

Aus dem Institut für Pathologie  
(Direktor: Prof. Dr. Röcken),  
Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Molekulare Charakterisierung  
adulter Burkitt Lymphome zur Identifizierung  
altersassoziierter genetischer Veränderungen

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**KATHARINA PAULA JOHN**  
aus Heidelberg

Kiel 2023

Aus dem Institut für Pathologie  
(Direktor: Prof. Dr. Röcken),  
Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Molekulare Charakterisierung  
adulter Burkitt Lymphome zur Identifizierung  
altersassoziierter genetischer Veränderungen

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**KATHARINA PAULA JOHN**  
aus Heidelberg

Kiel 2023

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfram Klapper, Institut für Pathologie

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Gunnar Cario, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2024

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 12.12.2023

gez.: Prof. Dr. Wolfram Klapper  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	III
1 Einführung.....	1
1.1 Lymphome .....	1
1.2 Aggressive B-Zell-Lymphome .....	1
1.3 Epidemiologie, Klinik und molekulare Eigenschaften des Burkitt Lymphoms .....	2
1.4 Technische Grundlagen der Basisdiagnostik.....	7
1.5 Mutationsanalysen zur Charakterisierung pädiatrischer und adulter BL.....	8
1.5.1 <i>Next Generation Sequencing</i> mit der <i>Illumina</i> Technologie .....	8
1.5.2 Unterscheidung von Artefakten und realen Mutationen .....	9
1.5.3 Bioinformatische Analyse von Sequenzierdaten.....	9
1.5.4 Datenbanken und Variantenprediktion .....	10
2 Zielsetzung und Fragestellung.....	14
3 Material und Methoden .....	15
3.1 Material .....	15
3.1.1 Auswahl des Patientenkollektivs für altersassoziierte Analysen an adulten Burkitt Lymphomen .....	15
3.1.2 Genpanel der Mutationsanalyse.....	16
3.1.3 Geräte .....	18
3.2 Methoden .....	18
3.2.1 Basisdiagnostik .....	18
3.2.2 DNA- und RNA-Extraktion.....	19
3.2.3 Genexpressionsanalyse mit dem nCounter von NanoString.....	20
3.2.4 Mutationsanalysen .....	20
3.3 Statistische Auswertung.....	25
3.4 Sonstige Verfahren zur Visualisierung und Auswertung .....	26
3.4.1 <i>Draw.io</i> zur Erstellung von Abbildungen zu Arbeitsabläufen.....	26
3.4.2 <i>Bio.oviz</i> zur Darstellung von Mutationen der gesamten Kohorte .....	26
4 Ergebnisse .....	27

4.1	Patientencharakteristika zeigen klar definierte Kohorte von sporadischen Burkitt Lymphomen .....	27
4.2	Validität der Mutationsanalysen der Kohorte von sporadischen BL.....	29
4.3	Mutationsanalyse zeigt Veränderungen in BL typischen Genen.....	30
4.4	Molekulare Charakteristika und Phänotyp sind bei Burkitt Lymphomen mit dem Alter assoziiert .....	32
4.5	Der EBV-Status von sporadischen Burkitt Lymphomen ist mit dem Auftreten von Mutationen assoziiert .....	34
5	Diskussion.....	36
5.1	Diskussion der Methoden.....	36
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	38
5.3	Klinischer Bezug und Ausblick .....	42
6	Zusammenfassung .....	43
7	Literaturverzeichnis .....	44
8	Danksagungen .....	52
9	Eidesstattliche Erklärung .....	53
10	Publikationen der Ergebnisse .....	54

## Abkürzungsverzeichnis

BCR	B-Zell-Rezeptor
BL	Burkitt Lymphom
bp	Basenpaare
CD	engl. cluster of differentiation (Immunphänotypischer Oberflächenmarker von Zellen)
CDS	Kodierende Sequenz
CNV	engl. copy number variation (dt. Kopiezahlvariation)
DLBCL	Diffus Großzelliges B-Zell Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Exon
EBV	Epstein-Barr Virus
ED	Erstdiagnose
FASTQ	Dateiformat, textbasiertes Format zum Speichern biologischen Sequenzen und Qualitätsfaktoren
FFPE	Formalin-fixiertes in Paraffin-eingebettetes Gewebe
FISH	Fluoreszenz in-Situ Hybridisierung
gDNA	genomische DNA
HGBL	Hochmalignes B-Zell Lymphom
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HIV-BL	Immunschwäche-assoziiertes Burkitt Lymphom
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
ISH	In-situ Hybridisierung
LRA	Logistische Regressionsanalyse
mBL	molekular definiertes Burkitt Lymphom
mRNA	messenger-RNA
NFE	Non-Finnish European (dt. nicht-finnische Europäer)
NGS	engl. next generation sequencing (dt. Hochdurchsatzsequenzierung)
NHL	Non Hodgkin Lymphom
non-mBL	nicht molekular definiertes Burkitt Lymphom
PCR	engl. polymerase chain reaction (dt. Polymerasekettenreaktion)
Ref-Seq	Referenzsequenzdatenbank
RNA	Ribonukleinsäure
SBS	engl. sequencing by synthesis (dt. Sequenzierung bei Synthese)
SNP	engl. small nucleotide polymorphism (dt. Einzelnukleotid Polymorphismus)
SNV	engl. single nucleotide variant (dt. Punktmutation)
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VAF	engl. variant allele frequency (dt. Allelfrequenz der Variante)
WHO	engl. World Health Organization (dt. Weltgesundheitsorganisation)

# **1 Einführung**

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird bei Personenbezeichnungen und personenbezogenen Hauptwörtern in dieser Arbeit die Sprachform des generischen Maskulinums verwendet. Die entsprechenden Begriffe sind jedoch als geschlechtsunabhängig zu erachten und implizieren keinerlei Benachteiligung weiblicher oder anderweitiger diverser Geschlechtsidentitäten.

## **1.1 Lymphome**

Der Begriff Lymphom wird als Sammelbezeichnung für maligne Erkrankungen verwendet, die ihren Ursprung in entarteten Lymphozyten haben. Die WHO-Klassifikation unterscheidet je nach Ursprungszelle und Wachstumsmuster zahlreiche Entitäten. Grundsätzlich lässt sich das Hodgkin-Lymphom vom Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) unterscheiden. Während das Hodgkin-Lymphom durch das Vorhandensein der sog. Hodgkin-Zellen und viel reaktivem Begleitinfiltrat gekennzeichnet ist, dominieren beim Non-Hodgkin-Lymphom die neoplastischen Lymphozyten (Pschyrembel, 2020).

## **1.2 Aggressive B-Zell-Lymphome**

Gemeinsam stellen das Burkitt Lymphom (BL) und das Diffus Großzellige B-Zell Lymphom (DLBCL) die häufigsten aggressiven B-Zell-Non-Hodgkin Lymphome dar. Tabelle 1 zeigt eine Gegenüberstellung der Eigenschaften dieser beiden Lymphome. Das DLBCL macht den größten Anteil aller adulten NHL aus, wohingegen das BL bei NHL im Kindesalter dominiert. Während das BL im Allgemeinen eine recht homogene Erkrankung darstellt, ist das DLBCL deutlich heterogener. Subtypen zeigen verschiedene histopathologische und genetische Charakteristika und auch das Genexpressionsprofil kann sich zwischen den Subtypen unterscheiden (Loeffler-Wirth et al., 2019).

Des Weiteren gibt es B-Zell Lymphome, die Eigenschaften von BL und DLBCL aufweisen und in der aktuellsten WHO-Klassifikation als eigene Entität der Hochmalignen B-Zell Lymphome (HGBL) beschrieben werden (Swerdlow et al., 2017). Insbesondere dann, wenn die Lymphom-Zellen die Morphologie eines DLBCL besitzen, gleichzeitig aber die genetischen und immunphänotypischen Merkmale des BL aufweisen, kann die Unterscheidung der verschiedenen Entitäten eine große Herausforderung darstellen. Dies liegt daran, dass die für das BL typische IgH-MYC-Translokation auch beim DLBCL oder HGBL auftreten kann und nicht nur auf das BL beschränkt ist (Hummel et al., 2006; Klapproth und Wirth, 2010; Swerdlow et al., 2017). Die Unterscheidung von BL zu anderen aggressiven B-Zell-Lymphomen (z.B. DLBCL) gelingt dann oftmals mittels der Genexpression (Masqué-Soler et al., 2013).

Tabelle 1: Eigenschaften von BL, HGBL und DLBCL. BL: Burkitt Lymphom; HGBL: Hochmalignes B-Zell-Lymphom; DLBCL: Diffus-Großzelliges B-Zell-Lymphom; LJ: Lebensjahr. (Bouska et al., 2017; Chen et al., 2019).

	<b>BL</b>	<b>HGBL</b>	<b>DLBCL</b>
<b>Anteil an adulten NHL</b>	1-5 %	Besitzt Merkmale von BL und DLBCL	25-35 %
<b>Haupterkrankungs- alter</b>	10. LJ		70. LJ
<b>Charakteristika</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• biologisch homogen</li> <li>• Einteilung in drei Varianten anhand epidemiologischer Merkmale</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• biologisch heterogen</li> <li>• Einteilung in Subtypen anhand Genexpressions-profils</li> </ul>
<b>Häufige genetische Translokationen</b>	IgH-MYC		Beteiligung von <i>BCL2</i> und <i>BCL6</i>

### 1.3 Epidemiologie, Klinik und molekulare Eigenschaften des Burkitt Lymphoms

Das BL wurde erstmals im Jahr 1887 von Sir Albert Cook beschrieben. Die Bezeichnung erhielt das Lymphom jedoch durch den irischen Chirurg Dennis Burkitt, der im Jahr 1958 das gehäufte Auftreten von Kiefersarkomen bei afrikanischen Kindern beobachtete und somit die Erkrankung erstmals definierte (Burkitt, 1958). Die aktuelle WHO-Klassifikation von Tumoren der hämatopoetischen und lymphoiden Gewebe sieht für das BL drei klinische Varianten vor: das endemische BL, das sporadische BL und das Immunschwäche-assoziierte BL. Diese klinischen Varianten unterscheiden sich primär hinsichtlich ihrer geografischen Verbreitung, ihrer klinischen Präsentation sowie den biologischen Eigenschaften (Swerdlow et al., 2017). Das endemische BL ist vor allem in Afrika und Papua-Neuguinea verbreitet. In diesen Regionen korrespondiert die Verbreitung holoendemischer Malaria mit dem frühen Erwerb des Epstein-Barr-Virus (EBV) (Molyneux et al., 2012). Der Nachweis einer EBV-Infektion lässt sich bei dem endemischen BL im Großteil (> 95 %) der Fälle nachweisen. In diesen Gebieten stellt das BL die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter dar. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 6 Jahre, wobei Jungen doppelt so häufig betroffen sind wie Mädchen (Swerdlow et al., 2017).

Das sporadische BL ist der vorherrschende Typ in Gebieten ohne Malaria (v.a. Nordamerika und Europa) und macht dort 1-2 % aller adulten Lymphome und 30-50 % der Lymphome im Kindesalter aus. Hohe Inzidenzen des BL sind bei Kindern im Alter von 11 Jahren und bei Erwachsenen im Alter von 30 Jahren zu beobachten. Einige Forschungsarbeiten verweisen zusätzlich auf hohe Inzidenzen im sehr hohen Alter von über 70 Jahren (Mbulaiteye et al., 2010). Das Verhältnis der betroffenen Geschlechter beträgt bei Männern zu Frauen 2-3:1.



Auch in 20-30 % der sporadischen BL lässt sich eine EBV-Infektion nachweisen (Molyneux et al., 2012; Swerdlow et al., 2017).

Die dritte Variante, das Immunschwäche-assoziierte BL (auch HIV-BL), betrifft am häufigsten HIV-infizierte Patienten. Oft stellt das Auftreten des HIV-BL eines der ersten Anzeichen der HIV-induzierten Krankheit dar. Deutlich seltener manifestiert sich diese Form im Zusammenhang mit anderen immunsupprimierenden Erkrankungen (Swerdlow et al., 2017).

Die epidemiologischen Daten (siehe Abbildung 1) zeigen, dass die Inzidenz aller lymphoiden Neoplasien unabhängig von Geschlecht und Ethnie mit dem Alter kontinuierlich ansteigt. Eine entsprechende Inzidenzentwicklung ist auch für das DLBCL zu erkennen. Im Vergleich dazu zeigt das BL eine deutlich geringere Inzidenzzunahme mit steigendem Alter. Wie bereits ausgeführt, sind im Kindesalter unabhängig von der Ethnie überwiegend männliche Patienten vom BL betroffen. Erst mit steigendem Alter bei Erstdiagnose nimmt der Anteil an weiblichen Patienten mit BL zu.

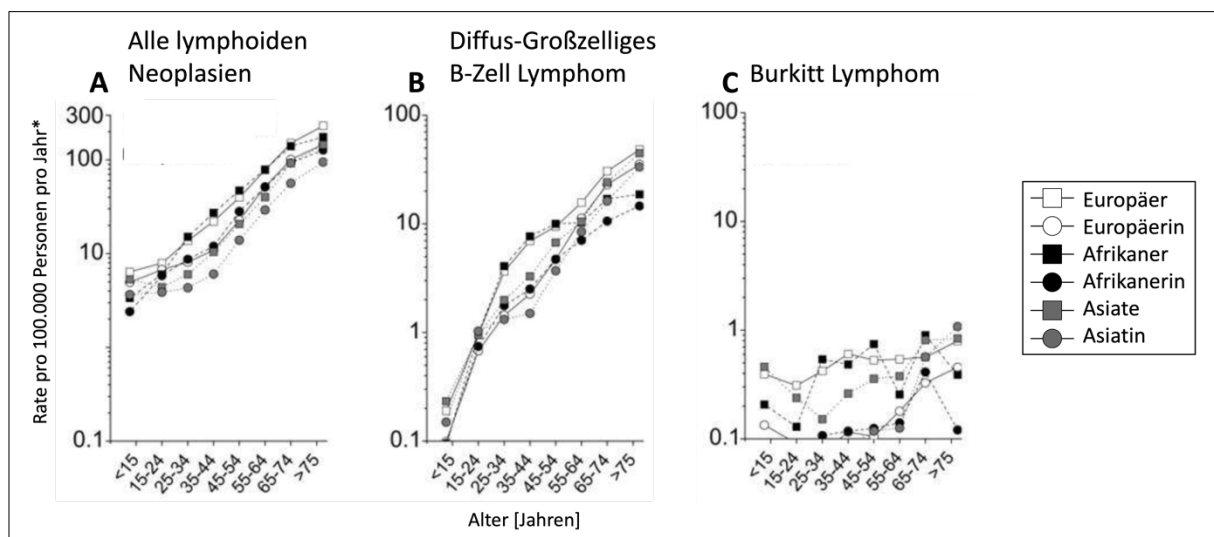


Abbildung 1: Inzidenzen lymphoplastischer Neoplasien nach Subtyp, Ethnie, Geschlecht und Alter. 12 SEER Register, 1992-2001 (Morton et al., 2006; Figure 2). \*Alle Inzidenzraten sind innerhalb der Altersgruppen auf die Bevölkerung der Vereinigten Staaten im Jahr 2000 altersadjustiert.

Die Klinik des BL variiert und ist abhängig vom jeweiligen Subtyp. Während sich das endemische BL meist im Bereich des Kiefers oder anderen Gesichtsknochen manifestiert, führt der sporadische Typ häufig zu großen Tumormassen im Bereich des Abdomens. Bei Immunschwäche-assoziierten BL sind Lymphknotenlokalisierung und Knochenmarksbeteiligung häufig (Swerdlow et al., 2017).

Das schnelle Fortschreiten der BL-Erkrankung macht den Einsatz einer aggressiven Hochdosis-Chemotherapie in der Behandlung notwendig, welche bei Kindern und jungen Erwachsenen zu einer Gesamtheilungsrate von etwa 90 % führt (Burkhardt et al., 2021; Möker et al., 2022; Woessmann et al., 2020). Bei älteren Patienten hingegen schränkt die

hohe behandlungsbedingte Toxizität die routinemäßige Anwendung von Standard-BL-Therapieansätzen ein. Dies führt insgesamt zu deutlich verminderten Überlebensraten der erwachsenen BL-Patienten im Vergleich zu den pädiatrischen BL-Patienten (Dunleavy, 2018; Minard-Colin et al., 2015).

Mikroskopisch sind monomorphe mittelgroße B-Zellen mit basophilem Zytoplasma kennzeichnend für das BL. Als charakteristisch für den Tumor erweist sich eine sehr hohe Proliferationsrate, wobei mehr als 90 % der Tumorzellen positiv für den Proliferationsmarker Ki67 sind. Dies äußert sich in vielen mitotischen Figuren sowie einer hohen Apoptose-Rate. Als morphologisches Korrelat dafür gilt das Erscheinungsbild eines „Sternenhimmels“, welches auf verstreute, apoptotische Tumorzellen enthaltene Makrophagen zurückzuführen ist (Swerdlow et al., 2017).

Das BL ist eine im Vergleich zu anderen aggressiven B-Zell NHL recht homogene Erkrankung. Die Tumorzellen, welche der B-Zelllinie entspringen, zeigen meist eine Expression von Markern der B-Zell Antigene CD20 und CD97a. Auch die Keimzentrumsmarker CD10 und BCL6 werden in der Regel exprimiert. Die neoplastischen Zellen sind meist negativ für BCL2 (Crombie und LaCasce, 2021).

Die Translokation des *MYC*-Gens, welches auf der Chromosomen-Bande 8q24 kodiert ist, neben den Immuglobulinschwerkettenloкус auf Chromosomen-Bande 14q32 (t(8;14)) gilt als molekulares Merkmal des BL und ist bei 70-80 % der Patienten nachzuweisen (Swerdlow et al., 2017). *MYC* ist ein Proto-Onkogen, das für ein Protein kodiert, welches unter anderem eine Rolle bei der Zellzyklusprogression, Apoptose und Zelltransformation spielt. Seltener Varianten dieser *MYC*-Translokation, die die Immunglobulinleichtkettenloki auf den Chromosomen-Banden 2p12 oder 22q11 involvieren, sind bei 10-15 % der Patienten vorzufinden (Molyneux et al., 2012). Diese Translokationen führen zu einer massiven Überexpression des *MYC*-Onkogens, was zu einer erheblichen Störung des normalen Genexpressionsmusters führt (Klapproth und Wirth, 2010). Zusätzlich kommt es zu Fehlern in der Montage des V(D)J-Gensegments, das für den Aufbau der Antigenbindungsstelle der B-Zell-Rezeptoren (BCR) verantwortlich ist. Somit weisen auch die Antigenrezeptorgene klonale Ig-Rearrangements und somatische Hypermutation auf (Haluska et al., 1986). Allerdings scheinen Translokationen im *MYC*-Onkogen allein nicht ausreichend für die Lymphogenese des BL zu sein, vielmehr sind weitere deregulierende Mechanismen für die Lymphom-entstehung notwendig. In umfassenden Forschungsarbeiten an pädiatrischen BL-Patienten wurden zahlreiche Gene genannt, deren Mutation mutmaßlich ebenfalls große Bedeutung für die BL-Pathogenese haben. So konnten etwa Richter et al. und López et al. die Gene *ID3*, *TCF3*, *CCND3*, *TP53*, *SMARCA4*, *FBXO11*, *DDX3X*, *RHOA* und *ARID1A* als potenzielle

Treibergene in kindlichen BL identifizieren. Als besonders relevant in diesem Zusammenhang gelten Mutationen im *ID3-TCF3-CCND3*-Signalweg (vgl. Abbildung 2) (López et al., 2019; Richter et al., 2012; Rohde et al., 2017). *ID3* (Inhibitor Of DNA Binding 3) stellt einen Regulator verschiedener Transkriptionsfaktoren dar. Durch Hemmung der Transkriptionsaktivität ist *ID3* an der Regulierung einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, darunter Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und neoplastische Transformation. *TCF3* (Transcription Factor 3) ist ein Transkriptionsfaktor, der von *ID3* gehemmt wird und eine zentrale Rolle in der Tumorgenese des BL spielt. Neben der Modulation von Genen des Keimzentrums reguliert *TCF3* auch das Überleben und die Vermehrung von Lymphoidzellen. Dies wird über den B-Zell-Rezeptor- und PI3K-Signalweg sowie von Zellzyklusregulatoren wie *CCND3* moduliert. *CCND3* (Cyclin D3), als drittes Gen der zentralen Signalkaskade, ist Teil eines Proteinkomplexes, dessen Aktivität den G<sub>1</sub>/S-Übergang während des Zellzyklus reguliert. Die t(8;14) Translokation, die im Großteil der BL zu finden ist, führt zu einer deregulierten Expression von *MYC*, was seinerseits über eine Induktion von *ID3* mit dem oben beschriebenen Signalweg verknüpft ist (Rohde et al., 2017; Swerdlow et al., 2017). Insbesondere die Arbeiten von Richter et al. und Love et al. zeigen die große Bedeutung der Kombination von IgH-*MYC*-Translokation und *ID3*-Mutation für die Pathogenese des kindlichen BL. Häufig wiederkehrende Mutationen von *ID3* in IgH-*MYC*-Translokation positiven BL führen meist zur Inaktivierung dieses Gens und lassen somit einen zu Grunde liegenden Tumor-Suppressor-Mechanismus vermuten (Schmitz et al., 2012). Verursacht werden diese Veränderungen vermutlich insbesondere durch aberrante somatische Hypermutation (Richter et al., 2012).

