

Diplomarbeit

**Identifizierung prognostischer Faktoren beim  
diffus großzelligen B-Zell-Lymphom**

eingereicht von

**Sharon Amelie Küntzel**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Klinischen Abteilung für Hämatologie**

Unter Anleitung von

Priv.-Doz.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> med. univ. Dr.<sup>in</sup> scient. med. Katharina Prochazka

Dr.<sup>in</sup> med. univ. Barbara Uhl

Graz, 22.05.2020

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 22.05.2020*

*Sharon Amelie Küntzel eh*

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) ist mit einem Anteil von 25-40% aller adulten Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) das häufigste maligne Lymphom der westlichen Welt. Die hohe biologische und molekulare Heterogenität spiegelt sich in variablen klinischen Verläufen unter R-CHOP-Standardtherapie wider, wodurch eine individuelle Prognoseabschätzung vor Therapiebeginn erschwert wird. Es ist anzunehmen, dass insbesondere Hochrisiko-Gruppen auch durch gängige Prognose-Scores, wie zum Beispiel dem IPI bzw. NCCN-IPI, nicht ausreichend erfasst sind. Der Einbezug molekularer Faktoren in Prognose-Systeme zur Risikostratifizierung der PatientInnen gewinnt daher zunehmend an Bedeutung und ist Gegenstand vieler gegenwärtiger Studien. Ziel dieser retrospektiven Studie war es, gängige Biomarker mit prognostischem Wert am PatientInnen-Kollektiv Standort Graz zu evaluieren.

**Material und Methoden:** Für die retrospektive Analyse wurden die Daten von 553 DLBCL-PatientInnen des LKH Graz in eine Datenbank überführt und statistisch ausgewertet. Die Prüfung auf Zusammenhänge zwischen der Marker-Expression und dem EFS24 erfolgte mithilfe von Kreuztabellen und dem Chi-Quadrat-Test. Für die Analysen des Gesamt- (OS) und krankheitsfreien Überlebens (DFS) wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt und diese mittels Log-Rank-Test miteinander verglichen. Ergänzend wurde eine univariate Cox-Regressionsanalyse für jeden Biomarker durchgeführt.

**Ergebnisse:** In der Kreuztabellenanalyse konnte für die Biomarker CD30, MUM1 und Eber jeweils ein signifikanter Zusammenhang mit dem EFS24 festgestellt werden ( $p=0.01$ ;  $p=0.03$ ;  $p=0.03$ ). In den Überlebensanalysen mittels Kaplan-Meier-Kurven, zeigte sich jeweils ein signifikant überlegenes OS für CD30- ( $p=0.014$ ), CD10- ( $p=0.031$ ) und GCET1-positive ( $p=0.04$ ) DLBCL-PatientInnen. Ein signifikant unterlegenes OS war hingegen für CD117- ( $p<0.001$ ) und CD15-positive ( $p=0.023$ ) PatientInnen zu beobachten. Ein verbessertes DFS konnte zugunsten von PatientInnen mit CD20- ( $p=0.024$ ) und CD30-positivem ( $p=0.014$ ) DLBCL gezeigt werden. Eine positive Expression der Marker CD117 ( $p=0.002$ ), BCL2 ( $p=0.04$ ) und MUM1 ( $p=0.03$ ) war jeweils mit einem schlechteren DFS assoziiert. In der univariaten Cox-Regressionsanalyse ließen sich die Ergebnisse hinsichtlich OS für die Marker CD30 ( $p=0.002$ ), CD10 ( $p=0.032$ ), GCET1 ( $p=0.045$ ),

CD117 ( $p=0.003$ ) und CD15 ( $p=0.03$ ) bestätigen. Bezüglich DFS konnten die Ergebnisse für die Marker CD20 ( $p=0.039$ ), CD30 ( $p=0.015$ ), CD117 ( $p=0.013$ ), BCL2 ( $p=0.044$ ) und MUM1 ( $p=0.043$ ) bestätigt werden.

**Diskussion:** Bei der Evaluierung von 23 Biomarkern ließen sich insgesamt 8 Marker identifizieren, die jeweils mit einem veränderten Outcome assoziiert waren. Bei Bewertung der prognostischen Relevanz der untersuchten Marker ist CD30 insgesamt als vielversprechendster Prädiktor für den Krankheitsverlauf zu sehen. Eine Überführung von CD30 in potentielle Prognose-Scores sollte daher in Betracht gezogen werden.

## Abstract

**Introduction:** Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is, with a percentage of 25-40% of all adult non-Hodgkin Lymphomas (NHLs), the most common lymphoid malignancy in the western world. Its biological and molecular heterogeneity, which is seen in variable clinical outcomes to standard R-CHOP therapy, complicates the individual prediction for patients prognosis at the beginning of treatment. It can be assumed that especially high risk groups are not identified even by known risk scores, like the IPI or NCCN-IPI. Integrating molecular features in prognostic tools for risk estimation is becoming more important and is currently part of several studies. Aim of this study was to evaluate routinely acquired biomarkers with prognostic significance for the patient population of the LKH-Graz.

**Material and Methods:** For the retrospective analysis data from 553 DLBCL-patients of LKH Graz were transferred into a database and statistically analyzed. Cross-tabulation and chi-square-test were used to analyze the relationship between biomarker-expression and EFS24. Overall survival (OS) and disease free survival (DFS) for each marker were evaluated using the Kaplan-Meier-method and the curves were compared with the log-rank test. Univariate analyses for survival were performed using the Cox regression model.

**Results:** Cross-tabulation showed a significant association with EFS24 for CD30, MUM1 and Eber ( $p=0.01$ ;  $p=0.03$ ;  $p=0.03$ ). Survival analyses in Kaplan-Meier-Curves showed a significant superior OS for patients with positive expression of CD30 ( $p=0.014$ ), CD10 ( $p=0.031$ ) and GCET1 ( $p=0.04$ ). A significant inferior OS was found for CD117- ( $p<0.001$ ) and CD15-positive ( $p=0.023$ ) DLBCL-patients. A significant difference in DFS was observed in favor of CD20- ( $p=0.024$ ) and CD30-positive ( $p=0.014$ ) DLBCL-patients. Positive expression of CD117 ( $p=0.002$ ), BCL2 ( $p=0.04$ ) and MUM1 ( $p=0.039$ ) significantly correlated with poor DFS. Univariate Cox regression revealed the results regarding OS for CD30 ( $p=0.002$ ), CD10 ( $p=0.032$ ), GCET1 ( $p=0.045$ ), CD117 ( $p=0.003$ ) and CD15 ( $p=0.03$ ). Concerning DFS, the results were confirmed for CD20 ( $p=0.039$ ), CD30 ( $p=0.015$ ), CD117 ( $p=0.044$ ), BCL2 ( $p=0.044$ ) and MUM1 ( $p=0.043$ ).

**Discussion:** Out of 23 biomarkers we identified 8 markers with a significant correlation between expression-status and patient outcome. The assessment of prognostic significance of these markers showed that CD30 might be the most

promising factor for predicting outcome. Therefore the integration of CD30 in potential prognostic tools for patients risk estimation might be considered.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract</b>	<b>iv</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>vi</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>viii</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>xii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>xiii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Lymphatische Organe</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Entwicklung und Reifung der Lymphozyten</b>	<b>2</b>
<b>1.4 B-Lymphozyten</b>	<b>3</b>
<b>1.5 Non-Hodgkin-Lymphom</b>	<b>4</b>
1.5.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	4
1.5.2 Klinisches Bild, Staging und Restaging	5
1.5.3 Histologische Klassifikation	10
<b>1.6 Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, nicht weiter spezifiziert (NOS)</b>	<b>12</b>
1.6.1 Epidemiologie und klinische Präsentation	13
1.6.2 Ätiologie und Risikofaktoren	13
1.6.3 Immunhistochemische Merkmale	14
1.6.4 "Cell-Of-Origin"-Klassifikation	15
1.6.5 Pathophysiologie und molekulare Aspekte	16
1.6.5.1 Die Keimzentrumsreaktion als Zielstruktur genetischer Alterationen	17
1.6.5.2 Molekulare Aspekte	19
1.6.6 Prognostische Faktoren	22
1.6.7 Therapie	24
1.6.7.1 Erstlinientherapie	24
1.6.7.2 Therapie refraktärer und rezidivierter DLBCL	26
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Datenerfassung</b>	<b>27</b>
<b>2.2 Statistische Auswertung</b>	<b>28</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Deskriptive Statistik</b>	<b>29</b>
3.1.1 Charakterisierung der Studienpopulation	29
3.1.1.1 Immunhistochemische Marker	31
<b>3.2 Kreuztabellen</b>	<b>32</b>
3.2.1 Zusammenhang Biomarker und EFS24	32
<b>3.3 Kaplan-Meier-Überlebenskurven</b>	<b>34</b>
3.3.1 Gesamtüberleben (OS)	35

3.3.2	Krankheitsfreies Überleben (DFS)	40
3.3.3	Cox-Proportionale Hazard-Modelle	45
3.3.4	Gesamtüberleben (OS)	45
3.3.5	Krankheitsfreies Überleben (DFS)	46
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b>	<b>60</b>

## Abkürzungen

aaIPI	Age adjusted IPI; altersjustierter IPI
ABC	Activated B-cell like DLBCL
ACVBP	Adriamycin, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vindesin, Bleomycin und Prednisolon
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
ALCL	Anaplastisch-großzelliges Lymphom
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
ASCT	Autologe Stammzelltransplantation
ASHM	Aberrante somatische Hypermutation
BCL2	B-cell lymphoma 2 protein
BCL6	B-cell lymphoma 6 protein
BCR	B-cell-receptor
BEAM	Carmustin, Etoposid, Cytarabin, Melphalan
BLIMP1	B-lymphocyte-induced maturation protein 1
BOB-1	B cell specific octamer binding protein 1
CALLA	Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen
CAR-T	Chimäre Antigen-Rezeptor-T-Zellen
CD	Cluster of differentiation
CGH	Comparative-Genomic-Hybridization
CHOEP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin, Etoposid, Prednisolon
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin, Prednis(ol)on
CI	Konfidenzintervall
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
coef	Regressionskoeffizient
COO	Cell of Origin
CR	Komplette metabolische Remission
CSR	Class-switch recombination; Klassenwechsel
d.h.	das heißt

DEL	Double-Expressor Lymphoma
DFS	Disease Free Survival; Krankheitsfreies Überleben
DHAP	Cisplatin, Cytarabin, Dexamethason
DHL	Double-Hit-Lymphoma
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma; Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSHNHL	Deutsche Studiengruppe für Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome
EBER	Epstein-Barr virus-encoded small RNA
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EFS	Event Free Survival; Ereignisfreies Überleben
ESMO	European Society for Medical Oncology
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FDG	Fluordesoxyglucose
GC	Germinal center; Keimzentrum
GCB	Germinal center B-cell like DLBCL
GCET1	Germinal center B cell-expressed transcript 1
GDP	Cisplatin, Gemcitabin, Dexamethason
GEMOX	Gemcitabin, Oxaliplatin
GEP	Gene expression profiling; Genexpressionsanalyse
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDC	Hochdosis-Chemotherapie
HHV8	Humanes Herpesvirus 8
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HR	Hazard-Ratio
ICE	Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid
Ig	Immunglobulin

IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPI	International Prognostic Index
IRF4	Interferon-Regulations-Faktor 4
JAK	Janus Kinase
Ki67	Proliferationsmarker (Ki - Kiel)
LDH	Lactatdehydrogenase
LKH	Landeskrankenhaus
m-BACOD	Methotrexat, Bleomycin, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Dexamethason
MACOB-B	Methotrexat, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisolon, Bleomycin
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEDOC	Medizinisches Informations- und Dokumentationssystem
MHC	Major histocompatibility complex
MIB-1	Molecular immunology borstel 1
MUM1	Multiple Myeloma 1
MYC	Myelocytomatosis oncogene
NCCN- IPI	National Comprehensive Cancer Network-IPI
NF- κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
NOS	Not otherwise specified; Nicht weiter spezifiziert
OCT2	Organic cation transporter 2
OS	Overall Survival; Gesamtüberleben
PAX5	Paired box 5
PD-L1	Programmed death ligand 1
PD-L2	Programmed death ligand 2

PET- CT	Positronenemissionstomographie- Computertomographie
PFS	Progression Free Survival; Progressionsfreies Überleben
PMBCL	Primär mediastinales B-Zell Lymphom
R	Rituximab
RNA	Ribonukleinsäure
SHM	Somatische Hypermutation
SLL	Small Lymphocytic Lymphoma; kleinzelliges lymphozytisches Lymphom
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Th2-Zelle	T-Helfer-Zelle vom Typ 2
THL	Triple-Hit-Lymphoma
TNF	Tumornekrosefaktor
VDJ	Variable, Diversity, Joining
WHO	World-Health-Organization; Weltgesundheitsorganisation
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Reifung der B-Lymphozyten .....	<b>3</b>
<b>Abbildung 2:</b> Immunhistochemische Algorithmen für "Cell of Origin" – Subtypisierung .....	<b>16</b>
<b>Abbildung 3:</b> Die Keimzentrumsreaktion (GC-reaction) .....	<b>19</b>
<b>Abbildung 5:</b> Geschlechterverteilung der Studienpopulation .....	<b>29</b>
<b>Abbildung 6:</b> Altersverteilung zum Diagnosezeitpunkt.....	<b>30</b>
<b>Abbildung 7:</b> Altersverteilung der verstorbenen PatientInnen im angegebenen Beobachtungszeitraum.....	<b>30</b>
<b>Abbildung 8:</b> Vergleich OS für PatientInnen mit CD10+ und CD10- DLBCL.....	<b>35</b>
<b>Abbildung 9:</b> Vergleich OS für PatientInnen mit CD15+ und CD15- .....	<b>36</b>
<b>Abbildung 10:</b> Vergleich OS für PatientInnen mit CD30+ und CD30- .....	<b>37</b>
<b>Abbildung 11:</b> Vergleich OS für PatientInnen mit CD117+ und CD117- DLBCL.	<b>38</b>
<b>Abbildung 12:</b> Vergleich OS für PatientInnen mit GCET+ und GCET- DLBCL ...	<b>39</b>
<b>Abbildung 13:</b> Vergleich DFS für PatientInnen mit CD20+ und CD20- DLBCL...	<b>40</b>
<b>Abbildung 14:</b> Vergleich DFS für PatientInnen mit CD30+ und CD30- DLBCL...	<b>41</b>
<b>Abbildung 15:</b> Vergleich DFS für PatientInnen mit CD117+ und CD117- DLBCL	<b>42</b>
<b>Abbildung 16:</b> Vergleich DFS für PatientInnen mit BCL2+ und BCL2- DLBCL ...	<b>43</b>
<b>Abbildung 17:</b> Vergleich DFS für PatientInnen mit MUM1+ und MUM1- DLBCL	<b>44</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Ann-Arbor-Klassifikation .....	<b>7</b>
<b>Tabelle 2:</b> Internationaler prognostischer Index .....	<b>8</b>
<b>Tabelle 3:</b> Risikostratifizierung nach IPI-Score .....	<b>8</b>
<b>Tabelle 4:</b> NCCN-IPI .....	<b>9</b>
<b>Tabelle 5:</b> Deauville-Score zur Quantifizierung des metabolischen Ansprechens (FDG-PET-Anreicherung).....	<b>10</b>
<b>Tabelle 6:</b> Klassifikation der Reifzelligigen B-Zell-Neoplasien nach der WHO-Klassifikation 2016 .....	<b>11</b>
<b>Tabelle 7:</b> Risikofaktoren für DLBCL.....	<b>14</b>
<b>Tabelle 8:</b> Assoziierte Mutationsprofile mit den "Cell-Of-Origin"-Subtypen.....	<b>22</b>
<b>Tabelle 9:</b> Immunhistochemische Marker .....	<b>27</b>
<b>Tabelle 10:</b> Häufigkeit erhobener Biomarker.....	<b>31</b>
<b>Tabelle 11:</b> Kreuztabelle CD30-Expression und EFS24 .....	<b>33</b>
<b>Tabelle 12:</b> Pearsons Chi-Quadrat-Test mit Monte-Carlo Simulationen .....	<b>33</b>
<b>Tabelle 13:</b> Kreuztabelle EBER-Expression und EFS24.....	<b>33</b>
<b>Tabelle 14:</b> Pearsons Chi-Quadrat-Test mit Monte Carlo Simulationen .....	<b>33</b>
<b>Tabelle 15:</b> Kreuztabelle MUM1-Expression und EFS24 .....	<b>34</b>
<b>Tabelle 16:</b> Pearsons Chi-Quadrat-Test mit Monte Carlo Simulationen .....	<b>34</b>
<b>Tabelle 17:</b> Univariate Cox-Analyse der einzelnen Biomarker in Bezug auf das OS.....	<b>45</b>
<b>Tabelle 18:</b> Univariate Cox-Analyse der einzelnen Biomarker in Bezug auf das DFS.....	<b>46</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Zielsetzung**

Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom repräsentiert eine Gruppe von Tumorentitäten, die histologisch und biologisch eine hohe Vielfalt aufweisen, was sich in variablen klinischen Verläufen unter Standardtherapie widerspiegelt. Zuletzt gab es immer wieder Grund zur Annahme, dass bestimmte Risikogruppen durch gängige Prognose-Scores, wie z.B. dem IPI, nicht ausreichend erfasst sind. Der Einbezug von genetischen und immunphänotypischen Faktoren in Prognose-Systeme zur Risikostratifizierung der PatientInnen gewinnt daher zunehmend an Bedeutung und ist Gegenstand vieler gegenwärtiger Studien. Ziel dieser retrospektiven Studie ist es, gängige Biomarker mit prognostischem Wert am PatientInnen-Kollektiv Standort Graz zu evaluieren.

## **1.2 Lymphatische Organe**

Das Lymphsystem setzt sich grundsätzlich aus den lymphatischen Organen sowie den Lymphgefäßen zusammen und ist Bestandteil des Immunsystems, insbesondere ist es das Zentrum der adaptiven Immunabwehr (1,2). Die lymphatischen Organe lassen sich wiederum in primäre und sekundäre lymphatische Organe unterteilen, deren Hauptakteure die Lymphozyten sind. Lediglich 2% aller Lymphozyten zirkulieren vorübergehend (ca. 1h) im Blut (2). In den primären lymphatischen Organen erfolgt die Entwicklung und Reifung der Lymphozyten, wobei die B-Lymphozyten im Knochenmark und die T-Lymphozyten vor allem im Thymus ihrem Reifungsprozess unterliegen (2). Dieser erfolgt zunächst antigenunabhängig, sodass naive (noch antigen-unerfahrene) Lymphozyten entstehen. Die sekundären lymphatischen Organe sind hingegen im Wesentlichen für die Generierung einer antigenspezifischen Immunantwort verantwortlich. Dazu gehören Lymphknoten, Milz, Tonsillen, Peyer-Plaques und Appendix (3). Sie dienen als Abfangstation für pathogene Mikroorganismen. Naive Lymphozyten bekommen dort ihr spezifisches Antigen durch eine spezialisierte Zelle (dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten) an ein MHC-Molekül (Major histocompatibility complex) gebunden präsentiert (3). Im Zuge dessen kommt es unter Einfluss

verschiedener Kofaktoren zur antigenabhängigen Aktivierung und damit zur Proliferation und weiteren Differenzierung der T- und B-Lymphozyten. Die Proliferation der immunkompetenten Lymphozyten in diesen Organen führt letztlich auch zur makroskopisch beobachtbaren Lymphknotenschwellung bzw. Milzvergrößerung bei einer Infektion (1).

### **1.3 Entwicklung und Reifung der Lymphozyten**

Blutzellen lassen sich morphologisch und funktionell in 3 Zellpopulationen gliedern, die Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Ursprung sämtlicher Blutzellen sind multipotente hämatopoetische Stammzellen, die im roten Knochenmark ansässig sind. Diese bilden ebendort zwei Hauptgruppen von Vorläuferzellen, die myeloischen (common myeloid progenitors, CMP) und die lymphatischen Progenitorzellen (common lymphoid progenitors, CLP). Aus diesen entwickeln sich ihrerseits über mehrere Differenzierungsschritte die reifen Blutzellen (1,2). Gesteuert werden diese Prozesse durch zahlreiche lokal gebildete hämatopoetische Wachstumsfaktoren (Zytokine), insbesondere dem Stammzellefaktor (stem-cell factor, SCF) in Verbindung mit anderen Koloniestimulierenden Faktoren (colony-stimulating factors, CSF) sowie Interleukinen (IL-1-7), Interferon  $\gamma$  und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , $-\beta$ . (1,3). Die lymphoide Vorläuferzelle differenziert sich zunächst in die Pro-B- und die Pro-T-Zelle, deren weiterer Reifungsprozess jeweils in unterschiedlichen lymphatischen Organen stattfindet (vgl. Kapitel 1.1). Während der B-Zell-Reifung im Knochenmark kommt es nun zur Umlagerung der Immunglobulin (Ig)-Gene (somatische Rekombination/VDJ-Rekombination), wobei für jedes Reifungsstadium unterschiedliche Umlagerungsprodukte charakteristisch sind (4). In der Folge entsteht die Prä-B-Zelle, aus der sich über weitere Zwischenstadien schließlich der reife, naive B-Lymphozyt entwickelt (Abbildung 1). Dieser zeichnet sich durch einen funktionsfähigen B-Zell-Rezeptor (BCR), bestehend aus IgM- und IgD-Immunglobulin, sowie alle B-Zell typischen Oberflächenmarker aus (Cluster of differentiation, CD). Dazu gehören CD19, CD20, CD21, CD23, CD24, CD38. Autoreaktive B-Zellen unterliegen dem Prozess der negativen Selektion. Es folgt die terminale bzw. antigenabhängige Reifung in den Keimzentren sekundär lymphatischer Organe (5).

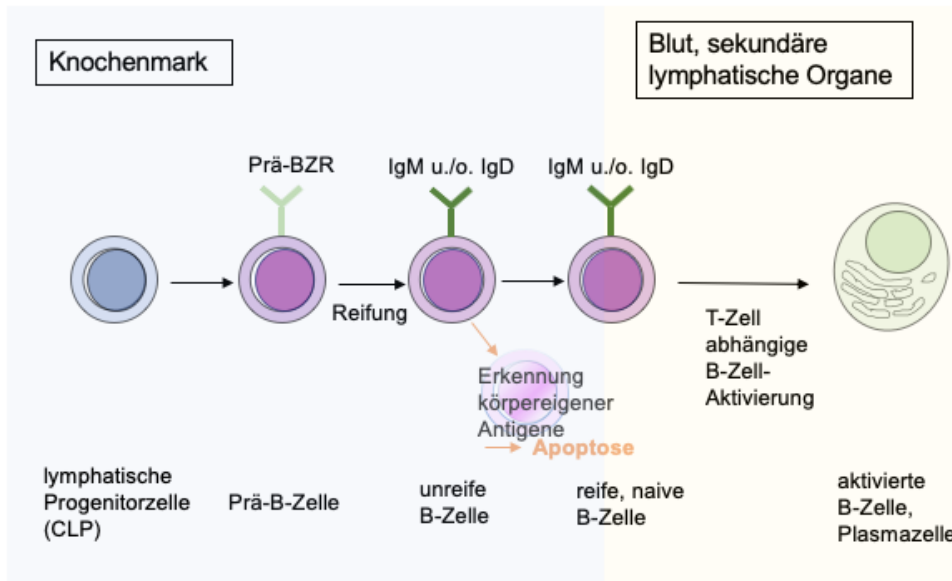


Abbildung 1: Reifung der B-Lymphozyten. Adaptiert nach Behrends *et al.* (6).

## 1.4 B-Lymphozyten

Lymphozyten gehören neben den Granulozyten und Monozyten zur Gruppe der Leukozyten und bilden drei Hauptfraktionen: T-Lymphozyten (ca. 75% der zirkulierenden Lymphozyten), B-Lymphozyten (ca. 15%) und Natürliche Killer (NK)-Zellen (ca. 10%), wobei T- und B-Lymphozyten Träger der adaptiven Immunabwehr sind. Diese lassen sich anhand der spezifischen Oberflächenmarker voneinander differenzieren (2).

