastq-Dateien wurden mit der bcl2fastq2-Software geschnitten. Die UMI-R2-Reads wurden in einem separaten Durchlauf mit den folgenden Einstellungen ohne jegliches Adapter-Trimming „demultiplexiert“: `--mask-short-adapter-reads 0 --minimum-trimmed-read-length 0`. Die Rohdaten wurden mithilfe des Burrows-Wheeler-Aligner (BWA) Alignmentsalgorithmus auf das Referenzgenom des Menschen, hg19, mit einer Basenqualitätsschwelle von 15 für das Trimmen der Reads (Parameter: `-q 15`) abgebildet⁷⁷. Die resultierenden BAM-Dateien wurden weiterhin von einer speziell für dieses Projekt entwickelten Pipeline verarbeitet. AddUMIsToBam (<https://github.com/mbusy/AddUMIsToBam>) wurde verwendet, um jedem gelesenen Read in jeder BAM-Datei eindeutige molekulare Identifikatoren (UMIs) zuzuordnen. GroupReadsByUmi-Funktion von Fgbio (<http://fulcrumgenomics.github.io/fgbio/>) wurde verwendet, um UMIs mit der Adjazenz-Strategie zu gruppieren, wobei maximal ein Bearbeitungsvorgang erlaubt war. Anschließend wurde die CallMolecularConsensusReads-Funktion von Fgbio verwendet, um einen Konsensus-Read für jede Gruppe von Reads zu erzeugen, die wahrscheinlich aus demselben Molekül stammen, sodass nur ein Read von jedem UMI akzeptiert wurde, um die Sequenz dieses Moleküls zu definieren. Schließlich wurden die Reads unter Verwendung von BWA mem mit den Standardeinstellungen erneut ausgerichtet⁷⁷. MPILEUP-Dateien wurden unter der Verwendung von Samtools⁷⁸ generiert, wobei Überlappungen ignoriert wurden (Parameter: `-x`), und die Mapping-Qualität für Reads mit übermäßigen Mismatches angepasst wurde (Parameter: `-C 50`). Lediglich die Reads mit einer minimalen Mapping-Qualität von 40 (Parameter: `-q 40`) und Basen mit einer minimalen Basenqualität von 30 (Parameter: `-Q 30`) wurden berücksichtigt. Die MPILEUP-Datei wurde auf den während der Bibliotheksvorbereitung erfassten genomischen Bereich beschränkt (Parameter: `-l`).

3.7. Bestimmung der somatischen Kopienzahlvariationen

Die in diesem Abschnitt beschriebene Datenverarbeitung sowie Bestimmung der Kopienzahlvariationen wurde durch Herrn Dr. Sven Borchmann mit meiner Mithilfe durchgeführt.

Eine Pipeline wurde entwickelt, um somatische Kopienzahlvariationen in zellfreier DNA basierend auf dem Toolkit CNVKit zu identifizieren⁷⁹. Zunächst wurde zellfreie DNA von einer Kohorte von 10 gesunden Spendern vorbereitet und wie oben beschrieben sequenziert. Diese Kohorte gesunder Kontrollen wurde als Referenzsatz verwendet, um einen durchschnittlichen technischen Hintergrund zu definieren, mit dem die somatische Kopienzahlvariationen einer bestimmten Probe verglichen wurden. Die Zielregion für das CNVKit⁷⁹ wurde als die Region definiert, die von den RNA-Baits für das jeweilige Panel-Design abgedeckt wurde. CNVKit's Batch-Funktion⁷⁹ wurde dann für jede zellfreie DNA-Probe ausgeführt, wobei nach der UMI-Verarbeitung konsensbildende Reads, die mit BWA mem⁷⁷ auf hg19 ausgerichtet wurden, als Eingabe verwendet wurden. Zugriffsdaten von dem CNVKit⁷⁹ für hg19 und die Option zum Drop-Low-Coverage (Parameter: --drop-low-coverage) wurden in allen Durchläufen verwendet. Dabei wurden die Reads mit einer Lesetiefe von 0 oder sehr nahe bei 0 verworfen. Für alle anderen Einstellungen wurden Standardparameter verwendet. Segmentierte Kopienzahlaufrufe wurden generiert und ein Amplitudenschwellenwert von 0,02 bzw. -0,02 wurde verwendet, um ein Segment als somatische Kopienzahlamplifikation bzw. -deletion zu definieren. Absolute somatische Kopienzahlvariationen wurden bewusst nicht ermittelt, weil zum einen die zellfreie DNA nicht ausschließlich aus Tumorzellen stammt und manchmal stark durch den Hintergrund verdünnt wird, was die Sensitivität reduziert, und zum anderen somatische Kopienzahlvariationen, die aus zellfreier DNA abgeleitet sind, einen Durchschnitt der individuellen somatischen Kopienzahlvariationen von Tumorzellen im Körper darstellen, die insbesondere im Fall von HL bekanntermaßen sehr variabel zwischen einzelnen Tumorzellen sind⁸⁰.

Um fokale rekurrente somatische Kopienzahlvariationen auf Arm-Ebene abzuleiten und potenziell biologisch relevante Veränderungen zu identifizieren, wurde GISTIC 2.0 verwendet⁸¹. Segmentierte Kopienzahlaufrufe wurden als Eingabe verwendet und GISTIC 2.0 wurde unter Einbeziehung der gesamten Probenkohorte mit den folgenden Einstellungen ausgeführt: Informationen zur Zytoband- und Genlokalisierung wurden aus hg19 entnommen, Amplifikationsschwelle 0,02 (Parameter: -ta), Deletionsschwelle 0,02 (Parameter: -td), Berechnung der Signifikanz nach Gen (Parameter: -genegistic 1), einschließlich der Analyse auf breiter Ebene (Parameter: -broad 1), Schwellenwert zur Unterscheidung von breiten und fokalen Ereignissen 0,98 (Parameter: -brlen), Konfidenzlevel 0,75 (Parameter: -conf), q-Wert-

Schwelle 0,05 (Parameter: -qvt), Durchführung von Arm Peel Off (Parameter: -armpeel 1) und das Extrem der Zusammenführung (Parameter: -gcm). Für alle anderen Einstellungen wurden Standardparameter verwendet.

Um den CNV-Score zu berechnen, der zur Bestimmung der Menge der ctDNA in einer Probe verwendet wurde, erfolgte die Berechnung des durchschnittlichen logarithmierten quadratischen Z-Scores aller Kopienzahlveränderungen (CNVs) in einer Probe.

3.8. Bestimmung der somatischen Einzelbasen-Substitutionen

Die in diesem Abschnitt beschriebene Datenverarbeitung sowie Bestimmung der somatischen Einzelbasen-Substitutionen wurde durch Herrn Dr. Sven Borchmann mit meiner Mithilfe durchgeführt.

Um die Sensitivität und Spezifität zu verbessern, wurde die Bestimmung von somatischen Einzelbasen-Substitutionen durch vergleichende Fehlerunterdrückung (CES) unterstützt. Für dieses Verfahren wurde zellfreie DNA von einer Kohorte von 10 gesunden Spendern vorbereitet und wie zuvor beschrieben sequenziert. Konsensbildende Reads nach UMI-Verarbeitung, die mit BWA mem⁷⁷ auf hg19 ausgerichtet wurden, wurden als Eingabe verwendet. Alle Positionen mit einer Nicht-Referenz-Allelhäufigkeit > 5% (hg19), die wahrscheinlich Keimbahn-Einzelnukleotidpolymorphismen darstellten, wurden unter Verwendung maßgeschneiderter Skripte in dieser Referenzkohorte auf eine Nicht-Referenz-Allelhäufigkeit von 0 gesetzt. Anschließend wurde TNER⁸² verwendet, um anhand der gesunden Spenderkontrollen als Eingabe eine Datenbank positionsspezifischer durchschnittlicher Hintergrundfehlerraten für jede Position im Zielbereich zu erstellen. Diese Datenbank wurde als Eingabe für TNER⁸² verwendet, um jeden aus den konsensbildenden Reads nach UMI-Verarbeitung generierten zellfreien DNA-Mpileup (ausgerichtet auf hg19 mit BWA mem⁷⁷) wie zuvor beschrieben zu optimieren. Der Parameter für die Polierstärke wurde auf 0,05 (Parameter: input.alpha = 0,05) gesetzt. TNER⁸² verwendet Tri-Nukleotid-Fehlerraten in der gesunden Referenzkohorte, um wahrscheinliche Sequenzierfehler zu unterdrücken. Zusätzlich wurden Sequenzierfehler an Positionen mit hoher Fehlerhäufigkeit unter Verwendung maßgeschneiderter Skripte unterdrückt. Jede potenziell variantenrelevante Position wurde mit dem oben genannten, generierten positionsspezifischen durchschnittlichen Hintergrundfehlerratenprofil verglichen. Wenn der durchschnittliche Hintergrundfehler an einer bestimmten Position > 0,5% betrug, wurde diese Position aufgrund einer hohen Rate an Sequenzierfehlern für die Variantenaufindung entfernt.

Anschließend wurde dieser fehlerkorrigierte Datensatz, der für jede zellfreie DNA-Probe generiert wurde, als Eingabe für eine maßgeschneiderte Variantenaufindung-Pipeline verwendet.

Eine Variante wurde an einer Position aufgerufen, wenn folgende Kriterien erfüllt waren: die minimale Sequenzierungstiefe an einer Position betrug 50 für die cfDNA-Probe und 10 für die Keimzell-Probe; es wurden mindestens 8 Reads gefunden, die die Variante unterstützen; die Variante hatte Unterstützung sowohl auf dem Plus- als auch auf dem Minusstrang; die relative Allelhäufigkeit der Variante betrug mindestens 0,1%; die Variante hatte eine relative Allelhäufigkeit von weniger als 2% in der Keimzellprobe; die relative Allelhäufigkeit in der zellfreien DNA-Probe war mindestens 3-mal höher als in der Keimzellprobe; der Fisher-Exakt-Test an einer 2x2-Kontingenztafel, einschließlich der Variante gegenüber dem Referenz-Allel und der zellfreien DNA gegenüber der Keimzellreferenzprobe, ergab einen p-Wert $< 0,2$ und schließlich, wenn ein einseitiger Binomialtest mit der alternativen Hypothese, dass die beobachtete Allelhäufigkeit der Variante höher ist als die Hintergrundfehlerrate an dieser Position, einen p-Wert $< 0,05$ ergab. Als zusätzlicher Filter wurde jede Variante auf ihre Häufigkeit in ExAC⁸³ überprüft. Varianten mit einer Häufigkeit über 0,01 in ExAC-Version 0.3⁸³ wurden ausgeschlossen. Darüber hinaus wurden einzelne Einzelbasen-Substitutionen, die in unmittelbarer Nähe (<6 Basenpaare) zu einem identifizierten InDel waren, ausgeschlossen. Varianten wurden mithilfe von ANNOVAR und den Datenbanken ExAC-Version 0.3 (Parameter: -protocol exac03), dbNFSP-Version 3.0a (Parameter: -protocol dbnsfp30a) und dbSNP-Version 147 (Parameter: -protocol avsnp147) annotiert und klassifiziert⁸⁴.

3.9. Bestimmung der somatischen kleinen Insertionen und Deletionen (InDel)

Die in diesem Abschnitt beschriebene Datenverarbeitung sowie Bestimmung der somatischen kleinen Insertionen und Deletionen wurde durch Herrn Dr. Sven Borchmann mit meiner Mithilfe durchgeführt.

Zur Identifizierung der kleinen somatischen Insertionen und Deletionen (InDels) und Anpassung der Skripte zur Filterung der erkannten Varianten wurde Varscan2⁸⁵ verwendet. Als Eingabe wurden mpileup-Dateien verwendet, die wie oben beschrieben, aus konsensbasierten Reads nach UMI-Verarbeitung (ausgerichtet auf hg19 mit BWA mem⁷⁷) erzeugt wurden. Zunächst wurde eine umfassende, ungefilterte Tabelle aller potenziellen InDels mit Varscan2⁸⁵ mit den folgenden Einstellungen erstellt: minimale Coverage der Datei der zellfreien-DNA-Probe 1 (Parameter: --min-coverage 1); minimale Coverage der entsprechenden Datei der Keimzell-DNA-Probe 1 (Parameter: --min-coverage-normal 1); minimale Allelelfrequenz 10^{-9} (Parameter: --min-var-freq); minimale Frequenz zur Bezeichnung einer Variante als homozygot 0.75 (Parameter: --min-freq-for-hom); minimaler somatischer p-Wert 0.99 (Parameter: --somatic-p-value) und Deaktivierung des Strangfilters (Parameter: --strand-filter 0). Die Parameter wurden absichtlich lockerer ausgewählt, da im nächsten Schritt eine strengere Filterung stattfinden sollte.

Mit Hilfe von angepassten Skripten wurde jede rohe InDel-Datei gefiltert, so dass nur Aufrufe, die folgende Kriterien erfüllten, den Filter passiert haben: relative Allelfrequenz der übereinstimmenden Keimzell-Kontrolle < 0,5 %; somatischer p-Wert des Aufrufs < 0,2; absolute Allelfrequenz der übereinstimmenden Keimzell-Kontrolle < 3; kein Heterozygotie-Verlust in VarScan2⁸⁵; mindestens 3-mal höhere relative Variantenallelfrequenz in der zellfreien DNA-Probe als in der Keimzell-Kontrolle; mindestens 8 Reads, die die Variante unterstützen; mindestens ein Read auf dem Plusstrang und ein Read auf dem Minusstrang, die die Variante unterstützen; eine minimale Sequenzierungstiefe von 50 an der Lokalisation der Variante in der zellfreien DNA-Probe. Jede Variante wurde als zusätzliche Filterung auf ihre Häufigkeit in ExAC⁸³ überprüft. Varianten mit einer Häufigkeit über 0,01 in ExAC-Version 0.3⁸³ wurden ausgeschlossen. Varianten wurden mithilfe von ANNOVAR und den Datenbanken ExAC-Version 0.3 (Parameter: -protocol exac03), dbNFSP-Version 3.0a (Parameter: -protocol dbnsfp30a) und dbSNP-Version 147 (Parameter: -protocol avsnp147) annotiert und klassifiziert⁸⁴.

3.10. Zusätzliche Variantenfilterung

Die in diesem Abschnitt beschriebene Datenverarbeitung sowie die Identifizierung der Tumorsuppressorgene und Onkogene wurde durch mich mit Hilfe von Dr. Sven Borchmann durchgeführt.

Um rekurrente Mutationen, die wahrscheinlich Treibermutationen sind und somit für die Pathogenese von HL relevant sind, entweder als Tumorsuppressorgene (TSG) oder Onkogene (OG) zu identifizieren, wurde eine leicht modifizierte Version der Vogelstein-Regel verwendet⁸⁶. Mit Hilfe von angepassten Skripten wurde ein Gen als Tumorsuppressorgen identifiziert, wenn das Verhältnis der kombinierten Anzahl von Spleiß- und Nonsense-Mutationen sowie Frameshift Insertionen und Deletionen zu allen kodierenden Mutationen $\geq 0,20$ betrug.

$$\text{Verhältnis X} = \frac{(X_{\text{Spleiß-Mutationen}} + X_{\text{Nonsense-Mutationen}} + X_{\text{Frameshift-Deletionen/-Insertionen}})}{X_{\text{Alle kodierende Mutationen}}}$$

wenn Verhältnis X $\geq 0,20 \rightarrow$ TSG

Ein Gen wurde als Onkogen identifiziert, wenn es kein Tumorsuppressorgen war und das Verhältnis von Mutationen, die zu einer Veränderung der Aminosäuren führen geteilt durch die Gesamtzahl der Mutationen $\geq 0,20$ betrug.

$$\text{Verhältnis Y} = \frac{Y_{\text{Mutationen, die zu einer Aminosäurenveränderung führen}}}{Y_{\text{Alle Mutationen}}}$$

wenn Verhältnis Y $\geq 0,20 \rightarrow$ OG

Die Bewertung der Gene als potenzielle Tumorsuppressorgene oder Onkogene wurde für alle Gene mit mindestens 5 Mutationen in der Kohorte durchgeführt. Dabei wurden bestimmte Gene manuell ausgeschlossen, in denen die Mutationen aufgrund ihrer Lage in hochrepetitiven Regionen oft zu Sequenzierungs- und Alignmentfehlern führen^{87,88}. Diese Gene sind MUC4 (Mucin 4), MUC5AC (Mucin 5AC), MUC19 (Mucin 19) und NBPF1 (Neuroblastoma-breakpoint-Family-Mitglied 1). Anschließend wurde MMP28 (Matrix-Metalloproteinase 28) manuell ausgeschlossen, da es auf eine einzige Position (chr17, Pos. 34100351) beschränkt war und eine relativ fixierte, unabhängige von der Probe Allelhäufigkeit und strenge (-)-Strand-Beschränkung aufwies. Des Weiteren wurden die verbliebenen Mutationen auf Wiederholungen, Strangbrüchen und auf Korrelation in der COSMIC-Datenbank überprüft⁸⁹. Basierend auf dieser Überprüfung wurden FAAP20 (FA-core complex associated Protein), MUC13 (Mucin 13), OR4Q2 (olfactory receptor family 4 subfamily member 2), PRDM9 (PR domain zinc finger protein 9), PRSS48 (serine protease 48), PTCH3 (patched domain containing 3), COL4A6 (collagen type IV alpha 6 chain), KCNM1 (potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1), SIRPB1 (signal regulatory protein beta 1) und SPAG9 (sperm associated antigen 9) aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

3.11. Gruppierung der Mutationen innerhalb der dreidimensionalen Proteinstrukturen

Die in diesem Abschnitt beschriebene Datenverarbeitung wurde durch Herrn Dr. Sven Borchmann durchgeführt.