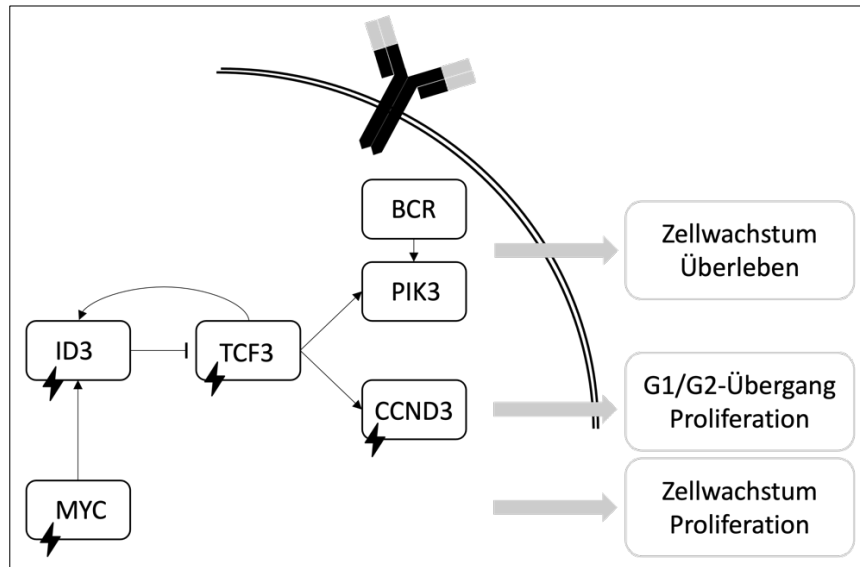


Abbildung 2: *ID3-TCF3-CCND3*-Signalweg im Burkitt Lymphom (modifiziert nach Rohde et al., 2017). Die Blitze in der Abbildung kennzeichnen die Gene, die häufig von Mutationen im BL betroffen sind. Sie wurden von Ralf Schmitzer von *Noun Project* erstellt. BCR: B-Zell-Rezeptor.

Neben Mechanismen wie der somatischen Hypermuation oder dem alternativen Splicing ist für das kindliche BL auch eine Regulierung der Genexpression durch die Modulation der DNA-Methylierung beschrieben. Im Keimzentrum von BL-B-Zellen konnte eine globale Hypomethylierung festgestellt werden. Zugleich wurde eine Zunahme der DNA-Methylierung an CpG-Dinukleotiden beobachtet, was zu einer Hochregulierung von Genen der Zell-Zyklus-Kontrolle führt. Diese massive Steigerung des Wachstums korrespondiert mit den hohen Proliferationsraten der Lymphom-Zellen. Die Überexprimierung durch Hypomethylierung konnte vor allem für *TCF3* neben den klassischen Mutationsmechanismen nachgewiesen werden (Kretzmer et al., 2015). Mehrere Studien haben gezeigt, dass pädiatrische BL eine typische genomische Signatur aufweisen, bei der insbesondere Gene des Toll-Rezeptor, JAK-STAT und MAPK-Signalweg überexprimiert sind (Klapper et al., 2008; Lee et al., 2017). An diesen Signalwegen sind mehrere Gene beteiligt, die als potenzielle Ziele für alternative Therapien bei der Behandlung des kindlichen BL dienen könnten.

Vergleichbar umfassende Arbeiten zur Pathogenese und Biologie adulter BL fehlen bislang. Es ist allerdings bekannt, dass erwachsene BL-Patienten deutlich schlechter auf Chemotherapie ansprechen als kindliche Patienten, was biologische Unterschiede zwischen pädiatrischen und adulten Lymphomen vermuten lässt (Schmitz et al., 2012).

Einige Studien konnten eine Untergruppe von BL identifizieren, die dem klassischen BL hinsichtlich Morphologie, Phänotyp und Genexpressionsprofil ähneln, jedoch keine BL-typische IgH-MYC-Translokation tragen. Stattdessen weisen diese Lymphome eine Veränderung, wie beispielsweise Telomerverluste, im langen Arm von Chromosom 11 auf (Gebauer et al.,

2021). Da die Burkitt ähnlichen Lymphome mit 11q Variante von der WHO als eigene Entität definiert wurden, die sich vom klassischen BL unterscheidet, wird in dieser Arbeit nicht weiter auf diese eingegangen (Swerdlow et al., 2017).

#### **1.4 Technische Grundlagen der Basisdiagnostik**

Die bereitgestellte Kohorte wurde bereits mittels immunhistochemischer Untersuchungen (IHC), in-situ-Hybridisierung (ISH) und Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) analysiert. Zudem wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Im Folgenden wird in Grundzügen auf die technischen Grundlagen dieser Methoden eingegangen.

Das Prinzip immunhistochemischer Färbungen beruht auf der Erkennung von auf der Oberfläche einer Zelle exprimierten Molekülen und Bindung von spezifischen Antikörpern. Es bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe, die in einem nächsten Schritt durch eine enzymatische Farbreaktion unter dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden.

Der Nachweis von EBV-Infektionen gelingt mittels EBER in-situ Hybridisierung. Beim Vorliegen latenter EBV-Infektionen werden Vorstufen der viralen Proteine EBER-1 und EBER-2 in geringer Anzahl von den infizierten Zellen exprimiert. Mit spezifischen, zu den mRNA-Sequenzen dieser Proteine komplementären DNA-Sonden kann somit der Nachweis einer EBV-Infektion erfolgen. Sonden, welche spezifisch an die mRNA der EBV-Proteine gebunden haben, werden in einer Reaktion mit enzymgekoppelten Antikörpern sichtbar gemacht.

Der Nachweis von Translokationen und Genbrüchen auf chromosomaler Ebene gelingt mit der FISH-Untersuchung. Auch hier werden Sonden genutzt, bei denen es sich um fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente handelt, welche aus der komplementären Basenabfolge des zu untersuchenden DNA-Abschnitts der Probe bestehen. Während der Präparation wird die doppelsträngige DNA der Probe in Einzelstränge denaturiert. Anschließend hybridisieren die fluoreszenz-markierten FISH-Sonden mit den DNA-Einzelsträngen der Probe. Im letzten Schritt werden die Sondenfragmente mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert und die Ergebnisse der Hybridisierungssignale interpretiert.

Mit der *nCounter* Technologie von *NanoString* (Seattle, USA) lässt sich eine expressionsbasierte Klassifizierung der Burkitt Lymphome durchführen, welche eine Differenzierung zum Diffus Großzelligen B-Zell Lymphom ermöglicht. Das Grundprinzip der *nCounter*-Analyse beruht darauf, dass genspezifische Sondenpaare in einer Lösung mit zuvor extrahierter Proben-RNA hybridisieren. Die aus einer Reporter- und einer Capture-Sonde bestehenden Sonden sind aus zur Proben-RNA homologen mRNA-Sequenzen aufgebaut. An die Capture-Sonde ist ein Biotin Molekül gebunden, welches im Verlauf die Fixierung auf einer sog. Cartridge (dt. Patrone) ermöglicht. Die Reporter-Sonde ist zusätzlich mit einem Farbcode

aus Fluoreszenzfarbstoff markiert, der nach der Hybridisierung mittels Fluoreszenzkamera detektiert wird. Aus den Formalin-fixierten in Paraffin-eingebetteten Gewebeblöcken (FFPE) isolierte Proben-RNA wird in einem Reaktionsansatz zu den Sonden gegeben. Nach der Denaturierung in Einzelstränge und der anschließenden Hybridisierung der komplementären RNA-Stränge werden die dreigliedrigen Moleküle auf eine Cartridge geladen. Es folgen Aufreinigungsschritte, bei der ungebundene Sondenmoleküle entfernt werden. Abschließend werden die Cartridges im *nCounter Digital Analyzer* ausgewertet. Dort wird jedes Zielmolekül anhand seines Fluoreszenz-Farbcodes auf der Reporter-Sonde identifiziert und gezählt.

## **1.5 Mutationsanalysen zur Charakterisierung pädiatrischer und adulter BL**

### **1.5.1 Next Generation Sequencing mit der *Illumina* Technologie**

Zur Identifizierung von genetischen Aberrationen in Patienten mit BL wurde die Technologie des *Next Generation Sequencing* (NGS) genutzt. Da die Durchführung der NGS-Analysen nicht primärer Teil dieser Arbeit war, wird im Folgenden nur in Grundzügen auf diese Technik eingegangen. Eine detaillierte Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte lässt sich in der Arbeit von Modi et al., 2021 finden.

NGS ist eine Hochdurchsatztechnologie, die eine DNA-Sequenzierung einzelner Gene, Exome oder ganzer menschlicher Genome ermöglicht. In dieser Arbeit konnten durch den Einsatz eines benutzerdefinierten NGS-Panels gezielt nur die kodierenden Bereiche ausgewählter Gene erfasst und genetische Variationen innerhalb dieser Gene erkannt werden, ohne das gesamte Genom zu analysieren. Das verwendete Panel wurde so erstellt, dass es vor allem die Gene und Mutationshotspots beinhaltet, die bekanntermaßen häufig in BL Patienten mutiert sind (Hüttl et al., 2021). Eine Variante zur gezielten Sequenzierung, die in dieser Arbeit Anwendung fand, ist die sog. Amplikon-Sequenzierung. Dabei werden ausschließlich die DNA-Regionen von Interesse durch verschiedene Arbeitsschritte von Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) amplifiziert. Zuvor ist die Erstellung einer sog. Library (dt. Bibliothek) notwendig. In verschiedenen Arbeitsschritten werden die DNA-Proben in einzelne Abschnitte fragmentiert, spezifische Indexadapter an die Fragmente angehängt und anschließend ausschließlich die Regionen von Interesse amplifiziert. Die amplifizierten DNA-Sequenzen werden nachfolgend sequenziert. Die *Illumina* Technologie verwendet hierbei die sog. Sequenzierung bei Synthese (SBS). Das bedeutet, dass die einzelnen Basen der DNA-Sequenz während des Einbaus in die wachsenden DNA-Fragmente detektiert werden. Dies geschieht mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Nukleotidbasen. Durch sich wiederholende Zyklen dieses Sequenzierprozesses entstehen am Ende die neu identifizierten Sequenzabfolgen der analysierten Regionen in Form von sog. Reads. Diese Reads sind kurze Abfolgen von Nukleotiden. Während der Sequenzierung werden jedem DNA-Fragment

individuelle „Barcode“-Sequenzen angefügt. So wird sichergestellt, dass jeder Read vor der Datenanalyse identifiziert werden und einer Patientenprobe zugeordnet werden kann.

### **1.5.2 Unterscheidung von Artefakten und realen Mutationen**

Während der DNA-Amplifikation kann es zu Artefakten kommen. Dabei handelt es sich um Sequenzveränderungen, die in der ursprünglichen DNA-Probe nicht vorhanden sind. Solche Artefakte können irrtümlicherweise als genomische Varianten erkannt werden und die Ergebnisse der Sequenzieranalyse verfälschen. Häufig resultieren PCR-Artefakte aus Fehlern der DNA-Polymerase (Peng et al., 2015). Ebenfalls sind Artefakte auf die mangelnde DNA-Qualität der Gewebeproben durch die Paraffinierung zurückzuführen. Auch das Vorhandensein von kurzen Insertionen und Deletionen kann zu einer falsch-positiven Identifizierung von Einzelnukleotid-Varianten (Single Nucleotide Variants, SNV) führen und so den Variantennachweis beeinträchtigen. Das Filtern nach Qualitätsparametern wie der Coverage (dt. Abdeckungsrate) oder Variant Allel Frequency (VAF) hilft einen Großteil fehlerhafter Varianten aus der Analyse auszuschließen. Die VAF ist der Prozentsatz der beobachteten Sequenzlesungen, die mit einer bestimmten DNA-Variante übereinstimmen, geteilt durch die Gesamtabdeckung an diesem Bereich (Strom, 2016). Auch die manuelle Inspektion der einzelnen Reads mit einem Visualisierungsprogramm kann bei der Einschätzung helfen, ob es sich bei einer detektierten Variante um einen richtig- oder falsch-positiven Variantenbefund handelt. Dazu sind auch die Basen in der unmittelbaren Umgebung der detektierten Aberration von Bedeutung. Zahlreiche Varianten im Bereich um eine Aberration, GC-Reichtum oder teilweise nicht sequenzierte Reads bzw. Lücken in den Reads weisen stark auf ein Artefakt hin.

### **1.5.3 Bioinformatische Analyse von Sequenzierdaten**

Die Ergebnisse der Sequenzierung werden in Form von FASTQ-Dateien zur Verfügung gestellt. Diese Dateien enthalten nur die Sequenzabfolgen der analysierten Regionen, die zuvor mit dem Panel ausgewählt wurden. Zusätzlich beinhalten sie auch Qualitätsangaben zu den einzelnen Reads. Durch das Software-Modul *SEQNEXT* (JSI medical systems GmbH, Ettenheim, Deutschland) können die Sequenzierdaten analysiert und ausgewertet werden. Als erstes erfolgt ein Vergleich der Sequenzierdaten mit Referenz-Regionen, die sich aus der Gesamtheit der analysierten genetischen Abschnitte ergeben. Mittels des Vergleiches von Referenz-Region und detektierter Sequenz werden Positionen identifiziert, die von der Referenzsequenz abweichen. Anschließend folgt eine Annotation dieser vom Referenzgenom abweichenden Varianten. Bei der Annotation werden bekannte Informationen über jede entdeckte Variante abgefragt. Dieser Vergleich kann beispielsweise zeigen, ob eine Variante bereits mit einer bestimmten Krankheit in Verbindung gebracht wird.

Andererseits kann so auch nachgewiesen werden, dass eine Variante einen gutartigen Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. Single nucleotide polymorphism, SNP) ohne Krankheitswert darstellt, der mit hoher Frequenz in der Bevölkerung vorhanden ist. Zur Annotation werden zahlreiche kostenlose und öffentlich zugängliche Datenbanken herangezogen, auf die im nachfolgenden Abschnitt näher eingegangen wird. Auch der Einsatz von Programmen zur Variantenprediktion ist, insbesondere bei Varianten, zu denen bisher keine Informationen aus anderen Datenbanken bekannt sind, ein wichtiger Bestandteil der Analyse (siehe Abschnitt 1.5.4). Die Variantenprediktion kann dabei helfen zu entscheiden, ob eine Variante tatsächlich eine mit dem Tumor assoziierte somatische Veränderung darstellt, oder ob es sich um eine Keimbahnveränderung handelt, die keine tumorinduzierende bzw. proteinverändernde Wirkung hat und unabhängig von der Tumorerkrankung vorliegt. Zusätzlich warnt das Programm *SEQNXT* bei geringer Qualität, geringer Abdeckung, fehlendem Base-Calling oder Dropouts und liefert eine detaillierte Zusammenfassung über Coverage und Qualität. Des Weiteren ist es innerhalb des Programms möglich, die einzelnen sequenzierten Reads auf der Ebene einzelner Basenpaare visuell zu betrachten. Somit kann für jede detektierte Variante zusätzlich individuell entschieden werden, ob es sich um ein Artefakt oder eine reale Mutation handeln könnte.

#### **1.5.4 Datenbanken und Variantenprediktion**

Das menschliche Genom ist bereits umfassend analysiert und es existieren zahlreiche Datenbanken, die Informationen zu bekannten Varianten beinhalten. Häufig sind weit verbreitete Datenbanken schon mit Annotationsprogrammen verknüpft und der Abgleich zwischen Datenbank und detektierten Varianten geschieht automatisch. *COSMIC* (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) ist die weltweit größte Datenbank zur Erforschung der Auswirkungen von somatischen Mutationen auf verschiedene Tumorerkrankungen. Sie beinhaltet bereits in Forschungsarbeiten publizierte und aus der Literatur zusammengefasste Mutationsdaten zu bekannten Tumorgenen. Zusätzlich enthält sie Daten, die durch Re-sequenzierungen des Genoms von Tumorproben aus anderen Studien generiert wurden. Mittlerweile umfasst diese Datenbank annähernd sechs Millionen Mutationen in kodierenden Regionen, die über eine individuelle Kennung identifiziert werden können (Tate et al., 2019). Eine andere Datenbank wurde im Zeitraum von 2008 bis 2015 im Rahmen des *1000 Genomes Project* erstellt. Bei diesem Projekt wurde das Genom von 2504 Individuen aus 26 Populationen sequenziert. Ziel war es, gutartige genetische Varianten zu identifizieren, die mit einer Frequenz von mindestens einem Prozent in der Bevölkerung vorlagen (Birney und Soranzo, 2015). Die Datenbank *dbSNP* (Single Nucleotide Polymorphism database) ist ein öffentlich zugängliches Archiv für genetische Polymorphismen. Diese Zusammenstellung von Polymorphismen umfasst Einzelnukleotid-Polymorphismen, kleine Deletionen oder



Insertionen sowie Insertionen von retropositiven Elementen und Mikrosatelliten-Repeat-Variationen (auch als Short Tandem Repeats oder STRs bezeichnet). Jeder dbSNP-Eintrag enthält die umgebende Sequenz des Polymorphismus sowie die Häufigkeit des Auftretens des Polymorphismus (nach Population oder Individuum) (Kitts und Sherry, 2011). Auch *gnomAD* (Genome Aggregation Database; ehemals *ExAC*, Exome Aggregation Consortium) ist eine Datenbank, die Informationen über bekannte Einzelnukleotid-Polymorphismen enthält. Sie wurde durch die umfangreiche Genom- und Exomsequenzierung von Individuen verschiedener Populationen generiert (Gudmundsson et al., 2022). *ClinVar* ist ein frei verfügbares Archiv von Daten, in dem genetische Varianten mit einem dazugehörigen Phänotyp verknüpft werden. So kann der Zusammenhang zwischen einer Variante und einer Krankheit oder anderen Merkmalen festgestellt werden. Das Analyseprogramm *SEQNEX*T hat die aktuellsten Versionen der oben genannten Datenbanken integriert und führt den Variantenabgleich automatisiert durch.

Eine Datenbank, die Informationen aus den oben genannten Quellen vereint und zusätzlich eine Genomvisualisierung ermöglicht, ist der *UCSC Genome Browser*. Diese webbasierte Plattform kombiniert die visuelle Betrachtung eines Genabschnitts auf der Ebene von Basenpaaren mit der Annotation verschiedener Varianten an exakt dieser Position, wie in Abbildung 3 dargestellt (Navarro Gonzalez et al., 2021).

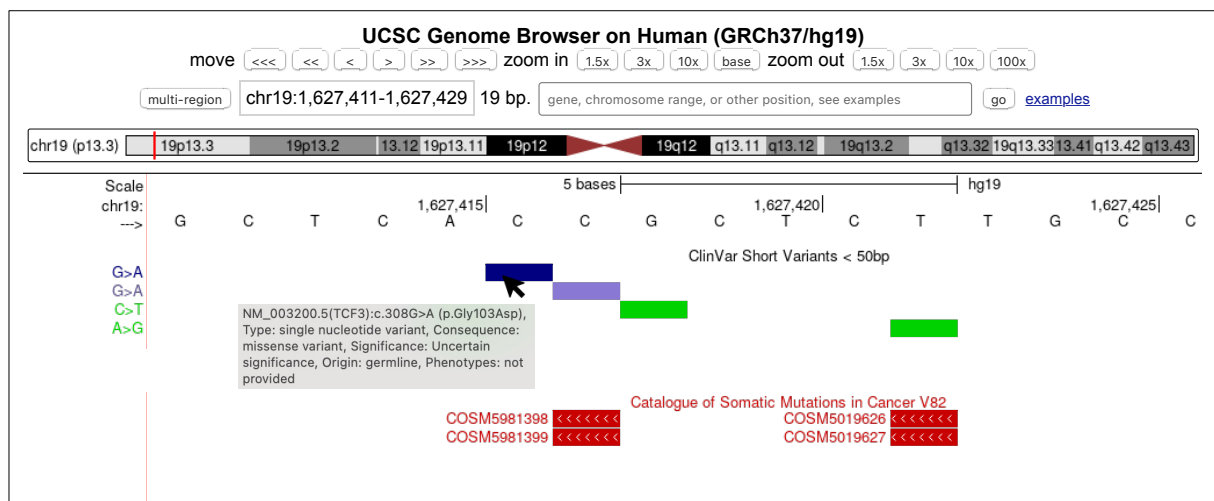


Abbildung 3: Modifizierter Ausschnitt des Internettools *UCSC Genome Browser* (modifiziert nach <https://genome.ucsc.edu>): Dargestellt ist ein Basenabschnitt des *TCF3*-Gens auf Chromosom 19. Darunter dargestellt sind genetische Varianten dieses Abschnitts aus der *ClinVar*-Datenbank. Beispielhaft ist mit dem Mauszeiger die zugehörige Information zu einer Position dargestellt. Darunter aufgelistet befinden sich *COSMIC*-Einträge zu den jeweiligen Positionen.