Mithilfe ihres Antigenrezeptors, dem B-Zell-Rezeptor (BCR), sind B-Lymphozyten in der Lage, Antigen-Moleküle zu erkennen und zu binden. In der Folge kann es zu einer T-Zell- unabhängigen bzw. T-Zell-abhängigen B-Zell-Aktivierung kommen. Letzteres erlaubt die Produktion hoch-affiner Antikörper durch Plasma- und Gedächtniszellen, die bei Zweitkontakt mit dem Antigen, eine raschere und effektivere Immunantwort ermöglichen: Erkannte Antigene (Proteine) werden in die Zelle aufgenommen, prozessiert und anschließend über den MHC-II-Rezeptor an der Oberfläche präsentiert. Treten diese in Kontakt mit einer T-Helfer-Zelle vom Typ 2 (Th2-Zelle), erkennt diese den Antigenpeptid-tragende MHC-II Komplex und es kommt durch Interaktion kostimulatorischer Moleküle, wie CD40/CD40-Ligand, IL-4 und anderen Zytokinen zur wechselseitigen Aktivierung (7). Dies führt einerseits zu einer starken B-Zell-Proliferation in den Keimzentren der Lymphknoten sowie zu

einem Wechsel der Antikörperklasse von IgM nach IgG oder IgA (class-switch recombination, CSR), andererseits kommt es durch den Prozess der somatischen Hypermutation (SHM) zur sogenannten Affinitätsreifung. Letztlich entstehen B-Zellen mit gesteigerter Affinität der produzierten Antikörper, welche zum Großteil zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und zu einem kleineren Teil zu langlebigen B-Gedächtniszellen differenzieren (7,8).

Die oben beschriebenen terminalen Differenzierungsschritte des B-Lymphozyten (Klassenwechsel, SHM) vollziehen sich in der sogenannten Keimzentrumsreaktion sekundär lymphatischer Organe, welche im Rahmen der Lymphomgenese in Kapitel 1.5.5.1 näher erläutert wird (5).

## **1.5 Non-Hodgkin-Lymphom**

Maligne Lymphome sind bösartige Tumoren des lymphatischen Systems und lassen sich grundsätzlich in Hodgkin- (ca. 10% aller Lymphome) und Non-Hodgkin-Lymphome (ca. 90%) unterteilen (9). Das Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) repräsentiert eine heterogene Gruppe an Krankheiten und umfasst mehr als 40 Subtypen mit unterschiedlichen genetischen, morphologischen und klinischen Eigenschaften (10). Das Spektrum der Krankheitsbilder reicht von indolenten, chronischen Verläufen bis hin zu aggressiven, rasch proliferierenden Verläufen (9). Non-Hodgkin-Lymphome stammen von Lymphozyten in unterschiedlichen Reifungs- und Differenzierungsstufen ab und entwickeln sich zu 80-85% aus der B-Zell- und zu 15-20% aus der T-Zell-Reihe (11). Das zunehmende Verständnis zugrunde liegender biologischer und genetischer Mechanismen des NHL sowie die Zugänglichkeit neuer diagnostischer Methoden und Therapien, haben in den vergangenen Jahren zu einer deutlichen Verbesserung im PatientInnenmanagement beigetragen (9).

### **1.5.1 Epidemiologie und Risikofaktoren**

Das NHL ist weltweit die meist verbreitete maligne hämatologische Erkrankung. Mit einem Anteil von 4,3% aller Krebsarten in den USA, ist das NHL die siebthäufigste Krebserkrankung beim Mann und die sechsthäufigste bei der Frau (10). In den USA

wurden 2016 etwa 72.580 neue Fälle diagnostiziert. Die relative Häufigkeit spezifischer Subtypen der NHL zeigt weltweit geografische Unterschiede. Low-grade B-Zell- Lymphome zeigen in einkommensstarken Regionen eine höhere Inzidenz als in Regionen mit geringfügig oder mittlerem Einkommen, während in einkommensschwächeren Regionen high-grade B-Zell-Lymphome , T-Zell – und NK-Zell-Lymphome mit einer höheren Inzidenz auftreten (9).

Als begünstigende Faktoren für die Entstehung von NHL gelten Autoimmunerkrankungen, Infektionskrankheiten, Lebensstil, genetische Faktoren, positive Familienanamnese und berufliche Faktoren (12–14). Fettleibigkeit ist als Risikofaktor für das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) zu sehen (15). Für die Entwicklung von NHL bei PatientInnen mit Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom und systemischem Lupus erythematodes wird insgesamt ein ansteigendes Risiko verzeichnet (16). Dabei bleibt unklar, ob das ansteigende Risiko nur mit dem Auftreten der Autoimmunerkrankung assoziiert ist oder auch mit der angewandten immunsuppressiven Therapie. Ebenfalls führen erworbenen Immundefekte wie HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von NHL (17). Weitere Assoziationen zwischen dem Auftreten von Lymphomen und viralen oder bakteriellen Infektionen sind für das Epstein-Barr-Virus (EBV) (Burkitt-Lymphom, nasales NK-T-Zell-Lymphom), Hepatitis-C-Virus (HCV), *Helicobacter pylori* (MALT(Mucosa-associated-lymphoid-tissue)-Lymphom), *Borrelia Burgdorferi*, *Chlamydia psittacosis* sowie *Coxiella burnettii* beschrieben (18–21). Dabei werden insbesondere das HCV und *Coxiella burnettii* als Risikofaktor für das DLBCL gehandelt (21,22).

### **1.5.2 Klinisches Bild, Staging und Restaging**

Das klinische Bild des NHL ist sehr variabel, abhängig vom Lymphom-Typ, sowie den nodalen und extranodalen Lymphommanifestationen, welche grundsätzlich jedes Organ des Körpers betreffen können. Von klinisch-praktischer Bedeutsamkeit ist die Einteilung der NHL nach ihrem klinischen Verlauf in indolente und aggressive Lymphome (23). In überwiegender Mehrzahl der Fälle präsentiert sich das NHL durch eine schmerzlose Lymphadenopathie. Außerdem können

Allgemeinsymptome wie Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust (zusammengefasst als B-Symptome), Pruritus und/oder Müdigkeit auftreten.

Die Diagnose wird histopathologisch durch Exstirpation eines involvierten Lymphknotens bzw. Exzisionsbiopsie von befallenem Gewebe mit anschließenden histologischen, immunhistochemischen sowie molekulargenetischen Analysen gestellt. Dazu ist eine ausreichend große Gewebsmenge erforderlich, um die Wahrscheinlichkeit für die richtige Diagnosestellung zu erhöhen. Eine Feinnadelaspiration bzw. Zytologie zur alleinigen Diagnosestellung ist nicht ausreichend (9).

Die Bandbreite an möglichen Differentialdiagnosen ist enorm und variiert für jeden spezifischen Subtyp. Zur Abgrenzung möglicher Differentialdiagnosen und exakten Einteilung des Subtypens entsprechend der WHO(World-Health-Organization)-Klassifikation, sollte die histomorphologische Diagnose daher immer mittels Immunphänotypisierung bestätigt werden. Immunhistochemische Testungen bei Morphologie eines DLBCLs könnten z.B. die Oberflächenmarker CD20, CD79a, BCL6, CD10, MYC, BCL2, Ki67, IRF4, CyclinD1, CD5 und CD23 beinhalten. Aufgrund der teilweise schwierigen Diagnosestellung sollte die Beurteilung durch einen erfahrenen Hämatopathologen angestrebt werden. (24)

Für die Abschätzung der Prognose und Planung der Therapie ist die genaue Stadieneinteilung relevant. Dazu erfolgt eine ausführliche Anamneseerhebung (B-Symptome), körperliche Untersuchung, Laboruntersuchungen sowie eine Knochenmarksbiopsie und geeignete bildgebende Verfahren zur Bestimmung des Ausbreitungsstadiums. Die Laboruntersuchungen umfassen neben einem großen Blutbild auch klinisch-chemische Untersuchungen bezüglich der Knochenmarks-, Leber- und Nierenfunktion sowie die Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH)- und Harnsäurekonzentration im Serum. Ergänzend werden Screening-Tests bezüglich HIV, Hepatitis-B-Virus (HBV) und HCV empfohlen, ebenso wie eine Proteinanalytik mittels Serumelektrophorese (9,24). Zur Bestimmung des Ausbreitungsstadiums wird entsprechend der Lugano-Klassifikation, international eine Positronenemissionstomographie-Computertomographie (PET-CT) mit Kontrastmittel für PatientInnen mit Fluordesoxyglucose (FDG)-aviden Lymphomen empfohlen (25). Zur Abschätzung des Knochenmarkbefalls zeigt sich die PET-CT

Untersuchung bei einigen NHL-Subtypen, insbesondere auch dem DLBCL, gleichermaßen sensitiv wie eine Knochenmarksbiopsie. Beim DLBCL wird eine Knochenmarksbiopsie nur im Falle eines negativen PET- Ergebnisses empfohlen, wenn diese eine Änderung der Therapiestrategie oder der Prognose zur Folge haben könnte (9,24).

Die Stadienbeurteilung wird entsprechend der Ann-Arbor-Klassifikation vorgenommen, die 1966 in Ann Arbour festgelegt wurde. Wie in Tabelle 1 ersichtlich, berücksichtigt diese die Anzahl der betroffenen Lymphknotenregionen, die Lage in Bezug auf das Zwerchfell sowie das Vorliegen von B-Symptomen und extralymphatischen Herden (26). In Anlehnung an die Ann-Arbor-Klassifikation wurde 2014 die sogenannte Lugano-Klassifikation etabliert, welche insbesondere bei Vorliegen der Ausbreitungsdiagnostik durch die PET-CT anwendbar ist (25).

**Tabelle 1:** Ann-Arbor-Klassifikation (26,27)

<b>Stadium</b>	<b>Definition</b>
I	Befall einer einzigen Lymphknotenregion
I <sub>2</sub>	Vorliegen eines einzigen lokalisierten extranodalen Herdes
II	Befall mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells
II <sub>2</sub>	Vorliegen eines einzelnen extranodalen Herdes und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf der gleichen Seite des Zwerchfells
III	Befall von Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells
III <sub>2</sub>	Befall eines einzigen lokalisierten Herdes extralymphatisch und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells
IV	Diffuser Befall mindestens eines extralymphatischen Organs
Zusatz A	Es liegen keine der unter B definierten Symptome vor
Zusatz B	Es liegen B-Symptome vor: Fieber > 38° C und/oder Nachtschweiß mit Wäschewechsel und/oder Gewichtsverlust von mehr als 10 % des Körpergewichtes innerhalb von 6 Monaten

Zur Abschätzung der Prognose existieren verschiedene Prognosesysteme, welche als Grundlage für therapeutische Entscheidungen dienen. Als erstes System zur Prognoseabschätzung aggressiver B- und T-Zelllymphome wurde in der Prä-Rituximab-Ära der Internationale Prognostische Index (IPI-Score) etabliert, welcher für nahezu jeden NHL-Subtypen aussagekräftig ist (9). In Studien von Ziepert *et al.* konnte anhand von MInT und RICOVER-60 die Gültigkeit auch für Rituximab behandelte PatientInnen gezeigt werden (28). Als Risikofaktoren, die die Prognose der PatientInnen vor Behandlungsbeginn beeinflussen, berücksichtigt der IPI-Score das Alter (>60 Jahre), den Performance-Status (ECOG-Status), das Tumorstadium nach Ann-Arbour, den prätherapeutischen LDH-Wert sowie die Anzahl extranodaler Lymphommanifestationen (Tabelle 2) (29).

**Tabelle 2:** Internationaler prognostischer Index (29)

Risikofaktor	Punktzahl
Alter > 60 Jahre	1
LDH im Serum erhöht	1
Ann-Arbour-Stadium III-IV	1
>1 Extranodaler Befall	1
Performance-Status (ECOG-Score $\geq$ 2)	1

Parallel wird bei PatientInnen unter 60 Jahren der altersjustierte IPI (aaIPI) angewandt, bei dem lediglich der Performance-Status, das Tumorstadium sowie der LDH-Wert miteinbezogen werden. Aufgrund der vorliegenden Risikofaktoren ergibt sich eine Punktzahl zwischen 0-5 beim IPI-Score bzw. 0-3 beim aaIPI-Score, aus denen sich jeweils vier Risikogruppen ableiten lassen: eine niedrige (IPI = 0 oder 1; aaIPI = 0), eine intermediär-niedrige (IPI = 2; aaIPI = 1), eine intermediär-hohe (IPI = 3; aaIPI = 2) und eine hohe Risikogruppe (IPI = 4 oder 5; aaIPI = 3) (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Risikostratifizierung nach IPI-Score (29)

Score	Risikogruppe	5-Jahres-Gesamtüberleben (OS)
0 - 1	niedrig	73 %
2	Intermediär-niedrig	51 %

<b>3</b>	Intermediär-hoch	43 %
<b>4 - 5</b>	hoch	26 %

Wie in Tabelle 3 dargestellt, ergibt sich für eine niedrige Risikogruppe ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 73% gegenüber der hohen Risikogruppe mit einem deutlich geringer geschätztem 5-Jahres-Gesamtüberleben von nur noch 26% (29). Eine Weiterentwicklung des IPI in der Rituximab-Ära stellt der "National Comprehensive Cancer Network" (NCCN)-IPI dar (Tabelle 4), der PatientInnen aufgrund der klinischen Merkmale Alter, LDH, spezifische Extranodal-Manifestationen, Ann-Arbour-Stadium sowie Performance-Status in vier Risikogruppen unterteilt: niedrig (0-1 Punkt), intermediär-niedrig (2-3 Punkte), intermediär-hoch (4-5 Punkte), hoch (6-8 Punkte). Verglichen mit dem IPI unterscheidet der NCCN-IPI in Bezug auf das Outcome besser zwischen Niedrig- und Hochrisiko-DLBCL-PatientInnen, d.h. er diskriminiert besser zwischen den beiden Überlebenskurven. Dabei zeigte sich beim NCCN-IPI ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 96% vs. 33% im Vergleich zum IPI mit 90% vs. 54%. Somit ließen sich durch den NCCN-IPI auch Risikogruppen mit einer 5-Jahresüberlebensrate von <50% identifizieren (30).

**Tabelle 4:** NCCN-IPI (30)

<b>Risikofaktor</b>	<b>Punktzahl</b>
<b>Alter</b>	
>40 bis ≤ 60	1
>60 bis ≤75	2
<75	3
<b>LDH im Serum</b>	
>1 bis ≤3	1
>3	1
<b>Ann-Arbour-Stadium III-IV</b>	1
<b>Extranodalbefall</b>	1
<b>Performance-Status</b> (ECOG-Score ≥ 2)	1

Als Standarduntersuchung zur Responsebeurteilung nach Behandlungsende wird international die PET-CT empfohlen (25). Der Abschluss PET-CT- Scan gilt als bester Prädiktor für das krankheitsfreie Überleben nach Therapieende und wird für die Standarddefinition der kompletten metabolischen Remission (CR)

herangezogen (31). Grundlage dieser Standarddefinition bildet eine 5-Punkte-Skala, der sogenannte Deauville-Score (Tabelle 5), anhand derer der Aviditätsgrad bewertet wird. Die Deauville-Stadien 1-3 werden dabei als komplette metabolische Remission gewertet, die Stadien 4 und 5 als Hinweis auf residuelle vitale Lymphom-Manifestationen (FDG-Aufnahme  $\geq$  Leber) (9,25). Die Bedeutung des Interim-PET-CT-Scans in Bezug auf das Outcome ist in der Literatur umstritten (31–36).

**Tabelle 5:** Deauville-Score zur Quantifizierung des metabolischen Ansprechens (FDG-PET-Anreicherung) (37)

1	Keine Anreicherung
2	Anreicherung $\leq$ Mediastinum
3	Anreicherung $>$ Leber aber $\leq$ Mediastinum
4	Anreicherung mäßig $>$ Leber an jeglicher Lymphomlokalisierung
5	Anreicherung deutlich* $>$ Leber an bekannten Lymphomlokalisierungen und/oder Anreicherung an neuen Lokalisationen

\*Maximaler standardisierter Aufnahmewert  $>$  2x Leber

Weitere, für PatientInnen mit DLBCL spezifische prognostische Faktoren werden in Kapitel 1.6.6 angeführt.

### 1.5.3 Histologische Klassifikation

Eine weltweit akzeptierte und angewandte Klassifikation von NHL stellt die WHO-Klassifikation dar, die auf Basis des “Revised European American Lymphoma“ (R.E.A.L.)-Systems im Jahr 2001 durch ein internationales Expertengremium beschlossen wurde (38). Dabei werden NHL entsprechend ihres Reifungsstadiums bzw. ihrer Ursprungszelllinie in Neoplasien der B- und T/NK-Zellreihe untergliedert und innerhalb dieser Zuordnung anhand morphologischer, molekulargenetischer, immunhistochemischer und klinischer Kriterien eingeteilt. In Tabelle 6 ist die WHO-Klassifikation für reifzellige B-Zell-Neoplasien dargestellt. Die aktuelle Fassung aus dem Jahr 2016 stellt eine Erweiterung und Erneuerung der 4. Ausgabe der WHO-Serie aus dem Jahr 2008 dar. Diese berücksichtigt vor allem auch neue Erkenntnisse in Bezug auf die Rolle des PatientInnenalters, spezifische anatomische Lokalisationen sowie charakteristische genetische Aberrationen (Translokationen, Mutationsprofile) (9). Darin neu beschriebene Erkrankungen

wurden zunächst als provisorische Entitäten aufgenommen, deren biologische Relevanz und Diagnostizierbarkeit in weiteren Studien bzw. in der Diagnostik erst noch bewiesen werden muss und für die noch kein Therapiestandard festgelegt wurde. Ziel war jedoch, neuere Daten von diagnostischer, prognostischer und therapeutischer Bedeutung mit aufzunehmen (39). Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom, nicht weiter spezifiziert (DLBCL, NOS), wird in der WHO-Klassifikation von anderen reifzelligen/blastischen B-Zell-Lymphomen unterschieden und durch die Definition des molekularen Typs (cell of origin, COO) weiter subklassifiziert. Innerhalb der Gruppe der DLBCL werden spezifische Varianten bzw. Subtypen durch die Lokalisation (ZNS, Mediastinum etc.), durch die Assoziation zu infektiösen Agenzien (*EBV*, *HHV8*) oder durch bestimmte genetischen Anomalien (*ALK*, *IRF4*) voneinander abgegrenzt (Tabelle 6). Eine in der revidierten Fassung neu definierte Krankheitskategorie stellen high-grade B-Zell-Lymphome dar. Zu dieser werden alle B-Zell Lymphome - auch das DLBCL, NOS - mit Double-hit(DH)- oder Triple-hit(TH)-genetischer Konstellation gezählt (39,40). Die genaue Festlegung der NHL-Entität dient als Grundlage für das weitere therapeutische Vorgehen.

**Tabelle 6:** Klassifikation der Reifzelligen B-Zell-Neoplasien nach der WHO-Klassifikation 2016 (39). *Kursiv gesetzte Entitäten stellen provisorische Entitäten dar, CLL chronische lymphatische Leukämie, DLBCL Diffus großzelliges B-Zell Lymphom, EBV Epstein-Barr Virus, MALT Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe, NOS nicht weiter spezifiziert, ZNS Zentralnervensystem, ALK anaplastische Lymphomkinase, HHV8 Humanes Herpesvirus 8, IRF4 Interferon-Regulations-Faktor 4*

#### Reifzellige B-Zell-Neoplasien

Monoklonale B-Zell-Lymphozytose vom CLL-Typ/Non-CLL-Typ  
 Chronische lymphatische Leukämie/kleinzelliges B-Zell-Lymphom  
 Prolymphozytenleukämie vom B-Typ  
 Lymphoplasmazytisches Lymphom  
 Makroglobulinämie Waldenström  
 Schwerkettenkrankheiten  
 Mantelzelllymphom  
 Follikuläres Lymphom  
 Follikuläres Lymphom vom pädiatrischen Typ  
*Großzelliges B-Zell-Lymphom mit Rearrangement von IRF4*  
 Primär kutanes Keimzentrumszelllymphom  
 Extranodales Marginalzonen B-Zell-Lymphom des MALT (MALT-Lymphom)  
 Nodales Marginalzonenlymphom  
*Pädiatrisches nodales Marginalzonenlymphom*  
 Splenisches Marginalzonenlymphom  
*Splenisches B-Zell-Lymphom/Leukämie, unklassifizierbar*  
*Diffuses splenisches Lymphom der roten Pulpa*

Harzellenleukämievariante  
*Haarzellenleukämie*  
 Plasmozytom  
 Plasmazellmyelom  
 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, NOS  
   Keimzentrums-B-Zell-Typ  
   Aktivierter B-Zell-Typ  
 T-Zell-/Histiozytenreiches B-Zell-Lymphom  
 Primäres DLBCL des ZNS  
 Primär kutanes B-Zell-Lymphom, „leg type“  
 EBV-positives DLBCL  
*EBV-positives mukokutanes Ulkus*  
 DLBCL assoziiert mit chronischer Entzündung  
 Fibrinassoziertes DLBCL  
 Lymphomatoide Granulomatose  
 Primär mediastinales (thymisches) B-Zell-Lymphom  
 Intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom  
 ALK-positives großzelliges B-Zell-Lymphom  
 Plasmoblastisches Lymphom  
 Primäres Effusionslymphom  
 Multizentrische Castleman-Erkrankung  
 HHV8-positives DLBCL, NOS  
 HHV8-positive germinotrope lymphoproliferative Erkrankung  
 Burkitt-Lymphom  
*Burkittähnliches Lymphom mit 11q-Aberration*  
 High-grade-B-Zell-Lymphom  
 High-grade-B-Zell-Lymphom, NOS  
 High-grade-B-Zell-Lymphom mit Rearrangements von *MYC* und *BCL2* und/oder *BCL6*  
 B-Zell-Lymphom, unklassifiziert mit Eigenschaften zwischen einem DLBCL und einem Hodgkin-Lymphom

## 1.6 Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, nicht weiter spezifiziert (NOS)

Das DLBCL gehört zu den aggressiven NHL der B-Zell-Reihe und stellt mit einem Anteil von 80% den häufigsten Vertreter aggressiver Lymphome dar. DLBCL, die nicht in eine der Subgruppen fallen, werden als nicht weiter spezifizierte, DLBCL bezeichnet. Etwa 80-85% der Fälle sind dem DLBCL, NOS zuzuordnen, während weitere 15-20% eine der 13 spezifischen DLBCL-Subgruppen zuzuordnen sind (41). Das DLBCL ist charakterisiert durch eine hohe histologische und molekulare Heterogenität, welche sich in unterschiedlichen klinischen Verläufen unter Standardtherapie widerspiegelt (42,43).

### **1.6.1 Epidemiologie und klinische Präsentation**

Das DLBCL ist mit einem Anteil von 25-40% der adulten NHLs und über 25.000 neu diagnostizierten Fällen in den USA im Jahr 2016 das häufigste maligne Lymphom der westlichen Welt (44–46). Die Inzidenz in Europa beträgt 3,8/100.000/Jahr und nimmt signifikant mit dem Alter zu (47,48). Das mediane Erkrankungsalter bei Diagnosestellung liegt in der 7. Lebensdekade, wenngleich das DLBCL auch bei jungen Erwachsenen und in seltenen Fällen auch bei Kindern vorkommen kann. Eine leichte Prädominanz zeigt sich beim männlichen Geschlecht (49,50).

Typischerweise präsentiert sich die Mehrheit der PatientInnen durch rasch wachsende Tumormassen in Lymphknoten und/oder extranodalen Organen. Etwa 1/3 der PatientInnen präsentiert sich mit B-Symptomatik, einige zeigen zusätzlich organspezifische Symptome. LDH und B2-Mikroglobulin sind oft erhöht (49). Der größte Teil der DLBCLs nimmt seinen Ursprung in den Lymphknoten (primär nodaler Befall), etwa 40% zeigen einen primär extranodalen Befall. Gehäuft ist dabei der Gastrointestinaltrakt betroffen, grundsätzlich aber sind primär extranodale Manifestationen in jedem Organ möglich (u.a. Haut, ZNS, Knochenmark) (49,51). Bei etwa 10-20% besteht eine konkordante oder diskordante Knochenmarksinfiltration (49,52,53).

