

**Prognosevorhersage für maligne Lymphome durch mit tumorbiologischen
Eigenschaften verbundene Marker**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Denis Terziev

Betreuer: PD Dr. med. Thomas Weber

Gutachter:

Prof. Dr. med. Jonas Rosendahl, Halle (Saale)

Prof. Dr. med. Christian Scholz, Berlin

Datum der Verteidigung: 24.10.2024

Referat

Für die Therapiesteuerung von Patient*innen mit malignen Lymphomen ist eine sichere Prognoseschätzung nötig. Die derzeit in der klinischen Praxis eingesetzten Prognosemodelle weisen jedoch zum Teil Defizite in ihrer prognostischen Güte auf. Prognostische Marker, die veränderte tumorbiologische Prozesse widerspiegeln, können möglicherweise dazu beitragen, die Prognostizierung der betroffenen Patient*innen zu verbessern. Ziel dieser explorativen Studie war es daher, den Einfluss möglicher prognostischer Faktoren mit tumorbiologischem Hintergrund auf das Therapieansprechen und die Überlebensparameter von Lymphompatient*innen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden patienten-, krankheits- und therapiespezifische Daten von Lymphompatient*innen, die am Universitätsklinikum Halle (Saale) behandelt wurden, retrospektiv erhoben und deskriptiv ausgewertet. Zusätzlich wurde die Assoziation potenzieller prognostischer Variablen mit dem Therapieansprechen und Überlebensparametern in univariaten und multivariaten Modellen untersucht. Die konkordante Knochenmarkinfiltration ist als mögliches Surrogat für eine veränderte Tumorbiologie ein ungünstiger prognostischer Marker für Patient*innen mit diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL) unter anthrazyklinhaltiger Erstlinientherapie. In der vorliegenden Analyse war die konkordante Knochenmarkinfiltration auch ein unabhängiger negativer Prognosefaktor für das progressionsfreie und Gesamtüberleben von Patient*innen mit refraktärem oder rezidiviertem DLBCL und transformiertem indolentem Lymphom, die für eine Stammzelltransplantation vorgesehen waren. Ribonukleinsäure- (RNA) bindende Proteine wie das RNA binding motif protein X-linked (RBMX) regulieren den RNA-Metabolismus und sind bei Tumorerkrankungen häufig verändert. In einer zweiten Analyse wurde die RBMX-Expression in verschiedenen Subtypen von T-NHL und deren Assoziation mit Therapieansprechen und Überlebensparametern untersucht. Eine erhöhte RBMX-Expression war mit einem reduzierten Ansprechen auf eine anthrazyklinhaltige Primärtherapie sowie einem kürzeren progressionsfreien und Gesamtüberleben von Patient*innen mit T-NHL assoziiert. Die Integration dieser Prognosemarker in bestehende Prognosemodelle könnte dazu beitragen, die Risikostratifizierung und Prognoseabschätzung von Patient*innen mit malignen Lymphomen zu verbessern.

Terziev, Denis: Prognosevorhersage für maligne Lymphome durch mit tumorbiologischen Eigenschaften verbundene Marker, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 26 Seiten, 2024

Inhalt

<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>II</u>
<u>1. EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG</u>	<u>1</u>
<u>2. DISKUSSION</u>	<u>11</u>
<u>3. LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>17</u>
<u>4. THESEN</u>	<u>26</u>
<u>ANLAGEN</u>	<u>III</u>
<u>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</u>	<u>IV</u>
<u>ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE DISSERTATIONSVERSUCHE</u>	<u>V</u>
<u>DANKSAGUNG</u>	<u>VI</u>

Abkürzungsverzeichnis

AA	Ann Arbor
aalPI	altersadjustierter Internationaler Prognoseindex
AITL	angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom
ALCL	anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
BAFF	B cell-activating factor
BCL-2	B-Zell-Lymphom 2
BV	Brentuximab-Vedotin
BV-CHP	Brentuximab-Vedotin, Cyclophosphamid, Doxyrubicin, Etoposid, Prednisolon
CAR	Chimeric-Antigen-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CHOEP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin, Etoposid, Prednisolon
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin und Prednisolon
CR	Komplettremission
c-Statistik	Konkordanz-Statistik
DLBCL	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
ECOG-PS	Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status
ENKTL	extranodales NK-/ T-Zell-Lymphom
GCB	germinal center B-cell-like
HDCT	Hochdosis-Chemotherapie
IPI	Internationaler Prognoseindex
IPTCLP	International Peripheral T-cell Lymphoma Project
LDH	Laktatdehydrogenase
KM	Knochenmark
mPIT	modifizierter Prognoseindex für T-NHL
mRNA	Messenger-RNA
MYC	MYC-Protoonkogen
NGS	next generation sequencing
NOS	nicht weiter spezifiziert
OS	Gesamtüberleben
PFS	progressionsfreies Überleben
PIT	Prognoseindex für T-NHL

PTCL	peripheres T-Zell-Lymphom
PR	Partialremission
p53	Cellular Tumor Antigen p53
RBMX	RNA binding motif protein X-linked
RBP	RNA-bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
r/r	rezidiert oder refraktär
SZT	Stammzelltransplantation
T-NHL	T-Zell-Lymphom
TRIL	transformiertes indolentes Lymphom
WBC	weiße Blutkörperchen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WHO-HAEM5	5. Auflage der WHO-Klassifikation der hämatolymphoiden Tumoren

1. Einleitung und Zielstellung

Maligne B- und T-Zell-Lymphome sind Neoplasien des lymphatischen Gewebes, die sich durch eine hohe biologische Heterogenität und damit eine vielgestaltige klinische Präsentation auszeichnen. Das klinische Spektrum der malignen Lymphome reicht von mehrjährig asymptomatischen bis zu aggressiven Verläufen. Eine sichere Prognoseschätzung ermöglicht eine verbesserte Therapiesteuerung und Aufklärung von Patient*innen mit malignen Lymphomen. So besteht bei Risiko für einen ungünstigen Verlauf unter Standardtherapie die Möglichkeit zur Intensivierung der lymphomgerichteten Therapie und der Tumornachsorge. Hingegen kann bei erwartbar günstigem Verlauf eine Deeskalation der Therapie erwogen und damit möglicherweise therapieassoziierte Toxizität eingespart werden [1]. Für die Prognoseprädiktion können vor Therapieeinleitung prognostische Biomarker erhoben werden, um die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Krankheitsrezidiven/ -progression oder des Todes bei Lymphompatient*innen vorherzusagen [2,3]. Diese Variablen umfassen in der aktuellen klinischen Praxis neben patientenbezogenen Markern wie Alter und Performance Status auch krankheitsbezogene Biomarker, die auf anatomischen, laborklinischen oder histopathologischen Faktoren beruhen [4]. Mit fortschreitendem Verständnis für die molekularen und zellbiologischen Grundlagen von malignen Lymphomen werden vermehrt mit tumorbiologischen Eigenschaften verbundene Marker identifiziert und hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung untersucht. Die Integration verschiedener prognostischer Variablen in Scores oder Modelle führt zu einer Verbesserung der Prognosevorhersagung für maligne Lymphome [5,6]. Allerdings ist die prognostische Güte, also die Fähigkeit die Prognose der Patient*innen korrekt vorherzusagen, auch solcher Modelle limitiert [7–10]. Die prognostische Güte kann mithilfe der Konkordanz-Statistik (c-Statistik) gemessen werden. Diese reicht von 0,5 (zufällige Konkordanz) bis 1 (perfekte Konkordanz) [3]. Um die Vorhersagegüte prognostischer Modelle bei malignen Lymphomen weiter zu verbessern, zielt eine Vielzahl von Analysen darauf mit tumorbiologischen Eigenschaften verbundene Marker in diesen Krankheitsbildern zu identifizieren und sie in bestehende oder neue prognostische Modelle zu integrieren [11–13].

Die Gruppe der reifzelligen großzelligen B-Zell-Lymphome umfasst die häufigsten Lymphomentitäten des Erwachsenen [14]. Ihre Inzidenz beträgt unter Berücksichtigung regionaler Unterschiede ca. 4-7 Fälle pro 100.000 Einwohner, wobei Männer häufiger von der Erkrankung betroffen sind als Frauen [15–17]. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 66 Jahre [17], jedoch können auch weitaus jüngere Frauen und Männer erkranken. Die reifzelligen großzelligen B-Zell-Lymphome werden innerhalb der aktuellen ‚World Health Organisation‘ (WHO) Klassifikation der hämatolymphoiden

Tumoren in ihrer 5. Auflage von 2022 (WHO-HAEM5) in 18 Subtypen unterteilt [18]. Dabei stellt die Gruppe der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome, nicht weiter spezifiziert (DLBCL, NOS) die häufigste Entität dar. Sie ist definiert durch die Morphologie mit mittelgroßen bis großen Zellen mit runden bis ovalen Kernen und vesikulärem Chromatin oder blastoiden Zellen, ihren reifen B-Zell-Phänotyp und das Fehlen von Kriterien zur Definition spezifischer großzelliger B-Zell-Lymphom-Entitäten. Die unter DLBCL, NOS zusammengefassten Lymphome sind morphologisch und molekularbiologisch heterogen. So kann histomorphologisch zwischen anaplastischen, immunblastischen und zentroblastischen DLBCL unterschieden werden [18]. Unterschiede in der Genexpression erlauben zudem eine Unterteilung der DLBCL nach dem zellulären Ursprung („cell of origin“) in „activated B-cell-like“ und „germinal center B-cell-like“ (GCB) DLBCL [19,20]. Stellvertretend für die in der klinischen Routine nicht standardmäßig etablierte Untersuchung der Genexpression können immunhistochemische Expressionsprofile zur Unterscheidung von GCB- und Non-GCB-DLBCL herangezogen werden [21]. Ferner erlauben Genexpressionsanalysen mit Sequenzierungsmethoden der nächsten Generation („next generation sequencing“ (NGS)) die Differenzierung in weitere DLBCL-Subtypen [22,23]. Neben den DLBCL, NOS führt die WHO-HAEM5 spezifische reifzellige großzellige B-Zell-Lymphome auf, die über sie jeweils definierende Kriterien voneinander abgegrenzt werden. Diese definierenden Kriterien umfassen dabei klinische Parameter wie die Lokalisationen (u.a. primär kutane großzellige B-Zell-Lymphome der unteren Extremität („leg type“), histologische Aspekte (u.a. T-Zell-/ Histiocytenreiche großzellige B-Zell-Lymphome), den Immunphänotyp (Anaplastische Lymphomkinase- (ALK) positive großzellige B-Zell-Lymphome), genetische Alterationen (u.a. großzellige B-Zell-Lymphome mit 11q-Aberration) und die Assoziation mit infektiösen Erregern (u.a. Epstein-Barr-Virus-positive großzellige B-Zell-Lymphome). Die Untergruppe der primären großzelligen B-Zell-Lymphome der immunprivilegierten Lokalisationen schließt das primäre diffuse großzellige B-Zell-Lymphom des zentralen Nervensystems sowie das primäre großzellige B-Zell-Lymphom des Hodens und das primäre vitreoretinale großzellige B-Zell-Lymphom ein. Transformierte indolente Lymphome (TRIL) bezeichnen großzellige B-Zell-Lymphome, die sekundär aus indolenten Lymphomen wie bspw. Marginalzonenlymphomen oder follikulären Lymphomen hervorgehen [18]. Da sich all diese klinisch aggressiv/ hochmaligne verlaufenden B-Zell-Lymphome in ihrer Therapie nicht wesentlich unterscheiden [4], werden sie im Folgenden unter dem Begriff DLBCL zusammengefasst. Die Basis der Erstlinientherapie des DLBCL bildet bei geeigneten Patient*innen eine anthrazyklinhaltige Polychemotherapie nach dem CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin, Prednisolon) kombiniert mit dem

monoklonalen anti- Cluster of Differentiation (CD) 20 Antikörper Rituximab (R) [24–28]. Hierunter werden Heilungsraten bis zu 70% erzielt [25,29–31]. Der Austausch von Vincristin durch das Antikörper-Chemotherapie-Konjugat Polatumumab-Vedotin verbessert das progressionsfreie Überleben (PFS) von Patient*innen mit Internationalem Prognoseindex (IPI) ≥ 2 um absolut 6,5% [32] und wird als Beispiel für eine abhängig vom Vorhandensein eines ungünstigen prognostischen Faktors eingesetzte Therapie für diese Patient*innen seit 2022 eingesetzt. Die Prognoseabschätzung der Patient*innen mit erstdiagnostiziertem DLBCL erfolgt maßgeblich anhand klinischer Parameter. Hierfür ist das Risikomodell des IPI etabliert, der die prognostisch ungünstigen Faktoren Alter >60 Jahre, erhöhte Laktatdehydrogenase (LDH), Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG-PS) 3-4, Ann-Arbor- (AA) Stadium $\geq III$ und mehr als einen extranodalen Befall zusammenfasst und eine Einteilung der Patient*innen in vier Prognosegruppen ermöglicht [6]. Je nach Prognosegruppe reichen die 5-Jahresraten des Gesamtüberlebens (OS) unter R-haltigen Immunchemotherapien von 43%–84% [5]. Der altersadjustierter IPI (aalPI) steht für die Prognoseschätzung für Patient*innen unter 60 Jahren zur Verfügung [33]. Der Knochenmark- (KM) Befall des DLBCL geht als extranodaler Befall und über das AA-Stadium IV in die genannten prognostischen Scores ein, ist jedoch auch einzeln betrachtet als prognostisch ungünstiger Faktor unter Erstlinientherapie anzusehen [34–36]. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Nachweis mittelgroß- bis großzelliger Lymphominfiltrate (konkordanter KM-Befall) mit einem schlechteren Überleben nach Erstlinientherapie verbunden ist, wohingegen der Nachweis kleinzelliger Lymphominfiltrate im KM (diskordanter KM-Befall) diesbezüglich nicht prognostisch relevant ist [34–36]. Neben den genannten klinischen Parametern zeigten Genexpressionsprofile, MYC-Protoonkogen (MYC) und B-Zell-Lymphom 2- (BCL-2) Translokationsstatus ('double hit'), myc- und bcl2-Expressionsstatus der DLBCL sowie ihre Einteilung nach dem immunhistochemischen Algorithmus von Hans et al. [21] ebenfalls prognostische Relevanz [22,23,37–40]. Jedoch ist ihre Bedeutung für die Krankenversorgung aktuell unklar [4]. Eine alterierte Expression des 'Cellular Tumor Antigen p53' (p53) scheint in DLBCL mit einer erhöhten Tumorlast, aber nicht mit einem kürzerem PFS oder OS assoziiert zu sein [41,42].