Um die Varianten innerhalb der 3-dimensionalen Proteinstrukturen in allen identifizierten Onkogenen zu clustern, die in dieser Kohorte mindestens 8 Varianten aufwiesen, wurde Mutation3D⁹⁰ verwendet. Denn dies wurde heuristisch als die Mindestanzahl von Varianten identifiziert, die für eine sinnvolle Analyse des jeweiligen Onkogens benötigt wurde. Alle Aminosäuresequenzveränderungen, die durch identifizierte Varianten verursacht waren, wurden für jedes analysierte Onkogen als Eingabe für Mutation3D⁹⁰ verwendet. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass alle ModBase-Homologiemodelle mit einem ModPipe-Qualitätswert (MPQS) $\geq 1,1$ einbezogen wurden, wobei mindestens drei Mutationen und mindestens eine eindeutige Aminosäureänderung pro Cluster erforderlich waren und eine maximale intracluster Distanz zwischen Mutationen von 25 Å erlaubt wurde. Ein identifiziertes Cluster wurde als ausreichend wahrscheinlich vorhanden betrachtet, wenn sein p-Wert $< 0,1$ war.

3.12. Bestimmung der Mutationssignaturen

Die in diesem Abschnitt beschriebene Datenverarbeitung wurde durch Herrn Dr. Sven Borchmann mit meiner Mithilfe durchgeführt.

Die Mutationssignaturen wurden mithilfe von R⁹¹ und deconstructSigs⁹² identifiziert. Die Mutationen wurden für jeden Patienten und für jedes Gen mit mehr als 30 Mutationen in der Kohorte mithilfe der COSMIC-Signaturen für Einzelbasensubstitutionen als Referenzsignaturen in Mutationsmuster dekonstruiert⁹³. Die Normalisierung des Trinukleotid-Kontexts basierte auf Beobachtungen des Trinukleotid-Kontexts im kodierenden Exom (Parameter: tri.counts.met,od = 'exome'). Eine Mutationssignatur wurde als erkannt in einem Patienten oder Gen betrachtet, wenn das zugehörige Gewicht > 0,1 betrug. Die Mutationssignaturen, die in mindestens 9% der Patienten in der Kohorte erkannt wurden, wurden als wiederkehrende Mutationssignaturen in HL betrachtet (COSMIC-Signaturen für Einzelbasensubstitutionen 1, 3, 6, 7, 9, 15 und 25). Sowohl für Patienten als auch für Gene wurde der Anteil der Mutationen, der nicht durch eine dieser Signaturen erklärt wurde, als "andere/nicht zugeordnet" klassifiziert.

3.13. Validierung

Die in diesem Abschnitt beschriebene Datenverarbeitung und Analyse wurde von mir und Frau Sophia Sobesky mit Hilfe von Dr. Sven Borchmann durchgeführt.

Zur Validierung wurden neun Patienten sowohl einer WES-Analyse als auch einer zielgerichteten Sequenzierungsplattform unterzogen (Sobesky et al.)²⁰ (siehe Abschnitt 3.5). Zuerst wurden die Allelfrequenzen von Varianten, die mit beiden Ansätzen erkannt wurden, verglichen und ihre Korrelation berechnet. Anschließend wurde die Detektionsrate von Mutationen durch die WES-Analyse von zellfreier DNA berechnet, wobei die Mutationen durch die zielgerichtete Sequenzierung als Referenz dienten. Es wurde auch die Mutationslast (Mutationen/Mb) zwischen beiden Plattformen verglichen und ihre Korrelation berechnet. Um die CNV-Bestimmung durch den Ansatz der WES-Analyse von zellfreier DNA zu validieren, wurde die Detektionsrate von CNV berechnet und die CNV-Bestimmung durch die zielgerichtete Sequenzierung als Referenz genommen. Die CNV-Loci, die in diese Analyse eingeschlossen wurden, wurden auf die CNV beschränkt, die in beiden Ansätzen die gleichen Locus-Grenzen aufwiesen. Darüber hinaus wurde die Bestimmungsrate des Epstein-Barr-Virus (EBV) in Plasma-DNA zwischen beiden Plattformen verglichen²⁰.

3.14. Statistische Methoden

Die in diesem Abschnitt beschriebenen statistischen Analysen wurden von mir und Herrn Dr. Sven Borchmann durchgeführt.

Diskrete Variablen wurden mit dem Fisher-Exact-Test verglichen. Zwei kontinuierliche Variablen wurden mit dem Student's t-Test verglichen, wenn von der Normalverteilung der Variablen ausgegangen werden konnte. Es wurde mit dem Mann-Whitney-Test verglichen, wenn keine Normalverteilung der Variablen vorlag. Mehrere kontinuierliche Variablen wurden mit einem One-Way-ANOVA mit Welsh-Korrektur verglichen, wenn von der Normalverteilung der Variablen ausgegangen werden konnte, oder dem Kruskal-Wallis-Test, wenn nicht. Die Normalverteilung der Variablen wurde heuristisch anhand der Verteilung der Werte überprüft und grafisch dargestellt. Der verwendete Test wurde angegeben, wann immer ein statistischer Test durchgeführt wurde.

Die Konzentrationen von ctDNA wurden in Haploid Genome Equivalents pro Milliliter (HGE/mL) ausgedrückt und berechnet, indem die durchschnittliche ctDNA-Allelfrequenz mit der Konzentration von ctDNA in pg/ml multipliziert und dann durch 3,3 geteilt wurde.

3.15. Mutationslast

Die Bestimmung der Mutationslast erfolgte von mir.

Die Mutationslast wurde berechnet, indem die Anzahl der Mutationen, die innerhalb des Zielbereichs für einen bestimmten Patienten auftraten, durch die Größe des Zielbereichs geteilt wurde.

4. Ergebnisse

4.1. Patienteneigenschaften

Patientenmerkmale waren repräsentativ für HL mit einer leichten Prädominanz des männlichen Geschlechts (55%), einem Medianalter von 34 [Spannweite: 18-60], IPS-Werten von 0-6, ECOG-Performance-Status (PS) von 0-2 und hauptsächlich mit nodulär sklerosierendem Subtyp (48%) (Tab. 3).

Tabelle 3: Patienteneigenschaften in der Gesamtkohorte

Patienteneigenschaften	n/Durchschnitt	%/Spannweite
Studie		
HD21	151	91,52%
NIVAHL	14	8,48%
Geschlecht		
männlich	90	54,55%
weiblich	75	45,45%
Alter	34	[18-60]
IPS		
0	9	5,45%
1	32	19,39%
2	54	32,73%
3	41	24,85%
4	17	10,30%
5	7	4,24%
6	5	3,03%
Ann-Arbor Stadium		
1	1	0,61%
2	35	21,21%
3	59	35,76%
4	70	42,42%
Histologie		
nodulär sklerosierender Subtyp	79	47,88%
klassisches HL ohne weitere Subtypisierung	42	25,45%
gemischte Zellularität	16	9,70%
lymphozytenreicher Subtyp	4	2,42%
nicht bekannt	24	14,55%
ECOG		
0	118	71,52%
1	43	26,06%
2	4	2,42%

4.2. Sequenzierung

Durchschnittlich wurde eine Gesamtzahl der Sequenzierungsreads pro cfDNA-Probe von $2,9 \times 10^8$ ($\pm 1,7 \times 10^6$ S.E.M) erzeugt. Nach Fehlerreduktion und Deduplikation (Entfernung der Duplikate) mittels der eindeutigen molekularen Identifikatoren (UMI) wurde der Durchschnitt von $1,9 \times 10^8$ ($\pm 1,5 \times 10^6$ S.E.M) pro Probe erreicht (Abb. 1a). Hierfür wurden die einzelsträngige UMI in das Protokoll aufgenommen. Nach UMI-Deduplikation betrug die durchschnittliche Coverage pro Patient 399x (± 13 S.E.M) und pro Gen 351x (± 3 S.E.M) (Abb. 1b). Die Coverage beschreibt die Anzahl der Sequenzierungsreads, die eindeutig einer Referenz zugeordnet sind und einen bekannten Teil des Genoms einbeziehen.

Die vorliegenden Daten sind Teil der ergänzenden Materialien zu dem Manuskript, das bei **Journal of Clinical Oncology** eingereicht und zur Publikation angenommen wurde, bei dem ich als Miterstautorin fungiere. Die Datenverarbeitung und die grafische Darstellung erfolgten durch mich in Zusammenarbeit mit Dr. Sven Borchmann.

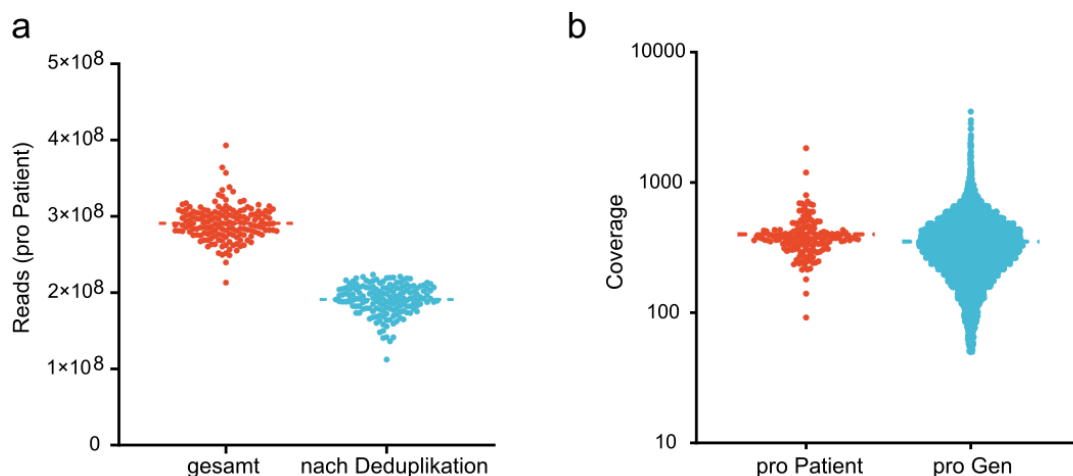


Abbildung 1: Sequenzierungsdaten erzeugt pro cfDNA: (a) die gesamte Anzahl der Sequenzierungsreads und nach der Entfernung der Duplikate; (b) durchschnittliche Coverage nach Deduplikation pro Patient und pro Gen

Die mediane ctDNA-Konzentration betrug 2,26 haploide Genomäquivalente pro Milliliter (hGE/ml) Plasma (Spannweite: 1,41 – 4,18 hGE/ml) (Abb. 2a). Die mediane Ausgangskonzentration von ctDNA unterschied sich nicht zwischen Männern und Frauen (2,28 hGE/ml und 2,22hGE/ml, $p=0,4201$) (Abb. 2b). Die mediane Konzentration variierte minimal zwischen IPS-Werten und reichte von 2,09 hGE/ml bis 2,43 hGE/ml, wobei eine Tendenz zu höherer Konzentration bei höheren IPS-Werten bestand, jedoch ohne signifikanten Trend ($p_{\text{trend}}=0,1550$) (Abb. 2c). Es wurden keine Unterschiede in der ctDNA-Konzentration zwischen klinischen Stadien beobachtet (Abb. 2d).

Die hier vorliegenden Daten sind Teil der ergänzenden Materialien zu dem Manuskript, das bei **Journal of Clinical Oncology** eingereicht und zur Publikation angenommen wurde, bei dem ich als Miterstautorin beteiligt bin. Die Datenverarbeitung und die grafische Darstellung erfolgten durch mich und Herrn Dr. Jan-Michel Heger mit Hilfe von Herrn Dr. Sven Borchmann.

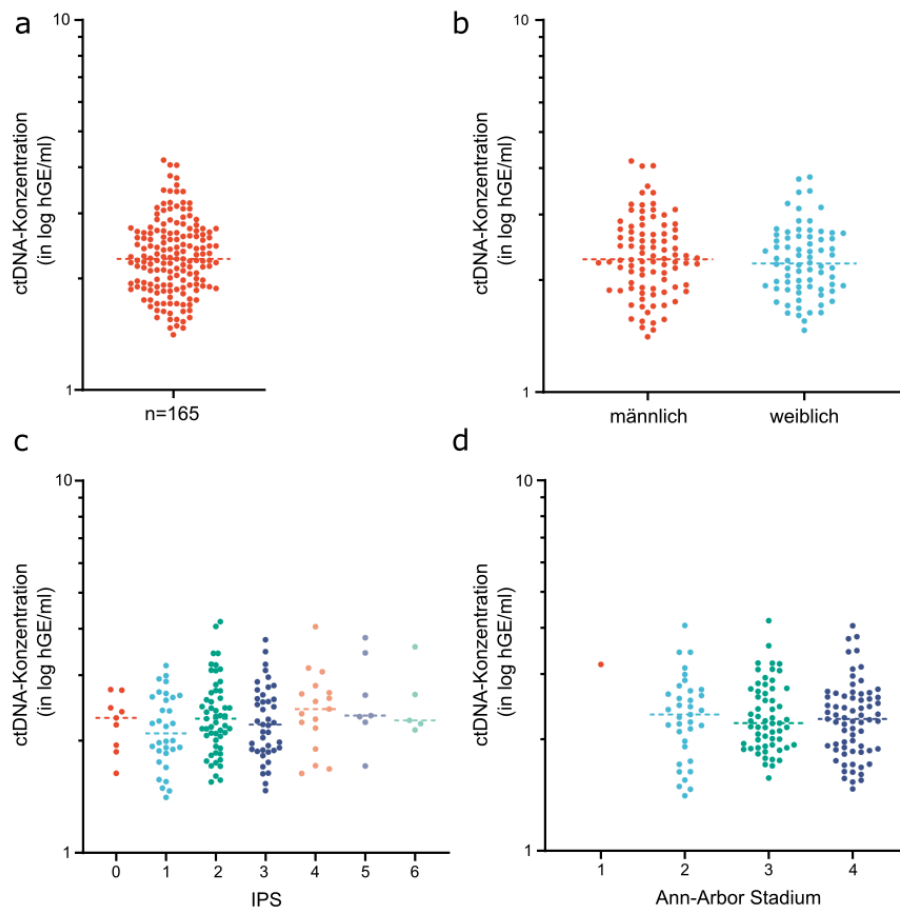


Abbildung 2: Die mediane ctDNA-Konzentration (hGE/ml) in Korrelation mit Patienteneigenschaften: (a) mediane ctDNA-Konzentration in der Gesamtkohorte; (b) ctDNA-Konzentration zwischen Männern und Frauen ohne signifikanten Unterschied; (c) ctDNA-Konzentration zwischen IPS-Werten; (d) ctDNA-Konzentration zwischen Ann-Arbor-Stadien ohne signifikanten Unterschied

4.3. Validierung

Die Ergebnisse wurden validiert, indem das Plasma von 9 Patienten sowohl dem hier vorgestellten Ansatz einer Gesamtexomsequenzierung als auch einer zielgerichteten Sequenzierung (TGP) unterzogen wurde²⁰ (für Methoden siehe Abschnitt 3.13.). Die Allelhäufigkeiten, die durch die zielgerichtete Sequenzierung von ctDNA detektiert wurden, korrelierten eng mit den Allelhäufigkeiten, die durch Gesamtexomsequenzierung (WES) in den entsprechenden Proben detektiert wurden ($R=0,8664$, $p<0,0001$) (Abb. 3a). Es wurde eine mediane Übereinstimmung (d.h. die Proportion der durch WES detektierten Mutationen im Vergleich zur Gesamtzahl der durch zielgerichtete Sequenzierung detektierten Mutationen) von 82% gefunden (95%-KI 60%-84%) (Abb. 3b).