### **1.6.2 Ätiologie und Risikofaktoren**

Der Großteil aller DLBCL entsteht *de novo* und wird als primäres DLBCL bezeichnet. Seltener entstehen sekundäre DLBCL durch Transformation eines niedrigmalignen (indolenten) Lymphoms, insbesondere dem folliculären Lymphom und der chronisch lymphatischen Leukämie (B-CLL mit sog. Richter-Transformation) (51). Die Ursache der Erkrankung ist weitgehend unbekannt. Zur Evaluierung von begünstigenden Faktoren für die Ausbildung eines DLBCLs existieren bereits zahlreiche Studien. Im Rahmen des interLymph-Datensatzes, bestehend aus zusammengeführten Daten von 19 epidemiologischen Studien aus Europa, Nordamerika und Australien, wurden über 4500 DLBCL-Fälle und über 22000 Kontrollen ausgewertet. Multivariable Analysen zeigten in dieser Studie ein erhöhtes Risiko für das DLBCL in Zusammenhang mit B-Zell aktivierenden

Autoimmunerkrankungen, positiver Familienanamnese (Verwandten 1. Grades), Hepatitis-C-Positivität sowie einem hohen Body-Mass-Index (BMI) im jungen Erwachsenenalter. Hingegen waren ein hoher sozioökonomischer Status, atopische Erkrankungen und gesteigerte Sonnenexposition mit einem erniedrigten DLBCL-Risiko assoziiert. Ebenso ließen sich Unterschiede hinsichtlich des Geschlechts und des Manifestationsortes feststellen. Insgesamt wird eine multifaktorielle Genese angenommen (10,54). Eine Zusammenfassung aller begünstigenden und protektiven Faktoren ist in Tabelle 7 dargestellt. Weiterhin wird in der Literatur *Corxiella burnetti* als infektiöser Risikofaktor beschrieben (22). In genomweiten Assoziationsstudien fanden Cerhan *et al.* 2016 auch Genloci, die mit einem stark erhöhten DLBCL-Risiko assoziiert waren (55).

**Tabelle 7:** Risikofaktoren für DLBCL (10)

Risiko erhöhende Faktoren für DLBCL	Risiko senkende Faktoren für DLBCL
<ul style="list-style-type: none"> <li>• B-Zell aktivierende Autoimmunerkrankungen</li> <li>• HCV-Positivität</li> <li>• NHL bei Verwandten 1. Grades</li> <li>• hoher BMI im jungen Erwachsenenalter</li> <li>• Nikotinkonsum</li> <li>• Berufliche Faktoren: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ FeldarbeiterInnen (Frauen)</li> <li>▪ Nähen, Sticken (Frauen)</li> <li>▪ FriseurInnen (Frauen)</li> <li>▪ FahrerInnen (Männer)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hoher sozioökonomischer Status</li> <li>• Atopische Erkrankungen</li> <li>• Erhöhte Sonnenexposition</li> <li>• niedriger BMI &lt;18 im Erwachsenenalter (Frauen)</li> <li>• Hormontherapie mit Beginn vor dem 50. Lebensjahr (Frauen)</li> <li>• Einnahme oraler Kontrazeptiva vor 1970 (Frauen)</li> <li>• Alkoholkonsum (Männer)</li> <li>• Bluttransfusion in Anamnese (Männer)</li> </ul>

### 1.6.3 Immunhistochemische Merkmale

Zur Bestimmung des Immunphänotyps wird die Methode der Immunhistochemie (IHC) und Durchflusszytometrie herangezogen.

DLBCL exprimieren charakteristische Pan-B-Zell-Marker wie CD19, CD20, CD22, CD79a sowie die B-Zell-Transkriptionsfaktoren PAX5, BOB1 und OCT2. Unter Umständen kann die Expression ein oder mehrerer Marker aber auch fehlen. In 50-70% der Fälle findet sich eine membranständige oder zytoplasmatische Ig-Expression, meist IgM, gefolgt von IgG und IgA (49). In 20-40% der Fälle wird eine Expression von CD10 beobachtet, die Expression des BCL6-Keimzentrumsmarkers

ist variabel und beträgt zwischen 60 und 90%. Zudem weisen 35-65% eine Expression des Postkeimzentrums- oder Plasmazellmarkers MUM1/IRF4 auf (56). Eine CD5-Positivität zeigt sich typischerweise in T-Zellen und kann in 10% der Fälle auch beim DLBCL beobachtet werden. Diese können durch maligne Transformation (B-CLL/SLL), häufiger aber *de novo* entstanden sein (44,56). Der Marker CD30 erweist sich in etwa 10-15% als positiv (57). Etwa 20-25% der DLBCL-Fälle zeigen auch eine Positivität für die Oberflächenantigene PD-L1 und PD-L2 (58). Von hoher prognostischer Relevanz ist die gemeinsame Expression des MYC- und BCL2-Proteins, welche bei 25-35% aller DLBCL-Fälle zu finden ist (59,60). Die Proliferationsrate (ki67) ist typischerweise hoch und liegt in der Regel über 40% (49). Neben ihrer diagnostischen Bedeutung, spielen immunphänotypische Analysen auch eine große Rolle bei der Evaluierung möglicher Zielmoleküle in Hinblick auf neue Therapieansätze (61). Als Oberflächenmarker mit potentiell prognostischem Wert werden neben der MYC-/BCL2- Koexpression auch die Antigene CD5 und CD30 diskutiert (siehe Kapitel 1.5.6).

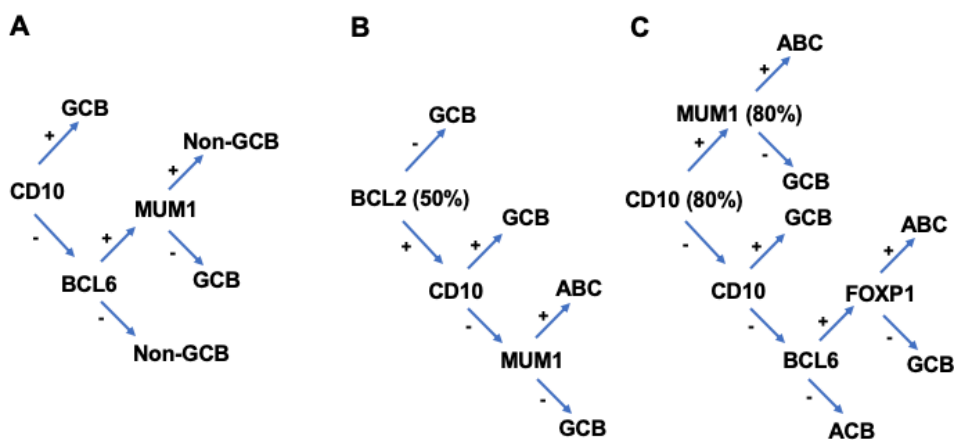
#### **1.6.4 “Cell-Of-Origin“-Klassifikation**

Mithilfe der c-DNA-Microarray -Technologie erstellten Alizadeh *et al.* 2000 erstmals Genexpressionsprofile des DLBCLs zur Identifizierung diagnostischer Subgruppen mit unterschiedlichen biologischen und prognostischen Eigenschaften, die Aufschluss über die klinische Heterogenität dieser Gruppe geben sollten (62). Aufgrund der ermittelten Expressionsprofile der malignen Zellen, konnte basierend auf Ähnlichkeiten mit der mutmaßlichen Ursprungszelllinie eine Unterteilung in den sogenannten Keimzentrums-B-Zell-Typ (germinal center B cell, GCB) und den aktivierten-B-Zell-Typ (activated B cell, ABC) erfolgen (62). Diese beiden Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer zu Grunde liegenden Pathomechanismen und zeigen unterschiedliche Überlebensraten, mit schlechterem Outcome für den ABC-Subtyp (63,64). Etwa 10-15% aller DLBCL-Fälle können jedoch nicht in eine der beiden Subgruppen klassifiziert werden. In späteren Genexpressionsanalysen wurde 2003 durch Rosenwald *et al.* ein weiterer Subtyp definiert, das Primärmediastinale B-Zell-Lymphom (PMBCL) (65).

Die Genexpressionsanalyse (Gene expression profiling, GEP) konnte sich in der Routineanwendung allerdings nicht als Subtypisierungsmethode durchsetzen.

Analog folgten diverse immunhistochemische Algorithmen, wovon der Hans-Algorithmus in der klinischen Praxis am weitesten verbreitet ist (Abbildung 2). Dieser basiert auf der Expression der Oberflächenmarker CD10, BCL6 und IRF4/MUM1: Alle CD10-positiven Fälle werden danach dem GCB-Typ zugeteilt. Bei Vorliegen einer CD10- Negativität und BCL6-Positivität ist die MUM1-Expression für die Gruppenzuordnung ausschlaggebend. Bei fehlender Expression beider Marker (CD10-/BCL6-) liegt ein Non-GCB-Typ vor (66). Daneben existieren zahlreiche weitere Schemata zur Subtypisierung nach der Ursprungszelle, beispielsweise der Choi- und der Muris-Algorithmus (Abbildung 2) (67,68).

Während die prognostische Relevanz der COO-Subtypisierung für die Methode der GEP mehrfach nachgewiesen werden konnte, ist der prognostische Wert für die IHC umstritten (63,69–72). In einer Metaanalyse von 24 Studien wurden die Überlebensraten der mittels GEP ermittelten Subgruppen mit denen der Hans-, Choi- und Muris-Algorithmen verglichen, wobei sich für die Methode der IHC keine signifikante prognostische Relevanz ergab (70).



**Abbildung 2:** Immunhistochemische Algorithmen für "Cell of Origin" - Subtypisierung. (A) Hans-Algorithmus. (B) Muris-Algorithmus. (C) Choi-Algorithmus. Adaptiert nach Chan *et al.* (44).

### 1.6.5 Pathophysiologie und molekulare Aspekte

In der Pathogenese der B-NHL, wie auch dem DLBCL, ist die Keimzentrumsreaktion (GC-reaction) als Zielstruktur maligner Transformation von zentraler Bedeutung. Das Vorkommen somatisch hypermutierter Immunglobulin-Gene in Tumorzellen gilt als irreversibler Marker für einen Keimzentrums-Ursprung

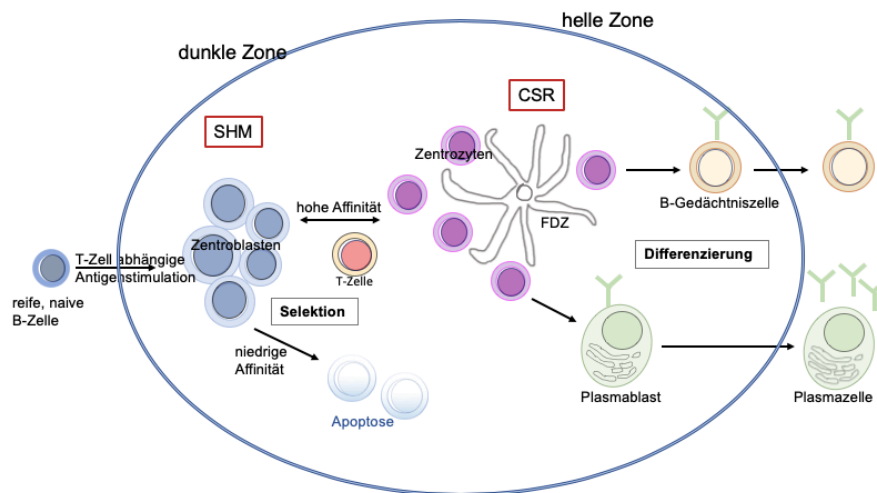
bzw. -Transit (73). Zwei Hauptmechanismen genetischer Läsionen werden beim DLBCL beobachtet - chromosomale Translokationen und aberrante somatische Hypermutationen (ASHM) - die als Nebenprodukte der AID (aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase)-abhängigen SHM und CSR im Keimzentrum oder durch fehlerhafte Prozesse bei der VDJ-Rekombination im Knochenmark entstehen können (74–76). NHL-assoziierte Translokationen führen typischerweise zu einer deregulierten Expression eines Protoonkogens, indem regulatorische Sequenzen (Enhancer oder Promotor) des heterologen Chromosoms in die Nähe der kodierenden Region des Zielgens transloziert werden (z.B. BCL2) (74). ASHM spielen ebenso eine bedeutende Rolle in der Lymphomgenese, mehr als 50% der neu diagnostizierten DLBCL-Fälle zeigen ASHM in Genen außerhalb der Ig-Genloci (75,77). Darunter fallen auch bekannte Proto-Onkogene wie *PIM1*, *MYC*, *PAX5* und *BCL6* (75). ASHM können eine deregulierte Expression des Zielgens oder aber eine strukturelle und funktionelle Änderung des Zielproteins zur Folge haben (74). Weitere genetische Aberrationen sind Punktmutationen, Deletionen sowie eine veränderte Kopienanzahl (77). Neben genetischen Aberrationen können auch epigenetische Modifikationen zur Lymphomentstehung beitragen, häufig handelt es sich um Histon- und Chromatinmodifikationen (Methylierung, Acetylierung), die die Genregulation beeinflussen (74,78,79). Aber auch die Rolle sogenannter nicht-kodierender mikroRNAs in der Pathophysiologie des DLBCL wurde mehrfach beschrieben (80).

#### **1.6.5.1 Die Keimzentrumsreaktion als Zielstruktur genetischer**

##### ***Alterationen***

Nach der antigenunabhängigen B-Zell-Reifung im Knochenmark erfolgt die antigenabhängige Reifung in den Follikeln sekundär lymphatischer Organe (Lymphknoten, Milz) (Abbildung 3). In den Keimzentren der Sekundärfollikel kommt es zunächst unter Th-Zell-abhängiger Antigenstimulation zu einer massiven Proliferation der naiven B-Zellen. Diese schnell proliferierenden B-Zellen werden auch als Zentroblasten bezeichnet und bilden die dunkle Zone des Keimzentrums (8). Dabei unterliegen sie dem Prozess der SHM in der variablen Region der IgG-Gene (IgV), wobei Punktmutationen, bevorzugt Einzelnukleotid-Substitutionen, aber auch Deletionen und Duplikationen in die Ig-Schwer- und Leichtkettengene

eingeführt werden. Dies soll eine Verbesserung der Antigenaffinität herbeiführen. Allerdings kann der Prozess der SHM auch in Nicht-Immunglobulin-Genen Punktmutationen induzieren, wie z.B. in der 5'-Region von BCL6. Dies kann zu einer Deregulation der BCL6-Aktivität führen. Das BCL6-Protein ist ein Transkriptions-Repressor, der verstärkt von Zentroblasten exprimiert wird und für die Bildung und Aufrechterhaltung des Keimzentrums essentiell ist. Es supprimiert Gene, die an Zellzyklusprogression, Apoptose und "DNA-damage-response" beteiligt sind. Weiterhin inhibiert BCL6 die Expression mehrerer, für die Plasmazelldifferenzierung essentieller Transkriptionsfaktoren, wie z.B. das BLIMP1-Protein, auch bekannt als Masterregulator der Plasmazelldifferenzierung. In der hellen Zone des Keimzentrums differenzieren sich die Zentroblasten in Zentrozyten und interagieren dort mit den antigenpräsentierenden, follikulären dendritischen Zellen. B-Zellen mit hochaffinem BCR für das präsentierte Antigen differenzieren sich weiter in langlebige Plasma- und Gedächtniszellen, während B-Zellen mit niedrig-affinem BCR der Apoptose verfallen. Des Weiteren kommt es durch intrachromosomale Rekombination in den Ig-Schwerketten zu einem Wechsel der Antikörperklasse von IgD und IgM zu IgG, IgA oder IgE. Beide beschriebenen Mechanismen sind AID-abhängig und initiieren Doppelstrangbrüche, die mit einer hohen Fehlerquote behaftet sind. Einen weiteren kritischen Prozess innerhalb der Keimzentrumsreaktion bietet die Plasmazelldifferenzierung. Zur Aufhebung der Differenzierungsblockade ist eine Herunterregulierung der BCL6-Expression erforderlich. Daran können zwei unterschiedliche Mechanismen beteiligt sein. Einerseits führt die Aktivierung von CD40 via CD40 Ligand (auf CD4+-T-Zellen exprimiert) zu einer NF- $\kappa$ B-vermittelten Aktivierung von IRF4 bzw. MUM1, was wiederum eine Transkriptionshemmung von BCL6 zur Folge hat. Andererseits führt die Stimulation des BCR zu einer MAPK-vermittelten Phosphorylierung von BCL6, wodurch BCL6 ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut wird. (77) Die BCL6-Funktion in DLBCL-Zellen kann indirekt oder direkt (Translokation, ASHM) dereguliert sein (vgl. Kapitel 1.5.5.2) (74).



**Abbildung 3:** Die Keimzentrumsreaktion (GC-reaction). Adaptiert nach Schneider *et al.* (81).

### 1.6.5.2 Molekulare Aspekte

#### BCL6-Deregulation:

Etwa 35% aller DLBCL-PatientInnen zeigen eine chromosomale Translokation des BCL6-Gens auf Chromosom 3q27, meist resultierend in einer Promotorsubstitution. Von über 20 alternativen Translokationspartnern, sind die Ig-Schwer- und Leichtkettengenloci dabei die häufigsten (74,77). Dadurch kommt es zu einer konstitutiven BCL6-Expression, die über einen Differenzierungsstopp und Hemmung der Apoptose zu einer erhöhten Zellproliferation führt (56). Grundsätzlich treten BCL6-Gen betreffende Translokationen häufiger im ABC- als im GCB-Subtyp auf (2:1) (77). In 75% aller DLBCL-Fälle sind multiple somatische Mutationen in der 5' regulatorischen Region von BCL6 als Ursache zu finden, resultierend aus dem physiologischen Prozess der SHM im Keimzentrum (77). Auch eine Vielzahl indirekter Mechanismen können zu einer Deregulation der BCL6-Funktion führen (74).

#### BCL2-Expression:

BCL2 ist ein antiapoptotisches Protein, das in der äußeren Membran von Mitochondrien lokalisiert ist und in Keimzentrumszellen typischerweise herunterreguliert vorliegt (51). Eine Überexpression von BCL2 wird in beiden DLBCL-Subtypen beobachtet, wobei sich die zugrunde liegenden genetischen Ereignisse jeweils unterscheiden (64). In 30-40% aller GCB-DLBCL kann eine

t(14;18)-Translokation nachgewiesen werden, bei der das BCL2-Gen unter die Kontrolle des IgH-Promotors gelangt und ektopisch exprimiert wird (82). Translokationen sind beim ABC-Subtypen nur selten. Allerdings zeigen auch 60% aller ABC-DLBCL PatientInnen erhöhte BCL2-Level, die typischerweise auf Amplifikationen des BCL2-Locus (46% aller ABC-DLBCL) oder aber genetische Aberrationen, die über Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges zu einer gesteigerten BCL2-Expression führen, zurückzuführen sind (56,60,64,83). Eine permanente BCL2-Expression hat einen Apoptose-Stopp im Keimzentrum zur Folge (56).

#### C-MYC-Expression:

C-MYC ist ein Transkriptionsfaktor, der in eine Vielzahl biologischer Prozesse involviert ist, unter anderem kontrolliert es Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose (84). Eine ektopische und konstitutive MYC-Expression kann in 10-14% aller GCB-DLBCLs nachgewiesen werden, meist resultierend aus Translokationen mit Beteiligung der Ig-Genloci (IgH, IgK, IgL), wie z.B. die t(8;14)-Translokation, aber auch mit nicht-Ig-Genloci (45,74).

Daneben zeigen 5-10% aller DLBCL eine "Double"- oder "Triple-hit"-Konstellation (Double-hit lymphoma, DHL; Triple-hit lymphoma, THL), bei denen zwei bzw. drei Translokationen (MYC und BCL2 und/oder BCL6) gleichzeitig vorliegen (74,85,86): Meist handelt es sich um eine Kombination von cMYC und BCL2 (ca. 65%), seltener um eine cMYC/BCL6- (15%) oder eine Triple-hit-Konstellation (20%) (49,87). Diese werden nach der aktuellen WHO-Klassifikation als "Hochmaligne B-Zell-Lymphome" klassifiziert (vgl. Kapitel 1.4.3) (39). MYC/BCL2-DHL und MYC/BCL2/BCL6-THL sind gehäuft im GCB-Subtypen vorliegend (91%) (88).

#### Immunevasion:

Nahezu 60% aller DLBCL zeigen eine fehlende Expression von MHC-Molekülen der Klasse 1, die normalerweise auf der Oberfläche aller kernhaltiger Zellen exprimiert werden und für die Erkennung durch zytotoxische T-Zellen erforderlich sind. Eine Vielzahl genetischer (z.B. Punktmutationen/Verluste der HLA/-B/-C-Loci, CD58-Mutationen) und epigenetischer Mechanismen sind diesem Prozess zugrunde liegend (74).

### Next-Generation-Sequencing-Technologie:

Die Identifikation rekurrenter genetischer Aberrationen (Genmutationen, Deletionen) in Tumorzellen des DLBCL mittels moderner Technologien, wie dem Next-Generation-Sequencing, war in den vergangenen Jahren immer wieder Gegenstand vieler Studien und ermöglichte ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen in der Lymphomgenese. Zwischen 30 und >100 Läsionen/DLBCL-Fall konnten identifiziert werden (74). Rekurrente Mutationen finden sich in Genen des Zellzyklus (Zellwachstum, Proliferation, Apoptose), Signaltransduktionskaskaden und epigenetischen Regulatorgenen (z.B. Histonmodifizierer) (49).

Die molekularen COO-Subtypen weisen unterschiedliche Repertoires genetischer Aberrationen auf, welche in Tabelle 8 zusammengefasst sind. In beiden Subtypen sind Mutationen in histon- bzw. chromatinmodifizierenden Enzymen rekurrent (KMT2D/MLL2, CREBBP/EP300). Zudem zeigen sich bei 60% aller DLBCL-Fälle genetische Aberrationen, die in Mechanismen der Immunevasion involviert sind (CD58, B2M/HLA-I, CITA, PD-L1). Charakteristisch für GCB-DLBCL sind vor allem Mutationen der histonmodifizierenden EZH2-Methyltransferase, BCL2- und MYC-Translokationen mit konstitutiver Überexpression, sowie Mutationen in Genen für die B-Zell-Migration (S1PR2, GNA13). Der ABC-Typ hingegen ist durch eine konstitutiv aktivierte B-Zell- und T-Zell-Rezeptor-Signalkaskade, unter anderem durch Mutationen von MYD88, CD79A/B und CARD11, mit Aktivierung von NF- $\kappa$ B und JAK/STAT, gekennzeichnet. Weiterhin wurden im ABC-Typ genetische Aberrationen im Transkriptionsfaktor PRDM1/BLIMP1 beobachtet, was eine wichtige Rolle in der terminalen Differenzierung der aktivierten B-Zellen zu Plasmazellen hat (vgl. Kapitel 1.5.5.1). (49,74) Bei ca. 55% aller GCB-DLBCL und nur 14% aller ABC-DLBCL besteht ein Expressionsverlust des Tumorsuppressors PTEN, resultierend in einer konstitutiven Aktivierung der Phosphatidyl-3-Kinase (PI3K)/AKT- Signalkaskade, die Zellwachstum und -proliferation reguliert. Als ursächlich sind PTEN-Deletionen oder Amplifikationen der miR-17-92 zu sehen (74,89). Weitere Mutationen wurden für Gene der *NOTCH*-Signalkaskade, *CDNK2A* und *TP53* (20%) beschrieben (49,90,91).

**Tabelle 8:** Assoziierte Mutationsprofile mit den "Cell-Of-Origin"-Subtypen (44,74)

<b>GCB-DLBCL</b>	<b>GCB- und ABC-DLBCL</b>	<b>ABC-DLBCL</b>
<u>BCL2- und MYC-Translokationen</u>	<u>Andere Histon-/Chromatin-modifizierer:</u> KMT2D/MLL2, CREBBP/EP300	<u>BCL2-und MYC-Amplifikationen</u>
<u>Histon-/Chromatinmodifizierer:</u> EZH2	<u>Immunevasion:</u> CD58, B2M/HLA-1, CIITA, PD-L1	<u>BCR-Signalweg:</u> CD798, CARD11
<u>B-Zell-Migration:</u> S1PR2, GNA13	<u>BCL6-Deregulation</u>	<u>Toll-like-Rezeptor-Signalweg:</u> MYD88-Mutation
<u>Tumornekrosefaktor-Rezeptor:</u> TNFRS14	<u>FOXO1-Mutationen</u>	<u>B-Zell-Differenzierung:</u> PRDM1/BLIMP1
<u>PTEN-Deletion</u>	<u>TP53-Mutation</u>	<u>Ubiquitinierungs-Modifikation:</u> TNFAIP3/A20
<u>miR17-92- Zugewinn</u>		

Mittels Array-CGH-Analysen (Array-Comparative-Genomic-Hybridization) konnten in Studien auch genomische Imbalancen (chromosomale Zugewinne/Verluste) für beide Subtypen nachgewiesen werden (92,93) .

