



# Technische Universität München

## Fakultät für Medizin

Quantifizierung zirkulierender zellfreier Tumor- DNA im peripheren Blut und Therapiemonitoring bei fortgeschrittenen B-Zell-Lymphomen durch ein Kombinationsverfahren aus Next Generation Sequencing und digitaler Polymerasekettenreaktion

Ludwig Korbinian Jägerhuber

Vollständiger Abdruck der von der  
Fakultät für Medizin

der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Marcus Makowski

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Jürgen Ruland
2. Prof. Dr. Franz Schilling

Die Dissertation wurde am 6.10.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.05.2022 angenommen

Meiner Familie und Unterzeismering gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND .....</b>	<b>6</b>
1.1 NON-HODGKIN B-ZELL LYMPHOME .....	6
1.1.1 Diffus großzelliges B-Zell Lymphom.....	8
1.1.2 Follikuläres Lymphom .....	17
1.2 LIQUID BIOPSY .....	22
1.2.1 Mechanismen der Entstehung von Mutationen in der DNA .....	22
1.2.2 Liquid Biopsy.....	26
1.2.3 Anwendung von Liquid Biopsy bei Non-Hodgkin Lymphomen.....	36
<b>2 PROBLEMSTELLUNG .....</b>	<b>41</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>43</b>
3.1 STUDIENPOPULATION .....	43
3.2 PROBENMATERIAL .....	44
3.3 KLINISCHE PARAMETER.....	46
3.4 DNA SEQUENZIERUNG MITTELS „NEXT GENERATION SEQUENCING“ .....	46
3.5 AVENIO KIT VON ROCHE.....	51
3.6 PCR METHODEN.....	54
3.6.1 Primer- und Sondendesign .....	58
3.6.2 Ablauf ddPCR.....	66
3.7 DATENBANKEN .....	68
3.8 AUSWERTUNG DER NGS ERGEBNISSE .....	71
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>75</b>
4.1 LYM01 .....	75
4.1.1 Patientenhistorie .....	75
4.1.2 Avenio Kit Roche NGS.....	78
4.1.3 DdPCR Ergebnisse.....	85
4.2 LYM02 .....	90
4.2.1 Patientenhistorie .....	90
4.2.2 NGS.....	93
4.2.3 DdPCR.....	94
4.3 LYM03 .....	95
4.3.1 Patientenhistorie .....	95
4.3.2 NGS.....	98
4.3.3 DdPCR.....	98
<b>5 DISKUSSION.....</b>	<b>101</b>
5.1 LYM01 .....	101
5.2 LYM02 .....	107
5.3 LYM03 .....	109
5.4 LIMITATIONEN UND VERBESSERUNGEN .....	112
5.5 ABSCHLIEßENDE BEURTEILUNG.....	115
<b>6 AUSBLICK .....</b>	<b>117</b>
<b>7 TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>118</b>
<b>8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>119</b>
<b>9 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>120</b>
<b>10 DANKSAGUNG.....</b>	<b>131</b>
<b>11 ANHANG .....</b>	<b>132</b>

# Abkürzungsverzeichnis

ABC	activated B-cell-like
AF	Allelfrequenz
AK	Allelkonzentration
AMG	Azido-Methylgruppe
AML	Akute Myeloische Leukämie
BEAM	Carmustin, Etoposid, Ara-C, Melphalan
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
cfDNA	zellfreie DNA
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CNV	Copy number variants
COO	Cells of origin
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CSF	Colony stimulating factor
csv	comma separated values
CT	Computertomographie
CTC	Zirkulierende Tumorzellen
ctDNA	zellfreie tumor-DNA
ddNTP	Didesoxyribonukleotide
ddPCR	digital-droplet PCR
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologische Erkrankungen
DLBCL	Diffus großes B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FDA	Food and Drug Administration
FDG18	18-Flourdesoxyglukose
FL	Follikuläres Lymphom
FLIPI	Follicular Lymphoma International Prognostic Index

GCB	germinal center B-cell-like
gDNA	genomische DNA
GEP	Gene Expression Profiling
Hb	Hämoglobin
HL	Hodgkin Lymphom
IPI	Internationaler Prognostischer Index
KM	Kontrastmittel
LB	Liquid Biopsy
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
LNA	Locked nucleic acid
LYMPHCIN	Studie am Klinikum rechts der Isar zu Lymphom und Liquid Biopsy
MAF	Minor-Allele-Frequency
MALT	Mucosa-associated-lymphatic-tissue
Mb	Megabasenpaare
MRD	Minimal residual disease
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PCR	Polymerase-chain-reaction
PET	Positronenemissionstomographie
R-CHOP	Rituximab und CHOP Schema
R-CHOP14	14-tägiges R-CHOP Schema
R-CHOP21	21-tägiges R-CHOP Schema
R-DHAP	Rituximab, Dexamethason, Ara-C, Cisplatin
R-ICE	Rituximab, Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
SNV	Single nucleotide variants
SOP	Standard operating procedures
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
VCF	variant call file

# 1 Wissenschaftlicher Hintergrund

## 1.1 Non-Hodgkin B-Zell Lymphome

Das folgende Kapitel befasst sich mit dem wissenschaftlichen Hintergrund des Promotionsvorhabens. Der erste Unterpunkt behandelt die Krankheitsbilder der Non-Hodgkin Lymphome (NHL). Im zweiten Unterpunkt wird die Thematik „Liquid Biopsy“ im Allgemeinen erläutert und im Speziellen Bezug auf den bisherigen Forschungsstand von Liquid Biopsy und NHL genommen.

Das Kapitel NHL gliedert sich in einen allgemeinen Teil, gefolgt von den spezifischen Krankheitsbildern des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) und des Follikulären Lymphoms (FL).

### **Definition**

Physiologischer Weise sind Lymphozyten Teil des spezifischen Abwehrsystems und lassen sich in B- und T-Zellen unterteilen, wobei rein morphologisch keine Unterscheidung möglich ist (Walzog & Fandrey, 2014, p. 279). B-Zellen bilden die Antikörper-vermittelte Immunantwort und T-Zellen sind für die spezifische zelluläre Immunantwort zuständig (Jelkmann, 2010, pp. 490-491). Pathophysiologisch führt eine unkontrollierte Proliferation von Lymphozyten zum Krankheitsbild eines Lymphoms, wobei insbesondere die aggressiven B-Zell-Lymphome durch ihr heterogenes Erscheinungsbild, klinisch wie molekular, charakterisiert sind (Campo, 2017). Lymphome werden in Hodgkin Lymphome (HL) und Non-Hodgkin Lymphome eingeteilt, wobei sich das HL vom NHL durch den Nachweis charakteristischer Riesenzellen (Reedberg-Stern-Zellen) und einkernigen Hodgkinzellen unterscheidet (Piper, 2013, p. 673). Die Gruppe der NHL umfasst alle lymphoproliferativen Erkrankungen der B-, T- oder natürlichen Killerzellreihen (NK), die definitionsgemäß kein Hodgkin Lymphom sind.

## Klassifikation

Die Klassifikation der Lymphome regelt die aktuell gültige Richtlinie (2016) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Swerdlow et al., 2016). Die Einteilung erfolgt nach dem Ursprung bzw. den Entwicklungsstadien der entarteten Zellen. B-Zell Lymphome sowie T- bzw. NK-Lymphome bilden zwei Hauptgruppen der Klassifikation. Zu den anderen drei übergeordneten Gruppen zählen das Hodgkin Lymphom, Lymphome nach Transplantationen (PTLD) und Neoplasien von histiozytären bzw. dendritischen Zellen (German Ott, 2017; Swerdlow et al., 2016). Die WHO Klassifikation listet über 40 verschiedene Tumorentitäten von B-Zell-Lymphomen auf, wobei generell zwischen aggressiven Lymphomen, wie dem DLBCL oder dem Burkittlymphom, und indolenten, wie dem Follikulären Lymphom oder die chronisch lymphatische Leukämie (CLL), unterschieden werden kann (Jiang, Bennani, & Feldman, 2017). Die sehr spezifische Differenzierung der Subtypen der Lymphome ist vergleichbar mit dem komplexen physiologischen Reifeprozess von Vorläuferzellen zu reifen Lymphozyten, bei der es theoretisch an jedem Differenzierungsschritt bei der Reifung der Lymphozyten zu einer Neoplasie kommen kann (Jiang et al., 2017). Zum einen ist der Ort der malignen Proliferation entscheidend. Das Mantelzelllymphom ist durch die Lage in der Mantelzone, das Follikuläre Lymphom durch seine Lage im Lymphfollikel des Lymphknotens gekennzeichnet. Zum anderen weisen die unterschiedlichen Subtypen eines B-Zell Lymphoms verschieden mutierte Signalwege und Oberflächenmarker auf. Entscheidend für eine weitere Subklassifikation ist das Wissen um den Ursprung des Tumors bzw. welche genetische Landschaft diesen kennzeichnet, festgestellt durch „Gene Expression Profiling“ (GEP) mit Microarrays (Campo, 2017; German Ott, 2017).

Eine Anpassung der Richtlinie aus dem Jahre 2008 wurde insbesondere durch den enormen Wissenszuwachs in Bezug auf die molekulare Landschaft der Lymphome nötig (Swerdlow et al., 2016). Während in der WHO-Klassifikation der Lymphome von 2008 noch die Existenz spezifischer Marker für Haarzelleukämie bestritt, ist mittlerweile bekannt, dass die BRAF V600E Mutation in fast allen Haarzelleukämien gefunden wird (Swerdlow et al., 2016; Tiacci et al., 2011). Ebenso verhält es sich mit dem Lymphoplasmozytischen Lymphom, dessen Gen-Mutation *MYD88* (L265P) in der früheren Fassung nicht bekannt war (Swerdlow et al., 2016; Treon et al., 2012). Diese beiden Tumorentitäten bilden im Bereich der Lymphome eher die

Ausnahme, da die Mehrheit keine einzelne spezifische Mutation enthält, sondern sich durch eine Vielzahl an verschiedenen Mutationen auszeichnen (L. Pasqualucci & Dalla-Favera, 2015). Für das DLBCL liegen neben den Unterscheidungen in ABC- und GCB-Typ noch weitere Subtypen wie vaskuläres oder das zentralnervöse DLBCL vor, sowie die Gruppe der „not otherwise specified“ (NOS, deutsch. „Nicht weiter spezifiziert“) (Jiang et al., 2017; Swerdlow et al., 2016).

Aufgrund der immer fortschrittlicheren Technik ist eine weitere spezifischere Unterteilung und Klassifikation der Lymphome in Zukunft vorstellbar und ist im weiteren Verlauf ein Schritt hin zu einer personalisierteren Tumorthherapie (Jiang et al., 2017). Trotz der Komplexität in der Differenzierung und Klassifikation von Lymphomen, ist sie unerlässlich für den klinischen Alltag.

### 1.1.1 Diffus großzelliges B-Zell Lymphom

Das folgende Kapitel befasst sich mit dem Krankheitsbild des Diffus großzelligen B-Zell Lymphoms. Exemplarisch wird am DLBCL der klinische Behandlungsverlauf gezeigt samt Diagnostik, Prognose, Stadieneinteilung, sowie Therapie, Verlauf und Nachsorge. Die Unterkapitel Diagnostik und Stadieneinteilung werden am DLBCL geschildert und können mit kleinen Abweichungen für das im darauffolgenden Kapitel angeführte Follikuläre Lymphom adaptiert werden.

#### **Epidemiologie**

In den USA erkrankten im Jahre 2005 93.429 Personen neu an einem Tumor des lymphatischen Gewebes und im selben Jahr starben rund 38.000 Patienten an dieser Diagnose (Morton et al., 2006). In Europa beträgt die altersangepasste, standardisierte Inzidenz für NHL rund 20-23/100 000 Fälle pro Jahr und das NHL ist unter den zehn häufigsten malignen Erkrankungen zu finden (Mercer et al., 2017; Sant et al., 2010). Das Robert-Koch Institut (RKI) hat für das Jahr 2016 die Anzahl der Neuerkrankungen an einem NHL in Deutschland mit rund 18 370 beziffert und mit 9830 Neuerkrankungen im Jahr 2016 sind etwas



mehr Männer als Frauen betroffen, wobei das mittlere Erkrankungsalter für Männer mit 70 Jahren und für Frauen mit 72 Jahren angegeben wird (Koch-Institut & e.V., 2019). Es wurde ein Anstieg in der Inzidenz von NHL in den letzten Jahren beobachtet und zukünftig wird mit einer steigenden Zahl an Neuerkrankungen pro Jahr gerechnet (Pulte et al., 2013). Dies spiegelt sich auch in der Prognose des RKI von 2015/16 für Deutschland für das Jahr 2020 wider, wo die geschätzte Inzidenz für NHL bei 20 300 Personen/Jahr liegen soll (Koch-Institut & e.V., 2019). Mit einem Anteil von rund 40% stellt das DLBCL die größte Gruppe unter den Non-Hodgkin Lymphomen dar (Coiffier, 2001; Illidge & Tolan, 2008; Shimono et al., 2018).

### Ätiologie

Ein spezifischer Auslöser für das Auftreten eines Lymphoms ist im Allgemeinen nicht bekannt, sodass eine multifaktorielle Genese bei der Entstehung zu berücksichtigen ist. Einzelne Faktoren wie beispielsweise Immunschwäche, Chemotherapie oder radioaktive Strahlung können das Risiko einer Erkrankung erhöhen, ebenso wie Viren und Bakterien, wie das in Afrika endemisch auftretende Burkitt-Lymphom, welches mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert ist (Koch-Institut & e.V., 2019). Das Auftreten eines „Mucosa-associated-lymphatic-tissue“ (MALT)-Lymphom ist mit einer Helicobacter Pylori Infektion assoziiert (Piper, 2013, p. 679). Ebenso kann ein erhöhtes Auftreten bei Familienangehörigen sowie Belastung mit Umweltgiften wie Benzol zur Erhöhung des Risikos für Lymphome beitragen, wobei die genauen Zusammenhänge derzeit noch nicht geklärt sind (Koch-Institut & e.V., 2019).

### Klassifikation

Das DLBCL kann molekulargenetisch in unterschiedliche Subtypen unterteilt werden. In der „Cells of origin“ (COO)- Klassifikation wird das DLBCL in einen „germinal center B-cell-like“ (GCB) und „activated B-cell-like“ (ABC) Typ anhand von Genen wie *CARD11*, *MYD88* oder *FBX011* unterschieden (Camus, Jardin, & Tilly, 2017; Lohr et al., 2012; Schuetz et al., 2012). Während der GCB-Typ eine dauerhafte Aktivierung des *PI3K* Signalweges und eine *BCL6* Überexpression aufweisen, dominiert bei ABC Tumoren die konstitutive Aktivierung des *NF-κB* Signalweges (Campo, 2017).

Die Differenzierung zwischen GCB- und ABC- Typ dient derzeit zu einer Prognoseabschätzung über den Krankheitsverlauf, wobei für den ABC-Typ eine schlechtere Krankheitsprognose beschrieben wurde (Campo, 2017).

### **Symptomatik**

Generell ist die Beschwerdesymptomatik einer lymphatischen Erkrankung relativ unspezifisch. Das Auftreten der sogenannten B-Symptomatik, darunter werden Symptome wie unspezifisches Fieber, ein vermehrtes Schwitzen in der Nacht, verstärkte Müdigkeit im Tagesverlauf und ungewollter Gewichtsverlust subsumiert, können allgemein ein Hinweis auf ein malignes Geschehen sein. Typisch für ein DLBCL sind eine schmerzlose, rasche Vergrößerung von Lymphknoten (LK), sowie eine extranodulare Tumorausbreitung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Piper, 2013, p. 680). Unstimmigkeiten im Labor wie eine neu diagnostizierte Anämie oder erhöhte Laktatdehydrogenase (LDH)-Werte können eine Diagnostik zwecks Tumorsuche in die Wege leiten. Neu aufgetretene, erhöhte Infektneigung oder Knochenschmerzen können ein Symptom einer lymphatischen Erkrankung sein (Michl, 2019).

### **Diagnostik**

Der Goldstandard zur Diagnosestellung ist laut der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen (DGHO) eine Biopsie aus dem Tumorgewebe und die anschließende Untersuchung auf histologisch, immunhistochemische, molekulare, sowie zytogenetische Merkmale (Dührsen, Fridrick, Klapper, & Schmitz, 2018). Bei histologischer Verdachtsdiagnose auf ein DLBCL gilt von Seiten der DGHO die Empfehlung an die Pathologie folgende diagnostische Untersuchungen zur weiteren molekularen Einteilung nach der WHO Klassifikation zu veranlassen (Dührsen et al., 2018; G. Ott et al., 2019):

- Die Testung auf den Oberflächenmarker CD-20 zwecks Nachweises auf Zuordnung zur B-Zell Linie bzw. mögliche therapeutische Interventionsmöglichkeit
- Testung auf MYC Mutation zwecks möglicher Zuordnung High-Grade DLBCL

- Bestimmung in GCB- oder ABC Typ anhand der COO-Klassifikation, wobei diese Klassifizierung derzeit ohne klinische Relevanz zu werten ist

### Stadieneinteilung

Eine auf 18-Fluordesoxyglukose (FDG18) basierende Positronen-Emissionstomographie (PET) in Verbindung mit einer Kontrastmittelgestützten Computertomographie (KM-CT) ist der Goldstandard bzw. Methode der Wahl für die Stadieneinteilung von NHL anzusehen, wobei sie der alleinigen KM-CT beim Staging überlegen ist (Cheson et al., 2014; Dührsen et al., 2018). Die Stadieneinteilung erfolgt nach der Einteilung nach Ann-Arbor und werden durch die Ergebnisse der Bildgebung bestimmt (Cheson et al., 2014). Die Ausbreitung bzw. das Befallsmuster, welche durch vergrößerte Lymphknoten oder gesteigerte Aufnahme des Tracers FDG festgestellt werden können, bestimmt das Stadium nach Ann-Arbor (Cheson et al., 2014). Vergrößerte LK sind gekennzeichnet durch einen Durchmesser von  $> 1.5\text{cm}$  und extranodale Manifestationen des Lymphoms müssen einen Durchmesser von  $> 1,0\text{cm}$  aufweisen (Cheson et al., 2014).

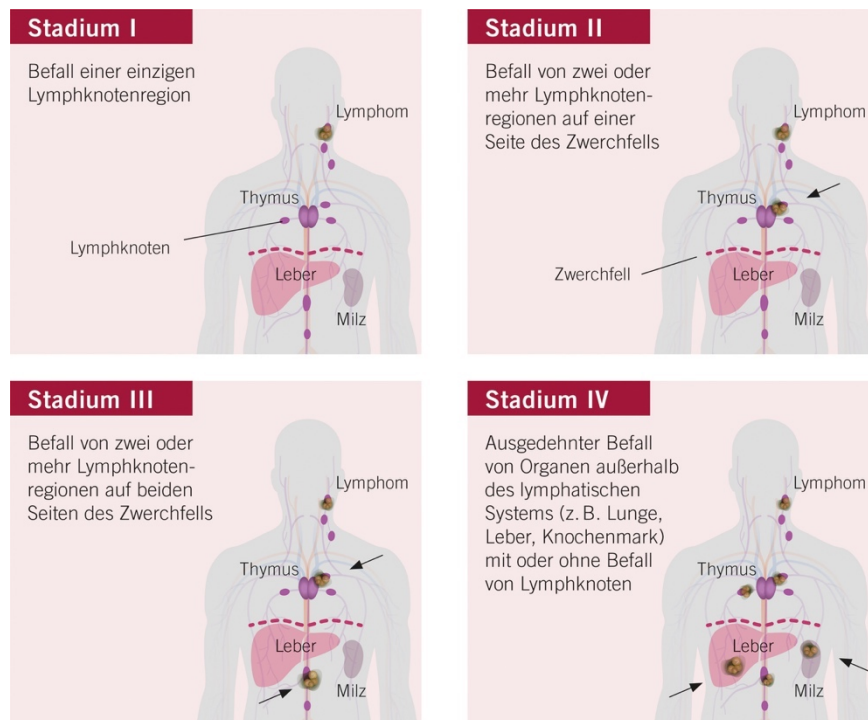


Abbildung 1-1 Ann-Arbor Klassifikation für maligne Lymphome

(Quelle: Leitlinienprogramm Onkologie, AWMF, 2013)

Es lassen sich insgesamt vier Stadien nach Ann-Arbor einteilen (siehe Abbildung). Bei der Einteilung nimmt das Diaphragma die zentrale Rolle ein. Ist die Manifestation des Lymphoms auf eine Seite des Diaphragmas mit Befall einer einzigen LK-Region (Stadium I) bzw. mehreren LK-Regionen (Stadium II) beschränkt, wird von einem limitierten Krankheitsbild gesprochen. Sind die Manifestationen kranial und kaudal des Diaphragmas (Stadium III) bzw. dazu noch extranodal (Stadium IV) nachzuweisen, wird dies als fortgeschrittenes Stadium bezeichnet. Eine ausgeprägte Ansammlung bzw. Masse von Lymphomgewebe wird als „bulk“ (zu deutsch „Masse“) benannt, wobei die genaue Größe, ab wann von einem bulk gesprochen wird, wissenschaftlich nicht genau geregelt ist und mit einem Größendurchmesser von 6-10cm beim DLBCL relativ vage definiert wird (Cheson et al., 2014; Michael Pfreundschuh et al., 2008). Das Vorliegen eines Tumorbulkes ist nicht ausschlaggebend für die Einordnung in ein limitiertes oder fortgeschrittenes Stadium (Cheson et al., 2014).

### **Prognostische Faktoren**

Der Internationale Prognostische Index (IPI) stellt ein Instrument zur Abschätzung der Prognose für NHL dar (Shipp & Harrington, 1993). Er enthält die fünf Kategorien Alter, Allgemeinzustand, LDH-Wert, Ann-Arbor-Stadium und extranodaler Organbefall. Bei jüngeren Patienten wird ein altersunabhängiger IPI mit den drei Faktoren LDH, Allgemeinzustand und Ann-Arbor-Stadium gebildet (Ziepert et al., 2010). Für jede der fünf Kategorien wird je nach zutreffendem Kriterium entweder kein oder ein Punkt vergeben.

Für jeden Patienten lässt sich ein Gesamtwert zwischen 0 und 5 aus den fünf Kategorien bilden. Diese Werte weisen jedem Lymphom eine von vier prognostischen Risikogruppen zu. Die Risikogruppen geben Aussagen zur Prognose hinsichtlich des 3-Jahresüberlebens (Shipp & Harrington, 1993). Ein hoher IPI Wert geht mit einer schlechteren Prognose einher (Cunningham et al., 2013).

Tabelle 1-1: IPI Score und Prognose

modifiziert nach (Ziepert et al., 2010)

	Alter	Allgemeinzustand	LDH	Ann-Arbor Stadium	Extranodaler Organbefall
<b>Günstiger Typ = 0 Punkte</b>	≤ 60 Jahre	ECOG 0-1	≤ oberer Normwert	Stadium I-II	0-1 Organ
<b>Ungünstiger Typ = 1 Punkt</b>	> 60 Jahre	ECOG > 1	> Oberer Normwert	Stadium III-IV	≥ 2 Organe
<b>Gesamtsumme</b>	0, 1	2	3	4	5
<b>IPI-Score</b>	I	II	III	IV	IV
<b>3-Jahres Überleben</b>	91,4%	80,9%	65,1%	59,0%	59,0%

Der 1992 eingeführte IPI-Score bezog sich damals auf ein Therapieregime mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon (CHOP) und kann auf das aktuelle Standard-Therapieschema mit Rituximab-CHOP (R-CHOP) angewendet werden (Ziepert et al., 2010).

Trotz verstärkter Suche nach molekularen und immunhistochemischen Markern ist der IPI-Score noch nicht aus der klinischen Routine verdrängt worden, da nur eine Minderheit der neuen Marker ihre Unabhängigkeit vom IPI-Score gezeigt haben (Cunningham et al., 2013; Hans et al., 2004; Ziepert et al., 2010).

## Therapie

In der grundsätzlichen kurativen Therapieintention des DLBCL stellt das R-CHOP Schema die Standardtherapie dar, wobei initial das Therapieregime nach patientenindividuellen Gegebenheiten wie Alter, Gesundheitszustand und Zuordnung in die entsprechende Niedrig-, Intermediärniedrig- und Intermediärhoch- bzw. Hochrisikogruppe abgestimmt wird (Tilly et al., 2015). Leitliniengerecht nach DGHO (siehe Abbildung) ist für alle Risikogruppen, ausgenommen sehr alte Patienten, eine Therapie mit 6-8 Zyklen des CHOP Protokolls und insgesamt 8-maliger Gabe des CD20-Antikörpers Rituximab (Cunningham et al., 2013; Delarue et al., 2013; Dührsen et al., 2018). Die European Society for Medical Oncology (ESMO) differenziert in ihren Leitlinien grundsätzlich nach Patienten ≤ 60 Jahre und > 60 Jahre, wobei

für ältere und gesundheitlich weniger belastbare Patienten ein reduziertes 6-maliges Therapieregime R-mini-CHOP21 offen steht (Tilly et al., 2015). Neben dem 6 bis 8-maligem Zyklus R-CHOP21 existiert ein um eine Woche pro Zyklus verkürzter R-CHOP14, welcher keine Unterlegenheit und gleichwertige Ergebnisse bei progressionsfreiem und Gesamtüberleben zeigt (Coiffier et al., 2010; Cunningham et al., 2013).

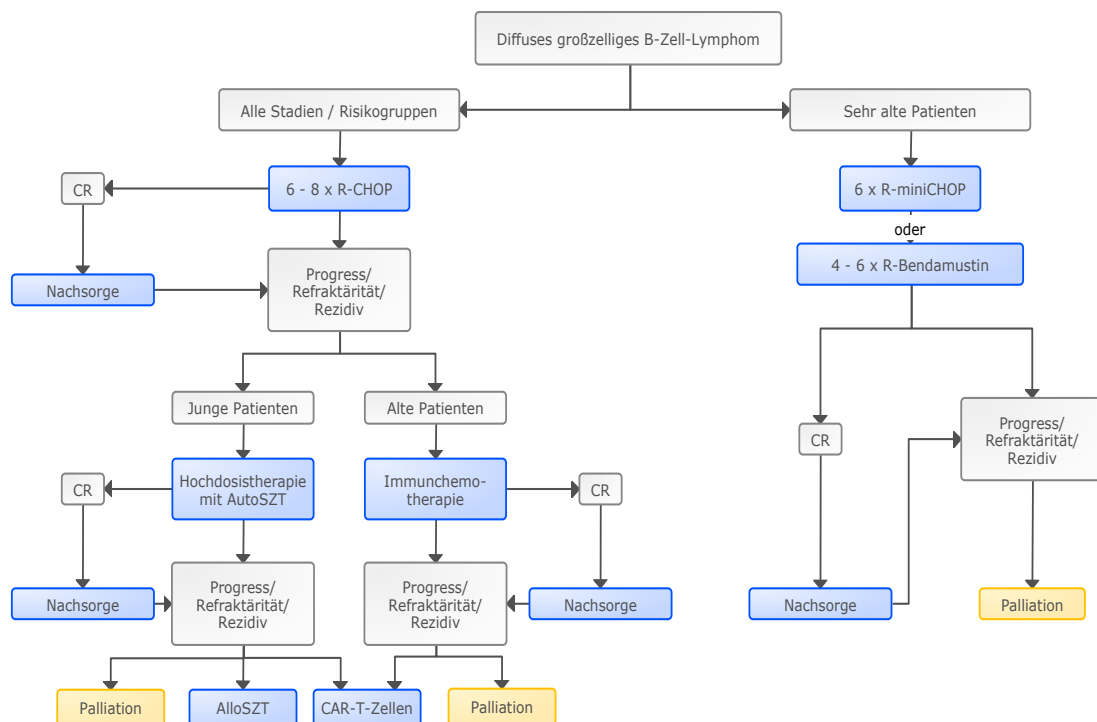


Abbildung 1-2: Therapieschema und Behandlungsalgorithmus DLBCL Leitlinien DGHO

(Quelle (Dührsen et al., 2018))

Eine 1-wöchige Vortherapie mit 1mg Vincristin und 100mg Prednisolon soll die Eignung für eine Hochdosischemotherapie bei älteren Menschen verbessern (Michael Pfreundschuh et al., 2008). Neben der Erstlinientherapie mit R-CHOP stehen andere Chemotherapieschemata mit Rituximab zur Verfügung, wie die Kombination aus Dexamethason, hochdosiertes Ara-C und Cisplatin (R-DHAP) und das Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid (R-ICE)-Protokoll (Gisselbrecht et al., 2010; Turki, Lamm, Liebrechts, & Dührsen, 2018)

## Rezidiv

Bei einem Rezidiv, im Falle des DLBCL in rund 30% der Fälle, soll, wenn möglich, ein Einschluss in klinische Studien erfolgen (Tilly et al., 2015). Als individuelle Therapieoptionen können eine Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation oder Immunochemotherapie verfolgt werden, wobei abhängig vom Alter und klinischen Zustand des Patienten sowie Dauer der Remission für jüngere Patienten die Option zur Stammzelltherapie, für ältere und weniger belastbare die Immunochemotherapie bereitsteht (Liu & Barta, 2019; M. Pfreundschuh & Trümper, 2019). Im Falle einer autologen Stammzelltherapie wird nach Induktionstherapie mit R-DHAP zur Reduktion der Tumorlast eine Stammzellmobilisierung und -gewinnung durchgeführt, gefolgt von einer myelosuppressiven Hochdosischemotherapie mit Carmustin, Etoposid, Ara-C und Melphalan (BEAM) und anschließender autologer Stammzelltransplantation (M. Pfreundschuh & Trümper, 2019). Bei der Auswahl des Chemotherapierregimes kann zwischen den gleichwertigen Schemata R-ICE und R-DHAP entschieden werden (Gisselbrecht et al., 2010). Für Patienten ohne Aussicht auf eine Transplantation stehen bei einer Immunochemotherapie neue Therapieverfahren parat, wie der Thyrosinkinaseinhibitor Ibrutinib, immunmodulatorische Substanzen wie Lenalidomid oder Antikörperkonjugatmedikamente wie der CD-30-Antikörper Brentuximab vedotin oder der CD79-Antikörper Polatuzumab vedotin (Jacobsen et al., 2015; Liu & Barta, 2019; Skrabek et al., 2019; Zelenetz et al., 2019).

Neben der Gabe der Chemotherapeutika können weitere Medikamente zur Linderung von therapieassoziierten Nebenwirkungen von Nöten sein. So ist beispielsweise bei Neutropenie die Gabe eines Granulozytenkolonien-stimulierenden Faktors (G-CSF) induziert (Piper, 2013, p. 668). Bei Chemotherapie assoziierter Übelkeit kann unter anderem auf 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten wie Ondansetron zurückgegriffen werden (Piper, 2013, pp. 347-349). Die Prognosen für ein 5-Jahres Überleben eines NHL sind insgesamt heterogen, wobei das schlechteste 5-Jahres Überleben bei Männern mit T/NK Zell Lymphomen mit 36%, das beste mit 92% bei Frauen in der Gruppe der bösartigen immunoproliferativen Krankheiten beobachtet werden konnte (Koch-Institut & e.V., 2019). Für das Follikuläre Lymphom wird das

5-Jahres Überleben mit rund 87% bei beiden Geschlechtern angegeben, bei nicht folliculären Lymphomen mit rund 62% (Koch-Institut & e.V., 2019).

### Verlaufskontrolle

Eine PET-CT Untersuchung ist nach Abschluss der Chemotherapie Goldstandard zur Beurteilung von Therapieansprechen und möglicher kompletter Remission, wobei ein zwischenzeitliches Therapiemonitoring mittels PET-CT unüblich ist (Cheson et al., 2014). Ist die FDG18 Traceranreicherung bei der erstmaligen Untersuchung gering oder ist kein PET-CT verfügbar, ersetzt ein KM-CT die PET-CT Bildgebung (Cheson et al., 2014). Um die Lymphomaktivität während und nach therapeutischer Intervention zu beschreiben, ist der fünfstufige Deauville-Score eingeführt worden (Barrington et al., 2014). Sie beschreibt die möglichen bildmorphologischen Zustände einer kompletten oder partiellen Remission, eines stabilen Zustandes im Vergleich zu Vorbefunden oder eines Progresses (Cheson et al., 2014). In der PET-CT wird der Metabolismus bzw. die Traceraufnahme der Lymphomanifestation mit unterschiedlicher Punktzahl gemäß eines 5-Punkte Scores (siehe Tabelle) bewertet (Barrington et al., 2014; Cheson et al., 2014): Keine Aufnahme wird mit einem Punkt, eine Aufnahme geringer als die Traceranreicherung um das Mediastinum mit zwei Punkten bemessen. Eine Aufnahme größer als die des Mediastinums, aber geringer bzw. gleich als die der Leber mit drei Punkten, sowie mit vier Punkten moderat mehr Aufnahme als die Leber und eine deutlich gesteigerte Traceranreicherung im Vergleich zur Leber mit 5 Punkten.

*Tabelle 1-2: Deauville-Score*

<b>Deauville-Score</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>FDG-Uptake Lymphom</b>	Keine FDG Aufnahme	FDG-Uptake $\leq$ Mediastinum	FDG-Uptake $>$ Mediastinum $\leq$ Leber	FDG-Uptake $>$ Leber	FDG-Uptake $\gg$ Leber

Neben des fünfstufigen Deauville-Scores fließen Vergrößerungen von Organen, neue Läsionen und die Bewertung des Knochenmarks in die abschließende Bewertung der PET ein (Younes et al., 2017). Die CT-Komponente bewertet nicht den Metabolismus der LK oder Organe, sondern die Größe bzw. bildmorphologischen Ausmaße. Die neuen Messergebnisse



werden in Bezug zu den Voraufnahmen gesetzt (Cheson et al., 2014; Younes et al., 2017). Eine komplette Remission ist mit einem Deauville-Score von 1-3 und keiner neuen FDG18 Anreicherung im Vergleich zu den Voraufnahmen zu vereinbaren (Younes et al., 2017). Der Unterschied zwischen partieller Remission und stabilem Krankheitszustand liegt in der Reduktion der Traceraufnahme im Vergleich zur Aufnahme bei Beginn der Erkrankung. Die partielle Remission ist mit mehr als 50%, der stabile Zustand mit kleiner 50% FDG18 Signalrückgang definiert. (Cheson et al., 2014; Younes et al., 2017) Es wird jedoch in Studien darauf hingewiesen, dass die PET-CT falsch positiv oder falsch negativ sein können, beispielsweise wegen Entzündungsreaktionen in der Mikroumgebung des Tumors (Meignan, Itti, Gallamini, & Younes, 2015; Younes et al., 2017.)

### **Nachsorge**

Bei kompletter Remission sollte im ersten Jahr nach Ende der Therapie alle 3 Monate, im zweiten und dritten Jahr nach Ende der Therapie alle 6 Monate und danach einmal jährlich eine Vorstellung des Patienten stattfinden (M. Pfreundschuh & Trümper, 2019; Tilly et al., 2015). Es soll der Allgemeinzustand inklusive körperlicher Untersuchung, sowie ein Blutbild mit den entsprechenden hämatologischen Laborparametern veranlasst werden (M. Pfreundschuh & Trümper, 2019). Nach der ESMO ist ein bildgebendes Verfahren in der Regel 6, 12 und 24 Monate ab Kuration gerechnet üblich, obwohl es bisher keinen Anhalt für ein besseres Outcome dadurch gibt (Thompson et al., 2014; Tilly et al., 2015).

#### **1.1.2 Follikuläres Lymphom**

Das Follikuläre Lymphom (FL) ist eine Neoplasie der B-Zell Reihe und es entarten die Zentroblasten oder Zentrozyten in den Keimzentren der Lymphfollikel (Piper, 2013, p. 680). Der Anteil der FL an allen neu diagnostizierten NHL liegt zwischen 20-35% (Morschhauser et al., 2018). FL lassen sich histologisch in drei Schweregrade einteilen, wobei die Einteilung durch den Anteil an großen zentroblastischen Zellen bestimmt wird (Piper, 2013, p. 680). Diese Schwereinteilung nach Feinnadelbiopsie ist entscheidend für die spätere Therapie. Die

Stadien I, II und IIIa sind als indolent zu werten, während das Stadium IIIb klinisch aggressiv verläuft (Buske et al., 2017).

Das FL ist assoziiert mit einem früheren oder zeitgleichen Auftreten eines anderen Lymphomtyps (Pillai, Surti, & Swerdlow, 2013). Eine Transformation in andere Lymphomentitäten sind für das Follikuläre Lymphom bekannt (Buske et al., 2017). Charakteristisch für das FL ist eine Translokation t (14;18) mit Überexpression des bcl2-Proteins, sodass die Apoptose der Zellen gehemmt wird und diese in den Lymphfollikeln akkumulieren (Piper, 2013, p. 680). Die Transformation t (14;18) ist nicht spezifisch für das FL, da sie auch bei gesunden Individuen gefunden wurde (Tellier et al., 2014).

Als Risikofaktoren für das FL werden kanzerogene Substanzen wie Benzol, Pestizide oder das Rauchen angesehen (Buske et al., 2017). Zur obligaten Diagnostik gehören laut Leitlinien der DGHO Anamnese, körperliche Untersuchung, Blutbild und Laborparameter sowie Bildgebung. Die Symptomatik gleicht im Allgemeinen dem DLBCL, selten (<30%) wird eine LDH Erhöhung gefunden (Buske et al., 2017). Die progrediente Lymphknotenschwellung erfolgt in der Regel sehr langsam und die meisten FL (rund 80%) werden in einem späten Stadium diagnostiziert (Buske et al., 2017; Morschhauser et al., 2018). Die Stadieneinteilung erfolgt wie beim DLBCL nach der Ann-Arbour Klassifikation auf Basis einer bildgebenden Diagnostik. Eine Überlegenheit der PET-CT gegenüber einer KM-CT konnten in frühen Stadien (Ann Arbour I-II), aber nicht in späten Stadien (Ann Arbor III oder IV) festgestellt werden (Luminari et al., 2013).

### **Follikular Prognostic Index**

Als prognostischer Faktor für das FL kommt der sogenannte „Follicular Lymphoma International Prognostic Index“ (FLIP-Index) in Betracht. Dieser Index sollte aus einer ursprünglichen Kohorte von 4167 Patienten mit FL zwischen 1985 und 1992 generiert werden, wegen fehlender Messwerte wurden nur 1795 Patienten für die FLIPI Bestimmung herangezogen (Solal-Céligny et al., 2004; van de Schans et al., 2009). Er besteht aus drei Kategorien mit niedrigem (0-1 Punkte), intermediärem (2 Punkte) und großem Risiko (3-5 Punkte). Die Einteilung erfolgt anhand von Risikofaktoren. Es wird je ein Punkt vergeben, wenn folgende Kriterien zutreffen:

- Alter größer 60 Jahre
- Ann-Arbor-Stadium III oder IV
- Hämoglobinwert <12g/dl
- Mehr als 4 befallene Lymphknoten
- LDH wert größer Normbereich

Aus den ursprünglichen Daten geht ein 5-Jahres Überleben von 81%, 66% bzw. 47% für die niedrige, intermediäre und hoch Risikogruppe hervor. Neueren Studien konnten ähnliche Werte für das 5-Jahresüberleben für die niedrig und intermediäre Gruppe zeigen (79% bzw. 59%) (van de Schans et al., 2009). Ein 5-Jahresüberleben von rund 28% wurde in der Hochrisikogruppe beobachtet, wobei der unterschiedliche Aufbau der Kohorten, insbesondere von Patienten > 70 Jahren, dafür verantwortlich sein könnte (van de Schans et al., 2009). Eine Anpassung bzw. teilweise Verbesserung des FLIPI ist über die Jahre erfolgt. Durch den m7-FLIPI, welcher das Vorhandensein von 7 tumorspezifischen Mutationen (bsp. CARD11, EZH2) in den Score mit einfließen lässt, wurde die Identifikation von Hochrisikogruppen erleichtert (Kahl, 2017). Aus dem m7-FLIPI lassen sich keine Aussagen zum Risiko einer Transformation eines FL treffen (Kridel, Sehn, & Gascoyne, 2017).

## **Therapie**

Die Therapie des FL bietet neben der „watch and wait“ Strategie, die Möglichkeit einer Strahlentherapie, sowie einer Induktionschemotherapie. In den Leitlinien der DGHO wird folgender Algorithmus für die Behandlung empfohlen:

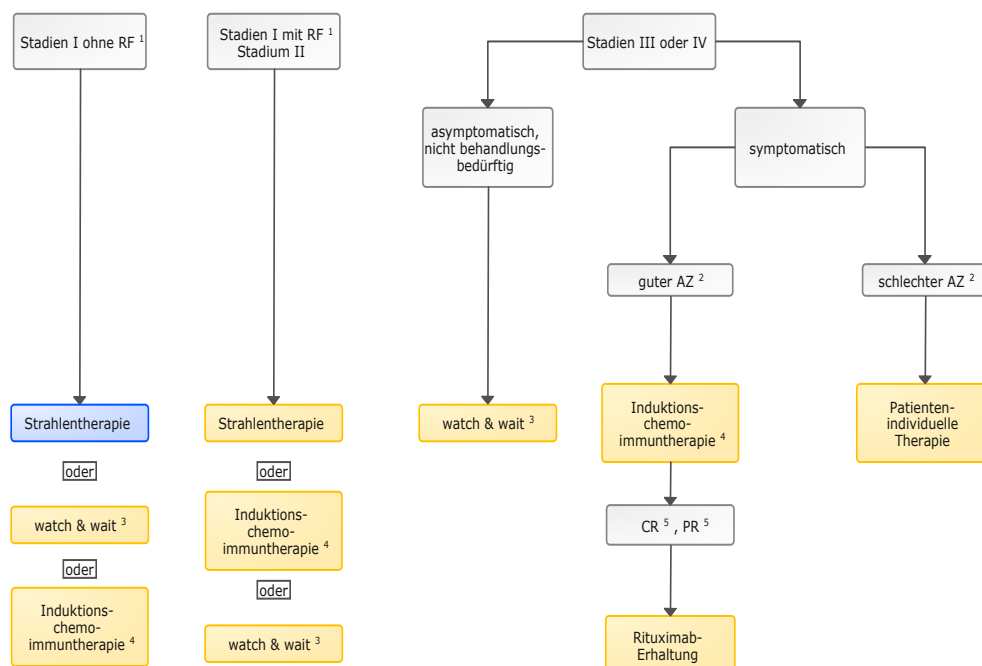


Abbildung 1-3: Therapieschema Follikuläres Lymphom DGHO

(Quelle (Buske et al., 2017))

Wie in der Abbildung zu erkennen, ist lediglich im Stadium I (LK < 5cm) eine kurative Intention mit Strahlentherapie geplant. Aufgrund des sehr langsam-progressiven Wachstums gilt die Erkrankung als nicht heilbar, sodass die palliativen Therapieintentionen überwiegen (Morschhauser et al., 2018). Entscheidend für den Beginn einer Induktionschemotherapie ist laut Algorithmus der DGHO das Vorhandensein einer Krankheitssymptomatik, wie laborchemisch festgestellter Anämie oder rasch progrediente LK Vergrößerung. Eine automatische Chemotherapie bei Ann Arbor-Stadium III oder IV wird laut DGHO nicht empfohlen, da die Studienlage derzeit keinen Vorteil im Hinblick auf das Gesamtüberleben beschreibt (Graham, Mardones, & Krause, 2015). Die Einteilung in die verschiedenen Schweregrade ist für die Therapie entscheidend, denn aggressive FL Grad 3b werden nach dem selben Therapieschema wie DLBCL behandelt (Buske, 2018). Für die Behandlung wird auf das Kapitel DLBCL verwiesen. Für die indolenten Lymphome (Grad I, II, IIIa) ist die medikamentöse Standardtherapie die Kombination von Chemo- und Antikörpertherapie. Die DGHO empfiehlt für jüngere Patienten das R-CHOP Schema, für ältere Patienten R-

Bendamustin. Das Alkylans Bendamustin zeigte in einer Studie eine mögliche Verbesserung des progressionsfreien Überlebens und weniger toxischer Nebenwirkungen (Rummel et al., 2013). Eine Erhaltungstherapie nach Ende der Chemotherapie sollte mit Gabe eines anti-CD20 Antikörper alle zwei Monate über 2 Jahre stattfinden (Buske, 2018).