Der *Variant Effect Predictor* von *Ensembl*© (VEP; <https://www.ensembl.org/Tools/VEP>) ist ein Onlineprogramm das eine Vorhersage ermöglicht, ob eine Variante einen gutartigen oder schädigenden bzw. proteinverändernden Effekt auf das aus der jeweiligen Sequenz ent-

stehende Protein hat. Es gibt verschiedene Formate, in denen die detektierte Variante in das Programm geladen werden kann. Eine mögliche Option ist die HGVS Nomenklatur. Diese Form der Variantenkenennung setzt sich aus zwei Teilen zusammen, die durch einen Doppelpunkt getrennt werden: der Kennung der Referenzsequenzdatei und der tatsächlichen Beschreibung der Variante (z.B. NM\_005026.3:c.2546C>T). Der Präfix NM beschreibt, dass die Referenzsequenz auf einer proteinkodierenden DNA-Sequenz basiert. Bezogen auf das oben genannte Beispiel beschreibt „NM\_005026“ die Eingangsnummer der Referenzsequenz und „.3“ die Version. Der Abschnitt „c.2546C>T“ bedeutet, dass an der Basenposition 2546 eine Thiaminbase statt einer Cytosinbase detektiert wurde. Die Nummerierung startet bei Position 1 mit der Adeninbase des Startcodons ATG und endet mit der letzten Position des Translationsstoppcodons.

Das Programm interpretiert die Effekte der detektierten Varianten mit Hilfe von *SIFT*- und *PolyPhen*-Werten, sowie dem vom VEP bereitgestellten *IMPACT*. *PolyPhen* steht für „Polymorphism Phenotyping“ und ist ein Wert, der die möglichen Auswirkungen einer Aminosäuresubstitution auf die Struktur und Funktion eines Proteins vorhersagt. Der Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit welcher eine Substitution schädigend bzw. proteinverändernd ist. Er reicht von 0,0 (gutartig) bis 1,0 (schädigend). Varianten mit einer Punktzahl von 0,0 werden als gutartig eingestuft, Werte, die näher an 1,0 liegen, werden mit größerer Sicherheit als schädlich eingestuft. Ähnlich wie der *PolyPhen*-Wert, sagt auch der *SIFT*-Wert (Sorting Intolerant from Tolerant) voraus, ob eine Aminosäuresubstitution die Proteinfunktion beeinträchtigt, allerdings ist die Bedeutung von *PolyPhen* und *SIFT* je nach Wert entgegengesetzt. Eine Variante mit einem *SIFT*-Wert von 1,0 wird als gutartig eingestuft, wohingegen Varianten, deren Werte näher bei 0,0 liegen, mit größerer Sicherheit als schädigend eingestuft werden. Für diese Arbeit wurden die im originalen *PolyPhen*- und *SIFT*-Wert verwendeten englischen Begriffe (*PolyPhen*: benign, damaging; *SIFT*: tolerated, deleterious) vereinheitlichend durch die deutschen Begriffe „gutartig“ und „schädigend“ zur Beschreibung der Auswirkung einer Variante auf die Proteinsequenz ersetzt. Eine Übersicht über die Werteeinteilung und Cut-off Werte von *PolyPhen* und *SIFT* gibt Abbildung 4.

Die *IMPACT*-Einteilung ist eine subjektive Einstufung des Schweregrads des Effekts der Variante, basierend auf der Übereinstimmung mit *SNPEff* (Toolbox zur Annotation genetischer Varianten und zur Vorhersage funktioneller Effekte). Zusätzlich sind in das Programm die Softwarekomponenten *FATHMM* (liefert Vorhersagen für Missense-Varianten), *CONDEL* (prüft die Übereinstimmung von *PolyPhen*- und *SIFT*-Wert) und *CLIN\_SIG* (bestimmt die klinische Relevanz einer *dbSNP* Variante) integriert, die ebenfalls als Pathogenitätsvorhersagen den *IMPACT*-Wert beeinflussen. Bei der *IMPACT*-Einteilung lassen sich insgesamt vier Kategorien differenzieren: „Modifier impact variant consequence“, „Low impact variant consequence“, „Moderate impact variant consequence“ und „High impact

variant consequence". In die beiden erstgenannten Kategorien fallen nicht-kodierende Varianten oder Aberrationen, von denen man annimmt, dass sie größtenteils harmlos sind oder die Funktion des Proteins nicht verändert wird. Die beiden letztgenannten Kategorien (Moderate und High impact) beschreiben vor allem nicht-disruptive Varianten, die die Wirksamkeit des Proteins verändern könnten, sowie Varianten, bei denen davon ausgegangen wird, dass sie Auswirkungen auf das Protein haben, die wahrscheinlich zu einer Verkürzung des Proteins, einem Funktionsverlust oder zur Auslösung von Nonsense-vermittelten Defekten führen.

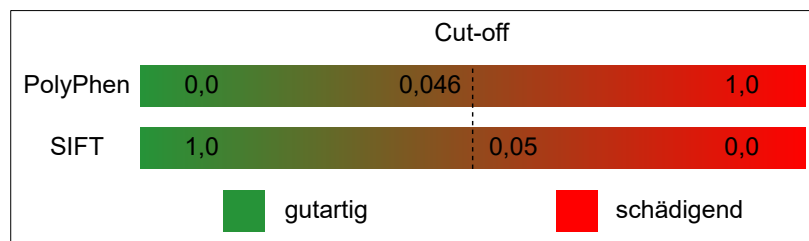


Abbildung 4: Einteilung der *PolyPhen*- und *SIFT*-Werte bezüglich ihrer Auswirkung auf das entstehende Protein. Gutartige Wertbereiche sind grün dargestellt, schädigende Wertbereiche sind rot dargestellt. *PolyPhen*: Der VEP zählt alle Werte  $\leq 0,046$  als gutartig, alle Werte darüber als schädigend für die entstehende Proteinsequenz. *SIFT*: Im VEP werden alle Werte, die unter 0,05 liegen, als schädigend eingestuft, Werte  $\geq 0,05$  als gutartig.

## **2 Zielsetzung und Fragestellung**

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt ist das BL eine im Kindesalter sehr umfassend charakterisierte Tumorerkrankung, bei der die aktuell eingesetzten Therapie-Regimen zu sehr hohen Heilungsraten führen. Im Gegensatz dazu ist die Biologie des adulten BL noch in weiten Teilen ungeklärt und gezielte Therapieansätze fehlen bislang, was zu deutlich geringeren Heilungsraten mit zunehmendem Alter der Patienten führt.

Das Ziel dieser Arbeit ist die ausführliche molekulare Charakterisierung einer großen, altersübergreifenden Kohorte von Patienten mit einem BL. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zu einem besseren Verständnis der Tumorbilogie und -pathologie beitragen und so die Entwicklung gezielter Therapieregime für Erwachsene Patienten unterstützen.

Die vorliegende Arbeit soll daher die folgenden Fragen beantworten:

- Sind bereits bekannt heterogen exprimierte Marker wie BCL2, SOX11, MUM1 mit dem Alter assoziiert?
- Gibt es eine Korrelation zwischen dem Alter und dem Auftreten von genetischen Aberrationen in Genen, die bekanntermaßen bei BL mutiert sind?

### **3 Material und Methoden**

Im folgenden Teil werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien sowie die angewendeten Methoden erläutert. Dabei liegt der Fokus auf der Beschreibung der spezifischen Materialien und Methoden. Allgemein gängige, grundsätzliche Laborprozesse werden nicht separat ausgeführt.

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Auswahl des Patientenkollektivs für altersassoziierte Analysen an adulten Burkitt Lymphomen**

Für diese Arbeit lag eine Gesamtzahl von 219 Biopsien von Lymphknoten mit der Diagnose sporadisches Burkitt Lymphom aus dem Zeitraum von 2001 bis 2017 vor. Bei den Tumormaterialien handelt es sich um die nach der Diagnosestellung übrig gebliebenen Materialien der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (UKSH). Diese Materialien dürfen basierend auf dem Ethikvotum der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Ethikvotum: D 477/10) gemäß den vorgegebenen Empfehlungen für die wissenschaftliche Nutzung von Gewebeproben verwendet werden. Die Patienten-identifizierenden Daten wurden pseudonymisiert und ausschließlich innerhalb des gesicherten Datennetzes der Universität Kiel gespeichert.

Weitere Gewebeproben wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie der Universität Würzburg, Leitung Prof. Andreas Rosenwald ( $n=5$ ) sowie dem Pathologischen Institut des Klinikums Stuttgart, Leitung Prof. German Ott ( $n=8$ ) bereitgestellt.

Für die Analysen im Rahmen dieser Dissertation stand ausschließlich Tumormaterial in Form von Formalin-fixierten in Paraffin-eingebetteten Gewebeproben zur Verfügung.

Die Diagnosestellung wurde bei allen Patienten basierend auf den Kriterien der aktuellen WHO-Klassifikation von 2017 durch Prof. Dr. Klapper (Leiter der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister des Pathologischen Instituts des UKSH, Campus Kiel) verifiziert (Swerdlow et al., 2017). Als Einschlusskriterium für diese Studie galt die verifizierte Diagnose eines sporadischen Burkitt Lymphoms, Vorhandensein von ausreichend Tumormaterial für die anschließenden molekulargenetischen Analysen und die Altersangabe bei Diagnosestellung. Um eine möglichst homogene Patienten-Kohorte, bestehend aus ausschließlich BL-Patientenproben, ohne mögliche Grenzfälle zu Patienten mit einem DLBCL oder HGBL zu erstellen, wurden Patientenproben mit einem Bruchereignis in den Genabschnitten von *BCL2* (Chromosom 18) und oder *BCL6* (Chromosom 3) ausgeschlossen. Ebenso wurden Patientenproben, bei denen die Diagnose eines Burkitt-ähnlichen Lymphoms mit chromosomalen Veränderungen in 11q gestellt wurde ausgeschlossen. Darüber hinaus wurden alle Patienten ausgeschlossen, bei denen eine HIV-Infektion nachgewiesen wurde. Der Alters-

grenzwert für die Kohorteneinteilung wurde auf 18 Jahre festgelegt. Alle Patienten, die bei Erstdiagnose des BL  $\leq 18$  Jahre alt waren, wurden den Kindern zugeordnet. Waren Patienten bei Erstdiagnose  $> 18$  Jahre alt, waren sie der erwachsenen Gruppe zugehörig. Nach Überprüfung des Patientenkollektivs entsprechend den oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien, verblieb eine Kohorte von insgesamt 162 Patienten für die weiteren Analysen.

Klinische Daten, wie solche zum Stadium der Erkrankung, zur Therapie, Prognose oder zu Begleiterkrankungen lagen uns insbesondere zu den erwachsenen Patienten nicht vor. Ein Teil der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten kindlichen Lymphomproben sind Teil der deutschen klinischen NHL-BFM-Studiengruppe. Da der Fokus dieser Arbeit aber explizit auf der molekulargenetischen Analyse der erwachsenen Patienten lag, wurden klinische Daten nicht einbezogen.

### **3.1.2 Genpanel der Mutationsanalyse**

Es wurde von insgesamt 91 Patienten (24 Kinder, 67 Erwachsene) eine Mutationsanalyse durchgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet wurde. Zusätzlich wurden 10 Patientenproben von Lymphknoten ohne maligne Veränderung sequenziert. Die Mutationsanalyse wurde mittels eines *AmpliSeq Custom* DNA Panels von *Illumina* durchgeführt. Dieses bereits in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klapper etablierte Panel beinhaltet 36 Gene oder Mutationshotspots, die bereits bekannt sind, gehäuft in B-Zell-Lymphomen (BL, DLBCL) von Mutationen betroffen zu sein. Es wird also nicht das gesamte Genom sequenziert, sondern nur die zuvor ausgewählten spezifischen Genabschnitte. Diese dienen in ihrer Gesamtheit in der weiteren Auswertung als Referenzsequenz. Tabelle 2 gibt einen detaillierten Überblick über die analysierten Regionen.

Tabelle 2: Mit dem *Ampliseq Panel* analysierte Regionen. \*: Kodierende und intronische Grenzen; E: Exon; CDS: Kodierende Sequenz.

Gen	Ref-Seq	Analysierte Region*	Gen	Ref-Seq	Analysierte Region*
<i>ARID1A</i>	NM_006015, NM_139135	CDS	<i>MEF2B</i>	NM_001145785	CDS
<i>CARD11</i>	NM_NM032415	CDS	<i>MYC</i>	NM_002467	CDS
<i>CCND3</i>	NM_001287427, NM_001760	CDS	<i>MYD88</i>	NM_001172567	L265
<i>CD79B</i>	NM_000626	CDS	<i>NOTCH1</i>	NM_017617	E25-E34
<i>CREBBP</i>	NM_004380	CDS	<i>NOTCH2</i>	NM_024408	E32-E34
<i>CXCR4</i>	NM_002467	CDS	<i>PIK3CD</i>	NM_001350234	CDS
<i>EP300</i>	NM_001429	CDS	<i>PIM1</i>	NM_001243186	CDS
<i>EZH2</i>	NM_001203247	E4, E14, E16	<i>PRDM1</i>	NM_001198, NM_182907	CDS
<i>FADD</i>	NM_003824	CDS	<i>PTEN</i>	NM_001304717	CDS
<i>FASLG</i>	NM_002015	CDS	<i>PTPRD</i>	NM_002839	E30-E35
<i>FOXO1</i>	NM_001349339	CDS	<i>RHOA</i>	NM_001664	CDS
<i>GNA13</i>	NM_006572	CDS	<i>SF3B1</i>	NM_001005526, NM_012433	E14-E18
<i>ID3</i>	NM_002167	CDS	<i>SOCS1</i>	NM_003745	CDS
<i>IRF4</i>	NM_001195286, NM_002460	CDS	<i>TBL1XR1</i>	NM_024665	E9-E12
<i>IRF8</i>	NM_002163	E1, E2, E7, E8	<i>TCF3</i>	NM_001136139, NM_003200	CDS
<i>KMT2C</i>	NM_170606	CDS	<i>TNFAIP3</i>	NM_001270507, NM_001270508, NM_006290	CDS
<i>KMT2D</i>	NM_003482	CDS	<i>TNFRSF14</i>	NM_001270949, NM_001270950, NM_001270951, NM_003839	CDS
<i>MAP2K1</i>	NM_002755	E1-E6	<i>TP53</i>	NM_000546, NM_001126112, NM_001126113, NM_001126114, NM_001126115, NM_001126116, NM_001126117, NM_001126118	CDS

### 3.1.3 Geräte

Eine Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Geräte sowie ihrer Hersteller kann Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Geräte, die für die IHC und ISH, Genexpressionsanalyse und Mutationsanalyse verwendet wurden.

Gerät	Hersteller
Automated Epifluorescent Scanner (Serie: nCounter Prep Station 5s)	NanoString, Seattle, USA
BOND-MAX Färbeautomat	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Liquid Handling Robot	NanoString, Seattle, USA
NovaSeq SP (2x150 bp)	Illumina, San Diego, USA

## 3.2 Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die verschiedenen Methoden erläutert, welche in dieser Arbeit angewendet wurden. Für diese Arbeit wurde eine bereits umfassend analysierte Patientenkohorte zur Verfügung gestellt. Der Fokus der Arbeit lag auf der Auswertung der bereitgestellten Daten, weswegen auf die zuvor durchgeführten Analysen nur in Grundzügen eingegangen wird.

### 3.2.1 Basisdiagnostik

#### Immunhistochemie, EBER in-situ Hybridisierung und Fluoreszenz in-situ Hybridisierung

Die für diese Arbeit bereit gestellte Kohorte war bereits mittels immunhistochemischer Färbungen (IHC), EBER-in-situ Hybridisierungen (ISH) und Fluoreszenz in-situ-Hybridisierungen (FISH) weitestgehend charakterisiert. Es wurden spezifische Antikörper, die gegen die Moleküle CD10, CD20, *BCL2*, *SOX11* und MUM1 gerichtet sind, verwendet. Die Auflistung der verwendeten Antikörper und ISH Sonde sowie ihrer Hersteller kann Tabelle 4 und Tabelle 5 entnommen werden. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen und der EBER-in-situ Hybridisierung erfolgte mit einem automatisierten Färbe-gerät unter Verwendung der vom Lieferanten empfohlenen Protokolle.

Zum Nachweis einer IgH-MYC-Translokation und Brüchen in den Genabschnitten von *BCL2* und *BCL6* wurde eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durchgeführt, wobei spezifische Break-Apart- und/oder Dual-Color-Dual-Fusion-Sonden mit den jeweils beiliegenden Protokollen verwendet wurden (siehe Tabelle 5).



Tabelle 4: Antikörper, die für die Charakterisierung der Kohorte mittels Immunhistochemie verwendet wurden und die zugehörigen Hersteller.

Antikörper (Klon)	Hersteller
BCL2 (100/D5)	Diagnostic BioSystems Inc., Pleasanton, USA
BCL2 (E17)	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
CD10 (56C6)	NovoCastra, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
CD20 (L26)	Dako, Glostrup, Dänemark
MUM1 (MUM1P)	Dako, Glostrup, Dänemark
SOX11 (MRQ-58)	CellMarque, Rocklin, USA

Tabelle 5: Sonden, die für die Charakterisierung der Kohorte mittels FISH und die EBER in-situ Hybridisierung verwendet wurden und die zugehörigen Hersteller.

Sonden	Hersteller
EBER-ISH, PB0589	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
BCL2	Abbott, Abbott Park, Illinois, USA Zytovision, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland
BCL6	Abbott, Abbott Park, Illinois, USA Zytovision, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland
IgH/MYC	Abbott, Abbott Park, Illinois, USA Zytovision, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland
MYC	Abbott, Abbott Park, Illinois, USA Zytovision, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland

### 3.2.2 DNA- und RNA-Extraktion

Die genomische DNA (gDNA) und RNA wurden aus den Tumor FFPE-Gewebeproben extrahiert. Hierfür verwendete Kits sind Tabelle 6 zu entnehmen. Die Durchführung der DNA- bzw. RNA Extraktion erfolgte mit wenigen Anpassungen entsprechend den beiliegenden Protokollen der Hersteller.

Tabelle 6: Kits, die bei der DNA- und RNA-Extraktion aus den FFPE-Materialblöcken und Probenaufbereitung für die Sequenzierung verwendet wurden.

Kits	Hersteller
AllPrep DNA/RNA FFPE Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
ExpressArt FFPE Clear RNAREady Kit	AmpTec, Hamburg, Deutschland
GeneRead DNA FFPE Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qubit™ dsDNA HS Assay-Kits	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

### 3.2.3 Genexpressionsanalyse mit dem nCounter von NanoString

Für diese Arbeit wurde im Vorfeld eine Genexpressionsanalyse von 62 Patienten mit der *nCounter* Technologie von *NanoString* (Seattle, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden für die Arbeit bereitgestellt. Dazu wurde ein *Custom Panel* mit dem entsprechenden *XT Assay* Protokoll verwendet. Ausgewertet wurde die Genexpressionsanalyse wie in dem Manuskript von Masqué-Soler et al. beschrieben (Masqué-Soler et al., 2013). Anhand der Genexpression von insgesamt 30 Genen wurden die Burkitt Lymphome einer der beiden Subgruppen „molekular definiertes Burkitt Lymphom“ (mBL) oder „nicht molekular definiertes Burkitt Lymphom“ (non-mBL) bzw. DLBCL zugeordnet. Dabei handelt es sich nicht um zwei klar getrennte Entitäten, sondern um einen mittels Cut-off definierten Bereich, der Extremgruppen abgrenzt. Zusätzlich umfasst dieser Bereich eine Graugruppe von Lymphomen, die zwischen den Extremgruppen liegen und sowohl Merkmale von BL als auch DLBCL aufweisen und daher als „intermediate“ bezeichnet wurden.

### 3.2.4 Mutationsanalysen

#### Bibliothekserstellung und Sequenzierung

Die DNA-Proben wurden durch die Erstellung einer sog. Bibliothek für die nachfolgende Sequenzierung vorbereitet. In einem ersten Multiplex-PCR-Ansatz wurden gezielt die DNA-Regionen von Interesse amplifiziert. Anschließend wurden die einzelnen DNA-Fragmente durch Legierung von Index-Adaptoren zur individuellen Identifizierung markiert. In einem zweiten Amplifikationsschritt wurden abschließend die Bibliotheken amplifiziert, um eine ausreichende Menge für die Sequenzierung zu gewährleisten. Die zur Bibliothekserstellung verwendeten Kits sind in Tabelle 7 aufgelistet und wurden mit den vom Hersteller empfohlenen Reagenzien entsprechend dem Protokoll im Referenzhandbuch „AmpliSeq for Illumina On-Demand, Custom and Community Panels“ von November 2019 von *Illumina* verwendet.