### 1.6.6 Prognostische Faktoren

Klinische prognostische Faktoren: In Kapitel 1.4.2 wurden bereits verschiedene Prognose-Scores vorgestellt (IPI, aalPI, NCCN-IPI). Eine konkordante (großzellige) Knochenmarksinfiltration erwies sich in einer großen retrospektiven Studie von Sehn *et al.* als IPI-unabhängiger negativer prognostischer Marker für das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben (52). Ebenso ist ein großer Tumorbulk von >7,5cm als ein vom IPI unabhängiger Risikofaktor anzusehen (94).

Die prognostische Signifikanz morphologischer Varianten ist kontrovers. Die zentroblastische Variante ist in der Rituximab-Ära mit einer schlechteren Prognose assoziiert (95).

Cell-of-Origin-Klassifikation: Die Prognostische Signifikanz konnte für die COO-Subtypisierung mittels GEP mehrfach nachgewiesen werden, während die prognostische Aussagekraft der IHC unsicher ist (vgl. Kapitel 1.5.4). Die beiden Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Überlebensraten unter R-CHOP-

Therapie deutlich. Der GCB-DLBCL-Typ zeigt sich dabei dem ABC-Subtyp überlegen (5-Jahres-Überlebensrate: 80% vs. 50%) (64).

In zahlreichen Studien konnte bestätigt werden, dass die gleichzeitige Expression von MYC- und BCL2-Protein ("double-expressor lymphoma", DEL) - ermittelt durch IHC - Testungen- mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert ist (59,60,96,97). Der MYC/BCL2-Phänotyp ist häufiger bei ABC- bzw. Non-GCB-Subtypen zu finden und stellt möglicherweise eine Erklärung für die schlechtere Prognose von PatientInnen mit ABC-DLBCL dar (60).

Des Weiteren werden die Oberflächenmarker CD5 und CD30 als phänotypische prognostische Faktoren diskutiert. PatientInnen mit CD5-positivem DLBCL zeigen häufig einen aggressiveren klinischen Verlauf, gehäuft bei älteren PatientInnen, mit extranodalen Manifestationen, fortgeschrittenem Tumorstadium, erhöhtem LDH-Level sowie einem hohen IPI-Score. Diverse Studien haben bestätigt, dass CD5-positive DLBCL gegenüber CD5-negativen mit R-CHOP behandelten PatientInnen mit einem schlechteren Outcome assoziiert sind, der sich auch über aggressivere Chemotherapie-Regime hinweg halten konnte. Die Datenlage zur prognostischen Bedeutung der CD30-Expression in DLBCL ist inkonsistent. In der Mehrzahl der Studien korrelierten CD30-positive DLBCL (außer EBV-assoziierte) mit einer günstigeren Prognose als CD30-negative DLBCL (44,49,61).

Als genetische Aberrationen mit prognostischem Wert sind vor allem MYC-Rearrangements zu nennen. In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass *myc*-Translokationen mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert sind (98–101). Dabei scheint auch der *myc*-Translokationspartner eine Rolle zu spielen. Translokationen unter Einbeziehung des Ig-Locus haben verglichen mit Nicht-Ig-Translokationen eine schlechtere Prognose (102,103). Uneinigkeit besteht über den prognostischen Wert einer erhöhten Kopienzahl von *c-myc* (49).

Sogenannte "double-hit"-, oder "triple-hit"-Konstellationen (DHL, THL) (vgl. Kapitel 1.5.5.2) sind mit einem aggressiveren klinischen Verlauf, Resistenz gegenüber Immunchemotherapien sowie einer deutlich schlechteren Prognose mit R-CHOP-Standardtherapie verbunden (2-Jahres-Überlebensrate 25%). (61)

Die COO-Subtypisierung, CD5-Evaluierung und Evaluierung der MYC/BCL2-Koexpression werden von der WHO daher in der aktuellen Fassung für alle neu diagnostizierten DLBCL-Fälle empfohlen. (39,104)

### **1.6.7 Therapie**

Als Standard-Chemotherapie hat sich das seit den 1970er Jahren eingesetzte CHOP-Schema etabliert, welches die Wirkstoffe Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison enthält. Eine Intensivierung der Chemotherapie durch Hinzunahme weiterer Substanzen, wie z.B. Methotrexat oder Bleomycin zeigten sich demgegenüber nicht überlegen (105). Auch beim Vergleich von aggressiveren Chemotherapie-Regimen der sogenannten 2. und 3. Generation (z.B. MACOB-B, m-BACOD) mit dem CHOP-Schema Anfang der 90er Jahre, konnte sich das CHOP-Regime als beste verfügbare Therapie für höhere Tumorstadien durchsetzen (106). Der Durchbruch in der Therapie des DLBCL gelang durch die Hinzunahme des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab in das CHOP-Regime, wodurch Therapieansprechen, ereignisfreies Überleben und Gesamtüberleben deutlich verbessert werden konnten (107–110).

#### **1.6.7.1 Erstlinientherapie**

Das Rückgrat aller Therapiestrategien bietet eine kombinierte Immun- und Chemotherapie, bestehend aus 6-8 Zyklen CHOP-Polychemotherapie sowie 6-8 Gaben des monoklonalen Anti-CD20-Antikörper Rituximab. Diese wird alle 2 (R-CHOP-14) bzw. 3 Wochen (R-CHOP-21) wiederholt. (111)

In Hinblick auf die einzuschlagende Therapiestrategie werden nach den aktuellen Leitlinien der ESMO (European Society for Medical Oncology) folgende risikoadaptierte Empfehlungen unterschieden:

- a) Junge PatientInnen mit niedrigem Risiko (aalPI = 0, kein Bulk):

Die Standardtherapie für diese PatientInnen beinhaltet 6 Zyklen des CHOP-Protokolls in Kombination mit 6 Gaben Rituximab in 21-tägigen Intervallen (6

x R-CHOP-21). Eine zusätzliche Radiotherapie brachte in dieser PatientInnengruppe keinen Benefit (24).

- b) Junge PatientInnen mit niedrigem (aaPI = 0) oder niedrig-intermediärem Risiko (aaPI = 1) ohne Bulk:

Basierend auf Ergebnissen der MINT-Studie wird für diese PatientInnengruppe eine 6xR-CHOP-21 mit Bestrahlung des Tumorbulks oder alternativ eine R-ACVBP -Therapie (Rituximab + Adriamycin, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vindesin, Bleomycin und Prednisolon) ohne Bestrahlung als Standard empfohlen (24).

- c) Junge PatientInnen mit hohem oder intermediär-hohem Risiko (aaPI 2 oder 3):

Eine Therapiestandard für diese Population ist noch nicht festgelegt. 6-8 Zyklen des CHOP-Protokolls in Kombination mit 8 Gaben Rituximab in 21-tägigen Intervallen (8 x R-CHOP-21) ist die am häufigsten applizierte Therapie. Eine R-Chemotherapie gefolgt von einer Hochdosis-Chemotherapie (HDC) und autologer Stammzelltransplantation (ASCT) erbrachte im Vergleich mit einer alleinigen R-Chemotherapie zwar einen Benefit im progressionsfreien Überleben aber keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben. Eine Hochdosistherapie mit Stammzelltransplantation als Teil der Primärtherapie wird daher außerhalb von Studien nicht empfohlen (24). Auch die Wirksamkeit intensivierter Chemotherapien wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. In einer randomisierten, Interim-PET-gesteuerten Studie war R-ACVBP der R-CHOP-Therapie nicht überlegen (112). Mit dem R-CHOEP-Protokoll (Hinzugabe von Etoposid) wurden in der Mega-CHOEP-Studie der DSHNHL (Deutsche Studiengruppe für Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome) gute Ergebnisse erzielt, im Sinne eines 3-Jahres-Gesamtüberleben von 91% (113). Ein direkter Vergleich mit dem konventionellen R-CHOP-Regime erfolgte allerdings nicht (24).

d) Ältere PatientInnen (60-80 Jahre):

Die Standardtherapie für diese PatientInnengruppe beinhaltet 8 Zyklen des CHOP-Protokolls in Kombination mit 8 Gaben Rituximab in 21-tägigen Intervallen (8 x R-CHOP-21). Zwei R-CHOP-21 und R-CHOP-14 vergleichende Studien zeigten keinen signifikanten Unterschied im Überleben auf. Bei Anwendung von R-CHOP-14 ist die Verabreichung von 6 Zyklen plus zwei zusätzliche Rituximab-Gaben ausreichend, mit dem Vorteil, dass die Zeit unter Chemotherapie verkürzt ist (10 vs. 21 Wochen). Eine längere Rituximabexposition führte bei älteren HochrisikopatientInnen in der SMARTE-R-CHOP14 Studie zu einem verbesserten Outcome. Eine konsolidierende Radiotherapie erbrachte bei PatientInnen mit lokalisierten Tumorstadien (IPI = 0) keinen Benefit, für PatientInnen mit "bulky disease" wird hingegen eine Bestrahlung empfohlen. (24,111)

e) PatientInnen > 80 Jahre:

Für älteren PatientInnen > 80 Jahre wird grundsätzlich ein dosisreduziertes R-CHOP-Protokoll empfohlen, das sogenannte R-miniCHOP-Protokoll. Bei PatientInnen mit kardialer Dysfunktion besteht die Möglichkeit, das im R-CHOP-Schema enthaltene Doxorubicin durch liposomales Doxorubicin zu ersetzen. Ein geriatrisches Assessment ist in dieser Gruppe zwingend erforderlich. (24)

### **1.6.7.2 Therapie refraktärer und rezidivierter DLBCL**

Als Standardtherapie des rezidivierten DLBCL gilt für junge PatientInnen unterhalb des 65.-70. Lebensjahres eine Salvage-Therapie mit R-ICE (Rituximab, Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid), R-DHAP (Rituximab, Cisplatin, Cytarabin, Dexamethason) oder R-GDP (Rituximab, Cisplatin, Gemcitabin, Dexamethason), gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation (ASCT). Als Hochdosistherapie wird meist das BEAM-Regime (Carmustin, Etoposid, Cytarabin, Melphalan) verwendet. Für PatientInnen mit chemorefraktärer Erkrankung, Frührelaps (< 12 Monate nach Erreichen einer CR nach Erstlinientherapie) oder Rückfall nach ASCT kann eine allogene Stammzelltransplantation in Betracht gezogen werden (24). Eine therapeutische Alternative stellt die Behandlung mit sogenannten chimären

Antigen-Rezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen) dar (114). Für PatientInnen, die aufgrund von Komorbiditäten nicht für eine Hochdosistherapie geeignet sind, bieten sich andere Therapieregime, wie z.B. das R-GEMOX-Regime (Rituximab, Gemcitabin, Oxaliplatin) an (24).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Datenerfassung

Es erfolgte zunächst eine retrospektive Erfassung aller PatientInnen zwischen April 1991 und Oktober 2018, die nach den Kriterien der WHO-Klassifikation (2008) an der Pathologie des LKH Graz als primäres DLBCL diagnostiziert wurden und am LKH Graz innerhalb dieses Zeitraums in Behandlung waren. Insgesamt umfasst die Kohorte 552 PatientInnen. Erfasst wurden Name, Geschlecht, Geburtsdatum, molekularer Subtyp, Datum der Erstdiagnose, Rezidiv und Datum dessen, Letztkontakt, Todesdatum sowie folgende immunhistochemische Marker, die routinemäßig in der DLBCL-Kohorte erhoben wurden (Tabelle 9):

**Tabelle 9:** Immunhistochemische Marker

CD3	CD5	CD10	CD15	CD20	CD21	CD30	CD79a
CD117	FOX-P1	PAX-5	BCL2	BCL6	MUM1	cMYC	p53
PD1	PDL1	PDL2	GCET1	LK Kappa	LK Lamda	MIB-1	

Die oben genannten Daten wurden dem MEDOC-System des LKH Graz entnommen. Dazu erfolgte einerseits die Durchsicht histopathologischer Diagnosebefunde hinsichtlich der genannten Marker, andererseits wurden vorliegenden Arztbriefe bzw. Befunde auf Rezidive, Letztkontakt und Todesdatum hin geprüft. Die Speicherung der erhobenen Daten erfolgte mit Microsoft Excel (Version 16.35).

Als Marker-Positivität wurden alle Expressionsgrade > 0% gewertet. Für MIB-1 wurden die Expressionsgrade in Gruppen eingeteilt (<5%, 5-20%, 20-50%, >50%).

## 2.2 Statistische Auswertung

Für die deskriptive Datenanalyse sowie deren graphische Veranschaulichung wurde IBM SPSS Statistics (Version 26) genutzt. Weitere statistische Datenanalysen (Chi-Quadrat-Test, Kaplan-Meier-Kurven, Log-Rank-Test, Cox-Regressionsanalyse) wurden mithilfe des Programms R Core T (Version 3.6.3) und entsprechenden R-Paketen (Survminer (Version 0.4.6); Survival Analysis (Version 3.1-11)) vorgenommen.

Zunächst erfolgte jeweils die Prüfung von Zusammenhängen zwischen der Expression des jeweiligen Markers und dem EFS24, definiert als ereignisfreies Überleben (Ereignis = Rezidiv oder Tod) innerhalb der ersten 24 Monaten nach Erstdiagnose. Lag die Zeit vom Erstdiagnosedatum bis zum Auftreten eines Rezidivs/Tod innerhalb des Zeitfensters von 24 Monaten, wurde dies als EFS24-positiv gewertet. Bei einem ereignisfreien Intervall  $> 24$  Monaten wurde dies als negativer EFS24 gewertet. Zur Untersuchung des Zusammenhangs der verschiedenen Marker und dem EFS24 wurden Kreuztabellen angelegt und die Variablen mittels Pearsons Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit geprüft. Der Bestand der Signifikanz wurde jeweils auch mit 10 000 Monte-Carlo Simulationen geprüft.

Nachfolgend wurden das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben in Bezug auf die einzelnen Marker analysiert. Dazu wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt und jeweils zwei PatientInnengruppen ("Marker exprimiert"/"Marker nicht exprimiert") hinsichtlich Gesamtüberleben und krankheitsfreien Überleben miteinander verglichen. Mittels Log-Rank Test und Cox-Regressionsmodell wurden die Überlebenszeiten beider Gruppen dann auf signifikante Unterschiede geprüft.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Deskriptive Statistik

#### 3.1.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Das Gesamtkollektiv im Umfang von 553 PatientInnen zeigte eine ausgeglichene Geschlechterverteilung. Die Anzahl weiblicher Personen betrug 275 (49,7%) und die Anzahl männlicher Personen 278 (50,3%), wie in Abbildung 5 dargestellt.

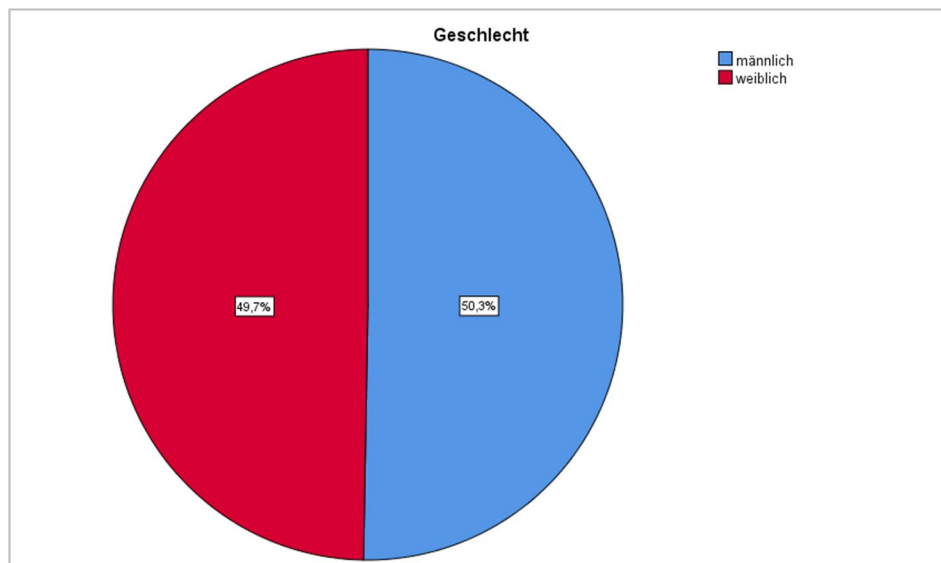


Abbildung 4: Geschlechterverteilung der Studienpopulation

Das mediane Alter bei Erstdiagnose lag bei 66 Jahren, der Altersdurchschnitt bei 63,8 Jahren. Die Standardabweichung betrug 16,36 Jahre. Der jüngste Patient war zum Diagnosezeitpunkt 18 Jahre alt, die älteste Patientin 93 Jahre, was einer Spannweite von 75 Jahren entspricht (Abbildung 6).

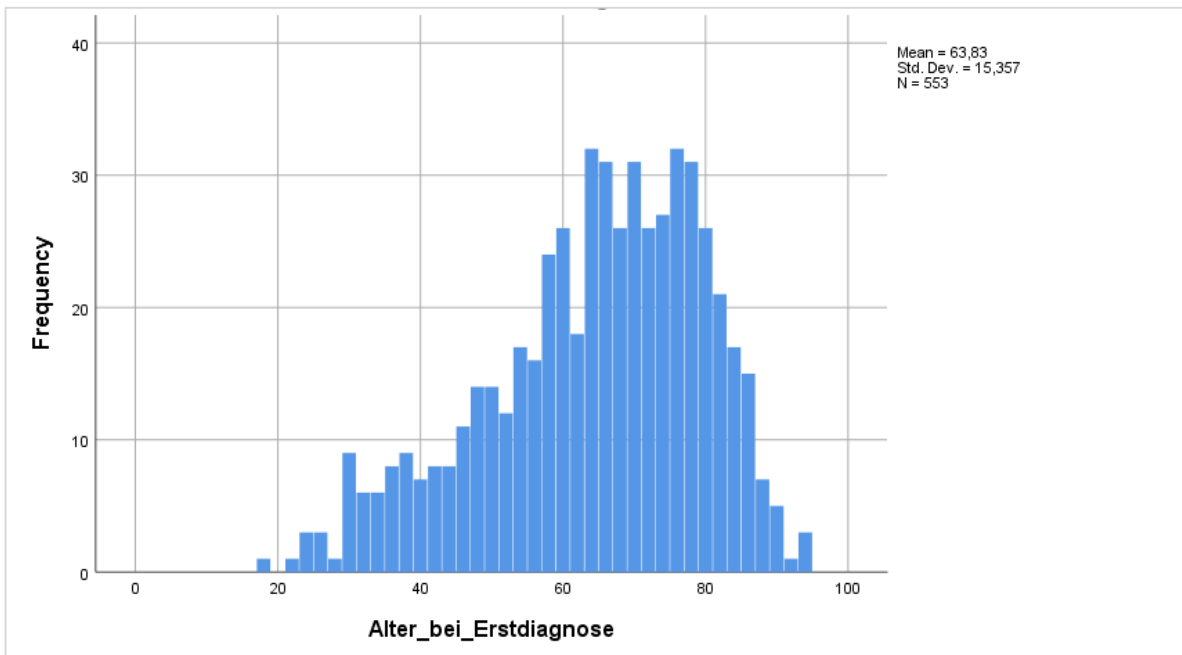


Abbildung 5: Altersverteilung zum Diagnosezeitpunkt

Zum Zeitpunkt des jeweiligen Letztkontaktes waren 181 PatientInnen bereits verstorben, entsprechend einem Anteil von 32,7%, 372 PatientInnen bzw. 67,3% waren zum Zeitpunkt des Letztkontaktes noch am Leben.

Wie in Abbildung 7 zu sehen, lag das Durchschnittsalter der im Studienverlauf verstorbenen PatientInnen bei 72,7 Jahren. Der jüngste Patient starb im Alter von 25 Jahren, der älteste mit 94 Jahren.

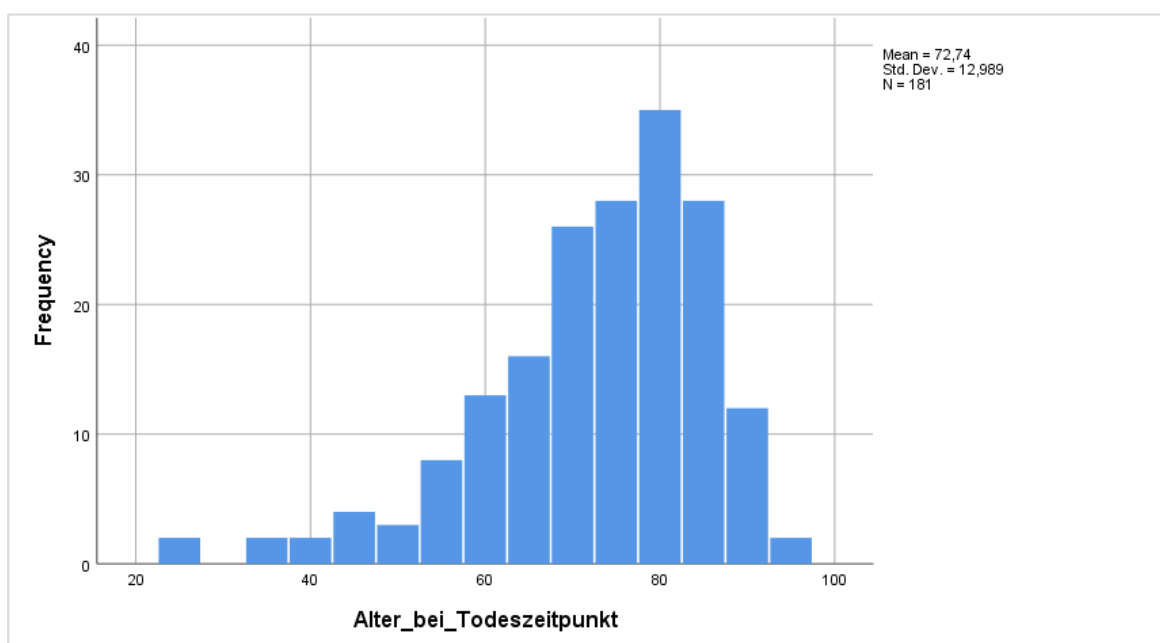


Abbildung 6: Altersverteilung der verstorbenen PatientInnen im angegebenen Beobachtungszeitraum

Der Rezidivstatus konnte für 541 PatientInnen erfasst werden. Davon wiesen 130 PatientInnen innerhalb des genannten Beobachtungszeitraums ein Rezidiv auf, entsprechend einem Anteil von 24%. Zur Krankheitsprogression unter Therapie kam es bei 11 PatientInnen (2%).

### 3.1.1.1 Immunhistochemische Marker

Im Rahmen der Datenanalyse wurden aus dem PatientInnenarchiv histopathologische Diagnosebefunde 23 immunhistochemischer Marker in den malignen Zellen untersucht.

In der nachfolgenden Tabelle sind die ermittelten Häufigkeiten für jeden Marker einzeln dargestellt. Insgesamt ließen sich je nach Marker zwischen 36 und 501 gültige Daten erfassen. Die typischen Pan-B-Zell-Marker wie CD20, CD79a sowie der B-Zell-Transkriptionsfaktor PAX5 werden wie zu erwarten in >98% der malignen Zellen exprimiert, bei jeweils ähnlichen Datensatzgrößen. Die Expression des Markers CD 10 zeigt sich bei etwa 32 % (Gesamt n=453). Der Marker CD30 erweist sich in etwa 43 % der Fälle als positiv von 400. Auch die BCL2-Expression ließ sich bei 446 erfassen und zeigt bei 79% eine Positivität. Der Marker CD117 wird in einem Anteil von 8% exprimiert bei einem Datensatz von 36.