Nur sehr wenige Patient*innen mit auf die Erstlinientherapie refraktärem oder rezidiertem (r/r) DLBCL erreichen eine langfristige Remission bzw. Kuration ohne zellbasierte Therapie [43]. Für ausreichend fitte Patient*innen mit r/rDLBCL ermöglicht die Hochdosis-Chemotherapie (HDCT) mit autologer Stammzelltransplantation (SZT) nach induktiver Immunchemotherapie hingegen Langzeitüberlebensraten von $>50\%$ [9,44]. Allerdings können bis zu 50% der initial transplantationsgeeigneten Patient*innen

aufgrund von Nichtansprechen auf die induktive Rezidivtherapie, therapielimitierender Toxizität oder Stammzellaphereseversagen nicht der angestrebten HDCT mit autologer SZT zugeführt werden [9]. Dazu kommt, dass das DLBCL bei 40–50% der Patient*innen innerhalb von vier Jahren nach autologer SZT rezidiert [9,45,46] und dann eine sehr schlechte Prognose aufweist [47–49]. Als prognostisch ungünstig für transplantationsgeeignete Patient*innen mit r/rDLBCL erwies sich, wenn die Erkrankung sich auf die Erstlinientherapie refraktär zeigt oder innerhalb von 12 Monaten nach Abschluss dieser rezidiert [8,9,48]. Gisselbrecht et al. [9] berichten von einem verschlechterten 3-Jahres-OS von 39% in dieser Subgruppe gegenüber 64% in der Subgruppe der spätrezidierten r/rDLBCL. Mittlerweile ist für die transplantationsgeeignete Patient*innengruppe mit primär refraktärem oder innerhalb von 12 Monaten nach abgeschlossener Erstlinientherapie rezidiertem DLBCL die Chimeric-Antigen-Receptor- (CAR) T-Zelltherapie als neuer Therapiestandard etabliert [50,51]. Die allogene SZT stellt hingegen eine therapeutische Alternative für dieses Patient*innenkollektiv zum Beispiel im Fall eines Stammzellapheresversagens dar. Das mittlere 1-Jahres-OS nach dieser Zelltherapie beträgt bis zu 52% [52]. Ihr Einsatz ist jedoch in Anbetracht der hohen therapieassoziierten Mortalität und dem Vorhandensein alternativer, weniger toxischer Therapieoptionen eingeschränkt [4]. Die Eignungsprüfung der Patient*innen für eine autologe oder allogene SZT erfolgt zumeist nach lokalen Richtlinien [53]. Dabei stellen neben therapielimitierenden Komorbiditäten, die mit Hilfe des Stammzelltransplantations-Komorbiditätenindex evaluiert werden können, ein Patient*innenalter über 65–75 Jahre und eine unzureichende soziale Versorgung der Patient*innen nach SZT relative Ausschlusskriterien für die SZT dar [54–56]. Für Patient*innen mit r/rDLBCL, die sich nicht für eine Zelltherapie eignen, stehen mittlerweile mit Tafasitamab/ Lenalidomid, Polatuzumab-Vedotin/ Rituximab/ Bendamustin sowie bispezifischen Antikörpern wie Glofitamab wirksame und verträgliche Therapieoptionen zur Verfügung [4]. Ob durch diese Therapien in einem Teil der Patient*innen eine langfristige Erkrankungskontrolle erreicht werden kann, ist noch nicht ausreichend untersucht. Für die Prognostizierung im Rezidiv werden weiterhin maßgeblich klinische Faktoren genutzt. Hierfür sind die in der Erstlinientherapie des DLBCL etablierten prognostischen Modelle IPI und der sekundäre aalPI (saalPI) anwendbar [9,33,48,57]. Das Prognosemodell des R/R IPI berücksichtigt den Faktor der Zeit von der Diagnose bis zum Progress des DLBCL [8]. Allerdings ist die prognostische Vorhersagegüte der vorhandenen Prognosemodelle limitiert. So sprechen r/rDLBCL-Patient*innen mit saalPI >1 (Hochrisiko) in 32% langfristig auf eine autologe SZT an, wohingegen 38% der Patient*innen mit saalPI von 0–1 (niedrig-intermediäres Risiko) innerhalb von drei Jahren versterben [9]. Der Identifikation neuer, mit tumorbiologischen

Prozessen assoziierter, prognostischer Parameter und deren Kombination mit etablierten prognostischen Markern kommt daher eine wichtige Rolle zur Optimierung der Therapiestrategie für r/rDLBCL zu. Bei transplantationsgeeigneten Patient*innen mit r/rDLBCL findet sich in 5–22% ein KM-Befall des Lymphoms [9,45,58,59]. Bei r/rTRIL-Patient*innen wurde über eine KM-Beteiligung von bis zu 40% berichtet [60]. Während das KM meist konkordant durch ein großzelliges Lymphom befallen ist, weist ein Teil der Patient*innen einen diskordanten KM-Befall durch ein kleinzelliges Lymphom auf. Ein solcher diskordanter KM-Befall kann eine klonale Verwandtschaft zu einer andernorts diagnostizierten Lymphommanifestation aufweisen, aber auch eine klonal distinkte und nicht verwandte B-Zell-Neoplasie darstellen [61,62]. Genexpressionsprofile von DLBCL-Proben mit konkordantem KM-Befall zeigen gegenüber DLBCL ohne KM-Befall eine Überexpression von Genen auf, deren Produkte an der zellulären Adhäsion, der Reorganisation des Zytoskeletts sowie der Immunregulation beteiligt sind [11]. Eine dadurch modulierte Stroma-Tumorzell-Interaktion innerhalb der KM-Nische führt möglicherweise zu einer Medikamentenresistenz und Prognoseeinschränkung [63–65]. Für Patient*innen mit r/rDLBCL ist der prognostische Einfluss des KM-Befalls weithin unklar, da entsprechende Patient*innenkollektive in klinischen Studien klein sind und Unterschiede in den Studiendesigns deren Vergleichbarkeit erschweren [9,45,58–60]. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, den Einfluss des konkordanten und diskordanten KM-Befalls auf das PFS und OS von transplantationsgeeigneten Patient*innen mit r/rDLBCL und r/rTRIL zu analysieren.

T-Zell-Lymphome (T-NHL) bezeichnen eine heterogene Gruppe von reifzelligen T-Zell- und NK-Zell-Neoplasien und sind bei einer Inzidenz von etwa 1 pro 100.000 Menschen pro Jahr in Europa und Nordamerika insgesamt selten [53]. Sie machen dabei ca. 10% aller neu diagnostizierten malignen Lymphome aus und treten wie bei den Lymphomen mit B-Zell-Differenzierung häufiger bei Männern auf [66]. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit steigt mit zunehmendem Alter [67,68]. Sowohl in der WHO-HAEM5 als auch in der parallel entwickelten ‚International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms‘ werden den reifzelligen T-Zell- und NK-Zell-Neoplasien über 30 einzelne Entitäten zugeschrieben [18,69]. Obwohl die meisten reifzelligen T- oder NK-Zell-Neoplasien der jeweiligen T- oder NK-Zell-Linie zugeordnet werden können, trennt die WHO-HAEM5 sie nicht in zwei Kategorien, da einige Entitäten ein Spektrum von Tumoren mit NK-, T-, hybridem oder unbestimmtem Phänotyp umfassen [18]. Stattdessen werden sie dynamisch u.a. nach klinischem Szenario, Lymphomlokalisierung, Zytomorphologie und Differenzierungsstatus geordnet [18]. In Hinblick auf klinische Aspekte und auf die Lymphomlokalisierung lassen sich primär nodale, primär leukämische, primär kutane und primär extranodale (nicht kutane) T-NHL

unterscheiden [70]. Zytomorphologisch und immunhistochemisch grenzt die WHO-HAEM5 die Gruppe der anaplastischen großzelligen Lymphome (ALCL) ab, die durch pleomorphe Tumorzellen mit einheitlich starker Expression von CD30 und häufig defekter Expression von T-Zell-Linienmarkern gekennzeichnet sind [18]. Sie umfasst die ALCL mit und ohne ALK-Translokation und die Brustimplantat-assoziierten ALCL. Auf Grundlage immunphänotypischer Überschneidungen sowie ähnlicher Genexpressionssignaturen und Mutationsprofile werden hingegen Teile der peripheren T-Zell-Lymphome (PTCL), NOS, das angioimmunoblastische T-Zell-Lymphom (AITL) und die folliculären T-Zell-Lymphome in der Gruppe der T-folliculären Helferzell-Lymphome zusammengefasst [18]. Am häufigsten werden in Europa das PTCL, NOS, das AITL und das ALK+/ ALK- ALCL diagnostiziert [67]. T-NHL weisen gegenüber anderen malignen Lymphomen eine ungünstige Prognose auf [67]. Das 5-Jahres OS liegt unter Standardtherapie nach dem CHOP-Schema über alle Entitäten der T-NHL hinweg lediglich bei ca. 30% [67]. 2/3 der Erkrankungen sind wiederum primär refraktär auf diese Therapie oder rezidivieren [67,71]. Abhängig vom histologischen Subtyp zeigen sich jedoch Unterschiede im Überleben. So beträgt das 5-Jahres OS unter Chemotherapie analog dem CHOP-Schema für primär kutane ALCL 78-90%, für ALK-positive ALCL 58–70%, für ALK-negative ALCL 34–49%, für PTCL, NOS und AITL 32–36% und für Enteropathie-assoziierte T-NHL 20–22% [67,72]. Die Intensivierung der CHOP-Chemotherapie durch Hinzunahme von Etoposid (CHOEP) scheint die Prognose zu verbessern [73–75] und kann daher bei Patient*innen unter 60 Jahren erwogen werden [53]. Für geeignete Patient*innen, die mit einer Komplettremission (CR) oder einer guten Partialremission (PR) hinreichend auf die primäre Induktionstherapie ansprechen, wird eine HDCT gefolgt von einer autologen SZT empfohlen. Eine Phase-II-Studie [76] und klinische Registerdaten [74,75] legen nahe, dass diese konsolidierende Therapie das OS nach Therapie mit sechs Zyklen CHOEP alle 14 Tage auf etwa 50% nach fünf Jahren verbessern kann. Ein aktuell ungelöstes Problem ist jedoch, dass in prospektiven Studien 20–30% der Patient*innen unter Induktionstherapie keine ausreichende Remission erreicht haben und somit der autologen SZT nicht zugeführt werden konnten [76,77]. Die Durchführung einer konsolidierenden allogenen SZT in der Erstlinientherapie führt gegenüber der autologen SZT zu keiner Verbesserung des OS, was sich auf die höhere therapieassoziierte Mortalität dieses Verfahren zurückführen lässt [78]. Mit zunehmendem Verständnis für ihre heterogene Biologie diversifiziert sich die Therapie der T-NHL. So hat sich in Europa für die obligat CD30 exprimierenden ALCL der Austausch von Vincristin durch das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat Brentuximab-Vedotin (BV) im CHOP-Regime (BV-CHP) als therapeutischer Standard für die Erstlinientherapie etabliert [53]. Bei Patient*innen mit