Tabelle 7: Kits, die zur Bibliotheksvorbereitung mit dem Genpanel verwendet wurden.

Kit	Hersteller
AmpliSeq Custom DNA Panel (Three Primer Pools)	Illumina, San Diego, USA
AmpliSeq Library PLUS kit	Illumina, San Diego, USA
AmpliSeq CD Indexes Set	Illumina, San Diego, USA

Die anschließenden Sequenzierungen der Patientenproben wurden am IKMB (Institut für Klinische Molekularbiologie, UKSH, Campus Kiel) durchgeführt und in Form von FASTQ-Dateien zur Verfügung gestellt.

## Software-Analyse der NGS-Daten

Zur Auswertung der Sequenzierdaten wurde das Programm *SEQNEXT* (JSI medical systems®, Ettenheim, Deutschland) verwendet. Dazu wurden die vom IKMB generierten FASTQ-Dateien der Sequenzierung in das Programm geladen. Jedem Patienten wird eine eigene FASTQ-Datei zugeordnet, die vom Programm als solche erkannt und mit einer individuellen Identifizierungsnummer gekennzeichnet wird. Somit ist die parallele Analyse einer Vielzahl von Patientenproben möglich. Das Programm vergleicht die Basenabfolgen aus den sequenzierten Reads mit der Referenzsequenz, also der Gesamtheit aller sequenzierten Regionen. Aus dem Vergleich der beiden Datensätze detektiert *SEQNEXT* unterschiedliche Genvarianten wie Deletionen, Insertionen oder SNP. Dazu hat das Programm Zugriff auf die aktuellsten Versionen der folgenden öffentlichen Datenbanken: *dbSNP*, *1000genomes*, *COSMIC*, *ClinVar*, *ClinVita*, *ExAC*, *genomAD*.

Zusätzlich überprüft das Programm, ob detektierte Varianten aus der BL-Patienten-DNA auch in den Kontrolllymphknoten auftreten. Varianten, die gleichzeitig in BL-Patienten und gesunden Lymphknoten vorkommen, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht an der Pathogenese des BL beteiligt.

Die mittels *SEQNEXT* detektierten Varianten wurden zudem mit dem *Variant Effect Predictor* von *Ensembl*® (VEP; <https://www.ensembl.org/Tools/VEP>) analysiert. Dazu wurden die detektierten Varianten im Format der HGVS Nomenklatur in das Onlinetool geladen (siehe Abschnitt 1.5.4.). Diese Nomenklatur wird von dem Programm *SEQNEXT* zu jeder detektierten Variante angegeben. Die in das Programm VEP geladenen Mutationen wurden klassifiziert und zu jeder Variante wurden Vorhersagen bezüglich ihrer Pathogenität und ihres proteinverändernden Effekts geliefert.

## Auswertung der Mutationsanalysen

Um die Vorhersagen des VEP zu vereinheitlichen und besser auswerten zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Einteilung der Ergebnisse des VEP entwickelt (siehe Tabelle 8). Wurde für eine Variante ein laut *PolyPhen* oder *SIFT*-Wert schädigender Effekt vorhergesagt, wurde sie unabhängig von ihrem *IMPACT*-Wert in dieser Arbeit als „damaging“ (schädigend/proteinverändernd) bezeichnet. Fehlten zu einer Variante die *PolyPhen*- und *SIFT*-Werte, wurde sie entsprechend ihrer *IMPACT*-Vorhersage als „high\_impact“ (hoher Einfluss/Wirkung) oder „moderate-NA“ (moderater Einfluss/Wirkung) bezeichnet. Bei einem moderaten Einfluss laut *IMPACT*-Vorhersage aber widersprüchlichen *PolyPhen*- und *SIFT*-Werten, wurden die Varianten als „moderate-mixed“ bezeichnet. Alle verbliebenen Varianten, für die beim *PolyPhen*- oder *SIFT*-Wert ein gutartiger Effekt vorhergesagt wurde oder ein niedriger Einfluss laut *IMPACT*-Wert, wurden in dieser Einteilung nicht berücksichtigt und im Verlauf aus der Analyse ausgeschlossen (siehe unten). Diese neue Einteilung wurde in der

weiteren Analyse genutzt, um identifizierte Varianten nach ihrem potenziellen Effekt betrachten zu können.

Tabelle 8: Neu entwickeltes Klassifizierungssystem basierend auf den Vorhersagen des *Variant Effect Predictors*.

Neue Bezeichnung	Einträge im <i>Variant Effect Predictor</i>	
damaging	<i>PolyPhen</i> : schädigend <i>SIFT</i> : schädigend <i>IMPACT</i> : hoher/moderater Einfluss	
high_impact	kein <i>PolyPhen/SIFT</i> Eintrag <i>IMPACT</i> : hoher Einfluss	
moderate_mixed	<i>PolyPhen</i> : schädigend <i>SIFT</i> : gutartig <i>IMPACT</i> : moderater Einfluss	<i>SIFT</i> : schädigend <i>PolyPhen</i> : gutartig <i>IMPACT</i> : moderater Einfluss
moderate_NA	kein <i>PolyPhen/SIFT</i> Eintrag <i>IMPACT</i> : moderater Einfluss	

Neben realen Mutationen, die im Rahmen der Pathogenese des BL entstanden sind, liefern die *SEQNEXT*-Analysen noch weitere genomische Varianten, bei denen es sich häufig um SNP oder Artefakte handelt. Die Ergebnis-Dateien des Annotationsprogramms *SEQNEXT* sind als Text-Datei exportierbar und wurden zur weiteren Filterung der Varianten in Excel geladen. Zur Beurteilung der Qualität einzelner Reads einer detektierten Variante, wurde der Coverage-Wert in Prozent (dt. Abdeckungsgrad) herangezogen. Der Coverage-Wert beschreibt die durchschnittliche Anzahl der Reads (sequenziert bei einer bestimmten Sequenziertiefe), die an bekannten Referenzbasen ausgerichtet sind oder diese "abdecken". Der Abdeckungsgrad der Sequenzierung bestimmt, ob die Entdeckung von Varianten an bestimmten Basenpositionen mit einem gewissen Grad an Sicherheit möglich ist.

Zur Identifizierung jener Varianten, die vermutlich ursächlich für die Pathogenese des BL sind, wurden sie gefiltert. Ziel der Filterung war es SNP, Artefakte und nicht protein-verändernde Mutationen aus der weiteren Analyse auszuschließen. Eine Veränderung wurde nur dann in die weitere Analyse eingeschlossen, wenn sie die folgenden Kriterien erfüllte:

- Coverage  $\geq 15$  %.
- Protein-verändernde Mutation (frameshift, inframe deletion, inframe insertion, missense, splice acceptor, splice donor, splice region, stop gained).
- Kein SNP (SNP: Mutationsfrequenz laut der verwendeten SNP-Datenbanken  $\geq 1$  % in der NFE-Bevölkerung (Non-Finnish European, dt. nicht-finnische Europäer)).
- Nicht in den Kontrolllymphknoten vorhanden.

Zusätzlich wurden Varianten ausgeschlossen, die sich bei genauerer Betrachtung aller Reads im Visualisierungsfenster von *SEQNEXT* als Artefakt herausstellten oder durch den VEP als gutartig/tolerabel eingestuft wurden. Dazu wurden die einzelnen Varianten von Dr. Julia Richter (Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister des Pathologischen Instituts des UKSH, Campus Kiel) in *SEQNEXT* begutachtet und Artefakte identifiziert. Als Artefaktkriterien galten unter anderem eine geringe Anzahl an Reads oder Readabbrüche bzw. Lücken, auffällig viele Mutationen in der unmittelbaren Umgebung der Variante, geringe Sequenziertiefe und CG-reiche Bereiche. Beispielhaft zeigt Abbildung 5, wie sich ein Artefakt in *SEQNEXT* darstellen kann. Varianten, die bereits in Zusammenhang mit der Pathogenese von B-Zell Lymphomen veröffentlicht wurden oder bei denen ein *COSMIC*-Eintrag bezüglich B-Zell Lymphomen vorlag, wurden unabhängig von der Vorhersage des VEP in die weitere Analyse eingeschlossen (Chapuy et al., 2018; Kaymaz et al., 2017; López et al., 2019; Panea et al., 2019; Reddy et al., 2017; Rohde et al., 2017; Zhou et al., 2019). Identische Varianten wurden mit Hilfe der *HGVS*-Nomenklatur unter Berücksichtigung des Transkripts sowie anhand ihrer spezifischen *COSM*-Kennung eindeutig identifiziert und miteinander verglichen (den Dunnen et al., 2016). Falls unterschiedliche Transkripte in den Arbeiten verwendet wurden, wurden entsprechende Transkripte mit Hilfe des *UCSC Genome Browsers* identifiziert.



## Programme

In Tabelle 9 sind die verwendeten Programme und sämtliche Datenbanken mit ihren Herstellern und Internetseiten aufgelistet, die in dieser Arbeit angewendet wurden.

Tabelle 9: Programme und Datenbanken, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

Software und Datenbanken	Hersteller/Homepage
1000 genomes	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/</a>
ClinVar/ ClinVita	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/</a>
Condel	<a href="http://bbglab.irbbarcelona.org/fannsdb/">http://bbglab.irbbarcelona.org/fannsdb/</a>
COSMIC v94	<a href="https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic">https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic</a>
dbSNP (build 153)	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi</a>
Draw.io v15.2.7	<a href="https://app.diagrams.net">https://app.diagrams.net</a>
Ensembl Variant Effect Predictor (Version 104)	<a href="https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html">https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html</a>
Excel	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
FATHMM (v2.3)	<a href="http://fathmm.biocompute.org.uk">http://fathmm.biocompute.org.uk</a>
gnomAD (v.2.1.1)/ ExAC	<a href="https://gnomad.broadinstitute.org">https://gnomad.broadinstitute.org</a>
GraphPad Prism	GraphPad Software, San Diego, USA
MutationMapper v.3.7.5	<a href="https://www.cbioportal.org/mutation_mapper">https://www.cbioportal.org/mutation_mapper</a>
Oviz-Bio v1.1.1 (Tool: LandScape)	<a href="https://bio.oviz.org">https://bio.oviz.org</a>
PolyPhen	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml</a>
Sequence Pilot 5.1.0 (Tool: SeqNext)	JSI medical systems GmbH, Ettenheim, Deutschland
SIFT	<a href="https://sift.bii.a-star.edu.sg">https://sift.bii.a-star.edu.sg</a>
USCS Genome Bioinformatics	<a href="https://genome.ucsc.edu/">https://genome.ucsc.edu/</a>

### 3.3 Statistische Auswertung

Eine Tumorgewebeprobe galt in der IHC und ISH als positiv für ein Oberflächenmolekül, wenn mindestens 25 % der Tumorzellen durch den spezifischen Antikörper markiert wurden. Zur Auswertung der FISH-Analyse wurden 30 Interphasekerne beurteilt und die vorliegende Signalkonstellation entsprechend den Empfehlungen des Herstellers begutachtet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm *GraphPad Prism* (GraphPad San Diego, USA). Unter Verwendung des Exakten Fisher Tests wurden die Zusammenhänge zwischen Altersgruppe bzw. EBV-Status und einer anderen Variablen untersucht. Signifikante Zusammenhänge zwischen der Ausprägung einzelner Variablen mit zu-

nehmendem Alter wurden mit Hilfe logistischer Regressionsanalysen (LRA), unter Verwendung eines zu Paul et al. sowie Klapper et al. analogen R-Skripts, berechnet (Klapper et al., 2012; Paul et al., 2018). Mit Hilfe des Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben, wurden signifikante Unterschiede zwischen der mittleren Anzahl an Mutationen pro Gen für unterschiedliche Untersuchungskohorten berechnet. Es wurde die zweiseitige Option verwendet.

Zum Nachweis eines statistisch signifikanten Unterschieds, wurde ein p-Wert kleiner als 0,05 angestrebt. Die p-Werte wurden auf vier Kommastellen gerundet dargestellt.

### **3.4 Sonstige Verfahren zur Visualisierung und Auswertung**

#### **3.4.1 *Draw.io* zur Erstellung von Abbildungen zu Arbeitsabläufen**

Das Internetprogramm *Draw.io* (<https://app.diagrams.net>) ist ein frei verfügbares Online-Programm zur Erstellung von Flussdiagrammen, Prozessdiagrammen, Organigrammen, UML-, ER- und Netzwerkdiagrammen. Ein Beispiel für ein derartiges Diagramm ist in Abbildung 4 zu sehen.

#### **3.4.2 *Bio.oviz* zur Darstellung von Mutationen der gesamten Kohorte**

*Bio.oviz* ist ein Online-Programm, welches die Visualisierung genomischer Daten ermöglicht. In dieser Arbeit wurde es zur Darstellung einer sogenannten Landschaftsansicht der Mutationen, wie in Abbildung 6 zu sehen, verwendet. Diese Darstellungsform ermöglicht eine systematische Darstellung integrativer Daten aus mehreren Schichten von Chargenproben, die hinsichtlich bestimmter Attribute (hier: Alter, Altersgruppe, Geschlecht, EBV-Status) miteinander verglichen werden.



## 4 Ergebnisse

Die präsentierten Ergebnisse wurden partiell bereits in der Arbeit „EBV-status of sporadic Burkitt lymphoma is associated with patient age and mutational features“ von Richter et al. veröffentlicht (Richter et al., 2022). Diese Arbeit erschien am 06.10.2022 im *British Journal of Haematology*.

Das Ziel dieser Arbeit ist die molekulare Charakterisierung adulter BL im Vergleich zu kindlichen sporadischen Burkitt Lymphomen zur Identifizierung genetischer Veränderungen, die mit dem Alter bei Erstdiagnose verbunden sind. Hierzu wurden an Tumorgewebeproben von Patienten unterschiedlicher Altersgruppen mit einem sporadischen BL gezielt Mutationsanalysen durchgeführt. Anschließend wurden diese Ergebnisse und die vorhandenen Daten aus der Basischarakterisierung miteinander verglichen.

### 4.1 Patientencharakteristika zeigen klar definierte Kohorte von sporadischen Burkitt Lymphomen

In dieser Arbeit wurde eine Patientenkohorte von 162 Patienten mit einem sporadischen Burkitt Lymphom hinsichtlich ihrer molekulargenetischen Eigenschaften untersucht. Eine Übersicht über die Patientencharakteristika und die molekulargenetischen Ergebnisse ist in Tabelle 10 gegeben.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines sporadischen BL waren 57 % (92/162) der Patienten Kinder ( $\leq 18$  Jahre) und 43 % (70/162) waren Erwachsene ( $> 18$  Jahre). In beiden Altersgruppen war die Mehrzahl der Patienten männlichen Geschlechts mit 87 % (79/91) bei den Kindern und 71 % (50/70) bei den Erwachsenen. Für einen Patienten aus der kindlichen Kohorte lag keine Information bezüglich des Geschlechts vor. Für 12 % (18/154) der Patienten konnte Positivität für EBV nachgewiesen werden (fünf kindliche BL und 13 erwachsene BL). Für acht Patientenfälle konnte kein EBV-Status bestimmt werden. Wie Tabelle 10 zu entnehmen ist, wiesen alle kindlichen Patientenproben sowie 99 % (66/76) bzw. 97 % (67/69) der erwachsenen Patientenproben eine Positivität für CD10 und CD20 in der immunhistochemischen Untersuchung auf. Lediglich für drei Fälle aus der adulten Kohorte (1x CD10, 2x CD20) konnte keine Expression dieser Marker nachgewiesen werden. Mit einer Ausnahme konnte in allen untersuchten Fällen mittels FISH ein *MYC*-Bruch oder eine *IgH-MYC*-Fusion nachgewiesen werden. In 9 % (14/156) der Burkitt Lymphome konnte Positivität für *BCL2* nachgewiesen werden. Auch die durchgeführten Genexpressionsanalysen bestätigten eine reine Zusammensetzung der Kohorte, die ausschließlich aus Burkitt Lymphomen und keiner anderen Lymphomentität, wie beispielsweise dem DLBCL, bestand. Keiner der untersuchten Fälle wurde als non-mBL klassifiziert. 17 der insgesamt 62 analysierten Fälle konnten durch die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse als „intermediate“ klassifiziert werden. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass auch typische Burkitt

Lymphome in der Genexpressionsanalyse teilweise der „intermediate“ Gruppe zugeordnet werden (Masqué-Soler et al., 2013).

Auch wenn für einzelne Patientenproben die Ergebnisse der molekularen Basisdiagnostik teilweise diskutabel waren, bestehen nach Zusammenschau mit anderen Eigenschaften nur sehr geringe Zweifel, dass es sich bei diesen Fällen nicht um BL handelt. Alle drei Fälle, für die in der immunhistochemischen Untersuchung keine Positivität für CD10 oder CD20 nachgewiesen werden konnte, zeigten den für BL charakteristischen Bruch im *MYC*-Gen. Zusätzlich wurde einer der drei Fälle in der Genexpressionsanalyse als mBL klassifiziert. Für einen Fall gelang kein FISH-Nachweis einer BL-typischen Veränderung im *MYC*-Gen. Bei diesem Fall war eine Auswertung der FISH-Analyse zum *MYC*-Bruch nicht möglich, der Nachweis bezüglich der IgH-*MYC*-Fusion war negativ. Aufgrund seiner Burkitt-typischen Morphologie und Immunhistochemie (CD10+, CD20+, *BCL2*-) wurde er jedoch auch zur finalen Patientenkohorte hinzugefügt. Die in der Diagnostik üblicherweise verwendeten FISH-Sonden können seltene oder atypische *MYC*-Veränderungen teilweise nicht nachweisen. Daher muss die Interpretation der Ergebnisse immer unter Berücksichtigung weiterer klinischer und pathologischer Daten eines Patienten erfolgen. Zudem ist bekannt, dass sich in bis zu 10 % der Burkitt Lymphome durch FISH oder andere molekulare Techniken keine Anzeichen für chromosomale Translokationen mit Beteiligung von *MYC* nachweisen lassen. In diesen Fällen könnte für *MYC* eine Deregulierung durch andere Mechanismen vorliegen (Molyneux et al., 2012). Auch eine Positivität für *BCL2* stellt keinen Widerspruch zur Diagnosestellung des Burkitt Lymphoms dar, wie in zahlreichen Arbeiten bestätigt wurde (Haralambieva et al., 2005; Masqué-Soler et al., 2015; Swerdlow et al., 2017). Bei Zusammenschau aller vorliegenden Daten zur Patientenkohorte kann mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die Kohorte ausschließlich aus Patienten mit sporadischen Burkitt Lymphomen besteht.

Tabelle 10: Übersicht über die Charakteristika des Patientenkollektivs. ED: Erstdiagnose; mBL: molekulares Burkitt Lymphom; N: Anzahl; %: Prozentualer Anteil.

	<b>Kinder</b>	<b>Erwachsene</b>	<b>Gesamt</b>
Alter bei ED	0-18	>18	0-94
Alter Mittelwert (min-max)	8 (0-17)	54 (20-94)	14 (0-94)

	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Anzahl	92	57 %	70	43 %	162	100 %
Männliches Geschlecht	79/91	87 %	50/70	71 %	129/162	80 %
Verhältnis Mann : Frau	6.6 : 1		2.5 : 1		3.9 : 1	

#### **Immunhistochemie**

CD10 positiv	92/92	100 %	66/67	99 %	158/159	99 %
CD20 positiv	91/91	100 %	67/69	97 %	158/160	99 %
MUM1 positiv	48/86	56 %	29/60	48 %	77/146	53 %

#### **Fluoreszenz in-Situ Hybridisierung**

<i>MYC</i> -Bruch oder IgH- <i>MYC</i> -Transfusion	91/91	100 %	69/70	99 %	160/161	99 %
<i>BCL2</i> Bruch	0/89	0 %	0/66	0 %	0/155	0 %
<i>BCL6</i> Bruch	0/85	0 %	0/68	0 %	0/153	0 %

#### **Digitale Multiplex Genexpressionsanalyse**

mBL	11/19	58 %	34/43	79 %	45/62	73 %
non-mBL	0/19	0 %	0/43	0 %	0/62	0 %
intermediate	8/19	42 %	9/43	20 %	17/62	27 %

## **4.2 Validität der Mutationsanalysen der Kohorte von sporadischen BL**

Es wurden insgesamt 91 Patientenproben analysiert, bei denen an 299 Positionen potenziell proteinverändernde Aberrationen identifiziert wurden. Die Kohorte umfasste 67 adulte und 24 pädiatrische Patienten. In einem ersten Schritt wurde die Validität dieser Daten überprüft,

indem die detektierten Varianten mit bereits publizierten Mutationsdaten zu aggressiven B-Zell Lymphomen abgeglichen wurden. Anschließend wurden die Daten im Kontext mit den Ergebnissen der Basisdiagnostik und des Alters systematisch ausgewertet (siehe Abschnitt 4.4).