Tabelle 10: Häufigkeit erhobener Biomarker

	Expressions-status erhebbar	positiv	negativ	positiv [%]	negativ [%]	Expressions-status nicht erhebbar
<b>CD3</b>	480	6	474	1,25	98,75	73
<b>CD5</b>	373	25	348	6,70	93,29	180
<b>CD10</b>	453	143	310	31, 57	68,43	100
<b>CD15</b>	112	9	103	8,04	91,96	441
<b>CD20</b>	501	497	4	99,20	0,80	52
<b>CD21</b>	171	4	167	2,34	97,66	382
<b>CD30</b>	400	173	227	43,25	56,75	153
<b>CD79a</b>	137	136	1	99,27	0,73	416
<b>CD117</b>	36	3	33	8,33	91,67	517

<b>FOX-P1</b>	208	184	24	88,46	11,54	345
<b>PAX-5</b>	73	72	1	98,63	1,37	480
<b>EBER</b>	187	27	160	14,44	85,56	366
<b>BCL-2</b>	446	353	93	79,15	20,85	107
<b>BCL-6</b>	380	300	80	78,95	21,05	173
<b>MUM-1</b>	361	259	102	71,75	28,25	192
<b>GCET-1</b>	202	54	148	26,73	73,27	351
<b>LK Kappa</b>	182	111	71	60,99	39,01	371
<b>LK Lambda</b>	178	66	112	37,08	62,92	375
<b>c-MYC</b>	141	97	44	68,79	31,20	412
<b>p53</b>	351	215	136	61,25	38,75	202
<b>PD1</b>	264	24	240	9,09	90,91	289
<b>PDL1</b>	268	107	161	39,93	60,07	285
<b>PDL2</b>	267	210	57	78,65	21,35	286
<b>MIB (%)</b>	424	424	0	100	0	129
< 5		0		0		
5-20		2		0,47		
20-50		24		5,66		
>50		400		94,34		

## 3.2 Kreuztabellen

### 3.2.1 Zusammenhang Biomarker und EFS24

Um zu überprüfen, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen der Expression der verschiedenen Marker und dem EFS24 besteht, wurde für jeden einzelnen Marker eine Kreuztabelle angelegt und der Zusammenhang mittels Chi-Quadrat-Methode getestet. Mit der Monte-Carlo Simulation (Anzahl 10 000) wurde überprüft, ob die ermittelte Signifikanz Bestand hat.

#### CD30

Die Prüfung des Zusammenhangs zwischen der CD30-Expression und dem EFS24 mittels Pearsons Chi-Quadrat-Test mit Monte-Carlo Simulation ist in Tabelle 11 dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0.01$ ) zwischen der CD30-Expression und dem EFS24.

**Tabelle 11:** Kreuztabelle CD30-Expression und EFS24

CD30-Expression	EFS24	
	NEIN	JA
0 (negativ)	180	40
1 (positiv)	156	16

**Tabelle 12:** Pearsons Chi-Quadrat-Test mit Monte-Carlo Simulationen (Anzahl der Simulationen = 10 000) zur Kreuztabelle CD30 und EFS24

	$\chi^2$	df	p-value
Chi-Quadrat nach Pearson	6,2156	1	0,01

## EBER

Die Prüfung des Zusammenhangs zwischen der EBER-Expression und dem EFS24 mittels Pearsons Chi-Quadrat-Test mit Monte-Carlo Simulation ist in Tabelle 13 dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0.03$ ) zwischen der EBER-Expression und dem EFS24.

**Tabelle 13:** Kreuztabelle EBER-Expression und EFS24

EBER-Expression	EFS24	
	NEIN	JA
0 (negativ)	132	27
1 (positiv)	26	0

**Tabelle 14:** Pearsons Chi-Quadrat-Test mit Monte Carlo Simulationen (Anzahl der Simulationen = 10 000) zur Kreuztabelle EBER und EFS24

	$\chi^2$	df	p-value
Chi-Quadrat nach Pearson	5,1696	1	0,03

## MUM1

Die Prüfung des Zusammenhangs zwischen der MUM1-Expression und dem EFS24 mittels Pearsons Chi-Quadrat-Test mit Monte-Carlo Simulation ist in Tabelle 15 dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0.03$ ) zwischen der MUM1-Expression und dem EFS24.

**Tabelle 15:** Kreuztabelle MUM1-Expression und EFS2

MUM1-Expression	EFS24	
	NEIN	JA
0 (negativ)	92	9
1 (positiv)	210	46

**Tabelle 16:** Pearsons Chi-Quadrat-Test mit Monte Carlo Simulationen (Anzahl der Simulationen = 10 000) zur Kreuztabelle MUM1 und EFS24

	$\chi^2$	df	p-value
Chi-Quadrat nach Pearson	4,5594	1	0,03

### 3.3 Kaplan-Meier-Überlebenskurven

Zu jedem in Kapitel 2.1 genannten Marker wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt, um die Überlebenszeiten (Gesamtüberleben, krankheitsfreies Überleben) für PatientInnen mit DLBCL in Bezug auf die Marker-Expression zunächst deskriptiv miteinander zu vergleichen. Mittels Log-Rank Test wurde geprüft, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenszeiten dieser Gruppen (Marker-exprimiert; Marker-nicht exprimiert) besteht.

Aus Gründen der Übersicht sind nur die Überlebenskurven derjenigen Marker aufgezeigt, die signifikante Ergebnisse im Log-Rank Test lieferten.

### 3.3.1 Gesamtüberleben (OS)

Nachfolgend ist die Analyse des Gesamtüberlebens (overall survival; OS) in Bezug auf die Marker-Expression für jeden Marker dargestellt.

#### CD10

In Bezug auf die CD10-Expression zeigte sich, wie in Abbildung 8 dargestellt, ein signifikanter Unterschied im OS zugunsten der PatientInnen mit CD10-positivem DLBCL. Die Prüfung mittels Log-Rank-Test ergab  $\chi^2 = 4,6673$  und  $p = 0.031$ .

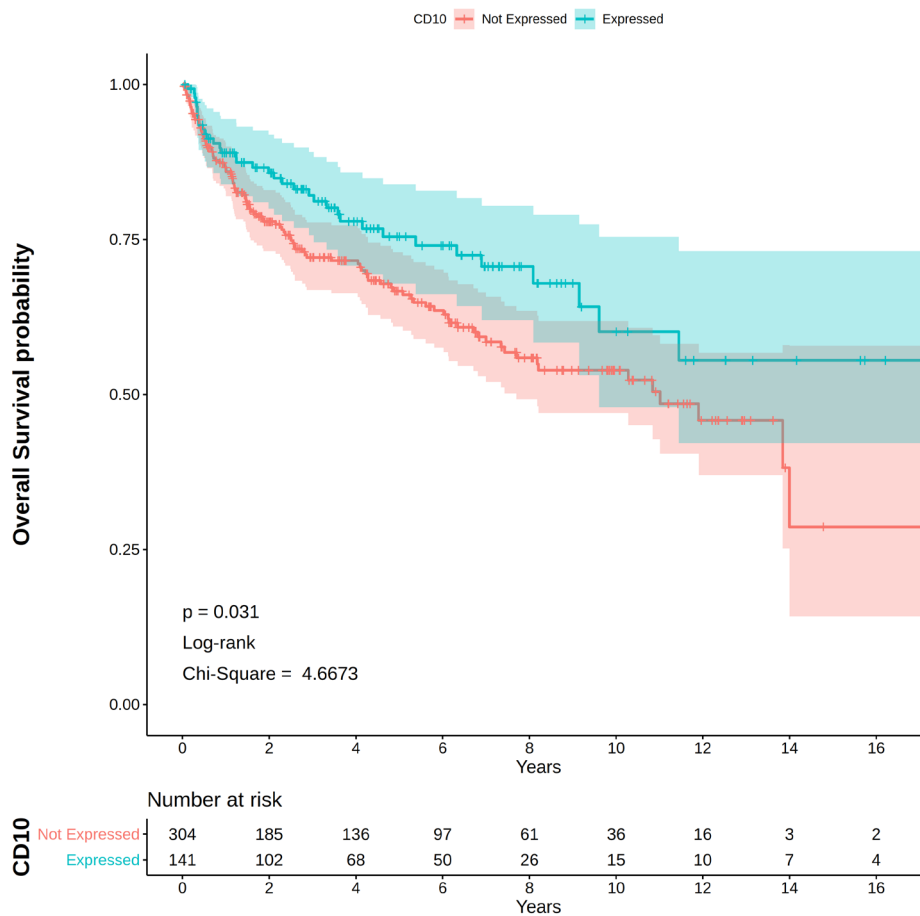
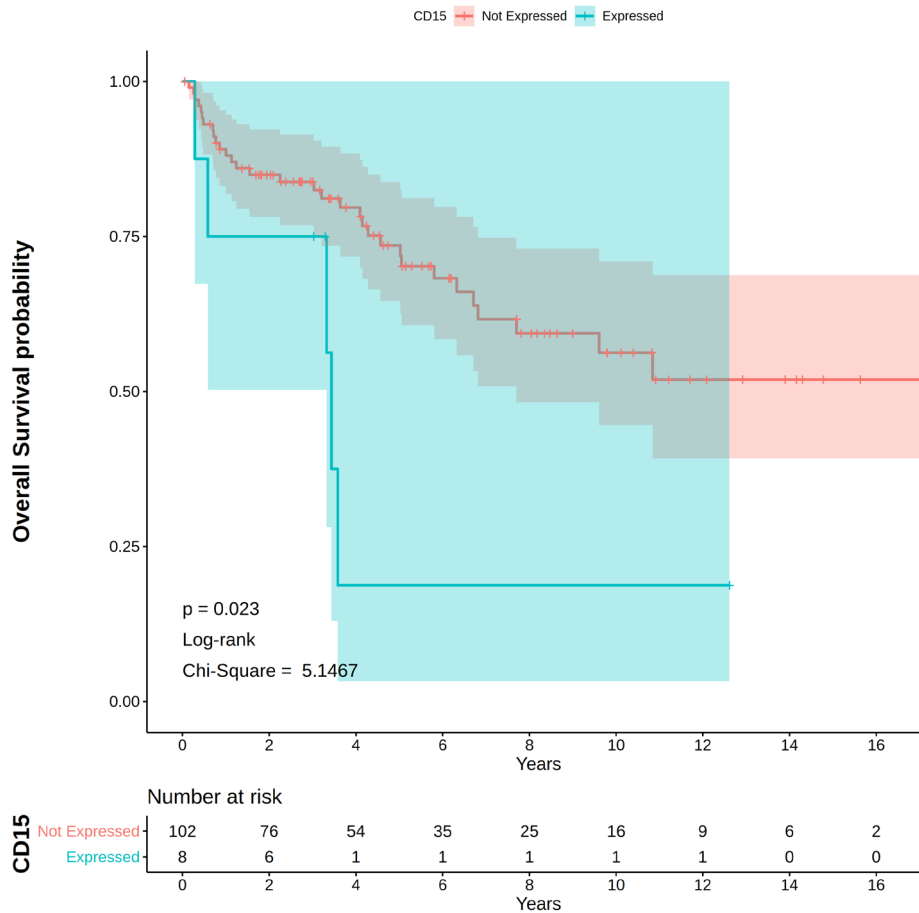


Abbildung 7: Vergleich OS für PatientInnen mit CD10+ und CD10- DLBCL

## CD15

In Bezug auf die CD15-Expression zeigte sich, wie in Abbildung 9 dargestellt, ein signifikanter Unterschied im OS zugunsten der PatientInnen mit CD15-negativem DLBCL. Die Prüfung mittels Log-Rank-Test ergab  $\chi^2 = 5,1467$  und  $p = 0.023$ .



**Abbildung 8:** Vergleich OS für PatientInnen mit CD15+ und CD15-

## CD30

In Bezug auf die CD30-Expression zeigte sich, wie in Abbildung 10 dargestellt, ein signifikanter Unterschied im OS zugunsten der PatientInnen mit CD30-positivem DLBCL. Die Prüfung mittels Log-Rank-Test ergab  $\chi^2 = 6,0287$  und  $p = 0.014$ .

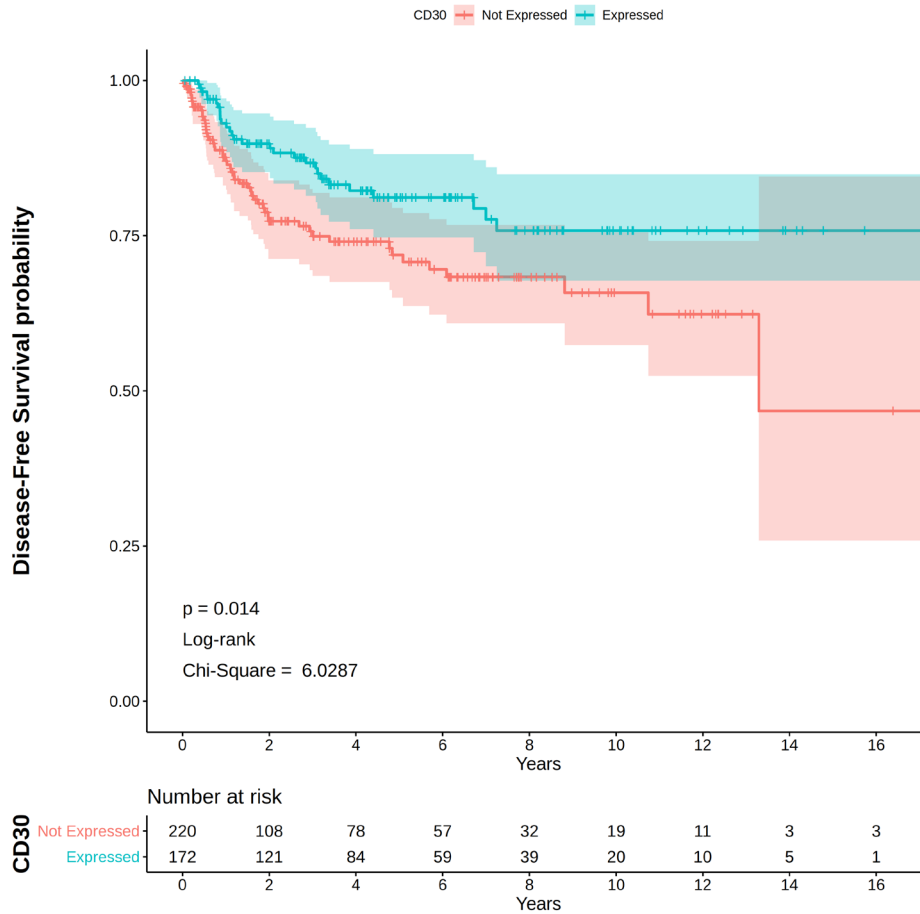
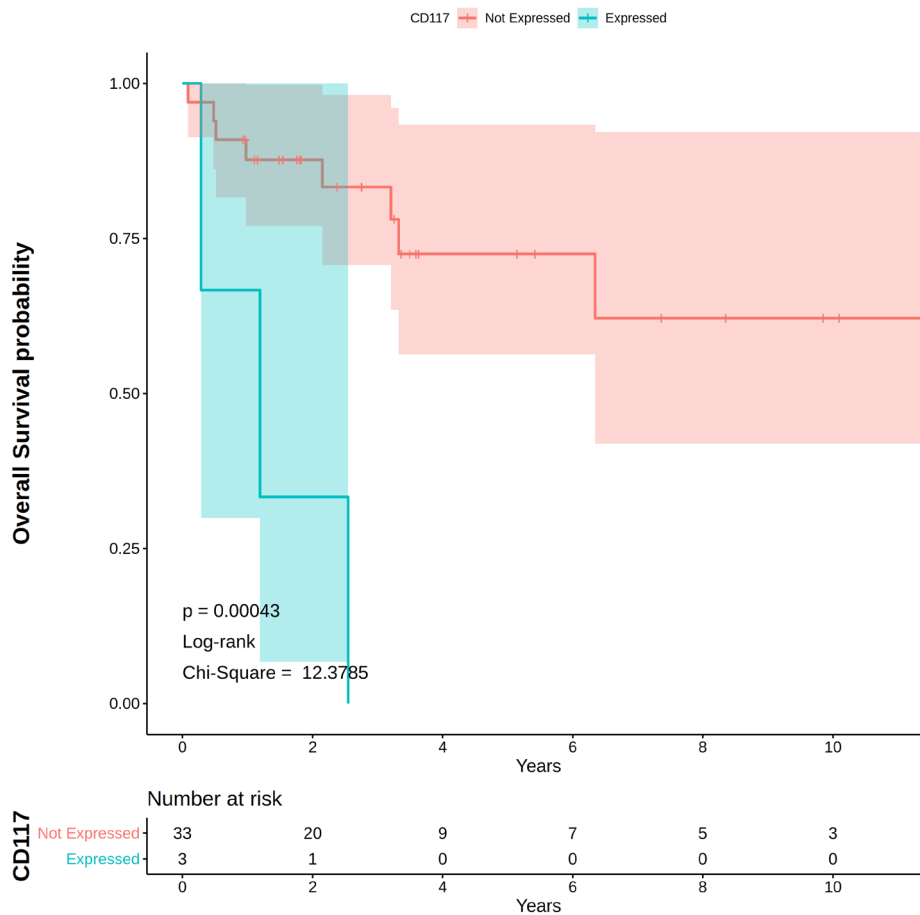


Abbildung 9: Vergleich OS für PatientInnen mit CD30+ und CD30-

## CD117

In Bezug auf die CD117-Expression zeigte sich, wie in Abbildung 11 dargestellt, ein signifikanter Unterschied im OS zugunsten der PatientInnen mit CD117-negativem DLBCL. Die Prüfung mittels Log-Rank-Test ergab  $\chi^2 = 12,3785$  und  $p = < 0.001$ .



**Abbildung 10:** Vergleich OS für PatientInnen mit CD117+ und CD117- DLBCL

## GCET1

In Bezug auf die GCET1-Expression zeigte sich, wie in Abbildung 12 dargestellt, ein signifikanter Unterschied im OS zugunsten der PatientInnen mit GCET1-positivem DLBCL. Die Prüfung mittels Log-Rank-Test ergab  $\chi^2 = 4,2174$  und  $p = 0.04$

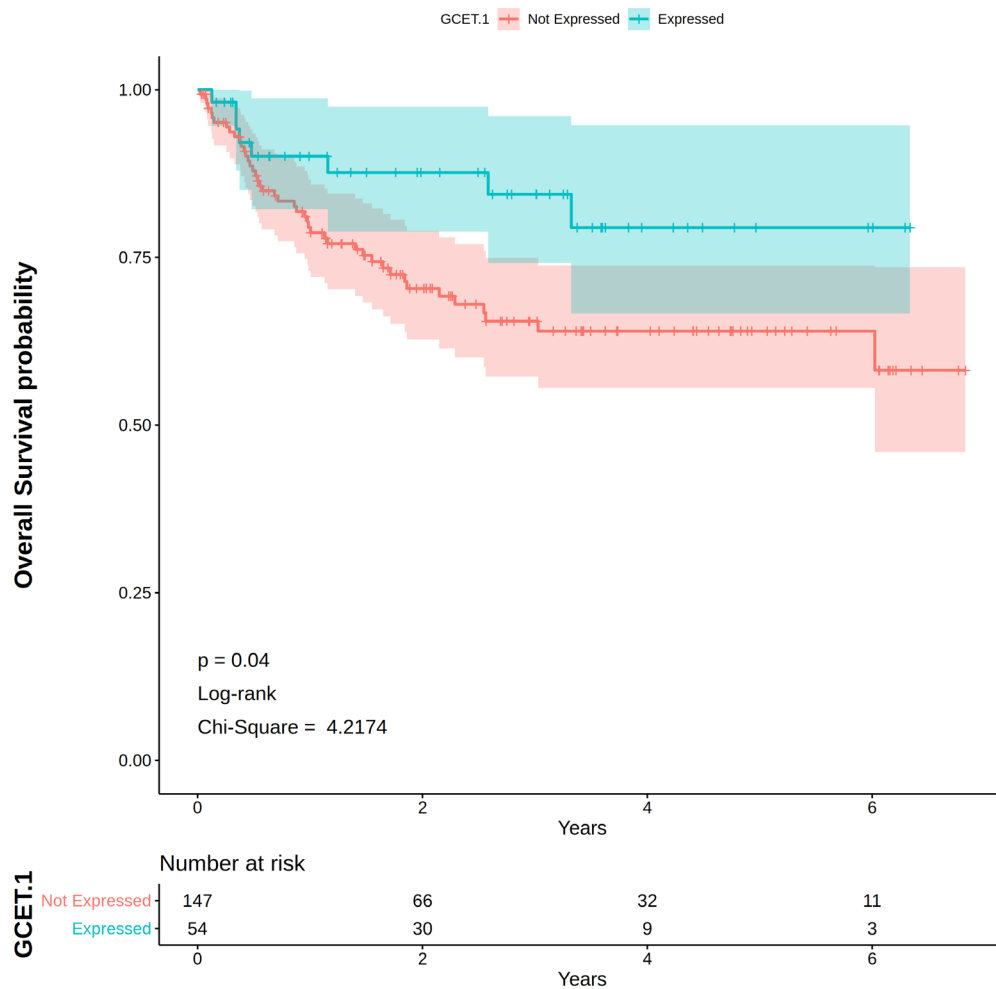


Abbildung 11: Vergleich OS für PatientInnen mit GCET+ und GCET- DLBCL

### 3.3.2 Krankheitsfreies Überleben (DFS)

Nachfolgend ist die Analyse des krankheitsfreien Überlebens (disease free survival; DFS) in Bezug auf die Marker-Expression für jeden Marker dargestellt.

#### CD20

In Bezug auf die CD20-Expression zeigte sich, wie in Abbildung 13 dargestellt, ein signifikanter Unterschied im DFS zugunsten der PatientInnen mit CD20-positivem DLBCL. Die Prüfung mittels Log-Rank-Test ergab  $\chi^2 = 5,0967$  und  $p = 0.024$ .

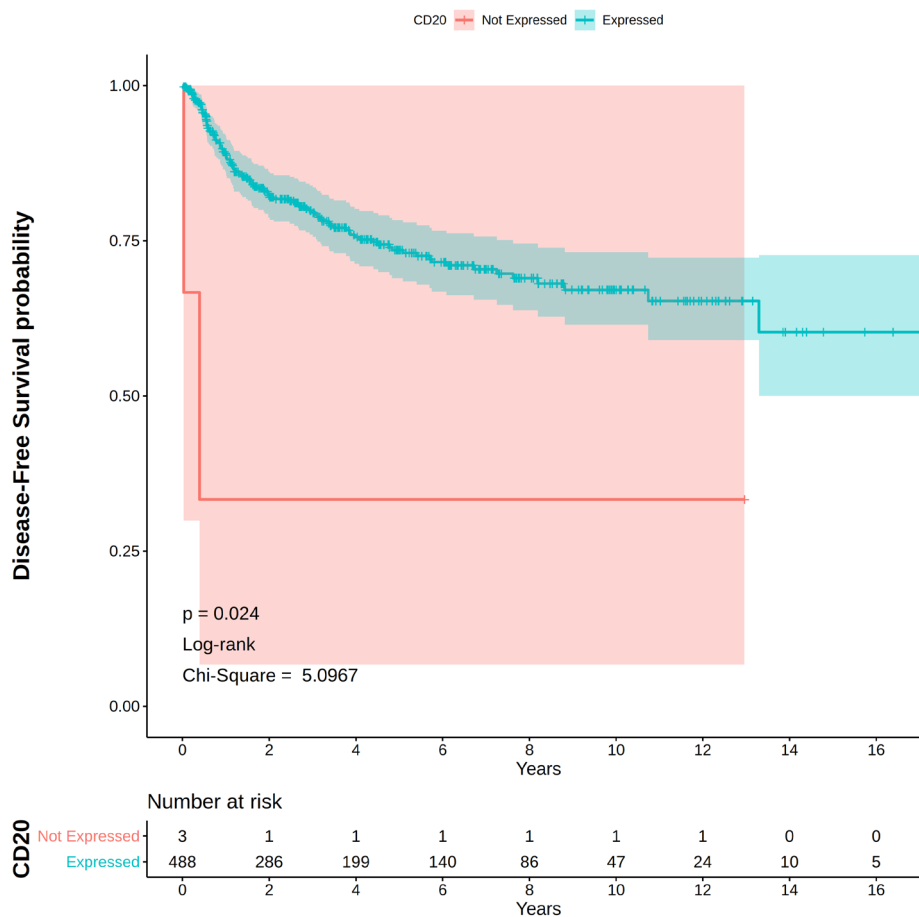


Abbildung 12: Vergleich DFS für PatientInnen mit CD20+ und CD20- DLBCL

## CD30

In Bezug auf die CD30-Expression zeigte sich, wie in Abbildung 14 dargestellt, ein signifikanter Unterschied im DFS zugunsten der PatientInnen mit CD30-positivem DLBCL. Die Prüfung mittels Log-Rank-Test ergab  $\chi^2 = 6,0287$  und  $p = 0.014$ .