ALK-positivem ALCL und IPI <2 kann nach Induktionstherapie mit BV-CHP aufgrund ihrer guten Prognose von einer konsolidierenden autologen SZT abgesehen werden. Die Therapie der extranodalen NK-/ T-Zell-Lymphome vom nasalen Typ (ENKTL) unterscheidet sich hingegen aufgrund ihrer schlechten Prognose unter anthrazyklinhaltiger Chemotherapie [67,72,79]. Während lokalisierte Stadien des ENKTL in der Erstlinientherapie radio- oder radiochemotherapiert werden sollten, wird für Patient*innen in fortgeschrittenen Stadien eine intensive anthrazyklinfreie Induktionstherapie mit nachfolgend konsolidierender autologen SZT empfohlen [53]. Patient*innen mit Rückfall eines T-NHL nach Erstlinientherapie oder primär auf Chemotherapie refraktärem Verlauf haben ohne Transplantationskonzept mit einem medianen OS von 5,5 Monaten eine ungünstige Prognose [80]. Bei entsprechender Eignung können sie jedoch einer allogenen SZT zugeführt werden, mit welcher Langzeitremissionsraten von bis zu 50% erzielt werden [78,81,82]. Voraussetzung für den Therapieerfolg ist allerdings das Erreichen einer ausreichend guten Remission vor SZT. Hierfür eignen sich platinhaltige Chemotherapieregime [83]. Für Patient*innen, die nicht für eine SZT in Frage kommen, ist die Prognose im Rezidiv desolat [80,84]. Die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe wie Dihydrofolat-Reduktase-Inhibitoren [85], Histon-Deacetylase-Inhibitoren [86], Phosphatidylinositol-3-Kinase Inhibitoren [87], Checkpoint-Inhibitoren [88], hypomethylierenden Agentien [89] und Inhibitoren der Enhancer of Zeste Homolog 1 und 2 [90] fußt auf einem wachsenden Verständnis für die molekularen und zellbiologischen Grundlagen der T-NHL. Diese ‚zielgerichteten‘ Therapeutika werden intensiv auch für chemotherapierefraktäre Patient*innen in klinischen Studien untersucht, sind allerdings mit Ausnahme von BV nicht in Europa zugelassen. In der Therapie relevant ist zum einen, Patient*innen mit einer ungünstigen Prognose unter Chemotherapie zu identifizieren, um ihnen frühzeitig andere Therapieoptionen zu ermöglichen. Dies beinhaltet intensivere und potentiell kurative Therapien wie die SZT oder bei Nichteignung den Zugang zu zumeist weniger toxischen ‚zielgerichteten‘ Therapeutika zum Beispiel im Rahmen klinischer Studien [91]. Neben der Identifikation chemotherapierefraktärer Verläufe sollten andererseits auch diejenigen Patient*innen selektiert werden, die mit konventioneller Chemotherapie eine Aussicht auf eine langfristige Remission haben [92–94]. Für die Risikostratifizierung und Prognoseschätzung der T-NHL-Patient*innen findet ebenfalls der in klinisch hochmalignen Lymphomen getestete IPI [6] eine häufige Anwendung. T-NHL-spezifische Modifikationen des IPI stellen der Prognoseindex für T-NHL (PIT), der Score des ‚International Peripheral T-cell Lymphoma Project‘ (IPTCLP) und der modifizierte Prognoseindex für T-NHL (mPIT) dar, die die Faktoren Alter, ECOG-PS, LDH, erniedrigter Thrombozytenwert, KM-Befall und die Ki-67 basierte

Lymphomproliferationsrate in unterschiedlichen Konstellationen einbeziehen (*Abbildung 1*) [13,53,74]. Diese Risikoscores stratifizieren Patient*innen in Niedrig- und Hochrisikogruppen mit einem 5-Jahres-OS zwischen 0% bis zu 75% [13]. Allerdings ist die Diskriminierungsfähigkeit der Modelle eingeschränkt (c-Statistik für den Endpunkt OS in PTCL, NOS des IPI: 0,664 und des PIT: 0,66; c-Statistik für den Endpunkt OS in AITL des IPI: 0,601 und des PIT: 0,591) [10]. Es ist zu vermuten, dass Weiterentwicklungen der Prognosemodelle zukünftig mit der Tumorbilogie eng assoziierte Marker wie z.B. genomische oder zellbiologische Alterationen zur Risikostratifizierung und Prognoseschätzung einbeziehen [91]. So hat sich auf molekularer Ebene der Nachweis einer ALK-Translokation in ALCL als ein prognostisch günstiger Faktor erwiesen, der Eingang in die Therapiesteuerung dieser Entität gefunden hat [53,67]. In PTCL, NOS konnten mit PTCL-GATA3 und PTCL-TBX21 genetisch definierte Subgruppen identifiziert werden, die mit einer unterschiedlichen Prognose assoziiert sind [95].

	IPI ^a	PIT ^b	IPTCLP ^c	mPIT ^d
Alter >60 Jahre	x	x	x	x
ECOG-PS >1	x	x	x	x
LDH erhöht	x	x		x
Ann Arbor >II	x			
extranodaler Befall >1	x			
KM-Befall		x		
Thrombozyten <150 Gpt/l			x	
Ki-67 >75%				x

Definition der Risikogruppen:

^a vier Risikogruppen, 0–1: niedrig, 2: niedrig-intermediär, 3: hoch-intermediär, 4–5: hoch

^b vier Risikogruppen, 0: niedrig, 1: niedrig-intermediär, 2: hoch-intermediär, 3–4: hoch

^c vier Risikogruppen, 0: niedrig, 1: niedrig-intermediär, 2: hoch-intermediär, 3: hoch

^d drei Risikogruppen, 0–1: niedrig, 2: intermediär, 3–4: hoch

Abbildung 1: prognostische Scores für T-NHL nach [13]; Abkürzungen: IPI: Internationaler Prognoseindex, PIT: Prognoseindex für T-NHL, IPTCLP: International peripheral T-cell lymphoma Project, mPIT: modifizierter Prognoseindex für T-NHL, ECOG-PS: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status, LDH: Laktatdehydrogenase, KM: Knochenmark

Ribonukleinsäure- (RNA) bindende Proteine (RBP) können den RNA-Metabolismus einschließlich des Splicings, nukleozytoplasmatischen Transports, der Translation und Stabilisierung der Messenger-RNA (mRNA) beeinflussen, indem sie an untranslatierte Regionen von dieser binden [96]. Sie spielen somit eine wichtige Rolle in der posttranskriptionalen Regulation der mRNA und beeinflussen dadurch maßgeblich die

Genexpression und Funktion der Zelle. Eine abweichende Expression und dysregulierte Funktion von RBP wird hingegen mit der Entstehung und Entwicklung von Tumorerkrankungen einschließlich maligner hämatologischer Neoplasien in Verbindung gebracht [97,98]. Dass eine veränderte Expression von RBP auch mit der Prognose maligner hämatologischer Neoplasien assoziiert sein kann, veranschaulicht ein auf RBP-Gensignaturen basierendes Normogramm, das unter Einschluss bekannter klinischer Risikofaktoren eine verbesserte Prognoseschätzung von DLBCL-Patient*innen ermöglicht [12]. Das zellkernständige RNA binding motif protein X-linked (RBMX) [99] gehört zur Familie der heterogenen Ribonukleoproteine, die eine große Gruppe von Chromatin-assoziierten RBPs bilden. RBMX ist eine Komponente von Supraspliceosomenkomplexen und damit konzentrationsabhängig in die Regulation des alternativen Splicings der prä-mRNA eingebunden [100,101]. Darüber hinaus spielt es eine Rolle in der Regulation der Kohäsion der Schwesterchromatide im Rahmen der Zellteilung [102] und bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität [103]. Vorgegangene Analysen weisen darauf hin, dass RBMX die Tumorprogression sowohl fördern als auch hemmen kann [104–106], wobei diese duale Wirkung mechanistisch mit den verschiedenen Tumoreigenschaften und dem Ort der Genexpression zusammenhängen könnte [96]. Daten zur tumoralen RBMX-Expression [99] und zum Überleben von Patient*innen mit verschiedenen Krebserkrankungen in Abhängigkeit von der RBMX-Expression sind heterogen [104,105,107] und in T-NHL nach derzeitigem Kenntnisstand bisher nicht beschrieben. Allerdings deuten unpublizierte Daten in einer Kohorte von 33 erstdiagnostizierten T-NHL vom Subtyp der monomorphen epitheliotropen intestinalen T-Zell-Lymphomen auf RBMX-Mutationen mit unklarer funktioneller Auswirkung in einer Frequenz von ca. 26% (persönliche Kommunikation mit PD Dr. med. Thomas Weber, Universitätsmedizin Halle). Insgesamt legen diese Daten eine Untersuchung der RBMX-Expression und ihrer Assoziation mit anderen klinisch-pathologischen Faktoren sowie Daten zum Therapieansprechen und Überleben von T-NHL-Patient*innen unter Erstlinientherapie nahe.

Ziel der vorliegenden kumulativen Arbeit ist es, die Relevanz von mit tumorbiologischen Prozessen assoziierten Markern für die Abschätzung der Prognose von malignen Lymphomen zu untersuchen. Die Bedeutung des KM-Befalls für die Prognosevorhersage soll in r/rDLBCL und r/rTRIL untersucht werden. Darüber hinaus soll die RBMX-Expression in verschiedenen T-NHL-Subtypen erfasst und ihr Einfluss auf das Chemotherapieansprechen und Überlebensparameter analysiert werden. Hierfür soll zum einen der KM-Befall an einer Kohorte von an r/rDLBCL und r/rTRIL erkrankten Patient*innen erfasst werden. Zum anderen soll an einer Kohorte von an T-NHL erkrankten Patient*innen die immunhistochemisch gemessene RBMX-Expression

erhoben werden. Daneben sollen jeweils patienten-, lymphom- und therapiespezifische Variablen erfasst und mit dem KM-Befall in r/rDLBCL und r/rTRIL sowie der RBMX-Expression in T-NHL assoziiert werden. Der Einfluss des konkordanten und diskordanten KM-Befalls bzw. der RBMX-Expression auf das PFS und OS der jeweiligen Patient*innen soll unter Verwendung von uni- und multivariaten Überlebenszeitanalysen untersucht werden.

2. Diskussion

In einer retrospektiven, monozentrischen Analyse von unselektierten Patient*innen mit r/rDLBCL und r/rTRIL, die zwischen November 1998 und März 2019 am Universitätsklinikum Halle (Saale) behandelt wurden und für eine autologe SZT im Rahmen der Rezidivtherapie vorgesehen waren, wurden klinische Daten in einer hierfür erstellten Datenbank erfasst. KM-Biopsien der Patient*innen wurden histologisch und immunhistochemisch bezüglich des Vorliegens eines zum diagnostizierten hochmalignen Lymphom konkordanten oder diskordanten KM-Befalls im Institut für Pathologie, Halle (Saale) durch Herrn Dr. med. Marcus Bauer und Frau Prof. Dr. med. Claudia Wickenhauser begutachtet. Bei unklaren Fällen wurden durchflusszytometrische und/ oder NGS-basierte B-Zell-Rezeptorklonalitätsanalysen eingesetzt, um einen alterierten Immunphänotyp bzw. eine klonale B-Zell-Population zu bestätigen. Verfügbare Lymphomproben wurden auf p53-Alterationen und nach dem Algorithmus von Hans et al. [21] immunhistochemisch auf den GCB/ Non-GCB-Status untersucht. Die Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt (#2019-072). Es wurde die Anzahl der Patient*innen mit nachweisbarem konkordanten und diskordanten KM-Befall erfasst. Nachfolgend wurden die Assoziationen des KM-Befalls (konkordant, diskordant und gesamt) mit bekannten Prognosemarkern und mit den Überlebenszeitparametern PFS und OS sowohl für die gesamte Kohorte, für die eine SZT vorgesehen war, als auch in einer ‚landmark‘-Analyse für die Subgruppe der tatsächlich transplantierten Patient*innen untersucht. Einen KM-Befall wiesen insgesamt 25 der eingeschlossenen 82 Patient*innen (31,5%) zu einem beliebigen Zeitpunkt vor Beginn der Induktionstherapie auf. Davon hatten 6 Patient*innen (7,3%) einen diskordanten und 19 Patient*innen (23,2%) einen konkordanten KM-Befall. Der konkordante KM-Befall zeigte eine Assoziation mit dem Non-GCB-Phänotyp nach Hans, jedoch keine relevante Assoziation in Bezug auf andere Prognosefaktoren wie Alter, saalPI, Bulk $\geq 7,5$ cm, sekundäre ZNS-Beteiligung, Dauer der ersten kompletten Remission und vorherige R-Behandlung. Das Erreichen einer CR oder PR gemäß Lugano-Kriterien [108] nach Induktionstherapie war ebenfalls nicht mit einem KM-Befall assoziiert. Der Nachweis eines KM-Befalls war sowohl in der Gesamtkohorte als auch in der Subgruppe der transplantierten Patient*innen mit einem kürzeren OS assoziiert. Bei getrennter Betrachtung von konkordantem und diskordantem KM-Befall zeigte sich, dass der konkordante, jedoch nicht der diskordante KM-Befall sowohl in der Gesamtkohorte als auch in der Gruppe der transplantierten Patient*innen mit einem kürzeren PFS und OS assoziiert war. Dass der konkordante KM-Befall auch in der Subgruppe der Patient*innen mit extensiver Erkrankung (AA-Stadium >2) mit einem

verringerten PFS und OS verbunden war, lässt vermuten, dass er nicht nur Ausdruck eines höheren Ausbreitungsstadiums, sondern einen davon unabhängigen prognostischen Marker darstellt, der sich negativ auf das Überleben der Patient*innen im Rezidiv auswirkt. Auch in den multivariaten Überlebenszeitanalysen unter Einschluss etablierter prognostischer Marker behielt der konkordante KM-Befall seinen negativen Einfluss auf das PFS und OS der Gesamt- und transplantierten Kohorte. Wie in vorangehenden Studien [9,45,49,109,110] waren in der vorliegenden Arbeit die Parameter Frührezidiv der Erkrankung, Ansprechen auf die Induktionstherapie und durchgeführte SZT mit Überlebensparametern assoziiert. Dieser Zusammenhang legt nahe, dass die Chemotherapiesensitivität von DLBCL eine Voraussetzung für eine erfolgreiche SZT-Strategie im Rezidiv ist. Unabhängig von diesen Parametern war jedoch der konkordante KM-Befall mit einem verkürzten PFS und OS in der multivariaten Analyse der transplantationsfähigen r/rDLBCL und r/rTRIL-Patient*innen assoziiert.