### **Rezidiv**

Allgemein wird ein hohes Rezidivrisiko von rund 20-30% bei R-CHOP Therapie innerhalb von 2 Jahren beobachtet (Casulo et al., 2015; Salles et al., 2011). Die DGHO empfiehlt bei Verdacht eines Rezidivs eine erneute Lymphknotenbiopsie zu veranlassen, da die Möglichkeit einer malignen Transformation von indolenten FL hin zu aggressiven Lymphomen besteht. Das Risiko dazu wird mit 2-3% pro Jahr beschrieben (Wagner-Johnston et al., 2015). Leitliniengerechte Therapie für den Fall eines Rezidivs ist die Immunochemotherapie mit R-CHOP, R-Bendamustin oder R-Fludarabin-Cyclophosphamid (Buske et al., 2017). Es kann die gleiche Therapie wie bei Primärtherapie verwendet werden, in der Mehrzahl der Fälle wird jedoch das Chemotherapeutikum getauscht (Buske, 2018). Wurde beispielsweise R-CHOP initial verwendet, kann bei Rezidiv ein Wechsel auf R-Bendamustin in Betracht gezogen werden.

### **Verlaufskontrolle/Nachsorge**

Die Nachsorge ist ähnlich dem entsprechenden Kapitel beim DLBCL. Bei den alle 3 Monate durchzuführenden Kontrollbesuchen in den ersten 3 Jahren nach Therapieende wird neben Erhebung von Anamnese und körperlicher Untersuchung ein Differentialblutbild und Serumchemie abgenommen.

Neben Remissionskontrolle sollte die Erkennung von Langzeitschäden der Chemotherapie oder sekundäre Neoplasien bei der Nachsorge untersucht werden (Buske et al., 2017). Je nach Befunden oder Beschwerdesymptomatik kann in der Nachsorge eine Bildgebung durch Ultraschall oder CT der betroffenen Lymphknoten notwendig werden (Buske, 2018).

## 1.2 Liquid Biopsy

### 1.2.1 Mechanismen der Entstehung von Mutationen in der DNA

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Träger des Erbgutes ist im Verlauf des Lebens zahlreichen Noxen ausgesetzt. Neben exogenen Faktoren wie UV-Licht oder Tabakrauch, beeinflussen endogene Größen wie Sauerstoffradikale oder spontane Mutationen, welche mit einer Häufigkeit von 1 zu  $10^9$  auftreten, den Zustand der DNA (Koch, Brix, & Heinrich, 2014, p. 559). Die Zellen des Körpers sind mit Reparaturmechanismen ausgestattet, um Mutationen oder Fehler in der Struktur der DNA erkennen und reparieren zu können. Dazu zählen die Basenexzisionsreparatur, die Nukleotidexzisionsreparatur oder die miss-match Reparatur (Koch et al., 2014, pp. 562-566). Schäden des Erbguts können in größerer Form auf Genom- oder Chromosomenebene, im Kleinen auf Ebene der Basensequenz auftreten. Beispiel einer Translokation von Genen ist das Philadelphia Chromosom bei Chronisch Myeloischer Leukämie (CML), bei der das Fusionsgen bcr-abl durch Translokation einzelner Genabschnitte der Chromosomen 9 und 22 entsteht (Brandt & Petrides, 2014, p. 639). Zu den Mutationsereignissen der DNA zählen neben Deletion, Amplifikation und „Rearrangements“ (deutsch: Umlagerungen), welche bis zu Millionen Basen betreffen können, ebenso wie Punktmutationen nur eines einzelnen Nukleotids (Brandt & Petrides, 2014, p. 640). Auswirkungen dieser Mutationen können die Funktion und Transkription eines Genes beeinflussen, welche sich in einem Funktionsgewinn (gain of function) oder einem Funktionsverlust (loss of function) des Genes äußern können. Bei in den Zellzyklus eingreifenden Gene wird in Onkogenen, Tumorsupressorgenen oder Mutatorgene differenziert.

Eine Punktmutation ist definiert als der Austausch einer Base gegen eine andere. Ein Austausch einer Purinbase gegen eine andere Purinbase wird Transition genannt. Ein Wechsel eines Pyrimidin-Rest gegen einen Purinrest oder umgekehrt, wird als Transversion bezeichnet (Wagener & Müller, 2010, p. 63) Häufige Fehler in der DNA Replikation sind G:C -> A:T , A:T -> G:C-Transitionen, sowie G:C -> T:A-Transversionen (Wagener & Müller, 2010, p. 63). Auswirkungen einer Punktmutation in kodierenden Sequenzen können sogenannte

silent, missense- oder nonsense Mutationen sein. Bei einer silent (deutsch: stillen) Mutation verändert sich die Basensequenz der DNA, ohne dass Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz und das kodierende Protein entstehen. Missense (deutsch: Fehlsinn) Mutationen sind gekennzeichnet durch den Einbau einer sich zu Regelvariante unterscheidenden Aminosäure während des Vorganges der Proteinbiosynthese. Nonsense Mutationen führen zum Abbruch der Translation durch vorzeitigen Einbau eines Stopp-Codons. Punktmutationen außerhalb der kodierenden Regionen können den Ablauf der Transkription und Translation betreffen, sowie die Ribonukleinsäure (RNA) Stabilität und die Transkriptionsrate beeinflussen (Wagener & Müller, 2010, p. 64).

Die Deletion von Basen kommt gehäuft in repetitiven DNA Sequenzen vor und kann bei der Replikation durch Ausbildung von Schleifen (Loops) in dem DNA-Strang oder durch Verrutschen (slippage) der Basensequenz entstehen (Wagener & Müller, 2010, p. 65). Werden 3 aufeinanderfolgende Basen oder ein Vielfaches von 3 Basen deletiert, werden die entsprechenden Aminosäuren bei der Proteinbiosynthese ausgelassen. Es kommt zu einer Leserasterverschiebung (frameshift), wenn die Anzahl der deletierten AS ungleich 3 oder kein Vielfaches von 3 ist. Dieser Mechanismus wird häufig bei Mutationen in Tumorsuppressorgenen beobachtet (Wagener & Müller, 2010, p. 64). Eine Insertion ist definiert als der zusätzliche Einbau von Basen in die DNA und kann ähnlich der Deletion zu einer Verschiebung des Leserasters führen. Eine Duplikation ist die Verdoppelung eines Genes bzw. der kodierenden Sequenzen und bei einer Amplifikation ist der entsprechende Genabschnitt vielfach hintereinander auf der DNA zu finden (Wagener & Müller, 2010, p. 63).

Mutationen des Erbgutes können ohne Auswirkungen auf die Zelle bleiben oder im Falle von Genen, welche für den Zellzyklus, das Wachstum oder die Reparatur zuständig sind, erheblich in den betreffenden Organismus eingreifen. Im Folgenden werden diese Gene, sogenannte Proto-Onkogene bzw. Onkogene und Tumorsuppressorgene näher beschrieben.

### **Proto-Onkogene und Onkogene**

Onkogene sind definiert als Gene, die unabhängig von äußeren Signalen das Wachstum der Zelle stimulieren können und Tumorsuppressorgene als Gene, die die Vermehrung von

geschädigten Zellen hemmen können (Brandt & Petrides, 2014, p. 640). Proto-Onkogene bezeichnen im Allgemeinen Proteine, die für das Wachstum der Zelle benötigt werden oder dieses induzieren können. Durch Veränderungen wie Punkt-, Insertions- oder Deletionsmutationen in der entsprechenden Genomregion können diese fehlreguliert und so zu Onkogenen aktiviert werden (Netzker, 2012, p. 514). Dies kann zu einer gesteigerten Aktivität oder Überexpression von Wachstums- und Differenzierungsprozessen führen (Netzker, 2012, p. 514). Beispiel für die Umwandlung eines Proto-Onkogens hin zu einem Onkogen ist die Inaktivität der GTP-ase im *ras*-Gen durch eine Punktmutation im Codon 12, 59 oder 61, wodurch es trotz Fehlen eines äußeren Stimulus zu einer dauerhaften Aktivität des Wachstumssignals kommt (Netzker, 2012, p. 514). Dieses wird über der MAP-Kinasesignalweg weitergeleitet, welcher unter anderem die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren für Zellproliferation, Migration oder Angiogenese induziert (Brandt & Petrides, 2014, p. 644). Bei Onkogenen ist bereits ein mutiertes Allel ausreichend, um die Zellteilung zu stimulieren, sodass Onkogene als dominant bezeichnet werden (Netzker, 2012, p. 514).

### **Tumorsupressorgene**

Tumorsupressorgene bzw. deren Proteinprodukte sind häufig für die Regulation des Zellzyklus als sogenannte „Checkpoint-Inhibitoren“ verantwortlich und besitzen die Fähigkeit, eine Apoptose der Zelle bei DNA Schäden auszulösen (Brandt & Petrides, 2014, p. 644). Da bei Tumorsupressorgenen von rezessiven Genen gesprochen wird, müssen beide Allele des Tumorsupressorgens ausfallen bzw. inaktiviert werden, damit die wachstumssupprimierende Wirkung bzw. Fähigkeit zur Induktion der Apoptose verloren geht (Brandt & Petrides, 2014, p. 644). Beispielhaft wird das Tumorsupressorgen am Protein *TP53* erläutert, das seinen Namen durch seine molekulare Masse von 53kDa bekommen hat. *TP53* wird konsekutiv in wachsenden Zellen exprimiert und im Normalfall nach Ubiquitinierung abgebaut. Schäden an der DNA oder Aktivierung von Wachstumsfaktoren wie Überexpression von cMyc führen zur Phosphorylierung von *TP53*, sodass dieses nicht mehr abgebaut werden kann und vermehrt in der Zelle anfällt, wobei phosphoryliertes *TP53* auf Proteinebene die Regulation des Zellzyklus sowie die Induktion der Apoptose beeinflusst (Brandt & Petrides, 2014, p. 645).



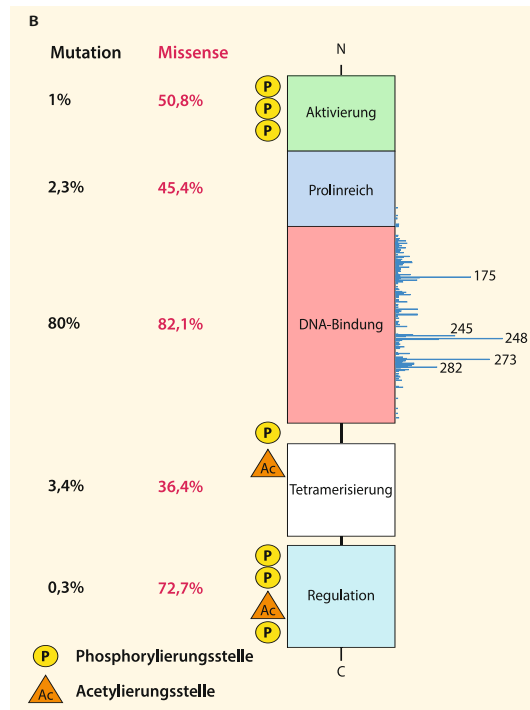


Abbildung 1-4: Übersicht häufige Mutationen im TP53-Gen

(Quelle (Brandt & Petrides, 2014))

Über die Transkription und Aktivierung des CDK-Inhibitors p21<sup>Cip1</sup> kann eine Zelle in den Zellzyklusarrest geschickt werden (Netzker, 2012, p. 516). Gelingt keine Reparatur der DNA-Schäden, wird die Apoptose der Zelle durch proapoptische Proteine wie Bax, Noxa und Puma eingeleitet (Brandt & Petrides, 2014, p. 645). Wie in der Abbildung zu sehen, liegt in der Mehrzahl der Fälle eine missense Mutation im Bereich der DNA Bindungsdomäne für TP53 vor, wobei einzelne wenige Punktmutationen, wie an Stelle 248 oder 273, gehäuft nachgewiesen wurden (Brandt & Petrides, 2014, p. 646). Bei rund 40-45% aller Tumoren lassen sich Mutationen im TP53-Gen feststellen (Wagener & Müller, 2010, p. 95). Aufgrund des häufigen Vorliegens von Mutationen bei Tumoren nimmt TP53 eine zentrale Stellung in der Forschung ein. Die „International Agency for research on Cancer“ der WHO hat eine Datenbank ([www-p53.iarc.fr](http://www-p53.iarc.fr)) mit Einträgen zu mehr als 20 000 Mutationen und Assoziation mit einer bestimmten Tumorentität, sowie der Prävalenz oder der Frage nach somatischem Ursprung etabliert (Wagener & Müller, 2010, p. 95).

## 1.2.2 Liquid Biopsy

Der Begriff „Liquid Biopsy“ (deutsch: Flüssigbiopsie) subsumiert verschiedene technische Verfahren zum Nachweis von Zellbestandteilen und DNA-Fragmenten tumorösen Ursprungs aus Blutproben mit dem Ziel, durch Quantifizierung, Genexpressionsanalyse, Monitoring oder Sequenzierung die derzeitige Diagnostik und Therapie einer Tumorerkrankung zu verbessern (Campos, Jackson, Witek, & Soper, 2018). Im Blutkreislauf vorkommende Strukturen wie zirkulierende Tumorzellen (CTC), zellfreie DNA (cfDNA) und zellfreie-Tumor-DNA (ctDNA) können beispielsweise durch Methoden wie Next-Generation-Sequencing (NGS) und digital-droplet-Polymerasekettenreaktion (ddPCR) nachgewiesen werden. Verbesserungen bei der Sensitivität und neue Entwicklungen im Bereich des NGS machen Liquid Biopsy zum Gegenstand zahlreicher aktueller onkologischer Forschungsvorhaben (Stewart & Tsui, 2018). In den folgenden Absätzen werden CTC, cfDNA und ctDNA näher beschrieben. Daran anschließend wird die Verwendung und die Rolle von LB im Management von Tumorerkrankungen erläutert.

### **Zirkulierende Tumorzellen (CTC)**

Mitte des 19. Jahrhunderts stellte der Pathologe Ashworth eine Ähnlichkeit zwischen Zellen im Blut und Zellen aus dem Tumorgewebe fest und beschrieb erstmals damit zirkulierende Tumorzellen (engl. Circulating tumor cells) in der Literatur (Mader & Pantel, 2017). Seit der Entdeckung von zirkulierenden Tumorzellen sind diese Ausgangspunkt vieler Forschungsvorhaben, die insbesondere die Migration von Zellen aus dem Tumorgewebe und das Eindringen in den Blutkreislauf untersuchen (Mader & Pantel, 2017). Die CTCs werden meist durch mechanische Kräfte, wie sie bei Tumorwachstum oder durch Scherkräften bei Operationen vorkommen, aus dem Tumorgewebe freigesetzt (W. Zhang et al., 2017). Ein Großteil der zirkulierenden Tumorzellen geht im Blutkreislauf aufgrund von Immunantwort oder Anoikis, einem apoptose-ähnlichen Mechanismus, zu Grunde (W. Zhang et al., 2017). Die Anzahl an CTCs im peripheren Blut ist gering und stellt bei teilweise weniger als 10 Zellen pro 7,5ml Blut eine Herausforderung in Bezug auf eine Detektion dar (D. R. Parkinson et al., 2012; W. Zhang et al., 2017). Das vermehrte Vorkommen von CTCs im Blut ist als negativer

prognostischer Marker in Krebsarten beschrieben worden, unter anderem bei Prostata- oder Kolorektalemkarzinomen (Groot Koerkamp, Rahbari, Buchler, Koch, & Weitz, 2013; Ma et al., 2014; W. Zhang et al., 2017).

### **cfDNA**

Zellfreie zirkulierende DNA wurde erstmals von Mandel und Métais 1948 beschrieben (Mandel & Metais, 1948). Ende der 1970er Jahre ist über die Korrelation von hohem cfDNA Spiegel bei Krebspatienten berichtet worden (Leon, Shapiro, Sklaroff, & Yaros, 1977). Es wird vermutet, dass Apoptose- und Nekrosevorgänge als Hauptursprungsquellen für cfDNA im Blutkreislauf verantwortlich sind, neben kleineren Anteilen wie Sekretion und Exosomenvermittelten Transport von DNA aus der Zelle (Pös, Biró, Szemes, & Nagy, 2018; Stewart & Tsui, 2018). Die beobachtete Fragmentlänge der cfDNA von <145bp spricht für eine apoptotische Genese, da bei einem apoptotischen Vorgang die DNA zu kleinen Stücken fragmentiert und kondensiert wird (Mouliere et al., 2011).

Zur spezifischen Halbwertszeit von cfDNA im Blut gibt es unterschiedliche Angaben in der Forschung. Fetale DNA im Blut von Müttern nach Geburt zeigte eine mittlere Halbwertszeit von rund 16 Minuten, wobei in der Studie lediglich 12 Patientinnen beobachtet wurden (Lo et al., 1999). Bei einer Studie mit 20 jungen Patienten konnte im Blut ein Peak der cfDNA 15 Minuten nach sportlicher Belastung festgestellt werden, der nach rund 20 Minuten wieder auf den Ausgangswert vor der Belastung zurück gegangen ist (Hummel et al., 2018). Im Allgemeinen wird aufgrund der unterschiedlichen Datenlage eine Halbwertszeit von rund 16 Minuten bis zu 2,5 Stunden suggeriert (Diehl et al., 2008; Lo et al., 1999; Stewart & Tsui, 2018). Die Spiegel von cfDNA im Blut wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Bei physischer und psychischer Belastung konnte ein Anstieg von cfDNA im Blut festgestellt werden (Hummel et al., 2018). Erhöhte Spiegel von cfDNA wurden außerdem bei Trauma oder cerebralem Insult festgestellt (Rodrigues Filho et al., 2014; Tsai et al., 2011; Wan et al., 2017). Es wird daher Beeinflussung des cfDNA Spiegels durch multifaktorielle Prozesse wie Inflammation, Schwangerschaft oder thrombotische Ereignisse angenommen (Chu & Park, 2017). Die Konzentration von cfDNA bei gesunden Patienten liegt im Bereich von 1-10 ng/ml (Mouliere et al., 2011; Wan et al., 2017).

Eine Detektion von cfDNA gelingt neben Probenmaterial aus dem Blut auch in Speichel, Liquor, Pleuraflüssigkeit oder Urin, über welchen die cfDNA hauptsächlich eliminiert wird (Stewart & Tsui, 2018). Bei eingeschränkter Nierenleistung und möglicher fehlender Elimination sollte eine Verzerrung des ctDNA Spiegels bedacht werden (Alix-Panabières & Pantel, 2016). Bei der Analyse von cfDNA ist anzumerken, dass es in der Präanalytik zu Verzerrungen des cfDNA Spiegels durch Zerfall von zellulären Bestandteilen in der Probe kommen kann (Stewart & Tsui, 2018).

### **ctDNA**

ctDNA ist definiert als mutierte, von Tumorzellen abstammende zellfreie zirkulierende DNA im Blut und stellt zusammen mit der Wildtyp-DNA die Gesamtmenge cfDNA im Blut (Rossi, Condoluci, Spina, & Gaidano, 2019). ctDNA zeichnet sich durch das Vorhandensein von Mutationen in einem entsprechenden Genfragment und einer kürzeren Fragmentlänge aus (Wan et al., 2017). So ist das mutierte Allel des Gens *BRAFV600E* mit einer Länge von 132-145bp kleiner als die des Wildtyp mit einer Länge von rund 165bp (Chu & Park, 2017; Underhill et al., 2016).

Eine direkte Isolierung der ctDNA aus der cfDNA kann nicht erfolgen, indirekt kann über die Veränderungen in der Basensequenz auf die Präsenz von ctDNA in der Gesamtmenge an cfDNA geschlossen werden (Alix-Panabières & Pantel, 2016). Die Halbwertszeit von ctDNA im Blut wird mit rund 2 Stunden angegeben (Cheng, Su, & Qian, 2016). Ähnlich der cfDNA ist der genaue Mechanismus der Freisetzung von ctDNA nicht abschließend geklärt. Im Sinne eines multifaktoriellen Geschehens werden apoptotische oder nekrotische Tumorzellen, sowie aktive Tumorzellen und zirkulierende Tumorzellen als Ursprungsquelle der ctDNA vermutet (Cheng et al., 2016). ctDNA wird in frühen und späten Tumorstadien gefunden, wobei die Menge an ctDNA mit der Größe des Tumors ansteigt (Newman et al., 2014; Stewart & Tsui, 2018).

Der Nachweis von ctDNA kann durch unterschiedliche Methoden erfolgen, wobei als Technik eine PCR oder ein NGS in verschiedenen technischen Variationen zum Einsatz kommen. Generell, so auch in der vorliegenden Arbeit, kann der Ansatz eines NGS der ctDNA mit anschließender Quantifizierung von detektierten Mutationen durch eine ddPCR erfolgen (Alix-

Panabières & Pantel, 2016). ddPCR eignet sich durch die Möglichkeit der absoluten Quantifizierung durch den Ansatz der multiplen Reaktionsräume gut, um die Anzahl der mutierten Kopien im Blut, auch von seltenen Mutationen, festzustellen (Stewart & Tsui, 2018; Vogelstein & Kinzler, 1999; Yung et al., 2009).

### **Allelfrequenz**

In der Absicht, die im Blut detektierte, mutierte DNA ins Verhältnis zur Anzahl Wildtyp-DNA setzen zu können, kann bei Liquid Biopsy Verfahren die Allelfrequenz (AF) und die Allelkonzentration (AK) eines bestimmten Genlokus bestimmt werden. Die Allelkonzentration ist die absolute Anzahl an mutierten DNA Kopien pro Milliliter Blut und die Allelfrequenz ist definiert als der prozentuale Anteil mutierter DNA Kopien ( $c_{mut}$ ) eines bestimmten Locus zu der Gesamtanzahl DNA Kopien, bestehend aus der Summe von Wildtyp- ( $c_{wild}$ ) und mutierter DNA (Ulz, Heitzer, Geigl, & Speicher, 2017). Die AF lässt sich aus der der ctDNA Konzentration und der Gesamtkonzentration cfDNA durch folgende Formel errechnen:

$$(Formel 1-1) \quad Allelfrequenz = \frac{\text{Anzahl mutierte DNA Kopien eines Locus}}{\text{Gesamt DNA Kopien eines Locus}} = \frac{c_{mut}}{(c_{mut} + c_{wild})}$$

Die Allelfrequenz wird oft mit dem Anteil mutierter DNA im Plasma gleichgesetzt, jedoch muss differenziert werden, da die Allelfrequenz von der Ploidität des Tumors und den mutierten Kopien abhängig ist (Ulz et al., 2017). Damit die allgemeine Aussage gültig ist, muss das mutierte Gen auf beiden Chromosomen vorhanden sein, denn ein triploider Chromosomensatz verändert die Allelfrequenz erheblich (Ulz et al., 2017).

Die cfDNA- und ctDNA-Konzentrationen im Blut können wie oben erwähnt durch Inflammation oder dem Einfluss von Chemotherapeutika im Rahmen der Therapie beeinflusst werden. Zum anderen ist die statistische Verteilung ein Faktor, der das Ergebnis der Allelfrequenz mitbestimmen und beeinflussen kann. In einer Simulation mit der Annahme, eine Probe enthalte nur Tumor-DNA, sollte eine heterozygote Mutation mit einer Allelfrequenz von 50% im Blut zu finden sein, jedoch konnten Werte für die Allelfrequenz im Bereich zwischen 40 und 62% festgestellt werden (Ulz et al., 2017).

Dank technischem Fortschritt bei NGS und ddPCR ist es möglich, Allelfrequenzen von mutierten Fragmenten  $\leq 0,1\%$  in der cfDNA festzustellen, teilweise bis zu  $0,001\%$  (Stewart & Tsui, 2018; Wan et al., 2017; Zonta et al., 2016). Die Detektion von sehr kleinen Spiegeln ctDNA bei variabler Input-Menge an cfDNA bleibt dennoch eine technische Herausforderung (Alix-Panabières & Pantel, 2016; Diaz & Bardelli, 2014).

### **Verwendung von Liquid Biopsy bei Tumorerkrankungen**

LB verspricht das klinische Management zu revolutionieren, falls es in Bereichen wie Diagnosestellung, Therapiemonitoring, Medikamentenmanagement, sowie Überwachung der Remission und Rezidivkontrolle routinemäßig eingesetzt werden könnte (Diaz & Bardelli, 2014; Sun et al., 2019; Wan et al., 2017). Derzeitig ist LB im klinischen Alltag bis auf einzelne Ausnahmen noch nicht angekommen, andererseits wird diesem Gebiet in der Forschung deutliches Gewicht und Aufmerksamkeit beigemessen, nicht nur hinsichtlich der Anzahl der Publikationen. Während im Jahr 2010 neu gelisteter Paper bei der Publikationssuchmaschine Pubmed unter dem Stichwort „Liquid biopsy“ mit 124 Einträgen zu finden sind, listet Pubmed allein für das Jahr 2019 mehr als 1300 neu veröffentlichte Paper zu diesem Stichwort auf.

### **LB und Biomarker**

„Traditionelle“ Biomarker, wie das aus dem Blut nachweisbare Prostata-Spezifische-Antigen (PSA), spielen zwar in der Diagnostik eine entscheidende Rolle, eignen sich nur bedingt für die Beurteilung des Therapieverlaufs (W. Zhang et al., 2017). Zum einen exprimiert nicht jeder Tumor ein im Blut detektierbares Protein, zum anderen besitzen proteinbasierte Biomarker eine lange Halbwertszeit von bis zu mehreren Wochen (Chu & Park, 2017). Eine unspezifische Erhöhung der traditionellen Biomarker ohne klinischen Progress kann zu falsch positiven Werten führen (Diaz & Bardelli, 2014). ctDNA würde sich durch seine kurze Halbwertszeit als Biomarker für die Bestimmung der Mutationslast eignen (Khatami & Tavangar, 2018). Die Diskrepanz in der Beurteilung des tumorösen Geschehens durch einen Nachweis von erhöhten traditionellen Biomarkern und negativer Bildgebung liegt bei Liquid Biopsy nicht vor, denn per se ist der Nachweis von ctDNA im Blut vereinbar mit dem Vorhandensein eines tumorösen Geschehens (Diaz & Bardelli, 2014). Durch eine gemeinsame Verwendung von

Biomarkern und LB zeigte sich durch eine bessere Sensitivität bei der Erkennung von Pankreaskrebs durch Verbindung von klassischen Tumormarkern wie CA19-9 mit dem Nachweis von KRAS durch LB (Cohen et al., 2017).

Aufgrund anatomischer Gegebenheiten oder anderweitiger Limitationen kann eine Probengewinnung mittels Biopsie nicht immer möglich sein. Bei thorakalen Biopsien kommt es in rund ein Fünftel der Eingriffe zu Komplikationen (Diaz & Bardelli, 2014; Saggese, Dua, Simmons, Lemech, & Arkenau, 2013). Nach einer zukünftigen Etablierung von LB könnte für diese Fälle durch die Probengewinnung aus venösem Blut die Möglichkeit einer fundierten Therapieentscheidung auf Basis einer ctDNA Mutationsanalyse gegeben sein (Arneth, 2018; Stewart & Tsui, 2018).

### **Profiling**

Eine genetische Untersuchung auf somatische Mutationen im Tumorgewebe nach chirurgische Gewebeentnahme ist derzeit Teil der onkologischen Routine trotz seiner Invasivität, der in der Regel Einmaligkeit des Vorganges und Problematik in Bezug auf Tumorerheterogenität (Diaz & Bardelli, 2014). Veränderungen in der molekularen Landschaft des Tumors während der Behandlung lassen sich nur unzureichend mittels Gewebeanalyse erfassen (Siravegna et al., 2015). Die molekulare Untersuchung der ctDNA kann zu einer individuelleren Diagnose beitragen und so zu einer individuelleren Therapie führen, wie beispielsweise ein früherer medikamentöser Therapiewechsel bei durch ctDNA detektiertem Nachweis von resistenzvermittelnden Mutationen (Alix-Panabières & Pantel, 2016; Bennett, Berchem, Kim, & El-Khoury, 2016; Ilie et al., 2014). NGS erlaubt die Untersuchung ganzer Exome mit einer Größe von rund 50 Megabasenpaaren (Mb) bis hin zur Detektion von Mutationen auf Basenebene, wobei auch Mutationen, die nicht in der Initialbiopsie vorhanden waren, mit NGS erfolgreich aus dem Blut detektiert werden konnten (Forsheew et al., 2012; Wan et al., 2017). Die Kenntnis des Mutationsprofil der ctDNA soll es zukünftig ermöglichen, fundierte Aussagen über den Krankheits- und Therapieverlauf treffen zu können (Wang, Chang, Li, & Sun, 2017).

### **Prognostische Aussagekraft**

Einen Zusammenhang zwischen der Größe des Tumors bzw. des Stadiums und der Konzentration von ctDNA im Blut wurde nachgewiesen, ebenso eine Korrelation zwischen der Menge von ctDNA und der Größe des Tumors in der Bildgebung (Fiala & Diamandis, 2018; Forsheo et al., 2012; C. A. Parkinson et al., 2016). Das Vorhandensein von ctDNA ist als negativer prognostischer Marker zu werten, insbesondere eine Zunahme im Verlauf geht mit schlechtem klinischem und radiologischem Outcome einher (Bettegowda et al., 2014; C. A. Parkinson et al., 2016). Demgegenüber weisen niedrige ctDNA Spiegel auf ein Ansprechen der Therapie, sowohl bei chirurgischer als auch bei pharmakologischer Behandlung hin (Diehl et al., 2008; Scherer et al., 2016). Erhöhte Spiegel von ctDNA sind auch bei Patienten mit Metastasen festgestellt worden (Stewart & Tsui, 2018). Eine höhere Sensitivität von ctDNA im Vergleich zu traditionellen Biomarkern hinsichtlich Prognose und Therapieansprechen bei metastasiertem Brustkrebs wurde beschrieben (Dawson et al., 2013). Es gibt jedoch auch Studien, die keinen starken Zusammenhang zwischen ctDNA Spiegel und prognostischer Aussagekraft beobachten konnten (Madic et al., 2015).

### **Monitoring**

Ein großer Vorteil von Liquid Biopsy im Vergleich zu den konventionellen Untersuchungsmethoden wie Gewebebiopsie und Bildgebung liegt in der geringeren Invasivität und Belastung für den Patienten. Liquid Biopsy besitzt das Potential eines langfristigen Monitorings, da durch Blutabnahmen im Verlauf der Therapie tumorspezifische Mutationen und Tumorevolution beobachtet werden könnten (Ulz et al., 2017). Nach Etablierung im klinischen Alltag könnte LB zu einem Paradigmenwechsel führen, indem neben den bildgebenden Verfahren die Tumormasse auch durch ctDNA Analyse bestimmt werden kann (Diaz & Bardelli, 2014). LB bietet das Potential eines dynamischen Monitorings bei Tumorprogress und medikamentöser Therapieüberwachung (X. Zhang, Ju, Wang, & Cong, 2019). Patientenindividuelle Assays mit ddPCR stellen eine Möglichkeit dar, Mutationen mit geringer Anzahl im Blut nachweisen und zeitlich beobachten zu können, erfordern jedoch eine vorausgehende Sequenzierung bzw. Kenntnis der Mutationslandschaft (Stewart & Tsui, 2018; Wan et al., 2017).



## **Resistenzmechanismen und Medikamentenmanagement**

Durch schnellere Diagnostik von Resistenzen bzw. eines Nichtansprechens der Therapie durch Liquid Biopsy wäre es grundsätzlich möglich, die medikamentöse Therapie an diese Gegebenheiten zu adaptieren, sodass therapieassoziierte Nebenwirkungen bereits vor fehlendem klinischem und bildmorphologischem Ansprechen minimiert werden könnten (Chu & Park, 2017). Ein Anstieg der Anzahl an Mutationen, die in Bezug zu Resistenzen gegen Pharmakotherapie stehen, konnte noch vor klinischer Progression festgestellt werden (Zheng et al., 2016). Durch Quantifizierung einer steigenden Allelfrequenz von tumorspezifischen Mutationen kann eine Resistenzentwicklung gegenüber der Therapie beobachtet werden (Heitzer, Ulz, & Geigl, 2015; Murtaza et al., 2013). 2016 hat die US-Amerikanische Gesundheitsbehörde Food and Drug Administration (FDA) die Zulassung für einen auf Liquid Biopsy beruhenden Test zur Überprüfung des *EGFR* Status beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom gegeben, sodass LB erstmals bei klinischen Entscheidungen Anwendung findet (Alix-Panabières & Pantel, 2016; Mader & Pantel, 2017). Ein Therapiemonitoring mit LB zeigte sich bei anti-EGFR-Therapie im Hinblick auf primäre und sekundäre Resistenzmechanismen vielversprechend (Bardelli et al., 2013).

## **Minimal residuale Erkrankung, Rezidiv und Früherkennung**

In der Remission ist ein Nachweis von ctDNA ungünstig, da er auf ein höheres Rückfallrisiko schließen lässt (Wan et al., 2017). Die Detektion von ctDNA nach Resektion ist ein potentieller Hinweis auf residuale Erkrankung und der Einsatz bei Rezidivkontrolle wäre denkbar (Diaz & Bardelli, 2014). In mehreren Studien gelang bis zu einem Jahr vor klinischem Auftreten eines Rezidivs eine Detektion von ctDNA im Blut (Alix-Panabières & Pantel, 2016; Garcia-Murillas et al., 2015). In einer Studie mit 230 Patient\*innen nach Colonkarzinomoperation zeigten sich bei jedem/er Patienten\*in einen Rückfall der Erkrankung innerhalb von 3 Jahren, wenn ctDNA beim ersten Nachsorgetermin im Blut nachgewiesen werden konnte (Tie et al., 2016).

Beim Management von minimal residueller Erkrankung (MRD) wäre LB als eine zusätzliche Alternative zur Bildgebung während des Follow-ups denkbar (Heitzer et al., 2015). Dank technischen Verbesserungen im Bereich der Sequenzierungstechnologien kann es in Zukunft möglich sein, Aussagen über Resistenzentstehung und Rezidivfrüherkennung, sowie

Informationen zur Risikostratifizierung eines Tumors durch ctDNA Analyse zu generieren (Stewart & Tsui, 2018).

### Idealvorstellung der klinischen Anwendung

In der Abbildung nach (Kwok, Wu, Mo, Summers, & Roschewski, 2016) wird beispielhaft die Idealvorstellung einer klinischen Anwendung von Liquid Biopsy bei der Initialbehandlung bzw. des anschließenden Rezidivs dargestellt. Die Grafik verdeutlicht die Aspekte eines Therapiemonitorings durch den quantitativen Nachweis von ctDNA, einer Tumorheterogenität dargestellt durch verschiedene Subklone sowie die Entwicklung hin zu einem Rezidiv.

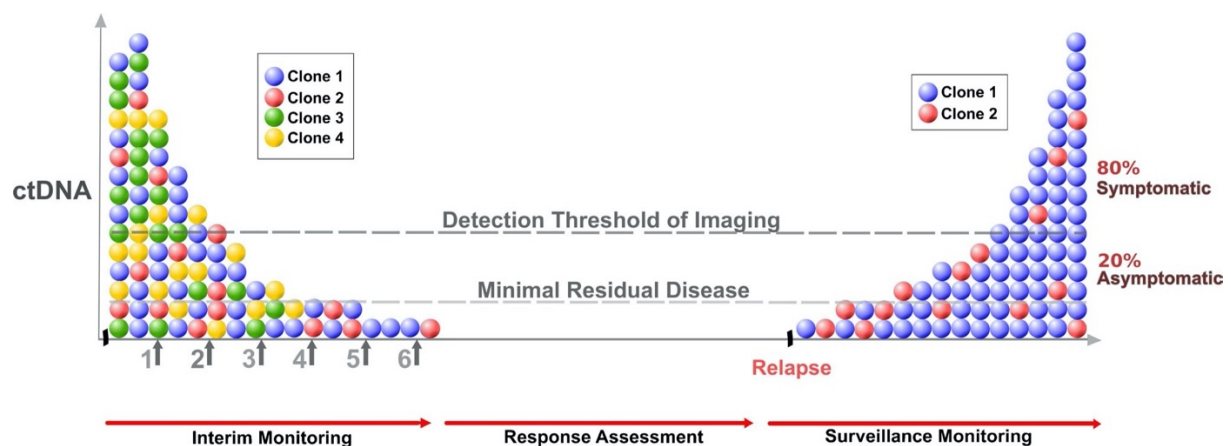


Abbildung 1-5: Eine Überwachung zirkulierender Tumor-DNA verbessert die Nachweisgrenzen im Vergleich zu bildgebenden Scans

(Quelle: aus dem Englischen nach (Kwok et al., 2016))

Zum Zeitpunkt der Diagnose lässt sich in der Bildgebung und in der Liquid Biopsy ein positiver Nachweis der Tumorerkrankung feststellen. Im Optimalfall ist die Erstlinientherapie so erfolgreich, dass in der Bildgebung und durch Liquid Biopsy kein Nachweis von Tumorlast zu sehen ist. In den Follow-up Untersuchungen kann mittels Liquid Biopsy, wie in der Abbildung zu erkennen, aufgrund einer besseren Sensitivität gegenüber der Bildgebung ein möglicher Rückfall schneller erkannt werden, sodass zukünftig unter Berücksichtigung der individuellen Mutations- und Resistenzlage durch LB ein Rezidiv bereits vor Nachweis in der Bildgebung behandelt werden könnte (Camus et al., 2017). Genauere Untersuchungen und Prüfung der

Theorien um Tumorentstehung und -progress, sowie klonaler Evolution könnte durch ctDNA Analyse möglich werden (Alix-Panabières & Pantel, 2016; Ulz et al., 2017).

### **Problematik und Limitationen**

Obwohl die zukünftige klinische Anwendung von Liquid Biopsy großes Potential verspricht, gilt es Probleme in der Standardisierung, Verbreitung und Vergleichbarkeit der verschiedenen Methoden zu klären (Heitzer et al., 2015; Kurtz et al., 2018). Die Diskrepanz von Liquid Biopsy in Bezug auf die Aufmerksamkeit in den Medien und dem routinemäßigen Einsatz in der Klinik ist durch weitere Studien zu vermindern (Wang et al., 2017). Es ist bisher kein Standard bei den verschiedenen technischen Methoden, welche unter dem Begriff LB subsumiert werden, festgelegt worden, sodass die Vergleichbarkeit von LB zwischen den Methoden bzw. dem aktuellen klinischen Standard aufgrund der verschiedenartigen Techniken wie ddPCR, NGS, Whole-Genome-Sequencing oder CAPP-Sequencing erschwert wird (Han, Wang, & Sun, 2017; Ilie et al., 2014). Einige Quellen sehen die Anwendung von LB primär bei Reevaluation und bei Biopsien schwieriger anatomischer Lage, weniger bei dem unspezifischen Thema der medialen Aufmerksamkeit einer vollständigen Tumoranalyse aus wenigen Tropfen Blut (Alix-Panabières & Pantel, 2016). Hier fehlt laut den Autoren noch an weiterer Forschung sowie Verbesserungen in Sensitivität und Spezifität.

Ebenso sind technische Grenzen bei der DNA-Input-Menge, sowie Fehlerraten der PCR und dem Sequenzierablauf gegeben (Camus et al., 2017). Liquid Biopsy liefert per se den Nachweis einer tumorösen Erkrankung, die genaue Lokalisation des Tumors oder der Metastasen bleiben durch diese Untersuchungen jedoch unbekannt (Camus et al., 2017). Kritisch zu betrachten sind der noch nicht gänzlich geklärte Mechanismus um die Freisetzung der ctDNA und welche Einflussfaktoren auf diese einwirken (Camus et al., 2017; Heitzer et al., 2015). Neben dem monetären Faktor einer teuren und neuen Technologie liegt eine weitere Problematik in der Diskrepanz zwischen rascher klinischer Entscheidungsfindung und der mehrere Tage dauernden Analyse der Blutproben (Ilie et al., 2014).

Um eine objektivierbare Meinung in Bezug auf den klinischen Stellenwert von LB zu generieren, sind große, randomisierte klinische Studien mit Endpunkten bei Therapieentscheidungen nötig (Alix-Panabières & Pantel, 2016).

### 1.2.3 Anwendung von Liquid Biopsy bei Non-Hodgkin Lymphomen

Im vorherigen Kapitel wurde schwerpunktmäßig auf Liquid Biopsy im Allgemeinen eingegangen. Der bisherige Wissensstand und die Anwendung von LB bei Non-Hodgkin Lymphomen werden im folgenden Kapitel näher beschrieben. Im Folgenden werden Studienergebnisse und Erkenntnisse zur klinischen Umsetzung von LB bei DLBCL und FL zusammengefasst.

#### **Liquid Biopsy beim DLBCL**

Ein potentieller Einsatz von Liquid Biopsy bei NHL wäre insofern eine Verbesserung, da besonders Risikogruppen mit schlechtem Outcome oder schlechtem Therapieansprechen derzeit nur schwer erkannt werden (Scherer et al., 2016). Limitationen besitzt derzeit auch die Aussagekraft von bildgebenden Verfahren. Die PET-CT wird der Diagnostik und als Staging-Untersuchung nach Abschluss der Chemotherapie verwendet, bei Rezidiv zeigt diese Bildgebung keine Verbesserung des Überlebens der Patienten (Scherer et al., 2016; Thompson et al., 2014).

#### **Mutationen**

Eine Korrelation der Allelfrequenz patientenindividueller Mutationen zwischen Gewebe und Plasma konnte gezeigt werden, sodass die Analyse von ctDNA eine gute Einschätzung über die Mutationslandschaft des Tumors leisten kann (Scherer et al., 2016). LB zeigt gleichwertige Ergebnisse beim Genotyping von NHL im Vergleich zu der Gewebebiopsie (Rossi et al., 2017). Die Erfassung von Mutationen mehrerer Subklone durch Liquid Biopsy wurde gezeigt und dadurch wird ein Einblick in die Heterogenität des Tumors gegeben (Kridel et al., 2017; Schurch, Federmann, Quintanilla-Martinez, & Fend, 2018). Liquid Biopsy zeigt aufgrund des Wissens der genetischen Landschaft Einblicke in die Tumorerogenität von DLBCL beispielsweise durch den Nachweis von Treibermutationen oder durch potentielle Angriffspunkte für eine mögliche Antikörpertherapie (Camus et al., 2017; Dubois et al., 2015; Reddy et al., 2017). Mit LB gelang bereits die Detektion einer Medikamentenresistenz bei fehlendem Ansprechen auf eine Antikörpertherapie mit dem Thyrosinkinaseinhibitor Ibrutinib

(Scherer et al., 2016). Bei der Einteilung der DLBCLs in GBC und non-GBC Typ ist eine Micro-Array Untersuchung derzeit nötig, wobei nach der Erstellung eines entsprechenden Gene-Panels in rund 88% der Fälle (n=41) eine Einteilung in COO-Klassifikation auf Basis von ctDNA Analyse bereits erfolgen konnte (Scherer et al., 2016).

### **Prognose und Therapiemonitoring**

Da für NHL keine spezifischen Proteinmarker existieren, gibt insbesondere die Erhöhung des Laborparameters für unspezifischen Zelluntergang LDH eine Einschätzung zum Tumorgeschehen, wobei häufig Limitationen in der LDH Diagnostik beobachtet werden konnten. In nur 37% der beobachteten Fälle war zum Diagnosezeitpunkt eines DLBCL die LDH über die Norm erhöht war, wohingegen ctDNA bei jedem einzelnen Patienten nachgewiesen werden konnte, sodass von einer besseren Sensitivität der ctDNA als Tumormarker gegenüber der LDH Diagnostik ausgegangen werden kann (Scherer et al., 2016). Erhöhte ctDNA Level zu Beginn der Erkrankung gehen ebenso bei NHL mit höheren Stadien und schlechterem Überleben einher (Scherer et al., 2016). Ist das Ergebnis der Liquid Biopsy Untersuchung und der Bildgebung zum Tumornachweis konkordant, konnte eine gute Prognose bei doppelt negativen Untersuchungen beobachtet werden, wohingegen Patient\*innen aus der Gruppe mit doppelt positivem Tumornachweis in Bildgebung und im Blut ein extrem erhöhtes Risiko für Therapieversagen aufweisen (Kurtz et al., 2018).