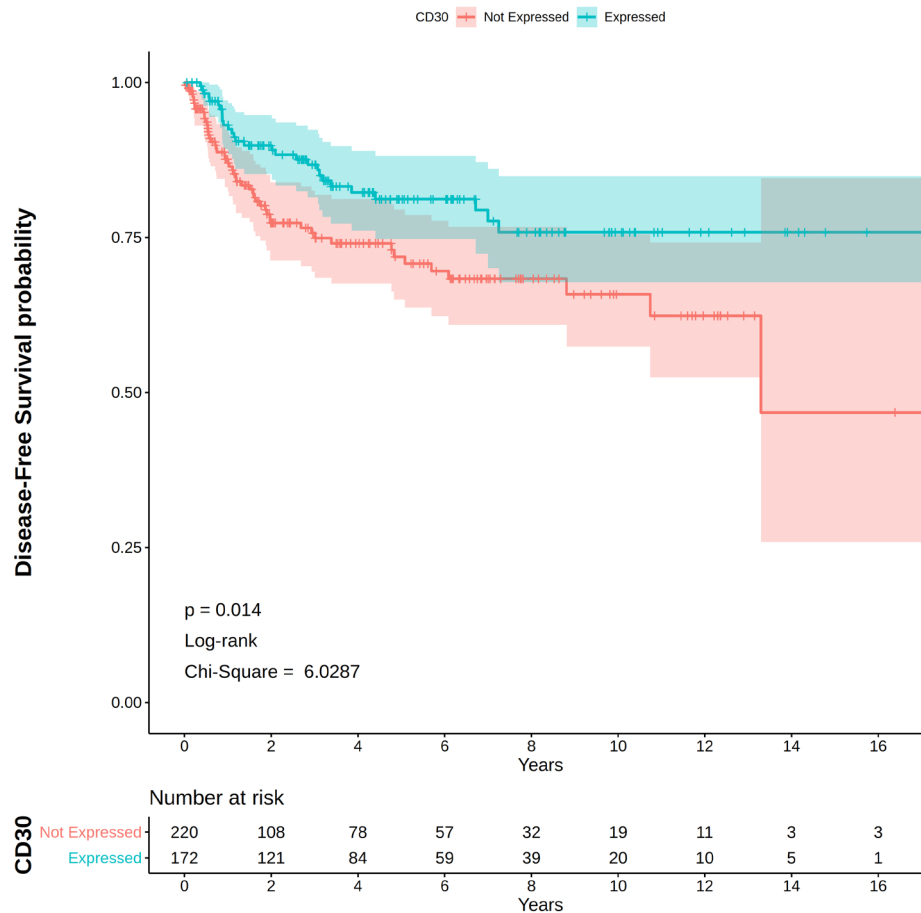


Abbildung 13: Vergleich DFS für PatientInnen mit CD30+ und CD30- DLBCL

## CD117

In Bezug auf die CD117-Expression zeigte sich, wie in Abbildung 15 dargestellt, ein signifikanter Unterschied im DFS zugunsten der PatientInnen mit CD117-negativen DLBCL. Die Prüfung mittels Log-Rank-Test ergab  $\chi^2 = 9,4487$  und  $p = 0.0021$ .

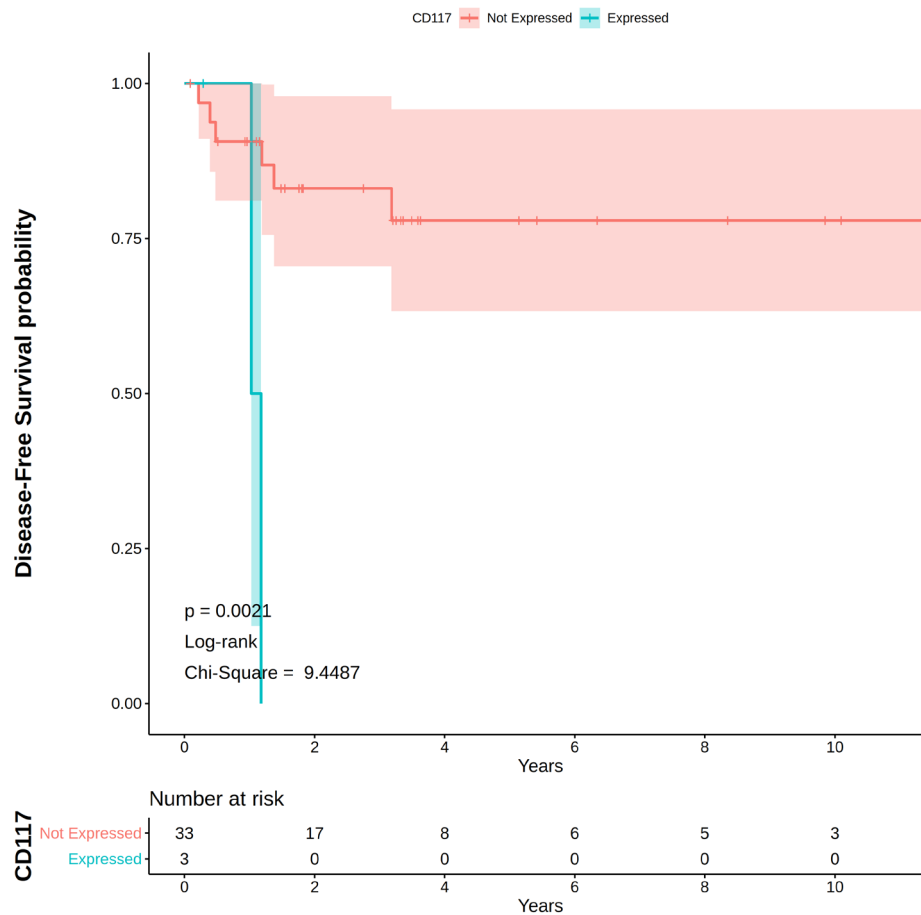


Abbildung 14: Vergleich DFS für PatientInnen mit CD117+ und CD117- DLBCL

## BCL2

In Bezug auf die BCL2-Expression zeigte sich, wie in Abbildung 16 dargestellt, ein signifikanter Unterschied im DFS zugunsten der PatientInnen mit BCL2-negativen DLBCL. Die Prüfung mittels Log-Rank-Test ergab  $\chi^2 = 4,2$  und  $p = 0.04$ .

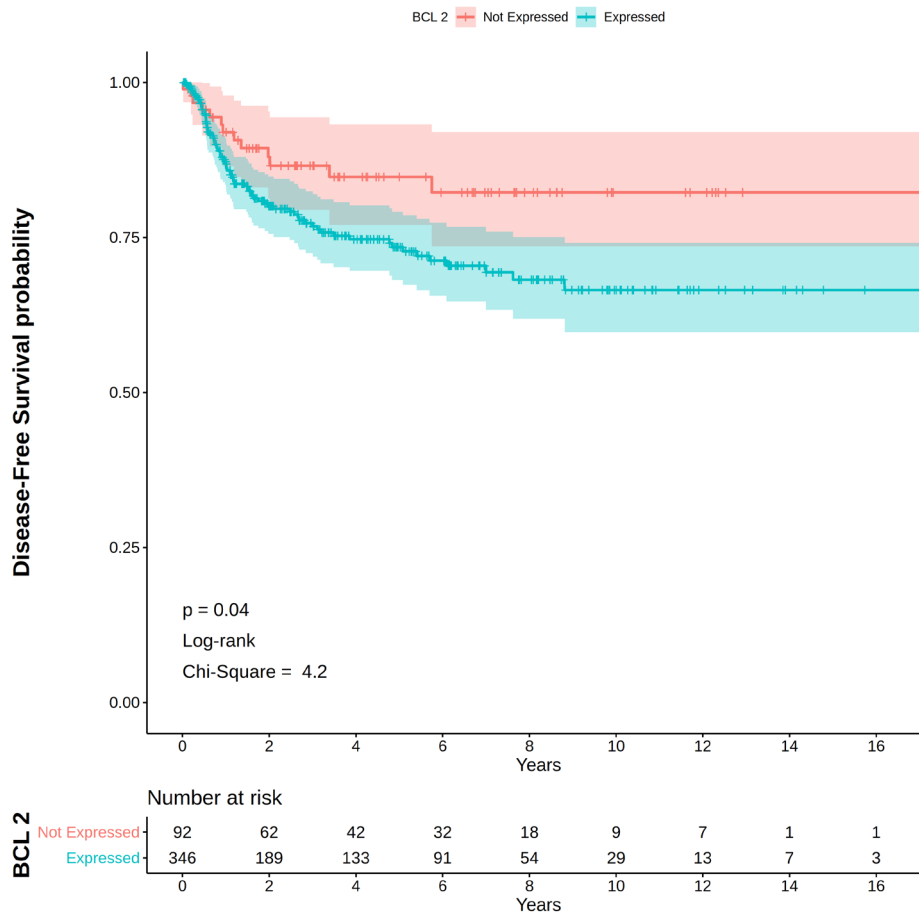
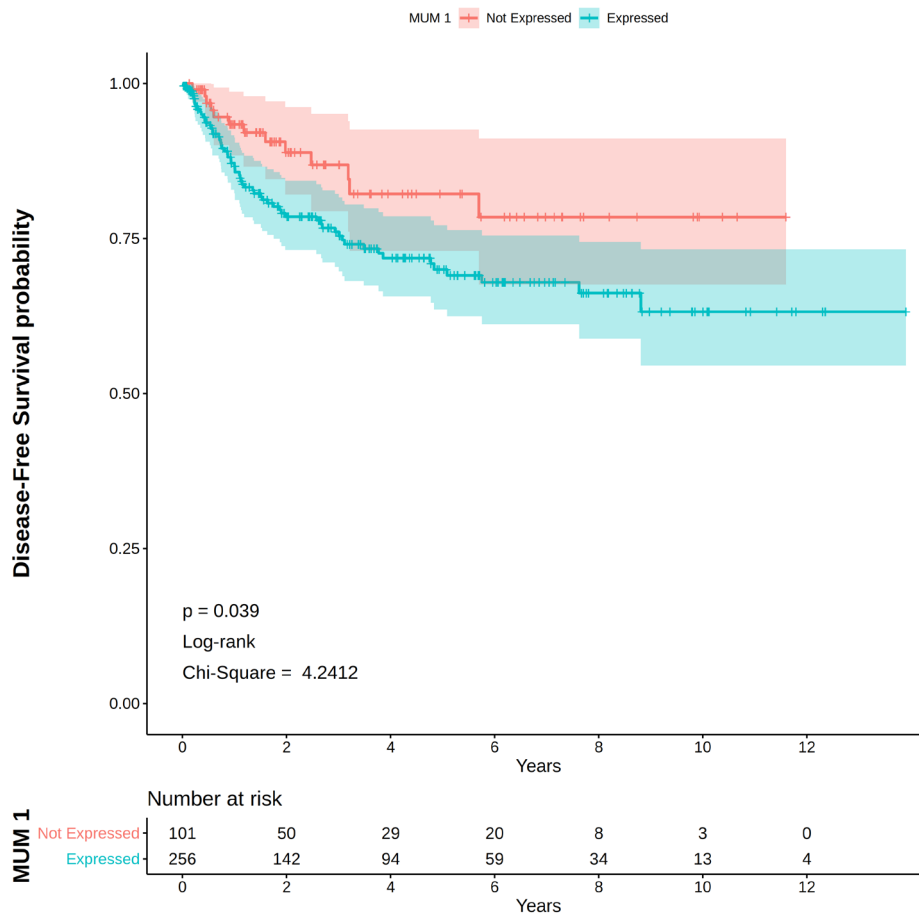


Abbildung 15: Vergleich DFS für PatientInnen mit BCL2+ und BCL2- DLBCL

## MUM1

In Bezug auf die MUM1-Expression zeigte sich, wie in Abbildung 17 dargestellt, ein signifikanter Unterschied im DFS zugunsten der PatientInnen mit MUM1-negativen DLBCL. Die Prüfung mittels Log-Rank-Test ergab  $\chi^2 = 4,2412$  und  $p = 0.039$ .



**Abbildung 16:** Vergleich DFS für PatientInnen mit MUM1+ und MUM1- DLBCL

### 3.3.3 Cox-Proportionale Hazard-Modelle

Nach Identifizierung möglicher prognostisch relevanter Marker mittels Kaplan-Meier-Kurven und Log-Rank Test wurde eine Cox-Regressionsanalyse durchgeführt, um jeweils den Einfluss der Marker-Expression auf das OS bzw. DFS genauer zu analysieren.

### 3.3.4 Gesamtüberleben (OS)

Die signifikanten Ergebnisse der univariaten Cox-Regressionsanalyse der einzelnen Marker in Bezug auf das OS sind in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17:** Univariate Cox-Analyse der einzelnen Biomarker in Bezug auf das OS. *n*=Stichprobenumfang; *coef*=Regressionskoeffizient; *HR*=Hazard-Ratio; *CI*=95%-Konfidenzintervall der Hazard-Ratio; *p-value*= *p*-Wert nach Wald-Statistik.

		coef	HR	95% CI	p-value
<b>CD10</b>					
0 (negativ)	n = 445	1 (Referenz)	1 (Referenz)		<b>0.032</b>
1 (positiv)		-0,414	0,661	0,4529 - 0,9649	
<b>CD15</b>					
0 (negativ)	n = 110	1 (Referenz)	1 (Referenz)		<b>0.03</b>
1 (positiv)		1,0559	2,874	1,108 - 7,454	
<b>CD30</b>					
0 (negativ)	n = 392	1 (Referenz)	1 (Referenz)		<b>0.002</b>
1 (positiv)		-0,5926	0,5529	0,3828 - 0,7986	
<b>CD117</b>					
0 (negativ)	n = 36	1 (Referenz)	1 (Referenz)		<b>0.003</b>
1 (positiv)		2,1498	8,5829	2,036 - 36,18	
<b>GCET1</b>					
0 (negativ)	n = 201	1 (Referenz)	1 (Referenz)		<b>0.045</b>
1 (positiv)		-0,7707	0,4627	0,2176 - 0,9837	

Wie in Tabelle 17 ersichtlich, zeigte sich für PatientInnen mit CD15-positivem DLBCL eine signifikante Verschlechterung des OS im Vergleich zur Referenzgruppe mit CD15-negativem DLBCL.

Ebenso zeigte sich für PatientInnen mit CD117-positivem DLBCL eine signifikante Verschlechterung des OS im Vergleich zur Referenzgruppe mit CD117-negativem DLBCL.

Eine positive CD30-Expression hingegen korrelierte mit einem signifikant verbesserten OS im Vergleich mit der Referenzgruppe mit negativer CD30-Expression.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine positive CD10-Expression im Vergleich mit der CD10-negativen Referenzgruppe mit einem signifikant besseren OS assoziiert ist.

Auch für PatientInnen mit GCET1-positivem DLBCL ergab sich eine signifikante Verbesserung im OS verglichen mit der Referenzgruppe mit GCET1-negativem DLBCL.

### 3.3.5 Krankheitsfreies Überleben (DFS)

Die signifikanten Ergebnisse der univariaten Cox-Regressionsanalyse der einzelnen Marker in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben sind in Tabelle 18 dargestellt.

**Tabelle 18:** Univariate Cox-Analyse der einzelnen Biomarker in Bezug auf das DFS. *n*=Stichprobenumfang; *coef*=Regressionskoeffizient; *HR*=Hazard-Ratio; *CI*=95%-Konfidenzintervall der Hazard-Ratio; *p-value*= *p*-Wert nach Wald-Statistik.

		coef	HR	95% CI	p-value
<b>CD20</b>					
0 (negativ)	n = 491	1 (Referenz)	1 (Referenz)	0,05598 - 0,928	<b>0.039</b>
1 (positiv)		-1,4787	0,2279		
<b>CD30</b>					
0 (negativ)	n = 392	1 (Referenz)	1 (Referenz)	0,3615 – 0,8979	<b>0.015</b>
1 (positiv)		-0,5626	0,5697		
<b>CD117</b>					
0 (negativ)	n = 36	1 (Referenz)	1 (Referenz)	1,64 – 60,48	<b>0.013</b>
1 (positiv)		2,2984	9,9584		

<b>BCL2</b>					
0 (negativ)	n = 438	1 (Referenz)	1 (Referenz)		
1 (positiv)		0,6049	1,831	1,018 – 3,295	<b>0.044</b>
<b>MUM1</b>					
0 (negativ)	n = 357	1 (Referenz)	1 (Referenz)		
1 (positiv)		0,619	1,857	1,021 – 3,379	<b>0.043</b>

Wie in Tabelle 18 zu sehen, zeigt sich eine signifikante Verbesserung des DFS zugunsten von PatientInnen mit CD20-positivem DLBCL gegenüber der Referenzgruppe mit CD20-negativem DLBCL.

Außerdem ergab sich für PatientInnen mit CD30-positivem DLBCL eine signifikante Verbesserung im DFS verglichen mit PatientInnen der CD30-negativen Gruppe.

Im Gegensatz dazu ließ sich für PatientInnen mit CD117-positivem DLBCL eine signifikante Verschlechterung im DFS verglichen mit der CD117-negativen Referenzgruppe verzeichnen.

Ebenso zeigt sich hinsichtlich BCL2 eine signifikante Verschlechterung im DFS für die BCL-positive Gruppe verglichen mit der BCL2-negativen Gruppe.

Auch für PatientInnen mit MUM1-positivem DLBCL konnte eine signifikante Verschlechterung im DFS gegenüber PatientInnen mit MUM1-negativem DLBCL nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl eine positive CD30-Expression, als auch eine positive CD117-Expression jeweils im Vergleich mit der Referenzgruppe mit einem signifikant besseren OS und DFS assoziiert waren.

## 4 Diskussion

Das DLBCL ist mit einem Anteil von 25-40% aller adulten NHL das häufigste maligne Lymphom der westlichen Welt (44–46). Die hohe biologische und molekulare Heterogenität spiegelt sich in unterschiedlichen klinischen Verläufen mit variablem Ansprechen auf R-CHOP-Standardtherapie wider. Unter R-CHOP Therapie können mehr als 60% geheilt werden, für einen beträchtlichen Anteil, vor allem PatientInnen mit Hochrisiko-Subtypen (z.B. DEL, DHL), ist das Behandlungsergebnis jedoch nicht zufriedenstellend (115). Zur prognostischen Abschätzung des individuellen Risikos existieren verschiedene Scores, unter anderem der IPI, der aalPI, und der NCCN-IPI, die als Grundlage für die angestrebte Therapiestrategie dienen (vgl. Kapitel 1.4.2). Obwohl der (NCCN)-IPI das am meisten genutzte System zur Prognoseabschätzung vor Therapiebeginn ist, ist die prognostische Aussagekraft für PatientInnen mit Risiko für einen sehr ungünstigen Verlauf fraglich. Die zugrunde liegende Tumorbilogie sowie molekulare Aspekte werden durch den IPI nicht berücksichtigt, was zu variablem Therapieansprechen auch innerhalb der Risikogruppen führt (43,116). Die Evaluierung IPI-unabhängiger Risikofaktoren mit prognostischem Wert ist daher von aktueller Relevanz und vielfach Bestandteil gegenwärtiger Studien. Diskutiert werden neben molekulargenetische Faktoren, wie z.B. der COO-Subtyp, auch phänotypische Marker wie z.B. CD5 oder aber der PET-CT-Scan nach Behandlungsende (vgl. Kapitel 1.5.6). Durch Entwicklung exakterer Prognose-Scores, unter Einbezug solcher Faktoren, könnte zukünftig das individuelle Risiko besser abgeschätzt und auch die Therapiestrategien entsprechend angepasst werden.

In dieser retrospektiven Studie wurde die Kohorte der zwischen 1991 und 2018 am LKH Graz behandelten DLBCL-PatientInnen (n = 553) auf bei Diagnosestellung routinemäßig erhobenen Biomarkern bezüglich ihrer prognostischen Relevanz untersucht. Dabei ließen sich 8 Marker identifizieren, die einen signifikanten prognostischen Wert hinsichtlich des Krankheitsverlaufs der PatientInnen aufwiesen.

Zunächst erfolgte die Prüfung auf mögliche Zusammenhänge zwischen der Marker-Expression und dem ereignisfreien Überleben innerhalb der ersten 24 Monate. Wie

die publizierten Daten von Maurer *et al.* zeigten, ist der EFS24 als vielversprechendes Surrogat für das Gesamtüberleben in klinische Studien zu sehen, weshalb dieser auch hier eingesetzt wurde (117,118). Hierbei ließen sich die Marker CD30, MUM1 und EBER als Faktoren mit potentiell prognostischem Wert identifizieren.

Für den Marker CD30 konnte auch in der weiteren statistischen Analyse anhand der Kaplan-Meier-Kurven und Log-Rank-Test ein signifikant verbessertes OS ( $p\text{-value} = 0.014$ ) und DFS ( $p\text{-value} = 0.014$ ) zugunsten der CD30-positiven Gruppe gezeigt werden. Diese signifikanten Unterschiede im Outcome ließen sich auch in der univariaten Cox-Regressionsanalyse bestätigen (OS:  $p\text{-value} = 0.002$ ; DFS:  $p\text{-value} = 0.015$ ).

CD30 ist ein Typ 1 Transmembran-Glykoprotein aus der Familie der TNF-Rezeptoren und wurde ursprünglich als Oberflächenmarker sogenannter Reed-Sternberg- und Hodgkin-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms (CHL) identifiziert. Aber auch in einigen B- und T-Zell-NHL, wie z.B. dem Anaplastisch-großzelligen-Lymphom (ALCL), dem primären mediastinalen B-Zell-Lymphom (PMBCL) oder aber in EBV-positiven Lymphomen findet sich eine CD30-Expression. Ebenso konnte in den letzten Jahren eine teilweise CD30-Expression mehrfach auch auf Zellen des DLBCL, NOS nachgewiesen werden. (57)

Die Inzidenz für eine positive CD30-Expression variiert zwischen 9,5 und 40%, was sich vermutlich auf unterschiedlich definierte Cut-Off-Werte sowie unterschiedliche Ein- und Ausschlusskriterien (z.B. EBV-Positivität, HIV-Positivität, spezifische Varianten) der Studien bzw. regionale Disparitäten zurückführen lässt. In der Mehrheit der Studien wurde für eine CD30-Positivität ein Cut-Off-Wert von  $>0\%$  oder  $>20\%$  gewählt (57,100,119–123). In dieser Arbeit galt ein Expressionsgrad von  $>0\%$  als positiv. Eine positive CD30-Expression zeigte sich demnach in 43% der Fälle. Dieser Anteil ist vergleichsweise hoch, möglicherweise durch den niedrig gewählten Cut-Off-Wert ( $>0\%$ ) sowie den Einschluss auch von EBV-positiven DLBCL-PatientInnen bedingt, die gewöhnlich mit einer höheren CD30-Prävalenz einhergehen (124).