In einer Arbeit von Yao et al. [11] wiesen DLBCL mit konkordantem KM-Befall vermehrt prognostisch ungünstige Marker wie eine CD5-Expression [111] und *MYC*-Gen-Rearrangements [112] auf. Dabei behielt in der analysierten Kohorte der konkordante KM-Befall seinen negativen Einfluss auf Überlebensparameter in fast allen DLBCL-Untergruppen mit positiven prognostisch ungünstigen Biomarkern bei. In der vorliegenden Arbeit war der konkordante KM-Befall mit einem nach Erstlinientherapie prognostisch ungünstigen Non-GCB-Immunphänotyp [39,40] assoziiert ohne seine prognostische Relevanz in den Subgruppen mit GCB- und Non-GCB-Immunphänotyp zu verlieren. Ein konkordanter KM-Befall könnte daher nicht nur einen stellvertretenden Marker für bekannte ungünstige Prognosefaktoren des DLBCL darstellen, sondern darüber hinaus auch weitere tumorbiologische Eigenschaften widerspiegeln, die sich negativ auf das Überleben auswirken. So konnte in DLBCL-Proben mit konkordantem KM-Befall mit Genexpressionsprofilen eine erhöhte Expression von stoffwechselbezogenen und transkriptionsaktivierenden Genen nachgewiesen werden, die auf eine gesteigerte Proliferationsfähigkeit von Lymphomzellen hinweist [11]. Daneben zeigte sich eine Hochregulation von Genen, deren Produkte einerseits mit der Immunregulation in Verbindung stehen und andererseits eine Schlüsselrolle bei der Reorganisation des Zytoskeletts und der Zelladhäsion einnehmen [11]. Veränderungen von Genen, die mit der Zelladhäsion oder -migration in Verbindung gebracht werden, sind bei metastasierten soliden Tumoren gut bekannt [113] und werden auch in DLBCL mit einer verschlechterten Prognose in Verbindung gebracht [114]. Genexpressionsanalysen weisen zudem auf einen relevanten Einfluss des Tumormikromilieus auf die Biologie und klinischen Verläufe von DLBCL hin [115].

Stromazellen des KM-Mikromilieus können Chemotherapieresistenz in B-Lymphomzellen durch Expression eines ‚B cell-activating factor‘ (BAFF) vermitteln, wobei die Adhäsion von Lymphomzellen an KM-Stromazellen die BAFF-Sekretion durch Hochregulierung der BAFF-Genexpression fördert [65]. Dieser und andere Mechanismen [63,64] der Zelladhäsion-vermittelten Chemotherapieresistenz durch Lymphom-Stroma-Interaktionen im KM könnten eine Erklärung für die in dieser Arbeit beobachtete ungünstige Prognose von r/rDLBCL und r/rTRIL mit konkordantem KM-Befall und geplanter SZT darstellen. Allerdings benötigt es translationale Studien, um die klinische Relevanz dieser Beobachtungen zu klären. Dabei sollten der KM-Befall mit Genexpressionsprofilen der Lymphomzellen sowie die Zusammensetzung des KM-Mikromilieus erfasst und mit dem Therapieansprechen und Überlebensparametern der Patient*innen assoziiert werden.

Der diskordante KM-Befall hatte in der beschriebenen Kohorte keinen signifikanten Einfluss auf das PFS und OS der Patient*innen nach SZT-orientierter Rezidivtherapie, was den Beobachtungen bei entsprechenden Patient*innen nach anthrazyklinhaltiger Erstlinientherapie entspricht [11,36]. Jedoch war die Subgruppe mit sechs Patient*innen klein, sodass die Beobachtung infolgedessen Ausdruck eines statistischen Effektes sein könnte und in einer größeren Kohorte nachgeprüft werden sollte. Dass ein Teil von Patient*innen mit DLBCL eine durchflusszytometrisch nachweisbare, aber nach aktueller klinischer Praxis therapeutisch nicht relevante monoklonale B-Zell-Lymphozytose aufweist [61], legt zum besseren Verständnis der prognostischen und therapeutischen Relevanz des diskordanten KM-Befalls eine genauere Charakterisierung des diskordanten KM-Befalls mittels Histopathologie sowie molekularbiologischen Methoden wie B-Zell-Rezeptorklonalitätsanalysen nahe. In der vorliegenden Arbeit konnte bei zwei Patient*innen mit immunhistochemisch und durchflusszytometrisch unklaren KM-Befunden ein Lymphombefall des KM mithilfe einer NGS-basierten B-Zell-Rezeptorklonalitätsanalyse detektiert werden. Es gilt zu klären, ob ein solcher mit Standardmethoden nicht nachweisbarer KM-Befall in DLBCL prognostisch relevant ist. Darüber hinaus gilt es zu untersuchen, ob die prognostische Vorhersagekraft des konkordanten KM-Befalls auch unter neueren Therapieverfahren wie der CAR-T-Zelltherapie bestehen bleibt [4,50,51]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigen die Hypothese, dass der konkordante KM-Befall ein einfach zu erhebender und prognostisch relevanter Surrogatparameter für eine zugrunde liegende ungünstige Lymphombiologie in r/rDLBCL und r/rTRIL ist.

In eine zweite retrospektive Studie zur Proteinexpression von RBMX und deren Assoziation zu klinischen und pathologischen Charakteristika in Patient*innen mit T-NHL wurden über 18-jährige Patient*innen eingeschlossen, die zwischen 2006 und März 2020 am Universitätsklinikum Halle (Saale) mit Primärdiagnose eines reifzelligem T-NHL nach WHO-Klassifikation von 2017 behandelt wurden. Es wurden Daten einschließlich Alter, Geschlecht, histologischer Phänotyp, B-Symptome, AA-Stadium, IPI, ECOG-PS, KM-Befall durch das Lymphom, LDH, Anzahl der weißen Blutkörperchen (WBC) und Ki-67-Expression zusammen mit dem Behandlungsregime, dem Ansprechen auf die Chemotherapie und Nachverfolgungsdaten der Patient*innen erhoben. Die Analyse der RBMX-Expression erfolgte an einem für die Kohorte erstellten Tissue-Micro-Array (durchgeführt von Franziska Schümann) unter Nutzung des H-Scores [116]. Die Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt (#2020-033). In den jeweiligen T-NHL-Subgruppen war die RBMX-Expression heterogen, allerdings zeigte sich keine veränderte Expression gegenüber den CD3-positiven Zellen aus gesunden Lymphknoten. Eine hohe RBMX-Expression war in der Gesamtkohorte der T-NHL mit einer normalen Zahl der WBC und in der Subgruppe der nodalen T-NHL mit einem KM-Befall assoziiert. Darüber hinaus war in der Gesamtkohorte der T-NHL eine Assoziation zwischen höherer RBMX-Expression und Nichtansprechen auf die anthrazyklinhaltige Erstlinientherapie nachweisbar, wobei in der Subgruppe der nodalen T-NHL diese Assoziation schwächer ausgeprägt war. Sowohl in der Gesamtkohorte als auch in der nodalen T-NHL-Subgruppe war eine erhöhte RBMX-Expression (Trennwert H-Score 175) mit einem verschlechterten PFS und OS in den univariaten Überlebenszeitanalysen verbunden. Diese Assoziation ließ sich auch in multivariaten Analysen für nodale T-NHL nachweisen. Die vorliegende Arbeit zeigt somit nach derzeitiger Kenntnis erstmalig einen negativen Einfluss einer erhöhten RBMX-Expression auf das Überleben von T-NHL-Patient*innen unter anthrazyklinhaltiger Erstlinientherapie auf. Daneben wurde eine Assoziation zwischen erhöhter Proteinexpression des RBMX und dem Nichtansprechen des T-NHL auf die applizierte Therapie in der untersuchten Gesamtkohorte beobachtet. Dass sich diese Zusammenhänge in der Subgruppe der nodalen T-NHL weniger klar darstellten, könnte der relativ kleinen Fallzahl und der Heterogenität der Krankheitsbilder geschuldet sein, womit wesentliche Limitationen der Arbeit abgebildet werden. Dennoch deutet die gezeigte Assoziation mit einer Verschlechterung des Therapieansprechens auf eine RBMX-vermittelte Therapieresistenz in der untersuchten T-NHL-Kohorte hin, wie sie auch in anderen Entitäten beobachtet wurde [104]. Für ein besseres Verständnis der RBMX-Assoziationen zur Entwicklung von Chemotherapieresistenz und Prognose von

Patient*innen mit T-NHL ist es jedoch in Anbetracht der oben aufgeführten vielseitigen Funktionen des RBMX wichtig, molekulare Mechanismen hinter der RBMX-Expression und ihren Assoziationen im jeweiligen zellulären Kontext zu beleuchten. Hervorgehoben wird diese Notwendigkeit durch die heterogenen Untersuchungsergebnisse zum Einfluss von RBMX-Alterationen auf die Tumorbiologie, Therapieresistenz und Überlebensparameter in anderen Malignomen [104,105,107,117–119]. So trägt in Patient*innen mit hepatozellulärem Karzinom eine Überexpression des RBMX zur Tumorgenese und Therapieresistenz bei und ist mit einer schlechteren Prognose verbunden [104]. In Endometriumkarzinomen und Urothelkarzinomen der Harnblase war hingegen eine hohe RBMX-Expression mit einem längeren Überleben assoziiert [105,107]. RBP wie RBMX durchlaufen zur Aufrechterhaltung ihrer physiologischen Funktionen in der Zelle diverse Regulierungsschritte durch posttranslationale Proteinmodifikation. Diese umfassen u.a. die Acetylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung der Proteine [120]. Neben Veränderungen dieser posttranslationalen Modifikationen können auch genetische und epigenetische Alterationen sowie eine veränderte Regulation durch nicht-kodierende RNA zu einer Dysregulation der RBP führen, die dann zur Entstehung, Unterhaltung und Therapieresistenz von malignen Tumoren beiträgt [120]. Translationale Untersuchung unter Einbeziehung von Mutations-, Gen- und Proteinexpressionsanalysen der T-NHL-Zellen und ihres Mikromilieus in Verbindung mit klinischen Parametern und Überlebensparametern könnten dazu beitragen, die Funktion von RBP wie RBMX in der Entstehung und Entwicklung von Tumoren sowie den Stellenwert von RBMX als Marker für die Prognoseschätzung in T-NHL besser zu verstehen.