Für das Therapiemonitoring, insbesondere zur Beurteilung von Ansprechen und möglicher Progression, wurde der Ansatz der „molecular response“ (deutsch: molekulares Ansprechen) vorgestellt (Kurtz et al., 2018). Dort wurden ctDNA Level in der Einheit „haploid genome elements“ gemessen, die das Produkt aus der gesamten cfDNA Menge und der mittleren Allelfraktion der somatischen Mutationen ist, ausgedrückt in Logarithmischer Skala (Kurtz et al., 2018). In dieser Studie mit 216 Patienten zeigte sich ein deutlich besseres Outcome, wenn die Blutproben der Patienten nach Abschluss des ersten Zyklus Chemotherapie ein Verringerung des ctDNA Spiegel um  $\log_2$  hGE/ml (haploid genome Elements) bzw. um  $\log_2,5$  hGE/ml nach dem zweiten Zyklus aufweisen. Ein initiales Ansprechen auf die Chemotherapie innerhalb des ersten Zyklus bzw. innerhalb von 21 Tage nach Therapie durch ein schnelles Absinken des ctDNA Spiegels ist prognoseentscheidend für das DLBCL, sodass bereits zu

diesem Zeitpunkt zwischen Respondern (zu deutsch: ansprechenden Patienten) und non-Respondern unterschieden werden konnte (Kurtz et al., 2018). In dem gleichen Paper wurde auch der Zusammenhang von PET-CT und ctDNA untersucht, mit dem Ergebnis, dass beide Untersuchung unabhängig voneinander als prognostisches Instrument für das Langzeitüberleben anzusehen sind. Mit LB lassen sich durch Veränderungen in der „minor-allel-frequency“ (MAF) Aussagen über mögliche Behandlungsstrategien und hinsichtlich eines dominanten Subklons treffen (Murtaza et al., 2013; M. Roschewski, Staudt, & Wilson, 2016).

### **Minimal residuale Erkrankung**

Die Behandlung des DLBCL zielt bei Kuration auf die volle Elimination der Tumorlast ab, sodass alle Subklone eradiziert werden sollen und im Optimalfall kein Tumorgewebe mehr im Körper verbleibt. Falls doch aktiver Tumor unter der Nachweisgrenze in der Bildgebung nach Therapie verbleibt, kann der Nachweis durch die sensitivere LB erbracht werden und die Erkrankung dementsprechend nicht als geheilt klassifiziert werden (M. Roschewski et al., 2016). Derzeit existiert keine Untersuchungsmethode im klinischen Alltag mit ausreichend zeitiger und spezifischer Aussagekraft zu Erkennung eines Rezidivs (Camus et al., 2017). Eine Erhöhung des LDH Wertes ist kein spezifischer und zeitlich präziser Marker für Rezidiverkennung, ist dennoch trotz dieser Limitation Teil der klinischen Routine (Camus et al., 2017; Weeks, Yeap, Canellos, & Shipp, 1991). Im klinischen Alltag wird die KM-CT Untersuchung als Kontrolluntersuchung beim Follow-up verwendet, wobei neben der Strahlenbelastung die geringe Frequenz der Bildgebung im Intervall von 3 Monaten als nachteilig anzusehen ist, sodass LB hier im Vergleich durch eine höhere Frequenz in der Blutentnahme besticht. Die PET-CT gibt keine Auskunft über dynamische Prozesse wie klonaler Evolution oder Entwicklung von zellulärer Resistenz, sondern stellt eine Momentaufnahme der tumorösen Ausbreitung fest (M. Roschewski et al., 2016). Aufgrund der Nachteile einer PET-CT wie hohe Kosten, Strahlung und limitierte Verbreitung ist eine Überlegenheit von ctDNA vor allem bei Follow-Up Besuchen zur Remissionskontrolle denkbar (Camus et al., 2017). Durch einen ctDNA Assay bei 11 Patienten konnte im Mittel 188 Tage vor klinischem Rückfall bzw. Rezidiv erhöhte ctDNA Mengen nachgewiesen werden (Scherer et al., 2016).

### **Liquid Biopsy beim Follikulären Lymphom**

Beim FL wurden mittlere Spiegel von ctDNA im Blut beobachtet, im Gegensatz zum DLBCL oder primär mediastinale B-Zell-Lymphom, welche mit hohen bis sehr hohen ctDNA Spiegeln einhergehen (Darrah & Herrera, 2018). Ähnlich soliden Tumoren ist beim Follikulären Lymphom ein hoher ctDNA Spiegel mit schlechter Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert (Delfau-Larue et al., 2018). Mutationen von *TP53* werden in mehreren Studien als prognostisch ungünstig beschrieben und bei Transformationen des FL treten diese verstärkt auf (Kridel et al., 2017; Laura Pasqualucci et al., 2014). Transformierte FL besitzen eine Ähnlichkeit in Hinblick auf Proliferation und Dynamik zum DLBCL und generell ist eine erhöhte Anzahl von Mutationen in der LB als verstärkter Risikofaktor für eine Transformation identifiziert worden (Gentles et al., 2009; Kridel et al., 2017; Scherer et al., 2016). In einer relativ kleinen Gruppe (n=4) konnte im Mittel 66 Tage vor klinischer Diagnose aufgrund von ctDNA Analyse eine Transformation beobachtet werden, sodass ein zukünftiger Einsatz hinsichtlich möglicher Früherkennung einer Transformation denkbar wäre (Scherer et al., 2016). Der klinische Einsatz von Liquid Biopsy bei Follikulären Lymphomen bedingt, wie beim DLBCL, derzeit aber noch eine Validierung und Testung in großen Studien (Kridel et al., 2017).

### **Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP)**

Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) wird als das Vorhandensein einer klonalen Stammzellpopulation im Blut definiert, welche in Verbindung zu Treibermutationen für hämatologische Neoplasien stehen und per Definition in Abwesenheit von schwerer Zytopenie oder einem nach WHO definierbaren Tumorleiden vorkommen (Steensma, 2018; Steensma et al., 2015). Die Begriff "indeterminate potential" bezeichnet die Ungewissheit, ob und in welcher Form die Mutationen in Tumortransformation/-progress oder andere Prozesse wie Autoimmunerkrankungen oder Neurodegenerative Erkrankungen eingreifen (Steensma, 2018). In der Definition wird für CHIPS eine klonale Blutzellpopulation mit einer Allelfrequenz von  $\geq 2\%$  festgelegt, welche mit einer allgemeinen, minimalen Nachweisgrenze der Allelfrequenz von rund 2% für verschiedene NGS-Plattformen begründet wird, wobei diese Grenze willkürlich definiert ist und je nach NGS Methode auch unter 2% liegen kann bzw. auch an zukünftige Erkenntnisse angepasst werden könnte (Steensma, 2018). Der Nachweis einer

CHIP geht mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer hämatologischen Erkrankung einher und häufig gefundene, mutierte Gene sind DNMT3A, TET2, ASXL1, JAK2 und TP53 (Chen & Liu, 2019). Grenzfälle die Definition einer CHIP betreffend sind Mutationen, die in Zusammenhang mit oder nach einer vorangegangenen Tumorerkrankung nachzuweisen sind, insbesondere falls die betroffenen Gene beiden Erkrankungen zugerechnet werden können (Suehara et al., 2019). Es wurden Mutationen von TP53 bei Patienten mit kompletter Remission nach erfolgreicher DLBCL-Therapie als CHIP beschrieben und nicht als Lymphom eigen bzw. im Sinne einer residual disease gewertet (Suehara et al., 2019).



## 2 Problemstellung

Bisher ist eine Grundlage an Forschungsarbeiten und Studien zum Thema Liquid Biopsy veröffentlicht worden. Untersuchungsschwerpunkte waren zum Großteil Gewebe von soliden Tumoren, sowie eine mögliche Korrelation zwischen Bildgebung, ctDNA-Menge und Allelfrequenz bestimmter Mutationen. Eine Sequenzierung zwecks Detektion tumorspezifischer Mutationen erfolgte in der Mehrzahl der Fälle aus Tumorgewebe. Da dies mit genannten Schwierigkeiten und Problemen verbunden ist, wird in dieser Arbeit eine Sequenzierung mit Next generation Sequencing (NGS) direkt aus dem Blut von Patienten mit der Diagnose NHL erfolgen.

Es soll untersucht werden, inwiefern im Patientenplasma tumorspezifische Mutationen durch ein NGS mit dem Roche Avenio Expanded Kit festgestellt werden können. Sollten im NGS tumorspezifische Mutationen detektiert worden sein, werden die weiteren Blutproben der Patient\*innen mit einer digitalen droplet Polymerasekettenreaktion (ddPCR) hinsichtlich Quantität und zeitlichem Verlauf von ctDNA untersucht. Die entsprechenden Primer und Sonden für eine patientenindividuelle ddPCR Analyse wurden kommerziell erworben oder eigens konstruiert. Abschließend erfolgte die Umrechnung, Auswertung und Einordnung der Ergebnisse in den klinischen Kontext. Es soll allgemein untersucht werden, inwiefern selbst-designte bzw. kommerziell erworbene ddPCR Assays und NGS sich in der Untersuchung von ctDNA ergänzen können und zur Beurteilung der Mutationslast zusammen verwendet werden können.

Es soll zum einen ein Fokus auf die qualitative Analyse der im NGS festgestellten Mutationen gelegt werden und zum anderen die absolute Quantifizierung der ctDNA bzw. der Allelfrequenzen und Allelkonzentrationen der tumorspezifischen Mutationen im zeitlichen Verlauf der Erkrankung dargestellt werden.

In der **qualitativen Beurteilung** soll die Einordnung der im NGS detektierten Mutationen im Kontext der Tumorerkrankung erfolgen. Es werden hierbei folgende Punkte näher untersucht:

- Die Beurteilung und Einordnung der identifizierten Mutationen mittels Datenbankanalyse hinsichtlich ihrer Pathogenität und eines möglichen

therapeutischen Mehrwertes (diagnostische Relevanz, Therapie- und Risikostratifizierung)

- Eine mögliche Übereinstimmung von tumorspezifischen Mutationen in der Detektion mit NGS aus dem Plasma und der ddPCR Analyse der DNA aus der initialen Gewebebiopsie
- Eine mögliche Detektion und Einordnung von nicht tumorassoziierten Mutationen
- Der Mehrwert einer NGS-basierten Mutationsanalyse im Verlauf eines Rezidivs verglichen mit der einmaligen Mutationsbestimmung bei Diagnosestellung (Studieneinschluss) zur Erfassung der genetischen Tumorevolution und möglicher Subklonselektion

Bei der **Quantifizierung** der ctDNA in der ddPCR werden folgenden Aspekte untersucht:

- Der Stellenwert von LB beim Monitoring von tumorspezifischen Mutationen und zur Beurteilung der Tumorlast während des Krankheitsverlaufs
- Die Bewertung und Einordnung einer in LB festgestellten Tumordynamik im Hinblick auf die erhaltene Therapie
- Die Untersuchung einer Konkordanz zwischen den Bildgebungsbefunden und den Ergebnissen der Liquid Biopsy
- Die Analyse einer möglichen Korrelation der Allelkonzentrationen mit dem routinemäßig-erhobenen LDH-Wert im Serum

Abschließend soll geklärt werden, inwiefern eine Liquid Biopsy Diagnostik durch eine Kombination von breitem NGS profiling und gezielter mutationsspezifischer ddPCR im Krankheitsverlauf klinisch wertvolle Informationen liefern kann. Ebenso sollen Fragen zur Kosteneffizienz, der Datenerhebung und der Machbarkeit mitsamt Limitationen im klinischen Umfeld des Klinikums rechts der Isar beurteilt werden.

### 3 Material und Methoden

Bei der Erstellung der Kapitel 3.1. und 3.2. wird Bezug genommen auf den Ethikantrag der LYMPHCIN Studie (Fassung 06.02.2017) am Klinikum rechts der Isar mit dem Titel „*Prospektive Studie zum Therapiemonitoring bei fortgeschrittenen B-Zell-Lymphomen durch Detektion zirkulierender zellfreier Tumor- Nukleinsäuren im peripheren Blut*“. Dieser regelt unter anderem die grundsätzlichen Voraussetzungen der Studie wie Ablauf, Organisation, Erhebung und Auswertung der Daten. Die Leitung der Studie hatten bei Beginn Herr Dr. Dr. Winter und Frau Dr. Kerle inne. Die Studienleitung von Frau Dr. Kerle hat im September 2018 Herr Dr. Blüm übernommen.

#### 3.1 Studienpopulation

Die Patientenrekrutierung und Datenerhebung der vorliegenden Dissertation gelang im Rahmen der LYMPHCIN-Studie. Diese wurde am Klinikum rechts der Isar, Universitätsklinikum der Technischen Fakultät München, in Kooperation zwischen dem Institut für Klinische Chemie und der III. Medizinischen Klinik durchgeführt. Nach Aufklärung über die Teilnahme und Aushändigung von Informationsmaterial wurde die schriftliche Zustimmung der Patient\*innen zu Beginn des Behandlungsaufenthaltes eingeholt. Einschlusskriterien sind neben einem histologisch gesichertem Diffus großzelligem B-Zell-Lymphom oder Follikulärem Lymphom im Stadium III oder IV nach der Ann-Arbor bei Erstdiagnose beziehungsweise zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses, die schriftliche Zustimmung zur Teilnahme sowie ein Alter von über 18 Jahren zu Beginn des Einschlusses. Die Möglichkeit eines nachträglichen Ausschlusses ist bei Eingang eines histopathologischen Befundes gegeben, wenn dieser nicht den Nachweis eines B-Zell Lymphom enthält. Vorzeitiges Ausscheiden und die Beendigung der Studienteilnahme sind bei Faktoren wie der persönliche Wunsch des Patienten, ein Kontaktverlust durch Ortswechsel und Tod des Patienten zu jeder Zeit möglich.

## 3.2 Probenmaterial

### Blutuntersuchungen

Im Rahmen der klinischen Diagnostik und zur Therapiekontrolle werden regelmäßige Routine-Laborkontrollen durchgeführt. Diese dienen zur Überprüfung des klinischen Zustandes, zur Verlaufskontrolle und frühzeitiger Erkennung von therapieassoziierten Nebenwirkungen bzw. Komplikationen. Die Zeitpunkte der Blutentnahmen entsprechen der gängigen klinischen Praxis, womit eine routinemäßige Abnahme bei folgenden Zeitpunkten gemeint ist:

- Bei Erstdiagnose bzw. Erstkontakt
- An jedem ersten Tag eines neuen Chemotherapie- oder Radiotherapiezyklus
- Am Tag der Staginguntersuchungen durch eine Bildgebung
- Bei Nachsorgebesuchen im Rahmen von Follow-Up Terminen alle 3 Monate bis 2 Jahre nach Behandlungsende
- Bei ungeplanten Vorstellungen aufgrund von Therapie- oder Krankheitsassoziierten Komplikationen

An diesen Zeitpunkten werden zusätzlich zu dem klinischen Routinelabor, welches Serumchemie (siehe Tabelle), ein Differenzialblutbild sowie ein Probenröhrchen für die Analyse der Standard-Gerinnungsparameter enthält, eine Blutprobe für die LYMPHCIN Studie abgenommen. Das Blut wird in 9ml fassende EDTA-Röhrchen gesammelt und zusammen mit dem Routinelabor in das Institut für klinische Chemie geschickt. Die Patienten erhalten keine Blutabnahmen an zusätzlichen Terminen für Studienzwecke.

*Tabelle 3-1: Untersuchte Parameter der Serumchemie*

Natrium	Harnstoff	Alkalische Phosphatase
Kalium	Laktatdehydrogenase	Albumin
Calcium	Bilirubin	Gamma-Glutamyl-Transferase
Kreatinin	Amino-Aspartat-Transferase	Harnsäure

Im Institut für Klinische Chemie beginnt der Prozess der Probenaufbereitung, welcher durch „Standard Operating Procedures“ (SOP) des Klinikums geregelt ist. Das EDTA Röhrchen wird zuerst bei 15°Celsius mit 2000-facher Erdbeschleunigung für 15 Minuten zentrifugiert, sodass zelluläre und flüssige Bestandteile voneinander getrennt werden. Das Plasma wird, ohne den Buffy-Coat zu berühren, in ein neues fassendes Röhrchen pipettiert. Der Buffy-Coat ist die Schicht zwischen dem darüber liegenden Plasma und den darunter liegenden Erythrozyten, welche die restlichen zellulären Bestandteile des Blutes wie beispielsweise Leukozyten enthält. Das Plasma wird erneut bei 15°Celsius mit 2000-facher Erdbeschleunigung für 15 Minuten zentrifugiert. Das verbleibende Plasma wird in jeweils 2ml fassende Eppendorf Tuben pipettiert und bei -80 ° Celsius zur späteren Verwendung eingefroren.

### **Gewebeentnahme**

Eine gesicherte Diagnosestellung erfordert standardmäßig eine Gewebebiopsie des Primärtumors, um die histologische und molekulargenetische Identität des Tumors festzustellen. Die Biopsien werden nach chirurgischer Entnahme in das pathologische Institut des Klinikums rechts der Isar gesendet und unterlaufen zwecks Probenaufarbeitung klinikinterne SOPs. Diese regeln das Verfahren der Probenasservierung und die spätere histologische Aufarbeitung. Je zwei Proben aus dem Tumor und eine Gewebeprobe mit Normalgewebe werden aus dem Biopsat extrahiert. Die Proben werden den Datenschutzvorschriften entsprechend mit Pseudonymen versehen und in speziell dafür vorgesehenen Gewebetanks in flüssigem Stickstoff zur späteren Verwendung eingefroren. Eine Aufarbeitung der Proben erfolgt nach Entnahme aus den Kühltanks durch Mitarbeiter der Pathologie an einem Schnittpräparat. Das mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Präparat wird standardmäßig für die Diagnosestellung von erfahrenen Fachpersonal mikroskopisch beurteilt und immunhistochemisch untersucht. Nicht benötigte Gewebeproben werden in der Pathologie verwahrt und stehen für spätere Anfragen bereit. Für die LYMPHCIN Studie wurde, falls vorhanden, verbliebene DNA aus dem Tumorgewebe angefordert, um die Fragestellung nach dem Vorhandensein und der Konkordanz von Mutationen im Gewebe und im Blut beantworten zu können.

### 3.3 Klinische Parameter

Neben den regelmäßigen Blutentnahmen bei Besuchen der hämatologischen Ambulanz, dienen insbesondere die bildgebenden Untersuchungen und die erhaltene medikamentöse Therapie als Referenz für das klinische Erscheinungsbild der Patienten. Das Routinelabor wird vollautomatisiert im Institut der Klinischen Chemie analysiert und die Ergebnisse werden im klinikinternen Befundsystem „Swisslab“ gespeichert. Im Zuge der Dissertation wurden die gespeicherten Laborbefunde aus dem System exzerpiert und mit den Laborbefunden des separat agierenden Labors der Hämatologie ergänzt. Von den Laborparametern bei regelmäßiger Kontrolle stehen besonders der zeitliche Verlauf des Differentialblutbildes, Serumspiegels von LDH, sowie den Retentionsparametern im Fokus. Informationen über den klinischen Zustand und Beschreibungen über das Krankheitsgeschehen konnten durch einen ärztlichen Account in SAP aus den Arztbriefen der III. Medizinischen Klinik und durch Einsicht in die Papierakte generiert werden. Über einen Zugang zum klinikinternen Patientenverwaltungssystem konnten, unter Wahrung des Datenschutzes, die Befunde der bildgebenden Untersuchungen, insbesondere die PET-CT und KM-CT Befundberichte, eingesehen werden. Die Fragen nach bildmorphologischem Progress, Remission oder stabilem Zustand stehen hier im Vordergrund. Die erhaltene Therapie, sowie Abweichungen vom festgelegten Dosierungs- und Verabreichungsschema bei therapieassoziierten Nebenwirkungen wurden aus der elektronischen und der Papierakte exzerpiert.

### 3.4 DNA Sequenzierung mittels „Next generation Sequencing“

#### **Theoretische Grundlagen**

Die erste Generation zur Analyse von DNA-Abschnitten bzw. des menschlichen Genoms arbeitete mit der Sequenzierungsmethode nach Sanger. Darunter versteht man die Kettenabbruchmethode aufgrund des Einbaus von Didesoxyribonukleotiden (ddNTP) während der enzymatischen DNA-Polymerisation. Die Weiterentwicklung der in den 1970er Jahren entwickelten Methode ist die Sequenzierung der zweiten Generation, welche unter anderem die Möglichkeit zur Beobachtung in Echtzeit geben konnte (Frontzek, 2015, pp. 173, 180). Die

neueste Generation der Sequenzierungstechnologien wird unter dem Begriff Next Generation Sequencing (NGS) zusammengefasst. Bahnbrechend für diesen neuen Zweig der Sequenzierung war die Vorstellung einer neuen Technologie der Firma „454 Life Science“ im Jahre 2005, die mittels Pyrosequenzierung erstmals mehr als 1 Million Sequenzierungen parallel pro Pikotiterplatte durchführen konnte (Frontzek, 2015, p. 187; Margulies et al., 2005). Der heutige Markt ist reich an einer Vielzahl kommerziell angebotener Techniken, unter anderem haben sich Methoden und Geräte wie Roche 454 Genome Sequencer-Systeme, Ion Torrent-Systeme, SOLiD-Technologie oder Illumina etabliert (Frontzek, 2015, pp. 187-190). (ISBN-978-3-527-33502-2) Im Folgenden wird die bei der Dissertation verwendete Technik der Firma Illumina näher beschrieben.

Folgende Übersicht beschreibt die notwendigen Arbeitsschritte, unter Berufung auf den Hersteller bzw. auf ein Sammelwerk zum Thema Molekulare Diagnostik (Frontzek, 2015, p. 189; Illumina, 2010):

1. Probenaufbereitung durch Zugabe der DNA-Fragmente in eine Cartridge und Ligation mit Adaptoren für die Trägeroberfläche
2. Amplifikationsreaktion und Erstellung von DNA-Clustern
3. Sequenzierung
4. Datenaufbereitung und -auswertung

In der Amplifizierungsreaktion werden bis zu 1000 Kopien in unmittelbarer Nähe ( $\leq 1\text{mm}$ ), sogenannte Cluster, um ein jeweiliges DNA Fragment durch eine „Bridge“(Brücken)-PCR nebeneinander produziert (Illumina, 2010; Yohe & Thyagarajan, 2017). Die Bridge-PCR hat ihren Namen aufgrund des brückenartigen Aussehens der DNA Sequenzen bei der Amplifikationsreaktion. Pro Durchlauf können bis zu 600 Gigabasen untersucht werden, wenn pro Cluster maximal 300 Basen analysiert werden sollen (Frontzek, 2015, p. 189).

Im ersten Arbeitsschritt werden die zu untersuchenden Fragmente der Proben-DNA mit den vom Hersteller gelieferten Reagenzien in einer Cartridge (ins Deutsche übersetzt: Patrone) gemischt. An den Enden der unterschiedlich langen Fragmente binden modifizierte Adapter,

die für die Bindung an die Trägeroberfläche bei der späteren Amplifikationsreaktion benötigt werden. Anschließend werden die ligierten Stränge auf einer Trägeroberfläche aufgebracht und ein Ende des mit Adaptoren versehenen DNA-Fragmentes lagert sich an einem der zwei komplementären Adaptoren, welcher auf der Zelloberfläche des Trägers gebunden ist, an.

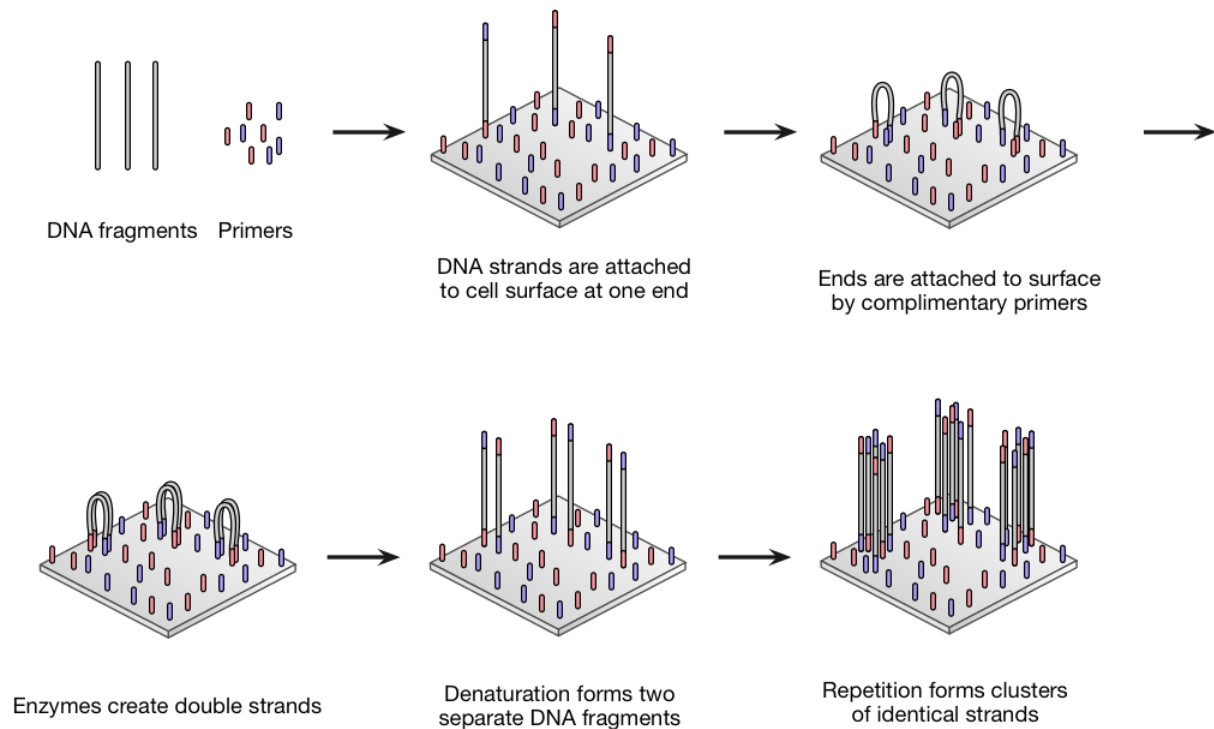


Abbildung 3-1: Amplifizierungsreaktion durch Bridge-PCR

(Quelle: (Brown & Brown))

Es erfolgt die Hybridisierung durch eine DNA-Polymerase zu einem Doppelstrang und die anschließende Denaturierung. Dieser ursprüngliche Strang verbindet sich mit den Adaptoren der Zelloberfläche und wird durch eine DNA-Polymerase zur Doppelstrang-DNA in namensgebender Brückenform komplementiert. Dieser Doppelstrang wird im nächsten Schritt durch Denaturierung getrennt und die Einzelstränge verbleiben in enger räumlicher Verbindung zueinander, sodass nach mehrfacher Wiederholung der Amplifikationsreaktion Millionen von Clustern gleicher DNA entstanden sind. Die Amplifikationsreaktion auf Trägeroberfläche (Illumina) erzeugt zwischen 100 und 200 Millionen Cluster mit freien Enden für die anschließende NGS Reaktion (Metzker, 2010). Nach Erstellung der Cluster erfolgt das Separieren und ggf. das Entfernen der „reverse strands“, also der 3′-5′ Stränge.



Die Sequenzierung der Einzelstränge erfolgt mit Hilfe chemisch modifizierter Desoxynukleotide (dNTP). Diese enthalten einen Farbstoff neben der am 3'-Ende vorhandenen Azido-Methylgruppe (AMG). Der Fluoreszenzfarbstoff bindet über Azido-Methylgruppe an das Nukleotid und ist für jedes der vier Nukleotide (A,G,T,C) verschieden, sodass die eingebaute Basen im späteren Arbeitsschritt voneinander differenziert werden können. Ein Einbau der dNTPs in die entstehende Kette führt zu einem Stopp der Sequenzierung in jedem Zyklus, da die AMG am 3'Ende eine Blockierung bei der Verlängerung durch eine DNA-Polymerase bewirkt. Nicht gebundene dNTPs werden in einem Waschvorgang entfernt.

Die Platte wird mit einem Laser bestrahlt und die Fluoreszenzfarbstoffe an den eingebauten dNTPs werden angeregt. Diese emittieren Lichtwellen verschiedener Spektren, wodurch eine eindeutige Zuordnung zwischen den verschiedenen Basen (A,G,C,T) für jedes Cluster erfolgen kann. Darauf wird die AMG Base am 3'Ende mit einem Reduktionsmittel (Tris(2-carboxyethyl)phosphin) abgespalten und an das freie 3'OH Ende kann ein neues Nukleotid binden (Bentley et al., 2008). Der gesamte Reaktionszyklus wird multipel wiederholt und in dem zweiten Schritt kann der 3'-5'Strang sequenziert werden, um Sequenzierfehler zu reduzieren, das Leseverhalten zu verbessern und ein „paired-end reading“, also die Analyse räumlich getrennte Regionen, zu ermöglichen (Yohe & Thyagarajan, 2017).

Die Detektion und Auswertung der Lichtsignale, sowie der Abgleich der DNA-Fragmente mit einem Referenzgenom erfolgen computergestützt. Die entstehenden Daten werden in einem bioinformatischen Prozess aufbereitet und in ein variant call file (VCF) formatiert (DePristo et al., 2011). Ein Merkmal der verwendeten Methode der Firma Illumina ist die annähernde Vollautomatisierung des Vorganges, welche durch mitgelieferte Reagenzien für Amplifikation und Sequenzierung möglich ist (Bentley et al., 2008). Einzig die Ziel-DNA muss mit Adaptersequenzen versehen werden. Es lassen sich Genauigkeiten für die Identifizierung der DNA Sequenzen zwischen 99,5 und 99,8% feststellen (Frontzek, 2015, p. 189) Die Methode der Firma Illumina ist den anderen Herstellern an Genauigkeit überlegen, jedoch mit dem Nachteil eines erhöhten zeitlichen Aufwandes (bis zu 5 Minuten für eine Zyklus) (Frontzek, 2015, p. 189).

## **Vorteile von NGS**

NGS ist eine etablierte Methode, um Keimbahn-assoziierte oder somatische, erworbene Mutationen festzustellen (Yohe & Thyagarajan, 2017). Ein großer Vorteil der NGS im Vergleich zu früheren Methoden liegt in der Analyse großer DNA Anschnitte oder ganzer Genome, welche in einem einzelnen Test analysiert werden können (Yohe & Thyagarajan, 2017). Es ist möglich, große Mengen an Daten zu generieren, teilweise bis zu einer Milliarde Informationen pro Durchlauf (Metzker, 2010). NGS erlaubt neben der Sequenzierung von DNA und der Untersuchung von mRNA, die Analyse von alternativem Splicen oder seltenen genetischen Transkripten (Metzker, 2010). Die Entdeckung von Mutationen ohne genaue Kenntnis über die genetische Landschaft ist durch NGS möglich geworden (Metzker, 2010; Stewart & Tsui, 2018).

## **Nachteile von NGS**

Die fehlende Vergleichbarkeit zwischen den Geräten ist als Nachteil zu werten, da sich die jeweiligen Herstellerangaben über Genauigkeit auf unterschiedliche Techniken bei der Sequenzierung beziehen und so den Vergleich zwischen verschiedenen Geräten erschweren. Diverser Einflussfaktoren bei DNA Isolierung, über Sequenzierung hin zur Bioinformatische Aufarbeitung der Daten lassen keine genaue Aussage über eine Gesamtvalidität zu, sodass eine Angabe der Gesamtvalidität von NGS Untersuchungen nicht zu empfehlen ist (Yohe & Thyagarajan, 2017). Für Illumina Geräte sind zwei Fehler bei NGS bekannt. Zum einen kommt es gehäuft zu Substitutionsfehlern bei neu eingebauten Nukleotiden, wenn die zuvor eingebaute Base Guanin ist (Dohm, Lottaz, Borodina, & Himmelbauer, 2008; Metzker, 2010). Zum anderen ist bei der Genomanalyse eine Unterrepräsentation von AT- und GC-reichen Regionen festgestellt worden (Dohm et al., 2008; Metzker, 2010). Als Limitation ist die Input-Mengenuntergrenze an DNA zu sehen, sodass Probleme insbesondere bei wenig Probenmaterial auftreten können (Yohe & Thyagarajan, 2017). Generelle Einschränkungen des NGS bestehen unter anderem bei der Sensitivität der Analyse, schwierig zu analysierenden Genabschnitten, der Interpretation von seltenen Varianten und der Integration der Daten in das klinische Management bei der Behandlung von Patienten (Yohe & Thyagarajan, 2017).

## Wirtschaftliche Problematik des NGS

Nachteilig bei der NGS Technologie ist derzeit noch der Kostenfaktor. Im Jahre 2005 kostete eine Analyse des gesamten Genoms zwischen 10 und 25 Millionen US Dollar (Margulies et al., 2005). Die Preise dafür sind rapide gesunken, so kostete die Analyse eines gesamten menschlichen Genoms im Jahr 2017 im Durchschnitt rund 3800 € (Plöthner, Frank, & von der Schulenburg, 2017).

In dieser Dissertation wurde das AVENIO Expanded Kit verwendet. Die Kosten für die Untersuchung sind mit rund 500 € für das Kit und die beteiligten Reagenzien gegeben, Geräte und Arbeit veranschlagen in der AG Ruland Lab im TranslaTUM eine Summe von rund 400 €. Es ergeben sich somit Gesamtkosten von rund 900 € je NGS Untersuchung einer einzigen Blutprobe.

### 3.5 Avenio Kit von Roche

Das „Avenio ctDNA Expanded Kit“ der Firma Roche® (Mannheim, Deutschland) ist ein 192 Kilobasen enthaltendes Panel und untersucht 77 Gene ("Tumor-Profiling in der Krebsdiagnostik," 2017). Die Gene für das Panel sind unter dem Fokus der „National Comprehensive Cancer Network Guidelines“ (NCCN) ausgewählt worden, also Leitlinien von einem Netzwerk aus 28 US-amerikanischen Krebszentren, sowie ergänzt durch den Hersteller mit Mutationen, die in Verbindung mit der Entstehung von Krebserkrankungen gebracht werden ("Tumor-Profiling in der Krebsdiagnostik," 2017). Dieses Kit steht derzeit nur für wissenschaftliche Studien zu Verfügung und ist nicht für die klinische Anwendung einzusetzen. Der Schwerpunkt des „Avenio Expanded Kit“ liegt auf den tumorspezifischen Mutationen für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom und das kolorektale Karzinom. Neben diesem Kit bietet die Firma Roche noch zwei andere Panels an, das Targeted Kit mit 17 Genen und 81kb und das Surveillance Kit mit 197 Genen und 198kb. Laut Hersteller liegt die optimale Einsatzmöglichkeit bei dem Targeted Kit zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bzw. dem Therapiebeginn, bei dem Surveillance Kit im Bereich des Therapieverlaufs, insbesondere bei der Überwachung eines möglichen Ansprechens auf Medikamente. Das verwendete

Expanded Kit ist für die Verwendung bei Tumorprogress bzw. Resistenzbildung vorgesehen. Eine Übersicht der Mutationen, die durch das Expanded Kit erfasst werden können, ist dem Anhang beigelegt.

Alle Kits enthalten die Möglichkeit, Veränderungen der DNA wie Single nucleotide variants (SNV), Insertionen und Deletionen (Indels), copy number variations (CNV) und Fusionsprodukte zu erkennen ("Tumor-Profiling in der Krebsdiagnostik," 2017). Die Probenaufbereitung (Library Prep) für das „Avenio Expanded Kit“ erfolgte im Labor der AG Winter im Institut für Klinische Chemie des Klinikums rechts der Isar und wurde von der Biologisch-technischen Assistentin Ramona Secci durchgeführt. Die Sequenzierung (NGS) wurde im Labor der AG Rad im TranslaTUM durchgeführt.

Die grundsätzlichen Arbeitsschritte bei der Analyse und Testung der Patientenproben mit dem Avenio ctDNA Expanded Kit auf ausgewählte Mutationen sind folgende:

1. Isolation der cfDNA aus dem Patientenplasma
2. Generierung der Sequenzierungsbibliothek (Library Prep)
3. Anreicherung und Hybridisierung von cfDNA und Targetmolekülen
4. Sequenzierungsreaktion
5. Analyse und Einordnung der gewonnenen Daten

Die nachfolgenden Beschreibungen beziehen sich auf das Benutzerhandbuch von Roche für das AVENIO-ctDNA-Analysis-Kit.

### **Isolation der cfDNA**

Die Isolation von cfDNA aus dem Patientenplasma ist der erste Arbeitsschritt. Wie oben erwähnt werden die Blutproben nach Abnahme aufbereitet und für eine weitere Verwendung eingefroren. Für die Isolation der cfDNA wird das „QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Nach Auftauen der Probe, Zentrifugation und Zugabe mehrerer Reagenzien wird das Plasma in ein spezielles Gefäß (50ml Polypropylengefäß mit sog. „High Pure Extender Assembly“ Einheit (Bild siehe Anhang) überführt. Durch Zentrifugation und mittels speziellem, in dem Gefäß enthaltenen Filter

(Silizium Fleece) wird die cfDNA gebunden. Durch mehrere Waschkvorgänge wird die cfDNA aufbereitet und die Qualität durch das Anfertigen einer TapeStation 2200 (Agilent) und Quantifizierung durch ein Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) in mehreren Schritten überprüft. Die TapeStation trägt die Anzahl der gefundenen Fragmente gemäß ihrer Basenpaarlänge auf. Qualitativ hochwertige cfDNA hat laut Benutzerhandbuch frei von hochmolekularer genomischer DNA zu sein, um valide Ergebnisse liefern zu können. Qualitativ nicht hochwertige cfDNA kann zu einer Vergrößerung von Sequenzierungsartefakten führen. Potentielle Ursachen von nicht hochwertiger Proben-cfDNA können eine zu lange Standdauer der Plasmaproben und die hiermit verbundenen DNA-Freisetzung aus Leukozyten oder eine unzureichend saubere, manuelle Plasmaseparierung sein.

### **Sequenzierungsbibliothek (Library Prep)**

Der zweite Arbeitsschritt befasst sich mit der Erstellung der Sequenzierungsbibliothek. Laut Hersteller ist die optimale Inputmenge 50ng cfDNA bei einer Fragmentgröße von rund 200bp für die zu untersuchende DNA. Nach Aufbereitung und Vorbereitung mit speziellen Reagenzien erfolgt die 16 bis 18 Stunden andauernde Ligationsreaktion der Adapter mit der cfDNA.

Am zweiten Tag werden in die Proben magnetische „Clean-up-Beads“ („Aufräumperlen“) gegeben. Mit ihnen und einem magnetischen Gestell werden die Probe in mehreren Waschkvorgängen von Überstand und Verunreinigungen befreit. Am Ende der Reaktionen können die Adapter-ligierten DNA Abschnitte isoliert werden und die Amplifikationsreaktion findet als Bridge-PCR statt. Nach Hinzugabe von Reagenzien und durch weitere Waschkritte werden die Proben nach der Amplifikation aufbereitet. Am Ende des Amplifikationsvorganges sind Proben mit angereicherter Bibliothek hergestellt worden. Die Proben können über Nacht bei -20°C eingefroren und aufbewahrt werden.

### **Anreicherung von Targetmolekülen**

Der dritte Arbeitsschritt ist die Anreicherung und Hybridisierung von DNA und deren Targetmoleküle. Mit dem AVENIO ctDNA Enrichment Kit, dem AVENIO Post-Hybridization-Kit

und dem AVENIO Expanded Panel sollen Zielgene („genes of interest“) isoliert und detektiert werden. Die Proben werden aufgetaut und für die Hybridisierung mit dem Expanded Panel vorbereitet. Die DNA-Fragmente der Zielgene werden mit Biotin versehenen Proben im Thermocycler hybridisiert. Nach erfolgreicher Hybridisierung binden magnetisierbare Streptavidin-beads an die biotynilierten Proben und mit magnetischen Kräften werden damit die Ziel-DNA bzw. DNA mit Mutationen von Interesse von der übrigen cfDNA in mehreren Wasch- und Aufbereitungsschritten separiert. Die cfDNA-Zielsequenzen werden final amplifiziert. Nach einem erneuten Waschvorgang sind die DNA Sequenzen der Zielgene aus dem gesamten Anteil cfDNA isoliert. Die Proben werden bei -20°C aufbewahrt und mehreren Qualitätssicherungsschritten unterzogen.

### **Sequenzierung und Ergebnisse**

Der letzte Arbeitsschritt ist die Sequenzierung der DNA Sequenzen und der bioinformatische Auswertungs- und Analyseprozess. Es wurde ein Sequenziergerät der Marke Illumina NextSeq 500 verwendet. Für den theoretischen Teil wird auf das Kapitel zu NGS verwiesen. Die Sequenzierung erfolgte im Labor der AG Rad im TranslaTUM der TU München und wurde durch Dr. Rupert Öllinger durchgeführt.

Im letzten Arbeitsschritt werden die gewonnenen Daten durch die Analyse Software von Roche aufbereitet und PDF Dokumente bzw. eine Datentabelle im „comma separated values“ (csv) Format erstellt. Diese Tabelle in ein Excel-Format für die manuelle Auswertung und Filterung der Daten überführt.

## **3.6 PCR Methoden**

Unter Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) versteht man die zyklische Vermehrung bzw. Vervielfältigung von DNA mittels DNA-abhängigen DNA Polymerasen (Lorkowski, Landt, & Tiemann, 2015, p. 80). Die serienreife praktische Umsetzung wurde 1986 von Karry B. Mullis auf Grundlage der Arbeiten von Har Gobin Khorana Anfang der 1970er Jahre veröffentlicht (Lorkowski et al., 2015, p. 79). Die folgenden

Hintergrundinformationen um die Thematik PCR wurden aus dem Sammelwerk Molekulare Diagnostik entnommen (Lorkowski et al., 2015, pp. 80-89). Das Verfahren gliedert sich grob in drei Schritte und wird je Anbieter in 20 bis 30 Zyklen wiederholt, um die DNA einfach und millionenfach zu vervielfältigen:

1. Denaturierung der DNA mittels Hitzeeinwirkung
2. Abkühlen und Primerhybridisierung (sog. Primer-Annealing)
3. Elongation der DNA mittels DNA-abhängiger DNA Polymerase

Die DNA liegt normalerweise in Doppelstrangform vor, sodass es für die PCR notwendig ist, diese in Einzelstränge zu überführen. Die Wasserstoffbrückenbindungen der Doppelstrang-DNA werden mittels Temperatureinwirkung (rund 95 Grad Celsius) über einen kurzen Zeitraum denaturiert. Im nächsten Schritt legt sich ein Primer an den jeweiligen Einzelstrang an und dient als Startpunkt für die spätere Polymerasekettenreaktion. Der Vorgang der Primerhybridisierung, also der Anlagerung der Primer an die Einzelstrang DNA, wird als Annealing bezeichnet. Die Temperatur wird soweit gesenkt, dass der Annealing-Vorgang stattfinden kann. Wird die Temperatur zu weit gesenkt, können unerwünschte Nebenprodukte, wie falsche Anlagerung oder unspezifisches Bindeverhalten, auftreten.

Im letzten Schritt synthetisieren temperaturstabile DNA-abhängige Polymerasen mit freien Nukleotiden den neuen DNA Strang, welcher komplementär zum Matrizenstrang ist. Das Synthetisieren des neuen Strangs wird als Elongation bezeichnet und läuft bei Temperaturen zwischen 68 und 72 Grad Celsius ab.

Die Vermehrung ist für die ersten Zyklen exponentiell, da sich anfangs die Menge der DNA pro Zyklus verdoppelt. Im Verlauf jedoch zeigt sich ein lineares Wachstum, bis schließlich die sogenannte Plateauphase erreicht wird. Die Gründe hierfür liegen am Verbrauch der Edukte, sowie die Schädigung und Abnahme der Prozessaktivität der Polymerase durch mehrmaliges Erhitzen. Die PCR wurde seitdem zu diversen Verfahren weiterentwickelt, wobei im Folgenden der Fokus auf die digitale droplet PCR (ddPCR) gelegt wird, da diese in der Promotion verwendet wurde.

## ddPCR

Charakteristisch für die digitale droplet PCR ist die Erstellung von Mikroreaktionsräumen für die PCR mittels Wasser-Öl Emulsion (Lorkowski et al., 2015, pp. 134-135). Durch die Fraktionierung in sogenannte „droplets“ (Tropfen) können bis zu 30 000 Nanotröpfchen entstehen. Jeder Tropfen enthält alle Komponenten für die anschließende PCR wie Pufferlösung, Polymerase und Target DNA. Die ddPCR kombiniert die digitale Auswertung mittels Detektion der Fluoreszenzemissionen der TaqMan Sonden mit der massenhaft parallelen Amplifikation der DNA in den Mikroreaktionsräumen (Lorkowski et al., 2015, pp. 134-135). Für jeden dieser Räume wird die Intensität des Fluoreszenzsignals gemessen. Computergestützt lassen sich aus diesen Daten mit speziellen Algorithmen unter anderem die Ausgangskonzentration in der Gesamtprobe bestimmen (Lorkowski et al., 2015, pp. 134-135).