57 % (169/299) der identifizierten Varianten wurden bereits zuvor in verschiedenen Forschungsarbeiten zu aggressiven B-Zell Lymphomen, 44 % (133/299) insbesondere bei sporadischen BL, beschrieben (Chapuy et al., 2018; Kaymaz et al., 2017; López et al., 2019; Panea et al., 2019; Reddy et al., 2017; Rohde et al., 2017; Zhou et al., 2019). Bei 130/299 (43 %) potenziell Protein-verändernden Varianten, welche bislang nicht in anderen Arbeiten beschrieben wurden, erfolgte eine Einteilung bezüglich ihrer Varianteneffekt-Vorhersage des VEP. Für 94/130 (72 %) dieser Aberrationen wurden durch den VEP „damaging“ oder „high impact“, also verändernde, Effekte auf die Proteinfunktion vorhergesagt. Für 28 % (36/130) der Varianten ohne Publikationserwähnung wurde laut Einschätzung des VEP ein moderater Effekt auf das entstehende Protein prognostiziert.

### **4.3 Mutationsanalyse zeigt Veränderungen in BL typischen Genen**

Die insgesamt 299 detektierten Varianten wurden in 22 Genen identifiziert. In 88/91 Patienten wurde mindestens eine Aberration nachgewiesen. Eine Übersicht über die detektierten Varianten liefert Abbildung 6. Bei den Mutationen handelte es sich größtenteils um Missense- (208/299, 70 %), Stop Gain- (30/299, 10 %) oder Frameshift-Mutationen (23/299, 8 %). In mindestens 40 % der Fälle konnten Veränderungen in den Genen *ID3*, *MYC*, *TP53* und *CCND3* identifiziert werden. *ID3* konnte mit der höchsten Frequenz an Varianten in 65 % (57/88) der Fälle, bei denen Varianten detektiert wurden, nachgewiesen werden. 65/88 (74 %) der Fälle zeigten Mutation im *ID3*- und/oder *TCF3*-Gen und für eine Kohorte von 75/88 (85 %) Patienten konnten Veränderungen detektiert werden, die eines der Gene aus dem Burkitt-typischen *ID3-TCF3-CCND3*-Signalweg betrafen (Rohde et al., 2017). Lediglich 16/91 Patienten zeigten keine Varianten für diese drei Gene. Davon wiesen 3/16 Patienten keine Varianten für Gene auf dem Panel auf. Bei 11/16 Patienten konnten Veränderungen in anderen Genen verzeichnet werden, die typischerweise Mutationen in der Pathogenese des Burkitt Lymphoms darstellen: *GNA13*, *FOXO1*, *RHOA*, *MYC*, *ARID1A* und *TP53* (López et al., 2019; Panea et al., 2019; Rohde et al., 2017). Die übrigen zwei Patienten ohne Mutationen in *ID3/TCF3/CCND3* zeigten Veränderungen in Genen, die dafür bekannt sind, im Rahmen eines DLBCL aufzutreten (Pasqualucci und Dalla-Favera, 2018). Sie wiesen Veränderungen im *PTEN*- und *CARD11*-Gen bzw. im *EP300*-Gen auf. Allerdings zeigten beide Fälle die BL-typischen Charakteristika in der Basisdiagnostik und wurden im Vorhinein eindeutig als BL klassifiziert. Die abschließende Betrachtung der Mutationsanalysen zeigte, dass wir bei 98 % (86/88) der Patienten Varianten identifizieren konnten, die

bevorzugt Gene betrafen, die sich als für Burkitt Lymphome charakteristisch erweisen und bekanntermaßen häufig bei dieser Erkrankung mutiert sind. Mutationen, die bekanntermaßen bei DLBCL auftreten, waren in unserer Kohorte selten bis gar nicht vorhanden. Somit bestätigte auch die Mutationsanalyse, dass unsere Kohorte mit großer Sicherheit nur aus BL besteht und nicht durch DLBCL „kontaminiert“ ist.

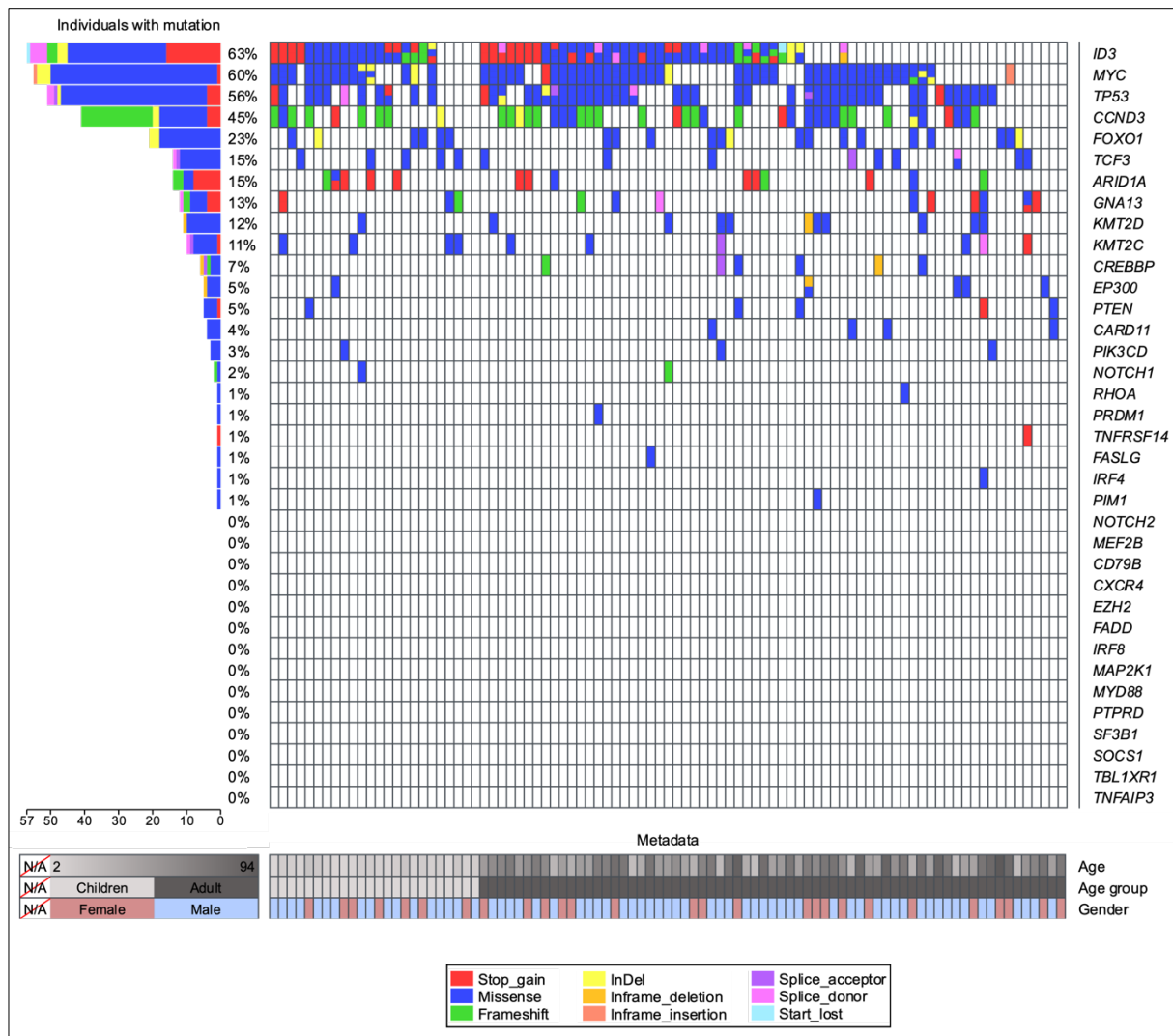


Abbildung 6: Molekulare Charakteristika pädiatrischer und adulter BL, sortiert nach Altersgruppe und Mutationsprofil (Mutation mit starkem Protein-verändernder Effekt in BL-typischen Genen). Jede Spalte stellt die Merkmale eines einzelnen Patienten dar. Jede Zeile repräsentiert ein Gen des Panels. Die Gene sind nach absteigender Mutationsfrequenz sortiert. Darunter befinden sich die Informationen bezüglich Alter bzw. Altersgruppe und Geschlecht jedes Patienten. Jede Farbe in einem Kästchen repräsentiert eine genetische Variante. Pro Gen und Patient ist die Darstellung von maximal drei Varianten möglich und das Feld dementsprechend mit bis zu drei Farben markiert. Wies ein Fall mehr als drei unterschiedliche genetische Varianten in einem Gen auf, wurden die drei Aberrationen nach absteigendem Effekt auf das entstehende Protein ausgewählt (Stop\_gain > Missense > Frameshift).

#### 4.4 Molekulare Charakteristika und Phänotyp sind bei Burkitt Lymphomen mit dem Alter assoziiert

Zur Identifizierung von Markern, die mit dem Erkrankungsalter bei Erstdiagnose eines Burkitt Lymphoms assoziiert sind, wurden die Ergebnisse aus der Basischarakterisierung und der Mutationsanalyse mittels LRA mit dem Erkrankungsalter verglichen. Logistische Regressionsanalysen zeigten mit zunehmendem Alter eine Abnahme der Wahrscheinlichkeit für einen das Burkitt Lymphom aufweisenden Patienten männlichen Geschlechts zu sein ( $p=0,0072$ ). Wie unter Absatz 1.3 bereits beschrieben, stellt das BL eine homogene Lymphomerkrankung dar. Dennoch wurden in der Vergangenheit einzelne Marker wie die Expression von BCL2, MUM und SOX11 sowie der EBV-Status identifiziert, die zwischen einzelnen Lymphomen bzw. Patienten unterschiedlich exprimiert werden (Karajannis et al., 2003; Masqué-Soler et al., 2015; Satou et al., 2017; Wästerlid et al., 2017). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Abhängigkeit der oben genannten Marker vom Erkrankungsalter untersucht. Die Expression von SOX11 war bei pädiatrischen Patienten (32/85, 38 %) signifikant höher als bei adulten Patienten (12/60, 20 %) ( $p=0,0279$ , Exakter Fischer Test). Zusätzlich zeigte auch die LRA eine Abnahme der Wahrscheinlichkeit für SOX11-Positivität mit zunehmendem Alter ( $p=0,0197$ ). Bezüglich des Vorliegens einer EBV-Infektion zeigte sich in dieser Arbeit ein geringer Anteil an EBV-positiven Lymphom-Patienten in der pädiatrischen Kohorte (5/89, 6 %) als in der adulten Kohorte (13/65, 20 %) ( $p=0,0097$ , Exakter Fischer Test). Analog dazu ergab auch die LRA eine Zunahme der Wahrscheinlichkeit für EBV-Positivität mit zunehmendem Patientenalter ( $p=0,0262$ ). Für die Expression von BCL2 konnte eine Tendenz zur Zunahme der Wahrscheinlichkeit der BCL2-Positivität mit zunehmendem Patientenalter festgestellt werden. Jedoch zeigte die LRA keinen signifikanten Wert (vgl. Abbildung 7).

Neben den molekularen Charakteristika wurde auch ein Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Auftreten somatischer Mutationen überprüft. Dabei wurden alle Gene mit einer Mutationsfrequenz  $\geq 10$  % in der Gesamtkohorte betrachtet. Diese waren *ID3*, *MYC*, *TP53*, *CCND3*, *FOXO1*, *ARID1A*, *TCF3*, *KMT2D*, *GNA13* und *KMT2C*. Lediglich für *ID3* zeigte sich eine signifikante Altersassoziation (siehe Abbildung 7). Mit zunehmendem Alter bei Erstdiagnose sank die Mutationsfrequenz von *ID3* signifikant ab ( $p=0,0123$ , LRA). Eine gleichgerichtete Entwicklung der Mutationsfrequenzen konnte man bei der Betrachtung von Varianten, die *ID3* und/oder *TCF3* betrafen, feststellen ( $p=0,0006$ , LRA). Ebenfalls bei Varianten die entweder *ID3* und/oder *TCF3* und/oder *CCND3* betrafen, kristallisierte sich eine Abnahme der Mutationsfrequenz mit zunehmendem Alter ( $p=0,0204$ , LRA) heraus.

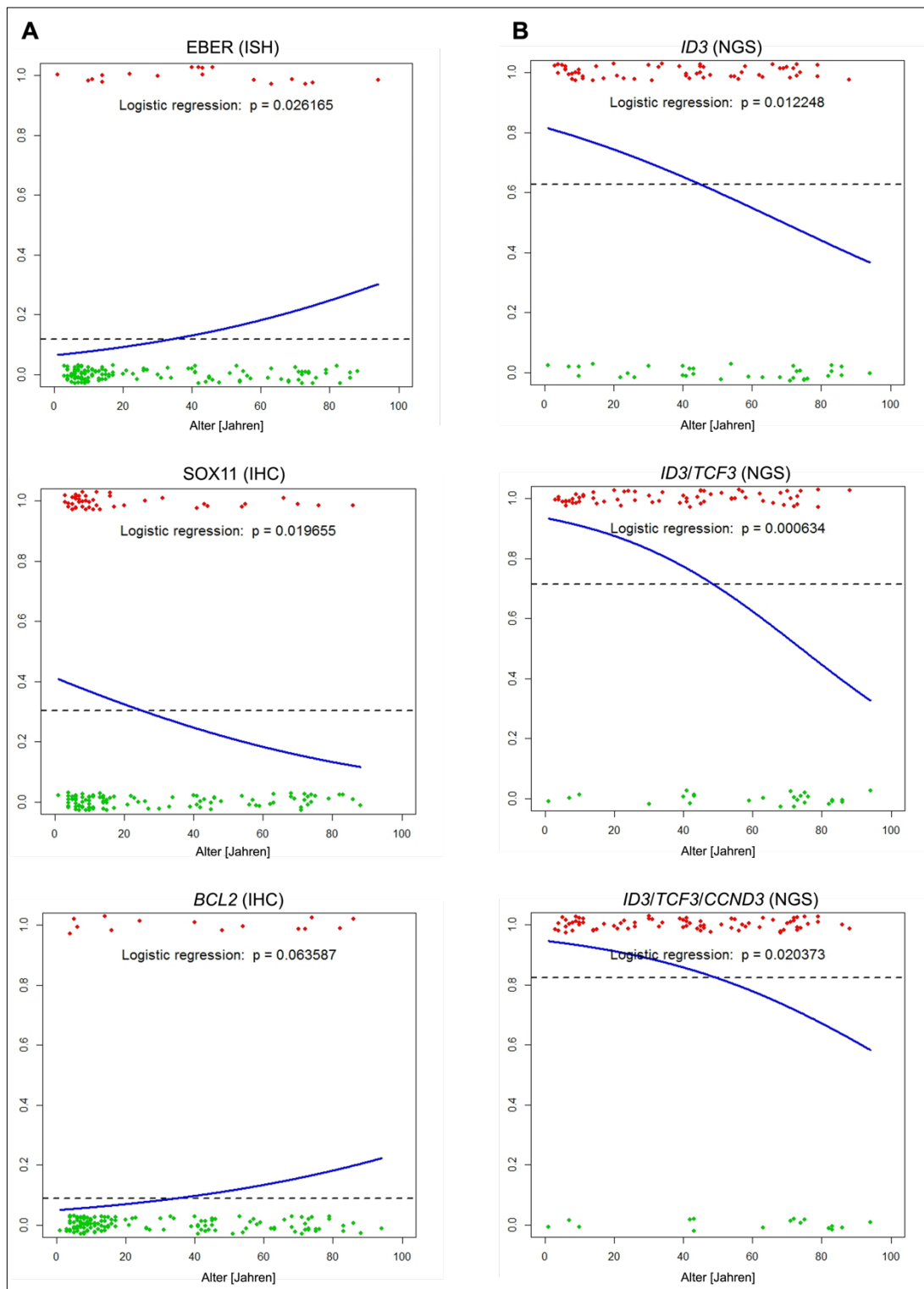


Abbildung 7: Logistische Regressionsanalysen molekularer Merkmale und Alter. x-Achse: Patientenalter in Jahren. y-Achse: Binäre Variable (1 oder 0). Jeder Punkt stellt einen Patienten dar. Roter Punkt: Positivität für ein Merkmal (Horizontale bei 1). Grüner Punkt: Negativität für ein Merkmal (Horizontale bei 0). Blaue Kurve: Logistische Regressionskurve. Gestrichelte Linie: Altersunabhängige Gesamthäufigkeit des Merkmals. A: Die LRA des EBV-Status der BL-Patienten sowie der Daten für SOX11 und BCL2. B: LRA für Patienten mit Mutation im *ID3*-Gen, im *ID3*- und/oder *TCF3*-Gen, im *ID3*- und/oder *TCF3*- und/oder *CCND3*-Gen. ISH=In-situ Hybridisierung, IHC=Immunhistochemie, NGS=Next Generation Sequencing.

#### **4.5 Der EBV-Status von sporadischen Burkitt Lymphomen ist mit dem Auftreten von Mutationen assoziiert**

Es konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Patientenalter bei Erstdiagnose auch der Anteil an Patienten mit positivem EBV-Status zunimmt. Zugleich konnte ein gemindertes Auftreten von Mutationen im *ID3-TCF3-CCND3*-Signalweg mit zunehmendem Patientenalter nachgewiesen werden. Zur Überprüfung eines potenziellen Zusammenhangs zwischen dem EBV-Status und dem Auftreten von Mutationen, wurden die Mutationsprofile von EBV-positiven und EBV-negativen Patienten unserer Kohorte von sporadischen Burkitt Lymphomen, unabhängig vom Alter, miteinander verglichen.

In EBV-positiven sporadischen Burkitt Lymphomen konnten wir signifikant häufiger Mutationen in den Genen *FOXO1* und *GNA13* nachweisen ( $p=0,0044$ ,  $p=0,0368$ , Exakter Fisher Test), wohingegen Mutationen im *ID3*-Gen seltener vorkamen ( $p=0,0088$ , Exakter Fisher Test). Bei Betrachtung des gesamten *ID3-TCF3-CCND3*-Signalwegs konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in der EBV-positiven Kohorte signifikant häufiger Mutationen in diesem Signalweg fehlten, als in der EBV-negativen Kohorte (6/17, 35 %; 8/69, 12 %;  $p=0,0281$ , Exakter Fisher Test). Burkitt Lymphome mit negativem EBV-Status sind folglich mit gehäuftem Auftreten von Mutationen in den Genen *ID3* und/oder *TCF3* und/oder *CCND3* assoziiert. Auch für Varianten im *TP53*-Gen ließ sich die Tendenz feststellen, dass sie bei EBV-positiven Patienten seltener vorkamen als bei EBV-negativen BL-Patienten. Diese Entwicklung wurde bereits für pädiatrische Patienten beschrieben, in der vorliegenden Arbeit ist dieser Unterschied jedoch als statistisch nicht signifikant zu klassifizieren (Grande et al., 2019). Abbildung 8 belegt die nachweislichen Unterschiede der *ID3*-Mutationen zwischen EBV-positiven und -negativen BL-Patienten in der pädiatrischen und adulten Kohorte. Es konnte keine Assoziation zwischen dem Auftreten von Mutationen und SOX11-Status der BL-Patienten festgestellt werden.