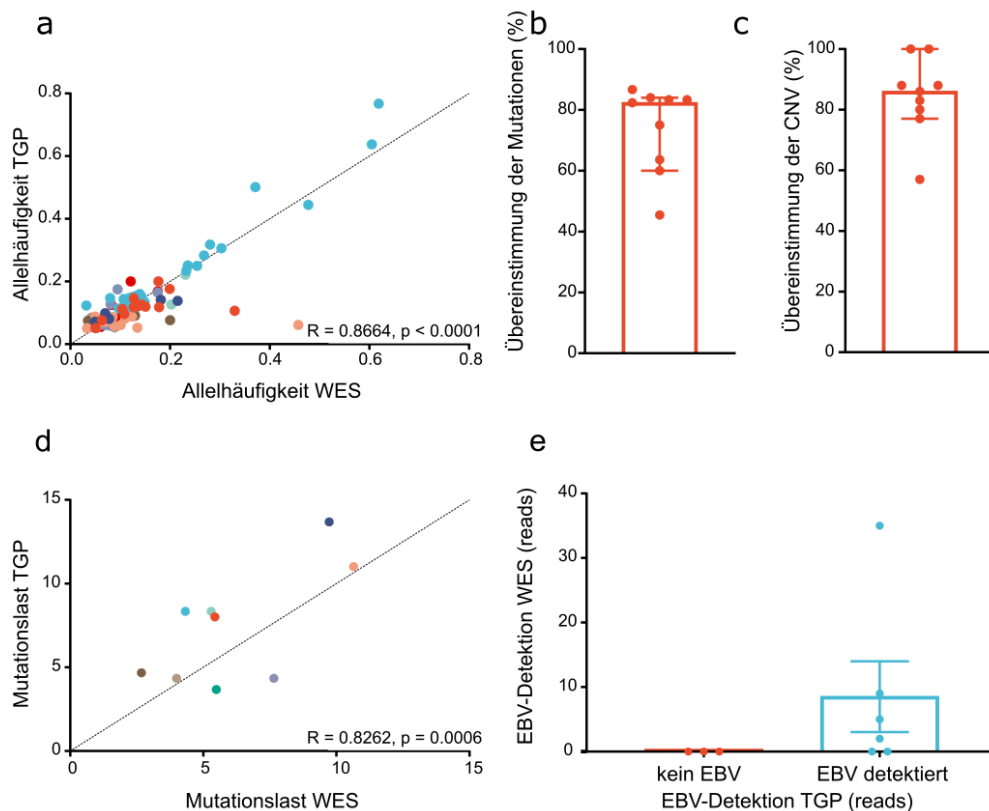


Abbildung 3: Validierung der WES-Ergebnisse mit einer zielgerichteten Sequenzierung (n=9): (a) hohe Korrelation der Allelhäufigkeiten zwischen beiden Ansätzen; (b) Übereinstimmung der Mutationen in Prozent; (c) Übereinstimmung der CNV-Detektion in Prozent; (d) Korrelation der Mutationslast auf patientenindividueller Basis; (e) Korrelation der EBV-Detektion in absoluten Zahlen

Zudem wurde die Detektion von Kopienzahlvariationen (CNV) validiert. Es wurde eine Übereinstimmung (d.h. die Proportion der durch WES gefundenen CNV im Vergleich zu den durch zielgerichtete Sequenzierung gefundenen CNV) von 83% gefunden (95%-KI 66%-100%) (Abb. 3c). Hierfür wurden ausschließlich die absolut identischen CNV-Loci betrachtet.

Darüber hinaus korrelierte die Tumormutationslast auf patientenindividueller Basis, die durch WES festgestellt wurde, sehr stark mit der durch zielgerichtete Sequenzierung bestimmten Tumormutationslast ($R=0,8262$, $p=0,0006$) (Abb. 3d).

Zur weiteren Validierung wurde die Nachweisrate des Epstein-Barr-Virus (EBV), das häufig mit HL assoziiert ist^{94,95}, zwischen beiden Ansätzen verglichen²⁰. Bei sechs der neun Validierungspatienten wurde EBV durch zielgerichtete Sequenzierung nachgewiesen. Von diesen sechs Patienten (67%) wurde EBV in vier Patienten auch durch WES bestimmt, während alle drei EBV-negativen Patienten auch in WES EBV-negativ waren (Abb. 3e).

Die hier vorliegende Datenverarbeitung und die grafische Darstellung erfolgten durch mich und Herrn Dr. Sven Borchmann. Die Abbildung 4e ist identisch mit der ergänzenden Figur 4A (Supplementary Figure 4A) des bei *Journal of Clinical Oncology* eingereichten und zur Publikation angenommenen Manuskripts.

4.4. Die genetische Landschaft des Hodgkin Lymphoms

Insgesamt wurden 26348 Mutationen festgestellt, mit einer medianen Anzahl von 103 Mutationen pro Patient (Spannweite: 24-1315) (Abb. 4a). Die exonischen kodierenden (n=9771) oder synonymen Mutationen (n=3535) machten den Großteil der Mutationen aus, wie es bei einem Ansatz mit gezielter Exom-Anreicherung zu erwarten war (Abb. 4b). Zusätzlich wurden 1045 UTR (untranslatierte Region) - und 174 Spleißmutationen sowie 11823 nicht-kodierende Mutationen festgestellt (Abb. 4). Die Medianzahl der exonischen kodierenden Mutationen und der synonymen Mutationen betrug jeweils pro Patient 33 (Spannweite: 1-333) bzw. 12 (Spannweite: 0-169), während pro Patient eine Mediananzahl von vier für UTR-Mutationen (Spannweite: 0-75), eins für Spleiß-Mutationen (Spannweite: 0-12) und 49 für nicht-kodierende Mutationen (Spannweite: 19-738) festgestellt wurde (Abb. 4c).

Die hier vorliegenden Daten sind Teil der ergänzenden Materialien zu dem Manuskript, das bei *Journal of Clinical Oncology* eingereicht und zur Publikation angenommen wurde, bei dem ich als Miterstautorin beteiligt bin. Die Datenverarbeitung und die untenstehende grafische Darstellung erfolgten durch Herrn Dr. Sven Borchmann und mich. Abbildungen 4b und 4c sind inhaltlich identisch mit den ergänzenden Figuren 1A und 1B (Supplementary Figure 1A und 1B) des Manuskripts.

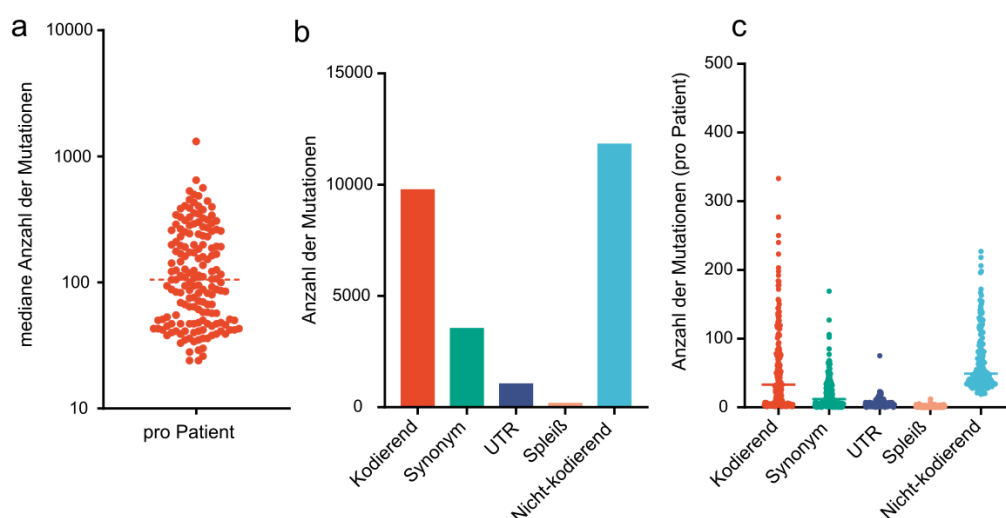


Abbildung 4: Anzahl der Mutationen der Kohorte und absolute Zahlen der definierten Genmutationen: (a) mediane Anzahl der Mutationen pro Patient; (b) Gesamtzahl der definierten Mutationen; (c) Anzahl der definierten Mutationen pro Patient

Die am häufigsten mutierten Gene ohne Filterung und unter Einbeziehung der nicht-kodierenden Mutationen waren APC (47%), MALRD1 (35%), BRCA1 (30%), METTL24 (24%), RNF114 (22%), TTN (21%), SMAD4 (21%), IGLL5 (19%), GNA13 (16%), SOCS1 (16%), STAT6 (16%) und TNFAIP3 (15%) (Abb. 5a). Es ist erwähnenswert, dass die Anzahl der Mutationen pro einzelne Patienten stark variierte (Abb. 4a). Über den gesamten einbezogenen Bereich hinweg zeigten die Patienten eine mediane Tumormutationslast von 2,62 Mutationen/Mb (Spannweite: 0,57-30,59), wenn alle Mutationen betrachtet wurden (Abb. 5b). Unter Anwendung der zusätzlichen funktionalen Filter, die intronische, intergenetische und synonyme Mutationen ausschlossen, blieb eine mediane funktionelle Tumormutationslast von 1,05 Mutationen/Mb (Spannweite 0,03-11,49) erhalten (Abb. 5c). Hiermit wurde die funktionelle Tumormutationslast als die Last der Mutationen festgelegt, die potenziell zu einer veränderten Proteinsynthese führen können.

Die hier vorliegenden Daten sind Teil der ergänzenden Materialien zu dem Manuskript, das bei **Journal of Clinical Oncology** eingereicht und zur Publikation angenommen wurde, bei dem ich als Miterstautorin beteiligt bin. Die Datenverarbeitung und die untenstehende grafische Darstellung erfolgten durch mich und Herrn Dr. Sven Borchmann. Die Abbildung 5b ist inhaltlich identisch mit der ergänzenden Figure 1C (Supplementary Figure 1C) des Manuskripts. In dieser Arbeit sind die Daten im Gegensatz zum Manuskript in einer logarithmischen Skalierung dargestellt.

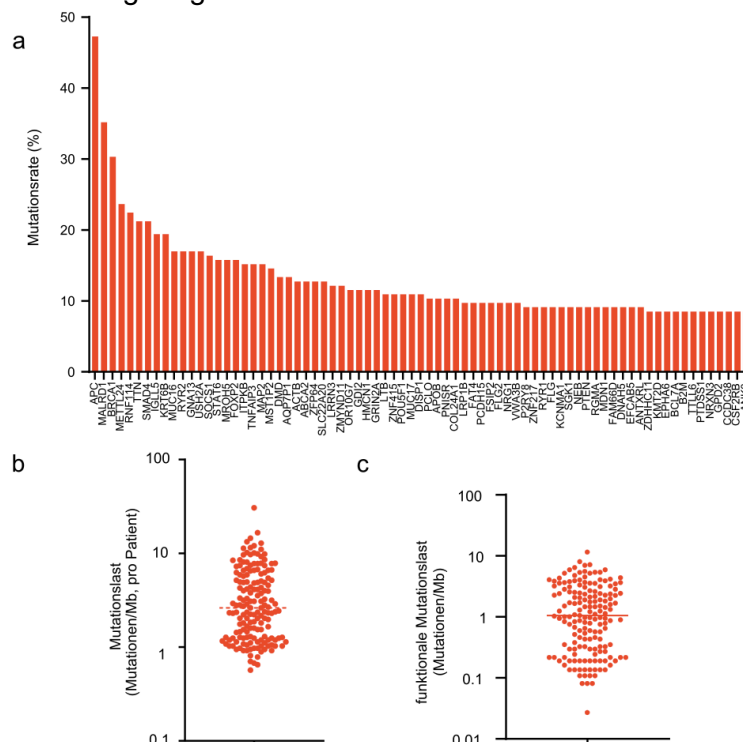


Abbildung 5: Die häufigsten mutierten Gene und Tumormutationslast der Gesamtkohorte: (a) Mutationsrate der häufigsten Mutationen in Prozent; (b) Mutationslast (Mutationen/Mb) pro Patient; (c) funktionale Mutationslast (Mutationen/Mb) pro Patient nach Ausschluss der intronischen, intergenetischen und synonymen Mutationen

Bei bereits charakteristischen und gut bekannten rekurrenten Mutationen des HL (z.B. B2M, CSF2RB, GNA13, SOCS1, STAT6, TNFAIP3) wurden in dieser Kohorte niedrigere Detektionsraten festgestellt als in ähnlichen vergleichbaren Studien mit zielgerichteten Sequenzierungsansätzen^{21,22}. Dies könnte auf eine reduzierte Sensitivität des Gesamtexomsequenzierungsansatzes zurückzuführen sein. Zur einfachen Abschätzung des ctDNA-Gehalts wurde das Ausmaß von CNV-Detektion als Richtfaktor verwendet. Nach der Filterung der Proben mit niedrigerer CNV-Detektion wurde eine Untergruppe von Patienten definiert, bei denen eine vollständige Identifizierung von Mutationen durch den WES-Ansatz sichergestellt werden konnte, ohne dass einige Mutationen aufgrund eines geringen ctDNA-Gehalts im Plasma übersehen wurden. Hierfür wurde ein CNV-Score erstellt, der es ermöglichte, Patienten in Gruppen abhängig von dem durchschnittlichen logarithmierten quadratischen Z-Score aller CNV in jeder Probe einzuteilen (Abb. 6a). Es wurde eine durchschnittliche Häufigkeit der oben genannten Onkogene oder Tumorsuppressorgene in anderen HL-Sequenzierungsstudien als Vergleich herangezogen und festgestellt, dass diese 19,7% betrug^{21,22}. Wenn man die hier dargestellte Kohorte im Gesamten betrachtete, betrug die Mutationshäufigkeit dieser Gene 14,9%. Wenn dennoch die Kohorte anhand des definierten CNV-Scores in Gruppen mit CNV-Score $< 0,15$ und $\geq 0,15$ aufgeteilt wurde, es zeigte sich eine Mutationshäufigkeit von 9,4% in der ersten Gruppe und die Häufigkeit von 17,2% in der zweiten Gruppe, die nicht signifikant von dem Vergleichsmaßstab abwich (Abb. 6b). Die zweite Gruppe beinhaltete 117 Patienten, welche 70,9% der Kohorte ausmachten. Daraus ließ sich folgern, dass der WES-Ansatz von ctDNA in über 70% der Fälle auf der gesamten Exom-Ebene genau genotypisieren kann.

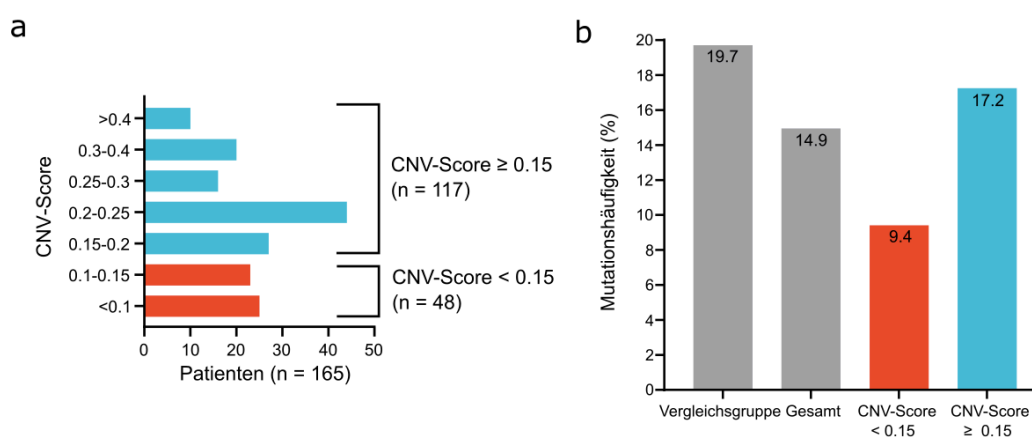


Abbildung 6: CNV-Score zum Vergleich der Mutationsrate der für HL charakteristischen Mutationen mit den vergleichbaren Studien: (a) CNV-Score basierend auf Ausmaß der CNV-Detektion; (b) Mutationshäufigkeit in der Vergleichsgruppe und in Subgruppen der Gesamtkohorte

Der hier dargestellte CNV-Score wurde durch Herrn Dr. Borchmann erstellt. Die grafische Darstellung und Applikation auf die Kohorte erfolgte durch mich.

4.4.1. Onkogene und Tumorsuppressorgene

Die Häufigkeit von Mutationen in einem Gen korreliert nicht zwangsläufig mit dem funktionellen Einfluss. Es wurden verschiedene statistische Methoden entwickelt, um die funktionelle Relevanz der häufigen Mutationen in spezifischen Genen zu entschlüsseln⁹⁶. Um wahrscheinliche Tumorsuppressorgene (TSG) oder Onkogene (OG) zu identifizieren, wurde die ratiometrische Methode (20/20-Regel, entwickelt von Bert Vogelstein) als Grundlage gewählt und diese leicht modifiziert (für Methoden siehe Abschnitt 3.10.)⁸⁶. Unter Verwendung dieses Ansatzes wurde die Kohorte auf potenzielle TSG und OG analysiert. Dabei wurden bestimmten Genen manuell ausgeschlossen, in denen die Mutationen aufgrund ihrer Lage in hochrepetitiven Regionen oft zu Sequenzierungs- und Alignmentfehler führen^{87,88} (für Methoden siehe Abschnitt 3.10.). Entsprechend umfasste die endgültige Analyse 25 TSG und 12 OG (Tab. 4, siehe Anhang). Die Anzahl der OG- und TSG-Mutationen war variabel mit einer Medianzahl von 11 Mutationen pro Patient (Spannweite: 7-31) (Abb. 8a).