Die Verfahrensschritte der ddPCR orientieren sich an denen der Standard PCR mit dem Unterschied, dass für die ddPCR zu Beginn droplets generiert werden müssen. Exemplarisch werden die Arbeitsschritte unter Bezug auf die Website (<http://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/droplet-digital-pcr-ddpcr-technology>) der Firma Bio-Rad angegeben:

1. Generierung der Droplets
2. Amplifikation der Droplets durch eine PCR
3. Auslesen der Fluoreszenzreaktion
4. Computergestützte Auswertung der Ergebnisse

Die Generierung der droplets erfolgt in einer speziellen Maschine, dem sogenannten droplet Generator. Mittels Mikrofluidik und den entsprechenden Reagenzien werden annähernd gleich große Tröpfchen erstellt und die so entstandene Lösung wird auf einer 96-Loch Platte verteilt und in einem Thermocycler für den Ablauf der PCR positioniert. Nach Amplifikation der DNA wird die Probe zum Auslesen in einen „droplet reader“ (Auswertemaschine für die droplets) gegeben. Dieser ermittelt die durch Laser emittierten Fluoreszenzsignale der Droplets. Die Maschine unterscheidet nach dem digitalen Prinzip, ob ein Signal detektiert wurde (1) oder



nicht (0). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt durch statistische Algorithmen am Computer (Lorkowski et al., 2015, p. 135).

### **Fluoreszenzsignal**

Das Unterkapitel zu Fluoreszenzsignalen bezieht sich auf das Sammelwerk Molekulare Diagnostik (Lorkowski et al., 2015, pp. 122-123). Die ddPCR nutzt sogenannte TaqMan- oder 5'Nuklease Assays zur Quantifizierung der amplifizierten DNA. Das Prinzip dahinter ist die Detektion von Reporterfluoreszenzmissionen, welche bei Synthese des naszierenden Stranges entstehen. Der Farbstoff ist an ein Oligonukleotid gebunden (sog. TaqMan Probe), welches sich in der Position zwischen den beiden Oligonukleotidprimer befindet. Dieser Farbstoff ist an seinem 5'Ende gebunden und wird durch einen, sich in der Nähe befindenden Quencher („Löschsubstanz“) unterdrückt. Bei Neusynthese spaltet die TaqPolymerase durch ihre 5'- 3' Exonukleaseaktivität die Sonde in kleinere Abschnitte, sodass die Reporterfluoreszenz freigesetzt wird. Da die hemmende Wirkung des Quenchers nach Fragmentierung nicht mehr auf den Farbstoff wirkt, kann die entstehende Emission durch einen Laser nach jedem Zyklus gemessen werden. In diesem Fall wurde 6-Carboxyfluorescein oder Hexachlorofluorescein als Reporterfluoreszenzfarbstoff verwendet. Es werden nur Signale emittiert, wenn die TaqMan-Sonde bei Neusynthese eines komplementären Stranges freigesetzt wurde, sodass dies als positives Signal (1) nach dem digitalen Prinzip gewertet wird. Wird das Signal des Farbstoffes durch den Quencher unterdrückt, wird keine Reporterfluoreszenz detektiert und dies als negatives Signal (0) interpretiert.

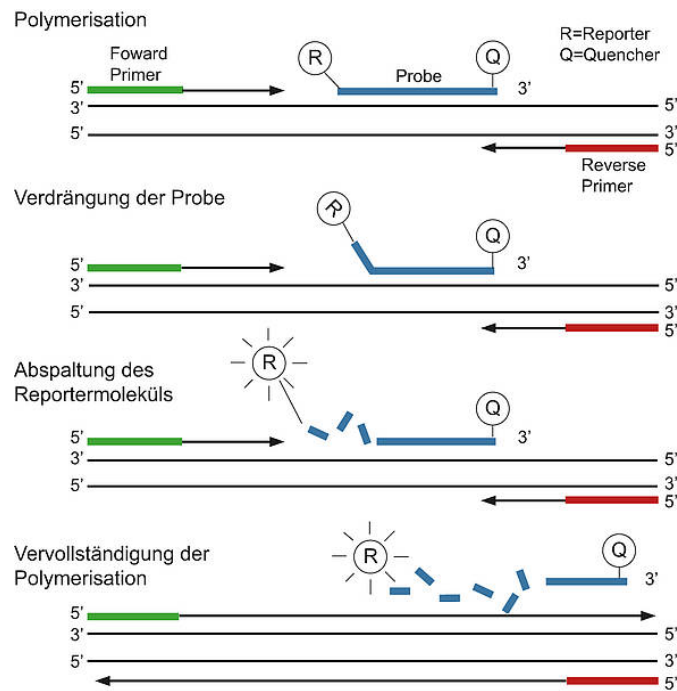


Abbildung 3-2: Prinzip einer Taq-Man Sonde

Die TaqMan Sonde, die an die Zielsequenz zwischen den beiden PCR-Primern hybridisiert, enthält einen Reporter-Farbstoff am 5'-Ende und einen Quencher-Farbstoff am 3'-Ende. Die räumliche Nähe von Reporter und Quencher supprimiert die Fluoreszenz. Während der PCR-Reaktion wird durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase die Sonde vom 5' Ende her von der Zielsequenz verdrängt und der Reporter vom Quencher getrennt. Erst jetzt kann die Fluoreszenz des Reporter-Moleküls detektiert werden. Die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz ist proportional zu der Entstehung von PCR-Produkten.

(Quelle: Abbildung und Beschriftung entnommen aus (Klein & Rost))

### 3.6.1 Primer- und Sondendesign

Das folgende Kapitel behandelt die Arbeitsschritte und Überlegungen hinter dem Design eines patientenindividuellen ddPCR-Assays, falls dieser nicht direkt kommerziell erworben werden kann. Entscheidend für die Konstruktion sind Informationen aus dem NGS der cf- und ctDNA des Patienten und das Wissen über die mutierte Basensequenz der einzelnen Gene. Unter Zuhilfenahme von Computeralgorithmen wird für jeden Gen-Assay ein Primerpaar, sowie je eine Sonde für den Wildtyp und die Mutation designet. Nach eigener Konstruktion der Sonden und Primer werden diese bei der Firma IDT in Auftrag gegeben und hergestellt.

Folgende Übersicht fasst die Arbeitsschritte bei der Erstellung eines ddPCR-Assays zusammen:

1. Zuordnung der Position im Genom für die jeweilige ausgewählte Base (bsp. Punktmutation im *FLT3* Gene an der Stelle: chr13:28018492)
2. Recherche nach der umgebenden Basensequenz der mutierten Base unter Zuhilfenahme des „Genome Browser“
3. Design von Sonden für den Wildtyp und die Mutation
4. Design eines passenden Primerpaares
5. Überprüfung des Gesamtprodukts

### **Auswahl und Zuordnung der Mutationen**

Nach NGS mit Hilfe des Avenio ctDNA Expanded Kit erfolgt eine Fokussierung auf somatische bzw. pathogene Mutationen in den verbleibenden Blutproben durch einen ddPCR-Assay. NGS listet multiple somatische oder keimbahnassoziierte Mutationen in der Proben-DNA auf, wobei für die nachfolgende ddPCR entscheidend ist, die Mutationen zu bestimmen, welche somatischen Ursprungs sind und welche durch Veränderungen in ihrer Basensequenz einen Einfluss auf Eigenschaften wie Pathogenität besitzen können. Alle detektierten Mutationen müssen dementsprechend auf somatischen Ursprung und Pathogenität vorab untersucht werden. Das Wissen um die Genese und die Pathogenität der Mutationen wird mit Hilfe der Datenbanken ClinVar und COSMIC generiert (siehe Kapitel 3.7). Die Mutationen werden nach dem später erwähnten Schema ausgewählt.

Für jeden Assay einer spezifischen Mutation wird ein eigenes Word-Dokument erstellt, welches den Ablauf für das Assay-Design festhält. Nachfolgend wird die Punktmutation im *FLT3* Gen (p.Asp839Gly) als Beispiel für die Konstruktion eines patientenindividuellen ddPCR-Assay verwendet.

Für das mutierte Protein *FLT3* wird neben der veränderten Aminosäuresequenz (p.Asp839Gly) die exakte Position auf dem entsprechenden Chromosom (chr13:28018492) aus der Ergebnistabelle des Avenio Expanded Kits in das Word-Dokument extrahiert.

## Genome Browser

Die Website „UCSC Genome Browser“ (<https://genome.ucsc.edu/index.html>) dient als Werkzeug für das Recherchieren des die Mutation umgebenden DNA-Abschnittes, insbesondere der umgebende Basensequenzabfolge. Der öffentlich zugängliche Genom-Browser erlaubt Suchanfragen über Sequenzierungsdaten, in diesem Fall zum menschlichen Genom. Laut Website ist dieses Genom-Projekt eine Zusammenarbeit der UCSC Genome Bioinformatik Gruppe und dem „International Human Genome Project“. Die Basensequenz jeder entsprechenden Region im menschlichen Genom kann durch den Browser abgerufen werden. Zum Zeitpunkt bei der Erstellung der ddPCR Assays während des Promotionsvorhabens (Stand August 2019) wird als Referenzeinstellung die aktuellste Version des menschlichen Genoms, der „Human Dec.2013 (GRCh38/hg38) Assembly“, verwendet. Nach Eingabe der Position des Genes in das Suchfeld greift die Website auf die entsprechende Datenbank zurück. Die Stelle des Wildtypes im Chromosom (bsp. chr13:28018492) wird als Ausgangspunkt in die entsprechende Suchmatrix eingegeben. Gesucht werden jeweils vor und nach dem Ausgangspunkt die 100 umgebenden Basen, wie in dem Textfeld zur Wildtypsequenz von *FLT3* dargestellt.

```
>chr13:28018392-28018591
AGTGCAGTTGTTTACCATGATAACGACACAACACAAAATAGCCGTATAAAAAATAAGTAGG
AAATAGCAGCCTCACATTGCCCTGACAACATAGTTGGAATCACTCATGATATCTCGAGC
CAATCCAAAGTCACATATCTTCACCACTTTCCCCTGGGTGACAAGCACGTTCTCGCGGC
CAGGTCTCTGTGAACACACT
```

*Abbildung 3-3: Wildtypsequenz FLT3 chr13:28018492*

*Die in roter Farbe und Unterstreichung gekennzeichnete Base ist die Wildtyp Base*

Dieser 201 Nukleotide enthaltende Abschnitt soll die späteren Primer und Sonden enthalten. Die Wildtypsequenz wird kopiert und in das Worddokument für den *FLT3*-Assay eingefügt. Für die Mutation kann die gleiche Sequenz, mit Ausnahme der mutierten Base (C) anstelle der Wildtypbase (T), verwendet werden.

## Sondendesign

Im nächsten Schritt werden je zwei, um die 15 Basenpaare umfassenden Sonden erstellt. Eine Sonde soll spezifisch an die Wildtyp -DNA, die andere an die ctDNA binden. Mittelpunkt der Sonde bildet im Optimalfall die mutierte Base (bei FLT3 die Base C) bzw. das Äquivalent der Wildtyp Sequenz (hier T). Diese Stellen sollen von jeweils 7 Basenpaaren flankiert werden.

Das Entscheidende an diesem Prozess ist, dass die Basen der Sonde nicht alle Desoxyribonukleinsäuren sind, sondern teilweise durch „Locked nucleic acid (LNA)“ ersetzt werden. LNA Basen sind Xenonukleinsäuren und eignen sich gut, um Einzelbasenaustausch fest zu stellen und grundsätzlich soll eine fertige Sonde folgende Merkmale aufweisen (Lorkowski et al., 2015, p. 102):

- Die mutierte Base bzw. die Wildtyp Base soll an eine LNA Base der Sonde binden
- Beginn der ersten Base am 5`Ende der Sonde nicht mit der Base Guanin
- Die Schmelztemperatur der Sonde sollte 2-4°C über der des Primers sein, optimal wären 65°C
- Maximal 6 LNA Basen pro Sonde verwenden
- LNA Basen sind nicht zwischen Palindromen von GC zu verwenden

Das Design einer Sonde wird hier am Beispiel der Wildtypsequenz verdeutlicht. Alle grundsätzlichen Arbeitsschritte für die Mutationssonde verhalten sich analog zu dieser Schilderung, sodass am Ende jeweils eine Sonde für Wildtyp und Mutation konstruiert sind.

Der nächste Schritt ist die Erstellung von Kopien in dem Word-Skript. Für den 15 Basen lange DNA Abschnitt werden 15 Kopien angefertigt. Diese unterscheiden sich nur an der unterschiedlichen Position der LNA-Base. Bei der ersten Kopie ist die LNA Base an Stelle 1, bei dem zweiten Abschnitt an Stelle 2 etc. eingefügt. Für diese 15 Kopien werden mit Hilfe der Website „LNA (TM) Oligo Tm Prediction“ (<https://www.qiagen.com/.../lna-oligo-tm-prediction>) der Firma QUIAGEN die spezifische Schmelztemperatur (Tm in °C) jeder Kopie ermittelt.

Tabelle 3-2: LNA-modifizierte Kopien mit entsprechender Schmelztemperatur Tm in °C

Modifizierte Kopien	Tm	Modifizierte Kopien	Tm	Modifizierte Kopien	Tm
+GTTGGAATCACTCAT	48	GTTGG+AATCACTCAT	52	GTTGGAATCA+CTCAT	52
G+TTGGAATCACTCAT	51	GTTGGA+ATCACTCAT	50	GTTGGAATCAC+TCAT	51
GT+TGGAATCACTCAT	52	GTTGGAA+TCACTCAT	52	GTTGGAATCACT+CAT	53
GTT+GGAATCACTCAT	55	<b>GTTGGAAT+CACTCAT</b>	53	GTTGGAATCACTC+AT	51
GTTG+GAATCACTCAT	53	GTTGGAATC+ACTCAT	51	GTTGGAATCACTCA+T	50

Im Idealfall dient der höchste Wert aus den 15 verschiedenen Temperaturen als Anhaltspunkt. Sollte es mehrere höchste Werte geben, wird der ausgewählt, welcher den geringsten Abstand der LNA Base zum Mittelpunkt der Sonde aufweist. Im vorliegenden Beispiel wurde nicht der Wert mit der höchsten Temperatur ausgewählt, sondern der zweit höchste aufgrund seiner Nähe zum Mittelpunkt der Sonde. Aus Gründen der Übersicht wird ab hier die ausgewählte Sonde als Sonde 1 bezeichnet.

Es wird weiter mit der Website „LNA (TM) Oligo Tm Prediction“ gearbeitet. Durch manuelles Einfügen von mehreren LNA Basen an verschiedene Positionen in Sonde 1 wird die Schmelztemperatur soweit erhöht, dass sie im Optimalfall Tm = 65°C erfüllt. Das entstandene Produkt (P1) aus Sonde 1 und den eingefügten LNA Basen wird in das Worddokument eingefügt. Es wird versucht, mehrere Produkte (P2, P3, P4) zu designen. Grundlage dieser Produkte ist S1, aber untereinander unterscheiden sich P1, P2 etc. durch andere Positionierung der eingefügten LNA Basen bzw. deren Anzahl. Das Design von jeweils mehreren Produkten ist erforderlich, da es in späteren Schritten möglich sein kann, dass P1 beispielsweise wegen mangelnder Eignung verworfen und anstelle P2 oder P3 verwendet werden müssen.

### Testung auf Homodimereigenschaften

Nächster Schritt ist die Testung der generierten Produkte (P1, P2 etc.) auf Homodimere. Es wird mit Hilfe eines Computeralgorithmus getestet, inwiefern die Sonde mit sich selbst interagiert und Sekundärstrukturen ausbilden kann. Die Website „LNA™ Oligo Optimizer“ der Firma QUIAGEN dient hier als Recherchewerkzeug (<https://www.qiagen.com/.../lna-oligo-optimizer/>). In das Eingabefeld wird zuerst P1, dann P2 usw. eingefügt. Für jedes Produkt wird

ein spezifischer Score errechnet, der eine Aussage über das Ausbilden einer Sekundärstruktur in Abhängigkeit der Umgebungstemperatur angibt. Für jedes Produkt wird ein entsprechender Score angezeigt. Die abgebildete Tabelle verdeutlicht durch Punkte und Striche zwischen Basen die Interaktion der Sonde mit sich selbst, wobei die Striche für eine besonders starke Interaktion zwischen den einzelnen Basen stehen.

*Tabelle 3-3: Beispiel von zwei Produkten mit Schmelztemperatur und Homodimereigenschaften*

Produkt 1 Wildtyp	Tm	Score	Interaktion	Produkt 2 Wildtyp	Tm	Score	Interaktion
TTGGAA+T+CA+ CT+CA+TG	65	28	+C A+T G   : :   G+T A+C	T+TGGAA+T+CA CT+CA+TG	65	28	+C A+T G   : :   G+T A+C

Ein Score von  $\leq 30$  wird angestrebt. Wenn also ein Produkt P einen Wert  $> 30$  aufweist, fällt es aus dem weiteren Auswahlprozedere heraus. Die Graphik zeigt die Bereiche der DNA, die für den errechneten Score durch eine starke Interaktion untereinander entscheidend sind. So ist es möglich, stark interagierende Bereiche zu erkennen und die LNA Basen Positionierung, unter Berücksichtigung eines optimalen Scores von  $< 30$ , dementsprechend zu gestalten. Sollte dies aufgrund zu starker Ausbildung von Sekundärstrukturen nicht gelingen, muss zum Ausgangspunkt des Sondendesigns zurückgegangen werden.

Der entsprechende DNA Abschnitt würde nun verschoben werden, sodass die mutierte Base bzw. das Korrelat des Wildtyps nicht mehr in der Mitte der Sequenz (Position 7) zu finden ist, sondern an den jeweiligen Randbereichen (bsp. Position 2-4 bzw. 11-13). Entsprechend würde die DNA Sequenz ergänzt werden, sodass die neuen Sonden (S1neu, S2neu etc.) wieder eine Länge von ca. 15 Basen aufweisen.

### Primerdesign

Für eine ddPCR sind „forward“ und „reverse“ Primer nötig. Dieses Primerpaar flankiert die Sonde und dient als Anlagerungspunkt bzw. Startpunkt für die DNA Polymerase. Die Website „Primer3Plus“ (<https://www.gear-genomics.com/primer3plus/>) des „European Molecular Biology Laboratory“ konstruiert mit Hilfe von Computeralgorithmen verschiedene Primerpaare. Der oben genannte, 201bp lange DNA Abschnitt wird in das Eingabefeld der Website hineinkopiert. Bei diesem Schritt kommt es nicht auf die Unterscheidung zwischen Wildtyp und

Mutation an, die Erstellung der Primer ist hiervon unabhängig. Das Programm schlägt nun verschiedene Positionen für die Primer im eingegebenen DNA Abschnitt vor. Diese unterscheiden sich beispielsweise Länge, Startposition sowie ihrem GC-Gehalt. Bei der Auswahl des Primerpaares (Pp) werden folgende Bedingungen berücksichtigt und das optimale Primerpaar (Pp1) ausgewählt (Lorkowski et al., 2015, pp. 88-89):

- Die Schmelztemperatur sollte für beide Primer bei 60°C liegen
- Der GC Gehalt der Oligonukleotide sollte ausgeglichen zum AT Gehalt sein
- Die optimale Länge des Amplikons sollte zwischen 60 und 100 bp liegen und die maximale Größe von 250bp nicht überschreiten
- Das Primerpaar darf nicht an den rund 15 bp langen Abschnitt der Sonde binden

Finaler Punkt des Arbeitsprozesses ist die Testung des Gesamtprodukts aus Wildtyp-, Mutationssonde und dem Primerpaar auf Heterodimereigenschaften. Die bereits bei der Testung auf Homodimereigenschaften erwähnte Website „LNA Oligo Optimizer“ wird analog zur Testung auf Heterodimereigenschaften verwendet. Die Sonden für die Mutation und den Wildtyp sowie das Primerpaar, bestehend aus „forward“ und „reverse“ Primer, werden in das Eingabefeld eingegeben.

Ein Computeralgorithmus errechnet wiederum einen Score für jede möglichen Interaktion. Neben der Interaktion mit sich selbst wird auch ein mögliches Agieren zwischen den verschiedenen Komponenten berechnet. Es gilt wiederum der Richtwert eines optimalen Scores  $\leq 30$ . Wird dieser Wert bei allen Möglichkeiten angegeben, ist die Erstellung beendet und die entsprechenden Sonden und das Primerpaar für die ddPCR gefunden. Sind jedoch mehrere Werte deutlich (Score  $>35$ ) erhöht und ist die mutmaßliche Ursache das Primerpaar, wird ein anderes vorgeschlagenes Primerpaar (Pp2, Pp3 etc.) des Programmes „Primer3Plus“ ausgewählt.



Tabelle 3-4: Mögliche Interaktionen der Sonden und Primer untereinander bei der Testung auf Heterodimereigenschaften

Interaktionspartner	Score	Interaktionen auf Basenebene
Fwd - Rev	31	C G A C A C A A C A C A A A A T A G C : : : : : : : : : : : : : : : : : : : G C T C G G T T A G G T T T C A G T G
Rev - ProbMTT	31	G A T T G G C T C   : : :   : : +C T C A C+C+A+A G
Rev - ProbWT	30	G A T T G G C T C G A   : :   . : : : +C T C A+C+T A A G G+T
ProbWT - ProbWT	28	+C A+T G   : :   G+T A+C
ProbWT - ProbMTT	28	+C A+T G   : :   G+T A+C
ProbMTT – ProbMTT	28	+C A+T G   : :   G+T A+C
Rev – Rev	18	T T G G A T T G G C T C G A : . : . . . . : : : : A G C T C G G T T A G G T T
Fwd – ProbMTT	17	A G C C G T : : :   : T C A C+C+A
Fwd - ProbWT	16	G A C A C A A   : : : : +C+T A A G G+T
Fwd - Fwd	12	C G A C : : : G C C G

In der Abbildung 3.4. ist das abschließende Manuskript für das Design eines patientenindividuellen ddPCR-Assays angeführt. Es zeigt die endgültigen forward und reverse Primer, sowie die Sonde für den Wildtyp und die Mutation *FLT3* (p.Asp839Gly).

<p>&gt;Fwd CGACACAACACAAAATAGCCGT</p> <p>&gt;Rev TGTGACTTTGGATTGGCTCGA</p> <p>&gt;ProbWT T+TGGAA+T+CACT+CA+TG</p> <p>&gt;ProbMUT +TTGG+A+A+CCACT+CA+TG</p>
--

Abbildung 3-4: Endgültiges Primerpaar, sowie der Wildtyp und die Mutationssonde des Gens *FLT3* p. Asp839Gly, blau ist WT-Base, rot mutierte Base

### 3.6.2 Ablauf ddPCR

Die ddPCR zur Quantifizierung der Mutationslast aus Patientenplasma fand im Labor der AG Winter am Klinikum rechts der Isar statt. Für die ddPCR wurde ein QX200 ddPCR System (Bio-Rad Laboratories) verwendet und die mutationsspezifischen Assays wurden von Ramona Secci, biologisch-technischen Assistentin in der AG Winter, durchgeführt. Die Auflistung über den Ablauf der ddPCR sind den SOP der AG Winter entnommen.

Folgende Arbeitsschritte sind hierzu durchzuführen:

1. Isolation der DNA aus dem Plasma der Patienten
2. Quantifizierung der DNA im Qubit 2.0. Fluorimeter
3. Vorbereitung der ddPCR96-well-Platten mit Proben und positiv/negativ Kontrollen
4. Droplet-Herstellung
5. Durchführen der ddPCR im Thermocycler
6. Auslesen der Daten mit Hilfe von Computeralgorithmen und -programmen

Im ersten Schritt wird nach Auftauen aus den Blutproben die DNA extrahiert. Dazu wird das „QIamp circulating Nucleic Acid Kit“ (Firma Quiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Es folgt die Quantifizierung der gewonnen DNA durch das „Qubit 2.0 Fluorimeter“ (Thermo Fisher Scientific, California, USA). Für die ddPCR werden 96-Loch Mikrotiterplatten (#12001925, Bio Rad) verwendet. Jede Platte enthält neben der Proben-DNA und den mutationsspezifischen Primer und Sonden, weitere Reagenzien wie Restriktionsenzyme und Puffer. Jede Platte enthält insgesamt 21µl Probenvolumen und setzt sich zusammen aus 10,5µl ddPCR supermix (no dUTP, Bio-Rad), 1,05µl mutationsspezifische Primer (900nmol/l), 1,05µl mutationsspezifische Sonden (250nmol/l), 1,05µl MseI Restriktionsenzym (New England Biolabs), 1,05µl DNA-freies Wasser und 6,3µl Proben-DNA. Für jede Platte werden positiv- und negativ-Kontrollen angelegt. Die positiv-Kontrolle ist der sogenannte „g-Block“ der Firma IDT. Darunter versteht man einen sequenzspezifisch-bindenden Doppelstrang-DNA Abschnitt von der ungefähren Länge eines Amplikons (125 bis rund 3000bp). Dieser soll nur die mutierte Sonde binden, sodass damit spezifisches Bindungsverhalten untersucht wird. Als negativ-Kontrolle wird 10ng genomischer DNA (gDNA) von peripheren Leukozyten gesunder

Probanden und die komplementäre (engl.complementary) DNA (cDNA), also durch eine Reverse Transkriptase aus RNA hergestellte DNA, von gesunden Probanden als negativ-Kontrolle verwendet. Damit wurde getestet, ob nur die WT Sonde an die gDNA und cDNA spezifisch bindet. Ebenso wurden die Proben mit DNA-freiem Wasser getestet, ob beispielsweise die Primerpaare und die beiden Sonden mit sich selbst interagieren und so ein falsch positives Signal bei der Auswertung erzeugen würden.

Im nächsten Schritt werden droplets in der 96-Loch Platte mit Hilfe eines droplet-Generator erzeugt. In einem Thermocycler der Marke C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) mit definiertem Temperaturprotokoll findet die Polymerasekettenreaktion statt. Das Protokoll sieht zu Beginn eine Enzymaktivierung bei 95°C für 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden und Anneiling bzw. Elongation bei 55°C für 60 Sekunden vor. Abschließend folgt die finale Inkubation bei 98°C für die Enzymdeaktivierung mit einer Temperatursteigerung von 2°C pro Sekunde. Die Proben werden nach der PCR bei 4°C gelagert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt durch den „!QX200 droplet reader“ (Firma Bio Rad). Die firmeneigene Software „QuantaSoft droplet reader“ (v1.7.4) exportiert die Ergebnisse. Diese werden in das Computerprogramm „R Studio“ importiert. Ein spezielles Skript für das Programm „R“ (Version 3.4.4; <http://www.r-project.org>) der AG Winter wertet die Daten aus und errechnet die Konzentration von Mutations- und Wildtyp-DNA pro ddPCR Well. Für jede DNA wird die Konzentration  $c$  pro Well aus der Anzahl positiver droplets  $N_p$  und negativer droplets  $N_n$ , dem durchschnittlichen Volumen  $V = 0,85 \times 10^{-9}$  Liter und dem Logarithmus naturale durch folgende Formel berechnet:

*Formel 3-1*

$$c = \frac{\ln(N_p + N_n) - \ln(N_n)}{V}$$

Die Auswertung der Daten erfolgt durch ein eigens erstelltes Excelskript. Es wird nach der Allelfrequenz, sowie der Anzahl an Kopien pro Milliliter Plasma (Anzahl Kopien/ml) ausgewertet. Die Allelfrequenz berechnet sich aus den Wildtyp- und Mutationskonzentrationen. und die Konzentration bzw. die Anzahl gefundener Mutationen pro Milliliter nach der nachfolgenden Rechenweg aus Kapitel 3.8.

### 3.7 Datenbanken

Die folgenden Datenbanken unterstützten die Auswertung und dienen als Referenz bezüglich einer Beurteilung der Pathogenität von Mutationen. Die ExAC Datenbank kam bei der NGS Datenfilterung zum Einsatz. Die ClinVar und COSMIC Website, sowie der FATHMM-Score sind bei der Auswertung und Beurteilung der NGS Ergebnisse angewendet worden.

#### **ExAC-Browser**

Im „Exome Aggregation Consortium“ (ExAC)-Browser (<http://exac.broadinstitute.org/>) ist das Genom von rund 60.000 Menschen nach Sequenzierung durch NGS gespeichert (Lek et al., 2016). Rund 91.000 Exome wurden untersucht und 10.195.872 Kandidaten-Gene, also Gene mit einer möglichen Assoziation für genetisch bedingte Erkrankungen, gefunden (Lek et al., 2016). Die Datenbank unterstützt die Analyse und Interpretation von seltenen genetischen Varianten (Lek et al., 2016). Die Häufigkeit von bekannten Mutationen in dieser Referenzgruppe, der sogenannte „ExAC highest polupation frequency“ Wert (ExAC-Wert), ist auf dieser Website zu finden und dient als Referenz bei der Filterung der NGS Daten. Die im NGS gefundenen Mutationen können auf ihre Häufigkeit in der Bevölkerung hin untersucht werden. Durch diese Information können Rückschlüsse auf somatische Ursprung der Mutation zugelassen werden, falls eine Mutation mit einer sehr kleinen Häufigkeit unter einen großen Referenzgruppe bzw. gar nicht zu finden ist.

Eine Unterteilung in häufige Varianten und seltene Varianten wird in der Literatur vorgeschlagen (Tarailo-Graovac, Zhu, Matthews, van Karnebeek, & Wasserman, 2017). In der Gruppe der häufigeren Varianten sind vor allem nicht tumoröse, durch autosomal dominante oder rezessive Vererbung gekennzeichnete Erkrankungen, wie beispielsweise Xeroderma pigmentosum oder Zystischer Fibrose zu finden (Tarailo-Graovac et al., 2017). Zur Gruppierung von selteneren Varianten wird ein ExAC-Wert von  $< 1\%$  für rezessive und ein Wert  $< 0,1\%$  für dominante Erkrankungen vorgeschlagen.

## COSMIC

COSMIC ist die Abkürzung für "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (<http://cancer.sanger.ac.uk>). Es handelt sich um einen Katalog, der somatische Mutationen im Genom des Menschen speichert und laufend alle drei Monate von Experten nach Literaturrecherche hinsichtlich neusten Informationen aktualisiert wird (Tate et al., 2019). Hauptziele von COSMIC sind die Sammlung von tumorspezifischen Mutationen und die Zugänglichkeit der Wissenschaft zu diesen Informationen (Forbes et al., 2015). Die Datenbank enthält Informationen über fast 6 Millionen Gene aus rund 26.000 Studien und zählt mit Informationen über somatische Mutationen, Fusionen, nicht-codierende Bereiche, sowie Resistenzmechanismen gegenüber Medikamenten zu einer der ersten Quellen bei wissenschaftlicher Recherche hinsichtlich Mutationen (Sondka et al., 2018; Tate et al., 2019). Die Datenbank listet über 700 Gene auf, die in Bezug zu Krebs oder dessen Entstehung stehen, wobei in zwei Gruppen unterschieden wird (Sondka et al., 2018). Zu einer Gruppe zählen Gene, die in direkter Verbindung mit dem Krankheitsgeschehen stehen, etwa durch Transformation hin zu einem Onkogen. Zur anderen Gruppe werden Gene gerechnet, die mit dem Tumor assoziiert sind, aber nicht zwingend in einen Signalweg bzw. in funktioneller Weise in die Zelle eingreifen (Sondka et al., 2018). Die seit 2004 existierende Datenbank verzeichnet einen stetigen Zuwachs an Informationen, so verdreifachten sich die Einträge von zwei auf rund sechs Millionen Gene in der Zeit von 2014 bis 2018 (Forbes et al., 2015; Tate et al., 2019). (Forbes, 2014, Tate, 2018) Seit 2016 listet COSMIC auch Gene, die Resistenzmechanismen gegen Medikamente aufweisen und derzeit sind rund 360 resistenzvermittelnde Allele bekannt (Tate et al., 2019). Die Pathogenität einer Mutation wird mit dem FATHMM-MKL Algorithmus angegeben, welcher für codierende und nicht-codierende Varianten angewendet werden kann (Shihab et al., 2015). Es wird ein Score zwischen 0 und 1 im Sinne eines p-Wertes für jede entsprechende Mutation angegeben und gibt Aussagen zu Konsequenzen hinsichtlich funktionalem und molekularem Phänotyp von Proteinvarianten, basierend auf dem verborgenen Markowmodell (Hashem A Shihab et al., 2013). FATHMM-Werte von  $\geq 0,7$  werden als pathogen und Werte  $\leq 0,5$  als neutral bewertet. (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/analyses>)

## **ClinVar**

Die Website ClinVar ist die Datenbank des US-amerikanischen „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) und listet zu genetischen Varianten und Mutationen klinische Informationen und Interpretationen (Landrum et al., 2016). Durch Verbesserungen der NGS-Technologien entstehen große Mengen an biomedizinischen Informationen und ClinVar verfolgt den Ansatz einer kostenlosen Datenbank durch Archivierung und Sammlung für wissenschaftliche Recherchezwecke (Landrum et al., 2016). Neben NCBI pflegen die US-amerikanische „National Library of Medicine“ und die „National Institutes of Health“ die ClinVar-Datenbank und Einträge können von klinischen Laboren, Forschungslaboren oder Expertengremien erstellt werden (Landrum et al., 2018). Mehr als eine halbe Million Einträge sind derzeit verzeichnet und über 330.000 Mutationsvarianten mit rund 3.000 somatischen Mutationen sind gelistet (Landrum et al., 2018). Die Größe der Mutationen umfasst die Spanne vom Austausch einzelner Basen bis hin zu Veränderungen auf chromosomaler Ebene. Der Fokus der Datenbank liegt nicht auf einer einfachen Auflistung, sondern auf der klinischen Interpretation der gelisteten Mutationen (Landrum et al., 2016).

## **cBioPortal**

Laut eigener Angabe vom Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSK) ins Leben gerufen, hat diese offene und frei verfügbare Web-Datenbank zum Ziel, Hilfestellung für die Interpretation von Mutationen bzw. Forschungsergebnissen zu geben (Gao et al., 2013). Durch Visualisierung von Signalwegen oder Überlebenskurven beispielsweise sollen die Hürden zwischen komplexen multidimensionalen, genomischen Daten aus Krebsstudien, wie dem „Cancer Genome Atlas“ und deren klinische Interpretation und Einordnung gesenkt werden (Gao et al., 2013). Für die Analyse in dieser Arbeit wurden als Recherchewerkzeug alle Studien mit Fokus auf Lymphome, hämatologischen Erkrankungen und der „Cancer Genome Atlas“ verwendet.

## **FATHMM-Score**

Der Functional Analysis Through Hidden Markov Models (FATHMM)-Score ist eine speziesunabhängige Methode mit optionaler, speziesspezifischer Gewichtung zur Vorhersage

der funktionellen Auswirkungen von Protein-Fehlvarianten (H. A. Shihab et al., 2013). Es beruht auf dem Hidden Markov Modell, welches die Ausrichtung homologer Sequenzen und konservierter Proteindomänen darstellt, mit „Pathogenitätsgewichten“ kombiniert und so die Gesamt toleranz des Proteins/der Domäne gegenüber Mutationen darstellt, wodurch Wahrscheinlichkeitsaussagen getroffen werden können, inwiefern eine spezifische Stelle in einer Proteindomäne anfällig bzw. intolerant für Punktmutationen ist (H. A. Shihab et al., 2013). Diesen Wahrscheinlichkeiten werden spezifische Scores zugeschrieben, sodass ein Wert von ungefähr gleich Null mit keiner signifikanten Änderung der Proteinstruktur einhergeht, wohingegen Werte größer Null Hinweis auf eine günstige Substitution geben und infolge dessen das Auftreten einer entsprechenden Mutation an der Proteindomäne wahrscheinlicher ist als das Vorkommen des Wildtyps der entsprechenden Stelle (H. A. Shihab et al., 2013).

### 3.8 Auswertung der NGS Ergebnisse

#### **Filterung der NGS Daten**

Die Filterung der NGS Daten ist der erste Schritt bei der Auswertung. Aus den gesamten Daten sollen die Mutationen, welche mit somatischem Ursprung oder Pathogenität assoziiert sind, herausgefiltert werden. Das Avenio Expanded ctDNA Panel von Roche untersucht rund 70 Mutationen, die häufig bei tumorösen Erkrankungen entartet sind. Um aus der Anzahl der Daten die Übersicht zu gewinnen, ist eine Filterung der Daten unerlässlich. Es gilt zu unterscheiden, ob die Mutationen keimbahn-assoziiert oder somatischen Ursprungs sind. Zur Sortierung der Daten dienen die Allelfrequenzen im Blut, sowie die ExAC-Fraktion der einzelnen Mutationen.

Die von uns festgelegte Filterauswahl grenzt alle Werte mit einer Allelfrequenz  $\geq 95\%$  aus. Die Überlegung dahinter ist, dass ctDNA nur einen Bruchteil an cfDNA im Blut darstellt und die Wildtyp Form nicht gänzlich aus dem Blut von dem mutierten Allel verdrängt wird. Für eine hypothetische Allelfrequenz einer Mutation von nahezu 100% müsste jede Tumorzelle in seinem diploiden Chromosomensatz Mutationen ausweisen und nicht mutierte Zellen dürfen keine cfDNA an das Blut abgeben.

### **Filterung durch die ExAC Frequenz**

Es wird davon ausgegangen, dass tumorassoziierte bzw. Lymphom-assoziierte Mutationen sehr selten in einer großen Referenzgruppe zu detektieren sind. Als Referenzgruppe werden die Genomdaten von rund 60.000 Patient\*innen des ExAC Browser verwendet. Um Mutationen aus den Ergebnissen auszuschließen, die nicht selten in der Bevölkerung vorkommen und somit höchstwahrscheinlich Keimbahnassoziiert sind, wurde ein Filter in der NGS-Datentabelle erstellt. Dieser Filter bezieht sich auf die ExAC-Fraktion und schließt alle detektierten Mutationen mit einer bekannten ExAC-Fraktion von  $> 0,1\%$  aus. Somit wurden nur Mutationen mit einer ExAC Fraktion  $\leq 0,1\%$  sowie der Angabe N/A (engl. Not available) bei unbekanntem ExAC-Werten in die weitere Auswahl übernommen.

### **Beurteilung der Pathogenität der verbleibenden Mutationen**

Eine Literaturrecherche der jeweiligen verbleibenden Mutationen wurde durchgeführt. Als Datenbanken dienten die COSMIC sowie die ClinVar Website. Entscheidendes Suchkriterium ist zum einen die COSMIC-ID, welche bereits zu einigen Mutationen (bsp. für *TP53* -> COSM10779) mit angegeben wurde. Zum anderen wurden die veränderten Basenpaarsequenz der DNA (bsp. c.818G>T, chr17:7673802) bzw. deren Auswirkung auf die Aminosäuresequenz (bsp. p.Arg262Leu) als Suchkriterium herangezogen. Bei der Recherche in den Genomdatenbanken steht die Frage im Vordergrund, ob die detektierten Mutationen bereits von anderen Quellen bzw. Studien aufgelistet und beschrieben wurden. Die Recherche hinsichtlich Pathogenität bzw. somatischer Genese der im NGS festgestellten Mutationen dient dazu, den Fokus auf spezifische Mutationen für die nachfolgenden ddPCR Untersuchungen zu legen.

### **Umrechnung der Ergebnisse zwischen NGS und ddPCR**

NGS und ddPCR geben als Ergebnis die Anzahl Kopien mutierter und Wildtyp-DNA pro Volumeneinheit an, in dem Fall sollen beide die Anzahl an Kopien von WT oder Mutation pro Milliliter angeben.

Formel 3-2

$$\text{Konzentration} = \frac{\text{Anzahl Kopien}}{\text{Volumen}}$$



Die Konzentration wird direkt beim NGS aus den Messungen durch eine firmeneigene Software in der Einheit Anzahl pro Milliliter bestimmt. Bei der ddPCR wird die Konzentration aus den Ergebnissen durch folgende Überlegung errechnet. Die in einer ddPCR Probe gemessene Konzentration bezieht sich auf das in einem Well, einer 96 Loch Platte, verdünnte Volumen. Aus dem ursprünglich gewonnenen Blutplasma je individueller Probe ( $V_{\text{Plasma}}$ ) wird die cfDNA isoliert und in einem Volumen ( $V_{\text{cfDNA}}$ ) zu 100 $\mu\text{l}$  eluiert. Aus diesem Volumen der isolierten cfDNA werden 6,3 $\mu\text{l}$  als Probe ( $V_{\text{Probe}}$ ) und mit den 14,7 $\mu\text{l}$  des ddPCR Mastermix zum Volumen von 21 $\mu\text{l}$  der ddPCR ( $V_{\text{ddPCR}}$ ) vermischt. Die Stoffmengenkonzentration gilt als Grundannahme bei der Berechnung. Es wird die Konzentration  $c_{\text{Plasma}}$  gesucht.

Formel 3-3 
$$c_{\text{Plasma}} = \frac{n_{\text{Plasma}}}{V_{\text{Plasma}}}$$

$V_{\text{Plasma}}$  ist gegeben bzw. wird routinemäßig im Labor bestimmt.  $n_{\text{Plasma}}$  setzt sich aus dem Verhältnis des Stoffmengenkonzentration der cfDNA in der eingesetzten ddPCR zur ursprünglich isolierten Menge cfDNA zusammen. Es gilt für die Konzentration der ddPCR Probe

Formel 3-4 
$$c_{\text{cfDNASample}} = \frac{21 \mu\text{l}}{6,3 \mu\text{l}} * c_{\text{Well}}$$

, wobei die Konzentration pro Well  $c_{\text{Well}}$  als Ergebnis durch den „droplet reader“ gemessen wird und in der Einheit Kopien pro Mikroliter [Anzahl/ $\mu\text{l}$ ] angegeben wird. Wird nach der Anzahl  $n_{\text{cfDNASample}}$  umgestellt, ergibt sich folgende Formel:

Formel 3-5 
$$n_{\text{cfDNASample}} = c_{\text{cfDNASample}} * V_{\text{ddPCR}}$$

Für die Durchführung einer ddPCR werden von der eluierte cfDNA  $V_{\text{cfDNA}}$  (100 $\mu\text{l}$ ) nur eine Teilmenge  $V_{\text{Probe}}$  (6,3 $\mu\text{l}$ ) benötigt. Das bedeutet, dass in der Rechnung die Volumina im Kehrbuch multipliziert werden müssen, um auf das ursprüngliche Verhältnis rückschließen zu können.

Formel 3-6

$$n_{cfDNASample} = c_{cfDNASample} * V_{ddPCR} * \frac{V_{cfDNA}}{V_{Probe}}$$

Beruhend auf der Annahme, dass die Anzahl des Wildtyps bzw. der Mutation vor und nach Verdünnung gleich ist, während sie in unterschiedlich großen Volumina gelöst sind, wird für die Anzahl der Kopien im Plasma ( $n_{Plasma}$ ) die Anzahl der Kopien der Probe ( $n_{cfDNASample}$ ) eingesetzt. Somit gilt für die Konzentration des Wildtyps bzw. der Mutation im Plasma:

Formel 3-7

$$c_{Plasma} \left[ \frac{1}{\mu l} \right] = \frac{n_{Plasma}}{V_{Plasma}} = \frac{c_{cfDNASample} * V_{ddPCR} * \left( \frac{V_{cfDNA}}{V_{Probe}} \right)}{V_{Plasma}}$$

Um das Ergebnis der Konzentration  $c_{Plasma}$  in Anzahl Kopien pro Milliliter darstellen zu können, muss mit dem Faktor 1000 multipliziert werden, sodass die endgültige Formel zur Umrechnung der ddPCR Ergebnisse folgendermaßen lautet:

Formel 3-8

$$c_{Plasma} \left[ \frac{1}{ml} \right] = \frac{n_{Plasma}}{V_{Plasma}} = \frac{c_{cfDNASample} * V_{ddPCR} * \left( \frac{V_{cfDNA}}{V_{Probe}} \right)}{V_{Plasma}} * 1000$$

Für Wildtyp und Mutation wurden jeweils zwei Konzentrationen  $c_{Well}$  pro Datum gemessen. Für beide Werte wurde die Plasmakonzentration ( $c_{Plasma}$ ) bestimmt und aus beiden Konzentrationen der Mittelwert gebildet.