Die Ergebnisse über den prognostischen Stellenwert von CD30 bei DLBCL-PatientInnen sind in der Literatur inkonsistent. Eine große Studie von Hu *et al.* mit

903 R-CHOP behandelten PatientInnen, lieferte allerdings ähnliche Ergebnisse in der Überlebensanalyse wie in der vorliegenden Arbeit. Demnach wiesen CD30-positive DLBCL-PatientInnen eine günstigere Prognose im Sinne eines verbesserten 5-Jahres-Gesamtüberleben (CD30+ 79% vs. CD30- 59%) und progressionsfreien Überleben im Vergleich zu CD30-negativen DLBCL-PatientInnen auf. Auch in multivariaten Analysen blieb die CD30-Expression ein vom IPI unabhängiger Prädiktor für ein verbessertes OS und progressionsfreies Überleben (progression free survival; PFS). Das verbesserte Outcome CD30-positiver DLBCL-PatientInnen galt zudem für beide COO-Subtypen und ließ sich auch an Unterschieden auf molekularer Basis festmachen, wie der Vergleich der Genexpressionsprofile beider Gruppen (CD30+, CD30- DLBCL) zeigte. So fand die Arbeitsgruppe in CD30-positiven DLBCL eine Hochregulierung von Genen, die für negative Regulatoren der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und dem Lymphozyten-Überleben kodieren, sowie eine Herunterregulierung jener Gene, die in B-Zell-Rezeptor-Signalkaskaden und B-Zell-Proliferation involviert sind. Weiterhin zeigten sich prominente Zytokin- und Stroma-Gensignaturen für CD30-positive PatientInnen. Aufgrund des danach als hoch einzustufenden prädikativen Wertes von CD30, der spezifischen Genexpressionssignatur sowie der Relevanz als therapeutisches Zielmolekül für Brentuximab Vedotin, definierten Hu *et al.* CD30-positive DLBCL als eine neue Subgruppe (125). Auch in diversen anderen Studien konnte, in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit, CD30 mit einer günstigeren Prognose assoziiert werden: In einer 385 PatientInnen umfassenden Arbeit von Slack *et al.* zeigte sich eine Assoziation zwischen positiver CD30-Expression und verbessertem PFS, allerdings nur für GCB-DLBCL. Die CD30-Expression hielt sich auch im multivariaten Cox-Modell als unabhängiger Prädiktor (120). Auch die publizierten Daten von Gong *et al.* bestätigten in einer ähnlichen Arbeit mit 232 R-CHOP behandelten PatientInnen ein signifikant überlegenes PFS und OS für CD30-positive DLBCL-PatientInnen (122). Im Gegensatz dazu berichteten Hao *et al.* (n = 146) und Campuzano-Zuluaga *et al.* (n = 167) übereinstimmend, dass eine CD30-Expression mit einer ungünstigeren Prognose, im Sinne eines verkürzten OS und DFS, assoziiert ist und positiv mit einer BCL2-Expression korreliert (119,121). Auch Gong *et al.* untersuchten 2018 in ihrer Arbeit mit 242 PatientInnen die Auswirkung von CD30 auf den klinischen Verlauf und kamen zwar wiederum zu dem Ergebnis, dass eine positive CD30-Expression mit einem verlängerten PFS und OS

einhergeht, diese aber einen vom IPI-Score, MYC-Status und BCL-Expression abhängigen Prädiktor darstellt. Diese Tatsache vermuteten sie auch als mitverantwortlich für die kontroverse Datenlage bezüglich der prognostischen Relevanz von CD30 (126). Als weitere mögliche Ursachen für die uneinheitlichen Resultate schlugen Hao *et al.* zudem den Gebrauch verschiedener Antikörper, variable IHC-Färbemethoden bzw. -Scoring-Systeme sowie die Heterogenität der Studienpopulationen vor. So fand die Arbeitsgruppe lediglich für PatientInnen <60 Jahren hinsichtlich OS und EFS einen signifikanten Unterschied zwischen der CD30-positiven und – negativen Gruppe (121). Zu berücksichtigen sind zudem die unterschiedlich großen Fallzahlen.

Für den Marker BCL2 ergab sich in der Kreuztabellenanalyse keine statistische Assoziation zwischen BCL2-Expression und EFS24. Es zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in der Überlebenszeitanalyse mittels Kaplan-Meier-Kurven und Log-Rank-Test ( $p\text{-value} = 0.04$ ). Demnach wiesen BCL2-positive PatientInnen ein signifikant verkürztes DFS auf ( $p\text{-value} = 0.044$ ), hinsichtlich OS zeigten sich jedoch keine Unterschiede. Der signifikante Unterschied im DFS hielt sich auch im univariaten Cox-Modell.

BCL2 ist ein antiapoptotisches Protein, das in der äußeren Membran von Mitochondrien lokalisiert ist und in Keimzentrumzellen typischerweise herunterreguliert vorliegt (51). Eine Überexpression von BCL2 wird in beiden DLBCL-Subtypen beobachtet und ist grundsätzlich mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapien assoziiert (127). In der Prä-Rituximab-Ära schien die IHC-basierte BCL2-Expression als robuster Prädiktor für ein schlechteres Outcome der PatientInnen zu gelten, wie verschiedene Studien nahelegen. Insbesondere wurde über eine signifikante Assoziation mit einem schlechteren DFS, wie auch in der vorliegenden Arbeit, aber auch mit einem verkürztem OS und einer höheren Rezidivrate berichtet (128–130). In der Rituximab-Ära hingegen, scheint der negative prognostische Einfluss von BCL2 durch Aufnahme von Rituximab als Standardtherapie überwunden zu sein, wie die publizierten Ergebnisse von Mournier *et al.* vermuten lassen. Demnach erzielten BCL2-positive PatientInnen einen signifikanten Benefit im OS und EFS durch R-CHOP-Therapie gegenüber CHOP-behandelten BCL2-positiven DLBCL-PatientInnen (131), während dieser

Effekt bei der BCL2-negativen Gruppe ausblieb. Zu dem gleichen Schluss kamen auch Seki *et al.* in ihrer Untersuchung von insgesamt 730 PatientInnen (132). Interessanterweise scheint der Überlebensbenefit durch R-CHOP für den BCL2-positiven GCB-Subtyp jedoch weniger stark ausgeprägt zu sein. Eine an R-CHOP therapierten PatientInnen durchgeführte Untersuchung, assoziierte BCL2-positive DLBCL und GCB-DLBCL demnach mit einem signifikant ungünstigeren Verlauf (OS, EFS). Indessen hatte BCL2 in der ABC-Kohorte keinen prognostischen Einfluss (133).

Grundsätzlich fällt ein Vergleich der Studien nicht nur aufgrund der unterschiedlichen Therapien schwer, sondern auch dahingehend, dass die gewählten Cut-Off -Werte für eine BCL2-Positivität untereinander stark variieren. In einer 2017 veröffentlichten Studie mit 218 R-CHOP behandelten PatientInnen, entwickelte die Arbeitsgruppe von Tsuyama *et al.* daher einen 4-Punkte-Score (0 bis 3+) mit neuen Kriterien zur Definition der histopathologisch mittels IHC evaluierten BCL2-Expression, dessen Zuverlässigkeit sich auch in digitalen Bildanalysen bestätigen ließ. Basierend auf dem Verhältnis positiver zu negativer Zellen sowie der Färbeintensität, wurde für eine starke BCL2-Expression ein Punktwert von 3+ festgelegt. Dieser korrelierte signifikant mit einer ungünstigeren Prognose (OS, PFS) sowohl für GCB, als auch für non-GCB-DLBCL-PatientInnen und konnte in multivariaten Analysen auch als IPI-unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert werden. Als leicht umsetzbares BCL2-Scoring-System schlug die Arbeitsgruppe daher den Gebrauch auch in der routinemäßigen Anwendung vor. Insbesondere zur Evaluierung von DLBCL-PatientInnen, die von einer BCL2-gezielten Therapie profitieren könnten. (134)

Wie die oben angeführten Studien verdeutlichen, ist der prognostische Wert von BCL2, insbesondere in der Rituximab-Ära, umstritten. Die Ergebnisse dieser Arbeit gehen aber in die gleiche Richtung hinsichtlich des DFS. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass in die vorliegende Studie nicht nur R-CHOP behandelte, sondern auch einige wenige CHOP-behandelte PatientInnen eingeschlossen wurden, da der Erfassungszeitraum der PatientInnen teilweise vor der R-CHOP Ära liegt. Um die prognostische Relevanz zukünftig genauer untersuchen zu können, ist vor allem ein einheitliches System zur Interpretation der BCL2-Positivität notwendig, wofür sich

z.B. der von Tsuyama *et al.* vorgeschlagene Score anbieten würde, sowie größere Fallzahlen. Bereits bekannt und unumstritten ist hingegen die prognostische Relevanz des sogenannten "double-expressor"-Phänotyps, sprich die gleichzeitige Expression von BCL2 und MYC, die mit einer deutlich ungünstigeren Prognose assoziiert wird (59,60,96,97).

Bei der statistischen Untersuchung von CD10 mittels Kreuztabellen zeigte sich hinsichtlich EFS24 kein Unterschied zwischen den Gruppen. Jedoch konnte in der Überlebensanalyse mittels Kaplan-Meier-Kurve und Log-Rank-Test ein signifikant überlegenes OS für die CD10-positive Gruppe festgestellt werden ( $p\text{-value} = 0.031$ ). Der signifikante Unterschied im Überleben zeigte sich auch in der univariaten Cox-Regressionsanalyse ( $p\text{-value} = 0.032$ ).

CD10 ist ein Zelloberflächenprotein mit neutraler Endopeptidaseaktivität, das ursprünglich als "Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen" (CALLA) identifiziert wurde, aber auch auf der Oberfläche vieler normaler (z.B. Prä-B-Zelle, reife B-Zellen des Keimzentrums, nicht-lymphatische Zellen) und anderer neoplastischer Zellen exprimiert wird. So konnte CD10 auch bei der Mehrzahl follikulärer Lymphome und beim Burkitt Lymphom nachgewiesen werden (135). Zudem exprimieren 20-40% aller *de novo* DLBCL das CD10-Antigen. In der Grazer Kohorte erwies sich CD10 bei ca. 32% der DLBCL-Fälle als positiv und liegt somit im Bereich der in der Literatur beschriebenen Inzidenz. Hinsichtlich des prognostischen Wertes von CD10 existieren bislang nur wenige Berichte, ohne klaren Konsens. Übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen, fand sich in den Untersuchungen von Chang *et al.* und Hans *et al.* mit 71 bzw. 152 PatientInnen für die CD10-positive Gruppe eine Assoziation mit einem verbesserten OS (53,104). Wohingegen in einer großen Studie des "Luneborg Lymphoma Biomarker Consortiums" im Umfang von 1344 PatientInnen kein statistischer Zusammenhang zwischen der IHC-basierten CD10-Expression und geändertem OS nachgewiesen werden konnte (136). Widersprüchlich stehen die Ergebnisse dieser Arbeit jenen von Harada *et al.* und Veelken *et al.* gegenüber, die einen Zusammenhang zwischen CD10 und schlechterem OS verzeichneten (137,138). Auch Uherova *et al.* konnten für die unter Durchflusszytometrie CD10-positive Gruppe ein signifikant unterlegenes OS feststellen (135)

Auch für den Pan-B-Zell-Marker CD20 konnte in der Kreuztabellenanalyse kein statistischer Zusammenhang mit dem EFS24 festgestellt werden. In der Überlebensanalyse zeigte sich allerdings ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im DFS zugunsten von PatientInnen mit CD20-positivem DLBCL ( $p\text{-value} = 0.024$ ), nicht jedoch im OS. Mittels Cox-Regression ließen sich die Ergebnisse bestätigen ( $p\text{-value} = 0.039$ ).

Das Auftreten CD20-negativer DLBCL ist eine Rarität und wird in der Literatur mit 1-2% angegeben (139). In dieser Studie sind CD20-negative DLBCL mit etwa 0,8% vertreten (4 von 491 Fällen). Eine fehlende CD20-Expression wird zumeist in plasmoblastischen Varianten des DLBCL (Effusionslymphom, Alk-positives großzelliges B-Zell-Lymphom, HIV-assoziiertes plasmoblastisches Lymphom) bzw. der HHV8-assoziierten multizentrischen Castleman-Krankheit beobachtet und wird grundsätzlich mit einem aggressiveren klinischen Verlauf, Resistenz gegenüber Chemotherapie sowie, übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit, mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert (140). Zudem ist der CD20-Verlust nach Rituximabtherapie ein bekanntes Phänomen (141). Es existieren aber auch Einzelberichte über primäre CD20-negative DLBCL, die nicht einem der genannten Subtypen zuordenbar sind (142). Als Grund für die schlechtere Prognose wird vor allem das inadäquate Ansprechen auf Standardchemotherapie bzw. die fehlende Möglichkeit der Rituximab-Anwendung, sowie Mangel an therapeutischen Alternativen genannt (139,140). Die Aufnahme von Rituximab in die Standardtherapie erbrachte einen deutlichen Benefit im PFS und OS (vgl. Kapitel 1.5.7.1). Somit war die schlechtere Prognose gegenüber CD20-positiven DLBCL zu erwarten.

Für den Marker CD15 ergab sich ebenfalls keine statistische Assoziation mit dem EFS24 in der Kreuztabellenanalyse. Es ließ sich aber auch hier in den Kaplan-Meier-Kurven mittels Log-Rank-Test ein signifikant unterlegenes OS für die CD15-positive Gruppe verzeichnen ( $p\text{-value} = 0.023$ ), welches auch in der Cox-Regressionsanalyse Bestand hatte ( $p\text{-value} = 0.03$ ). Hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens ließen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen vermerken.

Bereits bekannt ist die Expression von CD15 in normalen lymphatischen Geweben, sowie in Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen und nicht-hämatopoetischen Neoplasien. Daneben lassen sich auch sehr vereinzelt Berichte über eine CD15-Expression in EBV-positiven DLBCL finden (143,144). CD15 ergab sich in der Grazer-Kohorte in 9 von 112 Fällen (8%) als positiv. Bezüglich der prognostischen Relevanz von CD15 beim DLBCL ist aktuell keine Vergleichsliteratur zu finden. Die in dieser Arbeit festgestellte Assoziation von CD15 mit einem schlechteren OS ist aufgrund der geringen Fallzahl der CD15-positiven Gruppe ( $n = 9$ ) jedoch nur begrenzt als aussagekräftig zu werten. Zur genaueren Überprüfung der prognostischen Relevanz sind Studienpopulationen mit höheren Fallzahlen notwendig.

Für den Marker MUM1 ließ sich in der Kreuztabellenanalyse ein signifikanter Zusammenhang mit dem EFS24 feststellen. Auch in der Überlebensanalyse zeigte sich für die MUM1-positive Gruppe ein signifikant verschlechtertes krankheitsfreies Überleben im Log-Rank-Test gegenüber der MUM1-negativen Gruppe ( $p\text{-value} = 0.039$ ), das sich auch in der Cox-Regressionsanalyse nachweisen ließ ( $p\text{-value} = 0.043$ ).

Die Integration von MUM1 in immunhistochemische Algorithmen als Oberflächenprotein von aktivierten, sich zu Plasmazellen differenzierenden B-Zellen, wird in der Routineanwendung zur Unterteilung in oben genannte Subgruppen genutzt (vgl. Kapitel 1.5.4). In Hinblick auf die prognostische Relevanz wurde MUM1 in den meisten Studien lediglich im Kontext dieser Algorithmen untersucht (67–72,145). Nur wenige Studien untersuchten den prognostischen Einfluss von MUM1 als alleinigen IHC-Marker und berichteten einheitlich und konform mit den Ergebnissen dieser Arbeit, über eine Assoziation mit einer ungünstigeren Prognose (68,146,147). Sofo-Hafizovic *et al.* sahen in MUM1/IRF >25% einen starken Prädiktor für das 3-Jahres-Gesamtüberleben von R-CHOP behandelten PatientInnen, der sich auch in multivariaten Analyse als IPI-unabhängiger Prädiktor identifizieren ließ ( $n = 60$ ) (146). Gleichmaßen konnte durch Muris *et al.* bei 71 CHOP/R-CHOP therapierten PatientInnen eine Assoziation vom MUM1 mit einem verschlechterten 5-Jahres-Gesamtüberleben nachgewiesen

werden. MUM1 blieb hier zumindest für PatientInnen mit hohem IPI ein starker unabhängiger prognostischer Faktor. Zudem korrelierte MUM1 in der genannten Studie mit der Expression der Apoptose-inhibierenden Proteine BCL 2 und XIAP, was nach Muris *et al.* möglicherweise eine konstitutive Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges in MUM1-positiven Fällen widerspiegeln und das schlechtere Outcome für diese Gruppe erklären könnte (68). Auch Lu *et al.* stellten in einer 601 PatientInnen umfassenden Studie für die MUM1-positive Gruppe nicht nur einen Zusammenhang mit einem verschlechterten Gesamt-, sondern auch progressionsfreien Überleben fest. Das PatientInnen-Kollektiv fiel hinsichtlich der erhaltenen Therapie hierbei sehr heterogen aus (147).

Die publizierten Daten von Culpin *et al.* und anderen Studien, sahen den größeren prognostischen Nutzen von MUM1 jedoch vielmehr in der Kombination mit anderen Markern in IHC-basierten Algorithmen, zur Einteilung des DLBCL in prognostische Subgruppen, als in der alleinigen Verwendung (66,67,148).

Der in unseren Resultaten fehlende signifikante Unterschied im Gesamtüberleben zwischen den Gruppen, ist möglicherweise auf den zu gering gewählten Cut-Off-Wert zurückzuführen (>0%). So konnten Sofu-Hafizovic *et al.* beispielsweise lediglich für MUM1 >25% ein signifikantes Ergebnis im 3-Jahres-Gesamtüberleben darstellen (146).

Für GCET-1 zeigte sich in der Kreuztabellenanalyse kein signifikanter Zusammenhang mit dem EFS24, es ließ sich jedoch ein signifikant besseres Gesamtüberleben zugunsten der GCET-1-positiven Gruppen bei Analyse der Kaplan-Meier-Kurven mittels Log-Rank-Test (*p-value* = 0.04), sowie auch in der Cox-Regression nachweisen (*p-value* = 0.045).

Auch für den Marker GCET1 ist die Integration in IHC-Algorithmen zur Abgrenzung von DLBCL mit Keimzentrumsursprung (GCB-DLBCL) gegenüber Nicht-GCB-DLBCL bereits bekannt (vgl. Kapitel 1.5.4). GCET1 ist bei einem Cut-Off von >60% als hoch spezifischer Marker für den GCB-Subtypen anzusehen (Spezifität 93%) (67). Hinsichtlich des prognostischen Wertes von GCET1 waren nur wenige Publikationen zu finden. Culpin *et al.* und Visco *et al.* berichteten übereinstimmend über einen Zusammenhang zwischen niedriger GCET1-Expression (<20%) und verkürztem progressionsfreien Überleben bei 190 bzw. 475 R-CHOP behandelten

PatientInnen (148,149). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten für eine fehlende GCET1-Expression im Vergleich mit der GCET1-positiven Gruppe ein schlechteres Gesamtüberleben auf, hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen. Zu einem besseren Vergleich mit gegebener Literatur wäre die Einteilung der GCET1-Positivität in Gruppen mit unterschiedlichen Expressionsgraden sinnvoll. In dieser Arbeit wurde lediglich die GCET1-negative Gruppe mit der GCET1-Gruppe jeglichen positiven Expressionsgrades verglichen.

Bei der Untersuchung des Markers CD117 mittels Kreuztabellen ergab sich keine statistische Assoziation mit dem EFS24. In der Überlebensanalyse konnte für CD117-positive Fälle jedoch ein signifikant überlegenes Gesamt- und krankheitsfreies Überleben im Log-rank-Test verzeichnet werden (*p-value*: OS = <0.001; DFS = 0.002). Auch die Cox-Regressionsanalyse lieferte in diesem Zusammenhang ein signifikantes Ergebnis (*p-value*: OS = 0.003; DFS = 0.013).

Das Auftreten CD117 positiver DLBCL-Fälle ist als sehr sporadisch zu betrachten, wie die Arbeitsgruppe von Vakiani *et al.* berichtete (150). Auch in dieser Arbeit konnten lediglich 3 von 36 Fällen als CD117-positiv ausgewiesen werden. CD117 wurde in der Literatur vor allem als Marker für die Diagnose von Plasmazellmyelomen beschrieben (151) und ist in diesem Kontext auch hinsichtlich seiner prognostischen Relevanz untersucht worden. Dabei konnte eine Assoziation von CD117 mit einem besseren OS und PFS festgestellt werden (152). Für das DLBCL ist bezüglich CD117 als prognostischen Faktor keine Vergleichsliteratur zu finden. Die statistische Aussagekraft der Ergebnisse ist mit größeren Fallzahlen zu prüfen.

Insgesamt auffällig erscheint die Tatsache, dass oftmals in der Kreuztabellenanalyse kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Marker-Expression und dem EFS24 nachgewiesen werden konnte, sich aber in den Überlebensanalysen bezüglich OS und DFS dann signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zeigten. Eine Erklärung dafür stellt möglicherweise die fehlende Berücksichtigung von Spätrezidiven (>2 Jahren) dar, die von Wang *et al.* mit einem nicht unerheblichen Anteil von 10% innerhalb der ersten 5 Jahre nach

dem EFS24 angegeben werden (153). Zudem betonen Maurer *et al.* in ihren publizierten Daten über die Validierung von EFS24 als Surrogatendpunkt, den Einfluss des jeweiligen Rezidiv-Managements nicht berücksichtigt zu haben (117,118).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich innerhalb dieser, durchaus großen Studienkohorte von insgesamt 553 DLBCL-PatientInnen, 8 routinemäßig bestimmbare Biomarker identifizieren ließen, die jeweils mit einem veränderten Outcome assoziiert waren. Durch das einheitliche Erfassen der gewonnenen Daten in einer Datenbank, können diese zukünftig beliebig ergänzt und für weitere statistische Analysen genutzt werden.

Als Limitation dieser Arbeit ist sicherlich die Heterogenität der Studienpopulation hinsichtlich der angewandten Therapieregime, die durch den langen Beobachtungszeitraum bedingt ist, sowie unterschiedliche Krankheitsstadien und eine breite Altersverteilung zu nennen. Teilweise ist davon auszugehen, dass der prognostische Wert unter R-CHOP-Therapie anders einzuschätzen ist (z.B. BCL2). Auch zu berücksichtigen ist die Wahl der Grenzwerte, die eine Marker-Positivität definieren. Diese variierten zwischen dieser und den anderen Studien, aber auch innerhalb der zitierten Studien teilweise stark. Um dennoch eine exaktere Einordnung in Vergleichsliteratur zu gewährleisten und die prognostische Aussagekraft der einzelnen Marker genauer eingrenzen zu können, wäre hier die Einteilung in Gruppen mit unterschiedlichen Expressionsgraden sinnvoll. Voraussetzung wäre allerdings die Etablierung eines einheitlichen, leicht umsetzbaren Scoring-Systems.

Als Einschränkungen in der Datenqualität ist zu erwähnen, dass der Expressionsstatus der Marker zwar einheitlich durch eine einzelne Person aus den histopathologischen Befunden erhoben wurde, die Befunderstellung selbst sowie dazugehörige immunhistochemische bzw. durchflusszytometrische Testungen und Interpretation derer jedoch durch unterschiedliche Untersucher erfolgt ist, was zu diagnostischen Varianzen führen kann, die sich wiederum auf die Wertung der prognostischen Relevanz der Marker auswirken.

Vor dem Hintergrund der genannten Aspekte lässt sich zusammenfassend sagen, dass vor allem CD30 als vielversprechender Prädiktor für das DFS und OS zu werten ist. Dieser erbrachte nicht nur in der Kreuztabellenanalyse, sondern auch in den Überlebensanalysen und der univariaten Cox-Regression signifikante Ergebnisse bei gleichzeitig relativ hoher Fallzahl von  $n = 400$ . Auch die Einordnung in Vergleichsliteratur zeigte Übereinstimmung mit diversen, teils auch größeren Studien, in denen CD30 bereits als IPI unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert werden konnte. In einer weiterführenden Arbeit könnte die prognostische Relevanz von CD30 durch multivariate Analysen bekräftigt und die Daten dazu genutzt werden, CD30 in einen prognostischen Score zu überführen. Dies würde insbesondere auch der Identifikation der PatientInnen-Gruppen dienen, die von der vielversprechenden Brentuximab Vedotin-Therapie profitieren könnten (154). Die einfache Anwendung der IHC-Methode ermöglicht zudem die Evaluierung auch in routinemäßigem Setting.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Kurtz A, Pape H-C, Silbernagl S, Bondke Persson A, Brenner B, Burckhardt G, et al. Physiologie [Internet]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2018. Available from: <https://eref.thieme.de/10.1055/b-006-149284>
2. R L-R. Taschenlehrbuch Histologie [Internet]. Lüllmann-Rauch R, editor. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2015. Available from: <https://eref.thieme.de/10.1055/b-003-124637>
3. Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, et al. Physiologie [Internet]. 3., vollst. Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, et al., editors. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2017. Available from: [https://eref.thieme.de/ebooks/1502150#/ebook\\_1502150\\_SL62133339 BT](https://eref.thieme.de/ebooks/1502150#/ebook_1502150_SL62133339 BT) - Duale Reihe Physiologie
4. Neumann J. Immunbiologie, Eine Einführung. Springer Verlag. 2008.
5. Blum HE, Müller-Wieland D. Klinische Pathophysiologie [Internet]. Blum HE, Müller-Wieland D, editors. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2018. Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/book/10.1055/b-004-132250>
6. Behrends J, Bischofberger J DR et al. Duale Reihe Physiologie [Internet]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. (Duale Reihe). Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/book/10.1055/b-002-23567>
7. Gekle M, Wischmeyer E, Gründer S, Petersen M, Schwab A, Markwardt F, et al. Taschenlehrbuch Physiologie. Taschenlehrbuch Physiologie. 2015.
8. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R. Physiologie.
9. Armitage JO, Gascoyne RD, Lunning MA, Cavalli F. Non-Hodgkin lymphoma. Lancet [Internet]. 2017;390(10091):298–310. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32407-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32407-2)
10. Chihara D, Nastoupil LJ, Williams JN, Lee P, Koff JL. New insights into the epidemiology of non-Hodgkin lymphoma and implications for therapy. 2016;15(5):531–44.
11. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H. Pathologie. 5.