Unter anderem wurden OG und TSG identifiziert, die an der Chromatinregulation (ARID1A, KMT2D), dem Interferon-Signalweg (PTPN1), der Antigenpräsentation (HLA-B) sowie der Zellzyklusregulation (BCL7A, XPO1) beteiligt sind^{21,22,97}. Mit diesem Ansatz konnten auch einige TSG und OG entdeckt werden, die bisher nicht in HL beschrieben wurden^{6,20-23}.

Unter den, nach dem besten Wissen, bisher nicht beschriebenen rekurrenten Mutationen in HL wurden die Mutationen im OR10G7 (Olfactory Receptor Family 10 Subfamily G Member 7) bei 11,5% der Patienten in der Kohorte identifiziert. APOB (Apolipoprotein B) und FLG2 (Filaggrin 2) waren jeweils bei 10,3% bzw. 9,7% der Patienten mutiert. Die Mutation von ZNF806 (Zinc Finger Protein 806) wurde bei 7,9% der Patienten festgestellt, während TYRO3 (Tyrosine protein kinase receptor), SEL1L3 (Sel-1 Suppressor of Lin-12-like 3) und PLXNC1 (Plexin C1) jeweils bei 7,3% der Patienten mutiert waren. RP1L1 (Retinitis pigmentosa 1 like 1), IGFN1 (Immunoglobulin like and Fibronectin Type III Domain Containing 1), NBPF10 (Neuroblastom Breakpoint Family Member 10), CISH (Cytokine inducible SH2 protein) und FREM2 (FRAS1 related extracellular Matrix 2) wurden bei jeweils 5,5% der Patienten entdeckt. Mutationen im KCNJ8 (Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 8), RFTN1 (Lipid-Raft-Linker 1) und im HLA-B (Human leukocyte antigen B) wurden bei 4,9%, 4,2% bzw. 3,6% der Patienten gefunden (Abb.7).

Die hier vorliegenden Daten sind Teil der ergänzenden Materialien zu dem bei *Journal of Clinical Oncology* eingereichten und zur Publikation angenommenen Manuskript, bei dem ich als Miterstautorin fungiere. Die Datenverarbeitung und die untenstehende grafische Darstellung erfolgten durch mich mit Hilfe von Herrn Dr. Sven Borchmann. Die Abbildung 7 ist inhaltlich identisch mit der ergänzenden Figure 3 (Supplementary Figure 3) des Manuskripts.

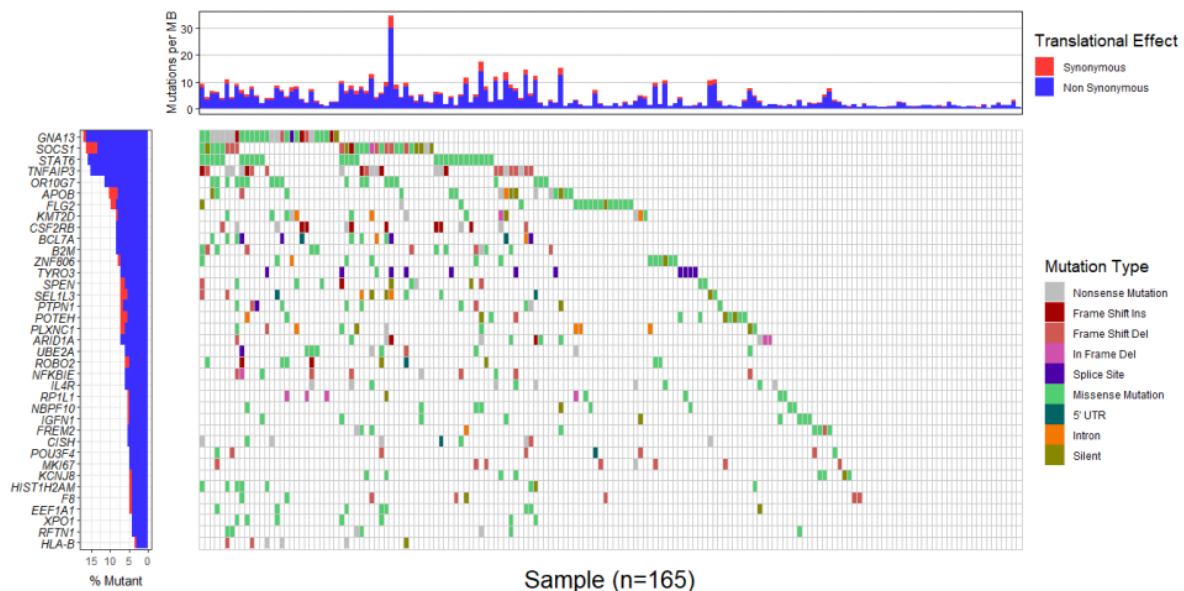


Abbildung 7: Die genetische Landschaft der HL-Patienten der Kohorte (OG und TSG) dargestellt in einem Wasserfalldiagramm: die X-Achse entspricht der einzelnen Patienten; die Y-Achse stellt die mit diesem Ansatz detektierten Onkogene und Tumorsuppressorgene dar; die Farben kodieren für verschiedene Mutationstypen. Oberhalb des Wasserfalldiagramms wird die Mutationslast jedes einzelnen Patienten dargestellt

Um funktionell verbundene Cluster von Mutationsorten in Genen zu identifizieren, wurde die räumliche Häufung von Aminosäure-Substitutionen, die durch Mutationen in dreidimensionalen Proteinmodellen verursacht wird, mithilfe von Mutation3D analysiert⁹⁰. Es wurden signifikante Cluster in den Genen STAT6 (Signal transducer and activator of transcription 6), XPO1 (Exportin 1), OR10G7, KCNJB8 und EEF1A1 (Elongation factor 1-alpha 1) identifiziert (Abb. 8b).

Mutationen in STAT6 traten im DNA-Bindungsbereich auf und betrafen die folgenden mutationalen Hotspots: N417Y/S, N421K/S und D419N/Y. Darüber hinaus wurden die bekannten Mutationscluster XPO1 E571K/A identifiziert⁹⁸. Es wurden auch Cluster-Mutationen in EEF1A1 D97N und D91N gefunden (Abb. 8b).

Die Datenverarbeitung und die Generierung dieser Modelle erfolgte durch Herrn Dr. Sven Borchmann.

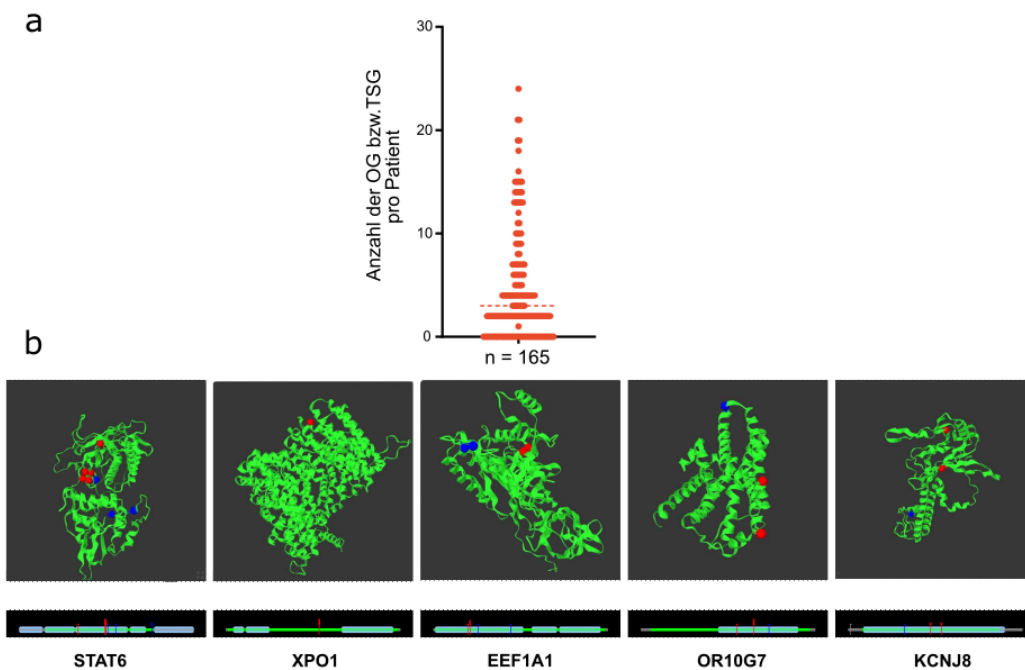


Abbildung 8: Die Medianzahl der Onkogene und Tumorsuppressorgene und funktionell verbundene Cluster von Mutationsorten dieser Gene: (a) Anzahl der Mutationen (OG und TSG) pro Patient in absoluten Zahlen; (b) 3D-Proteinmodelle mit mutationalen Hotspots

4.4.2. Mutationssignaturen

Mutationen treten nicht zufällig auf, sondern weisen spezifische Muster auf, die als mutationale Signaturen oder Mutationssignaturen bezeichnet werden. Diese liefern uns die Einblicke in die zugrunde liegenden mutationalen Prozesse⁹⁹. In dieser Analyse wurden sieben verschiedene mutationale Signaturen basierend auf einzelnen Basensubstitutionen (SBS) aus der COSMIC-Datenbank identifiziert: SBS1 (C>T-Transition, spontane Desaminierung von 5-Methylcytosin, auch bekannt als Alterungssignatur) bei 92% der Patienten, SBS3 (das Fehlen der Doppelstrangreparatur) bei 15% der Patienten, SBS6 (C>T-Transition, defektes DNA-Mismatch-Repair, Mikrosatelliteninstabilität, MSI) bei 10% der Patienten, SBS7 (UV-Lichtexposition) bei 9% der Patienten, SBS9 (AID-verursachte Mutationen) bei 15% der Patienten, SBS15 (defektes DNA-Mismatch-Repair (MSI)) bei 13% der Patienten und SBS25 (bisher nur in HL-Zelllinien identifiziert) bei 9% der Patienten in der Kohorte (Abb. 9a). Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit der früheren Analyse der AG Borchmann auf Basis der zielgerichteten Sequenzierung von ctDNA überein (Sobesky et al.)²⁰.

Die Korrelation zwischen der Detektion von SBS1 und dem Alter bei Diagnosestellung wurde untersucht. Es konnten keine Altersunterschiede ($p=0,3521$) zwischen Patienten mit und ohne Nachweis von SBS1 festgestellt werden. Die Altersmediane betragen jeweils 32 (Spannweite: 18-61) bzw. 34 (Spannweite: 23-60) in beiden Gruppen (Abb. 9b). Dies ist wahrscheinlich auf

die hohe Nachweisrate der SBS1-Signatur in der hier dargestellten Kohorte zurückzuführen, was angesichts des jungen Alters der Patienten in dieser Kohorte bemerkenswert ist und mit dem jungen Durchschnittsalter der HL-Population im Allgemeinen übereinstimmt.

Darüber hinaus wurde der Beitrag von mutationalen Prozessen zu den in dieser Arbeit neu entdeckten häufig mutierten OG und TSG untersucht. Es konnte ein bedeutender Beitrag von SBS1 zu KCNJ8 und FREM2 gesehen werden; SBS3 trug zu Genen wie SEL1L3, FLG2, IGFN1, HLA-B, NBPF10, RFTN1 und POTEH bei; SBS6 trug zu 100% zu CISH bei; SBS7 zeigte einen Beitrag zu F8 und APOB; SBS9 zu ZNF806 und F8; SBS15 zu RP1L1 und APOB; und SBS25 trug hauptsächlich zu TYRO3 und PLXNC1 bei (Abb. 9c).

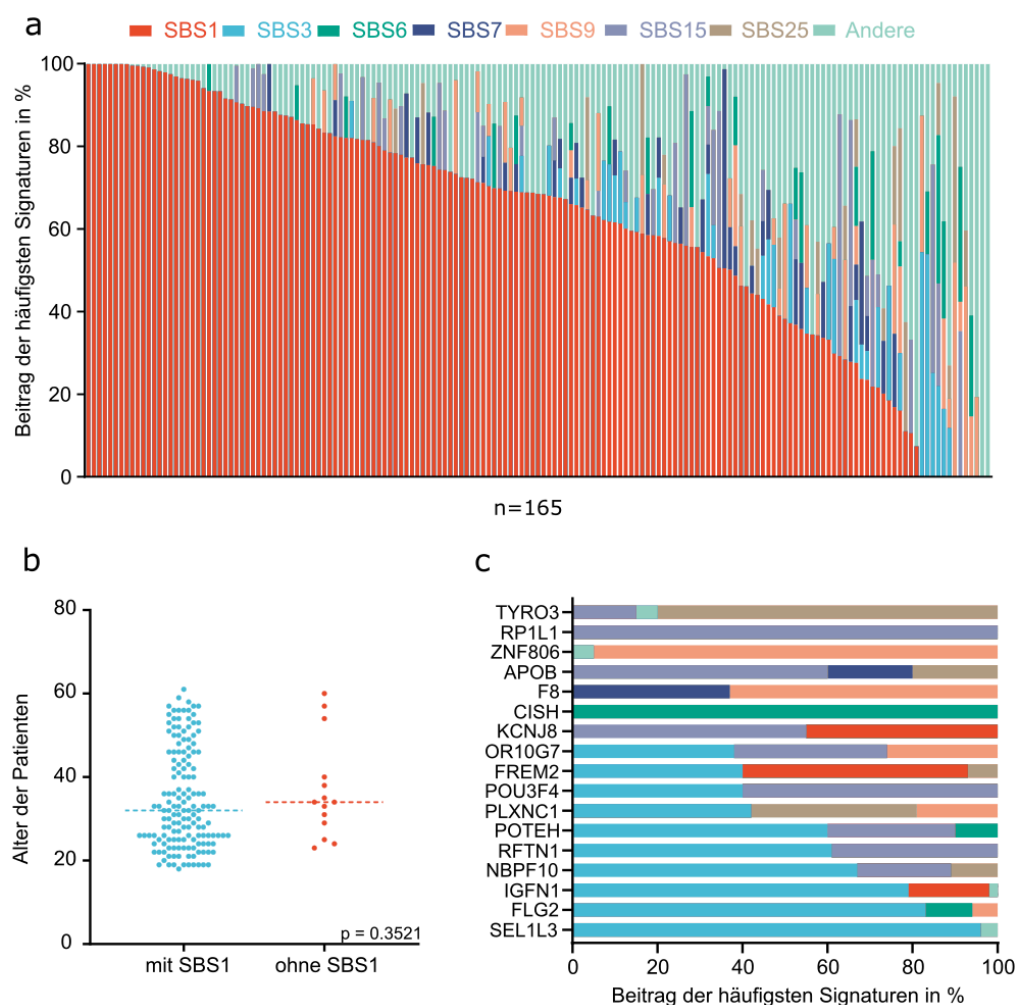


Abbildung 9: Die häufigsten Mutationssignaturen und deren Eigenschaften und die Verteilung in der Gesamtkohorte: (a) Beitrag der häufigsten Signaturen in der gesamten Kohorte in Prozent, wobei die X-Achse die einzelnen Patienten darstellt; (b) Korrelation der häufigsten Signatur (SBS1, Alterssignatur) mit dem Alter der Patienten (c) Beitrag von mutationalen Prozessen zu den neu diagnostizierten Onkogenen und Tumorsuppressorgen

Die Bearbeitung der Rohdaten erfolgte durch Herrn Dr. Sven Borchmann. Die grafische Darstellung und die weitere Analyse der Daten erfolgten durch mich mit Hilfe von Dr. Sven Borchmann.

4.4.3. Somatische Kopienzahlvariationen

Um rekurrente somatische Kopienzahlveränderungen (CNVs) zu identifizieren, wurde cnvkit und Gistic 2.0 unter Berücksichtigung sowohl der On-Target- als auch der Off-Target-Reads verwendet^{79,81}. Es wurden 30 signifikante Genamplifikationen und 44 Gendeletionen identifiziert ($q < 0.05$) (Abb. 10, Tab. 5, siehe Anhang).