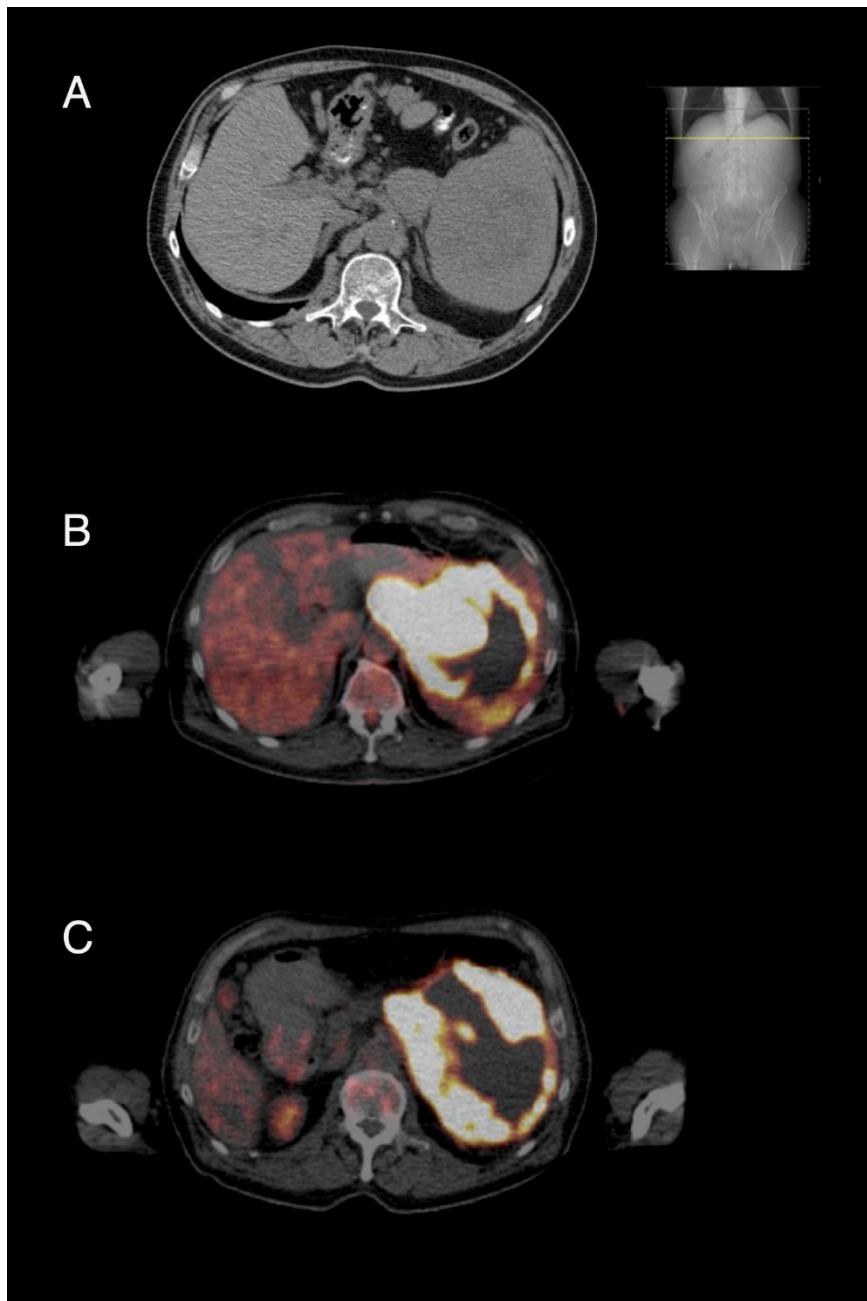
## 4 Ergebnisse

### 4.1 LYM01

#### 4.1.1 Patientenhistorie

LYM01 ist ein 71 Jahre alter Mann zum Zeitpunkt der erstmaligen Vorstellung in der Ambulanz des Klinikums rechts der Isar im November 2016. Vom Patienten wurden seit Mai 2016 bestehende, linksseitige Flankenschmerzen und B-Symptomatik wie 7kg Gewichtsverlust, vermehrte Müdigkeit und Nachtschweiß geschildert. In der Bildgebung mittels CT zeigt sich eine tumoröse Raumforderung um den Pankreaskopf mit Ausdehnung bis in den Truncus coeliacus, sowie eine regionale Ausbreitung vergrößerter LK bis zur Bifurkation der Aorta. In der Bildgebung waren keine Lungen und Knochenmetastasen bei Diagnosestellung zu erkennen. In der Feinnadelpunktion wurde histologisch ein aggressives NHL der B-Zellreihe gesichert, im Speziellen vom Subtyp eines DLBCL, non GC-Typ nach Hans, mit CD-20 positiver und nukleärer Co-Expression von PAX 5, sowie einem Proliferationsindex von 80% MIB-1 festgestellt. Die Punktion des Knochenmarks ergab keinen Anhalt auf eine Infiltration durch das Lymphom.

In der III. Medizinischen Klinik wurde in Zusammenschau der Befunde die Diagnose eines DLBCL Stadium IVB Ann-Arbor mit abdominellem Befall der Milz, des Pankreaskopfes und paraaortale LK- Vergrößerung gestellt. Im Tumorboard wurde ein sechsmaliger Zyklus R-CHOP 14 mit 2-maliger Gabe von Rituximab und einmalig Lonquex 6mg subkutan als medikamentöse Therapie vorgeschlagen. Zu Beginn der Therapie war der „Eastern Cooperative Oncology Group“ (ECOG) Status des Patienten bei 1-2, welcher mit Einschränkungen bei körperlicher Anstrengung einhergeht. Die Chemotherapie verlief bis auf eine Neutropenie mit klinischem Bild eines Nitrit-positiven Harnwegsinfektes während des 3.Zyklus wie geplant ab. Bei Abschluss der Chemotherapie im März 2017 wurde im PET-CT eine „Complete Remission“ festgestellt.



*Abbildung 4-1: PET-CT abdomineller Transversalschnitt LYM01*

*A: Kontrastmittelgestützte CT Untersuchung des Abdomens vom September 2017*

*B: PET-CT Abdomen mit Fokus Milzhilus vom Oktober 2017*

*C: PET-CT Abdomen mit Fokus Milzhilus vom Januar 2018*

In der Verlaufs-CT-Untersuchung wurde im September 2017 eine Größenzunahme der Milz festgestellt, welche laut radiologischem Befund am ehesten mit einem Frührezidiv des DLBCLs zu vereinbaren war. Im Oktober 2017 erfolgte der Einschluss in die LYMPHCIN-

Studie bei einem IPI von 3. Der Patient wurde beim vorliegenden Fall eines Rezidivs mit Immunochemotherapie behandelt. Ein Zyklus beinhaltet die zweimalige Gabe von Rituximab  $375\text{mg}/\text{m}^2$ , die 21-tägige Gabe von Lenalidomid ( $20\text{mg p.o.}$ ) und die tägliche Gabe von Ibrutinib ( $560\text{mg p.o.}$ ). In der PET-CT am 18.10.2017 wurde ein vermehrter Glukosemetabolismus im Bereich der früheren Lymphommanifestation um den Milzhilus herum festgestellt. In der CT vom 14.11.2017 zeigt sich ein stabiler Zustand ohne Größenprogress oder -regress. Am 19.12.2017 wurde bei Neutropenie der Beginn des dritten Zyklus um 7 Tage auf den 27.12.2017 verschoben.

Eine am 16.1.2018 durchgeführte PET-CT zeigte eine verstärkte zentrale Nekrose im abdominellen Bulk, sowie eine verminderte Glucoseaufnahme in den Lymphknoten, welche von radiologischer Seite als eine Verbesserung gewertet wurde. Eine Progredienz der Ausdehnung des Lymphoms ( $8,5 \times 9,9\text{ cm}$  auf  $11 \times 14\text{ cm}$ ) wurde im Bereich des Milzhilus beobachtet, wohingegen die Ausmaße der paraaortalen LK ( $11$  auf  $4\text{ mm}$ ) abnahmen. Am 25. Januar 2018 trat eine Neutropenie Grad 3 auf, sodass der Start des 4. Zyklus um 4 Tage auf den 29.1.2018 verschoben wurde und eine 4 tägige GM-CSF Gabe zur Behandlung der Neutropenie verabreicht wurde. Bei protrahierender Panzytopenie im März erfolgte die Gabe von G-CSF am 26.3.2018 und anschließendem Pausieren der Immunochemotherapie. Am 29.3.2018 zeigte sich das Bild eines fieberhaften Infekts ohne eindeutigen Fokus mit einem Leukozytenanstieg über  $100\,000/\text{L}$ , einem HSV Infekt an der Lippe, einer Anämie und einer Thrombozytopenie. Außerdem lagen erhöhte Werte für Laktat von  $4,1\text{mmol/l}$ , LDH von  $1095\text{ U/l}$  und Kreatinin  $1,6$  vor. Es wurde aufgrund eines Anteil von  $76\%$  myeloischer Blasten in der Immunphänotypisierung des peripheren Blut die Diagnose einer sekundären, therapieassoziierten akuten myeloischen Leukämie (t-AML) gestellt. Es erfolgte nach der Zytoreduktion mit Cytarabin und ein Wechsel der Therapie auf Vidaza  $100\text{mg}/\text{m}^2\text{ d1-5}$ . Im weiteren Verlauf wurde keine Kontrolle der Leukämie erreicht, sodass aus ärztlicher Sicht die Entscheidung auf ein palliatives Konzept mit „best supportive Care“ gefallen ist, sowie auf einem Stopp von Ara-C mit einer Umstellung auf Litalir oral. Der Patient verstarb am 2.6.2018.

#### 4.1.2 Avenio Kit Roche NGS

Vier Blutproben des Patienten LYM01 wurden für das NGS mit dem AVENIO ctDNA Expanded Kit der Firma Roche ausgewählt. Die erste Blutprobe ist vom Einschlusszeitpunkt in die LYMPHCIN Studie (27.09.2017), die zweite Probe am Tag der CT-Untersuchung (14.11.2017) zwei Wochen nach Beginn der Immunochemotherapie, die dritte Probe zum Zeitpunkt der Neutropenie am 25. Januar 2018 und die letzte Probe unmittelbar vor Ende der LYMPHCIN Studie am 31. März 2018.

Folgende Tabelle enthält eine Übersicht zu Anzahl der Keimbahnmutationen, sowie die detektierte cfDNA-Konzentration.

*Tabelle 4-1: Ergebnisse Avenio Kit von Patient LYM01*

Probe (Datum)	P01 (27.09.2017)	P05 (4.11.2017)	P012 (25.01.2018)	P014 (31.03.2018)
Somatisch	6	5	7	6
Keimbahn	89	89	88	89
DNA Menge Input NGS	50ng	50ng	50ng	50ng
Verwendetes Plasma	4,5ml	3,5ml	3,6ml	3,7ml
cfDNA Konzentration	4,04 ng/µl	5,45 ng/µl	12,30 ng/µl	46,00 ng/µl
cfDNA Menge pro 65µl	262,0ng	360,1ng	799,5ng	2990,0ng
Mutationen	95 SNVs	94 SNVs	95 SNVs	95 SNVs
Mittlere Fragmentlänge	173 bp	178 bp	173 bp	163 bp
Fragmentlänge (5.-95.Perzentile)	129-369 bp	125-394 bp	129-369 bp	139-178 bp

Die absolute Anzahl der gefundenen SNV-Mutationen bei diesem Patienten variiert über die Untersuchungszeitpunkte nur wesentlich. Bei der ersten und letzten Probe ist die Anzahl der somatischen Mutationen (6) identisch. Bei der zweiten Probe wurden fünf, bei der dritten sieben somatische Mutationen gefunden. Die Anzahl der Keimbahnmutationen ist bei drei Proben gleich (89), nur bei der Probe Mitte Januar ist eine Keimbahnmutation weniger gefunden worden.

Die Sequenzierungstiefe liegt bei den vier Proben zwischen 10 365 - (Probe 012) und 20 474 (Probe 01) -facher Molekültiefe. Über die vier Abnahmezeitpunkte bleibt die Größe der

mittleren Fragmentlänge relativ stabil. Bei der P01 und bei P012 ist der Wert (173bp) gleich. Im Vergleich dazu ist bei der zweiten Abnahme P05 die mittlere Fragmentlänge rund 5 Basenpaare länger, bei der letzten Probe P014 um 10 Basenpaare kürzer. Wird die Streuung der Fragmentlängen im Bereich der 5. bis zu 95. Perzentile betrachtet, sind sich die Werte der ersten drei Proben p01, P05 und P012 ähnlich. Bei der letzten Probe P14 fällt auf, dass die Streuung der Fragmenglängen deutlich geringer ausfällt. Besonders die 95.Perzentile weist einen deutlich geringeren Wert (178bp) auf.

### Quantitative Veränderungen cfDNA

Die Menge an cfDNA im Blut weist über die vier verschiedenen Zeitpunkte einen großen Anstieg auf. Im Zeitraum von Ende September 2017 bis Ende März 2018 steigt die Menge cfDNA pro 65µl im Plasma um mehr als das 10-fache ihres ursprünglichen Wertes an. Die Konzentration pro Mikroliter verhält sich ähnlich. Sie steigt von rund 4ng/µl bei Probe 1 auf 46ng/µl.

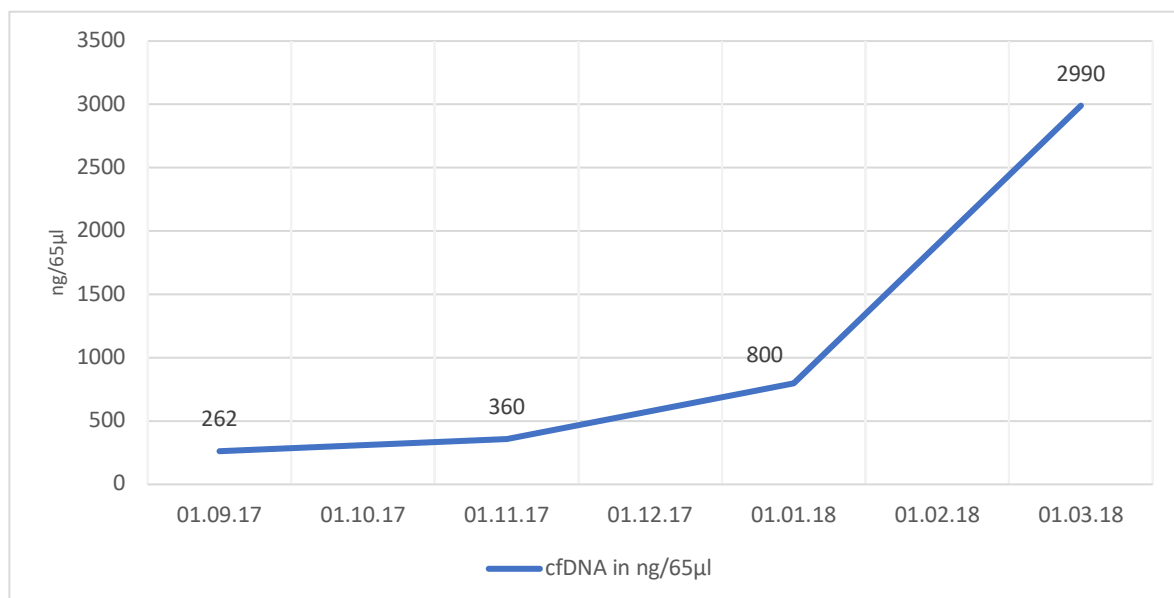


Abbildung 4-2: Detektierte Menge cfDNA im Blut von Patient LYM01

(Eigene Darstellung)

Während sich die Menge der cfDNA pro 65µl im Blut von Anfang November 2017 (rund 360ng) bis Ende Januar 2018 etwas mehr als verdoppelt (etwa um den Faktor 2,2 auf rund 799ng),

steigt sie in dem kürzeren Zeitraum zwischen Ende Januar 2018 und Ende März 2018 um mehr als das 3,7-fache des dritten Wertes sprunghaft auf einen Wert von 2990ng an.

### Detektierte Mutationen durch NGS

Die folgende Tabelle listet die im NGS detektierten Mutationen auf, welche nach den oben genannten Filterkriterien als potentiell somatisch oder pathogen gewertet werden. Die Mutationen werden mit Beschreibung der Varianten, Allelfrequenz, sowie die ExAC Häufigkeit angegeben.

Tabelle 4-2: Ergebnisse Avenio Kit NGS zu somatischen Mutationen von Patient LYM01

Gene	Variante	Allelfrequenz Tag 0	Allelfrequenz Tag 48	Allelfrequenz Tag 120	Allelfrequenz Tag 185	ExAC-Frequenz
BRCA1	p.Glu286Gln	0.10%	0	0	0	N/A
EGFR	p.Gly63Trp	0	0	0.08%	0	N/A
ERBB2	p.Pro391Leu	0.16%	0.21%	0	0	0.000835%
ERBB2	p.Lys937Arg	0.10%	0	0	0	N/A
FGFR3	p.Cys730Ser	0	0	0.04%	0	N/A
FLT3	p.Asp839Gly	0	0	0	21.27%	N/A
FLT3	p.Asp835His	0	0	0	0.57%	N/A
KEAP1	N/A	0.18%	0	0	0	N/A
KIT	p.Ile163Ser	0	0	0.09%	0	N/A
KRAS	p.Gly13Asp	0	0	0	0.36%	N/A
MET	p.Asp884Ala	0	0.17%	0	0	N/A
NF2	p.Ala193Thr	0	0	0.09%	0	N/A
PDGFRA	p.Thr276Met	0.51%	0.80%	0.54%	0.10%	0.00742%
PDGFRB	p.Thr140Met	23.41%	23.21%	32.19%	1.23%	0.00830%
SMAD4	p.Arg445*	0	0.04%	0	0	0.00083%
TP53 I	p.Arg273Leu	38.52%	34.73%	52.25%	0,014	0.00088%
TP53 II	p.Gly245Ser	0.35%	0.53%	0.81%	0.19%	0.00082%
TSC1	p.Leu136*	0	0	0	0.05%	N/A

Es fällt auf, dass Mutationen wie *PDGFRA* (p.Thr276Met), *PDGFRB* (p.Thr140Met), *TP53* (p.Arg273Leu) und *TP53* (p.Gly145Ser) zu allen Abnahmezeitpunkten im NGS nachzuweisen sind. Die übrigen Mutationen werden jeweils nur bei einem Zeitpunkt detektiert. *PDGFRB* (p.Thr140Met), *TP53* (p.Arg273Leu) und *FLT3* (p.Asp839Gly) unterscheiden sich von den anderen Mutationen durch die deutlich größere Allelfrequenz im Plasma, mit Werten für die Allelfrequenz von rund 21-52%. Die übrigen somatischen Mutationen sind mit einer Allelfrequenz von < 1% im Blut nachweisbar.

Für jeden der vier Zeitpunkte lassen sich einzelne Mutationen detektieren, die vor oder nach diesem Zeitpunkt nicht mehr nachzuweisen sind und mit geringer Allelfrequenz (< 1%) vorkommen. Bei dem ersten Abnahmezeitpunkt lassen sich die Mutationen *BRCA1*



(p.Glu286Gln), *ERB2* (p.Lys937Arg) und *KEAP1* im Plasma nachweisen. Zum Zeitpunkt der 2. Entnahme trifft dies auf *MET* (p.Asp884Ala) und *SMAD4* (p.Arg445\*) zu. Singulär zum Zeitpunkt der dritten Probe lassen sich die Mutationen in den Genen *EGFR* (p.Gly63Trp), *KIT* (p.Ile163Ser) und *NF2* (p.Ala193Thr) detektieren. Die Detektion von *FGFR3* (p.Cys730Ser), *FLT3*(p.ASP835His), *FLT3*(p.Asp839Gly), *KRAS*(p.Gly13Asp) und *TSC1*(p.Leu136\*) gelingt nur am letzten Abnahmezeitpunkt Ende März 2018.

### Absolute Veränderung der mutierten Gene

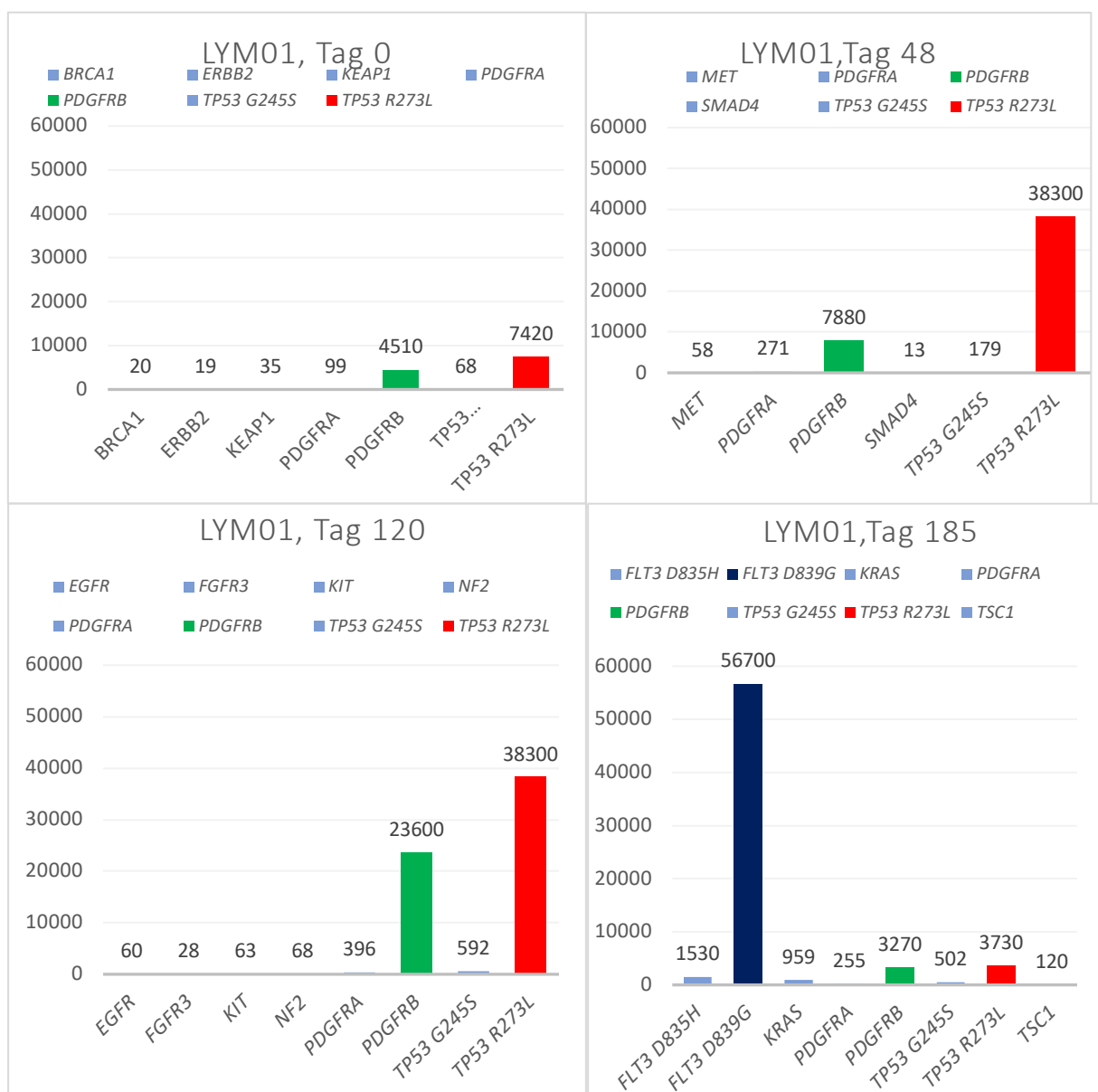


Abbildung 4-3: Allelkonzentration der Mutationen nach dem NGS zu den Zeitpunkten Tag 0, 48, 120 und 185 nach Rezidivfeststellung

Die Säulendiagramme zeigen die Allelkonzentration, also die absolute Anzahl mutierter Kopien pro Milliliter Plasma (Kopien/ml). Auf *TP53* (p.Asg271Leu) entfällt bei den ersten drei Proben der größte Anteil an nachgewiesener ctDNA. Die absolute Anzahl Kopien/ml steigt zum 2. Abnahmezeitpunkt um den Faktor 5 (von rund 7.400 auf 38.000 Kopien/ml) im Vergleich zu Beginn und stagniert bei dem Wert bis zum dritten Zeitpunkt. In der letzten Probe hat die Anzahl auf rund 3.700 Kopien/ml abgenommen. Der Anteil von *TP53* (p.Arg273Leu) an der Gesamtmenge ctDNA variiert stark über den gesamten Beobachtungszeitraum (rund 4 bis 85%).

*PDGFRB* (p.Thr140Met) als zweitgrößter Subanteil in den ersten drei Probenzeitpunkten zeigt ebenso ein Wachstum im Hinblick auf die absolute Anzahl an Kopien (von rund 4.500 auf 23.600). Wie *TP53* (p.Arg273Leu) nimmt die Anzahl Kopien/ml von *PDGFRB* (p.Thr140Met) zum letzten Zeitpunkt ab und fällt unter den Ausgangswert der ersten Probe.

Während *FLT3* (p.Asp839Gly) in den ersten drei Proben nicht nachzuweisen war, dominiert es die letzte Probe und stellt in dieser mit rund 58.200 Kopien/ml die größte Fraktion dar. Für die Allelkonzentration) von *FLT3* (p.Asp839Gly) lässt sich feststellen, dass sie sich im Vergleich zu der früher dominierenden Allelkonzentration von *TP53* (p.Arg273Leu) in deutlich größerer absoluter Anzahl nachzuweisen ist.

### **Qualitative Auswertung der Mutationen**

Die detektierten Mutationen wurden mittels Datenbankrecherche auf ihre Pathogenität hin untersucht, ob die im NGS detektierten Mutationen bereits in der Literatur erwähnt worden sind und ob für diese Mutationen Informationen von klinischer Relevanz im Sinne von Therapie und Prognostik beschrieben sind.

### **Somatisch, pathogene und tumor-assoziierte Mutationen**

Für die in den ersten drei Proben dominierende Mutation *TP53* (p.Arg273Leu) sind zahlreiche Einträge in der COSMIC Datenbank verzeichnet. Unter der entsprechenden COSMIC ID [COSM3675521] sind allein über 110 Einträge für das Vorkommen dieser Mutation in Lungenkarzinomen zu finden, wobei diese Mutation in nur 4 lymphoiden Tumoren gefunden,

aber ohne in Bezug zu einem DLBCL. Laut COSMIC Datenbank wird sie als pathogen bezeichnet (FATHMM Score 1) und diese Mutation ist in diverse Signalwege involviert, unter anderem in Zellzykluskontrolle, Apoptose und DNA Reparatur. Die ClinVar-Datenbank hat 28 Einträge zu dieser Mutation [VCV000376655.3] verzeichnet, zwei als pathogen und 26 als wahrscheinlich pathogen. Die Punktmutation wurde in einem der Fälle bei einer AML gefunden [RCV000433315.1], ebenso ist ein Fall mit dieser Mutation bei AML bei cBioPortal beschrieben. In cBioPortal sind 27 Einträge für diese Mutation gelistet, wobei die Mutation in weniger als 0,1% aller 23500 Vergleichsproben vorkam und kein Eintrag in Bezug zu einer lymphoiden Erkrankung steht, aber als Hotspot-Mutation gelistet wird.

Über *TP53* (p.Gly245Ser) sind hunderte Einträge in COSMIC zu finden [COSM6932]. Allein 29 Vermerke für dieser Punktmutation im Fokus lymphoiden bzw. hämatologischen Tumoren. Die Mutation ist sechsmal in Patienten mit einer AML gefunden worden, sowie dreimal in Patienten mit der Diagnose eines DLBCL. Die Aberration wird als somatisch und pathogen beschrieben (FATHMM Score 0,99). cBioPortal listet für die Mutation fünf Einträge zu AML, darunter zweimal therapieassoziierte-AML, sowie vier Myelodysplastische Syndrome, wobei ebenso zweimal t-AML Einträge zu finden sind. Laut cBioPortal konnte die Punktmutation in sechs Proben bei Patienten mit DLBCL gefunden werden. Dort wird diese Mutation als pathogen und statistisch signifikante Hotspot Region bezeichnet und ist in Signalwege bei Apoptose und DNA Reparatur involviert.

Die Mutation *FLT3* (p.Asp839Gly) ist bei COSMIC mit 18 Treffern für hämatopoetische und lymphoide Erkrankungen verzeichnet [COSM1166729], wobei diese 17-mal in Patientenproben mit einer AML als maligne Grunderkrankung nachgewiesen wurde. Sie wird als somatisch und pathogen (FATHMM Score 0,99) bezeichnet. ClinVar beschreibt diese Mutation als wahrscheinlich pathogen (VCV000376014.1). cBioPortal listet für alle 14 Einträge eine AML als Grunderkrankung und bei den verschiedenen Proben wird die Allelfrequenz der Mutation zwischen 10-28% angegeben. cBioPortal gibt für diese Punktmutation eine von der FDA vorgeschlagene Chemotherapie mit Midostaurin + Hochdosischemotherapie an, wobei darauf hingewiesen wird, dass diese Information aber noch nicht für den klinischen Gebrauch bestimmt ist bzw. verwendet werden darf.

Für die Mutation *FLT3* (p.Asp835His) sind in der COSMIC Datenbank 79 Einträge in Bezug auf hämatopoetische und lymphoide Tumore zu finden [COSM785]. Sie wird als somatisch und pathogen (FATHMM Score 0,99) beschrieben. Für diese Mutation ist ein Resistenzmechanismus gegen Sorafenib, einem Inhibitor von Angiogenese und des *raf*-Signalweges, bekannt. ClinVar beschreibt die Mutation als pathogen [VCV000016273.1] und bei cBioPortal sind 46 Einträge mit AML als zugrundeliegender Erkrankung zu finden.

Die Mutation *KRAS* (p.Gly13Asp) ist in der Datenbank COSMIC mit mehreren tausend Einträgen gelistet [COSM532]. Mit über 230 verzeichneten Vermerken zu hämatopoetischen und lymphoiden Erkrankungen ist dies die zweitgrößte Gruppe hinter den Gastrointestinaltumoren (> 4500 Verweise). COSMIC listet zwei bekannte Medikamentenresistenzen, die mit dieser Mutation assoziiert sind auf, gegenüber Cetuximab und Panitumumab (Antikörperbasierende Medikamente gegenüber dem „Epidermal growth factor“). Die Mutation wird in COSMIC und ClinVar als somatisch und pathogen beschrieben (FATHMM Score 0,98) und wird häufig bei AML oder bei akuter lymphoblastischer B-Zell Leukämie gefunden. cBioPortal listet für diese Punktmutation deutlich mehr Einträge für AML als für DLBCL auf. Für diese Mutation sind bis zu 10 Signalwege beschrieben, die beeinflusst werden können, wie die MAPK-Kaskade, IL-5 bzw. -3 oder G-Protein Signalwege.

### **Somatisch und pathogene Mutationen**

Für die Mutation *ERBB2* (p.Lys937Arg) wurde in COSMIC ein Eintrag gefunden [COSM3370707]. Die Mutation wurde in einem Schilddrüsentumor gefunden und als pathogen beschrieben (FATHMM Score 0,82). Ein Eintrag ist für *NF2* (p.Ala193Thr) bei COSMIC verzeichnet [COSM6960084]. Diese Mutation wurde bei einem Gastrointestinaltumor gefunden und als somatisch und pathogen beschrieben (FATHMM Score 0,98).

Die Mutation *SMAD4* (p.Arg445\*) ist in COSMIC mit rund 40 Einträgen gelistet [COSM14096]. Sie ist als somatisch und pathogen beschrieben (FATHMM Score 0,94). Sie ist hauptsächlich bei Pankreastumoren gefunden worden und ein Eintrag mit Assoziation zu lymphatischen Erkrankungen ist nicht verzeichnet. Über *PDGFRB* (p.Thr140Met) sind keine Einträge zwecks Pathogenität in der COSMIC oder ClinVar Datenbank zu finden. Bei Uniprot [P09619] wird

diese Mutation mit CML und AML assoziiert. cBioPortal listet gesamt 13 Einträge für das mutierte Gen PDGFRB (p.Thr140Met) mit AML oder DLBCL als Grunderkrankung.

### **Somatische Mutationen unklarer Pathogenität**

Als somatisch, aber neutral (FATHMM Score 0,06) wurde die Mutation *PDGFRA* (p.Thr276Met) in COSMIC bewertet [COSM1540243]. ClinVar bezeichnet die Mutation als nicht genau spezifiziert, da Einträge in Assoziation mit Tumoren gelistet werden [VCV000348896.2]. Bei cBioPortal sind Einträge zu *PDGFRA* (p.Thr276Met) sowohl bei AML, DLBCL und Myelodysplastischem Syndrom zu finden, wobei auch hier die Pathogenität als unbekannt bezeichnet wird.

Für *BRCA1* (p.Glu286Gln) konnten keine Einträge in den Datenbanken gefunden werden. Das Proteintranskript [ENST00000357654.8] ist mit der DNA Reparatur assoziiert. Für die Mutation *EGFR* (p.Gly63Trp) ist kein Eintrag in COSMIC oder ClinVar verzeichnet. Für *ERBB2* (p.Pro391Leu) konnte kein Eintrag in den Datenbanken gefunden werden, ebenso wie für *FGFR3* (p.Cys732Ser), *KEAP1* (c.1709 G>A), *KIT* (p.Ile163Ser), *MET* (p.Asp884Ala) und *TSC1* (p.Leu136\*).

### 4.1.3 ddPCR Ergebnisse

Nach Auswertung der NGS Ergebnisse wurden entsprechende ddPCR Assays für die Verlaufsbeurteilung der gefundenen Mutationen bestellt bzw. konstruiert. Die restlichen 10 Blutproben des Patienten wurden mittels ddPCR untersucht, um die Allelfrequenz und Allelkonzentration zu bestimmen. Die Grafiken zeigen den zeitlichen und quantitativen Verlauf der ctDNA seit Feststellung des Rezidivs, wobei in den Diagrammen die Daten von NGS und ddPCR zu einem gemeinsamen Verlauf zusammengefügt wurden. Bei der Berechnung der Allelfrequenz und Allelkonzentration der ddPCR wurden folgende Volumina für die entsprechenden Proben bedacht:

Tabelle 4-3: Volumina Blutplasma Proben P01-P014

Volumen (ml)	Probe	Volumen (ml)	Probe	Volumen (ml)	Probe	Volumen (ml)	Probe
5,0	P01	4,0	P05	4,0	P09	3,6	P13
4,0	P02	3,6	P06	3,5	P10	4,0	P14
4,0	P03	4,0	P07	1,5	P11		
4,0	P04	4,0	P08	4,0	P12		

## Zeitlicher Verlauf der Allelkonzentration

In dieser Grafik sind die Allelkonzentrationen der Mutationen, die erhaltene Therapie, sowie Therapieverzögerungen und Bildgebung im zeitlichen Verlauf eingezeichnet.

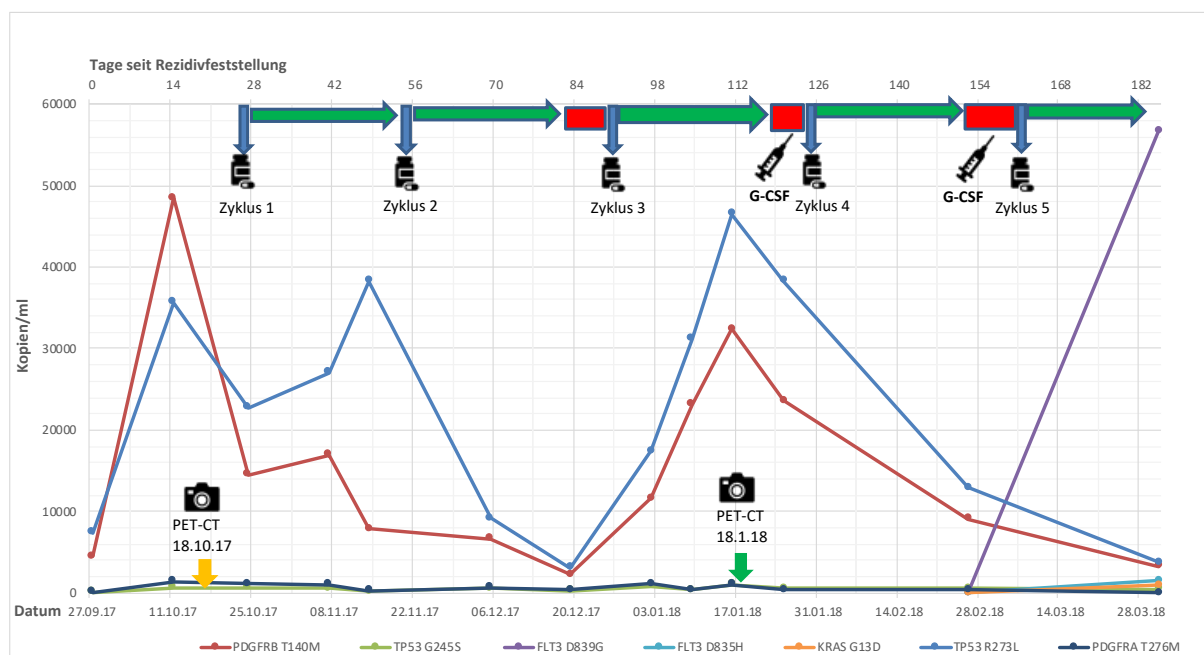


Abbildung 4-4: Verlauf der Mutationslast ausgewählter Mutationen bestimmt durch NGS und ddPCR.

Aufgetragen ist die Anzahl mutierter Kopien der in der Legende angeführten Mutationen pro Milliliter Plasma gegenüber dem zeitlichen Verlauf der Erkrankung. Die blauen Pfeile sowie die Medikamentenboxen verdeutlichen den Start eines Immunochemotherapiezyklus. Die grünen Pfeile im oberen Bildabschnitt zeigen die Länge eines normalen 28-tägigen Zyklus. Die roten Quadrate stehen für eine Therapieunterbrechung. Die Spritzen zeigen die Zeitpunkte einer Gabe von G-CSF. Die Kameras symbolisieren den Zeitpunkt der Bildgebung, der grüne Pfeil darunter symbolisiert eine Befundverbesserung, der gelbe Pfeil symbolisiert keine signifikante Verbesserung in der Bildgebung. Zu den Mutationen beider FLT3 Loci ist zu sagen, dass diese lediglich zum letzten Zeitpunkt nachzuweisen sind, didaktisch dieser enorme Anstieg graphisch aber als Linie und nicht als Messpunkt dargestellt ist (Quelle: eigene Darstellung)

Deutlich heben sich über den gesamten Verlauf *PDGFRB* (p.Thr140Met), *TP53* (p.Arg273Leu) und *FLT3* (p.Asp839Gly) von den übrigen Mutationen durch eine wesentlich höhere Allelkonzentration (rund 100-fach größer) ab. Die Allelkonzentration der im Verlauf dominierenden Mutationen *PDGFRB* (p.Thr140Met) und *TP53* (p.Arg273Leu) steigen nach der ersten Probe innerhalb von 14 Tagen enorm an, fallen beide jedoch bei Beginn des medikamentösen Therapieregimes ab. Auffällig daran ist, dass dieser Abfall ohne Verabreichen einer Therapie beobachtet werden konnte. Über die ersten zwei Immunochemotherapiezyklen gesehen nimmt die Allelkonzentration wieder deutlich ab und am Ende des 2. Zyklus lassen sich kleinere Werte als zum Ursprungszeitpunkt feststellen, wobei die Allelkonzentration im ersten Zyklus teilweise noch weiter ansteigt, bevor sie anschließend im Verlauf fällt. Nach dem zweiten Zyklus ist eine Neutropenie bedingte Unterbrechung des Therapieregimes aufgetreten. Ab diesem Zeitpunkt steigt die Allelkonzentration innerhalb des darauffolgenden Monats wieder rasant an hin zu Werten vergleichbar mit dem Initialbefund vor Therapiebeginn. Mit dem Peak am 17.1.2018 fallen die Allelkonzentrationen bis Mitte März wieder.

Die Allelkonzentration von *TP53* (p.Gly245Ser) und *PDFGRA* (p.Thr276Met) sind über den gesamten Probenzeitraum ebenso nachweisbar, wenngleich mit geringer Anzahl und geringerer Dynamik. Es lassen sich für diese Mutationen durchschnittlich mehrere Hundert Kopien pro Milliliter nachweisen, mit einer Streubreite von rund 60 bis rund 1000 Kopien/ml für *TP53* (p.Gly245Ser) und von 0 Kopien/ml bis rund 1400 Kopien/ml für *PDFGRA* (p.Thr276Met). Die Mutationen *FLT3* (p.ASP835His), *FLT3* (p.Asp839Gly) und *KRAS* (p.Gly13Asp) sind nur am letzten Probenzeitpunkt nachzuweisen. *FLT3* (p.ASP835His) und *KRAS* (p.Gly13Asp) lassen sich beim letzten Probenzeitpunkt mit rund 1500 bzw. rund 1000 Kopien/ml auf einem ähnlichen Niveau wie zuvor *TP53* (p.Gly245Ser) und *PDFGRA* (p.Thr276Met) nachweisen.

### **Zeitlicher Verlauf der Allelfrequenz**

In der folgenden Grafik sind die Allelfrequenzen der Mutationen, die erhaltene Therapie, sowie Therapieverzögerungen und die Bildgebung im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Auch bei der Allelfrequenz sind die zwei verlaufsdominierenden Mutationen *PDGFRB* (p.Thr140Met) und *TP53* (p.Arg273Leu). Im Unterschied zu der Allelkonzentration bei Probe 2 fällt die

Allelfrequenz der Mutationen 14 Tage vor Beginn der Therapie ab. Dies lässt sich mit dem vermehrten Nachweis der Wildtyp-DNA zu diesem Zeitpunkt erklären. Während des ersten Zyklus ist bei beiden Allelfrequenzen ein Anstieg zu verzeichnen, der im Verlauf des 2. Zyklus abnimmt und zum Ende des Zyklus fällt die Allelfrequenz kontinuierlich auf ungefähr halbe Ausgangswerte wie zu Therapiebeginn ab.

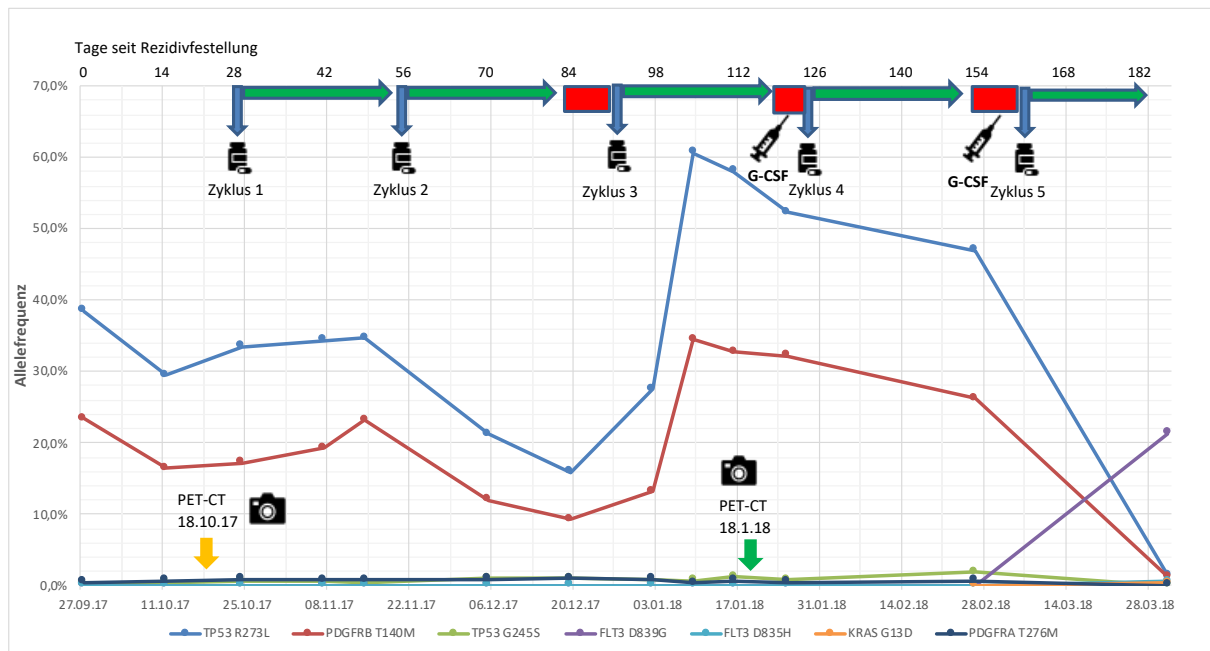


Abbildung 4-5: Zeitlicher Verlauf der Allelfrequenzen bei LYM01,

Erklärung Symbole siehe Abbildung 4.4

Ein Anstieg in der Allelfrequenz ist deutlich nach verzögertem Beginn des 3. Zyklus zu erkennen. Die Allelfrequenz steigt innerhalb eines Monats für *TP53* (p.Arg273Leu) auf Werte über 60% und für *PDGFRB* (p.Thr140Met) auf rund 35%. Im Gegensatz zu den Allelkonzentrationen der Mutationen fallen die Allelfrequenzen weniger stark ab bis Ende Februar, brechen jedoch beim letzten Probenzeitpunkt auf Werte knapp größer 1% ein. FLT3 (p.Asp839Gly) ist nur zum Probenzeitpunkt P014 mit einer Allelfrequenz von 21 % nachweisbar. *TP53* (p.Gly245Ser) und *PDGFRA* (p.Thr276Met) sind über den gesamten Zeitraum mit einer Frequenz im Bereich von rund 1% detektierbar. *TP53* (p.Gly245Ser) hat seine maximale Allelfrequenz bei Zeitpunkt P013 mit rund 1,9% und sein Minimum bei Zeitpunkt P014 mit rund 0,2 %, während *PDGFRA* (p.Thr276Met) bei Zeitpunkt P07 mit 1,1% sein Maximum und sein Minimum mit keinem Nachweis bei Zeitpunkt P014 aufweist.