Die prognosegestützte Therapiesteuerung maligner Lymphome ist Gegenstand aktueller klinischer Prüfungen [121] und der Erfolg neuer Therapien kann von der Differenzierung prognostischer Subgruppen abhängen [122]. Die auf anatomischen, klinischen und histopathologischen Parametern gestützten etablierten Modelle weisen die bereits beschriebenen Limitationen in ihrer prognostischen Güte auf [8–10]. Prognostische Marker, die eng mit tumorbiologischen Prozessen assoziiert sind, können die Güte der Prognosevorhersage allein oder insbesondere in Kombination mit etablierten Prognosemodellen möglicherweise verbessern [1]. Die hier zusammengefassten Arbeiten identifizieren neue prognostische Marker mit einer tumorbiologischen Rationalen bei an DLBCL bzw. T-NHL erkrankten Patient*innen. Bei Patient*innen mit r/rDLBCL bzw. r/rTRIL mit geplanter SZT war der konkordante KM-Befall in einem Modell mit etablierten Prognosefaktoren ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben. In Patient*innen mit primärdiagnostiziertem T-NHL war eine hohe RBMX-

Proteinexpression mit einem geringeren Ansprechen und kürzerem Überleben unter anthrazyklinhaltiger Erstlinientherapie verbunden. Die RBMX-Expression war auch in einem multivariaten Modell mit etablierten Prognosefaktoren ein unabhängiger prognostischer Faktor. Diese Ergebnisse heben das Potential neuer Prognosemarker für maligne Lymphome hervor, unterliegen aber auch Limitationen. So bedingt der retrospektive Charakter der Arbeit potentielle Verzerrungen z.B. durch nicht auszuschließende Einschränkungen in der Repräsentativität der untersuchten Kohorten sowie durch die Heterogenität der Krankheitsbilder und der retrospektiv bewerteten Datendokumentation [122]. Zudem fördert die relative kleine Patient*innenzahl statistische Fehler. Die Reproduzierbarkeit der eingesetzten immunhistochemischen Ergebnisse ist durch die Intra- und Interobserver-Variabilität der Verfahren eingeschränkt [116,123]. Die ausstehende Validierung der Untersuchungsergebnisse unter Einbeziehung externer Kohorten ist durch die Heterogenität und Seltenheit der malignen Lymphome erschwert. Um diese Probleme zumindest teilweise zu adressieren, werden größere, zum Teil prospektive Datensätze erhoben, z.B. durch das Register und die Biomaterialbank für T-Zell-Lymphome der German Lymphoma Alliance und Ostdeutschen Studiengruppe für Hämatologie und Onkologie (Deutsches Register klinischer Studien Nummer: DRKS00030561). Für ihren potentiellen Einsatz in der Klinik müssen neu identifizierte Biomarker darauf untersucht werden, ob sie die prädiktive Güte bestehender Prognosemodelle verbessern [124]. Darüber hinaus gilt es den Wert identifizierter Prognosefaktoren unter neuen Therapieoptionen zu reevaluieren [122,125]. So steht die Analyse der prognostischen Vorhersagekraft des konkordanten KM-Befalls in frührezidivierten und primär refraktären DLBCL unter Anwendung der CAR-T-Zelltherapie aus, die für diese Patient*innen mittlerweile als therapeutischer Standard erachtet werden kann [50,51]. Die vorliegenden retrospektiven Arbeiten haben einen explorativen Charakter und sollen für diese Vorhaben als Grundlage dienen.

3. Literaturverzeichnis

1. Weber T. Tumorbiologie-assoziierte Prognosefaktoren für maligne Erkrankungen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Habil., 129 Seiten. 2022.
2. Group F-NBW. BEST (Biomarkers , EndpointS , and other Tools) Resource. 2021;
3. Pencina MJ, D'Agostino RB. Evaluating discrimination of risk prediction models: The C statistic. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2015;314:1063–4.
4. Ulrich Dürsen, Michael A. Fridrik NS. Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom. *Onkopedia.* 2022;25.
5. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, LaCasce AS, Crosby-Thompson A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood.* 2014;123:837–42.
6. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1993;329:987–94.
7. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006;24:995–1007.
8. Maurer MJ, Jakobsen LH, Mwangi R, Schmitz N, Farooq U, Flowers CR, et al. Relapsed / Refractory International Prognostic Index (R/R-IPI): An international prognostic calculator for relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol.* 2021;96:599–605.
9. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Gill DS, Linch DC, Trneny M, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol.* 2010;28:4184–90.
10. Ellin F, Maurer MJ, Srour L, Farooq U, Jerkeman M, Connors JM, et al. Comparison of the NCCN-IPI, the IPI and PIT scores as prognostic tools in peripheral T-cell lymphomas. *Br J Haematol.* 2019;186:1–7.
11. 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;32:353–63.
12. Xie Y, Luo X, He H, Pan T, He Y. Identification of an individualized RNA binding protein-based prognostic signature for diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Med.* 2021;10:2703–13.
13. Gutiérrez-García G, García-Herrera A, Cardesa T, Martínez A, Villamor N, Ghita G, et al. Comparison of four prognostic scores in peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol.* 2011;22:397–404.
14. 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;26:v116–25.
15. 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;116:3724–34.
16. Morton L, Wang S, Devesa S. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States. *Blood.* 2006;107:1992–2001.
17. Bethesda. Health Nlo. 2022. p. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/dlbcl.html>.
18. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et

- al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. Springer US; 2022;36:1720–48.
19. 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;403:503–11.
20. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:9991–6.
21. Hans CP. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103:275–82.
22. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2018;378:1396–407.
23. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med*. 2018;24:679–90.
24. 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;328:1002–6.
25. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepage G, Plantier I, Castaigne S, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: A study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2010;116:2040–5.
26. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P, et al. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2013;381:1817–26.
27. Delarue R, Tilly H, Mounier N, Petrella T, Salles G, Thieblemont C, et al. Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14:525–33.
28. V. Poeschel et al. Excellent Outcome of Young Patients (18-60 years) with Favourable-Prognosis Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) Treated with 4 Cycles CHOP Plus 6 Applications of Rituximab: Results of the 592 Patients of the Flyer Trial of the Dshnhl/GLA. *Blood*. 2018;132:781.
29. Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trümper L, Österborg A, Trnety M, Shepherd L, et al. CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol*. 2011;12:1013–22.
30. Link BK, Maurer MJ, Nowakowski GS, Ansell SM, MacOn WR, Syrbu SI, et al. Rates and outcomes of follicular lymphoma transformation in the immunochemotherapy era: A report from the university of Iowa/mayo clinic specialized program of research excellence molecular epidemiology resource. *J Clin Oncol*. 2013;31:3272–8.

31. Gleeson M, Hawkes EA, Peckitt C, Wotherspoon A, Attygalle A, Sharma B, et al. Outcomes for transformed follicular lymphoma in the rituximab era: the Royal Marsden experience 2003–2013. *Leuk Lymphoma*. 2017;58:1805–13.
32. Tilly H, Morschhauser F, Sehn LH, Friedberg JW, Trněný M, Sharman JP, et al. Polatuzumab Vedotin in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2022;386:351–63.
33. Hamlin PA, Zelenetz AD, Kewalramani T, Qin J, Satagopan JM, Verbel D, et al. Age-adjusted International Prognostic Index predicts autologous stem cell transplantation outcome for patients with relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003;102:1989–96.
34. Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M, Berry B, Ruskova A, Berkahn L, et al. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2011;29:1452–7.
35. Chung R, Lai R, Wei P, Lee J, Hanson J, Belch AR, et al. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood*. 2007;110:1278–82.
36. Park M-J, Park S-H, Park P-W, Seo Y-H, Kim K-H, Seo J-Y, et al. Prognostic impact of concordant and discordant bone marrow involvement and cell-of-origin in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Pathol*. 2015;68:733–8.
37. 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;30:3452–9.
38. Rosenwald A, Bens S, Advani R, Barrans S, Copie-Bergman C, Elsensohn MH, et al. Prognostic significance of MYC rearrangement and translocation partner in diffuse large B-cell lymphoma: A study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol*. 2019;37:3359–68.
39. Berglund M, Thunberg U, Amini RM, Book M, Roos G, Erlanson M, et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol*. 2005;18:1113–20.
40. Van Imhoff GW, Boerma EJJ, Van Der Holt B, Schuurin E, Verdonck LF, Kluin-Nelemans HC, et al. Prognostic impact of germinal center-associated proteins and chromosomal breakpoints in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24:4135–42.
41. Kramer MH, Hermans J, Parker J, Krol AD, Kluin-Nelemans JC, Haak HL, et al. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol*. 1996;14:2131–8.
42. Chang CC, Liu YC, Cleveland RP, Perkins SL. Expression of c-Myc and p53 correlates with clinical outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 2000;113:512–8.
43. 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;23:4117–26.
44. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van Der Lelie H, Bron D, et al.

Autologous Bone Marrow Transplantation as Compared with Salvage Chemotherapy in Relapses of Chemotherapy-Sensitive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;333:1540–5.

45. Armand P, Welch S, Kim HT, Lacasce AS, Jacobsen ED, Davids MS, et al. Prognostic factors for patients with diffuse large B cell lymphoma and transformed indolent lymphoma undergoing autologous stem cell transplantation in the positron emission tomography era. *Br J Haematol.* 2013;160:608–17.

46. Hamadani M, Hari PN, Zhang Y, Carreras J, Akpek G, Aljurf MD, et al. Early Failure of Frontline Rituximab-Containing Chemo-immunotherapy in Diffuse Large B Cell Lymphoma Does Not Predict Futility of Autologous Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* Elsevier Ltd; 2014;20:1729–36.

47. Nagle SJ, Woo K, Schuster SJ, Nasta SD, Stadtmauer E, Mick R, et al. Outcomes of patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma with progression of lymphoma after autologous stem cell transplantation in the rituximab era. *Am J Hematol.* 2013;88:890–4.

48. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: Results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood.* 2017;130:1800–8.

49. Van Den Neste E, Schmitz N, Mounier N, Gill D, Linch D, Trneny M, et al. Outcome of patients with relapsed diffuse large B-cell lymphoma who fail second-line salvage regimens in the International CORAL study. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51:51–7.

50. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleuce CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2017;377:2531–44.

51. Kamdar M, Solomon SR, Arnason J, Johnston PB, Glass B, Bachanova V, et al. Lisocabtagene maraleuce versus standard of care with salvage chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation as second-line treatment in patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma (TRANSFORM): results from an interim analysis. *Lancet.* 2022;399:2294–308.

52. Glass B, Hasenkamp J, Wulf G, Dreger P, Pfreundschuh M, Gramatzki M, et al. Rituximab after lymphoma-directed conditioning and allogeneic stem-cell transplantation for relapsed and refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma (DSHNHL R3): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15:757–66.

53. Hopfinger G, Herling M, de Leval L, Krasniqi F, Reimer P, Schmitz N WG. Periphere T-Zell Lymphome. *Dtsch Gesellschaft für Hämatologie und Onkol.* 2021;

54. Sorrow ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)–specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. 2005;106:2912–20.

55. Sorrow ML, Logan BR, Zhu X, Rizzo JD, Cooke KR, McCarthy PL, et al. Biology of Blood and Marrow Transplantation Prospective Validation of the Predictive Power of the Hematopoietic Cell Transplantation Comorbidity Index: A Center for International Blood and Marrow Transplant Research Study. *Biol Blood Marrow Transplant.* Elsevier Inc; 2015;21:1479–87.

56. Friedberg JW. Relapsed / Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood.* :498–505.

57. Gisselbrecht C, Schmitz N, Mounier N, Gill DS, Linch DC, Trneny M, et al.

Rituximab maintenance therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with relapsed CD20+ diffuse large B-cell lymphoma: Final analysis of the collaborative trial in relapsed aggressive lymphoma. *J Clin Oncol*. 2012;30:4462–9.

58. Derenzini E, Musuraca G, Fanti S, Stefoni V, Tani M, Alinari L, et al. Pretransplantation positron emission tomography scan is the main predictor of autologous stem cell transplantation outcome in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2008;113:2496–503.

59. Caballero MD, Pérez-Simón JA, Iriondo A, Lahuerta JJ, Sierra J, Marín J, et al. High-dose therapy in diffuse large cell lymphoma: Results and prognostic factors in 452 patients from the GEL-TAMO Spanish cooperative group. *Ann Oncol*. 2003;14:140–51.

60. Kuruvilla J, Chen B, MacDonald D, Kouroukis T, Cheung M, Olney H, et al. Salvage chemotherapy (SC) and autologous stem cell transplantation (ASCT) for transformed indolent lymphoma (TR): A subgroup analysis of NCIC CTG LY12. *Hematol Oncol*. 2013;31:117.

61. Brandt A, Matschke J, Fehrle W, von Wenserski L, Bokemeyer C, Illerhaus G, et al. A significant proportion of patients with primary central nervous system lymphoma harbor clonal bone marrow B-cells. *Leuk Lymphoma*. 2019;60:334–40.

62. Kremer M, Spitzer M, Mandl-Weber S, Stecker K, Schmidt B, Höfler H, et al. Discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: Comparative molecular analysis reveals a heterogeneous group of disorders. *Lab Invest*. 2003;83:107–14.

63. Mraz M, Zent CS, Church AK, Jelinek DF, Wu X, Pospisilova S, et al. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin α -4- β -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol*. 2011;155:53–64.

64. Grégoire M, Guilloton F, Pangault C, Mourcin F, Sok P, Latour M, et al. Neutrophils trigger a NF-KB dependent polarization of tumorsupportive stromal cells in germinal center B-cell lymphomas. *Oncotarget*. 2015;6:16471–87.

65. Lwin T, Crespo LA, Wu A, Dessureault S, Shu HB, Moscinski LC, et al. Lymphoma cell adhesion-induced expression of B cell-activating factor of the TNF family in bone marrow stromal cells protects non-Hodgkin's B lymphoma cells from apoptosis. *Leukemia*. 2009;23:170–7.

66. Smith A, Crouch S, Lax S, Li J, Painter D, Howell D, et al. Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004-2014: Sub-type analyses from the UK's Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. 2015;112:1575–84.

67. Vose JM, Neumann M, Harris ME. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: Pathology findings and clinical outcomes international T-cell lymphoma project. *J Clin Oncol*. 2008;26:4124–30.

68. Wang SS, Vose JM. *Epidemiology and Prognosis of T-Cell Lymphoma*. T-Cell Lymphomas. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p. 25–39.

69. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, Quintanilla-Martinez L, Swerdlow SH, Anderson KC, et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood*. 2022;140:1229–53.

70. Wulf G, Weber T. Periphere T-Zell-Lymphome. *Der Onkol*. 2019;25:892–8.

71. Bellei M, Foss FM, Shustov AR, Horwitz SM, Marcheselli L, Kim WS, et al. The outcome of peripheral t-cell lymphoma patients failing first-line therapy: A report from

- the prospective, international t-cell project. *Haematologica*. 2018;103:1191–7.
72. Savage KJ, Chhanabhai M, Gascoyne RD, Connors JM. Characterization of peripheral T-cell lymphomas in a single North American institution by the WHO classification. *Ann Oncol*. Elsevier Masson SAS; 2004;15:1467–75.
73. Schmitz N, Trümper L, Ziepert M, Nickelsen M, Ho AD, Metzner B, et al. Treatment and prognosis of mature T-cell and NK-cell lymphoma: An analysis of patients with T-cell lymphoma treated in studies of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood*. 2010;116:3418–25.
74. Ellin F, Landström J, Jerkeman M, Relander T. Real-world data on prognostic factors and treatment in peripheral T-cell lymphomas: A study from the Swedish Lymphoma Registry. *Blood*. 2014;124:1570–7.
75. Brink M, Meeuwes FO, van der Poel MWM, Kersten MJ, Wondergem M, Mutsaers PGNJ, et al. Impact of etoposide and ASCT on survival among patients aged <65 years with stage II to IV PTCL: a population-based cohort study. *Blood*. 2022;140:1009–19.
76. d'Amore F, Relander T, Lauritzsen GF, Jantunen E, Hagberg H, Anderson H, et al. Up-Front Autologous Stem-Cell Transplantation in Peripheral T-Cell Lymphoma: NLG-T-01. *J Clin Oncol*. 2012;30:3093–9.
77. Reimer P, Rüdiger T, Geissinger E, Weissinger F, Nerl C, Schmitz N, et al. Autologous Stem-Cell Transplantation As First-Line Therapy in Peripheral T-Cell Lymphomas: Results of a Prospective Multicenter Study. *J Clin Oncol*. 2009;27:106–13.
78. Schmitz N, Altmann B, Friedrichs B, Bouabdallah K, Cartron G, Nickelsen M, et al. Standard chemotherapy followed by allogeneic or autologous transplantation: The role of allogeneic transplantation in the AATT study. *J Clin Oncol*. 2022;40:7534–7534.
79. Cheung MM, Chan JK, Lau WH, Foo W, Chan PT, Ng CS, et al. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the nose and nasopharynx: clinical features, tumor immunophenotype, and treatment outcome in 113 patients. *J Clin Oncol*. 1998;16:70–7.
80. Mak V, Hamm J, Chhanabhai M, Shenkier T, Klasa R, Sehn LH, et al. Survival of Patients With Peripheral T-Cell Lymphoma After First Relapse or Progression: Spectrum of Disease and Rare Long-Term Survivors. *J Clin Oncol*. 2013;31:1970–6.
81. Corradini P, Doderò A, Zallio F, Caracciolo D, Casini M, Bregni M, et al. Graft-Versus-Lymphoma Effect in Relapsed Peripheral T-Cell Non-Hodgkin's Lymphomas After Reduced-Intensity Conditioning Followed by Allogeneic Transplantation of Hematopoietic Cells. *J Clin Oncol*. 2004;22:2172–6.
82. Doderò A, Spina F, Narni F, Patriarca F, Cavattoni I, Benedetti F, et al. Allogeneic transplantation following a reduced-intensity conditioning regimen in relapsed/refractory peripheral T-cell lymphomas: long-term remissions and response to donor lymphocyte infusions support the role of a graft-versus-lymphoma effect. *Leukemia*. 2012;26:520–6.
83. Ngu H, Parkin S, Villa D, Scott D, Gerrie A, Toze C, et al. TCL-323 Outcome of Relapsed and Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma (PTCL) With Intention for Curative Therapy Incorporating High-Dose Chemotherapy and Hematopoietic Stem Cell Transplant (HDC/SCT). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2022;22:S399–400.
84. Zhang JY, Briski R, Devata S, Kaminski MS, Phillips TJ, Mayer TL, et al. Survival following salvage therapy for primary refractory peripheral T-cell lymphomas (PTCL).

Am J Hematol. 2018;93:394–400.

85. O'Connor OA, Pro B, Pinter-Brown L, Bartlett N, Popplewell L, Coiffier B, et al. Pralatrexate in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: Results from the pivotal PROPEL study. *J Clin Oncol*. 2011;29:1182–9.

86. Coiffier B, Pro B, Prince HM, Foss F, Sokol L, Greenwood M, et al. Romidepsin for the treatment of relapsed/refractory peripheral T-cell lymphoma: Pivotal study update demonstrates durable responses. *J Hematol Oncol*. 2014;7:1–9.

87. Brammer JE, Zinzani PL, Zain J, Mead M, Casulo C, Jacobsen ED, et al. Duvelisib in Patients with Relapsed/Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma from the Phase 2 Primo Trial: Results of an Interim Analysis. *Blood*. 2021;138:2456–2456.

88. Houot R, Poeschel V, Altmann B, Angel S, Thurner L, Illmer T, et al. Prolonged Remissions after Nivolumab Plus Gemcitabine/Oxaliplatin in Relapsed/Refractory T-cell Lymphoma. *HemaSphere*. 2022;6:E672.

89. Laribi K, Baugier De Materre A, Touileb Y, Boursot C, Sandrini J, Cavalieri D, et al. Azacytidine and Venetoclax in Relapsed and Refractory Patients with Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. *HemaSphere*. 2022;6:E675.

90. Ishitsuka K, Izutsu K, Maruyama D, Makita S, Jacobsen ED, Horwitz S, et al. FIRST-IN-HUMAN STUDY OF THE EZH1 AND EZH2 DUAL INHIBITOR VALEMETOSTAT TOSYLATE (DS-3201B) IN PATIENTS WITH RELAPSED OR REFRACTORY NON-HODGKIN LYMPHOMAS. *Hematol Oncol*. 2021;39.

91. Weiss J, Reneau J, Wilcox RA. PTCL, NOS: An update on classification, risk-stratification, and treatment. *Front Oncol*. 2023;13:1–12.

92. Savage KJ. Peripheral T-cell Lymphomas. *Blood Rev*. 2007;21:201–16.

93. Rüdiger T, Weisenburger DD, Anderson JR, Armitage JO, Diebold J, MacLennan KA, et al. Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large-cell lymphoma): Results from the non-Hodgkin's lymphoma classification project. *Ann Oncol*. Elsevier Masson SAS; 2002;13:140–9.

94. Went P, Agostinelli C, Gallamini A, Piccaluga PP, Ascani S, Sabattini E, et al. Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: A proposed clinical-pathologic prognostic score. *J Clin Oncol*. 2006;24:2472–9.

95. Heavican TB, Bouska A, Yu J, Lone W, Amador C, Gong Q, et al. Genetic drivers of oncogenic pathways in molecular subgroups of peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2019;133:1664–76.

96. Li Z, Guo Q, Zhang J, Fu Z, Wang Y, Wang T, et al. The RNA-Binding Motif Protein Family in Cancer: Friend or Foe? *Front Oncol*. 2021;11:1–15.

97. Aguilar-Garrido P, Otero-Sobrino Á, Navarro-Aguadero MÁ, Velasco-Estévez M, Gallardo M. The Role of RNA-Binding Proteins in Hematological Malignancies. *Int J Mol Sci*. 2022;23.

98. Prieto C, Kharas MG. RNA regulators in leukemia and lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020;10:1–27.

99. RBMX in The Human Protein Atlas.
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000147274-RBMX>.

100. Heinrich B, Zhang Z, Raitskin O, Hiller M, Benderska N, Hartmann AM, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G regulates splice site selection by binding to CC(A/C)-rich regions in pre-mRNA. *J Biol Chem*. 2009;284:14303–15.

101. Martinez-Contreras R, Cloutier P, Shkreta L, Fiset J-F, Revil T, Chabot B. hnRNP Proteins and Splicing Control. 2007. p. 123–47.
102. Matsunaga S, Takata H, Morimoto A, Hayashihara K, Higashi T, Akatsuchi K, et al. RBMX: A Regulator for Maintenance and Centromeric Protection of Sister Chromatid Cohesion. *Cell Rep. The Authors*; 2012;1:299–308.
103. Zheng T, Zhou H, Li X, Peng D, Yang Y, Zeng Y, et al. RBMX is required for activation of ATR on repetitive DNAs to maintain genome stability. *Cell Death Differ. Springer US*; 2020;27:3162–76.
104. Song Y, He S, Ma X, Zhang M, Zhuang J, Wang G, et al. RBMX contributes to hepatocellular carcinoma progression and sorafenib resistance by specifically binding and stabilizing BLACAT1. *Am J Cancer Res. 2020*;10:3644–65.
105. Yan Q, Zeng P, Zhou X, Zhao X, Chen R, Qiao J, et al. RBMX suppresses tumorigenicity and progression of bladder cancer by interacting with the hnRNP A1 protein to regulate PKM alternative splicing. *Oncogene. Springer US*; 2021;40:2635–50.
106. Prieto C, Nguyen DTT, Liu Z, Wheat J, Perez A, Gourkanti S, et al. Transcriptional control of CBX5 by the RNA-binding proteins RBMX and RBMXL1 maintains chromatin state in myeloid leukemia. *Nat Cancer. 2021*;2:741–57.
107. Ouyang YQ, Zur Hausen A, Orlowska-Volk M, Jäger M, Bettendorf H, Hirschfeld M, et al. Expression levels of hnRNP G and hTra2-beta1 correlate with opposite outcomes in endometrial cancer biology. *Int J Cancer. 2011*;128:2010–9.
108. 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. *J Clin Oncol. 2014*;32:3059–67.
109. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van Der Lelie H, Bron D, et al. Autologous Bone Marrow Transplantation as Compared with Salvage Chemotherapy in Relapses of Chemotherapy-Sensitive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med. 1995*;333:1540–5.
110. Guglielmi C, Gomez F, Philip T, Hagenbeek A, Martelli M, Sebban C, et al. Time to relapse has prognostic value in patients with aggressive lymphoma enrolled onto the Parma trial. *J Clin Oncol. 1998*;16:3264–9.
111. Miyazaki K, Yamaguchi M, Suzuki R, Kobayashi Y, Maeshima AM, Niitsu N, et al. CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma: A retrospective study in 337 patients treated by chemotherapy with or without rituximab. *Ann Oncol. 2011*;22:1601–7.
112. Akyurek N, Uner A, Benekli M, Barista I. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab. *Cancer. 2012*;118:4173–83.
113. Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity. *Cell. Elsevier Inc.*; 2011;147:992–1009.
114. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, 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*;121:4021–31.
115. Kotlov N, Bagaev A, Revuelta M V., Phillip JM, Cacciapuoti MT, Antysheva Z, et al. Clinical and biological subtypes of b-cell lymphoma revealed by microenvironmental

signatures. *Cancer Discov.* 2021;11:1468–89.

116. Detre S, Sacconi Jotti G, Dowsett M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: Validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol.* 1995;48:876–8.

117. Adamson B, Smogorzewska A, Sigoillot FD, King RW, Elledge SJ. A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response. *Nat Cell Biol.* 2012;14:318–28.

118. Guo J, Wang X, Jia J, Jia R. Underexpression of SRSF3 and its target gene RBMX predicts good prognosis in patients with head and neck cancer. *J Oral Sci.* 2020;62:175–9.

119. Prieto C, Nguyen DTT, Liu Z, Wheat J, Perez A, Gourkanti S, et al. Transcriptional control of CBX5 by the RNA-binding proteins RBMX and RBMXL1 maintains chromatin state in myeloid leukemia. *Nat Cancer.* 2021;2:741–57.

120. Hong S. RNA Binding Protein as an Emerging Therapeutic Target for Cancer Prevention and Treatment. *J Cancer Prev.* 2017;22:203–10.

121. Vitolo U, Nowakowski GS, Burke JM, Fox CP, Trneny M, Chiappella A, et al. ABCL-023 frontMIND: A Phase III, Randomized, Double-Blind Study of Tafasitamab + Lenalidomide + R-CHOP Versus R-CHOP Alone for Newly Diagnosed High-Intermediate and High-Risk Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk.* 2022;22:S352–3.

122. Taube SE, Clark GM, Dancey JE, McShane LM, Sigman CC, Gutman SI. A perspective on challenges and issues in biomarker development and drug and biomarker codevelopment. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:1453–63.

123. de Jong D, Xie W, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, et al. Retracted: Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications (a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium). *J Clin Pathol.* 2009;62:128–38.

124. Riley RD, Sauerbrei W, Altman DG. Prognostic markers in cancer: The evolution of evidence from single studies to meta-analysis, and beyond. *Br J Cancer.* Nature Publishing Group; 2009;100:1219–29.

125. 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;28:2373–80.