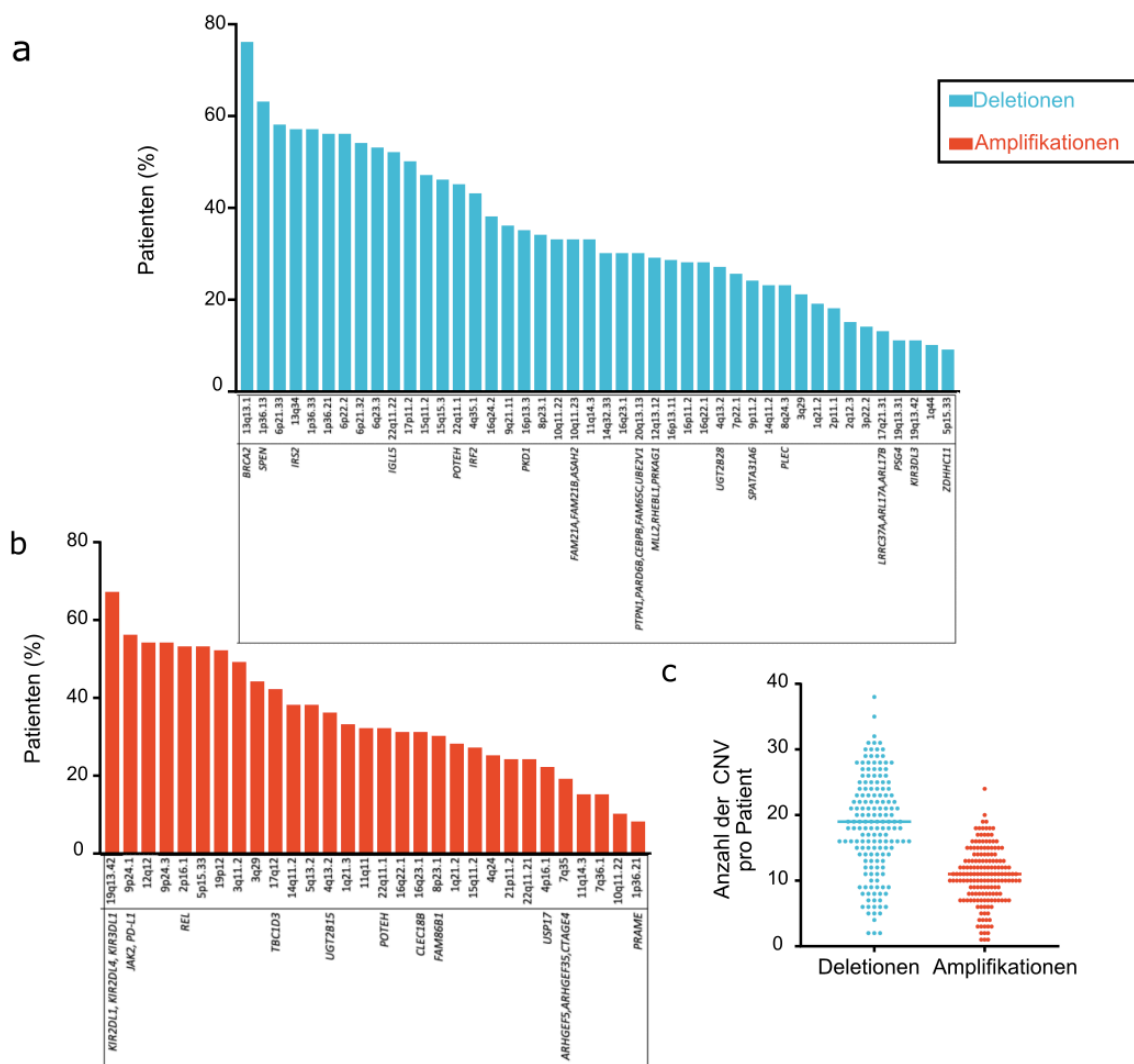


Abbildung 10: Kopienzahlvariationen (CNV) in Prozent mit entsprechenden Gen-Loci und Anzahl der CNV pro Patient: (a) Verteilung der häufigsten Kopienzahldeletionen in der Gesamtkohorte in Prozent; (b) Verteilung der Kopienzahlamplifikationen in der Gesamtkohorte in Prozent; (c) Anzahl der Deletionen und Amplifikationen pro Patient

Die häufigsten Gipfel der Gendeletionen wurden in folgenden Loci detektiert: 13q13.1 (76%), 1p36.13a (SPEN) (68%), 6p21.33 (58%), 1p36.33 (57%), 13q34 (57%), 1p36.21 (56%), 6p22.2 (56%) und 6q23 (TNFAIP3) (53%) (Abb. 10a).

Die häufigsten Gipfel der Genamplifikationen wurden in folgenden Loci gesehen: 19q13.42 (67%), 9p24 (JAK2, PD-L1) (56%), 12q12 (54%), 2p16 (REL) (53%), 5p15.33 (53%) und 19p12 (52%) (Abb. 10b).

Die detektierten CNVs zeigten eine hohe Übereinstimmung mit vorherigen Analysen unter Verwendung anderer Ansätze, insbesondere hinsichtlich häufig auftretender Genamplifikationen in 2p15-16, 9p24 und 5q sowie Gendeletionen in 13q, 6p21.32-33 und 6q23^{20,23,100}. Die Anzahl der Genamplifikationen und -Deletionen variierte stark bei den Patienten mit einem Median von 11 (Spannweite: 1-24) bzw. 19 (Spannweite: 2-38) (Abb. 10c).

Darüber hinaus konnten einige zuvor nicht beschriebene fokale Genamplifikationen und -Deletionen nachgewiesen werden. Zum Beispiel war die häufigste fokale Amplifikation in der Kohorte im Locus 19q13.42 (67%), der das KIR2DL1, KIR2DL4 und KIR3DL1 (Killer cell immunoglobulin like receptors) umfasste. Eine weitere fokale Amplifikation wurde im q12-Bereich des Chromosoms 17 (42%) beobachtet, der das Gen TBC1D3 (TBC1 Domain Family Member-3) umfasste. Eine Amplifikation im Locus 4q13.2 (36%) beherbergte das UGT2B15 (UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member-B15). 30% der Kohorte zeigten eine Amplifikation in 8p23.1, die das FAM86B1 (Family with Sequence Similarity 86 Member-B1) beherbergte. Eine Genamplifikation in 22q11.1 (32%) enthielt das Gen POTEH (POTE Ankyrin Domain Family Member-H). Eine weitere Genamplifikation wurde im Bereich 23.1 des Chromosoms 16 festgestellt, der das CLEC18B (C-Type Lectin Domain Family 18 Member-B) einschloss. Eine Amplifikation in 4p16.1 (22%) umfasste das Gen USP17 (Ubiquitin specific peptidase 17). In 18% der Kohorte konnte eine Genamplifikation in 7q35 festgestellt werden, die das ARHGEF5 (Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor-5) und sein paraloges Gen ARHGEF35 enthielt. In diesem Bereich befand sich auch das Gen CTAGE4 (Cutaneous T-Cell-Lymphoma associated Antigen-1). 8% der Kohorte wiesen eine Amplifikation im Bereich 36.21 des Chromosoms 1 auf, die Mitglieder der PRAME-Familie (Preferentially Expressed Antigen of Melanoma) umfasste.

Die rekurrente Deletion (57%) im q34-Bereich des Chromosoms 13 umfasste das Gen IRS2 (Insulin Receptor Substrate-2). Eine weitere rekurrente Deletion in 22q11.22 (52%) umfasste den Locus des ICLL5 (Immunoglobulin Lambda Like Polypeptide-5). Ein rekurrenter Copy Loss in 16p13.3 (35%) beinhaltete das PKD1 (transient receptor potential channel interacting Polycystin 1). 33% der Patienten in der Kohorte zeigten Deletion im Bereich 10q11.23, die das

FAM21A und FAM21B (Family With Sequence Similarity 21 Member A and Member B) umfasste. Derselbe Bereich beinhaltete auch den Locus mit ASAH2 (N-Acylsphingosin Amidohydrolase 2). Eine fokale Deletion in 4q13.2 (27%) umfasste das UGT2B28 (UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Mitglied-B28). Die rekurrente Deletion im Bereich q13.13 (30%) des Chromosoms 20 umfasste die Loci der CEBPB (CCAAT Enhancer Binding Protein Beta), PTPN1 (Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1), UBE2V1 (Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 V1), PARD6B (Par-6 Family Cell Polarity Regulator Beta) und FAM65C (Family With Sequence Similarity 65 Member C). 29% der Patienten zeigten Deletion im Bereich 12q13.12. Dieser Bereich beinhaltete Genloci für das PRKAG1 (Protein Kinase AMP Activated Non-Catalytic Subunit Gamma 1), KMTD2D (MLL2, Histone Lysine N-Methyltransferase 2D) und das RHEBL1 (Rheb like 1 protein). Eine Gendeletion im Bereich 9p11.2 (24%) umfasste das SPATA31A6 (spermatogenesis associated protein 31A6), auch bekannt als FAM75A6. 23% der Patienten in der Kohorte hatten rekurrente Deletionen in 8q24.3, einschließlich des PLEC-Locus (Plectin Protein). Der Bereich 17q21.31, der die Gene LRRC37A (Leucin rich Repeat containing 37A) und ARL17A, ARL17B (ADP Ribosylation Factor like -17A und -17B) beinhaltete, zeigte eine rekurrente Deletion bei 12% der Patienten. 11% der Patienten hatten eine Deletion im Bereich 19q13. Der betroffene Bereich 19q13.31 beinhaltete das PSG4 (Pregnancy specific Glycoprotein 4) und der Bereich 19q13.42 - KIR3DL3 (Killer Cell Immunoglobulin Like Receptor). Schließlich wurde bei 9% der Kohorte eine Deletion im Bereich 5p15.33 festgestellt, die das ZDHHC11 (Zinkfinger DHHC Type-11) umfasste.

Die Bearbeitung der Rohdaten erfolgte durch Herrn Dr. Sven Borchmann. Die grafische Darstellung und die weitere Analyse der Daten erfolgten durch mich mit Hilfe von Herrn Dr. Borchmann. Die Abbildung 10a und 10b ist identisch mit den ergänzenden Figuren 3C und 3D (Supplementary Figure 3C and 3D) des bei **Journal of Clinical Oncology** eingereichten und zur Publikation angenommenen Manuskripts.

5. Diskussion

Die molekulare und genomische Analyse des Hodgkin Lymphoms war bis vor kurzem äußerst herausfordernd, da die pathognomonischen Zellen in herkömmlichen Tumorbiopsien nur in geringem Maße vertreten sind⁷⁰. Um diese Herausforderung zu überwinden und die genomische Landschaft des Hodgkin Lymphoms mit minimaler Invasivität umfassend zu verstehen, wurde in dieser Arbeit eine Gesamtexomsequenzierung (WES) der zirkulierenden-Tumor-DNA (ctDNA) in einer großen Kohorte der Studienpatienten mit neu diagnostiziertem HL im fortgeschrittenen Stadium durchgeführt. Aktuelle Studien haben zielgerichtete Sequenzierungsansätze verwendet, um Mutationen in der ctDNA von HL-Patienten zu erkennen. Obwohl diese Studien die Analyse von ctDNA bei HL vorangebracht haben, haben sie nur einen Bruchteil des kodierenden Genoms betrachtet^{20,21,75}. Mit dieser Arbeit wurde unter Berücksichtigung der Limitationen des WES-Ansatzes wie die Schwierigkeiten der klinischen Interpretation der großen Anzahl der identifizierten Varianten, die Generierung der Varianten von unklarer Bedeutung oder Zufallsbefunden, die begrenzte Zielerfassung und Vernachlässigung einiger klinisch relevanter Varianten sowie Kostenintensivität versucht, eine breite Palette von Genen zu generieren, die potenziell in der Onkogenese der HL eine Rolle spielen und ebenfalls mit dem fortgeschrittenen Stadium der Patienten assoziiert werden könnten¹⁰¹.

Die drei wichtigsten Erkenntnisse dieser Dissertation sollten an dieser Stelle hervorgehoben werden.

Zum einen konnte eine starke Korrelation zwischen der zuvor veröffentlichten zielgerichteten Sequenzierungsplattform und dem WES-Ansatz hinsichtlich der Allelhäufigkeiten, der Tumormutationslast, der EBV-Nachweisrate und der Detektion der Kopienzahlvariationen in einer Gruppe von repräsentativen Patienten festgestellt werden²⁰.

Es wurden mehrere Gene identifiziert, die zuvor in zielgerichteten Sequenzierungsansätzen als rekurrente Mutationen beim HL beschrieben wurden^{20,21}. Allerdings waren die Häufigkeiten der für HL charakteristischen Mutationen mit dem WES-Ansatz im Allgemeinen geringer. Eine mögliche Erklärung dafür könnte ein geringerer Gehalt an ctDNA im Plasma bei mehreren Patienten sein. Um diese Annahmen bestätigen zu können, wurde anschließend ein CNV-Score entwickelt. Dieser Score, abgeleitet von der Größenordnung der Kopienzahlveränderungen, sollte diejenigen Patienten identifizieren, bei denen wahrscheinlich aufgrund des geringeren Gehalts an ctDNA nicht alle genetischen Veränderungen erfasst werden konnten. Nach dem Ausschluss dieser Patienten ergab sich eine vergleichbare Mutationsrate für die charakteristischen HL-Mutationen in ähnlichen Studien^{21,22}. Im Rahmen

dieser Arbeit wurden trotzdem die Daten von allen Patienten angewendet, um zuvor nicht beschriebene genetische Veränderungen in HL mit hoher Sensitivität darstellen zu können.

All dies lässt den Schluss zu, dass die Anwendung von WES auf ctDNA in HL-Patienten sowohl möglich als auch nicht unterlegen ist, um die genomische Landschaft des HL zu erforschen.

Die zweite wichtige Erkenntnis betraf die Identifizierung der potenziellen Onkogene (OG) und Tumorsuppressorgene (TSG) mit dem breit angelegten Ansatz. Durch die weitere Analyse der häufigen Mutationen, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden, wurden räumliche Häufungen der Aminosäure-Substitutionen, die wahrscheinlich eine funktionelle Relevanz in HL haben, identifiziert.

Einige Onkogene und Tumorsuppressorgene, die mit diesem Ansatz gefunden wurden, wurden vorher bereits beschrieben und sind charakteristische Mitglieder der zentralen onkogenen Signalwege des HL wie JAK-STAT-Signalweg (STAT6, SOCS1, CSF2RB), NF-kappa B-Signalweg (NFKBIE, TNFAIP3) oder MHC-Klasse-I vermittelte Antigenpräsentation (B2M, HLA-B)^{10,22,23}. Eine unzureichende oder reduzierte Präsentation von Antigenen der MHC-Klasse-I wurde mit einem komplizierten Krankheitsverlauf bei HL in Verbindung gebracht¹⁰². Darüber hinaus zeigten ARID1A, BCL7A, GNA13, IL4R, HIST1H2AM, KMT2D, MKI67, UBE2A, ROBO2 und XPO1 häufige Mutationen in HL, genauso wie im Rahmen des zielgerichteten Sequenzierungsansatzes der AG Borchmann identifiziert (Sobesky et al.)²⁰.

Zusätzlich konnten mehrere rekurrente potenzielle Onkogene und Tumorsuppressorgene identifiziert werden, die zuvor nicht in HL beschrieben wurden. EEF1A1, FLG2, IGFN1, KCNJ8, NBP10, OR10G7, POTEH, RP1L1 und ZNF806 wurden als potenzielle Onkogene identifiziert, während APOB, CISH, F8, FREM2, PLXNC1, POU3F4, RFTN1, SEL1L3, SPEN und TYRO3 als potenzielle Tumorsuppressorgene identifiziert wurden. Einige dieser Gene wurden jedoch bereits in anderen Krebserkrankungen mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht.

Obwohl die exakte Funktion von Apolipoproteinen (z. B. APOB) in der Tumorentstehung noch nicht vollständig geklärt ist, haben einige Studien bei HCC-Patienten einen Zusammenhang zwischen niedriger APOB-Aktivität und Hochregulierung von Onkogenen und metastatischen Regulatoren wie HGF, MTIF, ERBB2, FOXM1 und CD44 sowie der Hemmung von Tumorsuppressoren wie TP53 und PTEN gezeigt¹⁰³. Darüber hinaus gibt es Überlegungen,

Apolipoproteine als potenzielle Biomarker für die Krebsdiagnose und -prognose zu untersuchen und ihre Verwendung in der zielgerichteten Krebstherapie weiter zu erforschen¹⁰⁴.

KCNJ8 ist an der Aktivierung von Kaliumkanälen beteiligt. Insgesamt wurde eine funktionelle Dysregulation von K⁺-Kanälen mit Aggressivität der verschiedenen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht^{105,106}. Da die Kohorte in dieser Arbeit hauptsächlich aus Patienten mit fortgeschrittenem HL besteht, könnte die KCNJ8-Mutation den aggressiven Krankheitsverlauf erklären. Dies müsste jedoch im Vergleich mit der Häufigkeit der KCNJ8-Mutationen in einer Kohorte mit frühem Stadium der Erkrankung nachgewiesen werden.

CISH kodiert für ein Protein aus der Cytokine Induced STAT-Inhibitor (CIS)-Familie und ist ein von acht Mitgliedern der Familie der Suppressoren des Zytokinsignals und ein wichtiger negativer Regulator der Signalgebung und Funktion von T-Zellen und NK-Zellen^{107,108}. Einige Studien legen nahe, dass die Deletion von CISH die antitumorale Immunität erhöht und in in vivo Modellen zu einer deutlichen Steigerung der Fähigkeit der CD8 T-Lymphozyten sowie der NK-Zellen und zur Tumorregression führt¹⁰⁹.