- Auflage. München: Elsevier; 2012.
12. Boffetta P. I. Epidemiology of adult non-Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol.* 2011;
  13. Morton LM, Slager SL, Cerhan JR, Wang SS, Vajdic CM, Skibola CF, et al. Etiologic heterogeneity among non-hodgkin lymphoma subtypes: The interLymph non-hodgkin lymphoma subtypes project. *J Natl Cancer Inst - Monogr.* 2014;
  14. Cerhan JR, Slager SL. Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. *Blood.* 2015.
  15. Castillo JJ, Ingham RR, Reagan JL, Furman M, Dalia S, Mitri J. Obesity is associated with increased relative risk of diffuse large B-cell lymphoma: A meta-analysis of observational studies. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk.* 2014;
  16. Zintzaras E, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: A meta-analysis. *Archives of Internal Medicine.* 2005.
  17. Shiels MS, Engels EA, Linet MS, Clarke CA, Li J, Hall HI, et al. The epidemic of non-Hodgkin lymphoma in the United States: Disentangling the effect of HIV, 1992-2009. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;
  18. Bayerdörffer E, Rudolph B, Neubauer A, Thiede C, Lehn N, Eidt S, et al. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. *Lancet.* 1995;
  19. Shannon-Lowe C, Rickinson AB, Bell AI. Epstein-barr virus-associated lymphomas. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2017.
  20. Kwong YL. Natural killer-cell malignancies: Diagnosis and treatment. *Leukemia.* 2005.
  21. Giordano TP, Henderson L, Landgren O, Chiao EY, Kramer JR, El-Serag H, et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma and lymphoproliferative precursor diseases in US veterans with hepatitis C virus. *J Am Med Assoc.* 2007;
  22. Melenotte C, Million M, Audoly G, Gorse A, Dutronc H, Roland G, et al. B-cell non-Hodgkin lymphoma linked to *Coxiella burnetii*. *Blood.* 2016;127(1):113–21.
  23. Freedman AS, Riedberg JW, Aster JC. Clinical presentation and diagnosis of non-Hodgkin lymphoma [Internet]. [cited 2019 Dec 15]. Available from:

- [https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-and-diagnosis-of-non-hodgkin-lymphoma?search=non-hodgkin-lymphom&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-and-diagnosis-of-non-hodgkin-lymphoma?search=non-hodgkin-lymphom&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)
24. Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, Jack A, Meignan M, Lopez-Guillermo A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;
  25. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of hodgkin and non-hodgkin lymphoma: The lugano classification. *Journal of Clinical Oncology*. 2014.
  26. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* [Internet]. 1989 Nov;7(11):1630–6. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1989.7.11.1630>
  27. Dührsen U, Fridrik MA, Klapper W, Schmitz N. Onkopedia Leitlinie Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom [Internet]. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. [cited 2020 Jan 15]. Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/diffuses-grosszelliges-b-zell-lymphom/@@guideline/html/index.html>
  28. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M, et al. 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*. 2010;
  29. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;
  30. Czuczman MS, Rademaker AW, Niland J, Zhou Z, Winter JN, Friedberg JW, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 2013;123(6):837–42.
  31. Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Müller SP, et al. 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*. 2014;
32. Liao C-C, Qin Y-Y, Tan X-H, Hu J-J, Tang Q, Rong Y, et al. Predictive value of interim PET/CT visual interpretation in the prognosis of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2017 Nov; Volume 10:5727–38. Available from: <https://www.dovepress.com/predictive-value-of-interim-petct-visual-interpretation-in-the-prognos-peer-reviewed-article-OTT>
  33. Pregno P, Chiappella A, Bellò M, Botto B, Ferrero S, Franceschetti S, et al. Interim 18-FDG-PET/CT failed to predict the outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated at the diagnosis with rituximab-CHOP. *Blood* [Internet]. 2012 Mar 1;119(9):2066–73. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/119/9/2066/30226/Interim-18FDGPETCT-failed-to-predict-the-outcome>
  34. Stewart DA, Kloiber R, Owen C, Bahlis NJ, Duggan P, Mansoor A, et al. Results of a prospective phase II trial evaluating interim positron emission tomography-guided high dose therapy for poor prognosis diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2014;
  35. Cox MC, Ambrogi V, Lanni V, Cavalieri E, Pelliccia S, Scopinaro F, et al. Use of interim [ 18 F]fluorodeoxyglucose-positron emission tomography is not justified in diffuse large B-cell lymphoma during first-line immunochemotherapy. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2012 Feb 23;53(2):263–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10428194.2011.614704>
  36. Casasnovas R-O, Meignan M, Berriolo-Riedinger A, Bardet S, Julian A, Thieblemont C, et al. SUVmax reduction improves early prognosis value of interim positron emission tomography scans in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* [Internet]. 2011 Jul 7;118(1):37–43. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/118/1/37/28406/SUVmax-reduction-improves-early-prognosis-value-of>
  37. Martelli M, Ceriani L, Zucca E, Zinzani PL, Ferreri AJM, Vitolo U, et al. [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts survival after chemoimmunotherapy for primary mediastinal large B-cell lymphoma: Results of the International Extranodal Lymphoma Study Group IELSG-26 study. *J Clin Oncol*. 2014;

38. Isaacson P, Berger F, Müller-Hermelink H, Nathwani B, Piris M, Swerdlow S, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001.
39. Ott, G; Klapper, W; Feller, A. C.; Hansmann, M. L.; Möller, P.; Stein, H.; Rosenwald, A.; Fend F. Revidierte Fassung der 4. Ausgabe der WHO-Klassifikation maligner Lymphome. Pathologe. 2019;40(2):157–68.
40. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Lee Harris N, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Vol. 127, Blood. 2016. p. 2375–90.
41. Sukswai N, Lyapichev K, Khoury JD, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma variants: an update. Pathology [Internet]. 2020 Jan;52(1):53–67. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003130251930399X>
42. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. J Clin Oncol. 2005;
43. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. Blood. 2007;109(5):1857–61.
44. Chan A, Dogan A. Prognostic and Predictive Biomarkers in Diffuse Large B-cell Lymphoma. Vol. 12, Surgical Pathology Clinics. 2019. p. 699–707.
45. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. 2017.
46. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. CA Cancer J Clin. 2016;

47. Tilly H, Vitolo U, Walewski J, Da silva MG, Shpilberg O, André M, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2012;23(SUPPL. 7).
48. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: Results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010;116(19):3724–34.
49. Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology*. 2018;50(1):74–87.
50. Martelli M, Ferreri AJM, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2013;87(2):146–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.12.009>
51. Gouveia GR, Siqueira SAC, Pereira J. Pathophysiology and molecular aspects of diffuse large B-cell lymphoma. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(6):447–51.
52. Yao Z, Deng L, Xu-Monette ZY, Manyam GC, Jain P, Tzankov A, et al. Concordant bone marrow involvement of diffuse large B-cell lymphoma represents a distinct clinical and biological entity in the era of immunotherapy. *Leukemia*. 2018;32(2):353–63.
53. Brudno J, Tadmor T, Pittaluga S, Nicolae A, Polliack A, Dunleavy K. Discordant bone marrow involvement in non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2016;127(8):965–70.
54. Bracci PM, Benavente Y, Turner JJ, Paltiel O, Slager SL, Vajdic CM, et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for marginal zone lymphoma: The interLymph non-Hodgkin lymphoma subtypes project. *J Natl Cancer Inst - Monogr* [Internet]. 2014;2014(48):52–65. Available from: <http://jncimono.oxfordjournals.org/%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed12&NEWS=N&AN=2014921101%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed12&NEWS=N&AN=2014579671>
55. Cerhan JR, Berndt SI, Vijai J, Ghesquières H, McKay J, Wang SS, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for diffuse large B cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014;46(11):1233–8.

56. Müller-Hermelink HK, Kreipe HH. Pathologie: Knochenmark, Lymphatisches System, Milz, Thymus [Internet]. Müller-Hermelink HK, Kreipe HH, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-85184-4>
57. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, Manyam GC, Visco C, Tzankov A, et al. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* [Internet]. 2013 Apr 4;121(14):2715–24. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/121/14/2715/31153/CD30-expression-defines-a-novel-subgroup-of>
58. Georgiou K, Chen L, Berglund M, Ren W, De Miranda NFCC, Lisboa S, et al. Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2016;
59. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;
60. Ferreri AJM, Chiu A, Liu W -m., Variakojis D, Huang Q, Richards KL, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*. 2013;121(20):4021–31.
61. Jamil MO, Mehta A. Diffuse Large B-cell lymphoma: Prognostic markers and their impact on therapy. Vol. 9, *Expert Review of Hematology*. 2016. p. 471–7.
62. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(February).
63. Ndrej A, Osenwald R, Eorge G, Right W, Ing W, Han CC, et al. The New England Journal of Medicine THE USE OF MOLECULAR PROFILING TO PREDICT SURVIVAL AFTER CHEMOTHERAPY FOR DIFFUSE LARGE-B-CELL LYMPHOMA A BSTRACT Background The survival of patients with diffuse. NUMBER 25 *N Engl J Med* [Internet]. 2002;346(25). Available from:

<http://www.nejm.org>

64. Pon JR, Marra MA. Clinical impact of molecular features in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma. *Blood*. 2016;127(2):181–6.
65. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*. 2003;198(6):851–62.
66. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275–82.
67. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5494–502.
68. Muris JJF, Meijer CJLM, Vos W, van Krieken JHJM, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol*. 2006;
69. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzman T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2011;117(18):4836–43.
70. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, Williams JN, Cohen JB, Flowers CR. Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-Cell lymphoma survival: A meta-analysis of gene expression profiling and immunohistochemistry algorithms. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* [Internet]. 2014;14(6):460–467.e2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2014.05.002>
71. Castillo JJ, Beltran BE, Song MK, Ilic I, Leppa S, Nurmi H, et al. The Hans algorithm is not prognostic in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Leuk Res* [Internet]. 2012;36(4):413–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2011.12.012>

72. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):200–7.
73. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 1999;341(20):1520–9.
74. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Genetics of diffuse large b-cell lymphoma. *Blood*. 2018;131(21):2307–19.
75. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RSK, Küppers R, et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*. 2001;412(6844):341–6.
76. Küppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 2001;20(40 REV. ISS. 4):5580–94.
77. Schneider C, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Diagn Pathol*. 2011;
78. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011;476(7360):298–303.
79. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet* [Internet]. 2011;43(9):830–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.892>
80. Troppan K, Wenzl K, Deutsch A, Ling H, Neumeister P, Pichler M. MicroRNAs in diffuse large B-cell lymphoma: Implications for pathogenesis, diagnosis, prognosis and therapy. Vol. 34, *Anticancer Research*. 2014. p. 557–64.
81. Schneider C, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Molecular pathology of lymphoma. *Mol Oncol Causes Cancer Targets Treat* [Internet]. 2015;27(2):738–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/eye.2012.247>
82. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, Rosenwald A, Pickering DL, Dave B, et al. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 2004;165(1):159–66.
83. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(6):961–8.
84. Conacci-sorrell M, McFerrin L, Eisenman RN. Erratum to: An overview of MYC

- and its interactome (Cold Spring Harb Perspect Med, (2014), 4). Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;4(4).
85. Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3360–5.
  86. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, Van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011;117(8):2319–31.
  87. Landsburg DJ, Petrich AM, Abramson JS, Sohani AR, Press O, Cassaday R, et al. Impact of oncogene rearrangement patterns on outcomes in patients with double-hit non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2016;122(4):559–64.
  88. Lin P, Medeiros LJ. High-grade B-cell lymphoma/leukemia associated with t(14;18) and 8q24/MYC rearrangement: A neoplasm of germinal center immunophenotype with poor prognosis. *Haematologica*. 2007;92(10):1297–301.
  89. Pfeifer M, Grau M, Lenze D, Wenzel SS, Wolf A, Wollert-Wulf B, et al. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(30):12420–5.
  90. Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, Jares P, Martin-Garcia D, Nadeu F, et al. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia*. 2018;32(3):675–84.
  91. Young KH, Weisenburger DD, Dave BJ, Smith L, Sanger W, Iqbal J, et al. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAIL receptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2007;110(13):4396–405.
  92. Guo Y, Takeuchi I, Karnan S, Miyata T, Ohshima K, Seto M. Array-comparative genomic hybridization profiling of immunohistochemical subgroups of diffuse large B-cell lymphoma shows distinct genomic alterations. *Cancer Sci*. 2014;105(4):481–9.
  93. Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, Matsuo K, Karnan S, Ohshima K, et al. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2005;106(5):1770–7.

94. Held G, Murawski N, Ziepert M, Fleckenstein J, Pöschel V, Zwick C, et al. Role of radiotherapy to bulky disease in elderly patients with aggressive b-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(11):1112–8.
95. Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanowski M, Bernd HW, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood*. 2010;116(23):4916–25.
96. Bellas C, García D, Vicente Y, Kilany L, Abraira V, Navarro B, et al. Immunohistochemical and Molecular Characteristics with Prognostic Significance in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Aziz SA, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jun 2;9(6):e98169. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0098169>
97. Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, Smith LM, Slack GW, Tan KL, et al. MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Br J Haematol*. 2014;
98. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009;
99. Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol*. 2010;
100. Lin P, Dickason TJ, Fayad LE, Lennon PA, Hu P, Garcia M, et al. Prognostic value of MYC rearrangement in cases of B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Cancer*. 2012;
101. Landsburg DJ, Falkiewicz MK, Petrich AM, Chu BA, Behdad A, Li S, et al. Sole rearrangement but not amplification of MYC is associated with a poor prognosis in patients with diffuse large B cell lymphoma and B cell lymphoma unclassifiable. *Br J Haematol*. 2016;
102. Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, Briere J, Delarue R, Canioni D, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: A GELA/LYSA study. *Blood*.

- 2015;
103. Rosenwald A, Sehn LH, Maucort-Boulch D. Prognostic Significance of MYC Single, Double, Triple Hit and MYC-Translocation Partner Status in Diffuse Large B-Cell Lymphoma - a Study By the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium (LLBC). *Blood*. 2018;
  104. Ott G, Klapper W, Feller AC, Hansmann ML, Möller P, Stein H, et al. Revised version of the 4th edition of the WHO classification of malignant lymphomas: What is new? Vol. 40, *Pathologie*. 2019. p. 157–68.
  105. Gordon LI, Harrington D, Andersen J, Colgan J, Glick J, Neiman R, et al. Comparison of a Second-Generation Combination Chemotherapeutic Regimen (m-BACOD) with a Standard Regimen (CHOP) for Advanced Diffuse Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 1992;
  106. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, et al. Comparison of a Standard Regimen (CHOP) with Three Intensive Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;
  107. Coiffier B, Lepage E, Brière J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. Chop chemotherapy plus rituximab compared with chop alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;
  108. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: A study by the groupe d'étude des lymphomes de l'adulte. *J Clin Oncol*. 2005;
  109. Pfreundschuh M, Trümper L, Österborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol*. 2006;
  110. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, et al. 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). *Lancet Oncol* [Internet]. 2008 Feb;9(2):105–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204508700020>

111. Pfreundschuh M. Aktuelle Therapiestrategien beim diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom. *Internist*. 2016;
112. Casasnovas RO, Ysebaert L, Thieblemont C, Bachy E, Feugier P, Delmer A, et al. FDG-PET–driven consolidation strategy in diffuse large B-cell lymphoma: Final results of a randomized phase 2 study. *Blood*. 2017;
113. Schmitz N, Nickelsen M, Ziepert M, Haenel M, Borchmann P, Schmidt C, et al. Conventional chemotherapy (CHOEP-14) with rituximab or high-dose chemotherapy (MegaCHOEP) with rituximab for young, high-risk patients with aggressive B-cell lymphoma: An open-label, randomised, phase 3 trial (DSHNHL 2002-1). *Lancet Oncol*. 2012;
114. Hopfinger G, Jäger U, Worel N. CAR-T Cell Therapy in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *HemaSphere*. 2019;
115. Coiffier B, Sarkozy C. Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure—what to do? *Hematology* [Internet]. 2016 Dec 2;2016(1):366–78. Available from: <https://ashpublications.org/hematology/article/2016/1/366/21001/Diffuse-large-Bcell-lymphoma-RCHOP-failurewhat-to>
116. Ruppert AS, Dixon JG, Salles GA, Wall A, Cunningham D, Poeschel V, et al. International prognostic indices in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): a comparison of IPI, R-IPI and NCCN-IPI. *Blood* [Internet]. 2020 Mar 13; Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/doi/10.1182/blood.2019002729/452696/International-prognostic-indices-in-diffuse-large>
117. Maurer MJ, Ghesquières H, Jais J-P, Witzig TE, Haioun C, Thompson CA, et al. Event-Free Survival at 24 Months Is a Robust End Point for Disease-Related Outcome in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Immunochemotherapy. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Apr 1;32(10):1066–73. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2013.51.5866>
118. Maurer MJ, Jais J-P, Ghesquières H, Witzig TE, Hong F, Haioun C, et al. Personalized risk prediction for event-free survival at 24 months in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol* [Internet]. 2016 Feb;91(2):179–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajh.24223>
119. Campuzano-Zuluaga G, Cioffi-Lavina M, Lossos IS, Chapman-Fredricks JR. Frequency and extent of CD30 expression in diffuse large B-cell lymphoma and its relation to clinical and biologic factors: A retrospective study of 167

- cases. *Leuk Lymphoma*. 2013;
120. Slack GW, Steidl C, Sehn LH, Gascoyne RD. CD30 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma: A population-based study from British Columbia. *Br J Haematol*. 2014;167(5):608–17.
  121. Hao X, Wei X, Huang F, Wei Y, Zeng H, Xu L, et al. The Expression of CD30 Based on Immunohistochemistry Predicts Inferior Outcome in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Batra SK, editor. PLoS One [Internet]*. 2015 May 14;10(5):e0126615. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0126615>
  122. Gong QX, Lu TX, Liu C, Wang Z, Liang JH, Xu W, et al. Prevalence and clinicopathologic features of CD30-positive de novo diffuse large B-cell lymphoma in Chinese patients: A retrospective study of 232 cases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;
  123. Wang XJ, Seegmiller AC, Reddy NM, Li S. CD30 expression and its correlation with MYC rearrangement in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2016;
  124. Korkolopoulou P, Vassilakopoulos T, Milionis V, Ioannou M. Recent Advances in Aggressive Large B-cell Lymphomas: A Comprehensive Review. *Advances in Anatomic Pathology*. 2016.
  125. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, Manyam GC, Visco C, Tzankov A, et al. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: A report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Vol. 121, Blood*. 2013. 2715-2724 p.
  126. Gong QX, Wang Z, Liu C, Li X, Lu TX, Liang JH, et al. CD30 expression and its correlation with MYC and BCL2 in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Pathol*. 2018;71(9):795–801.
  127. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood*. 1993;
  128. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay M, Briere J, Lavignac C, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA)*. *Blood*. 1996;
  129. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Hudson BV, Burke M, Clarke P, et

- al. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-hodgkin's lymphoma: A British National Lymphoma Investigation Study. *Blood*. 1996;
130. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;
131. Mounier N. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* [Internet]. 2003 Jun 1;101(11):4279–84. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2002-11-3442>
132. Seki R, Ohshima K, Fujisaki T, Uike N, Kawano F, Gondo H, et al. Prognostic impact of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer Sci*. 2009;100(10):1842–7.
133. Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, Johnson NA, Vose JM, Greiner TC, et al. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res*. 2011;
134. Tsuyama N, Sakata S, Baba S, Mishima Y, Nishimura N, Ueda K, et al. BCL2 expression in DLBCL: Reappraisal of immunohistochemistry with new criteria for therapeutic biomarker evaluation. *Blood*. 2017;
135. Uherova P, Ross CW, Schnitzer B, Singleton TP, Finn WG. The clinical significance of CD10 antigen expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2001;
136. Salles G, De Jong D, Xie W, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, et al. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: A study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood*. 2011;
137. Harada S, Suzuki R, Uehira K, Yatabe Y, Kagami Y, Ogura M, et al. Molecular and immunological dissection of diffuse large B cell lymphoma: CD5+, and CD5- with CD10+ groups may constitute clinically relevant subtypes. *Leukemia* [Internet]. 1999 Sep 9;13(9):1441–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/2401487>
138. Veelken H, Vik Dannheim S, Schulte Moenting J, Martens UM, Finke J, Schmitt-Graeff A. Immunophenotype as prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in patients undergoing clinical risk-adapted therapy. *Ann*

- Oncol. 2007;
139. Castillo JJ, Chavez JC, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Montes-Moreno S. CD20-negative diffuse large B-cell lymphomas: Biology and emerging therapeutic options. *Expert Review of Hematology*. 2015.
  140. Katchi T, Liu D. Diagnosis and treatment of CD20 negative B cell lymphomas. *Biomarker Research*. 2017.
  141. Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, Shimada K, Ito M, Nakamura S, et al. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: Its prevalence and clinical significance. *Blood*. 2009;
  142. AbdullGaffar B, Seliem RM. De Novo Unclassifiable CD20-Negative Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Diagnostic and Therapeutic Challenge. *Int J Surg Pathol*. 2018;
  143. Ok CY, Papathomas TG, Medeiros LJ, Young KH. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Blood*. 2013;
  144. Dojcinov SD, Venkataraman G, Pittaluga S, Wlodarska I, Schrag JA, Raffeld M, et al. Age-related EBV-associated lymphoproliferative disorders in the Western population: A spectrum of reactive lymphoid hyperplasia and lymphoma. *Blood*. 2011;
  145. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, et al. Prognostic significance of diffuse large B-cell lymphoma cell of origin determined by digital gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2848–56.
  146. Sofohafizovic A, Chikha A, Gojak R, Hadzimesic A. Expression IRF/MUM1 > 25% Predictor to Three-year Survival of Diffuse Large B Cell Lymphoma in the Immunochemotherapy Era. *Med Arch [Internet]*. 2016;70(5):342. Available from: <http://www.scopemed.org/fulltextpdf.php?mno=247068>
  147. Lu T-X, Miao Y, Wu J-Z, Gong Q-X, Liang J-H, Wang Z, et al. The distinct clinical features and prognosis of the CD10+MUM1+ and CD10–Bcl6–MUM1– diffuse large B-cell lymphoma. *Sci Rep [Internet]*. 2016 Apr 9;6(1):20465. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep20465>
  148. Culpin RE, Sieniawski M, Angus B, Menon GK, Proctor SJ, Milne P, et al. Prognostic significance of immunohistochemistry-based markers and

- algorithms in immunochemotherapy-treated diffuse large B cell lymphoma patients. *Histopathology*. 2013;
149. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: A report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortiu. *Leukemia*. 2012;
  150. Vakiani E, Cattoretti G, Colovai AI, Murty V V., Alobeid B, Bhagat G. CD117 expression in diffuse large B-cell lymphomas: Fact or fiction? *Pathol Int*. 2005;55(11):716–23.
  151. Marks E, Shi Y, Wang Y. CD117 (KIT) is a useful marker in the diagnosis of plasmablastic plasma cell myeloma. *Histopathology*. 2017;
  152. Chen F, Hu Y, Wang X, Fu S, Liu Z, Zhang J. Expression of CD81 and CD117 in plasma cell myeloma and the relationship to prognosis. *Cancer Med*. 2018;
  153. Wang Y, Farooq U, Link BK, Larson MC, King RL, Maurer MJ, et al. Late relapses in patients with diffuse large b-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *J Clin Oncol*. 2019;
  154. Jacobsen ED, Sharman JP, Oki Y, Advani RH, Winter JN, Bello CM, et al. Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood* [Internet]. 2015 Feb 26;125(9):1394–402. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/125/9/1394/34206/Brentuximab-vedotin-demonstrates-objective>