4. Thesen

1. Bei Patient*innen mit rezidierten oder refraktären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (r/rDLBCL) und rezidierten oder refraktären transformierten indolenten Lymphomen (r/rTRIL), die sich für eine Stammzelltransplantation (SZT) eignen, war die konkordante jedoch nicht die diskordante Knochenmarkinfiltration in uni- und multivariaten Analysen mit einem verschlechterten progressionsfreien- (PFS) und Gesamtüberleben (OS) assoziiert.
2. Bei SZT-geeigneten Patient*innen mit r/rDLBCL und r/rTRIL waren in univariaten Analysen die Faktoren saalPI ≥ 2 , Bulk-Manifestationen $\geq 7,5$ cm, Dauer der ersten Remission < 12 Monate, Nichtansprechen auf die Reinduktionstherapie, nicht durchgeführte SZT und Remissionsstatus \geq Partialremission vor SZT ebenfalls mit einem verschlechterten PFS und OS assoziiert.
3. Bei Patient*innen mit T-Zell-Lymphomen (T-NHL) war die RNA binding motif protein X-linked (RBMX)-Expression unter den T-NHL Subtypen heterogen, im Vergleich zu Geweben von gesunden Lymphknoten jedoch nicht erhöht.
4. Bei Patient*innen mit T-NHL war eine höhere RBMX-Expression mit einem verminderten Ansprechen auf eine anthrazyklinhaltige Polychemotherapie assoziiert.
5. Bei Patient*innen mit T-NHL war eine höhere RBMX-Expression in uni- und multivariaten Analysen mit einem verschlechterten PFS und OS assoziiert.

Anlagen

Anlage A

Denis Terziev, Marcus Bauer, Lisa Paschold, Claudia Wickenhauser, Andreas Wienke, Mascha Binder, Lutz P. Müller, Thomas Weber. Impact of bone marrow involvement on outcome in relapsed and refractory transplant eligible diffuse large B-cell lymphoma and transformed indolent lymphoma. PLoS One. 2020;15:1–13.

Beiträge der Autoren: Konzeptualisierung, Thomas Weber; Datenkuration, Denis Terziev, Lutz P. Müller, Thomas Weber; formale Analyse, Denis Terziev, Marcus Bauer, Lisa Paschold, Claudia Wickenhauser, Andreas Wienke, Lutz P. Müller, Thomas Weber; Untersuchung, Denis Terziev, Lisa Paschold, Claudia Wickenhauser, Thomas Weber; Methodik, Andreas Wienke, Mascha Binder, Thomas Weber; Supervision, Thomas Weber; Validation, Andreas Wienke, Thomas Weber; Visualisierung, Denis Terziev; Schreiben - Erstellen des ursprünglichen Entwurfs, Denis Terziev, Thomas Weber; Korrekturlesen und Redaktion, Denis Terziev, Marcus Bauer, Lisa Paschold, Claudia Wickenhauser, Andreas Wienke, Mascha Binder, Lutz P. Müller, Thomas Weber

Anlage B

Franziska L. Schümann, Marcus Bauer, Elisabeth Groß, Denis Terziev, Andreas Wienke, Claudia Wickenhauser, Mascha Binder, Thomas Weber. RBMX Protein Expression in T-Cell Lymphomas Predicts Chemotherapy Response and Prognosis. Cancers (Basel). 2021;13:4788.

Beiträge der Autoren: Konzeptualisierung, Thomas Weber; Methodik, Andreas Wienke, Mascha Binder, Thomas Weber; Validierung, Andreas Wienke, Thomas Weber; formale Analyse, Franziska L. Schümann., Marcus Bauer, Elisabeth Groß, Denis Terziev, Andreas Wienke, Thomas Weber; Untersuchung, Marcus Bauer, Franziska L. Schümann, Thomas Weber, Andreas Wienke; Datenkuration, Franziska L. Schümann, Denis Terziev, Thomas Weber; Schreiben - Erstellung des ursprünglichen Entwurfs, Franziska L. Schümann, Marcus Bauer, Thomas Weber; Korrekturlesen und Redaktion, Franziska L. Schümann, Marcus Bauer, Elisabeth Groß, Denis Terziev, Andreas Wienke, Claudia Wickenhauser, Mascha Binder, Thomas Weber; Visualisierung, Franziska L. Schümann; Supervision, Thomas Weber; Projektadministration, Thomas Weber; Fördermittelakquise, Thomas Weber, Mascha Binder, Franziska L. Schümann

RESEARCH ARTICLE

Impact of bone marrow involvement on outcome in relapsed and refractory transplant eligible diffuse large B-cell lymphoma and transformed indolent lymphoma

Denis Terziev¹, Marcus Bauer², Lisa Paschold¹, Claudia Wickenhauser², Andreas Wienke³, Mascha Binder¹, Lutz P. Müller¹, Thomas Weber^{1*}

1 Department of Internal Medicine IV, Haematology and Oncology, University Hospital Halle (Saale), Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle, Germany, **2** Institute of Pathology, University Hospital Halle (Saale), Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle, Germany, **3** Institute of Medical Epidemiology, Biometrics and Informatics, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Halle, Germany

* thomas.weber@uk-halle.de



OPEN ACCESS

Citation: Terziev D, Bauer M, Paschold L, Wickenhauser C, Wienke A, Binder M, et al. (2020) Impact of bone marrow involvement on outcome in relapsed and refractory transplant eligible diffuse large B-cell lymphoma and transformed indolent lymphoma. PLoS ONE 15(7): e0235786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235786>

Editor: Francesco Bertolini, European Institute of Oncology, ITALY

Received: March 14, 2020

Accepted: June 22, 2020

Published: July 8, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235786>

Copyright: © 2020 Terziev et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Abstract

In front-line treatment of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), prior studies suggest that concordant but not discordant involvement of the bone marrow (BM) portends a poor prognosis. The prognostic impact of bone marrow infiltration (BMI) in recurrent or refractory DLBCL (r/rDLBCL) and transformed indolent lymphoma (r/rTRIL) patients is less clear. Thus, we examined the prognostic significance of the infiltration of bone marrow (BMI) by concordant, large B-cells (conBMI) and discordant, small B-cells (disBMI) in this patient group. We performed a single center retrospective analysis of the prognostic impact of BMI diagnosed before start of second-line treatment as well as multiple clinicopathologic variables in 82 patients with r/rDLBCL or r/rTRIL intended to treat with autologous SCT. Twenty-five of 82 patients (30.5%) had BMI. Out of these, 19 (76%) had conBMI and 6 (24%) had disBMI. In patients with conBMI but not disBMI, uni- and multivariate analysis revealed inferior progression free survival (PFS) and overall survival (OS) compared to patients without BMI (median PFS, 9.2 vs 17.45 months, log rank: $p = 0.049$; Hazard Ratio, 2.34 (Confidence Interval, 1.24–4.44), $p = 0.009$; median OS 14.72 vs 28.91 months, log rank: $p = 0.017$; Hazard Ratio, 2.76 (Confidence Interval, 1.43–5.31), $p = 0.002$). ConBMI was strongly associated with nonGCB subtype as classified by the Hans algorithm (82.4% vs 17.6%, $p = 0.01$). ConBMI comprised an independent predictor of poor prognosis in primary and secondary r/rDLBCL. Incorporating conBMI in the pretherapeutic risk assessment for r/rDLBCL and r/rTRIL patients may be useful for prognostication, for stratification in clinical trials, and to assess new therapies for this high-risk patient subset that might not benefit from SCT in second-line treatment.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most frequent type of lymphoma and is highly heterogeneous with regard to clinical manifestation, biological and molecular features and prognosis [1–3]. In eligible patients with refractory or recurrent DLBCL (r/rDLBCL) and transformed indolent lymphoma (r/rTRIL) the introduction of high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation (SCT) following salvage immunochemotherapy led to long term survival rates of >50% [4,5]. Yet, up to 50% of initially transplant eligible patients are not able to receive autologous SCT due to failure of salvage therapy, failure of apheresis of autologous peripheral blood stem cells or therapy-limiting toxicity [5]. On the other hand, 40–50% of patients relapse within 4 years after autologous SCT [5–7], in that case resulting in very poor prognosis [8,9]. In primary refractory DLBCL and DLBCL relapsing within 12 months after completion of first line therapy, lymphoma-directed myeloablative conditioning followed by allogeneic SCT may result in a better outcome compared to autologous SCT. Still, OS 1 year post allogeneic SCT does not exceed 50% [10]. Thus, the benefit of autologous and allogeneic SCT in r/rDLBCL and r/rTRIL is ultimately limited and therefore, pretherapeutic risk stratification to identify a subset of patients who will not benefit from SCT and should therefore be referred to alternative treatment approaches is an urgent need in clinical practice.

5–22% of transplant eligible r/rDLBCL patients show lymphoma infiltration of the bone marrow (BM) [5,6,11,12]. In TRIL patients, up to 40% of BM involvement (BMI) has been reported [13]. While the BM is mostly concordantly involved by large cell lymphoma (conBMI), a subset of positive BMI (posBMI) patients show BMI by discordant small cell lymphoma (disBMI). The latter represents a heterogeneous group of disorders, comprising cases with clonally related, as well as cases with two clonally distinct, unrelated B-cell neoplasms presenting synchronously as previously shown by comparative molecular analysis of immunoglobulin heavy chain (IgH) and BCL2 gene rearrangements [14]. Since BMI is clinically recognized as advanced disease, it contributes to higher International Prognostic Index (IPI) scores [15]. However, it has been reported that conBMI but not disBMI negatively impacts progression free survival (PFS) and overall survival (OS) in DLBCL patients after treatment with front-line therapy independently from the IPI [16–18]. Yet, owing to the dissimilarity of designs and inclusion criteria and the limited number of enrolled patients with BMI in studies concerning r/rDLBCL and r/rTRIL, the prognostic impact of conBMI and disBMI in this patient group is unknown. In addition, clinicopathologic characteristics of posBMI primary and secondary r/rDLBCL patients are so far not well investigated. We retrospectively investigated a patient cohort intended to treat with autologous SCT to address these questions and elucidate the role of BMI in transplant eligible r/rDLBCL and r/rTRIL patients.

Patients and methods

This is a retrospective single center analysis of unselected patients with transplant eligible r/rDLBCL and r/rTRIL patients who were treated between November 1998 and March 2019 at the University Hospital Halle (Saale). Patients were identified by a review of the internal hospital database records and verified by using the transplant-team records and German Registry for Stem Cell Transplantation (DRST) database. TRIL was defined as the presence of indolent B-cell lymphoma prior to or at the time of DLBCL diagnosis [6]. Only patients with histologically proven transformation were included. Patients were included in the analysis if they were ≥ 18 years of age with a biopsy proven diagnosis of DLBCL according to the 2008 WHO classification [19], were intended to treat with a consolidating SCT and had complete clinical data. Exclusion criteria comprised primary involvement of the central nervous system, primary mediastinal B-cell lymphoma or coincident medical conditions that precluded treating the

lymphoma with curative intention. Assessed clinical data were age at relapse, sex, secondary age adjusted IPI (saaIPI) [20] (incorporating Ann Arbor staging >II, elevated LDH and ECOG performance score >1), TRIL, early relapse defined as duration of first complete remission <12 months or incomplete response following front-line treatment, bulky mass ≥ 7.5 cm in largest diameter at any time before start of induction therapy [21], secondary involvement of the central nervous system (CNS), prior Rituximab application, executed SCT, remission status before SCT and histologically confirmed BMI any time prior to start of induction therapy.

BM biopsy were centrally reviewed at the Institute of Pathology, Halle (Saale) by the pathologists MB and CW. ConBMI was defined as BMI with DLBCL, while disBMI was reported if the histological and immunohistochemical picture was compatible with small cell B-cell lymphoma. Flow cytometry, immunohistochemistry and/ or next generation sequencing (NGS) based analysis of IgH gene rearrangements were utilized to confirm the clonality of the B-cell population or an aberrant immunophenotype when BM involvement was clinically highly suspicious and/ or histology was inconclusive. All available lymphoma samples were immunohistochemically analyzed for GCB/ nonGCB status utilizing the classifier developed by Hans and colleagues [22]. In addition, available lymphoma tissue was immunohistochemically accessed for p53 alteration by IHC utilizing the p53 mouse monoclonal antibody (clone DO7, Cell Marque). A p53 overexpression and the lack of p53 immunohistochemical expression were considered positive [23]. Response to salvage therapy and, if applied, SCT was assessed by reviewing reports of contrasted computer tomography scans, magnetic resonance imaging (MRI) and/ or positron emission tomography with the tracer fluorine-18 fluorodeoxyglucose at time of relapse, after each line of salvage therapy and within three months after completion of SCT. Further, if BM was involved at any time before start of salvage therapy, remission assessment included the review of restaging BM biopsies. Response to salvage therapy was defined by achievement of at least partial remission (PR) defined by the diagnostic criteria of Lugano [24].

This study was performed according to the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee at the Martin-Luther-University of Halle-Wittenberg (#2019-072).