## Ergebnisse ddPCR Assays der Biopsie

Im Zuge der Diagnosestellung des DLBCL im November 2016 wurde eine Biopsie aus den abdominellen Lymphknotenpaketen entnommen. Dieses Material wurde SOP gemäß in der Pathologie des rechts der Isar aufgearbeitet und asserviert. Die DNA dieses Biopsats wurde mit den ddPCR-Assays auf das Vorhandensein der entsprechenden Mutationen hin untersucht. Die Tabelle listet die ddPCR bestimmten Allelfrequenzen der im Gewebe der initialen Biopsie detektierten Mutationen auf, sowie der im Buffy coat nachgewiesenen.

Tabelle 4-4: ddPCR Assays initiale Biopsie und Buffy coat

Mutationen	<i>TP53</i> <i>R273L</i>	<i>TP53</i> <i>G245S</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>KRAS</i> <i>G13D</i>	<i>FLT3</i> <i>D839G</i>	<i>FLT3</i> <i>D835H</i>	<i>PDGFRA</i>
Biopsie AF Lauf 1	86,2%	0,0%	45,8%	0,2%	0,0%	0,0%	0,3%
Biopsie AF Lauf 2	84,3%	0,0%	49,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%
Buffy coat AF Lauf 1	0,0%	0,9%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,4%
Buffy coat AF Lauf 2	0,0%	0,8%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,5%

Aus der Tabelle kann entnommen werden, dass die Mutationen *TP53* (p.Arg273Leu), *PDGFRB* (p.Thr140Met), *PDGFRA* (p.Thr276Met) und *KRAS* (p.Gly13Asp) in der Gewebebiopsie zum Zeitpunkt der Erstdiagnose detektierbar waren. *TP53* (p.Arg273Leu) und *PDGFRB* (p.Thr140Met) sind ebenso wie zum Zeitpunkt späteren Rezidiv die dominierenden Mutationen, mit fast 50% für *PDGFRB* (p.Thr140Met) und einer sehr hohen Allelfrequenz von rund 85% für *TP53* (p.Arg273Leu). Während sowohl in der Gewebeprobe als auch beim Zeitpunkt des Rezidivs diese beiden Mutationen ebenso wie *PDGFRA* (p.Thr276Met) vorkommen, ist *TP53* (p.Gly245Ser) erst beim Rezidiv zu detektieren und umgekehrt *KRAS* (p.Gly13Asp) ist in lediglich beim letzten Probenzeitpunkt wieder detektierbar. Die Mutationen *FLT3* (p.Asp839Gly) und *FLT3* (p.Asp835His) konnten nicht in der initialen Biopsie nachgewiesen werden.

Im Buffy coat konnten nur die beiden Mutationen *TP53* (p.Gly245Ser) und *PDGFRA* (p.Thr276Met) detektiert werden.

## Mögliche Korrelation von Mutationen untereinander und in Bezug auf LDH

Für die über den gesamten Rezidivzeitraum nachzuweisenden Mutationen wurde eine mögliche Korrelation untereinander, sowie hinsichtlich des unspezifischen Laborparameters LDH untersucht. Es wurde ein Spearman Korrelationstest an den unten angeführten Mutationen durchgeführt.

*Tabelle 4-5: Spearman Test*

	TP53 R273L	PDGFRB T140M	TP53 G245S	PDGFRA T276M	LDH
TP53 R273L	1,000	0,842	0,330	0,242	0,135
PDGFRB T140M		1,000	0,577	0,698	0,352
TP53 G245S			1,000	0,879	0,258
PDGFRA T276M				1,000	0,242
LDH					1,000

## 4.2 LYM02

### 4.2.1 Patientenhistorie

LYM02 ist zum Zeitpunkt des ersten Kontaktes (Juni 2017) eine 71-jährige Patientin mit Zustand nach Nierentransplantation 1989 und zur Zeit der Tumordiagnose unter dualer Immunsuppression mit Ciclosporin und Azathioprin. Initial litt die Patientin unter rezidivierender Hämatoemesis und progredienter Schwäche, sodass eine in der Diagnostik festgestellte Raumforderung des Magens weiter mittels Gastroskopie und Biopsie abgeklärt wurde. Aufgrund des initialen klinischen Verdachtes auf ein Burkitt Lymphom in Verbindung mit dem ausgeprägten Befund in der Bildgebung erhielt die Patientin ab dem 13.06.2017 eine Vorphasetherapie mit zweimaliger Rituximab-Gabe ( $375\text{mg}/\text{m}^2$  i.v.), 5-tägiger Prednisolongabe  $100\text{mg}$  i.v. und 4-tägiger Cyclophosphamidgabe ( $200\text{mg}/\text{m}^2$  i.v.). Nach histologischer Aufarbeitung wurde die Diagnose eines DLBCL, speziell einer „post-transplant lymphoproliferative disorder“ (PTLD) gestellt. Unter diesem Begriff wird das Auftreten verschiedener Lymphomentitäten nach Stammzell- oder Organtransplantationen in der Vorgeschichte subsumiert. Eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus konnte nicht nachgewiesen werden. Bildmorphologisch zeigte sich eine Infiltration der Magenwand mit Einbezug des umgebenden Mesenteriums und der Pankreaskopfregeion und einer

Lymphadenopathie links tiefzervikal, sowie anteriores und posteriores Mediastinum, zoeliakal, pleural und retroperitoneal im Sinne eines Stadium Ann-Arbour IVA. Nach histologischer Sicherung des DLBCLs mit kräftiger c-Myc Expression und einer Proliferationsrate von 90-95% wurde initial ein 4-6 maliger Zyklus R-CHOP 21 mit Zwischenstaging nach dem 3. Zyklus vereinbart. Der erste Zyklus (Start 27.06.2017) erfolgte in reduzierter Dosierung (Rituximab-Gabe  $375\text{mg}/\text{m}^2$  i.v., Doxorubicin 75% von  $50\text{mg}/\text{m}^2$ , Cyclophosphamid  $200\text{mg}/\text{m}^2$  i.v., Vincristin 1mg), die weiteren Zyklen in normaler Dosierung. Der IPI wurde zu Beginn mit vier Punkten angegeben und die LDH war zu Beginn der Vortherapie (rund  $620\text{U}/\text{L}$ ) und bei Beginn des 1.Zyklus (rund  $530\text{U}/\text{L}$ ) deutlich erhöht. Am 30.6.2017 wurde einmalig Lonquex zur Reduzierung der Neutropeniephase verabreicht. Im Verlauf des 1.Zyklus der Chemotherapie war die LDH fallend bei Besserung der klinischen Symptomatik. Das Staging-CT vom 30.8.2017 zeigt ein deutliches Therapieansprechen mit Größenregredienz des Tumorbulks in der Magenwand und der paramesenterialen Region im Sinne einer partiellen Remission. In der abschließenden PET-CT Diagnostik vom 3.11.2017 zeigt sich eine weiterhin regrediente Befundsituation im Bereich der früheren Lymphommanifestation mit keinem Nachweis von vitaler Lymphommanifestation (Deauville 1). Die darauffolgenden Verlaufs- und Kontroll CT-Untersuchungen zeigten bis Oktober 2019 keinen bildmorphologischen Nachweis einer neu aufgetretenen Lymphommanifestation.

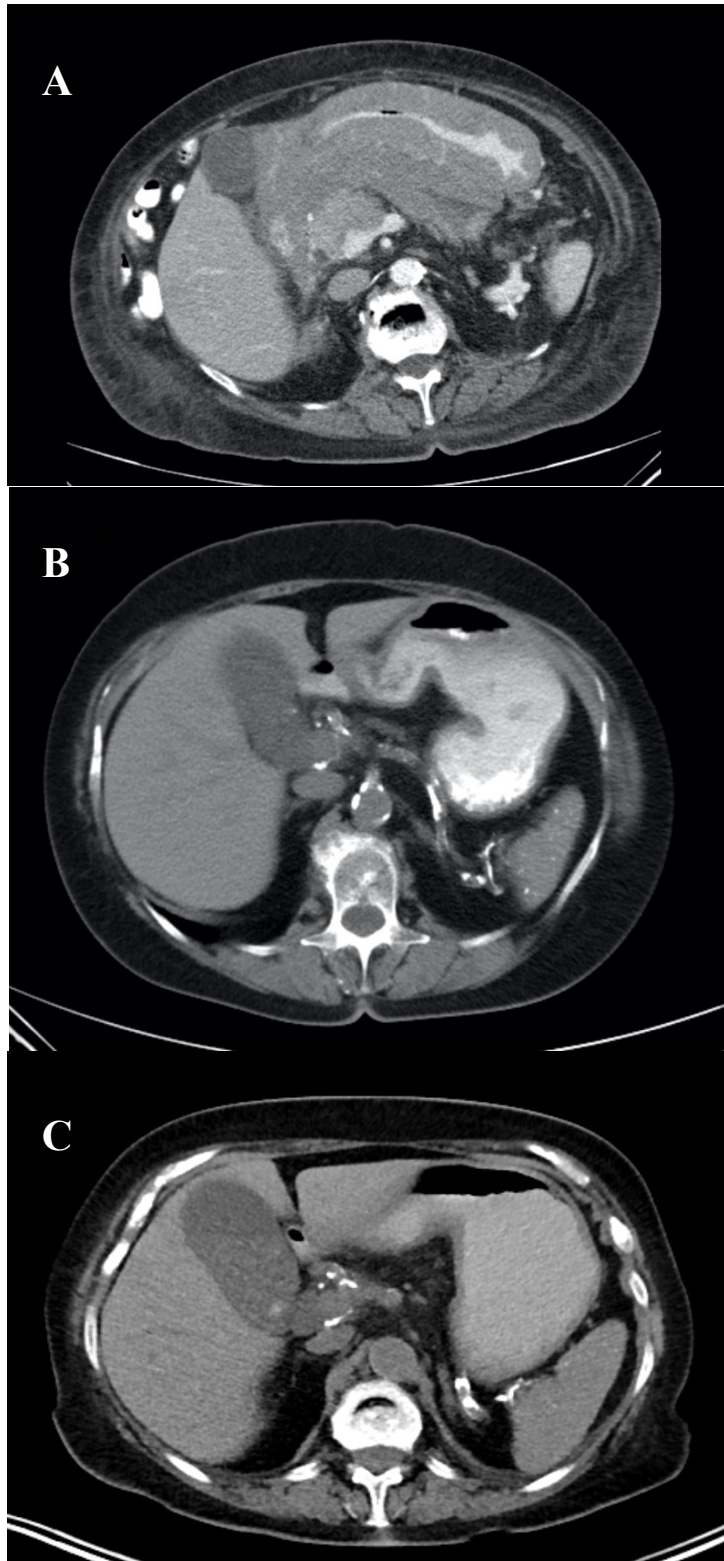


Abbildung 4-6: CT-Abdomen Transversalschnitt Verlaufsbilder LYM02

A: Kontrastmittelgestütztes CT-Abdomen Juni 2017, Massive tumorbedingte Wandverdickung des Magen

B: Kontrastmittelgestütztes CT-Abdomen August 2017, Deutliche Größenregredienz des Lymphobulks der Magenwand

C: PET-CT Abdomen November 2017: Weiterhin Größenregredienz bei fehlendem Hinweis auf Lymphomaktivität (Deauville 1)

## 4.2.2 NGS

Für das NGS mit dem Avenio Expanded Kit standen 4,0ml Plasma aus der Probe P01 zur Verfügung und 50ng wurden als Inputmenge an DNA verwendet. Die im NGS isolierte cfDNA-Masse lag nach Anreicherung bei rund 103ng. Probe P01 vom 23.06.2017 wurde sequenziert und 147 SNVs wurden in dieser Probe detektiert, wobei nach erster Filterung der Daten vier Mutationen als somatisch oder potentiell pathologisch verblieben sind:

Tabelle 4-6: Mutationen im NGS LYM02

Gen	Variante	AF	Kopien/ml
APC	p.R564*	0,18%	15
EZH2	p.Y646N	0,21%	18
PTEN	p.R335*	25,70%	2190
TP53	p.R280S	26,70%	2280

*PTEN* (p.Arg335\*) und *TP53* (p.Arg280Ser) sind die zwei dominierenden Mutationen in der ersten Probe der Patientin. *APC* (p.Arg564\*) und *EZH2* (p.Tyr646Asn) sind mit einer sehr niedrigen Allelfrequenz bzw. Allelkonzentration nachzuweisen.

### Qualitative Auswertung Mutationen

Für *TP53* (p.Arg280Ser) sind auf COSMIC 30 Einträge zu Tumoren gelistet, wobei diese Mutation mit drei Einträgen bei hämatologischen Tumoren, einer darunter ein DLBCL, gelistet wird. Die Mutation wird bei COSMIC als somatisch und pathogen beschrieben (FATHMM 0,87), bei ClinVar und cBioPortal als wahrscheinlich pathogen.

*PTEN*(p.Arg335\*) wird bei COSMIC mit fünf Einträgen zu hämatologischen und lymphatischen Tumoren gelistet, darunter ein Nachweis dieser Punktmutation in der Gewebeprobe eines DLBCL. Die Mutation wird bei COSMIC und bei ClinVar als somatisch und pathogen beschrieben (FATHMM 0.9). Laut cBioPortal wurde diese Punktmutation in zwei Fällen mit DLBCL gefunden und die Mutation als onkogen gekennzeichnet.

*APC* (p.Arg564\*) wird als pathogen (FATHMM 0.94) und somatisch beschrieben, wobei bei COSMIC kein Eintrag zu NHL zu finden ist, sondern hauptsächlich Einträge zu Adenokarzinomen. cBioPortal und ClinVar verzeichnen ebenso keinen Eintrag in Bezug auf NHL, wobei die Mutation allgemein als wahrscheinlich pathogen bezeichnet wird.

*EZH2* (p.Tyr646Asn) wird bei ClinVar als wahrscheinlich pathogen beschrieben und wurde bereits bei einem NHL beschrieben. COSMIC beschreibt die Mutation als pathogen (FATHMM 0.99) und somatisch. Es sind knapp 80 Einträge zu dieser Mutation in hämatologischen und lymphatischen Tumoren verzeichnet und die Punktmutation wurde zum Großteil in Gewebeproben von DLBCL und FL gefunden.

#### 4.2.3 ddPCR

Für die vier im NGS festgestellten Mutationen wurden ddPCR-Assays bestellt. Die übrigen sieben Blutproben erstrecken sich über den Zeitraum der Chemotherapiebehandlung und wurden mit den ddPCR Assays getestet. Folgende Volumina wurden bei der ddPCR eingesetzt:

*Tabelle 4-7: Volumen Blutplasma Proben P02-P08*

Volumen (ml)	Probe	Volumen (ml)	Probe
4,5	P01	4,0	P05
4,5	P02	3,8	P06
6,0	P03	5,2	P07
5,5	P04	0,4	P08

Initial sind die Mutationen *PTEN* (p.Arg335\*) und *TP53* (p.Arg280Ser) mit einer AZ >2000 Kopien/ml im NGS zu detektieren. Bereits beim Zeitpunkt der zweiten Probennahme 14 Tage später und nach Erhalt einer Chemotherapie mit Rituximab, Prednisolon und Cyclophosphamid bei initialem Verdacht auf ein Burkitt Lymphom, sind fast keine Kopien (<100/ml) dieser beiden Mutationen in der ddPCR mehr zu detektieren. Die Mutationen *APC* (p.Arg564\*) und *EZH2* (p.Tyr646Asn) sind, außer im NGS der Probe P01, in keiner weiteren Probe mit einem ddPCR-Assay detektierbar. In den nachfolgenden Proben von P03 bis zum Ende des 6-zyklischen R-CHOP Regimes bei P08 gelingt kein Nachweis der vier Mutationen in der ddPCR.

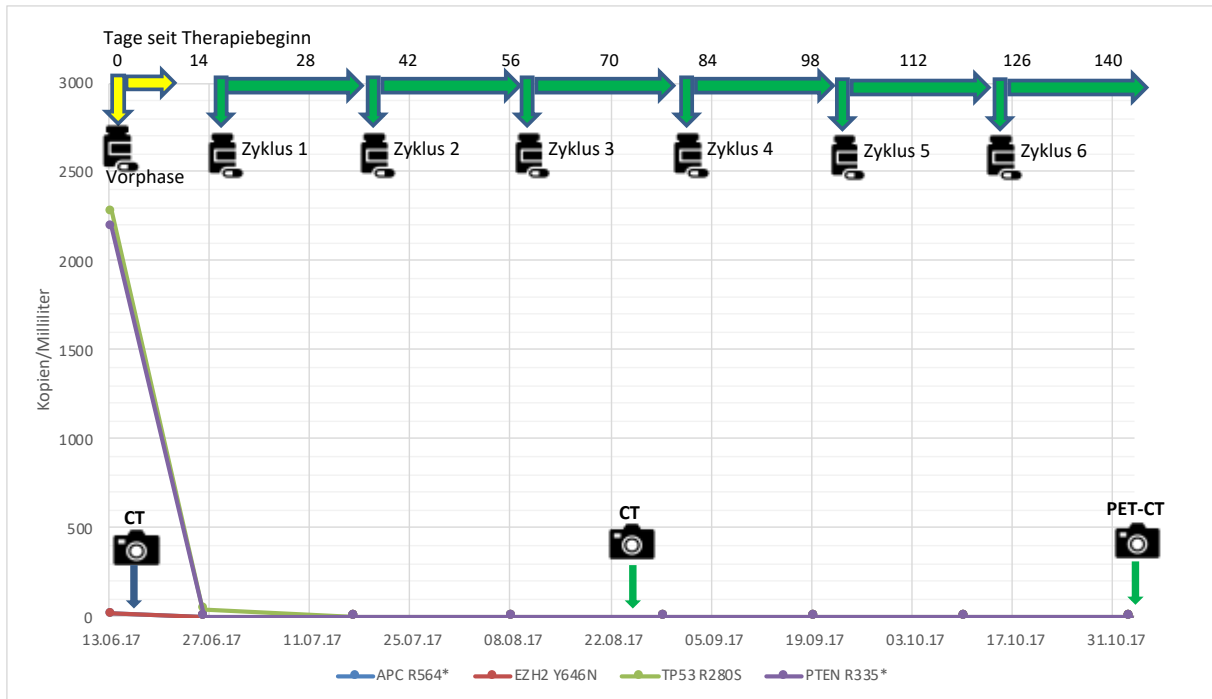


Abbildung 4-7: Zeitlicher Verlauf der Allelkonzentration LYM02

Die gelben Pfeile stehen für die Vorphase mit Rituximab, Prednisolon und Cyclophosphamid bei initialem Verdacht eines Burkitt-Lymphoms; die grünen horizontalen symbolisieren den Verlauf der erhaltenen Chemotherapie mit R-CHOP (Zyklus 1 reduziert). Das Kamerasymbol die Zeitpunkte der Bildgebung (BG). Der blaue Pfeil am unteren Bildrand steht für die initiale BG, die grünen vertikalen Pfeile für ein bildmorphologisches Therapieansprechen

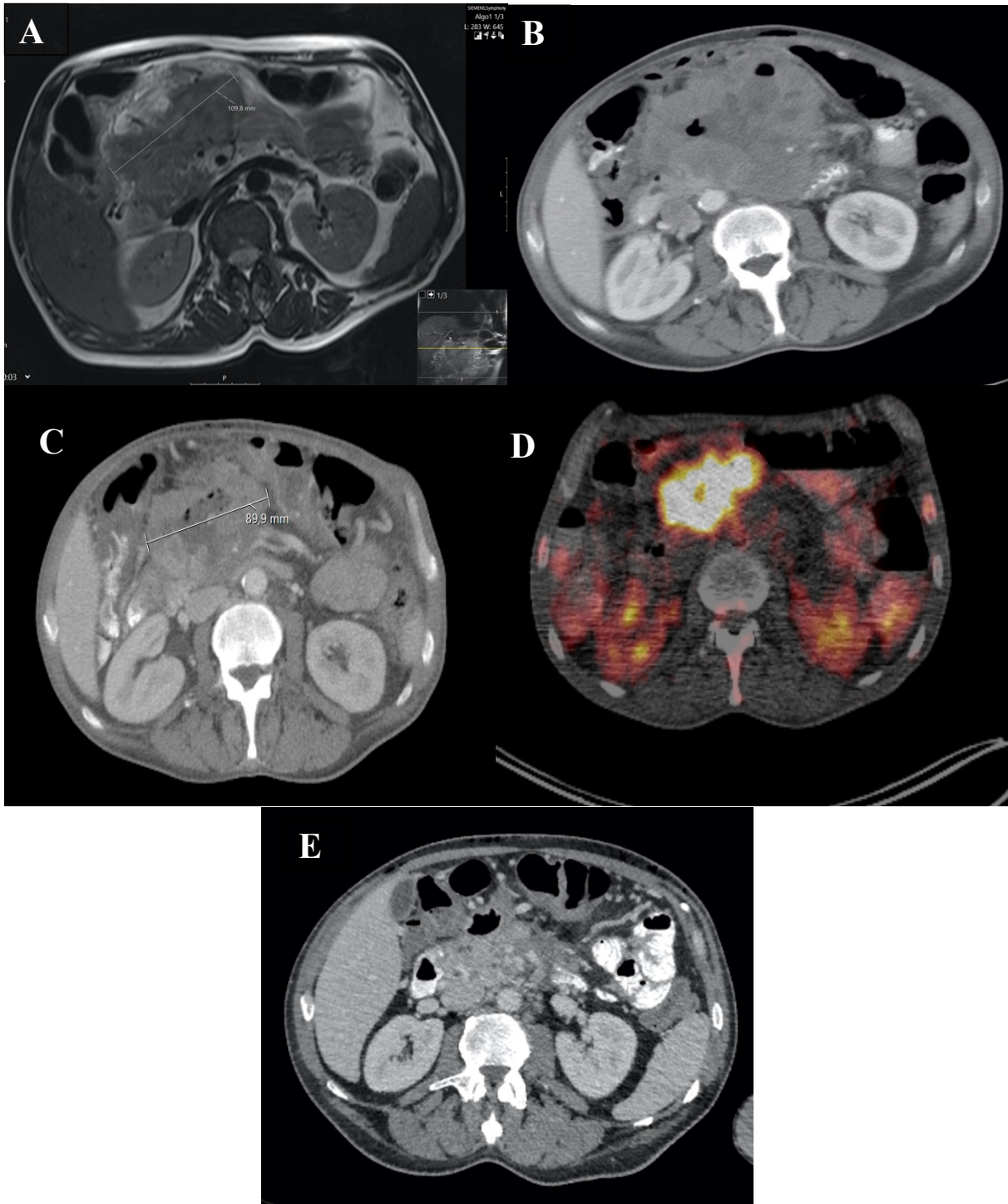
## 4.3 LYM03

### 4.3.1 Patientenhistorie

LYM03 ist zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Juni 2017) ein 55-jähriger Mann und stellte sich mit seit Dezember 2016 bestehenden, diffusen epigastrischen Schmerzen mit Inappetenz und Gewichtsverlust (11kg über 4 Monate) Ende April 2017 in einer auswärtigen Klinik vor. Die initiale Diagnostik zeigte einen Verdacht auf eine Raumforderung im Bereich des Pankreas. Der Patient wurde damit in die II. Medizinische Klinik am rechts der Isar verwiesen und nach Biopsie (22.06.2017), sowie der Diagnose eines Follikulären Lymphoms WHO Grad IIIb, Ann-Arbour IIeB und FLIPI II (27.06.2017) in die III. Medizinische Klinik verlegt. Der abdominelle Befall maß 13cmx16cm im CT (22.06.2017) im Bereich der Pankreasregion bei einer histologisch festgestellten Proliferationsrate von 50%. Im interdisziplinären Tumorboard wurde ein sechsmaliger Zyklus R-CHOP 21, ein Zwischenstaging mit CT nach drei Zyklen und

anschließender Rituximab Erhaltungstherapie für zwei Jahre beschlossen. Vor Therapiebeginn am 03.07.2017 erfolgte eine Vortherapie mit Prednisolon 100mg. In dem CT-Zwischenstaging (31.08.2017) zeigte sich das FL mit weitestgehend größenkonstantem Befund. Die Therapie wurde auf das R-DHAP Schema gewechselt mit Start am 05.09.2017, wobei Rituximab am Vortag schon appliziert wurde. Nach zwei Zyklen R-DHAP zeigte sich in der CT-Untersuchung am 12.10.2017 eine partielle Remission, sodass nach einem dritten Zyklus eine Stammzellmobilisierung und Stammzellsammlung geplant und durchgeführt werden konnte. Nach dem dritten Zyklus erfolgte am 13.11.2017 eine PET-CT mit dem Ergebnis einer weiterhin vitalen Lymphommanifestation (Deauville 5). Die Chemotherapie wurde am 15.11.2017 auf ein 4-tägiges R-ICE Schema umgestellt. In der CT vom 5.12.2017 wurde eine partielle Remission bei noch deutlichem Restbefund befundet. Vom 11.12.-14.12.2017 wurde der zweite Zyklus R-ICE (insgesamt der 8.Chemotherapiezyklus) verabreicht. Anschließend konnte eine Hochdosis R- BEAM Therapie von 11.01.-16.01.18 mit anschließender autologer Stammzelltransplantation am 18.01.2018 durchgeführt werden. Vom 20.01. bis zum 27.01.2018 wurde zur Stimulation und Regeneration des Blutbilds protokollgerecht G-CSF verabreicht. Im Anschluss an die Stammzelltransplantation wurde die Indikation zur perkutanen, fraktionierten Strahlentherapie (40Gy) mit Fokus auf die Region der ehemaligen Lymphommanifestation gestellt und in dem Zeitraum von 19.03.-18.04.2018 durchgeführt. Bis Januar 2020 zeigte sich in den bildgebenden Kontrolluntersuchen keine neue Lymphommanifestation.





*Abbildung 4-8: Abdomen Transversalschnitte Verlaufsbilder LYM03*

*A: Magnetresonanztomographie Abdomen Juni 2017, rund 11cm großer Lymphobulk*

*B: CT Abdomen August 2017, Nekrose mit Lufteinschlüssen bei mangelndem Regress*

*C: CT Abdomen Oktober 2017, Therapieansprechen bei weiterhin großem Lymphobulk*

*D: PET-CT November 2017, vitales Lymphomgewebe (Deauville 5) bei Größenregredienz*

*E: KM-CT Februar 2018, onkologische Befundverbesserung bei Größenregredienz*

### 4.3.2 NGS

An der Probe P01 wurde das NGS mittels Avenio Expanded Kit durchgeführt. Das Plasmavolumen der Probe betrug 3,1 ml bei einer Input DNA Menge von 50ng. Es wurde eine DNA Masse von 387ng beim NGS festgestellt und 82 SNV, sowie 3 CNV konnten detektiert werden. Nach Filterung hinsichtlich somatisch und pathogener Kriterien verbleibt die Punktmutation *TP53* (p.Val197Gly) mit einer initialen Allelfrequenz von 55% und einer Allelkonzentration von 22800 Kopien/Milliliter.

*TP53* (p.Val197Gly) wird bei COSMIC als somatisch und pathogen (FATHMM 0.99) gelistet. Es ist bei COSMIC in zwei Fällen von T-Zell Leukämien, aber bei keinem FL festgestellt worden. cBioPortal listet keinen Nachweis für diese Mutation bei lymphoiden oder hämatologischen Tumoren, wobei die Punktmutation als wahrscheinlich pathogen und als Hotspot-Mutation bezeichnet wird. Bei ClinVar ist keine sichere Angabe zwecks Pathogenität zu finden.

### 4.3.3 ddPCR

Die verbleibenden Proben wurden hinsichtlich des quantitativen und zeitlichen Verlaufs auf die Mutation *TP53* V197G mit einem ddPCR-Assay untersucht. Folgenden Volumina für das Blutplasma der entsprechenden Probe wurden in der Berechnung verwendet:

*Tabelle 4-8: Volumen Blutplasma Proben P01-P14*

Volumen (ml)	Probe	Volumen (ml)	Probe	Volumen (ml)	Probe	Volumen (ml)	Probe
3,5	P01	5,0	P05	4,0	P09	5,0	P13
4,0	P02	5,8	P06	4,0	P10	3,5	P14
5,0	P03	5,8	P07	4,0	P11		
6,0	P04	5,0	P08	5,0	P12		

Im Folgenden sind die Allelkonzentrationen und die Allelfrequenzen dieser Punktmutation graphisch dargestellt. Ausgehend von einer Allelkonzentration von rund 22800 Kopien/ml zeigt sich bei dem zweiten Probenzeitpunkt am Beginn des 2. Zyklus eine deutliche Abnahme von fast Faktor zehn auf einen Wert von rund 2300 Kopien/ml. Bis zum Zeitpunkt der Bildgebung

sieben Tage vor Ende des 3.Zyklus nimmt die Anzahl weiter ab auf Werte von rund 1200 Kopien/ml. Innerhalb von fünf Tagen steigt die Allelkonzentration zu Beginn des Therapieregimes mit R-DHAP wieder auf Werte von rund 2800 Kopien/ml an. Bereits zum 2. Zyklus R-DHAP ist die Anzahl von *TP53* (p.Val197Gly) mit weniger als 100 Kopien/ml detektierbar. Bis zum Zeitpunkt Ende Oktober ist die Mutation im Plasma nachweisbar. Erst ab dem Zeitpunkt bei Probe P08 am 16.11.2017 gelingt kein Nachweis der Punktmutation mehr. Bei allen verbleibenden Proben während der Therapie sowie im Nachbeobachtungszeitraum bis Juni 2019 konnte die Mutation *TP53*(p.Val197Gly) nicht mehr nachgewiesen werden bei klinischer und bildgebungstechnischer Remission des FL.

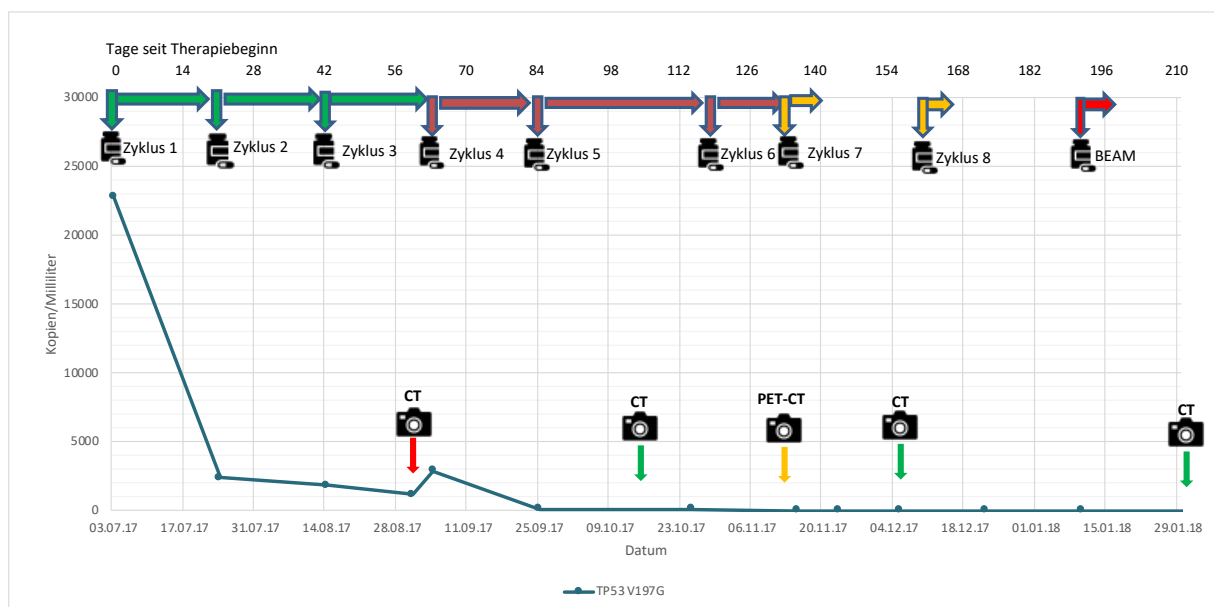


Abbildung-4-9: Verlauf der Allelkonzentration bei LYM03

Grüne horizontale Pfeile bezeichnen die initiale Therapie mit R-CHOP, lila Pfeile symbolisieren R-DHAP, gelbe horizontale Pfeile symbolisieren R-ICE, rote horizontale Pfeile BEAM, Kamerasymbole stehen für den Zeitpunkt der Bildgebungen, roter Pfeil symbolisiert ungenügendes bildmorphologisches Therapieansprechen, gelber Pfeil weiterhin aktive Lymphommanifestation, grün bildmorphologisches Therapieansprechen

Bei der Betrachtung der Allelfrequenz fällt auf, dass diese von einer initialen Allelfrequenz von rund 55% nach Abschluss des ersten Zyklus auf ein Niveau von rund 23% abfällt. Während des zweiten und dritten Zyklus fällt die Allelfrequenz nur unwesentlich weiter ab auf rund 20%, bevor die Allelfrequenz zum Zeitpunkt der Therapieumstellung auf R-DHAP einen Anstieg auf fast 30% erfährt. Nach Abschluss des ersten Zyklus R-DHAP ist ein deutlicher Abfall der

Allelfrequenz von *TP53* (p.Val197Gly) auf Werte <1% zu detektieren. Die Allelfrequenz ist Ende Oktober ein letztes Mal nachzuweisen und ab November 2017 bis Juni 2019 wurden Werte von 0% detektiert.

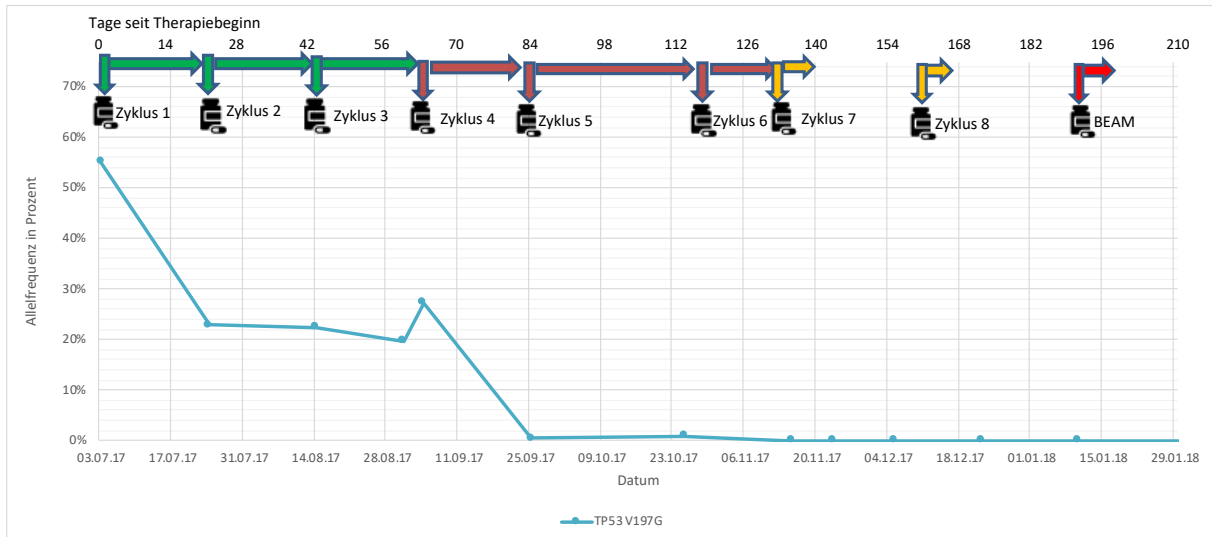


Abbildung 4-10: Verlauf der Allelfrequenz bei LYM03

Erklärung Symbole siehe Abbildung 4.7.

### ddPCR Ergebnisse NGS Bibliothek und Gewebeprobe

Mit dem ddPCR-Assay für *TP53* (p.Val197Gly) wurden die NGS Bibliothek und die DNA der Gewebebiopsie untersucht. Eine Allelfrequenz von 51% für P01 konnte aus der angereicherten Sequenzierungsbibliothek mit ddPCR bestimmt werden. Die Allelfrequenz liegt vier Prozentpunkte unter dem Ergebnis aus dem NGS. Die Punktmutation *TP53* (p.Val197Gly) konnte in der DNA, die aus der Gewebeprobe der Biopsie isoliert wurde, nachgewiesen werden. Aus beiden ddPCR Assays wurde eine mittlere Allelfrequenz für von 29,5% (Min. 27%, Max. 31,9%) bestimmt.

## 5 Diskussion

### 5.1 LYM01

#### Einordnung der nachgewiesenen Mutationen

Die Punktmutationen *TP53* (p.Arg273Leu) und *PDGFRB* (p.Thr140Met) können bei diesem Patienten als tumorspezifisch für das vorliegende DLBCL bezeichnet werden. Diese beiden Mutationen sind in der initialen Gewebebiopsie im November 2016, sowie während des gesamten Zeitraums des Rezidivs von September 2017 bis Ende März 2018 im Blut nachweisbar. Der kongruente graphische Verlauf der Allelfrequenz und Allelkonzentration, sowie eine positive Spearman Korrelation ( $r=0,84$ ) lassen vermuten, dass beide Mutationen einem gemeinsamen tumorösen Geschehen angehören. Aus dem quantitativen Verlauf aller detektierten Mutationen wird gefolgert, dass die Mutationen *TP53* (p.Arg273Leu) und *PDGFRB* (p.Thr140Met) die Haupttumorlast des DLBCL repräsentieren. Sie zeigen ein dynamisches Verhalten während der Behandlung und sind, im Gegensatz zu den Mutationen *PDGFRA* (p.Thr276Met) und *TP53* (p.Gly245Ser), mit hoher Allelfrequenz und Allelkonzentration im Blut über alle Probenzeitpunkte nachzuweisen.

Generell konnten Mutationen im Gen von *TP53* in rund der Hälfte der Fälle bei Rezidiven von DLBCL festgestellt werden, wobei die vorliegende Mutation *TP53* (p.Arg273) als Hotspotmutation beim DLBCL-Rezidiv bekannt ist und für Instabilität in der DNA-Bindedomäne von *TP53* verantwortlich zu sein scheint (Baugh, Ke, Levine, Bonneau, & Chan, 2018; Rushton et al., 2020). *TP53* (p.Arg273Leu) und *PDGFRB* (p.Thr140Met) werden bisher nicht in den genannten Datenbanken (COSMIC, ClinVar, cBioPortal) bei Patienten mit einem DLBCL gelistet, bekannt ist aber die allgemein maligne Assoziation von *TP53* (p.Arg273Leu) (FATHMM Score 1.0), sowie die Bezeichnung der Mutation *TP53* (p.Arg273Leu) in der Literatur als signifikante Hotspot-Mutation.

Ebenso als tumorspezifisch, sowie somatisch und pathogen sind beide Mutationen *FLT3* (p.Asp839Gly) und *FLT3* (p.Asp835His) einzuordnen. Sie werden als pathogen (beide FATHMM 0.99) und somatischen Ursprungs bezeichnet, sowie in allen drei verwendeten Datenbanken mit der Erkrankung einer AML assoziiert. Mutationen sind im *FLT3* Gen in rund 30 Prozent der Fälle bei AML vorhanden und die Mutation *FLT3* (p.Asp835His) scheint für die

dauerhafte konstitutive Aktivierung von Signalwegen verantwortlich zu sein (Kelly et al., 2002; Yamamoto et al., 2001). Für die Mutation FLT3 (p.ASP835His) sind bereits Resistenzmechanismen gegen den bei der Erkrankung verwendeten Thyrosinkinaseinhibitor Sorafenib bekannt (Baker et al., 2013).

FLT3 (p.Asp839Gly) hebt sich deutlich in Allelfrequenz und Allelkonzentration von FLT3 (p.ASP835His) ab, sodass vermutlich die beobachtbare Haupttumorlast zum Zeitpunkt der Diagnose der t-AML durch einen dominanten Klon mit der Mutation FLT3 (p.Asp839Gly) repräsentiert wird. Die Mutation FLT3 (p.ASP835His) könnte einem Subklon zugehörig sein, der möglicherweise unter dem Aspekt der Tumorevolution am Beginn der Selektion steht. Abschließend wird gefolgert, dass beide Mutationen der t-AML zugeschrieben werden können, aufgrund der in der Datenbank- und Literaturrecherche beschriebenen, spezifisch pathophysiologischen Assoziation zu einer AML bzw. t-AML.

Als nicht tumorspezifisch einzuordnen sind die Mutationen TP53 (p.Gly245Ser) und PDGFA (p.Thr276Met). Beide Mutationen sind während des gesamten Rezidivzeitraum nachzuweisen, allerdings mit deutlich niedriger Allelfrequenz (<1%) bzw. Allelkonzentration, insbesondere im Vergleich zu den dominierenden Mutationen. TP53 (p.Gly245Ser) wird als pathogen beschrieben und wurde bereits in Proben von Patienten mit DLBCL, sowie t-AML nachgewiesen. Für PDGFA (p.Thr276Met) gibt es keine genaue Einordnung zur Pathogenität, da einerseits die Mutation in DLBCL und AML bzw. MDS nachgewiesen werden konnte, andererseits sie aber als neutral (FATHMM 0.06) eingestuft wird. Während PDGFA (p.Thr276Met) in der initialen Gewebebiopsie nachgewiesen werden konnte, trifft dies für TP53 (p.Gly245Ser) nicht zu. Zwei mögliche denkbare Erklärungen für eine Interpretation und Einordnung sind wie folgt.

Zum einen lässt sich vermuten, dass beide Mutationen dem DLBCL zugeordnet werden können. Dies beruht auf der Annahme, dass die Tumorerheterogenität durch die Biopsie nicht vollumfänglich erfasst werden konnte. Es wurde bereits in der Literatur erwähnt, dass Gewebebiopsien nicht immer die gesamte genetische Landschaft des Tumors abbilden können, sodass ein fehlender Nachweis der Mutation von TP53 (p.Gly245Ser) im Gewebe nicht gleichzusetzen ist mit einem Nichtvorhanden-Sein dieser Mutation. Insofern kann nicht

ausgeschlossen werden, dass die Mutation TP53 (p.Gly245Ser) initial im DLBCL schon vorhanden war, auch wenn sie nicht in der ddPCR Gewebeprobe detektiert werden konnte. Eine mögliche weitere Interpretation zur Zuordnung der Mutationen ist das Konzept der CHIPs. Gegen die These spricht, dass die Mutation TP53 (p.Gly245Ser) entgegen der Definition von CHIPs mit einer Allelfrequenz von <2% über den gesamten Zeitraum des Rezidivs nachzuweisen ist und gleichzeitig während einer malignen Grunderkrankung detektiert wird. Andererseits scheinen die Mutationen über den gesamten Zeitraum durch ihre geringe Allelfrequenz nicht die Tumordynamik des DLBCL einzugreifen. Ein weiterer Aspekt für die Theorie zur Zuordnung zu CHIPs ist die Tatsache, dass eine t-AML im Verlauf des Rezidivs auftritt und CHIPs, unter anderem mit Mutationen in TP53-Gen, als Risikofaktor dafür beschrieben werden (Chen & Liu, 2019). Es konnten bereits Jahre vor dem Auftreten einer t-AML oder t-MDS Mutationen im Gen von TP53 in geringer Frequenz (0,003-0,07%) im Blut und Knochenmark detektiert werden, auch ohne Zusammenhang mit einer vorherigen Chemotherapie (Wong et al., 2015). Ein TP53 enthaltender CHIP Klon kann, muss aber nicht in die Entstehung von Leukämieklonen eingreifen (Suehara et al., 2019; Takahashi et al., 2017). Eine Interpretation ist, wie im vorliegenden Fall, erschwert, wenn Mutationen, wie TP53, sowohl in Lymphomen und CHIPs gleichermaßen vorkommen und während beider Erkrankungen nachgewiesen werden können.