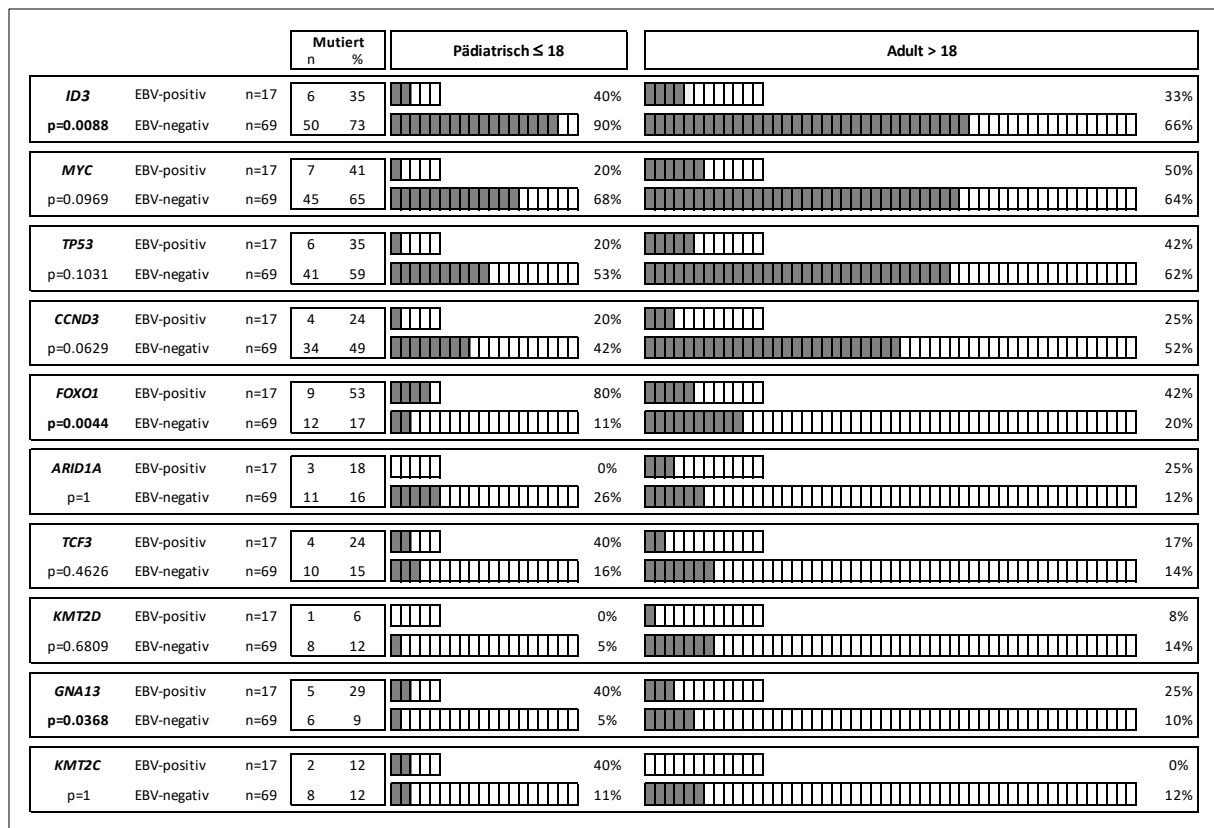


Abbildung 8: Mutationsfrequenzen bei EBV-positiven und EBV-negativen Patienten im pädiatrischen und adultem Alter. Es sind die Varianten der Gene dargestellt, die in mindestens 10 % der BL-Proben in der Gesamtkohorte verändert sind. Sie sind nach Alter und EBV-Status getrennt dargestellt. Von 86 BL-Proben (24 pädiatrische, 62 erwachsene BL) waren sowohl der EBV-Status (17 EBV-positiv, 69 EBV-negativ) als auch die Ergebnisse der Mutationsanalysen verfügbar. Es wurden exakte Fisher-Tests auf EBV-Status und Variantenhäufigkeit in der Gesamtkohorte durchgeführt. Signifikante p-Werte ( $< 0,05$ ) sind fett dargestellt. Die Proben wurden nach den Ergebnissen der Mutationsanalysen sortiert, wobei die von Varianten betroffenen Proben in grau und die Proben ohne Varianten in weiß dargestellt sind.

## 5 Diskussion

Patienten jeder Altersgruppe können an einem Lymphom erkranken. Dennoch gibt es verschiedene Entitäten, die eine beträchtliche Variabilität der Inzidenz in Abhängigkeit vom Alter aufweisen (Morton et al., 2006). Das BL tritt vorwiegend im Kindesalter auf, wohingegen das DLBCL und das follikuläre Lymphom überwiegend erwachsene Patienten betreffen (Loeffler-Wirth et al., 2019). Zudem ist für das follikuläre Lymphom und das DLBCL bereits beschrieben, dass sich auch molekulare, pathologische und klinischen Merkmale innerhalb einer Lymphom-Entität zwischen den Altersgruppen unterscheiden können (Attarbaschi et al., 2020; Klapper et al., 2012; Paul et al., 2018).

Ein Großteil unseres bisherigen Wissens über die Genetik und Pathologie des BL stammt aus der Untersuchung von pädiatrischen Patienten. Zusammenhänge zu adulten Patienten sind bislang nicht vollständig erforscht und altersübergreifende Analysen für das BL existieren nur beschränkt. Um die Biologie des adulten BL besser zu verstehen, wurde eine große Kohorte adulter BL hinsichtlich molekularer Charakteristika und Mutationsprofil untersucht und mit pädiatrischen BL verglichen.

### 5.1 Diskussion der Methoden

Ein besonderes Merkmal der Kohorte dieser Arbeit ist das altersübergreifende Spektrum der Patienten, das es ermöglicht, altersassoziierte Merkmale zu untersuchen, sowie die Reinheit der Kohorte, die ausschließlich aus sporadischen BL besteht. Ein Großteil der bislang veröffentlichten BL-Kohorten enthielt entweder nur sehr wenige erwachsene Patienten, verschiedene Subtypen des BL oder wurde nur auf klinische und phänotypische Daten hin untersucht, ohne dass eine Mutationsanalyse durchgeführt wurde (Havelange et al., 2016; López et al., 2019; Richter et al., 2012; Rohde et al., 2017; Thomas et al., 2022). Eine kleine Untergruppe von BL weist überlappende pathologische Merkmale mit DLBCLs auf, was die korrekte Diagnosestellung beeinträchtigen kann. Erschwerend hinzu kommt die Entität der Hochgradigen B-Zell Lymphome (HGBCL), die biologische Eigenschaften von BL und DLBCL aufweisen (Swerdlow et al., 2017). Erst kürzlich hat eine Studie gezeigt, dass nach den aktuellen diagnostischen Kriterien eine große Anzahl ehemaliger BL-Diagnosen revidiert werden muss (Elgaafary et al., 2021).

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit strenge Ein- und Ausschlusskriterien bei der Zusammenstellung einer ausschließlich aus sporadischen BL bestehenden Patientenkohorte gewählt. In Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen sind die angewandten Auswahlkriterien, die auf allgemein verfügbaren Daten wie der von erfahrenen Pathologen überprüften Morphologie, dem Immunphänotyp und dem Nachweis von *MYC*-Translokationen basieren, ein sehr spezifischer Ansatz, um BL von DLBCL zu unterscheiden (Hüttl et al., 2021). Darüber hinaus wurden die wichtigsten Differentialdiagnosen, Burkitt-ähnliche

Lymphome mit 11q-Aberration und hochgradige B-Zell Lymphome mit *MYC*- und *BCL2*- oder *BCL6*-Translokationen, so weit wie möglich durch FISH-Analysen ausgeschlossen (Salaverria et al., 2014; Swerdlow et al., 2017). Zudem wurde die molekulare Diagnose auf der Grundlage von Genexpressionsprofilen in den Auswahlprozess inkludiert, die sich in anderen Studien als sehr hilfreich erwiesen hat (Masqué-Soler et al., 2013). Obwohl mit großer Sicherheit davon ausgegangen wird, dass diese Kohorte nicht durch andere Lymphomentitäten wie dem DLBCL kontaminiert ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das angewandte Auswahlverfahren eine Untergruppe reifer aggressiver B-Zell-Lymphome nicht erfasst, die pathologisch von BL abweichen, aber durch eine mBL-Genexpressionssignatur gekennzeichnet sind (Bouska et al., 2017).

Die in dieser Arbeit verwendete statistische Methode zur Identifizierung einer Altersassoziation (LRA) korrigiert die Anzahl der Patienten in einem bestimmten Alter, so dass es unwahrscheinlich ist, dass eine Anreicherung von erwachsenen Patienten in der untersuchten Kohorte zu den beobachteten Effekten führt. Der Vergleich der Kohorte dieser Arbeit mit allen Patienten, bei denen im untersuchten Zeitraum in Schleswig-Holstein ein BL diagnostiziert wurde, zeigt, dass der Anteil an erwachsenen Patienten in dieser Arbeit (43 %) im Vergleich zu den bevölkerungsbasierten Daten (75 %, <http://www.krebsregister-sh.de/>, Jahre 2001-2018, n=101) möglicherweise sogar unterrepräsentiert ist. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass die Ergebnisse der Altersassoziation dieser Arbeit mit einer hohen Anzahl erwachsener Patienten in der Studienkohorte zusammenhängen (Richter et al., 2022).

In dieser Arbeit wurde die Kohorte sporadischer BL auf somatische Mutationen und phänotypische Marker hin untersucht. Es ist bekannt, dass das Fehlen einer passenden Keimbahnkontrolle zu falsch-positiven Mutationsbefunden führen kann. Ebenfalls ist bekannt, dass das gewählte Versuchsdesign, welches auf Panel-Sequenzierungen beruht, möglicherweise aufgrund von Allel-Drop-Outs oder homozygoten Deletionen zu falsch-negativen Befunden führt. Eine geeignete Methode zur Validierung der NGS-Ergebnisse wäre aufgrund dieser Risiken die Sanger-Sequenzierung. Tatsächlich fand die Sanger-Sequenzierung in dieser Arbeit Anwendung, jedoch waren die Ergebnisse wegen geringer Probenqualität und zahlreicher Paraffinierungsartefakte nicht auswertbar. Aufgrund zeitlich und personell beschränkter Kapazitäten wurde auf die Wiederholung dieser Analyse verzichtet. Stattdessen wurde die Unsicherheit durch Fehlbeurteilung von Mutationen in dieser Arbeit durch die Anwendung adäquater Annotations- und Filterungssoftware reduziert. In einer Studie von Kalatskaya et al. konnte gezeigt werden, dass mit einem geeigneten Filterungsalgorithmus 95-98 % der somatischen Mutationen trotz fehlender Keimbahnkontrolle korrekt klassifiziert

werden (Kalatskaya et al., 2017). Die zur Klassifizierung herangezogenen Variantenmerkmale dieser Arbeit waren weitestgehend übereinstimmend mit denen von Kalatskaya et al.. Zusätzlich wurden Filter vorgeschaltet, deren Funktion die Erkennung von Sequenzierungsartefakten ist, die im Zusammenhang mit FFPE-Schäden oder anderen Artefakten entstanden sind. Ebenfalls ist nicht davon auszugehen, dass die aus den Ergebnissen gezogenen Schlussfolgerung dieser Arbeit aufgrund falsch-negativer Befunde irrtümlich sind, da für alle Teilkohorten derselbe Ansatz verwendet wurde.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

Die Ergebnisse der Sequenzierungsanalyse dieser Arbeit stimmen weitestgehend mit der zuvor berichtete Häufigkeit von *ID3*-, *TCF3*-, *CCND3* und *TP53*-Mutationen bei BL-Patienten überein (Burkhardt et al., 2022; Richter et al., 2012; Rohde et al., 2017). Über die Hälfte der durch Amplikon-basierte NGS identifizierten Mutationen (57 %, 169/299) waren zuvor in der Literatur und/oder der COSMIC- Datenbank beschrieben worden.

In den vergangenen Jahren konnte bereits gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen Mutationsfrequenz und Alter bei Erstdiagnose in BL gibt (Havelange et al., 2016; Mbulaiteye et al., 2012). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit, in der adulte und pädiatrische BL Patienten einer genomischen Vergleichsanalyse unterzogen wurden, ergab ein unterschiedliches CNV-Profil (copy number variation, dt. Kopiezahlvariation) zwischen den beiden Kohorten (Dreval et al., 2021).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die Häufigkeit von Mutationen in *ID3* signifikant mit zunehmendem Patientenalter abnehmen. Die Daten von Havelange et al. hingegen verweisen auf einen entgegengesetzten Trend mit einer signifikant höheren Anzahl von *ID3*-Mutationen in erwachsenen BL-Patienten. Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind möglicherweise auf eine Verzerrung durch eine weitaus geringere Stichprobengröße bei Havelange et al. zurückzuführen. Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte zudem aus einer heterogeneren Studienpopulation folgen, da die frühere Studie nicht strikt auf sporadische BL beschränkt war bzw. bei der Diagnosestellung zahlreiche Kriterien (beispielsweise *BCL2* – und *BCL6*-Bruch) außer Acht gelassen wurden, die eine mögliche Fehldiagnose eines nicht-BL als BL aufdeckt hätten. Die eigenen Daten stimmen mit den kürzlich veröffentlichten Daten von Burkhardt et. al. im Wesentlichen überein und weisen darauf hin, dass die Mutationswahrscheinlichkeit von *ID3* bzw. der gesamten *ID3/TCF3/CCND3*-Achse mit einem jüngeren Alter bei BL assoziiert ist (Burkhardt et al., 2022). Somit kann auch die von Havelange et al. vermutete Beobachtung, dass *ID3*- und *CCND3*-Doppelhit-Mutationen, die in jener Arbeit hauptsächlich bei Erwachsenen vorkamen

und mutmaßlich für die schlechtere Prognose von BL im Erwachsenenalter verantwortlich sind, nicht bestätigt werden (Havelange et al., 2016).

Burkhardt et al. konnten darüber hinaus Altersassoziationen mit einer größeren Mutationswahrscheinlichkeit im kindlichen Alter für die Gene *ARID1A*, *GNA13* und *SMARCA4* sowie im erwachsenen Alter für *CREBBP*, *PIM1*, *CARD11*, *SOCS* nachweisen. Diese Beobachtungen, die in der eigenen Gesamtkohorte nicht bestätigt werden konnten, sind möglicherweise auf die strengeren Einschlusskriterien dieser Arbeit, die ausschließlich sporadische BL und keinen anderen BL-Subtyp beinhaltet, zurückzuführen.

Insgesamt legen die Resultate nahe, dass die Rolle von *ID3*, und möglicherweise auch anderer Gene, in der Biologie des pädiatrischen BL weitaus bedeutender ist als im adulten BL. Die ungleiche genomische Ausprägung nach Altersgruppe deutet darauf hin, dass der Alterungsprozess die Biologie von BL beeinflusst, wie es bereits für das DLBCL gezeigt wurde (Klapper et al., 2012).

Bei allen Merkmalen, die mit zunehmendem Alter assoziiert sind, gab es keine klare Altersgrenze zwischen pädiatrischem und erwachsenem BL. Neuere Daten zur Genmutationsdichte in BL ergaben, dass der biologische Übergang der Mutationssignatur primär im Alter von 25-40 Jahren erfolgt. Ein Wechsel der Mutationsdichte folgt für zahlreiche Gene also nicht der klassischen Einteilung (Kindern sind alle Patienten  $\leq 18$  Jahren), sondern erst deutlich später. Die höchste Homogenität des Mutationsprofils sei demnach in der Altersspanne von etwa 7-15 Jahren zu beobachten (Burkhardt et al., 2022). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass eine biologische Heterogenität des BL bei veränderten Altersgrenzen noch ausgeprägter sein könnte. Die Bestimmung einer neuen Altersgrenze könnte dabei helfen die Tumorbilogie noch besser zu verstehen.

In Bezug auf den Phänotyp wird in dieser Arbeit beschrieben, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein BL positiv für EBV ist, mit dem Alter bei der Diagnose zunimmt. Zu beachten ist, dass nur sporadische BL und keine endemischen Lymphome einbezogen wurden, da letztere meist positiv für EBV sind. EBV-positive sporadische BL waren in früheren Studien unterrepräsentiert, was zur Entwicklung eines auf Genexpression basierenden Diagnoseinstruments für BL führte. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass EBV-positive BL häufiger als "intermediär" zwischen mBL und non-mBL eingestuft werden, obwohl alle anderen Merkmale (Morphologie, Immunphänotyp) mit BL übereinstimmen. Die Ergebnisse legen nahe, dass molekulare Klassifikationskriterien für BL möglicherweise für EBV-positive sporadische BL angepasst werden müssen. Zudem sind künftige Studien erforderlich, um zu untersuchen, wie EBV die Expression von Klassifikationsgenen beeinflusst.

Bei pädiatrischen Patienten hat sich bereits gezeigt, dass EBV-positive BL im Vergleich zu EBV-negativen BL wesentlich weniger somatische Mutationen aufweisen, insbesondere bei Treibermutationen und Genen, die an der Apoptose beteiligt sind (Grande et al., 2019). Vor allem gehörten Gene des *ID3/TCF3/CCND3*-Signalwegs zu den Genen, von denen berichtet wurde, dass sie zwischen EBV-positiven und -negativen BL bei pädiatrischen Patienten unterschiedlich mutiert sind (Abate et al., 2015; Amato et al., 2016; Satou et al., 2015). Während in vorausgegangenen Arbeiten zu altersassoziierten BL-Veränderungen ein Zusammenhang von Mutations- und EBV-Status im Alter noch klar ausgeschlossen wird, unterstreichen aktuellere Publikationen, die während der Überarbeitung dieser Arbeit veröffentlicht wurden, die Relevanz der Ergebnisse dieser Arbeit (Havelange et al., 2016; Thomas et al., 2022). Wie in der vorliegenden Studie gezeigt, scheint die *ID3/TCF3/CCND3*-Achse, die einen wichtigen pathogenetischen Signalweg bei BL darstellt, in Anwesenheit von EBV bei älteren Patienten weniger häufig mutiert zu sein. Für *FOXO1* konnte hingegen gezeigt werden, dass es bei EBV-Positivität häufiger Mutationen aufweist, als beim Fehlen eines EBV-Nachweises. In der erst kürzlich veröffentlichten Arbeit von Thomas et al. konnten für zahlreiche Gene, darunter auch überlappende Gene aus dieser Arbeit (*CCND3*, *FOXO1*, *PTEN*, *TP53*), große molekulare Unterschiede zwischen EBV-positiven und -negativen BL nachgewiesen. Leider umfasst das Targeted-Sequencing-Panel dieser Arbeit nicht alle Gene, die bei der Ganzgenomsequenzierung erfasst wurden, um diese Aussagen zu bestätigen. Der nachgewiesene Zusammenhang von EBV- und *ID3*-Mutationsstatus aus der eigenen Analyse konnte von Thomas et al. nicht bestätigt werden. Dies könnte durch die Beobachtung erklärt werden, dass die eben genannte Studie nicht nur sporadische BL, sondern möglicherweise alle drei Subtypen von BL in der Patientenkohorte beinhaltet. Dies spiegelt sich unter anderem durch den hohen Anteil an EBV+ BL (52 %) wieder, der bei sporadischen BL in aller Regel zwischen 20 % und 30 % liegt (Swerdlow et al., 2017). Auch die Probenherkunft, die zahlreiche Proben aus Afrika beinhaltet, lassen auf einen großen Anteil endemischer BL schließen. Zudem beinhaltet die Patientenkohorte auch HIV-positive BL-Patienten, die in der eigenen Arbeit von der Analyse ausgeschlossen wurden. Somit muss auch die von Thomas et al. geäußerte These, dass primär EBV und nicht das Alter der Patienten die Ursache für die molekularen Unterschiede innerhalb der BL ist, kritisch hinterfragt werden. Tatsächlich war bei Thomas et al. eine deutlich höhere Anzahl an molekularen Unterschieden zwischen den beiden EBV-Kohorten verglichen mit den Alterskohorten zu verzeichnen. Allerdings könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass effektiv endemische (EBV+) und sporadische (EBV-) BL miteinander verglichen wurden.

Es ist nicht auszuschließen, dass der EBV-Status des Tumors die Biologie von BL stärker beeinflusst als das Alter des Patienten. Dennoch gibt es genetische Unterschiede in den unterschiedlichen Alterskohorten des BL wie beispielsweise die CNV-Mutationslast, die nicht

durch EBV-Status oder Geschlecht des Patienten erklärt werden können (Dreval et al., 2021). Zur Klärung der Frage, welches Merkmal den Mutationsstatus bestimmt - Alter oder EBV - sind zukünftige Studien, die altersübergreifende Kohorten sporadischer und endemischen BL beinhalten und getrennt vergleichen, notwendig. Unter Verwendung unseres vorliegenden Datensatzes ist diese Frage nicht zu beantworten.

SOX11 wurde bereits als eines der Gene genannt, die zwischen BL bei Kindern und Erwachsenen unterschiedlich exprimiert werden (Deffenbacher et al., 2012). In dieser Arbeit wird beschrieben, dass die Expression von SOX11 mit zunehmendem Alter bei der Diagnose abnimmt - ein Befund, der in einer zuvor durchgeführten Studie nicht festgestellt wurde (Wästerlid et al., 2017).

SOX11 und seine Beteiligung an der Differenzierung und Gestaltung der Lymphom-Mikroumgebung ist bereits für die Biologie des Mantelzell-Lymphoms eingehend untersucht (Palomero et al., 2016). Die pathogene Rolle bei BL und Vorläuferzellneoplasien, die beide SOX11 exprimieren können, wurde jedoch noch nicht entschlüsselt. Es ist allerdings bereits bekannt, dass die SOX11 Expression in BL keinen signifikanten Einfluss auf das Outcome der Patienten hat. In einer BL-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass verminderte Expression von SOX11 in gesteigerter Proliferation resultiert (Wästerlid et al., 2017). SOX11 könnte somit eine Rolle bei der Wachstumsregulation in BL spielen. Die vollständige Bedeutung dieses Markers für die Pathogenese von BL muss jedoch noch in weiteren Studien analysiert werden.

Zusammenfassend ergaben die Mutationsanalysen dieser Arbeit, dass die Häufigkeit von Mutationen, die die *ID3/TCF3/CCND3*-Achse betreffen, mit einem jüngeren Alter bei BL assoziiert sind. Gleichzeitig konnte eine Verbindung zwischen Mutationen der *ID3/TCF3/CCND3*-Achse und EBV-Status beobachtet werden, die zeigte, dass ein positiver EBV-Status mit einer geringeren Mutationsfrequenz dieser Gene assoziiert ist.

Zudem konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen jüngerem Patientenalter und stärkerer Expression des Markers SOX11 bei BL dokumentiert werden.