RFTN1 kodiert für Lipid Raft Linker 1, ein Protein, das eine entscheidende Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung von Lipid-Rafts spielt und auch an der Vermittlung der B-Zell-Antigen-Rezeptor vermittelten (BCR) Signalgebung beteiligt ist¹¹⁰. Die verschiedenen Mechanismen der BCR-Aktivierung in verschiedenen B-Zell-Malignitäten belegen die proto-onkogene Natur dieses Signalwegs, der die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung von B-Zellen reguliert¹¹¹. In einer Studie mit Patienten, die an Magenkarzinom leiden, bewirkte die Reduzierung von RFTN1 die Hemmung des AKT-Signalwegs, die Hemmung der Zellproliferation und die Aktivierung des p38-Signalwegs, womit RFTN1 hier eine onkogene Funktion zeigte¹¹⁰. In dieser Arbeit wurde RFTN1 im Gegenteil als ein Tumorsuppressorgen definiert.

TYRO3 ist ein Mitglied des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs^{112,113}. Eine Hochregulation von TYRO3 beeinflusst das Überleben und das Ansprechen gegenüber der Chemotherapie bei kolorektalen Karzinomen¹¹⁴. Darüber hinaus wurde TYRO3 in einer kleinen Untergruppe von B-Zell-Non-Hodgkin Lymphomen (B-NHL) mit dem Zellüberleben in Verbindung gebracht¹¹⁵. In dieser Analyse wurde TYRO3 als Tumorsuppressorgen bewertet.

Für einige der identifizierten potenziellen Onkogene und Tumorsuppressorgene konnte bisher keine Verbindung zu Krebsarten nachgewiesen werden. Dies betrifft F8, FREM2, PLXNC1, POU3F4, SEL1L3, SPEN, FLG2, IGFN1, NBPF10, OR10G7, RP1L1 und ZNF806.

Dementsprechend könnten diese Mutationen entweder mit HL in Verbindung stehen oder zufällig entdeckt worden sein. Weitere Erforschung wird erforderlich sein, um potenzielle Verbindungen zur Tumorentstehung in HL zu etablieren oder auszuschließen.

Die Erkennung der räumlichen Cluster von Aminosäure-Substitutionen nach der 3D-Modellierung der Proteine, die durch hier definierten Onkogene (OG) kodiert werden, erhöht erheblich die Evidenz dafür, dass diese Gene tatsächlich eine funktionale Rolle in der Entwicklung des HL spielen. Mutationen im Transkriptionsfaktor STAT6 bildeten Cluster in der DNA-Bindungsdomäne von STAT6 einbeziehend N417Y/S, N421K/S, D419N/Y, die zuvor als Mutationshotspots beschrieben wurden^{20,22,23}. Tiacci et al. haben die Vermutung geäußert, dass die Häufung von Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne ein potenzieller Mechanismus sein könnte, durch den HRS-Zellen einen Überlebensvorteil erlangen könnten. Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen und Erforschung, um bestätigt zu werden²². Es wurde auch der zuvor beschriebener Mutationshotspot E571K/A in XPO1 identifiziert²². Es konnte bereits gezeigt werden, dass XPO1 eine Rolle in der Entwicklung von HL und anderen B-Zell-Lymphomen wie CLL spielt^{20,98,116}. Mutationen in diesem Hotspot wurden auch als Biomarker für minimale Restkrankheit unter Verwendung eines digitalen Tropfen-PCR-Assays verwendet⁹⁸. Als nächstes wurden räumliche Cluster D97N und D91N in EEF1A1 identifiziert, einem wichtigen Regulator des Zellzyklus, der Zellproliferation, der zellulären Apoptose, der Hitzeschockantwort, der Modulation des Zytoskeletts und der RNA-Virusreplikation¹¹⁷⁻¹²¹. EEF1A1 beteiligt sich an der Tumorprogression und Metastasierung in verschiedenen Krebsarten wie hepatozelluläres Karzinom, Prostatakarzinom sowie in hämatopoetischen humanen Krebszelllinien. Es wurde bereits gezeigt, dass die Hochregulation von EEF1A1 hauptsächlich mit der Zellproliferation von Krebszellen assoziiert ist¹²²⁻¹²⁵.

Die letzten wichtigen Erkenntnisse dieser Arbeit waren die Beschreibung der Mutationssignaturen in der gesamten Kohorte und die Identifizierung der zuvor nicht beschriebenen Kopienzahlvariationen in HL.

Es wurden sieben rekurrente mutationale Signaturen identifiziert (SBS1, SBS3, SBS6, SBS7, SBS9, SBS15 und SBS25). Mit Ausnahme von SBS7 ähnelten diese Ergebnisse den mutationalen Signaturen, die durch den zielgerichteten ctDNA-Sequenzierungsansatz erkannt wurden (Sobesky et al.)²⁰. SBS7 wird hauptsächlich in Hautkrebsarten gefunden und ist mit durch UV-Licht verursachten DNA-Schäden assoziiert⁹³. Die Signaturen für Mikrosatelliteninstabilität (MSI), SBS6 und SBS15, treten häufig zusammen auf und deuten auf eine fehlerhafte DNA-Mismatch-Reparatur hin^{93,126,127}. Die Alterssignatur SBS1, die durch einen endogenen mutationalen Prozess initiiert wird und durch spontane Desaminierung von

5-Methylcytosin verursacht wird, wurde in dieser Patientenkohorte am häufigsten erkannt. MSI- und Alterssignaturen wurden zuvor sowohl von Wienand et al. als auch von Sobesky et al. bei HL-Patienten beschrieben^{20,23}. Angesichts der Tatsache, dass HL hauptsächlich junge Patienten betrifft, ist die Entdeckung einer Alterssignatur etwas überraschend. Die Ätiologie von SBS25 ist bislang unklar, allerdings wurde diese in einigen Proben von Hodgkin-Zelllinien gefunden, die von den Patienten stammten, die sich einer Chemotherapie unterzogen hatten. Daher wurde die Vermutung geäußert, dass die Signatur 25 möglicherweise mit der Chemotherapie in Zusammenhang stehen könnte^{127,128}. Diese Signatur wurde sowohl von Sobesky et al. mit der zielgerichteten Sequenzierung als auch hier mit dem WES-Ansatz nachgewiesen²⁰. Es ist wichtig zu betonen, dass die Kohorte in dieser Arbeit vorher nicht behandelte HL-Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium einschloss.

Zusätzlich zur mutationalen Landschaft konnten mehrere Kopienzahlveränderungen identifiziert werden, die zuvor nicht in HL beschrieben wurden. Die betroffenen Gene könnten somit auch eine Rolle in der Tumorentstehung von HL spielen.

Zu den Kopienzahlamplifikationen, die hier detektiert wurden, gehörten 19q13.42, 17q12, 4q13.2, 8p23.1, 22q11.1, 16q23.1, 4p16.1 und 7q35.

Die fokale Amplifikation von 19q13.42 umfasste KIR2DL1, KIR2DL4, KIR3DL1, die Killerzell Immunoglobulin ähnliche Rezeptoren (KIR) sind und eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von humanen Leukozytenantigenen (HLA) der Klasse I auf den Zielzellen spielen¹²⁹. KIR sind stark polymorph und können menschliche natürliche Killerzellen (NK-Zellen) in aktivierender und inhibierender Weise beeinflussen¹²⁹. KIR2DL1 und KIR3DL1 gelten als inhibierende und KIR2DL4 als aktivierende Rezeptoren¹³⁰. Durch Interaktionen mit MHC-Klasse-I-Molekülen verhindern die inhibitorischen KIR, dass NK-Zellen gesunde Zellen eliminieren, sodass nach einer Herunterregulierung von MHC-Klasse I die NK-Zellen über das "fehlende Selbst" -Modell aktiviert werden können¹³⁰. Die Verwendung von NK-Zellen in der Immuntherapie von menschlichen Krebserkrankungen ist eine sehr wichtige therapeutische Strategie. Die vorgeschlagenen Möglichkeiten, die NK-Zell-Toleranz zu überwinden, sind entweder die Verwendung von Agonisten aktivierender Rezeptoren oder die Blockierung inhibierender Rezeptoren¹³¹.

Die fokale Amplifikation auf 17q12 enthielt TBC1D3, das die intrinsische GTPase-Aktivität von RAB5A stimuliert, einem wesentlichen Akteur im Transport der Endosomen¹³². Die onkogenen Eigenschaften von TBC1D3 wurden zuvor sowohl in vitro als auch in Mausmodellen nachgewiesen¹³². Obwohl der genaue onkogene Mechanismus von TBC1D3 noch nicht

vollständig verstanden ist, zeigt sich eine Amplifikation des TBC1D3-Locus (Chromosom 17q12) in 15% der primären Prostatatumoren¹³². Dies war in 42% dieser Kohorte der Fall, weshalb eine weitere Erforschung der onkogenen Funktion von TBC1D3 in HL sinnvoll erscheint.

UGT2B15 (4q13.2) ist ein wichtiges Glucuronidierungsenzym beim Menschen und zeigt eine onkogene Funktion in Magen- und Brustkrebs durch die Regulierung von Transkriptionsfaktoren ER- α und Foxa-1^{133,134}. Eine Überexpression von UGT2B15 wurde mit Brust- und Magenkrebs in Verbindung gebracht und mit einer schlechten Gesamtüberlebensrate verknüpft^{133,134}. Es ist notwendig, weitere Forschungen durchzuführen, um den möglichen Zusammenhang zwischen der Amplifikation an diesem Genort bei beinahe einem Drittel der hier dargestellten Kohorte und einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium zu untersuchen.

Locus 22q11.1 trug das Gen POTEH, auch ANKRD26-like family member 3 genannt, der zur POTE-Familie gehört. Mitglieder dieser Familie werden sowohl in normalen Prostata-, Hoden- und Eierstockgeweben als auch in verschiedenen Krebsarten wie Gliom, Prostata- oder Brustkrebs exprimiert¹³⁵. Es konnte ein starker Zusammenhang zwischen der Hochregulierung des Ankrd26 und ungünstigem Krankheitsverlauf bei Krebspatienten gezeigt werden¹³⁵. Der Mechanismus der Hochregulierung ist jedoch unklar¹³⁵.

CLEC18 oder C-Typ-Lectin 18 (16q23.1) gehört zur CLEC-Familie und bindet an Glykolipide. Eine Überexpression dieses Gens wurde als potenziell verantwortlich für abnorme Glykosylierung, einschließlich eines erhöhten Niveaus von O-Glykanen, Glykoproteinen und Glykolipiden beschrieben und scheint eng mit der Tumorentwicklung und -transformation in Verbindung zu stehen¹³⁶.

USP17 im Chromosombereich 4p16.1 ist ein Deubiquitinierungsenzym, das in zahlreichen Krebserkrankungen wie Lungen-, Brust-, Prostata-, Eierstock- und Magen-Darm-Krebs herunterreguliert oder überexprimiert ist¹³⁷. USP17 beeinflusst die Signalübertragung über den Ras-Signalweg, indem es die intrazelluläre Lokalisierung von Ras und anderen kleinen GTPasen reguliert¹³⁷. Diese GTPasen sind entscheidende Regulatoren von Zellproliferation und -migration¹³⁸. Bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) wurde festgestellt, dass USP17-Positivität signifikant mit einer Verringerung des rezidivfreien Überlebens korreliert. Dies deutet darauf hin, dass USP17 als potenzieller Biomarker für metastasierenden Lungenkrebs in Betracht gezogen werden könnte¹³⁸. Diese Entdeckung ist auch im Kontext von HL von Interesse, da sie hier zum ersten Mal beschrieben wurde und

weitere Erforschungen zur Rolle von USP17 in der Tumorentwicklung von HL erforderlich erscheinen.

Die Kopienzahndeletionen umfassten 13q34, 22q11.22, 16p13.3, 10q11.23, 4q13.2, 20q13.13, 12q13.12, 9p11.2 und 5p15.33.

IGLL5 im Chromosombereich 22q11.22 ist ein Immunoglobulin ähnliches Polypeptid 5 und wurde als prognostisch bedeutsam bei verschiedenen Krankheiten wie multiples Myelom und Glioblastom beschrieben¹³⁹. Darüber hinaus mutiert IGLL5 häufig bei chronischer lymphatischer Leukämie, aggressiven Lymphomen und multiplen Myelom¹⁴⁰⁻¹⁴². Obwohl fokale Deletionen von Regionen, die das IGLL5 umfassen, auch in anderen B-Zell-Malignitäten vorkommen, einschließlich der akuten lymphoblastischen Leukämie bei Kindern und CLL, ist ihre Pathogenität unklar¹⁴³. Da sich das IGLL5 im Locus der Immunglobulin- λ -Leichtkette (IGL) befindet, postulierten Mraz et al., dass solche Deletionen wahrscheinlich lediglich die Folge von IGL-Umstrukturierungen sind¹⁴⁴.

10q11.23 beinhaltet FAM21 und ASAH2. FAM21 ist eine wichtige Komponente des WASH-Komplexes. Zudem wurde auch eine Verbindung zu Komponenten des NF- κ B-Signalwegs in Bauchspeicheldrüsenkrebszellen beschrieben¹⁴⁵. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass der Mangel an FAM21 die Tumorzellen im Pankreas empfindlicher für Gemcitabin und 5-Fluorouracil macht¹⁴⁵. ASAH2 kodiert für eine der fünf verschiedenen Ceramidasen, der sogenannten neutralen Ceramidasen. Ceramidasen spielen eine entscheidende Rolle in der Zellsignalgebung und bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-apoptotischen Sphingolipid-Metaboliten¹⁴⁶. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Hemmung von ASAH2 in kolorektalen Zellen zu einem verringerten Basalniveau der Akt-Signalweg-Aktivität führt^{146,147}.

UGT2B2 (UDP-Glucuronosyltransferase-Familie 2 Mitglied B28; 4q13.2) kodiert für Enzyme, die für die Glucuronidierung verantwortlich sind und in Geweben wie Niere und Leber vorkommen. Kopienzahlverluste im Locus wurden mit einem erhöhten Risiko für Prostata-, Dickdarm- und Speiseröhrenkrebs in Verbindung gebracht¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

Inaktivierende Mutationen des PTPN1 (Protein-Tyrosin-Phosphatase Non-Rezeptor Typ 1; 20q13.13) wurden zuvor als beitragende Faktoren zur Pathogenese von HL und primärem mediastinalem B-Zell-Lymphom (PMBCL) beschrieben^{3,22}.

CEBPB (20q13.13) ist ein Transkriptionsfaktor, der zur CREB-Familie gehört und Proteine kodiert, die an zellulärem Stoffwechsel, Entwicklung, Immun- und Entzündungsreaktion, Gewebedifferenzierung sowie Hämatopoese beteiligt sind¹⁵¹.

UBE2V1 (Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2; 20q13.13) katalysiert den Aufbau von Polyubiquitinketten und ist an der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, vermittelt durch TRAF6, TRAF2, TNF und IL1B, beteiligt¹⁵². Dennoch ist die Rolle von UBE2V1 in der Krebsentstehung sowie den beteiligten Mechanismen größtenteils noch unbekannt¹⁵³.

MLL2 (12q13.12), auch als KMT2D bekannt, kodiert für eine Histon-Methyltransferase, die an epigenetischen Mechanismen beteiligt ist. Die tumorfördernde Funktion des MLL2-Verlusts wurde in verschiedenen Krebsarten wie Dickdarm-, Leber- und Gliomen gezeigt¹⁵⁴.

RHEBL1 (12q13.2) ist ein Mitglied der Ras-Familie, auch Rheb2 genannt. Es wurde gezeigt, dass RHEBL1 ein Aktivator des NF- κ B-Signalwegs sowie des mTOR-Signalwegs ist¹⁵⁵. Zudem ist bekannt, dass Rheb1 bei AML-Patienten überexprimiert ist und die Veränderung des Rheb1-Spiegels bei AML-Patienten mit ihrer medianen Überlebenszeit zusammenhängt¹⁵⁶. Somit wäre auch interessant, den Zusammenhang zwischen der Deletion von RHEBL1 in HL-Patienten genauer zu untersuchen, um die mögliche onkogene oder protektive Wirkung zu verstehen.

Zinc Finger DHHC Domain-containing Protein 11 (ZDHHC11, 5p15.33) ist ein positiver Modulator der TRAF6-vermittelten NF- κ B-Signalwegsaktivierung¹⁵⁷. Darüber hinaus scheint ZDHHC11 die Tumorzellproliferation in Burkitt Lymphom zu beeinflussen¹⁵⁸.

Obwohl bereits Verbindungen zwischen diesen Kopienzahlamplifikationen und -deletionen in verschiedenen Krebsarten etabliert wurden, bleibt ihre Rolle in HL unklar, und weitere Untersuchungen sind erforderlich.