Für PDFGRA (p.Thr276Met) liegt keine stichhaltige Assoziation in der Literatur zu CHIP vor. Ein weiterer Punkt für die Einordnung von TP53 (p.Gly245Ser) und PDFGRA (p.Thr276Met) als CHIPs ist der Nachweis von beiden Mutationen im Buffy-Coat der Proben. Dieser enthält DNA von Blutzellen, wie Leukozyten oder Thrombozyten. Beide Mutationen konnten in dem Buffy-Coat detektiert werden. Dennoch kann abschließend nicht eindeutig geklärt werden, ob die Mutationen TP53 (p.Gly245Ser) und PDFGRA (p.Thr276Met) Teil des DLBCL im Sinne nichtdominanter Subklone sind oder CHIPs.

Eine Zuordnung von *KRAS* (p.Gly13Asp) zu als tumorspezifisch ist nicht gegeben, da die Mutation zwar in der Gewebebiopsie zu detektieren ist, in keinem der ddPCR bzw. NGS Proben nachgewiesen werden konnte. Ebenso stehen die bisher noch nicht genannten Mutationen in keinem direkten Zusammenhang mit der Erkrankung des DLBCLs und der t-AML. Sie werden zwar teilweise als pathogen beschrieben, jedoch sind die Mutationen in

geringer Allelfrequenz jeweils nur an einzelnen, spezifischen Zeitpunkten nachzuweisen. Dies steht im Gegensatz zu den Lymphom-assoziierten Mutationen, die über den gesamten Zeitpunkt nachzuweisen waren. Eine Vermutung wäre, dass diese Mutationen jeweils Subklonen mit sehr geringer Frequenz angehören. Diese werden im Rahmen der Tumorevolution gebildet, gehen vermutlich aufgrund eines fehlenden Selektionsvorteils wieder zugrunde und nehmen so nicht direkt Einfluss auf das Krankheitsgeschehen.

### **Quantitativer Verlauf**

Zur Beurteilung der Mutationslast und in Zusammenschau mit der Klinik des Patienten wurde die Allelfrequenz und die Allelkonzentration graphisch gegenüber dem zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Ergebnisse zeigen einen dynamischen Verlauf während des Erkrankungszeitraums. Nach Diagnose des Rezidivs zeigt sich ein steiler Anstieg der beiden dominierenden Mutationen *TP53* (p.Arg273Leu) und *PDGFRB* (p.Thr140Met) bis zum Beginn der medikamentösen Therapie. Obwohl die Allelfrequenz zum Zeitpunkt bei Probe P02 fällt, wird dieser Zeitraum als Progress gewertet, da die Allelkonzentration beider Mutationen im Vergleich zu Zeitpunkt P01 enorm angestiegen sind. Die Allelfrequenz nimmt ab, da trotz des Anstiegs in der Allelkonzentration im Verhältnis deutlich mehr Wildtyp-DNA als ctDNA nachgewiesen wird.

Bei Beginn der medikamentösen Therapie (P03) sind die Allelkonzentrationen beider Mutationen in deutlich niedrigerer Anzahl nachzuweisen. Dass dieser Abfall ohne medikamentöse Therapie auftritt, könnte mit dem gleichzeitigen Vorhandensein von mehreren Subklonen zu erklären sein, die jedoch nicht mit dem verwendeten Gen-Panel erfasst werden konnten. Subklone können gegenseitig im Rahmen einer Tumorevolution entstehen. Sie beeinflussen gegenseitig durch ihr Wachstum und ihre Vermehrung die Allelfrequenz und Allelkonzentration im Blut, sodass ein Anstieg oder Abfall der Mutationen auch ohne äußere Einflüsse wie Chemotherapie denkbar wäre.

Die Allelkonzentration von *TP53* (p.Arg273Leu) und *PDGFRB* (p.Thr140Met) steigt über den ersten Immunochemotherapiezyklus noch leicht an, bevor sie im Verlauf des zweiten Zyklus auf Werte im Bereich der initialen Proben abfällt. Die Beobachtung, dass WT und Mutationen über alle Zeitpunkte während des zweiten Zyklus abnehmen, wird gleichsam als partielles



Therapieansprechen auf die ICT gewertet, da die Mutationen nicht vollständig aus dem Blut verschwinden und im Wertebereich zum Rezidivzeitpunkt detektierbar sind. In der Literatur konnte für vollständiges Therapieansprechen mit guter Prognose nach zwei Chemotherapiezyklen eine signifikante Reduktion bis fehlender Nachweis der tumorspezifischen Mutationen beobachtet werden, sodass in diesem Fall von partiellem Ansprechen gesprochen wird (Kurtz et al., 2018).

Klinisch wurde nach Ende des 2.Zyklus eine Neutropenie festgestellt, sodass der Start des dritten Zyklus um 8 Tage verschoben werden musste. Dieser Therapieverzögerung wird der anschließende Anstieg der Allelkonzentration und Allelfrequenz in den beiden darauffolgenden Proben P09 bzw. P010 zugeschrieben und dementsprechend als Tumorprogress gesehen. Der steile Anstieg von Allelkonzentration und Allelfrequenz findet im 3. Zyklus seinen Höhepunkt und im Verlauf der nächsten Zyklen sinken die Werte wieder. Die Allelfrequenz bleibt für zwischen den Proben P012 bzw. P013 auf relativ hohem Niveau konstant, während die Allelkonzentration sich dem Bereich der vormalig niedrig gemessenen Werten annähert. Diese hohen Werte in der Allelfrequenz von größer 50% von *TP53* (p.Arg273Leu) konnten bereits bei therapieresistenten DLBCL nachgewiesen werden und werden als zunehmender Verlust des Wildtyps unter Selektionsdruck aufgrund einer Immunochemotherapie gewertet (Morin et al., 2016). Der Anstieg auf hohe Werte in der Allelfrequenz und Allelkonzentration in der Zeit der Therapieunterbrechungen und der darauffolgende mangelnde Abfall wird als zunehmender Selektionsdruck, sowie daraus resultierendes mangelhaftes Therapieansprechen gewertet.

Beim letzten Zeitpunkt ist die Allelkonzentration der beiden Mutationen wieder auf Werte im Bereich des Ausgangsniveaus und die Allelfrequenz auf Werte im niedrigen einstelligen Bereich gefallen. Dies wird nicht einem Therapieansprechen zugeschrieben, sondern es wird vermutet, dass das gleichzeitige Auftreten der t-AML die Tumorlast des DLBCL Klon im Blut enorm beeinflusst hat. Ausgehend vom hohen Niveau der Allelfrequenz bei P013 fällt diese zur nächsten Probe dramatisch ab. Dies einem Ansprechen der Therapie trotz einer erneuten Therapieverzögerung bei der Immunochemotherapie zuzuschreiben, scheint nicht plausibel.

### **Konkordanz mit der Bildgebung**

In Zusammenschau von LB und der Bildgebung ist für die CT Untersuchung im September und die PET-CT Untersuchung im Oktober 2017 eine Konkordanz zu sehen, da beide Bildgebungen zu dem jeweiligen Zeitpunkt einen Progress der Erkrankung diagnostizieren und sich dies mit der Interpretation der Ergebnisse der LB deckt. Anfang Januar 2018 ist eine Diskrepanz zwischen dem Anstieg der ctDNA im Blut gegenüber der Beurteilung des PET-CTs festzustellen. Der Befund der PET-CT zeigt zwar einen Progress im Sinne einer Größenzunahme der tumorösen Raumforderung am Milzhilus (Zunahme von 8,5 x 9,4 cm auf 14 x 11 cm), die PET Komponente sieht jedoch einen verringerten Glucosemetabolismus, sodass in der abschließenden Befundbeurteilung von einer Befundverbesserung gesprochen wird. In Zusammenschau mit der LB wird gedeutet, dass LB einen früheren Hinweis auf den Tumorprogress gibt, da bereits 14 Tage vor Bildgebung ein eindeutiger Anstieg in Allelfrequenz und AZ detektierbar ist. Es wird suggeriert, dass LB ein besseres Bild über den aktuellen Zustand der Erkrankung in der Situation einer Therapieverzögerung abbilden kann als die Bildgebung. Gründe hierfür liegen in der kurzen Halbwertszeit der ctDNA, sowie der theoretischen Möglichkeit der tagesaktuelle Beobachtung einer Tumordynamik durch repetitive Blutentnahmen gegenüber der bildgebenden Diagnostik, welche erst im Abstand von mehreren Wochen erneut durchgeführt werden kann. Eine Korrelation von ctDNA Spiegel und LDH konnte nicht festgestellt werden, weder graphisch noch statistisch.

### **Überprüfung Assays**

Sowohl die Testung der Assays mittels g-blocks, cDNA, gDNA und H<sub>2</sub>O zeigten kein unspezifisches Bindungsverhalten oder Auffälligkeiten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Assays funktionierten und die Ergebnisse valide erscheinen.

## 5.2 LYM02

### Einordnung der nachgewiesenen Mutationen

*TP53* (p.Arg280Ser) und *PTEN* (p.Arg335\*) sind bei diesem Patienten im NGS die dominierenden Mutationen im untersuchten Blut. Beide Mutationen lassen sich in ausreichend hoher Frequenz ( $\geq 20\%$ ) nachweisen, sodass sie im Vergleich zu den Mutationen mit deutlich geringerer Allelfrequenz bzw. Allelkonzentration die detektierbare Haupttumorlast am besten widerspiegeln und daher als dominierende Mutationen bezeichnet werden können. Aufgrund ihrer Pathogenität bzw. onkogenen Potentials (FATHMM 0.87 bzw. 0.9) und der Tatsache, dass diese beiden Punktmutationen bereits in Patientenproben eines DLBCLs nachgewiesen wurden, werden sie als tumorspezifisch für das DLBCL des Patienten gewertet. Sie sind mit einer annähernd gleichen Allelfrequenz und Allelkonzentration aus dem Blut nachzuweisen, sodass davon ausgegangen wird, dass diese beiden Mutationen dem gleichen Klonalität zuzuordnen sind.

*APC* (p.Arg564\*) und *EZH2* (p.Tyr646Asn) werden als pathogen und somatisch beschrieben, wobei *EZH2* häufig bei NHL, insbesondere FL und DLBCL, nachgewiesen wurde, wohingegen für *APC* bisher kein Bezug hinsichtlich NHL recherchiert werden konnte. Da diese Mutationen in sehr geringer Allelfrequenz ( $<0,3\%$ ) und einer knapp zweistelligen Anzahl Kopien pro Milliliter detektiert wurden, repräsentieren sie nicht die Haupttumorlast zum Zeitpunkt des Probenzeitpunkts P01. Obwohl Mutationen im Gen *EZH2* häufig (in rund 80 Fällen) in anderen NHL bisher detektiert werden konnten, ist diese Mutation zum Zeitpunkt der Probe P01 nicht direkt in das maligne Hauptgeschehen um das DLBCL einzuordnen. Im Hinblick auf das Konzept der heterogenen Tumorevolution sind diese Mutationen vermutlich mit Subklonen assoziiert.

Mutationen in *PTEN* und *EZH2* können häufig bei GCB DLBCL festgestellt werden, welche generell eine bessere Prognose aufweisen als ABC DLBCL (M. Roschewski, Dunleavy, & Wilson, 2014). Da beide Mutationen im NGS detektiert wurden, ist das DLBCL der Patientin vermutlich einem GCB Typ zuzuordnen, wobei diese Vermutung aufgrund fehlender Untersuchung hinsichtlich Typeneinteilung nach Hans et. al. in der Pathologie nicht final bestätigt werden kann.

Ein definitiver möglicher diagnostischer und therapeutischer Mehrwert hinsichtlich zu empfehlender Therapie, bekannter Medikamentenresistenzen oder möglicher Prognoseassoziation dieser spezifischen Punktmutationen konnte während der Recherche in den genannten Genomdatenbanken nicht festgestellt werden.

### **Quantitativer Verlauf**

Zur Beurteilung der Mutationslast und in Zusammenschau mit dem klinischen Bild der Patientin wurde in dem Ergebnisteil die Allelkonzentration graphisch gegenüber dem zeitlichen Verlauf und der erhaltenen Therapie dargestellt. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Mutationen, fällt zwischen P01 und P02 ein enormer Abfall der Allelfrequenz bzw. Allelkonzentration der initial dominierenden Mutationen *TP53* (p.Arg280Ser) und *P TEN* (p.Arg335\*) auf. Dieser starke Abfall innerhalb von 14 Tagen wird dem Erhalt einer Vorphasetherapie mit Rituximab, Prednisolon und Cyclophosphamid zugeschrieben. Nach Ende des 1.Zyklus R-CHOP bei Probe P03 konnte keine der initialen Mutationen mit der ddPCR nachgewiesen werden. Der fehlende Nachweis der Mutationen nach Ende des ersten Zyklus ist als deutliches Therapieansprechen zu deuten. Ein fehlender Nachweis der initialer Mutationen nach zwei Chemotherapiezyklen zeigt ein deutlich besseres, Progress-freies 5-Jahresüberleben als bei Patient\*innen mit Nachweis von ctDNA nach zwei Zyklen (Mark Roschewski et al., 2015). Ein derartiger Abfall innerhalb der ersten zwei Zyklen auf die erhaltene Therapie spricht für eine molekulares Ansprechen, wobei für diese Patient\*innen ein gutes Therapieansprechen und besseres 24-Monats Outcome beschrieben wurde (Kurtz et al., 2018).

### **Vergleich Bildgebung, Biopsie und Labor**

Bei der Patientin liegt eine Konkordanz zwischen LB und den Befunden der Bildgebung vor. Der fehlende Nachweis der ctDNA liefert für LB bereits nach Ende des 1.Zyklus deutliche Hinweise auf ein Therapieansprechen. Die Bildgebung kam zu dem gleichen Ergebnis in der Kontroll-CT nach 3 Monaten, sodass LB hier schon früher einen Hinweis geben konnte. Bis zum Ende aller Chemotherapiezyklen Ende Oktober 2017 ist in der Bildgebung ein deutliches Therapieansprechen zu sehen, welches sich auch in der LB mit weiterhin fehlendem Nachweis der Mutationen zeigt. Ein doppelt negativer Nachweis in LB und Bildgebung spricht für eine

gute Prognose (Kurtz et al., 2018). In Zusammenschau aller Bildgebungen bestätigt sich bildmorphologisch und hinsichtlich des ctDNA Verlauf das deutliche Therapieansprechen. In Eintracht stehen die Ergebnisse aus LB und der Bildgebung mit der Klinik der Patientin, da im Hinblick auf beobachtete Therapieansprechen der Patientin eine Rezidivfreiheit bis zum Ende des Nachbeobachtungszeitraums zwei Jahre später aufgetreten ist.

Eine Bestätigung bzw. der konkordante Nachweis der Mutationen im Tumorgewebe war nicht möglich, da die DNA aus den histologischen Proben zum Zeitpunkt der Durchführung der ddPCR Assays bereits anderweitig komplett verwendet wurde. Eine Korrelationsanalyse zwischen ctDNA und LDH konnte nicht durchgeführt werden, da die ctDNA nach zwei Proben nicht mehr nachweisbar war.

### **Überprüfung Assays**

Sowohl die Testung der Assays mittels g-blocks, cDNA, gDNA und H<sub>2</sub>O zeigten kein unspezifisches Bindungsverhalten oder Auffälligkeiten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Assays funktionieren und die Ergebnisse valide erscheinen. Die Mutationen sind nicht im Buffy Coat in der ddPCR festgestellt worden.

## **5.3 LYM03**

### **Einordnung der nachgewiesenen Mutationen**

Bei diesem Patienten mit Follikulärem Lymphom ist nach NGS Analyse mit dem Avenio Expanded Kit und Filterung einzig die Mutation *TP53* (p.Val197Gly) als somatisch festgestellt worden. Die Datenbanken befinden die Mutation als somatisch und pathogen (FATHMM 0.99). Obwohl diese Punktmutation bisher noch nicht in Proben von FL nachgewiesen wurde, wird in diesem Fall *TP53* (p.Val197Gly) als tumorspezifisch für das FL angesehen. Begründet wird dies mit dem Nachweis der Mutation mittels ddPCR Assay aus der Gewebeprobe des FL. *TP53* (p.Val197Gly) konnte in der Gewebebiopsie zwar mit einer geringeren Allelfrequenz (rund 30%) als im Blut detektiert werden, aber der Nachweis an sich gilt als Bestätigung für die Tumorspezifität. Dass für die Allelfrequenz niedrigere Werte detektiert werden als im Blut könnte an dem Zeitpunkt der Probengewinnung liegen, da die Biopsie rund 11 Tage vor der

ersten Blutprobe entnommen wurde und das Tumorwachstum in der Zwischenzeit bis zur Blutentnahme bzw. zum Start der Chemotherapie fortschreiten konnte. Ebenso wäre es denkbar, dass die Biopsie nicht die Gänze des Tumors abbildet und der Wert in der Biopsie falsch niedrig ist.

### **Quantitativer Verlauf**

Zur Beurteilung der Mutationslast und in Zusammenschau mit dem klinischen Bild des Patienten wurde in dem Ergebnisteil die Allelfrequenz und die Allelkonzentration graphisch gegenüber dem zeitlichen Verlauf, sowie der erhaltenen Chemotherapien dargestellt. In den ersten drei Zyklen R-CHOP 21 nimmt die Allelfrequenz und Allelkonzentration der Punktmutation *TP53*(p.Val197Gly) deutlich ab, insbesondere über den Zeitraum des 1.Zyklus. Dies wird als partielles Therapieansprechen mit initial gutem Ansprechen gewertet. Der weitere Verlauf wird als Stagnation des Regresses und beginnendem Progress am Ende des dritten Zyklus interpretiert, da auf die deutliche Abnahme der Allelfrequenz und vor allem der Allelkonzentration im Zeitraum des 1.Zyklus die Allelfrequenz auf einem Niveau von >20% stabil bleibt, ohne dass es zu einem weiteren Abfall kommt. Im Vergleich mit der Allelkonzentration relativiert die Allelfrequenz den Abfall, da zwar deutlich weniger ctDNA und WT detektiert wird, die ctDNA aber immerhin noch einen Anteil von etwas mehr als 20 Prozent an der gesamten cfDNA der spezifischen Stelle einnimmt. Die Interpretation des Progresses begründet sich mit dem Anstieg der Allelfrequenz und Allelkonzentration in letzten Tagen des 3.Zyklus R-CHOP (31.08. – 04.09.2017).

In den anschließenden Zyklen R-DHAP ist gleich dem R-CHOP Schema in der Allelfrequenz und Allelkonzentration von *TP53* (p.Val197Gly) ein initial sehr deutlicher Abfall mit im Verlauf auf niedrigem Niveau persistierendem Nachweis der Mutationen zu beobachten. Diese Befunde werden als partielles Therapieansprechen gewertet, da die ctDNA während des neuen Therapieregimes zwischen Probe P05 und P06 deutlich sinkt, aber bei Probe P07 einen Monat später weiterhin nachweisbar ist.

In der PET-CT vom 13.11.2017 wurde der Verdacht einer weiterhin aktiven Lymphommanifestation bei Größenregredienz gestellt (Deauville 5). Zwei Tage später am Tag des neuen Chemotherapieschemas mit R-ICE gelang kein Nachweis von *TP53* (p.Val197Gly)

in der ddPCR. Eine Erklärung könnte die Existenz weiterer Klone bzw. deren Mutationen sein, welche durch das initial verwendete Gen-Panel nicht erfasst wurden bzw. sekundär im Verlauf im Rahmen einer Tumorevolution entstanden sein könnten. Da keine Voraufnahmen für die PET-CT als Vergleich vorliegen und keine Blutprobe an dem Tag der PET-CT abgenommen wurde, ist eine abschließende Einordnung nicht möglich ist.

Im weiteren Verlauf während des 2.Zyklus R-ICE, sowie nach BEAM und Radiotherapie bis Juni 2019 konnte die Mutation *TP53* (p.Val197Gly) in den restlichen sieben Plasmaproben P08 bis P15 durch ddPCR nicht mehr detektiert werden, was als komplettes Therapieansprechen im Hinblick auf die ursprünglich nachzuweisende Mutation bzw. den zugeordneten Klon zu werten ist.

### **Vergleich Bildgebung**

In Bezug auf eine Konkordanz zwischen LB und der Bildgebung kann gesagt werden, dass im vorliegenden Fall Bildgebung und LB Befunde zur Beurteilung des Therapieansprechens während der Therapie größtenteils übereinkommen. Ausgenommen davon ist der uneinheitlichen Befunde von LB und PET-CTs im November 2017, bei dem einerseits im PET-CT der Verdacht auf vitale Lymphommanifestation festgestellt wird, während zwei Tage später keine ctDNA mehr nachzuweisen war. Der Patient zeigte anschließend das klinische Bild einer Rezidivfreiheit bei fehlendem Nachweis der initialen ctDNA durch LB bis Juni 2019 und negativer Bildgebung bis einschließlich April 2020.

### **Überprüfung Assays**

Sowohl die Testung der Assays mittels g-blocks, cDNA, gDNA und H2O zeigten kein unspezifisches Bindungsverhalten oder Auffälligkeiten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Assays funktionieren und die Ergebnisse valide erscheinen.

## 5.4 Limitationen und Verbesserungen

### **Datenerhebung**

Kritisch bei der Datenerhebung ist anzumerken, dass die Blutentnahmen bzw. die Generierung von Proben für Studienzwecke nicht an einer zentralen Stelle, sondern aufgrund der unterschiedlichen Zuständigkeit bzw. multidisziplinäre Involvierung der Fachdisziplinen in den jeweiligen Abteilungen abgenommen wurden. Neben der Hämatologischen Ambulanz, dem Tumor-Therapiezentrum und der Hämatologischen Station am Klinikum rechts der Isar, ist ebenso die Radiologie und die Nuklearmedizin bei der Behandlung und Betreuung von Patienten\*innen involviert. Kommt es so zur Nichtabnahme von Probenröhrchen, wird die Beurteilung und Aussagekraft der Daten erschwert, da bei fehlender Blutentnahme am Tag der Bildgebung Aussagen hierzu nicht oder nur eingeschränkt möglich sind. Für Patienten\*innen, die nicht in München wohnhaft sind, war insbesondere die Datenerhebung für die Zeit der follow-up Termine problematisch, da einige Bildgebungen extra domum in der Nähe des Wohnortes stattgefunden haben. Ein Befundbericht darüber ist zwar in der Akte vermerkt, Blutentnahmen zur ctDNA Analyse werden außerhalb des Universitätsklinikums nicht gewonnen. Für zukünftige Studien und Untersuchungen wäre es wünschenswert, wenn die Kommunikation, besonders auf elektronischem Wege, erleichtert werden würde. Die Einordnung der klinischen Daten wird dadurch erschwert, dass es derzeit keine zentrale, elektronische Patientenakte gibt, sondern alle Befunde und Untersuchungen in ein oder mehreren Akten gesammelt werden.

### **Limitationen im Vergleich von ddPCR und NGS**

DdPCR und NGS Ergebnisse konnten nach Umrechnung miteinander in einen Kontext gesetzt werden und der zeitliche Verlauf mit initialem NS und nachfolgender ddPCR dargestellt werden. Ein Vergleich zum selben Zeitpunkt bzw. der Ergebnisse der gleichen Probe war nicht möglich. Das NGS benötigt die gesamte Plasmamenge des Probenröhrchens für den jeweiligen Zeitpunkt, sodass kein Material für eine anschließende ddPCR bereitstand, um die AZ und die Allelfrequenz der entsprechenden Mutationen in der ddPCR und dem NGS vergleichen zu



können. Als zukünftige Verbesserung wäre die Überlegung, zwei statt ein 10ml-EDTA fassendes Probenröhrchen abzunehmen, um genügend Probenmaterial zu asservieren.

### **Zeitfaktor für Implementierung in den klinischen Alltag**

Für den routinemäßigen klinischen Einsatz ist derzeit noch der lange Zeitraum limitierend von der Blutentnahme bis zu den abschließenden Ergebnissen eines NGS bzw. die Erstellung und Durchführung eines ddPCR Assays. Die NGS Untersuchung für sich nimmt aufgrund technischer Gegebenheiten einen Zeitraum von drei Tagen in Anspruch. Die anschließende Auswertung der Daten nimmt, ebenso wie das Konstruieren eines neuen ddPCR Assays im Optimalfall einen Tag in Anspruch. Initial nach Bestellung der ddPCR Assay vergehen derzeit bis zur Lieferung der ddPCR-Assays durchschnittlich 14 bis 21 Tagen. Die Durchführung und Auswertung der ddPCR dauern unter optimalen Bedingungen zwei bis drei Tage. Final kann gesagt werden, dass derzeit frühestens einen ganzen Monat nach initialem NGS die ersten ddPCR Assays durchgeführt werden konnten und Ergebnisse vorlagen. Dies trifft für Mutationen zu, bei denen bisher noch kein ddPCR-Assay vorhanden ist. Werden im NGS Mutationen nachgewiesen, bei denen in der Arbeitsgruppe schon ein entsprechender ddPCR-Assay vorhanden ist, kann die ddPCR gleich im Anschluss an die Auswertung der NGS Ergebnisse durchgeführt werden. Dabei muss bedacht werden, dass unter Umständen die Bestellung und Lieferung von Primer und Sonden anderer Mutationen ausstehen, sodass dies die klinische Aussagekraft der Teildaten limitiert.

Insofern in der Theorie zwar die Option eines „Echtzeitmonitorings“ mit LB aufgrund der HWZ von rund 30 min von ctDNA besteht, ist dies in der Praxis derzeit weit entfernt. Im Optimalfall, falls ein Assay bereits vorhanden ist, vergehen zur Ausführung und finalen Auswertung noch mehrere Tage. Sollten sich diese Prozesse automatisieren lassen, sowie die Assays nicht neu konstruiert und bestellt werden müssen, ist ein Monitoring mit Ergebnissen in wenigen Tagen vorstellbar.

### **Ökonomische Limitationen**

Die Durchführung repetitiver NGS mit dem Avenio Expanded Kit ist derzeit ein starker Kostenfaktor, da ein einzelnes NGS mit Material- und Personalkosten von rund 1200 Euro pro

Probe enorme Kosten verursacht, sodass derzeit eine Verlaufsbeobachtung von cfDNA über einen Zeitraum mit mehreren Proben mit einem fünfstelligen Eurobetrag ins Gewicht fallen kann. Das in der Arbeit verwendete Konzept des initialen NGS mit anschließender Fokussierung auf „Regions of Interests“ ist ein Ansatz, die Kosten zu reduzieren und sich auf die tumorspezifischen Mutationen zu fokussieren. Anstatt zu jedem Zeitpunkt einer Blutentnahme eine teure Sequenzierung mit NGS anzuordnen, wird ein Schwerpunkt auf bestimmte Gene gelegt, da die Ziel-DNA im Vergleich zu NGS durch die kostengünstiger ddPCR untersucht werden kann (Frontzek, 2015, pp. 134,190). Ein ddPCR Assay für eine spezifische Mutation kostet rund 20 Euro, Bestellung und Durchführung inkludiert. Sollen beispielweise fünf Mutationen im Blut mittels ddPCR detektiert werden, würden Personal und Materialkosten von rund 100 Euro für alle fünf ddPCR Assays zusammen fällig werden.

#### **Limitationen verwendeter Methoden**

Das verwendete NGS-Panels untersuchte 77 Gene, die im Allgemeinen bei häufigen Tumorerkrankungen mutiert sind, sodass das NGS nicht die Gänze des Tumors abbildet. Im Optimalfall, Geld und örtliche Gegebenheiten außen vorlassend, würde ein whole-genome Sequencing kompletten Aufschluss Mutationen im Tumorgewebe, ctDNA im Blut und hinsichtlich der Heterogenität der Tumorlandschaft geben.

Hinsichtlich Validität gilt es die derzeit unterschiedlichen Methoden von LB und die Ergebnisse in einen gemeinsamen Rahmen zu setzen, sowie in großen Studien zu untersuchen und eine valide Datengrundlage zu schaffen, sodass im weiteren Verlauf eine Implementierung in den klinischen Alltag erfolgen kann. In dem vorliegenden Projekt ist eine abschließende Angabe einer Gesamtvalidität nicht möglich, da alle Störfaktoren von der Blutentnahme, über Probenaufbereitung, NGS und ddPCR Abläufen sich nicht komplett erfassen lassen.

## 5.5 Abschließende Beurteilung

### **Qualitative Untersuchungsschwerpunkte**

Mit dem NGS durch das Avenio Expanded Kit konnten bei jedem Patienten Keimbahn-assoziierte und somatische Mutationen detektiert werden. Durch Datenbankrecherche konnten die Punktmutationen hinsichtlich ihrer Pathogenität, eines bereits erfolgten Nachweises und möglicher Assoziation zur jeweiligen Tumorerkrankung eingeordnet werden. Es konnten tumorspezifische Mutationen für NHL und t-AML, sowie CHIP Mutationen und somatische Mutationen ohne direkten Bezug zu den Malignomen festgestellt werden. Die Tumorspezifität einzelner Punktmutationen konnte mit den Untersuchungen der ddPCR Assays aus der DNA der initialen Gewebeproben, sowie im Falle der CHIPs aus dem Buffy coat bestätigt werden. Es konnten mehrere Punktmutationen detektiert werden, die im Zusammenhang mit dem vorliegenden tumorösen Geschehen stehen und die bisher nicht in den genannten Datenbanken in Vergleichsproben der entsprechenden Tumore nachgewiesen und gelistet wurden.

Es gelang die Detektion von Punktmutationen mit bekannter Assoziation hinsichtlich einer vorhandenen Medikamentenresistenz, sowie andererseits von Mutationen, für die ein möglicherweise gutes Ansprechen auf ein vorgeschlagenes Chemotherapieregime bekannt ist, wobei derzeit keine ausdrückliche Empfehlung für den klinischen Einsatz vorhanden ist. Insofern sind die Informationen bezüglich nachgewiesener Punktmutationen und klinisch therapeutischer Relevanz derzeit limitiert.

Im Falle eines Rezidivs konnten die durchgeführten NGS Untersuchungen Subklone detektieren. Repetitive NGS Untersuchungen zeigen einen Einblick in die Tumorevolution und Subklonselektion, wobei das in der Arbeit verwendete Panel nur ein kleines Spektrum mit 77 zu untersuchenden Genen abbildet. Sinnvoll erscheint ein repetitives NGS vor allem in Situationen von unzureichendem Therapieansprechen bzw. -verzögerungen, sodass mögliche Subklone oder neu selektierte Klone rechtzeitig erkannt werden können, wobei sich insbesondere ein breiteres Gen-Panel oder ein whole-genome-Sequencing anbieten würden.

### **Quantitative Untersuchungsschwerpunkte**

Ein zeitlicher und quantitativer Verlauf der ctDNA konnte mit den ddPCR Assays erstellt werden. Indem die Allelfrequenz und die Allelkonzentration getrennt voneinander aufgetragen wurden, konnte ein differenziertes Bild von der Tumordynamik dargestellt werden. Für LB scheint eine Beurteilung der Werte von Allelfrequenz und Allelkonzentration in Zusammenschau miteinander daher sinnvoll. Der Verlauf der Allelfrequenz und Allelkonzentration konnte in den Zusammenhang mit der Klinik des jeweiligen Krankheitsfalles gesetzt werden, sodass LB in Zukunft wertvolle Informationen bei noch fehlender Möglichkeit eines adäquaten Therapiemonitorings bei NHL liefern könnte. Durch LB konnte eine Tumordynamik hinsichtlich eines vollständigen oder nur unzureichenden Therapieansprechens dargestellt werden, ebenso ein neu auftretender Progress. Ein gutes Therapieansprechen, ebenso wie ein ausbleibender Therapieerfolg konnte in den beschriebenen Patientenfälle mittels LB beobachtet werden und in Zusammenhang mit bisherigen wissenschaftlichen Veröffentlichungen gesetzt werden. Insbesondere für klinisch schwierig zu bewertende Zeiträume, wie Therapieverzögerungen durch Nebenwirkungen der Chemotherapie oder diskrepante Befunde in der Bildgebung konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden, dass LB sinnvoll die klinische Beurteilung des Falles um wichtige Aspekte ergänzen kann. Eine Korrelation von tumorspezifischen Mutationen und LDH-Werten konnte bei den vorliegenden Daten nicht beobachtet werden.

## 6 Ausblick

Für weitere Studien am Klinikum rechts der Isar hinsichtlich NHL und LB liegen mittlerweile die entsprechenden Werkzeuge und Tools zur zeitnahen Auswertung vor, sowie die bestehende Erfahrung. In dieser Arbeit wurden generell breite Untersuchungsschwerpunkte gewählt, sodass in zukünftigen Studien einzelne Bereiche wie beispielsweise Verlauf der Tumorlast bei Therapieverzögerungen oder Whole-genome Sequencing bei fraglichem, mangelhaftem Therapieansprechen fokussiert und eingehend tiefer untersucht werden könnten. Besonders der Aspekt dieser Arbeit hinsichtlich des Nachweises von CHIP während eines NHL und des damit verbundenen Risikos einer sich unter Chemotherapie entwickelnden sekundären AML verdient weitere Aufmerksamkeit. Ebenso erscheint ein Bündeln der Zuständigkeiten und Aufgabenbereiche sinnvoll, da die Arbeit auf die perfekte Zusammenarbeit von bis zu fünf klinischen Fachabteilungen angewiesen war.

Um die klinische Implementierung des revolutionären Potential von LB voranzutreiben, sind in Zukunft eine Validierung und Standardisierung ebenso erforderlich wie eine Überwindung der derzeitigen ökonomischen Limitationen. Ist die klinische Implementierung und Validierung erfolgt, so ist ein Einsatz von LB im molekularen Tumorboard vorstellbar, um zum einen Informationen hinsichtlich der molekularen Landschaft sowie das beispielweise das Vorhandensein von Hotspot-Mutationen, fraglichen Medikamentenresistenzen oder gar der mit den Mutationen assoziierten Prognose zu liefern. Zum anderen ist der Einsatz im Tumorboard denkbar hinsichtlich Therapiemonitoring bzw. -ansprechen sowie insbesondere bei therapieassoziierten Verzögerungen denkbar.

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: IPI Score und Prognose.....	13
Tabelle 1-2: Deauville-Score.....	16
Tabelle 3-1: Untersuchte Parameter der Serumchemie .....	44
Tabelle 3-2: LNA-modifizierte Kopien mit entsprechender Schmelztemperatur Tm in °C .....	62
Tabelle 3-3: Beispiel von zwei Produkten mit Schmelztemperatur und Homodimereigenschaften .....	63
Tabelle 3-4: Mögliche Interaktionen der Sonden und Primer untereinander bei der Testung auf Heterodimereigenschaften .....	65
Tabelle 4-1: Ergebnisse Avenio Kit von Patient LYM01 .....	78
Tabelle 4-2: Ergebnisse Avenio Kit NGS zu somatischen Mutationen von Patient LYM01...	80
Tabelle 4-3: Volumen Blutplasma Proben P01-P014 .....	86
Tabelle 4-4: ddPCR Assays initiale Biopsie und Buffy coat.....	89
Tabelle 4-5: Spearman Test .....	90
Tabelle 4-6: Mutationen im NGS LYM02 .....	93
Tabelle 4-7: Volumen Blutplasma Proben P02-P08 .....	94
Tabelle 4-8: Volumen Blutplasma Proben P01-P14 .....	98

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Ann-Arbor Klassifikation für maligne Lymphome.....	11
Abbildung 1-2: Therapieschema und Behandlungsalgorithmus DLBCL Leitlinien DGHO.....	14
Abbildung 1-3: Therapieschema Follikuläres Lymphom DGHO .....	20
Abbildung 1-4: Übersicht Mutationen im TP53-Gen .....	25
Abbildung 1-5: Eine Überwachung zirkulierender Tumor-DNA verbessert die Nachweisgrenzen im Vergleich zu bildgebenden Scans.....	34
Abbildung 3-1: Amplifizierungsreaktion durch Bridge-PCR .....	48
Abbildung 3-2: Prinzip einer Taq-Man Sonde .....	58
Abbildung 3-3: Wildtypsequenz FLT3 chr13:28018492 .....	60
Abbildung 3-4: Endgültiges Primerpaar, sowie Wildtyp und Mutationssonde.....	65
Abbildung 4-1: PET-CT abdomineller Transversalschnitt LYM01 .....	76
Abbildung 4-2: Detektierte Menge cfDNA im Blut von Patient LYM01 .....	79
Abbildung 4-3: Allelkonzentration der Mutationen nach dem NGS.....	81
Abbildung 4-4: Verlauf der Mutationslast ausgewählter Mutationen bestimmte durch NGS und ddPCR.....	86
Abbildung 4-5: Zeitlicher Verlauf der Allelfrequenzen bei LYM01, .....	88
Abbildung 4-6: CT Abdomen Transversalschnitt Verlaufsbilder LYM02 .....	92
Abbildung 4-7: Zeitlicher Verlauf der Allelkonzentration LYM02.....	95
Abbildung 4-8: Abdomen Transversalschnitte Verlaufsbilder LYM03.....	97
Abbildung 4-9: Verlauf der Allelkonzentration bei LYM03 .....	99
Abbildung 4-10: Verlauf der Allelfrequenz bei LYM03 .....	100

- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2016). Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov*, 6(5), 479-491. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1483
- Arneth, B. (2018). Update on the types and usage of liquid biopsies in the clinical setting: a systematic review. *BMC Cancer*, 18(1), 527. doi:10.1186/s12885-018-4433-3
- Baker, S. D., Zimmerman, E. I., Wang, Y. D., Orwick, S., Zatechka, D. S., Buaboonnam, J., . . . Inaba, H. (2013). Emergence of polyclonal FLT3 tyrosine kinase domain mutations during sequential therapy with sorafenib and sunitinib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 19(20), 5758-5768. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1323
- Bardelli, A., Corso, S., Bertotti, A., Hobor, S., Valtorta, E., Siravegna, G., . . . Siena, S. (2013). Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov*, 3(6), 658-673. doi:10.1158/2159-8290.Cd-12-0558
- Barrington, S. F., Mikhaeel, N. G., Kostakoglu, L., Meignan, M., Hutchings, M., Mueller, S. P., . . . Cheson, B. D. (2014). Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol*, 32(27), 3048-3058. doi:10.1200/JCO.2013.53.5229
- Baugh, E. H., Ke, H., Levine, A. J., Bonneau, R. A., & Chan, C. S. (2018). Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death Differ*, 25(1), 154-160. doi:10.1038/cdd.2017.180
- Bennett, C. W., Berchem, G., Kim, Y. J., & El-Khoury, V. (2016). Cell-free DNA and next-generation sequencing in the service of personalized medicine for lung cancer. *Oncotarget*, 7(43).
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., . . . Smith, A. J. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218), 53-59. doi:10.1038/nature07517
- Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., . . . Diaz, L. (2014). Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science translational medicine*, 6, 224ra224. doi:10.1126/scitranslmed.3007094
- Brandt, B., & Petrides, P. E. (2014). Grundlagen der Tumorentstehung. In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin: Springer Verlag.
- Brown, T., & Brown, T. J. Nucleic Acids Book. Retrieved from <https://www.atdbio.com/content/58/Next-generation-sequencing>
- Buske, C. (2018). Follikuläres Lymphom.
- Buske, C., Dreyling, M., Herold, M., Lohri, A., Neumeister, P., & Willenbacher, W. (2017). Follikuläres Lymphom.
- Campo, E. (2017). Pathology and classification of aggressive mature B-cell lymphomas. *Hematol Oncol*, 35 Suppl 1, 80-83. doi:10.1002/hon.2406
- Campos, C. D. M., Jackson, J. M., Witek, M. A., & Soper, S. A. (2018). Molecular Profiling of Liquid Biopsy Samples for Precision Medicine. *Cancer J*, 24(2), 93-103. doi:10.1097/PPO.0000000000000311
- Camus, V., Jardin, F., & Tilly, H. (2017). The value of liquid biopsy in diagnosis and monitoring of diffuse large b-cell lymphoma: recent developments and future potential. *Expert Rev Mol Diagn*, 17(6), 557-566. doi:10.1080/14737159.2017.1319765



- Casulo, C., Byrtek, M., Dawson, K. L., Zhou, X., Farber, C. M., Flowers, C. R., . . . Friedberg, J. W. (2015). Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(23), 2516-2522. doi:10.1200/JCO.2014.59.7534
- Chen, S., & Liu, Y. (2019). p53 involvement in clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Curr Opin Hematol*, 26(4), 235-240. doi:10.1097/MOH.0000000000000509
- Cheng, F., Su, L., & Qian, C. (2016). Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*, 7(30).
- Cheson, B. D., Fisher, R. I., Barrington, S. F., Cavalli, F., Schwartz, L. H., Zucca, E., . . . United Kingdom National Cancer Research, I. (2014). Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*, 32(27), 3059-3068. doi:10.1200/JCO.2013.54.8800
- Chu, D., & Park, B. H. (2017). Liquid biopsy: unlocking the potentials of cell-free DNA. *Virchows Arch*, 471(2), 147-154. doi:10.1007/s00428-017-2137-8
- Cohen, J. D., Javed, A. A., Thoburn, C., Wong, F., Tie, J., Gibbs, P., . . . Lennon, A. M. (2017). Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(38), 10202-10207. doi:10.1073/pnas.1704961114
- Coiffier, B. (2001). Diffuse large cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*, 13(5), 325-334. doi:10.1097/00001622-200109000-00003
- Coiffier, B., Thieblemont, C., Van Den Neste, E., Lepage, G., Plantier, I., Castaigne, S., . . . Tilly, H. (2010). Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*, 116(12), 2040-2045. doi:10.1182/blood-2010-03-276246
- Cunningham, D., Hawkes, E. A., Jack, A., Qian, W., Smith, P., Mouncey, P., . . . Linch, D. (2013). Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *The Lancet*, 381(9880), 1817-1826. doi:10.1016/s0140-6736(13)60313-x
- Darrah, J. M., & Herrera, A. F. (2018). Updates on Circulating Tumor DNA Assessment in Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*, 13(5), 348-355. doi:10.1007/s11899-018-0468-4
- Dawson, S. J., Tsui, D. W., Murtaza, M., Biggs, H., Rueda, O. M., Chin, S. F., . . . Rosenfeld, N. (2013). Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 368(13), 1199-1209. doi:10.1056/NEJMoa1213261
- Delarue, R., Tilly, H., Mounier, N., Petrella, T., Salles, G., Thieblemont, C., . . . Bosly, A. (2013). Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 14(6), 525-533. doi:10.1016/s1470-2045(13)70122-0
- Delfau-Larue, M.-H., Van Der Gucht, A., Dupuis, J., Jais, J.-P., Nel, I., Beldi-Ferchiou, A., . . . Verret, B. (2018). Total metabolic tumor volume, circulating tumor cells, cell-free DNA: distinct prognostic value in follicular lymphoma. *Blood advances*, 2(7), 807-816.
- DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., . . . Daly, M. J. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*, 43(5), 491-498. doi:10.1038/ng.806