Zu den potenziellen Limitationen dieser Arbeit gehören die kleine Kohortengröße insbesondere EBV+ adulter Patienten, das Fehlen von Keimbahnmaterial und der Einsatz eines Sequenzierpanels, das relevante Mutationen in anderen Genen nur unvollständig erfasst. Allerdings muss an dieser Stelle betont werden, dass das kombinierte Auftreten von hohem Alter und positiven EBV-Status eine seltene Besonderheit darstellt und nur einen ausgesprochen geringen Anteil der BL Patienten betrifft. Künftige Studien sollten darauf ab-

zielen eine große Kohorte an EBV-positiven und -negativen sporadischen BL aller Altersgruppen anhand von Ganzgenomsequenzierung zu analysieren.

### **5.3 Klinischer Bezug und Ausblick**

Wenn auch in einem viel geringeren Ausmaß als beim DLBCL, deuten unsere Daten darauf hin, dass es sich beim BL um eine Krankheit mit altersassoziierter Mutationsheterogenität handelt. Zudem bekräftigen die vorliegenden und die veröffentlichten Daten das Konzept der Unterscheidung zwischen EBV-positiver und EBV-negativer BL aufgrund der Unterschiede in der zugrunde liegenden Mutationslandschaft (Richter et al., 2022; Thomas et al., 2022).

Die Behandlung von Erwachsenen mit BL ist bei älteren Patienten häufig durch die therapieassoziierte Toxizität eingeschränkt und daher weit weniger standardisiert als bei Kindern. Aufgrund der geringen Fallzahlen werden BL bei Erwachsenen bislang außerhalb von klinischen Studien behandelt. Inwieweit die altersbedingte Mutationsheterogenität klinisch relevant ist und ein mögliches Fundament für zielgerichtete Therapien darstellt, muss daher in neuen Studien erforscht werden.

Darüberhinaus könnte man spekulieren, dass neue therapeutische Konzepte, die sich aus endemischen BL ergeben, auch für BL des älteren Menschen, die positiv auf EBV getestet wurden, von Bedeutung sein könnten (Grande et al., 2019).



## 6 Zusammenfassung

Das Burkitt Lymphom ist mit 30-50 % das häufigste Non-Hodgkin Lymphom im Kindesalter. Zu einem deutlich geringeren Anteil sind auch erwachsene Patienten vom Burkitt Lymphom betroffen. Wohingegen bei der Behandlung von kindlichen Burkitt Lymphomen hohe Heilungsraten erzielt werden, ist das steigende Alter der adulten Patienten in vielen Fällen mit einem geringeren Überleben verbunden. Der Großteil unseres aktuellen Wissens zur Biologie dieses Lymphoms stammt aus Studien zu Burkitt Lymphomen im Kindesalter. Umfassende Studien zum adulten Burkitt Lymphom sind erstmalig in den letzten zwei Jahren erschienen.

In dieser Arbeit wurde eine große Kohorte von 92 kindlichen und 70 adulten sporadischen Burkitt Lymphomen auf molekulare und genetische Marker hin untersucht, um altersassoziierte Veränderungen zu detektieren. Neben der Basisdiagnostik (Fluoreszenz in-situ Hybridisierung, Immunhistochemie und In-situ Hybridisierung) wurden an einer Teilkohorte Genexpressionsanalysen durchgeführt. An 91 Patienten wurden mit Hilfe eines Amplikonbasierten Panels Mutationsanalysen an Genen, die rekurrent bei aggressiven B-Zell Lymphomen mutiert sind, durchgeführt. Es zeigte sich, dass die SOX11-Expression sowie Mutationen im *ID3*-Gen bzw. im gesamten *ID3-CCND3-TCF3*-Signalweg mit jüngerem Ersterkrankungsalter assoziiert waren. Bei erwachsenen Burkitt Lymphom Patienten wurde signifikant häufiger ein positiver EBV-Status beobachtet als in der kindlichen Kohorte. Die darauffolgende Analyse eines Zusammenhangs von EBV-Status und Mutationsprofils ergab, dass sporadische EBV-negative Burkitt Lymphome mit einem gehäuftem Auftreten von Mutationen in den Genen *ID3* und/oder *TCF3* und/oder *CCND3* assoziiert sind. Mutationen in den Genen *FOXO1* und *GNA13* kamen hingegen gehäuft bei EBV-positiven Burkitt Lymphomen vor (Richter et al., 2022).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen eine altersabhängige molekulare Heterogenität innerhalb des sporadischen Burkitt Lymphoms. Zudem wurden abweichende genomische Muster in Abhängigkeit vom EBV-Status der Patienten identifiziert. Die klinische Bedeutung dieser differenziellen molekularen Profile sollte in weitere Studien mit großen Kohorten überprüft werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abate, F., Ambrosio, M.R., Mundo, L., Laginestra, M.A., Fuligni, F., Rossi, M., Zairis, S., Gazaneo, S., De Falco, G., Lazzi, S., Bellan, C., Rocca, B.J., Amato, T., Marasco, E., Etebari, M., Ogwang, M., Calbi, V., Ndede, I., Patel, K., Chumba, D., Piccaluga, P.P., Pileri, S., Leoncini, L., Rabadan, R., 2015. Distinct Viral and Mutational Spectrum of Endemic Burkitt Lymphoma. *PLoS Pathog* 11, e1005158.
- Amato, T., Abate, F., Piccaluga, P., Iacono, M., Fallerini, C., Renieri, A., De Falco, G., Ambrosio, M.R., Mourmouras, V., Ogwang, M., Calbi, V., Rabadan, R., Hummel, M., Pileri, S., Leoncini, L., Bellan, C., 2016. Clonality Analysis of Immunoglobulin Gene Rearrangement by Next-Generation Sequencing in Endemic Burkitt Lymphoma Suggests Antigen Drive Activation of BCR as Opposed to Sporadic Burkitt Lymphoma. *Am J Clin Pathol* 145, 116–127.
- Attarbaschi, A., Abl, O., Arias Padilla, L., Beishuizen, A., Burke, G.A.A., Brugières, L., Bruneau, J., Burkhardt, B., d'Amore, E.S.G., Klapper, W., Kontny, U., Pillon, M., Taj, M., Turner, S.D., Uyttebroeck, A., Woessmann, W., Mellgren, K., 2020. Rare non-Hodgkin lymphoma of childhood and adolescence: A consensus diagnostic and therapeutic approach to pediatric-type follicular lymphoma, marginal zone lymphoma, and nonanaplastic peripheral T-cell lymphoma. *Pediatr Blood Cancer* 67.
- Birney, E., Soranzo, N., 2015. The end of the start for population sequencing. *Nature* 526, 52–53.
- Bouska, A., Bi, C., Lone, W., Zhang, W., Kedwaili, A., Heavican, T., Lachel, C.M., Yu, J., Ferro, R., Eldorhamy, N., Greiner, T.C., Vose, J., Weisenburger, D.D., Gascoyne, R.D., Rosenwald, A., Ott, G., Campo, E., Rimsza, L.M., Jaffe, E.S., Braziel, R.M., Siebert, R., Miles, R.R., Dave, S., Reddy, A., Delabie, J., Staudt, L.M., Song, J.Y., McKeithan, T.W., Fu, K., Green, M., Chan, W.C., Iqbal, J., 2017. Adult high-grade B-cell lymphoma with Burkitt lymphoma signature: genomic features and potential therapeutic targets. *Blood* 130, 1819–1831.
- Burkhardt, B., Michgehl, U., Rohde, J., Erdmann, T., Berning, P., Reutter, K., Rohde, M., Borkhardt, A., Burmeister, T., Dave, S., Tzankov, A., Dugas, M., Sandmann, S., Fend, F., Finger, J., Mueller, S., Gökbüget, N., Haferlach, T., Kern, W., Hartmann, W., Klapper, W., Oschlies, I., Richter, J., Kontny, U., Lutz, M., Maecker-Kolhoff, B., Ott, G., Rosenwald, A., Siebert, R., von Stackelberg, A., Strahm, B., Woessmann, W., Zimmermann, M., Zapukhlyak, M., Grau, M., Lenz, G., 2022. Clinical relevance of molecular characteristics in Burkitt lymphoma differs according to age. *Nat Commun* 13, 3881.
- Burkhardt, B., Taj, M., Garnier, N., Minard-Colin, V., Hazar, V., Mellgren, K., Osumi, T., Fedorova, A., Myakova, N., Verdu-Amoros, J., Andres, M., Kabickova, E., Attarbaschi, A., Chiang, A.K.S., Bubanska, E., Donska, S., Hjalgrim, L.L., Wachowiak, J., Pieczonka, A., Uyttebroeck, A., Lazic, J., Loeffen, J., Buechner, J., Niggli, F., Csoka, M., Krivan, G., Palma, J., Burke, G.A.A., Beishuizen, A., Koeppen, K., Mueller, S., Herbrueggen, H., Woessmann, W., Zimmermann, M., Balduzzi, A., Pillon, M., 2021. Treatment and Outcome Analysis of 639 Relapsed Non-Hodgkin Lymphomas in Children and Adolescents and Resulting Treatment Recommendations. *Cancers* 13, 2075.
- Burkitt, D., 1958. A sarcoma involving the jaws in african children. *British Journal of Surgery* 46, 218–223.
- Chapuy, B., Stewart, C., Dunford, A.J., Kim, J., Kamburov, A., Redd, R.A., Lawrence, M.S., Roemer, M.G.M., Li, A.J., Ziepert, M., Staiger, A.M., Wala, J.A., Ducar, M.D.,

- Leshchiner, I., Rheinbay, E., Taylor-Weiner, A., Coughlin, C.A., Hess, J.M., Pedamallu, C.S., Livitz, D., Rosebrock, D., Rosenberg, M., Tracy, A.A., Horn, H., van Hummelen, P., Feldman, A.L., Link, B.K., Novak, A.J., Cerhan, J.R., Habermann, T.M., Siebert, R., Rosenwald, A., Thorner, A.R., Meyerson, M.L., Golub, T.R., Beroukhi, R., Wulf, G.G., Ott, G., Rodig, S.J., Monti, S., Neuberg, D.S., Loeffler, M., Pfreundschuh, M., Trümper, L., Getz, G., Shipp, M.A., 2018. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med* 24, 679–690.
- Chen, B.-J., Fend, F., Campo, E., Quintanilla-Martinez, L., 2019. Aggressive B-cell lymphomas—from morphology to molecular pathogenesis. *Ann Lymphoma* 3, 1–1.
- Crombie, J., LaCasce, A., 2021. The treatment of Burkitt lymphoma in adults. *Blood* 137, 743–750.
- Deffenbacher, K.E., Iqbal, J., Sanger, W., Shen, Y., Lachel, C., Liu, Z., Liu, Y., Lim, M.S., Perkins, S.L., Fu, K., Smith, L., Lynch, J., Staudt, L.M., Rimsza, L.M., Jaffe, E., Rosenwald, A., Ott, G.K., Delabie, J., Campo, E., Gascoyne, R.D., Cairo, M.S., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Gross, T.G., Chan, W.C., 2012. Molecular distinctions between pediatric and adult mature B-cell non-Hodgkin lymphomas identified through genomic profiling. *Blood* 119, 3757–3766.
- den Dunnen, J.T., Dalgleish, R., Maglott, D.R., Hart, R.K., Greenblatt, M.S., McGowan-Jordan, J., Roux, A.-F., Smith, T., Antonarakis, S.E., Taschner, P.E.M., on behalf of the Human Genome Variation Society (HGVS), the Human Variome Project (HVP), and the Human Genome Organisation (HUGO), 2016. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human Mutation* 37, 564–569.
- Dreval, K., Thomas, N., Gerhard, D.S., Hilton, L.K., Wong, J., Abramson, J.S., Bartlett, N.L., Bethony, J., Bowen, J., Bryan, A.C., Casper, C., Dyer, M., Gastier-Foster, J.M., Grande, B.M., Greiner, T., Griner, N.B., Gross, T.G., Harris, N.L., Irvin, J.D., Jaffe, E., Leal, F., Martin, J.P., Martin, M.-R., Mbulaiteye, S.M., Mullighan, C.G., Mungall, A.J., Mungall, K., Namirembe, C., Noy, A., Ogwang, M.D., Orem, J., Petrello, H., Reynolds, S.J., Swerdlow, S.H., Traverse-Glehen, A., Wilson, W.H., Marra, M.A., Staudt, L.M., Scott, D.W., Morin, R.D., 2021. COPY NUMBER VARIATION ANALYSIS IDENTIFIES DISTINCT GENOMIC FEATURES IN ADULT BURKITT LYMPHOMA. *Hematological Oncology* 39, hon.67\_2879.
- Dunleavy, K., 2018. Approach to the Diagnosis and Treatment of Adult Burkitt's Lymphoma. *JOP* 14, 665–671.
- Elgaafary, S., López, C., Nagel, I., Vater, I., Bens, S., Szczepanowski, M., Aukema, S.M., Wagener, R., Hopp, L., Binder, H., de Leval, L., Klapper, W., Siebert, R., 2021. Molecular characterization of Burkitt lymphoma in the breast or ovary. *Leukemia & Lymphoma* 62, 2120–2129.
- Gebauer, N., Witte, H.M., Merz, H., Oschlies, I., Klapper, W., Caliebe, A., Tharun, L., Spielmann, M., von Bubnoff, N., Feller, A.C., Murga Penas, E.M., 2021. Aggressive B-cell lymphoma cases with 11q aberration patterns indicate a spectrum beyond Burkitt-like lymphoma. *Blood Adv* 5, 5220–5225.
- Grande, B.M., Gerhard, D.S., Jiang, A., Griner, N.B., Abramson, J.S., Alexander, T.B., Allen, H., Ayers, L.W., Bethony, J.M., Bhatia, K., Bowen, J., Casper, C., Choi, J.K., Culibrk, L., Davidsen, T.M., Dyer, M.A., Gastier-Foster, J.M., Gesuwan, P., Greiner, T.C., Gross, T.G., Hanf, B., Harris, N.L., He, Y., Irvin, J.D., Jaffe, E.S., Jones, S.J.M., Kerchan, P., Knoetze, N., Leal, F.E., Lichtenberg, T.M., Ma, Y., Martin, J.P., Martin,

- M.-R., Mbulaiteye, S.M., Mullighan, C.G., Mungall, A.J., Namirembe, C., Novik, K., Noy, A., Ogwang, M.D., Omoding, A., Orem, J., Reynolds, S.J., Rushton, C.K., Sandlund, J.T., Schmitz, R., Taylor, C., Wilson, W.H., Wright, G.W., Zhao, E.Y., Marra, M.A., Morin, R.D., Staudt, L.M., 2019. Genome-wide discovery of somatic coding and noncoding mutations in pediatric endemic and sporadic Burkitt lymphoma. *Blood* 133, 1313–1324.
- Gudmundsson, S., Singer-Berk, M., Watts, N.A., Phu, W., Goodrich, J.K., Solomonson, M., Genome Aggregation Database Consortium, Rehm, H.L., MacArthur, D.G., O'Donnell-Luria, A., 2022. Variant interpretation using population databases: Lessons from gnomAD. *Human Mutation* 43, 1012–1030.
- Haluska, F.G., Finver, S., Tsujimoto, Y., Croce, C.M., 1986. The t(8; 14) chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results from mistakes in V-D-J joining. *Nature* 324, 158–161.
- Haralambieva, E., Boerma, E.-J., van Imhoff, G.W., Rosati, S., Schuurin, E., Muller-Hermelink, H.K., Kluin, P.M., Ott, G., 2005. Clinical, Immunophenotypic, and Genetic Analysis of Adult Lymphomas With Morphologic Features of Burkitt Lymphoma. *Am J Surg Pathol* 29, 9.
- Havelange, V., Pepermans, X., Ameye, G., Théate, I., Callet-Bauchu, E., Barin, C., Penther, D., Lippert, E., Michaux, L., Mugneret, F., Dastugue, N., Raphaël, M., Vikkula, M., Poirel, H.A., 2016. Genetic differences between paediatric and adult Burkitt lymphomas. *Br J Haematol* 173, 137–144.
- Hummel, M., Bentink, S., Berger, H., Klapper, W., Wessendorf, S., Barth, T.F.E., Bernd, H.-W., Cogliatti, S.B., Dierlamm, J., Feller, A.C., Hansmann, M.-L., Haralambieva, E., Harder, L., Hasenclever, D., Kühn, M., Lenze, D., Lichter, P., Martin-Subero, J.I., Möller, P., Müller-Hermelink, H.-K., Ott, G., Parwaresch, R.M., Pott, C., Rosenwald, A., Rosolowski, M., Schwaenen, C., Stürzenhofecker, B., Szczepanowski, M., Trautmann, H., Wacker, H.-H., Spang, R., Loeffler, M., Trümper, L., Stein, H., Siebert, R., 2006. A Biologic Definition of Burkitt's Lymphoma from Transcriptional and Genomic Profiling. *N Engl J Med* 354, 2419–2430.
- Hüttl, K.S., Staiger, A.M., Richter, J., Ott, M.M., Kalmbach, S., Klapper, W., Biesdorf, A.-S., Trümper, L., Rosenwald, A., Ziepert, M., Horn, H., Ott, G., 2021. The “Burkitt-like” immunophenotype and genotype is rarely encountered in diffuse large B cell lymphoma and high-grade B cell lymphoma, NOS. *Virchows Arch* 479, 575–583.
- Kalatskaya, I., Trinh, Q.M., Spears, M., McPherson, J.D., Bartlett, J.M.S., Stein, L., 2017. ISOWN: accurate somatic mutation identification in the absence of normal tissue controls. *Genome Med* 9, 59.
- Karajannis, M.A., Hummel, M., Oschlies, I., Anagnostopoulos, I., Zimmermann, M., Stein, H., Parwaresch, R., Reiter, A., 2003. Epstein-Barr virus infection in Western European pediatric non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 102, 4244–4244.
- Kaymaz, Y., Oduor, C.I., Yu, H., Otieno, J.A., Ong'echa, J.M., Moormann, A.M., Bailey, J.A., 2017. Comprehensive Transcriptome and Mutational Profiling of Endemic Burkitt Lymphoma Reveals EBV Type-Specific Differences. *Mol Cancer Res* 15, 563–576.
- Kitts, A., Sherry, S., 2002 (Updated 2011). Chapter 5. The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation. In: McEntyre J., Ostell J. (Hrsg.). *The NCBI Handbook*, 2. Auflage, National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).