Zusammenfassend wurde hier ein ctDNA basierter WES-Ansatz präsentiert, der die Möglichkeit bietet, die genomische Landschaft von HL umfassend zu analysieren. Die Validierung durch den zielgerichteten ctDNA-Sequenzierungsansatz (Sobesky et al.)²⁰ legt nahe, dass die Ergebnisse, die hier dargestellt wurden, ein korrektes Abbild der genetischen Veränderungen des HL darstellen. Auf der anderen Seite geht die Breite dieses Ansatzes auf Kosten einer tieferen Analyse. Dennoch könnte der ctDNA-basierte WES-Ansatz wichtige Entdeckungen bei der Identifizierung von neuen Genen, die an der Tumorentstehung des HL

beteiligt sind, liefern. Diese Entdeckungen könnten anschließend durch einen angepassten zielgerichteten Sequenzierungsansatz in größerem Umfang validiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Dutton A, Reynolds GM, Dawson CW, Young LS, Murray PG. 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.
2. Green MR, Monti S, Rodig SJ, 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.
3. Gunawardana J, Chan FC, Telenius A, et al. Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Nat Genet* 2014; **46**(4): 329-35.
4. Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, et al. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *EMBO J* 2002; **21**(15): 4104-13.
5. Rosenwald A KR. Pathology and Molecular Pathology of Hodgkin Lymphoma. 2015: 45-64.
6. Schmitz R, Hansmann ML, Bohle V, 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.
7. Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* 2011; **471**(7338): 377-81.
8. Steidl C, Telenius A, Shah SP, et al. Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. *Blood* 2010; **116**(3): 418-27.
9. Weniger MA, Kuppers R. NF-kappaB deregulation in Hodgkin lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2016; **39**: 32-9.
10. Weniger MA, Melzner I, Menz CK, 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.
11. Kahn JM, Kelly KM. Adolescent and young adult Hodgkin lymphoma: Raising the bar through collaborative science and multidisciplinary care. *Pediatr Blood Cancer* 2018; **65**(7): e27033.
12. Metzger ML, Mauz-Korholz C. Epidemiology, outcome, targeted agents and immunotherapy in adolescent and young adult non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2019; **185**(6): 1142-57.

13. Momotow J, Borchmann S, Eichenauer DA, Engert A, Sasse S. Hodgkin Lymphoma-Review on Pathogenesis, Diagnosis, Current and Future Treatment Approaches for Adult Patients. *J Clin Med* 2021; **10**(5).
14. Rathore B, Kadin ME. Hodgkin's lymphoma therapy: past, present, and future. *Expert Opin Pharmacother* 2010; **11**(17): 2891-906.
15. Kreissl S, Mueller H, Goergen H, et al. Cancer-related fatigue in patients with and survivors of Hodgkin's lymphoma: a longitudinal study of the German Hodgkin Study Group. *Lancet Oncol* 2016; **17**(10): 1453-62.
16. Eichenauer DA, Thielen I, Haverkamp H, et al. Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in patients with Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Study Group. *Blood* 2014; **123**(11): 1658-64.
17. Behringer K, Mueller H, Goergen H, et al. Gonadal function and fertility in survivors after Hodgkin lymphoma treatment within the German Hodgkin Study Group HD13 to HD15 trials. *J Clin Oncol* 2013; **31**(2): 231-9.
18. Borchmann S, Muller H, Haverkamp H, et al. Symptomatic osteonecrosis as a treatment complication in Hodgkin lymphoma: an analysis of the German Hodgkin Study Group (GHSG). *Leukemia* 2019; **33**(2): 439-46.
19. Derenzini E, Younes A. Predicting treatment outcome in classical Hodgkin lymphoma: genomic advances. *Genome Med* 2011; **3**(4): 26.
20. Sobesky S, Mammadova L, Cirillo M, et al. In-depth cell-free DNA sequencing reveals genomic landscape of Hodgkin's lymphoma and facilitates ultrasensitive residual disease detection. *Med* 2021; **2**(10): 1171-93 e11.
21. Spina V, Brusca A, Cuccaro A, et al. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2018; **131**(22): 2413-25.
22. Tiacci E, Ladewig E, Schiavoni G, et al. Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2018; **131**(22): 2454-65.
23. Wienand K, Chapuy B, Stewart C, et al. Genomic analyses of flow-sorted Hodgkin Reed-Sternberg cells reveal complementary mechanisms of immune evasion. *Blood Adv* 2019; **3**(23): 4065-80.
24. Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans* 1832; **17**: 68-114.
25. Greenfield WS. Specimens illustrative of the pathology of lymphadenoma and leukocythemia. *Transactions of the Pathological Society of London* 1878; **29**: 272-304.
26. Sternberg C. Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Zeitschrift Heilkunde* 1898; **19**: 21–90.

27. Mendenhall DR. On the pathological changes in Hodgkin's disease, with especial reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hospital Reports* 1902; **10**: 133–96.
28. Kuppers R, Hansmann ML. The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**(3): 511-7.
29. Hjalgrim H. On the aetiology of Hodgkin lymphoma. *Dan Med J* 2012; **59**(7): B4485.
30. Glaser SL CE, Clarke CA, Keegan TH. Epidemiology. In: *Engert A, Younes A, editors Hodgkin Lymphoma, A comprehensive overview* 2014.
31. Briggs NC, Hall HI, Brann EA, Moriarty CJ, Levine RS. Cigarette smoking and risk of Hodgkin's disease: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol* 2002; **156**(11): 1011-20.
32. Jarrett AF, Armstrong AA, Alexander E. Epidemiology of EBV and Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 1996; **7 Suppl 4**: 5-10.
33. Navarro JT, Molto J, Tapia G, Ribera JM. Hodgkin Lymphoma in People Living with HIV. *Cancers (Basel)* 2021; **13**(17).
34. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; **99**(12): 4283-97.
35. Shanbhag S, Ambinder RF. Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress. *CA Cancer J Clin* 2018; **68**(2): 116-32.
36. Mauch PM, Kalish LA, Kadin M, Coleman CN, Osteen R, Hellman S. Patterns of presentation of Hodgkin disease. Implications for etiology and pathogenesis. *Cancer* 1993; **71**(6): 2062-71.
37. Guermazi A, Brice P, de Kerviler EE, et al. Extranodal Hodgkin disease: spectrum of disease. *Radiographics* 2001; **21**(1): 161-79.
38. Hasenclever D, 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.
39. Feng Q, Zak D, Daya R. Autoimmune hemolytic anemia and classical Hodgkin lymphoma: a case report and literature review. *Clin Adv Hematol Oncol* 2012; **10**(4): 270-6.
40. Hansmann ML, Willenbrock K. [WHO classification of Hodgkin's lymphoma and its molecular pathological relevance]. *Pathologe* 2002; **23**(3): 207-18.
41. Allemani C, Sant M, De Angelis R, Marcos-Gragera R, Coebergh JW, Group EW. Hodgkin disease survival in Europe and the U.S.: prognostic significance of morphologic groups. *Cancer* 2006; **107**(2): 352-60.
42. Diehl V, Stein H, Hummel M, Zollinger R, Connors JM. Hodgkin's lymphoma: biology and treatment strategies for primary, refractory, and relapsed disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003: 225-47.

43. Brockelmann PJ, Angelopoulou MK, Vassilakopoulos TP. Prognostic factors in Hodgkin lymphoma. *Semin Hematol* 2016; **53**(3): 155-64.
44. Brockelmann PJ, Eichenauer DA, Jakob T, Follmann M, Engert A, Skoetz N. Hodgkin Lymphoma in Adults. *Dtsch Arztebl Int* 2018; **115**(31-32): 535-40.
45. Engert A, Plutschow A, Eich HT, et al. Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010; **363**(7): 640-52.
46. Andre MPE, Girinsky T, Federico M, et al. Early Positron Emission Tomography Response-Adapted Treatment in Stage I and II Hodgkin Lymphoma: Final Results of the Randomized EORTC/LYSA/FIL H10 Trial. *J Clin Oncol* 2017; **35**(16): 1786-94.
47. von Tresckow B, Plutschow A, Fuchs M, et al. Dose-intensification in early unfavorable Hodgkin's lymphoma: final analysis of the German Hodgkin Study Group HD14 trial. *J Clin Oncol* 2012; **30**(9): 907-13.
48. Eich HT, Diehl V, Gorgen H, et al. Intensified chemotherapy and dose-reduced involved-field radiotherapy in patients with early unfavorable Hodgkin's lymphoma: final analysis of the German Hodgkin Study Group HD11 trial. *J Clin Oncol* 2010; **28**(27): 4199-206.
49. Borchmann P, Plutschow A, Kobe C, et al. PET-guided omission of radiotherapy in early-stage unfavourable Hodgkin lymphoma (GHSG HD17): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2021; **22**(2): 223-34.
50. Borchmann P, Goergen H, Kobe C, et al. PET-guided treatment in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma (HD18): final results of an open-label, international, randomised phase 3 trial by the German Hodgkin Study Group. *Lancet* 2017; **390**(10114): 2790-802.
51. Boll B, Goergen H, Behringer K, et al. Bleomycin in older early-stage favorable Hodgkin lymphoma patients: analysis of the German Hodgkin Study Group (GHSG) HD10 and HD13 trials. *Blood* 2016; **127**(18): 2189-92.
52. Boll B, Bredenfeld H, Gorgen H, et al. Phase 2 study of PVAG (prednisone, vinblastine, doxorubicin, gemcitabine) in elderly patients with early unfavorable or advanced stage Hodgkin lymphoma. *Blood* 2011; **118**(24): 6292-8.
53. Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget* 2016; **7**(30): 48832-41.
54. Karachaliou N, Mayo-de-Las-Casas C, Molina-Vila MA, Rosell R. Real-time liquid biopsies become a reality in cancer treatment. *Ann Transl Med* 2015; **3**(3): 36.
55. Lone SN, Nisar S, Masoodi T, et al. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol Cancer* 2022; **21**(1): 79.
56. Mandel P, Metais P. [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948; **142**(3-4): 241-3.

57. Yan YY, Guo QR, Wang FH, et al. Cell-Free DNA: Hope and Potential Application in Cancer. *Front Cell Dev Biol* 2021; **9**: 639233.
58. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; **37**(3): 646-50.
59. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; **350**(9076): 485-7.
60. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**(6): 426-37.
61. Esposito A, Criscitiello C, Trapani D, Curigliano G. The Emerging Role of "Liquid Biopsies," Circulating Tumor Cells, and Circulating Cell-Free Tumor DNA in Lung Cancer Diagnosis and Identification of Resistance Mutations. *Curr Oncol Rep* 2017; **19**(1): 1.
62. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* 2011; **6**(9): e23418.
63. Martins I, Ribeiro IP, Jorge J, et al. Liquid Biopsies: Applications for Cancer Diagnosis and Monitoring. *Genes (Basel)* 2021; **12**(3).
64. Heger JM, Borchmann S. Coming of age: the evolving role of circulating tumor DNA in malignant lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2022; **63**(4): 768-70.
65. Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, et al. Circulating Tumor DNA Measurements As Early Outcome Predictors in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2018; **36**(28): 2845-53.
66. Manier S, Park J, Capelletti M, et al. Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma. *Nat Commun* 2018; **9**(1): 1691.
67. Rossi D, Diop F, Spaccarotella E, et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood* 2017; **129**(14): 1947-57.
68. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, 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.
69. Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Dynamic monitoring of circulating tumor DNA in non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2016; **127**(25): 3127-32.
70. Kuppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**(1): 15-27.
71. Visser L, van den Berg A, Poppema S, Diepstra A. Microenvironment, Crosstalk, and Immune Escape Mechanisms. In: *Engert A, Younes A, editors Hodgkin Lymphoma, A comprehensive overview* 2014: 65-78.
72. Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, et al. Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001; **97**(1): 250-5.
73. Rosenwald A, Küppers R. Pathology and Molecular Pathology of Hodgkin Lymphoma. In: *Engert A, Younes A, editors Hodgkin Lymphoma, A comprehensive overview* 2014: 45-64.

74. Rossi D, Spina V, Brusca A, Gaidano G. Liquid biopsy in lymphoma. *Haematologica* 2019; **104**(4): 648-52.
75. Camus V, Jardin F. Cell-Free DNA for the Management of Classical Hodgkin Lymphoma. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021; **14**(3).
76. Brockelmann PJ, Buhnen I, Meissner J, et al. Nivolumab and Doxorubicin, Vinblastine, and Dacarbazine in Early-Stage Unfavorable Hodgkin Lymphoma: Final Analysis of the Randomized German Hodgkin Study Group Phase II NIVAHL Trial. *J Clin Oncol* 2023; **41**(6): 1193-9.
77. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009; **25**(14): 1754-60.
78. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; **25**(16): 2078-9.
79. Talevich E, Shain AH, Botton T, Bastian BC. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLoS Comput Biol* 2016; **12**(4): e1004873.
80. Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H, et al. Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *Int J Cancer* 2003; **103**(4): 489-95.
81. Mermel CH, Schumacher SE, Hill B, Meyerson ML, Beroukhi R, Getz G. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome Biol* 2011; **12**(4): R41.
82. Deng S, Lira M, Huang D, et al. TNER: a novel background error suppression method for mutation detection in circulating tumor DNA. *BMC Bioinformatics* 2018; **19**(1): 387.
83. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016; **536**(7616): 285-91.
84. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**(1): 308-11.
85. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 2012; **22**(3): 568-76.
86. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; **339**(6127): 1546-58.
87. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013; **499**(7457): 214-8.
88. Escande F, Aubert JP, Porchet N, Buisine MP. Human mucin gene MUC5AC: organization of its 5'-region and central repetitive region. *Biochem J* 2001; **358**(Pt 3): 763-72.
89. Bamford S, Dawson E, Forbes S, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer* 2004; **91**(2): 355-8.

90. Meyer MJ, Lapcevic R, Romero AE, et al. mutation3D: Cancer Gene Prediction Through Atomic Clustering of Coding Variants in the Structural Proteome. *Hum Mutat* 2016; **37**(5): 447-56.
91. Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2020. <https://www.r-project.org>.
92. Rosenthal R, McGranahan N, Herrero J, Taylor BS, Swanton C. DeconstructSigs: delineating mutational processes in single tumors distinguishes DNA repair deficiencies and patterns of carcinoma evolution. *Genome Biol* 2016; **17**: 31.
93. Alexandrov LB, Kim J, Haradhvala NJ, et al. The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature* 2020; **578**(7793): 94-101.
94. Levine PH, Ablashi DV, Berard CW, Carbone PP, Waggoner DE, Malan L. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Cancer* 1971; **27**(2): 416-21.
95. Weiss LM, Strickler JG, Warnke RA, Purtilo DT, Sklar J. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1987; **129**(1): 86-91.
96. Parmigiani G, Boca S, Lin J, Kinzler KW, Velculescu V, Vogelstein B. Design and analysis issues in genome-wide somatic mutation studies of cancer. *Genomics* 2009; **93**(1): 17-21.
97. Azizian NG, Li Y. XPO1-dependent nuclear export as a target for cancer therapy. *J Hematol Oncol* 2020; **13**(1): 61.
98. Camus V, Stamatoullas A, Mareschal S, 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.
99. Hu X, Xu Z, De S. Characteristics of mutational signatures of unknown etiology. *NAR Cancer* 2020; **2**(3): zcaa026.
100. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* 2015; **125**(7): 1061-72.
101. Seaby EG, Pengelly RJ, Ennis S. Exome sequencing explained: a practical guide to its clinical application. *Brief Funct Genomics* 2016; **15**(5): 374-84.
102. Roemer MG, Advani RH, Redd RA, et al. Classical Hodgkin Lymphoma with Reduced beta2M/MHC Class I Expression Is Associated with Inferior Outcome Independent of 9p24.1 Status. *Cancer Immunol Res* 2016; **4**(11): 910-6.
103. Lee G, Jeong YS, Kim DW, et al. Clinical significance of APOB inactivation in hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med* 2018; **50**(11): 1-12.
104. Ren L, Yi J, Li W, et al. Apolipoproteins and cancer. *Cancer Med* 2019; **8**(16): 7032-43.
105. Basile MS, Fagone P, Mangano K, et al. KCNMA1 Expression is Downregulated in Colorectal Cancer via Epigenetic Mechanisms. *Cancers (Basel)* 2019; **11**(2).