- Diaz, L. A., Jr., & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*, 32(6), 579-586. doi:10.1200/JCO.2012.45.2011
- Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M. A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., . . . Diaz, L. A., Jr. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*, 14(9), 985-990. doi:10.1038/nm.1789
- Dohm, J. C., Lottaz, C., Borodina, T., & Himmelbauer, H. (2008). Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*, 36(16), e105. doi:10.1093/nar/gkn425
- Dubois, S., Mareschal, S., Picquenot, J.-M., Viailly, P.-J., Bohers, E., Cornic, M., . . . Maingonnat, C. (2015). Immunohistochemical and genomic profiles of diffuse large B-cell lymphomas: implications for targeted EZH2 inhibitor therapy? *Oncotarget*, 6(18), 16712.
- Dührsen, U., Fridrick, M. A., Klapper, W., & Schmitz, N. (2018). Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom.
- Fiala, C., & Diamandis, E. (2018). Utility of circulating tumor DNA in cancer diagnostics with emphasis on early detection. *BMC Medicine*, 16. doi:10.1186/s12916-018-1157-9
- Forbes, S. A., Beare, D., Gunasekaran, P., Leung, K., Bindal, N., Boutselakis, H., . . . Campbell, P. J. (2015). COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D805-811. doi:10.1093/nar/gku1075
- Forsheew, T., Murtaza, M., Parkinson, C., Gale, D., Tsui, D. W., Kaper, F., . . . Rosenfeld, N. (2012). Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med*, 4(136), 136ra168. doi:10.1126/scitranslmed.3003726
- Frontzek, A. (2015). DNA-Sequenzierung. In F. Thiemann, P. M. Cullen, & H.-G. Klein (Eds.), *Molekulare Diagnostik. Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik* (pp. 173-191). Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA.
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., . . . Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*, 6(269), p11. doi:10.1126/scisignal.2004088
- Garcia-Murillas, I., Schiavon, G., Weigelt, B., Ng, C., Hrebien, S., Cutts, R. J., . . . Turner, N. C. (2015). Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med*, 7(302), 302ra133. doi:10.1126/scitranslmed.aab0021
- Gentles, A. J., Alizadeh, A. A., Lee, S.-I., Myklebust, J. H., Shachaf, C. M., Shahbaba, B., . . . Plevritis, S. K. (2009). A pluripotency signature predicts histologic transformation and influences survival in follicular lymphoma patients. *Blood*, 114(15), 3158-3166.
- Gisselbrecht, C., Glass, B., Mounier, N., Singh Gill, D., Linch, D. C., Trneny, M., . . . Schmitz, N. (2010). Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*, 28(27), 4184-4190. doi:10.1200/JCO.2010.28.1618
- Graham, R. L., Mardones, M. A., & Krause, J. R. (2015). Primary follicular lymphoma of the duodenum. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 28(3), 381-383. doi:10.1080/08998280.2015.11929284
- Groot Koerkamp, B., Rahbari, N. N., Buchler, M. W., Koch, M., & Weitz, J. (2013). Circulating tumor cells and prognosis of patients with resectable colorectal liver metastases or widespread metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol*, 20(7), 2156-2165. doi:10.1245/s10434-013-2907-8
- Han, X., Wang, J., & Sun, Y. (2017). Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 15(2), 59-72. doi:10.1016/j.gpb.2016.12.004

- Hans, C. P., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Gascoyne, R. D., Delabie, J., Ott, G., . . . Chan, W. C. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, *103*(1), 275-282. doi:10.1182/blood-2003-05-1545
- Heitzer, E., Ulz, P., & Geigl, J. B. (2015). Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem*, *61*(1), 112-123. doi:10.1373/clinchem.2014.222679
- Hummel, E. M., Hessas, E., Muller, S., Beiter, T., Fisch, M., Eibl, A., . . . Moser, D. A. (2018). Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. *Transl Psychiatry*, *8*(1), 236. doi:10.1038/s41398-018-0264-x
- Ilie, M., Hofman, V., Long, E., Bordone, O., Selva, E., Washetine, K., . . . Hofman, P. (2014). Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Ann Transl Med*, *2*(11), 107. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.08.11
- Illidge, T., & Tolan, S. (2008). Current treatment approaches for diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, *49*(4), 663-676. doi:10.1080/10428190701882187
- Illumina, I. (2010). Illumina Sequencing. Retrieved from [https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight\\_sequencing.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf)
- Jacobsen, E. D., Sharman, J. P., Oki, Y., Advani, R. H., Winter, J. N., Bello, C. M., . . . Bartlett, N. L. (2015). Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood*, *125*(9), 1394-1402. doi:10.1182/blood-2014-09-598763
- Jelkmann, W. (2010). Blut und Immunsystem. In R. F. Schmidt, F. Lang, & M. Heckmann (Eds.), *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Jiang, M., Bennani, N. N., & Feldman, A. L. (2017). Lymphoma classification update: B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Expert Review of Hematology*, *10*(5), 405-415. doi:10.1080/17474086.2017.1318053
- Kahl, B. S. (2017). Follicular lymphoma: are we ready for a risk-adapted approach? *American Society of Hematology*.
- Kelly, L. M., Liu, Q., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., & Gilliland, D. G. (2002). FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood*, *99*(1), 310-318. doi:10.1182/blood.V99.1.310
- Khatami, F., & Tavangar, S. M. (2018). Circulating tumor DNA (ctDNA) in the era of personalized cancer therapy. *J Diabetes Metab Disord*, *17*(1), 19-30. doi:10.1007/s40200-018-0334-x
- Klein, H.-G., & Rost, I. Real-time PCR. Retrieved from <https://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=real-time-pcr-qpcr>
- Koch, H.-G., Brix, J., & Heinrich, P. C. (2014). DNA-Mutationen und ihre Reparatur. In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin: Springer Medizin.
- Koch-Institut, R., & e.V., G. d. e. K. i. D. (2019). Krebs in Deutschland 2015/2016. In: Robert Koch-Institut.
- Kridel, R., Sehn, L. H., & Gascoyne, R. D. (2017). Can histologic transformation of follicular lymphoma be predicted and prevented? *Blood*, *130*(3), 258-266. doi:10.1182/blood-2017-03-691345
- Kurtz, D. M., Scherer, F., Jin, M. C., Soo, J., Craig, A. F. M., Esfahani, M. S., . . . Alizadeh, A. A. (2018). Circulating Tumor DNA Measurements As Early Outcome Predictors in

- Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*, 36(28), 2845-2853.  
doi:10.1200/jco.2018.78.5246
- Kwok, M., Wu, S. P., Mo, C., Summers, T., & Roschewski, M. (2016). Circulating Tumor DNA to Monitor Therapy for Aggressive B-Cell Lymphomas. *Curr Treat Options Oncol*, 17(9), 47. doi:10.1007/s11864-016-0425-1
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G., Chao, C., Chitipiralla, S., . . . Maglott, D. R. (2016). ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*, 44(D1), D862-868. doi:10.1093/nar/gkv1222
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. R., Chao, C., Chitipiralla, S., . . . Maglott, D. R. (2018). ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*, 46(D1), D1062-D1067. doi:10.1093/nar/gkx1153
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., . . . Exome Aggregation, C. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285-291. doi:10.1038/nature19057
- Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M., & Yaros, M. J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*, 37(3), 646-650.
- Liu, Y., & Barta, S. K. (2019). Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*, 94(5), 604-616. doi:10.1002/ajh.25460
- Lo, Y. M., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M., & Hjelm, N. M. (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*, 64(1), 218-224. doi:10.1086/302205
- Lohr, J. G., Stojanov, P., Lawrence, M. S., Auclair, D., Chapuy, B., Sougnez, C., . . . Golub, T. R. (2012). Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), 3879-3884. doi:10.1073/pnas.1121343109
- Lorkowski, S., Landt, O., & Tiemann, C. (2015). Amplifikation und Detektion von Nukleinsäuren. In F. Thiemann, P. M. Cullen, & H.-G. Klein (Eds.), *Molekulare Diagnostik. Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik* (pp. 79-171). Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA.
- Luminari, S., Biasoli, I., Arcaini, L., Versari, A., Rusconi, C., Merli, F., . . . Federico, M. (2013). The use of FDG-PET in the initial staging of 142 patients with follicular lymphoma: a retrospective study from the FOLL05 randomized trial of the Fondazione Italiana Linfomi. *Annals of Oncology*, 24(8), 2108-2112. doi:10.1093/annonc/mdt137
- Ma, X., Xiao, Z., Li, X., Wang, F., Zhang, J., Zhou, R., . . . Liu, L. (2014). Prognostic role of circulating tumor cells and disseminated tumor cells in patients with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol*, 35(6), 5551-5560. doi:10.1007/s13277-014-1731-5
- Mader, S., & Pantel, K. (2017). Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. *Oncol Res Treat*, 40(7-8), 404-408. doi:10.1159/000478018
- Madic, J., Kiiialainen, A., Bidard, F. C., Birzele, F., Ramey, G., Leroy, Q., . . . Lebofsky, R. (2015). Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients. *Int J Cancer*, 136(9), 2158-2165. doi:10.1002/ijc.29265
- Mandel, P., & Metais, P. (1948). Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil*, 142(3-4), 241-243.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bembien, L. A., . . . Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376-380. doi:10.1038/nature03959

- Meignan, M., Itti, E., Gallamini, A., & Younes, A. (2015). FDG PET/CT imaging as a biomarker in lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 42(4), 623-633. doi:10.1007/s00259-014-2973-6
- Mercer, L. K., Regierer, A. C., Mariette, X., Dixon, W. G., Baecklund, E., Hellgren, K., . . . Listing, J. (2017). Spectrum of lymphomas across different drug treatment groups in rheumatoid arthritis: a European registries collaborative project. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(12), 2025-2030. doi:10.1136/annrheumdis-2017-211623
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31-46. doi:10.1038/nrg2626
- Michl, M. (2019). *BASICS Hämatologie* (Vol. 5). München: Urban und Fisher Verlag.
- Morin, R. D., Assouline, S., Alcaide, M., Mohajeri, A., Johnston, R. L., Chong, L., . . . Johnson, N. A. (2016). Genetic Landscapes of Relapsed and Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Clin Cancer Res*, 22(9), 2290-2300. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2123
- Morschhauser, F., Fowler, N. H., Feugier, P., Bouabdallah, R., Tilly, H., Palomba, M. L., . . . Salles, G. A. (2018). Rituximab plus Lenalidomide in Advanced Untreated Follicular Lymphoma. *N Engl J Med*, 379(10), 934-947. doi:10.1056/NEJMoa1805104
- 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 Journal*, 107(1), 265-276. doi:10.1182/blood-2005-06-2508
- Mouliere, F., Robert, B., Arnau Peyrotte, E., Del Rio, M., Ychou, M., Molina, F., . . . Thierry, A. R. (2011). High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One*, 6(9), e23418. doi:10.1371/journal.pone.0023418
- Murtaza, M., Dawson, S. J., Tsui, D. W., Gale, D., Forshe, T., Piskorz, A. M., . . . Rosenfeld, N. (2013). Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*, 497(7447), 108-112. doi:10.1038/nature12065
- Netzker, R. (2012). Zellzyklus und molekulare Genetik. In J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker, & R. Deutzmann (Eds.), *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Newman, A. M., Bratman, S. V., To, J., Wynne, J. F., Eclov, N. C., Modlin, L. A., . . . Diehn, M. (2014). An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*, 20(5), 548-554. doi:10.1038/nm.3519
- Ott, G. (2017). Aggressive B-cell lymphomas in the update of the 4th edition of the World Health Organization classification of haematopoietic and lymphatic tissues: refinements of the classification, new entities and genetic findings. *Br J Haematol*, 178(6), 871-887. doi:10.1111/bjh.14744
- Ott, G., Klapper, W., Feller, A. C., Hansmann, M. L., Moller, P., Stein, H., . . . Fend, F. (2019). [Revised version of the 4th edition of the WHO classification of malignant lymphomas : What is new?]. *Pathologe*, 40(2), 157-168. doi:10.1007/s00292-018-0456-4
- Parkinson, C. A., Gale, D., Piskorz, A. M., Biggs, H., Hodgkin, C., Addley, H., . . . Brenton, J. D. (2016). Exploratory Analysis of TP53 Mutations in Circulating Tumour DNA as Biomarkers of Treatment Response for Patients with Relapsed High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: A Retrospective Study. *PLoS Med*, 13(12), e1002198. doi:10.1371/journal.pmed.1002198
- Parkinson, D. R., Dracopoli, N., Petty, B. G., Compton, C., Cristofanilli, M., Deisseroth, A., . . . Kelloff, G. J. (2012). Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med*, 10, 138. doi:10.1186/1479-5876-10-138
- Pasqualucci, L., & Dalla-Favera, R. (2015). The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma. *Seminars in Hematology*, 52(2), 67-76. doi:10.1053/j.seminhematol.2015.01.005

- Pasqualucci, L., Khiabanian, H., Fangazio, M., Vasishta, M., Messina, M., Holmes, A. B., . . . Dalla-Favera, R. (2014). Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell reports*, *6*(1), 130-140. doi:10.1016/j.celrep.2013.12.027
- Pfreundschuh, M., Schubert, J., Ziepert, M., Schmits, R., Mohren, M., Lengfelder, E., . . . Loeffler, M. (2008). Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *The Lancet Oncology*, *9*(2), 105-116. doi:10.1016/s1470-2045(08)70002-0
- Pfreundschuh, M., & Trümper, L. (2019). Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom. Retrieved from <https://lymphome.de/diffus-grosszelliges-b-zell-lymphom/>
- Pillai, R. K., Surti, U., & Swerdlow, S. H. (2013). Follicular lymphoma-like B cells of uncertain significance (in situ follicular lymphoma) may infrequently progress, but precedes follicular lymphoma, is associated with other overt lymphomas and mimics follicular lymphoma in flow cytometric studies. *Haematologica*, *98*(10), 1571-1580. doi:10.3324/haematol.2013.085506
- Piper, W. (2013). *Innere Medizin*. Berlin: Springer Medizin.
- Plöthner, M., Frank, M., & von der Schulenburg, J. G. (2017). Cost analysis of whole genome sequencing in German clinical practice. *Eur J Health Econ*, *18*(5), 623-633. doi:10.1007/s10198-016-0815-0
- Pös, O., Biró, O., Szemes, T., & Nagy, B. (2018). Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *European Journal of Human Genetics*, *26*(7), 937-945. doi:10.1038/s41431-018-0132-4
- Pulte, D., Jansen, L., Gondos, A., Emrich, K., Holleczeck, B., Katalinic, A., . . . Group, G. C. S. W. (2013). Survival of patients with non-Hodgkin lymphoma in Germany in the early 21st century. *Leukemia & Lymphoma*, *54*(5), 979-985. doi:10.3109/10428194.2012.734616
- Reddy, A., Zhang, J., Davis, N. S., Moffitt, A. B., Love, C. L., Waldrop, A., . . . Dave, S. S. (2017). Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell*, *171*(2), 481-494 e415. doi:10.1016/j.cell.2017.09.027
- Rodrigues Filho, E. M., Simon, D., Ikuta, N., Klovan, C., Dannebrock, F. A., Oliveira de Oliveira, C., & Regner, A. (2014). Elevated cell-free plasma DNA level as an independent predictor of mortality in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, *31*(19), 1639-1646. doi:10.1089/neu.2013.3178
- Roschewski, M., Dunleavy, K., Pittaluga, S., Moorhead, M., Pepin, F., Kong, K., . . . Wilson, W. H. (2015). Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *The Lancet Oncology*, *16*(5), 541-549. doi:10.1016/s1470-2045(15)70106-3
- Roschewski, M., Dunleavy, K., & Wilson, W. H. (2014). Moving beyond rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone for diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, *55*(11), 2428-2437. doi:10.3109/10428194.2014.883075
- Roschewski, M., Staudt, L. M., & Wilson, W. H. (2016). Dynamic monitoring of circulating tumor DNA in non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, *127*(25), 3127-3132. doi:10.1182/blood-2016-03-635219
- Rossi, D., Condoluci, A., Spina, V., & Gaidano, G. (2019). Methods for Measuring ctDNA in Lymphomas. *Methods Mol Biol*, *1881*, 253-265. doi:10.1007/978-1-4939-8876-1\_19
- Rossi, D., Diop, F., Spaccarotella, E., Monti, S., Zanni, M., Rasi, S., . . . Gaidano, G. (2017). Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood*, *129*(14), 1947-1957. doi:10.1182/blood-2016-05-719641
- Rummel, M. J., Niederle, N., Maschmeyer, G., Banat, G. A., von Grünhagen, U., Losem, C., . . . Brugger, W. (2013). Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas:

- an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet*, 381(9873), 1203-1210. doi:10.1016/S0140-6736(12)61763-2
- Rushton, C. K., Arthur, S. E., Alcaide, M., Cheung, M., Jiang, A., Coyle, K. M., . . . Morin, R. D. (2020). Genetic and evolutionary patterns of treatment resistance in relapsed B-cell lymphoma. *Blood Adv*, 4(13), 2886-2898. doi:10.1182/bloodadvances.2020001696
- Saggese, M., Dua, D., Simmons, E., Lemech, C., & Arkenau, H.-T. (2013). Research biopsies in the context of early phase oncology studies: clinical and ethical considerations. *Oncology reviews*, 7(1), e5-e5. doi:10.4081/oncol.2013.e5
- Salles, G., Seymour, J. F., Offner, F., López-Guillermo, A., Belada, D., Xerri, L., . . . Tilly, H. (2011). Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *The Lancet*, 377(9759), 42-51. doi:10.1016/S0140-6736(10)62175-7
- Sant, M., Allemani, C., Tereanu, C., De Angelis, R., Capocaccia, R., Visser, O., . . . Group, H. W. (2010). Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood Journal*, 116(19), 3724-3734. doi:10.1182/blood-2010-05-282632
- Scherer, F., Kurtz, D., Newman, A., Stehr, H., Craig, A., Shahrokh Esfahani, M., . . . Alizadeh, A. (2016). Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Science translational medicine*, 8, 364ra155-364ra155. doi:10.1126/scitranslmed.aai8545
- Schuetz, J. M., Johnson, N. A., Morin, R. D., Scott, D. W., Tan, K., Ben-Nierah, S., . . . Gascoyne, R. D. (2012). BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 26(6), 1383-1390. doi:10.1038/leu.2011.378
- Schurch, C. M., Federmann, B., Quintanilla-Martinez, L., & Fend, F. (2018). Tumor Heterogeneity in Lymphomas: A Different Breed. *Pathobiology*, 85(1-2), 130-145. doi:10.1159/000475530
- Shihab, H. A., Gough, J., Cooper, D. N., Stenson, P. D., Barker, G. L., Edwards, K. J., . . . Gaunt, T. R. (2013). Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Human mutation*, 34(1), 57-65.
- Shihab, H. A., Gough, J., Cooper, D. N., Stenson, P. D., Barker, G. L., Edwards, K. J., . . . Gaunt, T. R. (2013). Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat*, 34(1), 57-65. doi:10.1002/humu.22225
- Shihab, H. A., Rogers, M. F., Gough, J., Mort, M., Cooper, D. N., Day, I. N. M., . . . Campbell, C. (2015). An integrative approach to predicting the functional effects of non-coding and coding sequence variation. *Bioinformatics*, 31(10), 1536-1543. doi:10.1093/bioinformatics/btv009
- Shimono, J., Miyoshi, H., Kiyasu, J., Kamimura, T., Eto, T., Miyagishima, T., . . . Ohshima, K. (2018). Clinicopathological analysis of polyploid diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One*, 13(4), e0194525. doi:10.1371/journal.pone.0194525
- Shipp, M. A., & Harrington, D. P. (1993). A predictive model for aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*, 329(14).
- Siravegna, G., Mussolin, B., Buscarino, M., Corti, G., Cassingena, A., Crisafulli, G., . . . Bardelli, A. (2015). Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nature medicine*, 21(7), 795-801. doi:10.1038/nm.3870
- Skrabek, P., Assouline, S., Christofides, A., MacDonald, D., Prica, A., Sangha, R., . . . Sehn, L. H. (2019). Emerging therapies for the treatment of relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma. *Curr Oncol*, 26(4), 253-265. doi:10.3747/co.26.5421

- Solal-Céligny, P., Roy, P., Colombat, P., White, J., Armitage, J. O., Arranz-Saez, R., . . . Montserrat, E. (2004). Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Blood*, *104*(5), 1258-1265. doi:10.1182/blood-2003-12-4434
- Sondka, Z., Bamford, S., Cole, C. G., Ward, S. A., Dunham, I., & Forbes, S. A. (2018). The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nat Rev Cancer*, *18*(11), 696-705. doi:10.1038/s41568-018-0060-1
- Steensma, D. P. (2018). Clinical consequences of clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Blood Adv*, *2*(22), 3404-3410. doi:10.1182/bloodadvances.2018020222
- Steensma, D. P., Bejar, R., Jaiswal, S., Lindsley, R. C., Sekeres, M. A., Hasserjian, R. P., & Ebert, B. L. (2015). Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*, *126*(1), 9-16. doi:10.1182/blood-2015-03-631747
- Stewart, C. M., & Tsui, D. W. Y. (2018). Circulating cell-free DNA for non-invasive cancer management. *Cancer Genet*, *228-229*, 169-179. doi:10.1016/j.cancergen.2018.02.005
- Suehara, Y., Sakata-Yanagimoto, M., Hattori, K., Kusakabe, M., Nanmoku, T., Sato, T., . . . Chiba, S. (2019). Mutations found in cell-free DNAs of patients with malignant lymphoma at remission can derive from clonal hematopoiesis. *Cancer Sci*, *110*(10), 3375-3381. doi:10.1111/cas.14176
- Sun, P., Chen, C., Xia, Y., Wang, Y., Liu, P. P., Bi, X. W., . . . Jiang, W. Q. (2019). Mutation Profiling of Malignant Lymphoma by Next-Generation Sequencing of Circulating Cell-Free DNA. *J Cancer*, *10*(2), 323-331. doi:10.7150/jca.27615
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., . . . Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, *127*(20), 2375-2390. doi:10.1182/blood-2016-01-643569
- Takahashi, K., Wang, F., Kantarjian, H., Doss, D., Khanna, K., Thompson, E., . . . Futreal, P. A. (2017). Preleukaemic clonal haemopoiesis and risk of therapy-related myeloid neoplasms: a case-control study. *The Lancet Oncology*, *18*(1), 100-111. doi:10.1016/s1470-2045(16)30626-x
- Tarailo-Graovac, M., Zhu, J. Y. A., Matthews, A., van Karnebeek, C. D. M., & Wasserman, W. W. (2017). Assessment of the ExAC data set for the presence of individuals with pathogenic genotypes implicated in severe Mendelian pediatric disorders. *Genet Med*, *19*(12), 1300-1308. doi:10.1038/gim.2017.50
- Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., . . . Forbes, S. A. (2019). COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*, *47*(D1), D941-D947. doi:10.1093/nar/gky1015
- Tellier, J., Menard, C., Roulland, S., Martin, N., Monvoisin, C., Chasson, L., . . . Tarte, K. (2014). Human t(14;18)positive germinal center B cells: a new step in follicular lymphoma pathogenesis? *Blood*, *123*(22), 3462-3465. doi:10.1182/blood-2013-12-545954
- Thompson, C. A., Ghesquieres, H., Maurer, M. J., Cerhan, J. R., Biron, P., Ansell, S. M., . . . Link, B. K. (2014). Utility of routine post-therapy surveillance imaging in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, *32*(31), 3506-3512. doi:10.1200/jco.2014.55.7561
- Tiacci, E., Trifonov, V., Schiavoni, G., Holmes, A., Kern, W., Martelli, M. P., . . . Falini, B. (2011). BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *New England Journal of Medicine*, *364*(24), 2305-2315. doi:10.1056/NEJMoa1014209
- Tie, J., Wang, Y., Tomasetti, C., Li, L., Springer, S., Kinde, I., . . . Gibbs, P. (2016). Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*, *8*(346), 346ra392. doi:10.1126/scitranslmed.aaf6219



- Tilly, H., Gomes da Silva, M., Vitolo, U., Jack, A., Meignan, M., Lopez-Guillermo, A., . . . Committee, E. G. (2015). Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, *26 Suppl 5*, v116-125. doi:10.1093/annonc/mdv304
- Treon, S. P., Xu, L., Yang, G., Zhou, Y., Liu, X., Cao, Y., . . . Hunter, Z. R. (2012). MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *New England Journal of Medicine*, *367*(9), 826-833. doi:10.1056/NEJMoa1200710
- Tsai, N. W., Lin, T. K., Chen, S. D., Chang, W. N., Wang, H. C., Yang, T. M., . . . Lu, C. H. (2011). The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke. *Clin Chim Acta*, *412*(5-6), 476-479. doi:10.1016/j.cca.2010.11.036
- Tumor-Profilng in der Krebsdiagnostik. (2017).
- Turki, A. T., Lamm, W., Liebrechts, T., & Duhrsen, U. (2018). R-ICE Chemotherapy with or without Autologous Transplantation for Elderly Patients with Relapsed or Refractory Aggressive B-Cell Lymphomas. *Oncol Res Treat*, *41*(9), 534-538. doi:10.1159/000489717
- Ulz, P., Heitzer, E., Geigl, J. B., & Speicher, M. R. (2017). Patient monitoring through liquid biopsies using circulating tumor DNA. *Int J Cancer*, *141*(5), 887-896. doi:10.1002/ijc.30759
- Underhill, H. R., Kitzman, J. O., Hellwig, S., Welker, N. C., Daza, R., Baker, D. N., . . . Shendure, J. (2016). Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet*, *12*(7), e1006162. doi:10.1371/journal.pgen.1006162
- van de Schans, S. A. M., Steyerberg, E. W., Nijziel, M. R., Creemers, G.-J., Janssen-Heijnen, M. L., & van Spronsen, D. J. (2009). Validation, revision and extension of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) in a population-based setting. *Annals of Oncology*, *20*(10), 1697-1702. doi:10.1093/annonc/mdp053
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1999). Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(16), 9236-9241. doi:10.1073/pnas.96.16.9236
- Wagener, C., & Müller, O. (2010). *Molekulare Onkologie. Entstehung, Progression, klinische Aspekte* (Vol. 3). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Wagner-Johnston, N. D., Link, B. K., Byrtek, M., Dawson, K. L., Hainsworth, J., Flowers, C. R., . . . Bartlett, N. L. (2015). Outcomes of transformed follicular lymphoma in the modern era: a report from the National LymphoCare Study (NLCS). *Blood*, *126*(7), 851-857. doi:10.1182/blood-2015-01-621375
- Walzog, B., & Fandrey, J. (2014). Blut: Ein flüssiges Organsystem. In S. Silbernagl, H. C. Pape, & A. Kurtz (Eds.), *Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Wan, J. C. M., Massie, C., Garcia-Corbacho, J., Mouliere, F., Brenton, J. D., Caldas, C., . . . Rosenfeld, N. (2017). Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*, *17*(4), 223-238. doi:10.1038/nrc.2017.7
- Wang, J., Chang, S., Li, G., & Sun, Y. (2017). Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Front Med*, *11*(4), 522-527. doi:10.1007/s11684-017-0526-7
- Weeks, J., Yeap, B., Canellos, G., & Shipp, M. (1991). Value of follow-up procedures in patients with large-cell lymphoma who achieve a complete remission. *Journal of Clinical Oncology*, *9*(7), 1196-1203.
- Wong, T. N., Ramsingh, G., Young, A. L., Miller, C. A., Touma, W., Welch, J. S., . . . Wilson, R. K. (2015). Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature*, *518*(7540), 552-555. doi:10.1038/nature13968

- Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., . . . Naoe, T. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, *97*(8), 2434-2439. doi:10.1182/blood.v97.8.2434
- Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med*, *141*(11), 1544-1557. doi:10.5858/arpa.2016-0501-RA
- Younes, A., Hilden, P., Coiffier, B., Hagenbeek, A., Salles, G., Wilson, W., . . . Seshan, V. E. (2017). International Working Group consensus response evaluation criteria in lymphoma (RECIL 2017). *Ann Oncol*, *28*(7), 1436-1447. doi:10.1093/annonc/mdx097
- Yung, T. K., Chan, K. C., Mok, T. S., Tong, J., To, K. F., & Lo, Y. M. (2009). Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*, *15*(6), 2076-2084. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-08-2622
- Zelenetz, A. D., Gordon, L. I., Abramson, J. S., Advani, R. H., Bartlett, N. L., Caimi, P. F., . . . Sundar, H. (2019). NCCN Guidelines Insights: B-Cell Lymphomas, Version 3.2019. *J Natl Compr Canc Netw*, *17*(6), 650-661. doi:10.6004/jnccn.2019.0029
- Zhang, W., Xia, W., Lv, Z., Ni, C., Xin, Y., & Yang, L. (2017). Liquid Biopsy for Cancer: Circulating Tumor Cells, Circulating Free DNA or Exosomes? *Cell Physiol Biochem*, *41*(2), 755-768. doi:10.1159/000458736
- Zhang, X., Ju, S., Wang, X., & Cong, H. (2019). Advances in liquid biopsy using circulating tumor cells and circulating cell-free tumor DNA for detection and monitoring of breast cancer. *Clin Exp Med*, *19*(3), 271-279. doi:10.1007/s10238-019-00563-w
- Zheng, D., Ye, X., Zhang, M. Z., Sun, Y., Wang, J. Y., Ni, J., . . . Xu, J. F. (2016). Plasma EGFR T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. *Scientific reports*, *6*, 20913-20913. doi:10.1038/srep20913
- Ziepert, M., Hasenclever, D., Kuhnt, E., Glass, B., Schmitz, N., Pfreundschuh, M., & Loeffler, M. (2010). Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*, *28*(14), 2373-2380. doi:10.1200/JCO.2009.26.2493
- Zonta, E., Garlan, F., Pecuchet, N., Perez-Toralla, K., Caen, O., Milbury, C., . . . Taly, V. (2016). Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations. *PLoS One*, *11*(7), e0159094. doi:10.1371/journal.pone.0159094

## 10 Danksagung

Zu Beginn geht ein herzlicher Dank an Prof. Dr. Jürgen Ruland, der mich in seinem Institut als Doktorand angenommen hat und mir so die Möglichkeit zur Durchführung des Promotionsvorhaben gegeben hat.

Ebenso gehen viele Dankesworte an Dr. Dr. Christof Winter, der mich immer herzlich in unzähligen Meetings empfangen hat und meine Fragen ausführlich zu beantworten wusste. Vielen Dank für deine angenehme Supervision der Promotion und deine Unterstützung.

Zugleich geht ein großer Dank an meine erste Betreuerin Dr. Irina Kerle, die die Datenerhebung im Rahmen der LYMPHCIN Studie möglich gemacht hat und somit die Grundlage für die Arbeit geschaffen hat.

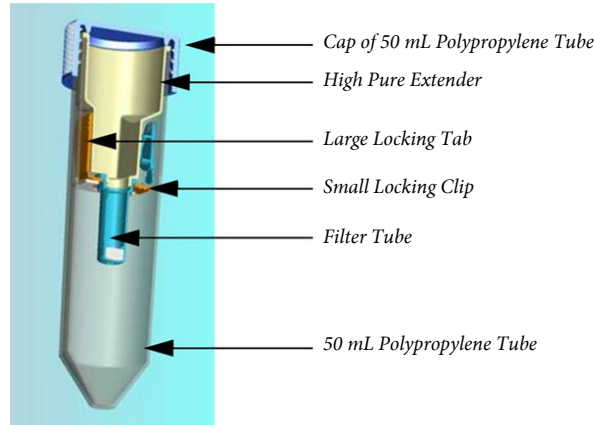
Des Weiteren vielen Dank an Dr. Philipp Blüm, der die Betreuung meiner Promotion im Verlauf übernommen hat. Seine Unterstützung für die klinische Sicht und sein Feedback waren immer eine sehr wertvolle Hilfe.

Herzlichen Dank ebenso an Ramona Secci, für ihre hervorragende Arbeit im Labor und ihre herzliche Art in den Lab-Meetings. Ihr präzises Arbeiten im Labor war eine Säule meiner Dissertation.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich meiner Kollegin und Mitdotorandin Romina Rösch, die mich auf das Projekt aufmerksam gemacht hat und immer für meine Fragen ein offenes Ohr hatte. Ihre Unterstützung war eine außerordentliche Hilfe.

Zuletzt geht ein Dank an all diejenigen, die mich in meinem Promotionsvorhaben unterstützt haben, insbesondere meinen Eltern, die mir für das schriftliche Verfassen der Arbeit mit dem Ferienhaus am Unteranger einen Rückzugsort geschaffen haben und mir mit dem außergewöhnlichen Ausblick auf den See Momente zum Erholen und Regenerieren ermöglicht haben.

Vielen Dank meiner Mutter, David Brißlinger und Romina Rösch für das Lesen und Korrigieren meiner Arbeit.



Anhang 1: Schema einer High Pure Extender Assembly Einheit; AVENIO ctDNA Analysis Kits Reagent Workflow User Guide V.1.1

**AVENIO ctDNA Expanded Kit Gene List**



The AVENIO ctDNA Expanded Kit is a next-generation sequencing (NGS) liquid biopsy tumor profiling assay for genomic aberrations in solid tumors. This assay contains 77 genes, including those in the U.S. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines,<sup>1</sup> as well as emerging biomarkers relevant to clinical research.

Gene	Full Exon Coverage	CRC	Lung	Breast	Gastric	Prostate	Bladder	Glioma	Melanoma	Ovarian	Thyroid	Pancreatic	Other Cancers	SNV	Indel <sup>2</sup>	Fusion <sup>3</sup>	CNV <sup>4</sup>
ABL1													CML, ALL	●			
AKT1		●	●	●						●				●			
AKT2		●	●	●				●				●		●			
ALK			●										ALCL, Neuroblastoma, Inflammatory Myofibroblastic Tumor, Spitzoid Tumor, Large B-Cell Lymphoma, Rhabdomyosarcoma	●	●	●	
APC		●			●			●				●	HCC, Medulloblastoma, Desmoid	●	●		
AR	●			●		●								●			
ARAF			●											●			
BRAF		●	●					●	●	●	●		Borderline Ovarian, Cholangiocarcinoma, Spitzoid Tumor, Pancreas Acinar Carcinoma, Melanocytic Nevus, GIST	●	●		
BRCA1	●			●						●		●		●			
BRCA2	●			●				●		●		●		●			
CCND1	●	●		●									CLL, B-ALL, MM, Mantle Cell Lymphoma	●			
CCND2	●												NHL, CLL	●			
CCND3	●						●	●					MM, Burkitt Lymphoma, other B-Cell Lymphomas	●			
CD274	●												Primary Medialastrial B-Cell Lymphoma, Hodgkin Lymphoma, CML, RCC, Lymphoepithelial-like Carcinoma	●			
CDK4	●			●					●				Liposarcoma	●			
CDK6				●				●					Endometrial Squamous Cancer, T-Cell Leukemia	●			
CDKN2A	●								●			●	Astrocytoma	●			
CSF1R				●		●				●			Endometrial, Testicular GCT, Malignant Histiocytosis	●			
CTNNB1		●											HCC, Medulloblastoma, Mesothelioma	●	●		

<sup>1</sup> National Comprehensive Cancer Network, <http://www.nccn.org>, October 15, 2016.  
<sup>2</sup> Indels are limited to variants in a pre-specified list of positions, referred to as "LoCI of Interest", except for EGFR exon 19 long deletions, EGFR exon 20 long insertions and MET long insertions, which are not restricted to a pre-defined set of indels.  
<sup>3</sup> Detection of Fusions and CNVs are limited to variants in a pre-specified list of positions, referred to as "LoCI of Interest" in the AVENIO ctDNA Analysis Software.  
 1 of 4 For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Anhang 2: Übersicht Gen Liste ctDNA Expanded Kit Seite 1

## AVENIO ctDNA Expanded Kit Gene List



Gene	Full Exon Coverage	CRC	Lung	Breast	Gastric	Prostate	Bladder	Glioma	Melanoma	Ovarian	Thyroid	Pancreatic	Other Cancers	SNV	Indel <sup>1</sup>	Fusion <sup>1</sup>	CNV <sup>1</sup>
DDR2			•										Lung Adenoid Cystic Carcinoma	•			
DPYD**		•												•			
EGFR	•		•					•						•	•		•
ERBB2	•	• <sup>1</sup>	•	•	•			•		•				•	•		•
ESR1	•			•										•			
EZH2													MDS, Mantle Cell Lymphoma, CML, DLBCL, Cholangiocellular Carcinoma	•			
FBXW7	•	•		•									Endometrial, T-ALL, Lymphoblastic Leukemia	•			
FGFR1			•	•									MPN, NHL, Salivary Adenoma	•			
FGFR2			•	•	•								Endometrial	•		•	
FGFR3			•				•						MM, T-Cell Lymphoma, Cervical, Testicular GCT	•		•	
FLT1													CNS Hemangiomas	•			
FLT3													AML, ALL	•			
FLT4													Soft Tissue Sarcoma	•			
GATA3				•									RCC	•			
GNA11									•					•			
GNAQ									•					•			
GNAS		•											Pituitary Adenoma	•			
IDH1								•					AML	•			
IDH2								•					AML	•			
JAK2													ALL, AML, MPN, CML	•			
JAK3													Acute Megakaryocytic Leukemia, ETP ALL	•			
KDR			•										Angiosarcoma	•			
KEAP1	•		•											•			
KIT									•				AML, Testicular Germ Cell Tumors, GIST, Thymic Carcinoma	•	•		

\*\* Inactivating mutations are associated with sensitivity to fluoropyrimidines.

Kawari et al. Cancer Discovery 6: 892-81 (2015) PMID: 26248665.

<sup>1</sup> Indels are limited to variants in a pre-specified list of positions, referred to as "Loci of Interest", except for EGFR exon 19 long deletions, EGFR exon 20 long insertions and MET long insertions, which are not restricted to a pre-defined set of indels.

<sup>1</sup> Detection of Fusions and CNVs are limited to variants in a pre-specified list of positions, referred to as "Loci of Interest" in the AVENIO ctDNA Analysis Software.

2 of 4

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

### Anhang 3: Übersicht Gen Liste ctDNA Expanded Kit Seite 2

## AVENIO ctDNA Expanded Kit Gene List



Gene	Full Exon Coverage	CRC	Lung	Breast	Gastric	Prostate	Bladder	Glioma	Melanoma	Ovarian	Thyroid	Pancreatic	Other Cancers	SNV	Indel <sup>1</sup>	Fusion <sup>1</sup>	CNV <sup>1</sup>
KRAS	•	•	•		•					•	•	•	AML, Juvenile Myelomonocytic Leukemia	•			
MAP2K1		•	•						•					•			
MAP2K2			•						•					•			
MET	•		•										Head and Neck Squamous Cell, HCC, Papillary RCC	•	•		•
MLH1	•	•		•	•					•			Endometrial, Small Intestine	•			
MSH2	•	•		•	•					•			Endometrial, Small Intestine	•			
MSH6	•	•		•	•					•			Endometrial, Small Intestine	•			
MTOR								•					Endometrial, Head and Neck SCC, Clear Cell RCC	•			
NF2	•												Meningioma, Acoustic Neuroma, Mesothelioma	•			
NFE2L2			•										Head and Neck SCC	•			
NRAS		•	•						•		•		MM, AML, Juvenile Myelomonocytic Leukemia	•			
NTRK1			•								•		Spitzoid Tumor	•		•	
PDCD1LG2	•												PMBL, Hodgkin Lymphoma	•			
PDGFRA													GIST, Hypereosinophilic Syndrome	•			
PDGFRB													MPN, AML, CMMML, CML, Juvenile Myelomonocytic Leukemia	•			
PIK3CA		•		•	•			•		•	•		HCC	•	•		
PIK3R1		•						•		•				•			
PMS2	•	•		•	•					•			Endometrial, Small Intestine	•			
PTCH1													Basal Cell Carcinoma, Medulloblastoma	•			
PTEN	•	•		•		•		•			•		Endometrial, Head and Neck SCC, RCC	•	•		
RAF1						•							Pilocytic Astrocytoma	•			
RB1	•			•			•						Retinoblastoma, Small Cell Lung Carcinoma, Osteosarcoma	•			

<sup>1</sup> Indels are limited to variants in a pre-specified list of positions, referred to as "Loci of Interest", except for EGFR exon 19 long deletions, EGFR exon 20 long insertions and MET long insertions, which are not restricted to a pre-defined set of indels.

<sup>1</sup> Detection of Fusions and CNVs are limited to variants in a pre-specified list of positions, referred to as "Loci of Interest" in the AVENIO ctDNA Analysis Software.

3 of 4

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

### Anhang 4: Übersicht Gen Liste ctDNA Expanded Kit Seite 3

# AVENIO ctDNA Expanded Kit Gene List



Gene	Full Exon Coverage	CRC	Lung	Breast	Gastric	Prostate	Bladder	Glioma	Melanoma	Ovarian	Thyroid	Pancreatic	Other Cancers	SNV	Indel <sup>†</sup>	Fusion <sup>‡</sup>	CNV <sup>§</sup>
RET		•	•								•		Pheochromocytoma, Spitzoid Tumor, Mucosal Neuroma	•		•	
RNF43		•								•		•	Cholangiocarcinoma	•			
RDS1			•		•			•					Spitzoid Tumor, Cholangiocarcinoma, Borderline Ovarian	•		•	
SMAD4	•	•										•	Small Intestine	•			
SMO	•												Basal Cell Carcinoma, Medulloblastoma	•			
STK11	•		•						•			•	Testicular GCT	•			
TERT promoter							•	•	•				HCC, Basal Cell Carcinoma, Skin Squamous Cell, Mesothelioma, Medulloblastoma	•			
TP53	•	•	•	•	•			•		•		•	Various Leukemias, Adenocarcinoma, Basal Cell Carcinoma, Esophageal, Soft Tissue and Bone Sarcomas, Head and Neck SCC	•			
TSC1							•						RCC, Angiomyolipoma	•	•		
TSC2													RCC, Angiomyolipoma, Head and Neck SCC	•			
UGT1A1 <sup>††</sup>														•			
VHL	•												Hemangioblastoma, Pheochromocytoma, RCC	•	•		



<sup>††</sup> UGT1A1\*28 allele sequenced but not currently called by the AVENIO ctDNA Analysis Software version 1.0.0, and 1.1.0.

<sup>†</sup> Indels are limited to variants in a pre-specified list of positions, referred to as "Loci of Interest", except for EGFR exon 19 long deletions, EGFR exon 20 long insertions and MET long insertions, which are not restricted to a pre-defined set of Indels.

<sup>‡</sup> Detection of Fusions and CNVs are limited to variants in a pre-specified list of positions, referred to as "Loci of Interest" in the AVENIO ctDNA Analysis Software.

Associations of variations or mutations in these genes with the listed diseases were sourced from the following: COSMIC, GeneCards, My Cancer Genome. Analysis performed 11/2016.

4 of 4

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

AVENIO is a trademark of Roche.  
© 2018 Roche Sequencing Solutions, Inc.  
SEQ100052 A115 01/2018

## Anhang 5: Übersicht Gen Liste ctDNA Expanded Kit Seite 4

Mutation	Variante	Forward Primer	Reverse primer	Wildtyp-Sonde	Mutations-Sonde	Kommerziell erworben
FLT3	p.Asp839Gly	CGACACA ACACAAA ATAGCCG T	TGTGACTT TGGATTGG CTCGA	T+TGGAA +T+CACT+ CA+TG	+TTGG+A+A +CCACT+CA +TG	nein
FLT3	p.Asp835His	ATAGCAG CCTCACA TTGCC	CTTGTCAC CCACGGGA AAGT	T+CA+CT CATGATA +T+CG+TCG	T+CA+CTCA TGATA+T+G +TCG	nein
KRAS	p.Gly13Asp					ja
PDGFRA	p.Thr276Met					ja
PDGFRB	p.Thr140Met	TGGGTCT GTTACTC GGCATG	TGGGTCTG TTACTCGG CATG	C+G+T+G A+GAAAG +AT+GA	C+A+TG+A+ GAAA+GAT +GA	nein
TP53	p.Arg273Leu	ATTCTCT TCCCTCTG TGCGCC	TGCCTCTT GCTTCTCTT TTCCT	ACAAAC+ A+CG+CA CCTC	ACA+AAC+ A+A+GC+AC CTC	nein
TP53	p.Gly245Ser					ja

## Anhang 6: Mutationen LYM01

Wenn vor einem Buchstaben ein + steht, ist die Base eine LNA Base; mit gelb gekennzeichnet sind Wildtypbasen, mit rot die mutierte Base

Mutation	Variante	Kommerziell erworben
APC	p.Arg564*	ja
EZH2	p.Tyr646Asn	ja
PTEN	p.Arg335*	ja
TP53	p.Arg280Ser	ja

Anhang 7: ddPCR Assays LYM02

Mutation	Variante	Kommerziell erworben
TP53	p.Arg280Ser	ja

Anhang 8: ddPCR Assays LYM03