- Klapper, W., Kreuz, M., Kohler, C.W., Burkhardt, B., Szczepanowski, M., Salaverria, I., Hummel, M., Loeffler, M., Pellissery, S., Woessmann, W., Schwanen, C., Trumper, L., Wessendorf, S., Spang, R., Hasenclever, D., Siebert, R., for the Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe, 2012. Patient age at diagnosis is associated with the molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 119, 1882–1887.
- Klapper, W., Szczepanowski, M., Burkhardt, B., Berger, H., Rosolowski, M., Bentink, S., Schwaenen, C., Wessendorf, S., Spang, R., Möller, P., Hansmann, M.L., Bernd, H.-W., Ott, G., Hummel, M., Stein, H., Loeffler, M., Trümper, L., Zimmermann, M., Reiter, A., Siebert, R., 2008. Molecular profiling of pediatric mature B-cell lymphoma treated in population-based prospective clinical trials. *Blood* 112, 1374–1381.
- Klapproth, K., Wirth, T., 2010. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis: Review. *British Journal of Haematology* 149, 484–497.
- Kretzmer, H., Bernhart, S.H., Wang, W., Haake, A., Weniger, M.A., Bergmann, A.K., Betts, M.J., Carrillo-de-Santa-Pau, E., Doose, G., Gutwein, J., Richter, J., Hovestadt, V., Huang, B., Rico, D., Jühling, F., Kolarova, J., Lu, Q., Otto, C., Wagener, R., Arnolds, J., Burkhardt, B., Claviez, A., Drexler, H.G., Eberth, S., Eils, R., Flicek, P., Haas, S., Hummel, M., Karsch, D., Kerstens, H.H.D., Klapper, W., Kreuz, M., Lawerenz, C., Lenze, D., Loeffler, M., López, C., MacLeod, R.A.F., Martens, J.H.A., Kulis, M., Martín-Subero, J.I., Möller, P., Nagel, I., Picelli, S., Vater, I., Rohde, M., Rosenstiel, P., Rosolowski, M., Russell, R.B., Schilhabel, M., Schlesner, M., Stadler, P.F., Szczepanowski, M., Trümper, L., Stunnenberg, H.G., Küppers, R., Ammerpohl, O., Lichter, P., Siebert, R., Hoffmann, S., Radlwimmer, B., 2015. DNA methylome analysis in Burkitt and follicular lymphomas identifies differentially methylated regions linked to somatic mutation and transcriptional control. *Nat Genet* 47, 1316–1325.
- Lee, S., Day, N.S., Miles, R.R., Perkins, S.L., Lim, M.S., Ayello, J., van de Ven, C., Harrison, L., El-Mallawany, N.K., Goldman, S., Cairo, M.S., 2017. Comparative genomic expression signatures of signal transduction pathways and targets in paediatric Burkitt lymphoma: a Children's Oncology Group report. *Br J Haematol* 177, 601–611.
- Loeffler-Wirth, H., Kreuz, M., Hopp, L., Arakelyan, A., Haake, A., Cogliatti, S.B., Feller, A.C., Hansmann, M.-L., Lenze, D., Möller, P., Müller-Hermelink, H.K., Fortenbacher, E., Willscher, E., Ott, G., Rosenwald, A., Pott, C., Schwaenen, C., Trautmann, H., Wessendorf, S., Stein, H., Szczepanowski, M., Trümper, L., Hummel, M., Klapper, W., Siebert, R., Loeffler, M., Binder, H., 2019. A modular transcriptome map of mature B cell lymphomas. *Genome Med* 11, 27.
- López, C., Kleinheinz, K., Aukema, S.M., Rohde, M., Bernhart, S.H., Hübschmann, D., Wagener, R., Toprak, U.H., Raimondi, F., Kreuz, M., Waszak, S.M., Huang, Z., Sieverling, L., Paramasivam, N., Seufert, J., Sungalee, S., Russell, R.B., Bausinger, J., Kretzmer, H., Ammerpohl, O., Bergmann, A.K., Binder, H., Borkhardt, A., Brors, B., Claviez, A., Doose, G., Feuerbach, L., Haake, A., Hansmann, M.-L., Hoell, J., Hummel, M., Korbel, J.O., Lawerenz, C., Lenze, D., Radlwimmer, B., Richter, J., Rosenstiel, P., Rosenwald, A., Schilhabel, M.B., Stein, H., Stilgenbauer, S., Stadler, P.F., Szczepanowski, M., Weniger, M.A., Zapatka, M., Eils, R., Lichter, P., Loeffler, M., Möller, P., Trümper, L., Klapper, W., Hoffmann, S., Küppers, R., Burkhardt, B., Schlesner, M., Siebert, R., 2019. Genomic and transcriptomic changes complement each other in the pathogenesis of sporadic Burkitt lymphoma. *Nat Commun* 10, 1459.
- Love, C., Sun, Z., Jima, D., Li, G., Zhang, J., Miles, R., Richards, K.L., Dunphy, C.H., Choi, W.W.L., Srivastava, G., Lugar, P.L., Rizzieri, D.A., Lagoo, A.S., Bernal-Mizrachi, L., Mann, K.P., Flowers, C.R., Naresh, K.N., Evens, A.M., Chadburn, A., Gordon, L.I.,

- Czader, M.B., Gill, J.I., Hsi, E.D., Greenough, A., Moffitt, A.B., McKinney, M., Banerjee, A., Grubor, V., Levy, S., Dunson, D.B., Dave, S.S., 2012. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat Genet* 44, 1321–1325.
- Masqué-Soler, N., Szczepanowski, M., Kohler, C.W., Aukema, S.M., Nagel, I., Richter, J., Siebert, R., Spang, R., Burkhardt, B., Klapper, W., 2015. Clinical and pathological features of Burkitt lymphoma showing expression of BCL2 - an analysis including gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Br J Haematol* 171, 501–508.
- Masqué-Soler, N., Szczepanowski, M., Kohler, C.W., Spang, R., Klapper, W., 2013. Molecular classification of mature aggressive B-cell lymphoma using digital multiplexed gene expression on formalin-fixed paraffin-embedded biopsy specimens. *Blood* 122, 1985–1986.
- Mbulaiteye, S.M., Anderson, W.F., Bhatia, K., Rosenberg, P.S., Linet, M.S., Devesa, S.S., 2010. Trimodal age-specific incidence patterns for Burkitt lymphoma in the United States, 1973-2005. *Int. J. Cancer NA-NA*.
- Mbulaiteye, S.M., Anderson, W.F., Ferlay, J., Bhatia, K., Chang, C., Rosenberg, P.S., Devesa, S.S., Parkin, D.M., 2012. Pediatric, elderly, and emerging adult-onset peaks in Burkitt's lymphoma incidence diagnosed in four continents, excluding Africa. *Am. J. Hematol.* 87, 573–578.
- Minard-Colin, V., Brugières, L., Reiter, A., Cairo, M.S., Gross, T.G., Woessmann, W., Burkhardt, B., Sandlund, J.T., Williams, D., Pillon, M., Horibe, K., Auperin, A., Le Deley, M.-C., Zimmerman, M., Perkins, S.L., Raphael, M., Lamant, L., Klapper, W., Mussolin, L., Poirel, H.A., Macintyre, E., Damm-Welk, C., Rosolen, A., Patte, C., 2015. Non-Hodgkin Lymphoma in Children and Adolescents: Progress Through Effective Collaboration, Current Knowledge, and Challenges Ahead. *J Clin Oncol* 33, 2963–2974.
- Modi, A., Vai, S., Caramelli, D., Lari, M., 2021. The Illumina Sequencing Protocol and the NovaSeq 6000 System, in: Mengoni, A., Bacci, G., Fondi, M. (Eds.), *Bacterial Pangenomics, Methods in Molecular Biology*. Springer US, New York, NY, pp. 15–42.
- Möker, P., zur Stadt, U., Zimmermann, M., Alawi, M., Mueller, S., Finger, J., Knörr, F., Riquelme, A., Oschlies, I., Klapper, W., Bradtke, J., Burkhardt, B., Woessmann, W., Damm-Welk, C., 2022. Characterization of IG-MYC-breakpoints and their application for quantitative minimal disease monitoring in high-risk pediatric Burkitt-lymphoma and -leukemia. *Leukemia* 36, 2343–2346.
- Molyneux, E.M., Rochford, R., Griffin, B., Newton, R., Jackson, G., Menon, G., Harrison, C.J., Israels, T., Bailey, S., 2012. Burkitt's lymphoma. *The Lancet* 379, 1234–1244.
- Morton, L.M., Wang, S.S., Devesa, S.S., Hartge, P., Weisenburger, D.D., Linet, M.S., 2006. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 107, 265–276.
- Navarro Gonzalez, J., Zweig, A.S., Speir, M.L., Schmelter, D., Rosenbloom, K.R., Raney, B.J., Powell, C.C., Nassar, L.R., Maulding, N.D., Lee, C.M., Lee, B.T., Hinrichs, A.S., Fyfe, A.C., Fernandes, J.D., Diekhans, M., Clawson, H., Casper, J., Benet-Pagès, A., Barber, G.P., Haussler, D., Kuhn, R.M., Haeussler, M., Kent, W.J., 2021. The UCSC Genome Browser database: 2021 update. *Nucleic Acids Research* 49, D1046–D1057.
- Palomero, J., Vegliante, M.C., Eguileor, A., Rodríguez, M.L., Balsas, P., Martínez, D.,

- Campo, E., Amador, V., 2016. SOX11 defines two different subtypes of mantle cell lymphoma through transcriptional regulation of BCL6. *Leukemia* 30, 1596–1599.
- Panea, R.I., Love, C.L., Shingleton, J.R., Reddy, A., Bailey, J.A., Moormann, A.M., Otieno, J.A., Ong'echa, J.M., Oduor, C.I., Schroeder, K.M.S., Masalu, N., Chao, N.J., Agajanian, M., Major, M.B., Fedoriw, Y., Richards, K.L., Rymkiewicz, G., Miles, R.R., Alobeid, B., Bhagat, G., Flowers, C.R., Ondrejka, S.L., Hsi, E.D., Choi, W.W.L., Au-Yeung, R.K.H., Hartmann, W., Lenz, G., Meyerson, H., Lin, Y.-Y., Zhuang, Y., Luftig, M.A., Waldrop, A., Dave, T., Thakkar, D., Sahay, H., Li, G., Palus, B.C., Seshadri, V., Kim, S.Y., Gascoyne, R.D., Levy, S., Mukhopadhyay, M., Dunson, D.B., Dave, S.S., 2019. The whole genome landscape of Burkitt lymphoma subtypes. *Blood* 130, 1880.
- Pasqualucci, L., Dalla-Favera, R., 2018. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 131, 13.
- Paul, U., Richter, J., Stuhlmann-Laiesz, C., Kreuz, M., Nagel, I., Horn, H., Staiger, A.M., Aukema, S.M., Hummel, M., Ott, G., Spang, R., Rosenwald, A., Feller, A.C., Cogliatti, S., Stein, H., Hansmann, M.-L., Moller, P., Szczepanowski, M., Burkhardt, B., Pfreundschuh, M., Schmitz, N., Loeffler, M., Trümper, L., Siebert, R., Klapper, W., 2018. Advanced patient age at diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma is associated with molecular characteristics including ABC-subtype and high expression of MYC. *Leukemia & Lymphoma* 59, 1213–1221.
- Peng, Q., Vijaya Satya, R., Lewis, M., Randad, P., Wang, Y., 2015. Reducing amplification artifacts in high multiplex amplicon sequencing by using molecular barcodes. *BMC Genomics* 16, 589.
- Pschyrembel, W., 2020. *Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch*, 268. Auflage, De Gruyter, Berlin.
- Reddy, A., Zhang, J., Davis, N.S., Moffitt, A.B., Love, C.L., Waldrop, A., Leppa, S., Pasanen, A., Meriranta, L., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Nørgaard, P., Pedersen, M., Gang, A.O., Høgdall, E., Heavican, T.B., Lone, W., Iqbal, J., Qin, Q., Li, G., Kim, S.Y., Healy, J., Richards, K.L., Fedoriw, Y., Bernal-Mizrachi, L., Koff, J.L., Staton, A.D., Flowers, C.R., Paltiel, O., Goldschmidt, N., Calaminici, M., Clear, A., Gribben, J., Nguyen, E., Czader, M.B., Ondrejka, S.L., Collie, A., Hsi, E.D., Tse, E., Au-Yeung, R.K.H., Kwong, Y.-L., Srivastava, G., Choi, W.W.L., Evens, A.M., Pilichowska, M., Sengar, M., Reddy, N., Li, S., Chadburn, A., Gordon, L.I., Jaffe, E.S., Levy, S., Rempel, R., Tzeng, T., Happ, L.E., Dave, T., Rajagopalan, D., Datta, J., Dunson, D.B., Dave, S.S., 2017. Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell* 171, 481-494.e15.
- Richter, J., John, K., Staiger, A.M., Rosenwald, A., Kurz, K., Michgehl, U., Ott, G., Franzenburg, S., Kohler, C., Finger, J., Oschlies, I., Paul, U., Siebert, R., Spang, R., Burkhardt, B., Klapper, W., 2022. Epstein–Barr virus status of sporadic Burkitt lymphoma is associated with patient age and mutational features. *Br J Haematol* 196, 681–689.
- Richter, J., Schlesner, M., Hoffmann, S., Kreuz, M., Leich, E., Burkhardt, B., Rosolowski, M., Ammerpohl, O., Wagener, R., Bernhart, S.H., Lenze, D., Szczepanowski, M., Paulsen, M., Lipinski, S., Russell, R.B., Adam-Klages, S., Apic, G., Claviez, A., Hasenclever, D., Hovestadt, V., Hornig, N., Korbel, J.O., Kube, D., Langenberger, D., Lawrenz, C., Lisfeld, J., Meyer, J., Picelli, S., Pischmarov, J., Radlwimmer, B., Rausch, T., Rohde, M., Schilhabel, M., Scholtysik, R., Spang, R., Trautmann, H., Zenz, T., Borkhardt, A., Drexler, H.G., Möller, P., MacLeod, R.A.F., Pott, C.,

- Schreiber, S., Trümper, L., Loeffler, M., Stadler, P.F., Lichter, P., Eils, R., Küppers, R., Hummel, M., Klapper, W., Rosenstiel, P., Rosenwald, A., Brors, B., Siebert, R., 2012. Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet* 44, 1316–1320.
- Rohde, M., Bonn, B.R., Zimmermann, M., Lange, J., Möricke, A., Klapper, W., Oschlies, I., Szczepanowski, M., Nagel, I., Schrappe, M., MMML-MYC-SYS Project, ICGC MMML-Seq Project, Loeffler, M., Siebert, R., Reiter, A., Burkhardt, B., 2017. Relevance of ID3-TCF3-CCND3 pathway mutations in pediatric aggressive B-cell lymphoma treated according to the non-Hodgkin Lymphoma Berlin-Frankfurt-Münster protocols. *Haematologica* 102, 1091–1098.
- Salaverria, I., Martin-Guerrero, I., Wagener, R., Kreuz, M., Kohler, C.W., Richter, J., Pienkowska-Grela, B., Adam, P., Burkhardt, B., Claviez, A., Damm-Welk, C., Drexler, H.G., Hummel, M., Jaffe, E.S., Küppers, R., Lefebvre, C., Lisfeld, J., Löffler, M., Macleod, R.A.F., Nagel, I., Oschlies, I., Rosolowski, M., Russell, R.B., Rymkiewicz, G., Schindler, D., Schlesner, M., Scholtysik, R., Schwaenen, C., Spang, R., Szczepanowski, M., Trümper, L., Vater, I., Wessendorf, S., Klapper, W., Siebert, R., 2014. A recurrent 11q aberration pattern characterizes a subset of MYC-negative high-grade B-cell lymphomas resembling Burkitt lymphoma. *Blood* 123, 1187–1198.
- Satou, A., Asano, N., Nakazawa, A., Osumi, T., Tsurusawa, M., Ishiguro, A., Elsayed, A.A., Nakamura, N., Ohshima, K., Kinoshita, T., Nakamura, S., 2015. Epstein-Barr Virus (EBV)-positive Sporadic Burkitt Lymphoma: An Age-related Lymphoproliferative Disorder? *American Journal of Surgical Pathology* 39, 227–235.
- Satou, A., Nakamura, N., Miyoshi, H., Nakamura, S., 2017. Prognostic Impact of MUM1/IRF4 Expression in Burkitt Lymphoma (BL). *Am J Surg Pathol* 41, 7.
- Schmitz, R., Young, R.M., Ceribelli, M., Jhavar, S., Xiao, W., Zhang, M., Wright, G., Shaffer, A.L., Hodson, D.J., Buras, E., Liu, X., Powell, J., Yang, Y., Xu, W., Zhao, H., Kohlhammer, H., Rosenwald, A., Kluin, P., Müller-Hermelink, H.K., Ott, G., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Rimsza, L.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Delabie, J., Smeland, E.B., Olgwang, M.D., Reynolds, S.J., Fisher, R.I., Braziel, R.M., Tubbs, R.R., Cook, J.R., Weisenburger, D.D., Chan, W.C., Pittaluga, S., Wilson, W., Waldmann, T.A., Rowe, M., Mbulaiteye, S.M., Rickinson, A.B., Staudt, L.M., 2012. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 490, 116–120.
- Strom, S.P., 2016. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biol Med* 13, 3–11.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J. (Eds.), 2017. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Revised 4th edition. ed, World Health Organization classification of tumours. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Tate, J.G., Bamford, S., Jubb, H.C., Sondka, Z., Beare, D.M., Bindal, N., Boutselakis, H., Cole, C.G., Creatore, C., Dawson, E., Fish, P., Harsha, B., Hathaway, C., Jupe, S.C., Kok, C.Y., Noble, K., Ponting, L., Ramshaw, C.C., Rye, C.E., Speedy, H.E., Stefancsik, R., Thompson, S.L., Wang, S., Ward, S., Campbell, P.J., Forbes, S.A., 2019. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research* 47, D941–D947.
- Thomas, N., Dreval, K., Gerhard, D.S., Hilton, L.K., Abramson, J.S., Barta, S.K., Bartlett, N.L., Bethony, J., Bhatia, K., Bowen, J., Bryan, A.C., Cesarman, E., Casper, C., Cruz,



- M., Dyer, M., Farinha, P., Gastier-Foster, J., Gerrie, A.S., Grande, B., Greiner, T.C., Griner, N., Gross, T.G., Harris, N.L., Irvin, J. d, Jaffe, E.S., Henry, D., Huppi, R.L., Leal, F.E., Lee, M., Martin, J.P., Martin, M.-R., Mbulaiteye, S.M., Mitsuyasu, R., Morris, V., Mullighan, C.G., Mungall, A.J., Mungall, K., Mutyaba, I., Nokta, M., Namirembe, C., Noy, A., Ogwang, M.D., Omoding, A., Orem, J., Ott, G., Petrello, H., Pittaluga, S., Phelan, J.D., Ramos, J.C., Ratner, L., Reynolds, S.J., Rubinstein, P.G., Sissolak, G., Slack, G.W., Soudi, S., Swerdlow, S.H., Traverse-Glehen, A., Wilson, W., Wong, J.C.H., Yarchoan, R., ZenKlusen, J.C., Marra, M.A., Staudt, L.M., Scott, D.W., Morin, R.D., 2022. GENETIC SUBGROUPS INFORM ON PATHOBIOLOGY IN ADULT AND PEDIATRIC BURKITT LYMPHOMA. *Blood* 137, 16534.
- Wästerlid, T., Nordström, L., Freiburghaus, C., Pedersen, M., Nørgaard, P., Gang, A.O., Brown, P., Dictor, M., Jerkeman, M., Ek, S., 2017. Frequency and clinical implications of SOX11 expression in Burkitt lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 58, 1760–1763.
- Woessmann, W., Zimmermann, M., Meinhardt, A., Mueller, S., Hauch, H., Knörr, F., Oshlies, I., Klapper, W., Niggli, F., Kabickova, E., Attarbaschi, A., Reiter, A., Burkhardt, B., 2020. Progressive or Relapsed Burkitt Lymphoma or Leukemia in Children and Adolescents after BFM-type First-line Therapy. *Blood* 136, 3591.
- Zhou, P., Blain, A.E., Newman, A.M., Zaka, M., Chagaluka, G., Adlar, F.R., Offor, U.T., Broadbent, C., Chaytor, L., Whitehead, A., Hall, A., O'Connor, H., Van Noorden, S., Lampert, I., Bailey, S., Molyneux, E., Bacon, C.M., Bomken, S., Rand, V., 2019. Sporadic and endemic Burkitt lymphoma have frequent FOXO1 mutations but distinct hotspots in the AKT recognition motif. *Blood Advances* 3, 2118–2127.

## **8 Danksagungen**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertationsarbeit beigetragen haben.

Großer Dank gebührt zuerst meinem Doktorvater Prof. Dr. Klapper für die Überlassung dieses Themas und seine große fachliche Unterstützung am Fortgang dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Julia Richter für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Ich danke ihr für ihre unschätzbare Zusammenarbeit und ihre unermüdliche Unterstützung in wissenschaftlichen und technischen Fragen. Zudem danke ich ihr für die rasche Rückmeldung bei Problemen und Fragen über zuletzt auch weitere Distanzen hinweg.

Ein großes Dankeschön an die gesamte Arbeitsgruppe des Lymphomregisters des Pathologischen Instituts des UKSH Campus Kiel, welches mich vom ersten Tag an herzlich aufgenommen hat und mich bei vielen Aufgaben unterstützt hat. Ich danke ihnen insbesondere für die Durchführung der Mutations- und Genexpressionsanalysen, histologischer Färbungen und weiterer labortechnischer Analysen. Danke an Charlotte Botz-Von Drathen, Dana Germer, Lorena Valles Uriarte und Raina Zühlke-Jenisch.

Ich danke dem Pathologischen Institut des UKSH für die Überlassung von Patientenfällen. Zudem bedanke ich mich bei allen Kooperationspartnern, insbesondere Prof. Andreas Rosenwald, Leiter des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg und Prof. German Ott, Leiter des Pathologischen Instituts des Klinikums Stuttgart, für die freundliche Zusendung von Probanden.

Schließlich möchte ich mich noch herzlich bei Dr. Christina Pham und M.Sc. Toni Lekić für ihre Hilfsbereitschaft, ermutigende Gespräche und umfassende Unterstützung bedanken.

## **9 Eidesstattliche Erklärung**

Mit meiner Unterschrift erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der im Literaturverzeichnis aufgeführten Quellen erarbeitet worden ist. Die Stellen meiner Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem Fall unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht. Die Angaben sind für jede einzelne Quelle als Fußnote mit Verweis auf die Quelle aufgeführt. Dasselbe gilt sinngemäß für Tabellen, Karten und Abbildungen, auch solche, die aus Internetquellen stammen.

## 10 Publikationen der Ergebnisse

### Veröffentlichte Paper

Richter, J., John, K., Staiger, A.M., Rosenwald, A., Kurz, K., Michgehl, U., Ott, G., Franzenburg, S., Kohler, C., Finger, J., Oschlies, I., Paul, U., Siebert, R., Spang, R., Burkhardt, B., Klapper, W., 2022. **Epstein–Barr virus status of sporadic Burkitt lymphoma is associated with patient age and mutational features.** British Journal of Haematology 196, 681–689.

### Veröffentlichte Poster

K. John, U. Paul, A. M. Staiger, B. Burkhardt, A. Rosenwald, G. Ott, M. Szczepanowski, W. Klapper, J. Richter., 2021. **Molecular characteristics of Burkitt lymphoma in pediatric and adult patients.** Virtuelle Pathologietage der DGP 2021, 8.-12. Juni 2021.