106. Bloch M, Ousingsawat J, Simon R, et al. KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer. *Oncogene* 2007; **26**(17): 2525-34.
107. Yoshimura A, Ito M, Chikuma S, Akanuma T, Nakatsukasa H. Negative Regulation of Cytokine Signaling in Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; **10**(7).
108. Yoshimura A. The CIS family: negative regulators of JAK-STAT signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; **9**(3-4): 197-204.
109. Boudin L, De Nonneville A, Finetti P, et al. CISH Expression Is Associated with Metastasis-Free Interval in Triple-Negative Breast Cancer and Refines the Prognostic Value of PDL1 Expression. *Cancers (Basel)* 2022; **14**(14).
110. Deng C, Zhang L, Ma X, Cai S, Jia Y, Zhao L. RFTN1 facilitates gastric cancer progression by modulating AKT/p38 signaling pathways. *Pathol Res Pract* 2022; **234**: 153902.
111. Niemann CU, Wiestner A. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Semin Cancer Biol* 2013; **23**(6): 410-21.
112. Smart SK, Vasileiadi E, Wang X, DeRyckere D, Graham DK. The Emerging Role of TYRO3 as a Therapeutic Target in Cancer. *Cancers (Basel)* 2018; **10**(12).
113. Ryu D, Lee C. Expression quantitative trait loci for PI3K/AKT pathway. *Medicine (Baltimore)* 2017; **96**(1): e5817.
114. Chien CW, Hou PC, Wu HC, et al. Targeting TYRO3 inhibits epithelial-mesenchymal transition and increases drug sensitivity in colon cancer. *Oncogene* 2016; **35**(45): 5872-81.
115. Wong JP, Stuhlmiller TJ, Giffin LC, et al. Kinome profiling of non-Hodgkin lymphoma identifies Tyro3 as a therapeutic target in primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; **116**(33): 16541-50.
116. Miloudi H, Bohers E, Guillonneau F, et al. XPO1(E571K) Mutation Modifies Exportin 1 Localisation and Interactome in B-cell Lymphoma. *Cancers (Basel)* 2020; **12**(10).
117. Abbas W, Kumar A, Herbein G. The eEF1A Proteins: At the Crossroads of Oncogenesis, Apoptosis, and Viral Infections. *Front Oncol* 2015; **5**: 75.
118. Li D, Wei T, Abbott CM, Harrich D. The unexpected roles of eukaryotic translation elongation factors in RNA virus replication and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2013; **77**(2): 253-66.
119. Kobayashi Y, Yonehara S. Novel cell death by downregulation of eEF1A1 expression in tetraploids. *Cell Death Differ* 2009; **16**(1): 139-50.
120. Vera M, Pani B, Griffiths LA, et al. The translation elongation factor eEF1A1 couples transcription to translation during heat shock response. *Elife* 2014; **3**: e03164.
121. Chen SL, Lu SX, Liu LL, et al. eEF1A1 Overexpression Enhances Tumor Progression and Indicates Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Transl Oncol* 2018; **11**(1): 125-31.

122. Liu X, Chen L, Ge J, et al. The Ubiquitin-like Protein FAT10 Stabilizes eEF1A1 Expression to Promote Tumor Proliferation in a Complex Manner. *Cancer Res* 2016; **76**(16): 4897-907.
123. Scaggiante B, Dapas B, Grassi G, Manzini G. Interaction of G-rich GT oligonucleotides with nuclear-associated eEF1A is correlated with their antiproliferative effect in haematopoietic human cancer cell lines. *FEBS J* 2006; **273**(7): 1350-61.
124. Zhu G, Yan W, He HC, et al. Inhibition of proliferation, invasion, and migration of prostate cancer cells by downregulating elongation factor-1alpha expression. *Mol Med* 2009; **15**(11-12): 363-70.
125. Yu X, Liu X, Liu T, et al. Identification of a novel binding protein of FAT10: eukaryotic translation elongation factor 1A1. *Dig Dis Sci* 2012; **57**(9): 2347-54.
126. Lee SY, Wang H, Cho HJ, Xi R, Kim TM. The shaping of cancer genomes with the regional impact of mutation processes. *Exp Mol Med* 2022; **54**(7): 1049-60.
127. Petljak M, Alexandrov LB, Brummel JS, et al. Characterizing Mutational Signatures in Human Cancer Cell Lines Reveals Episodic APOBEC Mutagenesis. *Cell* 2019; **176**(6): 1282-94 e20.
128. Alexandrov LB, Jones PH, Wedge DC, et al. Clock-like mutational processes in human somatic cells. *Nat Genet* 2015; **47**(12): 1402-7.
129. Pende D, Falco M, Vitale M, et al. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front Immunol* 2019; **10**: 1179.
130. Blunt MD, Khakoo SI. Activating killer cell immunoglobulin-like receptors: Detection, function and therapeutic use. *Int J Immunogenet* 2020; **47**(1): 1-12.
131. Debska-Zielkowska J, Moszkowska G, Zielinski M, et al. KIR Receptors as Key Regulators of NK Cells Activity in Health and Disease. *Cells* 2021; **10**(7).
132. Hodzic D, Kong C, Wainszelbaum MJ, Charron AJ, Su X, Stahl PD. TBC1D3, a hominoid oncoprotein, is encoded by a cluster of paralogues located on chromosome 17q12. *Genomics* 2006; **88**(6): 731-6.
133. Chen X, Li D, Wang N, et al. Bioinformatic analysis suggests that UGT2B15 activates the Hippo-YAP signaling pathway leading to the pathogenesis of gastric cancer. *Oncol Rep* 2018; **40**(4): 1855-62.
134. Hu DG, Selth LA, Tarulli GA, et al. Androgen and Estrogen Receptors in Breast Cancer Coregulate Human UDP-Glucuronosyltransferases 2B15 and 2B17. *Cancer Res* 2016; **76**(19): 5881-93.
135. Liu X, Tang H, Zhang Z, et al. POTEH hypomethylation, a new epigenetic biomarker for glioma prognosis. *Brain Res* 2011; **1391**: 125-31.

136. Hakomori SI, Cummings RD. Glycosylation effects on cancer development. *Glycoconj J* 2012; **29**(8-9): 565-6.
137. Yang GF, Zhang X, Su YG, Zhao R, Wang YY. The role of the deubiquitinating enzyme DUB3/USP17 in cancer: a narrative review. *Cancer Cell Int* 2021; **21**(1): 455.
138. McFarlane C, McFarlane S, Paul I, et al. The deubiquitinating enzyme USP17 is associated with non-small cell lung cancer (NSCLC) recurrence and metastasis. *Oncotarget* 2013; **4**(10): 1836-43.
139. Xia ZN, Wang XY, Cai LC, Jian WG, Zhang C. IGLL5 is correlated with tumor-infiltrating immune cells in clear cell renal cell carcinoma. *FEBS Open Bio* 2021; **11**(3): 898-910.
140. Kasar S, Kim J, Improgo R, et al. Whole-genome sequencing reveals activation-induced cytidine deaminase signatures during indolent chronic lymphocytic leukaemia evolution. *Nat Commun* 2015; **6**: 8866.
141. Fan Z, Pei R, Sha K, Chen L, Wang T, Lu Y. Comprehensive characterization of driver genes in diffuse large B cell lymphoma. *Oncol Lett* 2020; **20**(1): 382-90.
142. White BS, Lanc I, O'Neal J, 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.
143. Cornish AJ, Hoang PH, Dobbins SE, et al. Identification of recurrent noncoding mutations in B-cell lymphoma using capture Hi-C. *Blood Adv* 2019; **3**(1): 21-32.
144. Mraz M, Stano Kozubik K, Plevova K, et al. The origin of deletion 22q11 in chronic lymphocytic leukemia is related to the rearrangement of immunoglobulin lambda light chain locus. *Leuk Res* 2013; **37**(7): 802-8.
145. Deng ZH, Gomez TS, Osborne DG, Phillips-Krawczak CA, Zhang JS, Billadeau DD. Nuclear FAM21 participates in NF-kappaB-dependent gene regulation in pancreatic cancer cells. *J Cell Sci* 2015; **128**(2): 373-84.
146. Parveen F, Bender D, Law SH, Mishra VK, Chen CC, Ke LY. Role of Ceramidases in Sphingolipid Metabolism and Human Diseases. *Cells* 2019; **8**(12).
147. Vijayan Y, Lankadasari MB, Harikumar KB. Acid Ceramidase: A Novel Therapeutic Target in Cancer. *Curr Top Med Chem* 2019; **19**(17): 1512-20.
148. Le PH, Kuo CJ, Hsieh YC, et al. Ages of hepatocellular carcinoma occurrence and life expectancy are associated with a UGT2B28 genomic variation. *BMC Cancer* 2019; **19**(1): 1190.
149. Hu L, Wu Y, Guan X, et al. Germline copy number loss of UGT2B28 and gain of PLEC contribute to increased human esophageal squamous cell carcinoma risk in Southwest China. *Am J Cancer Res* 2015; **5**(10): 3056-71.

150. Yoshida T, Kobayashi T, Itoda M, et al. Clinical omics analysis of colorectal cancer incorporating copy number aberrations and gene expression data. *Cancer Inform* 2010; **9**: 147-61.
151. Gardiner JD, Abegglen LM, Huang X, et al. C/EBPbeta-1 promotes transformation and chemoresistance in Ewing sarcoma cells. *Oncotarget* 2017; **8**(16): 26013-26.
152. Deng L, Wang C, Spencer E, et al. Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000; **103**(2): 351-61.
153. Shen T, Cai LD, Liu YH, et al. Ube2v1-mediated ubiquitination and degradation of Sirt1 promotes metastasis of colorectal cancer by epigenetically suppressing autophagy. *J Hematol Oncol* 2018; **11**(1): 95.
154. Klonou A, Chlamydas S, Piperi C. Structure, Activity and Function of the MLL2 (KMT2B) Protein Lysine Methyltransferase. *Life (Basel)* 2021; **11**(8).
155. Yuan J, Shan Y, Chen X, et al. Identification and characterization of RHEBL1, a novel member of Ras family, which activates transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Biol Rep* 2005; **32**(4): 205-14.
156. Gao Y, Gao J, Li M, et al. Rheb1 promotes tumor progression through mTORC1 in MLL-AF9-initiated murine acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2016; **9**: 36.
157. Liu E, Sun J, Yang J, et al. ZDHHC11 Positively Regulates NF-kappaB Activation by Enhancing TRAF6 Oligomerization. *Front Cell Dev Biol* 2021; **9**: 710967.
158. Dzikiewicz-Krawczyk A, Kok K, Slezak-Prochazka I, et al. ZDHHC11 and ZDHHC11B are critical novel components of the oncogenic MYC-miR-150-MYB network in Burkitt lymphoma. *Leukemia* 2017; **31**(6): 1470-3.

7. Anhang

Tabelle 4: Liste der detektierten Onkogene und Tumorsuppressorgene in der Gesamtkohorte

OG	TSG
EEF1A1	APOB
FLG2	ARID1A
HIST1H2AM	B2M
IGFN1	BCL7A
KCNJ8	CISH
NBPF10	CSF2RB
OR10G7	F8
POTEH	FREM2
RP1L1	GNA13
STAT6	HLA-B
XPO1	IL4R
ZNF806	KMT2D
	MKI67
	NFKBIE
	PLXNC1
	POU3F4
	PTPN1
	RFTN1
	ROBO2
	SEL1L3
	SOCS1
	SPEN
	TNFAIP3
	TYRO3
	UBE2A

Tabelle 5: Liste der detektierten Kopienzahlvariationen in der Gesamtkohorte

Amplifikationen	Deletionen
Amplifikation 19q13.42	Deletion 13q13.1
Amplifikation 9p24.1	Deletion 1p36.13
Amplifikation 12q12	Deletion 6p21.33
Amplifikation 9p24.3	Deletion 1p36.33
Amplifikation 2p16.1	Deletion 13q34
Amplifikation 5p15.33	Deletion 1p36.21
Amplifikation 19p12	Deletion 6p22.2
Amplifikation 3q11.2	Deletion 6p21.32
Amplifikation 3q29	Deletion 6q23.3
Amplifikation 17q12	Deletion 17p11.2
Amplifikation 5q13.2	Deletion 22q11.22
Amplifikation 14q11.2	Deletion 15q11.2
Amplifikation 4q13.2	Deletion 15q15.3
Amplifikation 1q21.3	Deletion 22q11.1
Amplifikation 8p23.1	Deletion 4q35.1
Amplifikation 22q11.1	Deletion 16q24.2
Amplifikation 11q11	Deletion 9q21.11
Amplifikation 16q22.1	Deletion 16p13.3
Amplifikation 16q23.1	Deletion 8p23.1
Amplifikation 1q21.2	Deletion 10q11.22
Amplifikation 15q11.2	Deletion 10q11.23
Amplifikation 4q24	Deletion 11q14.3
Amplifikation 21p11.2	Deletion 14q32.33
Amplifikation 22q11.21	Deletion 16p13.11
Amplifikation 4p16.1	Deletion 4q13.2
Amplifikation 7q35	Deletion 16q23.1
Amplifikation 7q36.1	Deletion 20q13.13
Amplifikation 11q14.3	Deletion 12q13.12
Amplifikation 10q11.22	Deletion 16p11.2
Amplifikation 1p36.21	Deletion 16q22.1
	Deletion 7p22.1
	Deletion 9p11.2
	Deletion 8q24.3
	Deletion 14q11.2
	Deletion 3q29
	Deletion 1q21.2
	Deletion 2p11.1
	Deletion 2q12.3
	Deletion 3p22.2
	Deletion 17q21.31
	Deletion 19q13.31
	Deletion 19q13.42
	Deletion 1q44
	Deletion 5p15.33

Tabelle 6: Liste der angewendeten Reagenzien, Software und Protokolle

Reagenzien, Software, Protokolle	Quelle	Identifikator
Biologische Proben		
Blutproben aus der peripheren Blutbahn	Klinische Studien: HD21 und NIVAHL	HD21: NCT02661503 NIVAHL: NCT03004833
Kits zur DNA-Extraktion		
QIAamp Circulating Nucleic-Acid Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	55114
Qiagen QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	51104
Quantifizierung der Eingangs-DNA		
Qubit-Fluorometer	Invitrogen, Waltham, MA	Q33230
TapeStation 2200 System	Agilent, Santa Clara, CA	G2964AA
Gesamtexomsequenzierung		
SureSelect Human All Exon V7-Plattform	Agilent, Santa Clara, CA	5191-4004
SureSelectXT HS Automated Target Enrichment Protokoll	Agilent, Santa Clara, CA	G9702-90000
Illumina Paired-End Multiplex-Sequenzierungsprotokoll	Illumina, San Diego, CA	PE400-1001
Illumina NovaSeq6000-Sequenziersystem	Illumina, San Diego, CA	20012850
Datenverarbeitung		
Software Bcl2fastq2 v2.20	Illumina, San Diego, CA	15051736 v02
CNVKit	Talevich et al.	PMID: 27100738
GISTIC 2.0	Mermel et al.	PMID: 21527027
TNER	Deng et al.	PMID: 30342468
BWA mem	Li et al.	PMID: 19451168
ANNOVAR	Wang et al.	PMID: 20601685
VarScan2	Koboldt et al.	PMID: 22300766
Mutation3D	Meyer et. al.	PMID: 26841357
R	R-core team	
DeconstructSigs	Rosenthal et al.	PMID: 26899170

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sequenzierungsdaten erzeugt pro cfDNA	33
Abbildung 2: Die mediane ctDNA-Konzentration (hGE/ml) in Korrelation mit Patienteneigenschaften.....	34
Abbildung 3: Validierung der WES-Ergebnisse mit einer zielgerichteten Sequenzierung (n=9)	35
Abbildung 4: Anzahl der Mutationen der Kohorte und absolute Zahlen der definierten Genmutationen.....	36
Abbildung 5: Die häufigsten mutierten Gene und Tumormutationslast der Gesamtkohorte	37
Abbildung 6: CNV-Score zum Vergleich der Mutationsrate der für HL charakteristischen Mutationen mit den vergleichbaren Studien	38
Abbildung 7: Die genetische Landschaft der HL-Patienten der Kohorte (OG und TSG) dargestellt in einem Wasserfalldiagramm	40
Abbildung 8: Die Medianzahl der Onkogene und Tumorsuppressorgene und funktionell verbundene Cluster von Mutationsorten dieser Gene.....	41
Abbildung 9: Die häufigsten Mutationssignaturen und deren Eigenschaften und die Verteilung in der Gesamtkohorte.....	42
Abbildung 10: Kopienzahlvariationen (CNV) in Prozent mit entsprechenden Gen-Loci und Anzahl der CNV pro Patient	43

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ann-Arbor Klassifikation (nach Pschyrembel).....	13
Tabelle 2: Modifizierte Ann-Arbor Klassifikation unter Berücksichtigung der von German Hodgkin Study Group (GHSg) definierten Risikofaktoren	14
Tabelle 3: Patienteneigenschaften in der Gesamtkohorte.....	32
Tabelle 4: Liste der detektierten Onkogene und Tumorsuppressorgene in der Gesamtkohorte	66
Tabelle 5: Liste der detektierten Kopienzahlvariationen in der Gesamtkohorte	67
Tabelle 6: Liste der angewendeten Reagenzien, Software und Protokolle	68

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten und Figuren entsprechen zum Teil dem Manuskript (*Circulating tumor DNA sequencing facilitates biological classification and individualized risk stratification in patients with Hodgkin lymphoma*) von AG Borchmann, Uniklinik Köln, mit den folgenden Erstautoren (Jan-Michel Heger, Laman Mammadova, Julia Mattlener), eingereicht und zur Publikation angenommen bei ***Journal of Clinical Oncology***.