Statistical analyses

Clinical characteristics were compared between the separate BMI cohorts using the independent samples t-test for continuous variables and the χ^2 test for categorical variables. Progression free survival (PFS) was defined as the time from disease recurrence until lymphoma progression or death of any cause. In a landmark analysis for patients who received SCT, PFS post SCT was defined as the time from SCT until lymphoma progression or death of any cause. Overall survival (OS) was defined as the time from disease recurrence until death from any cause and OS post SCT was calculated from SCT until death from any cause. Patients were censored at time of their last clinical visit by a physician. OS and PFS were assessed using the Kaplan-Meier (KM) method [25]. The log-rank test [26] was utilized for comparison of PFS and OS between groups. Multivariate analysis was performed using a Cox proportional hazards model [27] to assess the independent effect of prognostic variables on PFS and OS. A P value of ≤ 0.05 (two-sided) was considered statistically significant. We used SPSS version 25.0 for Windows; SPSS Inc, Chicago, IL for data analysis.

Results

Patient and treatment characteristics

A total of 82 patients with r/rDLBCL and r/rTRIL that met the inclusion criteria were identified. The median age of the entire cohort was 59 years (range, 23 to 75). At the time of analysis,

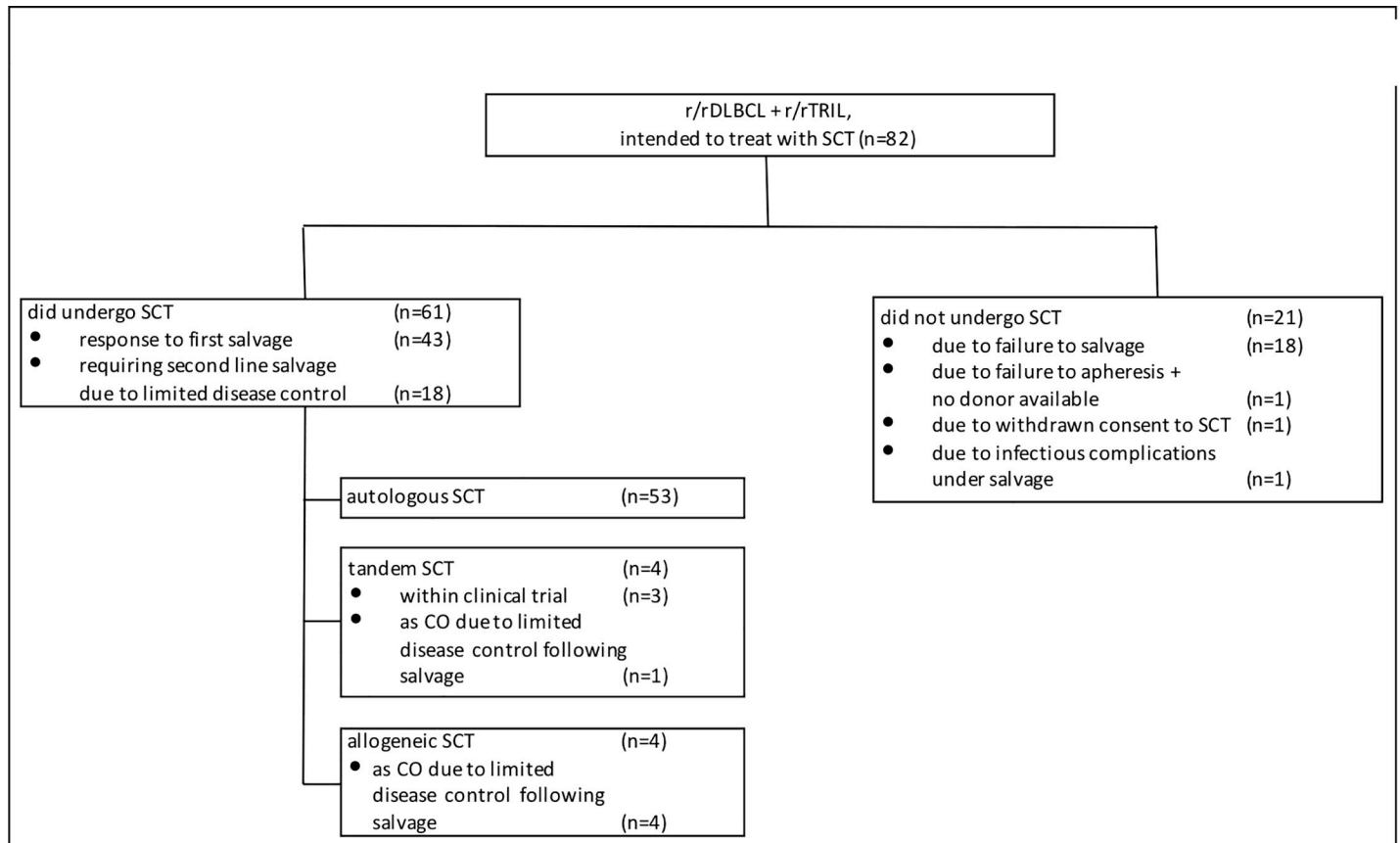


Fig 1. Consort diagram for the present DLBCL and TRIL patient cohort intended to treat with SCT. Abbreviations: r/r: recurrent or refractory, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma; SCT: stem cell transplantation, TRIL: transformed indolent lymphoma, CO: clinical option.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235786.g001>

median follow-up time for living patients was 66.3 months (range, 8.1 to 238.7). Overall, 58 patients (70.7%) have died. All patients have received front-line anthracycline-containing chemotherapy (S1 Table). Front-line therapy contained Rituximab in 59 patients (72%). Salvage immunochemotherapy comprised (R)-DHAP [5] in 40 patients (48.8%), (R)-ICE [5] in 14 patients (17.1%), (R)-DexaBEAM [28] in 15 patients (18.3%) and others in 13 patients (15.9%). Autologous SCT was accomplished in 57 patients (69.5%) (Fig 1). Out of these, 4 patients (4.9%) had tandem autologous and allogeneic SCT. Highdose chemotherapy regimens foregoing autologous SCT comprised BEAM [29] in 35 patients (61.4%), TEC [30] in 11 patients (19.3%) and other regimens in 11 patients (19.3%). Four patients (4.8%), in which autologous SCT was not executed due to insufficient disease control ($n = 3$, 3.6%) or failure of stem cell apheresis after induction immunochemotherapy ($n = 1$, 1.2%), were alternatively referred to allogeneic SCT. Patient and treatment characteristics are given in Table 1.

Characteristics of patients with BMI

A total of 25 patients (31.5%) had BMI at any time before start of induction therapy. Of these, 19 patients (23.2%) had conBMI and 6 patients (7.3%) had disBMI. Two patients with inconclusive BM histology were clinically suspicious for conBMI and showed a clonal B-cell population in BM accessed by NGS and were therefore assigned to the conBMI patient group. 57 patients (68.5%) had noBMI (noBMI). Table 1 summarizes the clinicopathological and therapy

Table 1. Clinicopathologic characteristics of patients grouped by type of BMI.

Characteristics	noBMI	conBMI	disBMI	P-value		
	(n = 57)	(n = 19)	(n = 6)			
	No. (%)	No. (%)	No. (%)	noBMI vs conBMI	noBMI vs disBMI	conBMI vs disBMI
Age at relapse (years)						
Median (Range)	59 (23–75)	56 (36–71)	58 (51–65)	0.81	0.83	0.69
Sex				0.381	0.041	0.199
Male	42 (73.7)	12 (63.2)	2 (33.3)			
Female	15 (26.3)	7 (36.8)	4 (66.7)			
saaIPI ≥2	37 (64.9)	16 (84.2)	5 (83.3)	0.113	0.363	0.959
Bulky mass ≥7.5 cm	21 (36.8)	4 (21.1)	2 (33.3)	0.205	0.865	0.539
Duration of first complete remission <12 months*	41 (71.9)	11 (57.9)	2 (33)	0.254	0.053	0.294
TRIL	11 (19.3)	5 (26.3)	6 (100)	0.516	<0.001	0.002
secondary CNS involvement	12 (17.5)	1 (5.3)	0 (0)	0.113	0.212	0.566
prior Rituximab treatment	44 (77.2)	11 (57.9)	4 (66.7)	0.103	0.565	0.702
failure to 1 st salvage regimen	22 (38.6)	5 (26.3)	3 (50)	0.333	0.587	0.278
completed SCT	43 (75.4)	14 (73.7)	4 (66.7)	0.878	0.639	0.739
autologous SCT	39 (68.4)	11 (57.9)	3 (50)			
allogeneic SCT	2 (3.5)	0 (0)	2 (33.3)			
tandem SCT	2 (3.5)	1 (15.3)	1 (16.7)			
no CR before SCT	27 (62.8)	8 (57.1)	4 (100)**	0.706	0.133	0.109
no CR after SCT	17 (40.5)	6 (42.9)	2 (50)	0.875	0.712	0.8
COO (IHC)				0.01	0.06	0.43
GCB	17 (56.7)	3 (17.6)	0 (0)			
nonGCB	13 (43.3)	14 (82.4)	3 (100)			
unknown	27	2	3			
p53 expression (IHC)				0.088	0.184	0.859
p53 wt	15 (71.4)	8 (44.4)	2 (40)			
p53 alteration	6 (28.6)	10 (55.6)	3 (60)			
unknown	36	1	1			

Abbreviations: BMI: bone marrow infiltration, noBMI: no bone marrow infiltration, conBMI: concordant bone marrow infiltration, disBMI: discordant bone marrow infiltration, saaIPI: secondary age adjusted International Prognostic Index, TRIL: transformed indolent lymphoma, CNS: central nervous system, SCT: stem cell transplantation, CR: complete remission, COO: cell of origin, IHC: immunohistochemistry, GCB: germinal center B-cell, wt: wildtype

*including patients not achieving complete response after front-line treatment

**2 (50%) no response of indolent component, 2 (50%) no response of aggressive component.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235786.t001>

associated characteristics for each of the three groups. Comparing all three groups, the noBMI, conBMI and disBMI group, we found no relevant difference in age, saaIPI, bulky disease, secondary CNS involvement, duration of first complete remission, prior Rituximab treatment, front-line regimens and completion of SCT. TRIL was more often diagnosed in patients with disBMI (disBMI 100% vs. conBMI 26.3% and noBMI 19.3%, $p < 0.01$, respectively). The conBMI group was more likely to express a nonGCB immunophenotype as classified by the HANS algorithm compared to the noBMI group (82.4% vs. 43.3%, $p = 0.01$). Alteration of p53 was equally distributed between the BMI groups. The same observations were made when conBMI and disBMI were compared to the patient group with extensive disease (AA >2) and noBMI, respectively (S2 Table). An enrichment of secondary CNS involvement was only observed when comparing patients with AA >2 and noBMI to the conBMI group (AA >2, noBMI 27.3% vs. conBMI 5.3%, $p = 0.048$).

Table 2. Prognostic factors of OS in r/rDLBCL and r/rTRIL patients, transplant eligible.

Parameters	total cohort (n = 82)					landmark analysis of the transplanted cohort (n = 61)				
	Univariate analysis		Multivariate analysis			Univariate analysis		Multivariate analysis		
	median OS (months)	P-value (log rank test)	HR	95% CI	P-value	median PFS (months)	P-value (log rank test)	HR	95% CI	P-value
Age at relapse			1.01	0.99–1.04	0.319			1.01	0.98–1.03	0.635
Sex		0.057	1.64	0.91–2.96	0.103		0.661	1.19	0.56–2.53	0.643
Male	28.91					37.98				
Female	11.89					23.79				
saalPI		0.01	1.57	0.79–3.2	0.203		0.1	1.53	0.7–3.32	0.286
saalPI <2	96.16					90.22				
saalPI ≥2	12.78					14.1				
TRIL			1.4	0.69–2.81	0.35		0.185	1.72	0.73–4.04	0.213
dnDLBCL	30.23	0.089				37.98				
TRIL	12.78					14				
Bulky mass ≥7.5 cm		0.001	1.91	0.95–3.83	0.068		0.072	1.53	0.61–3.83	0.362
no	36.7					37.98				
yes	8.44					5.29				
Duration of first CR		0.021	2.27	1.07–4.81	0.032		0.284	1.28	0.58–2.83	0.532
<12 months*	11.9					14				
≥12 months	43.96					38.87				
BMI		0.022					0.041			
noBMI	28.91					66.86				
posBMI	13.54					14				
conBMI	14.72	0.017	2.76	1.43–5.31	0.002	14	0.025	2.63	1.19–5.79	0.017
disBMI	11.89	0.4	1.47	0.42–5.14	0.543	7.1	0.587	0.62	0.12–3.23	0.572
prior Rituximab treatment		0.315					0.627			
no	43.96					37.98				
yes	13.54					28.39				
response to first salvage		0.006					<0.001			
no	9.3					4.34				
yes	36.7					38.87				
undergone SCT		<0.001	0.313	0.16–0.63	0.001					
no	7									
yes	36.7									
remission status before SCT							0.008	2.64	1.19–5.87	0.017
CR						82.46				
≥PR						7.8				
COO (IHC)		0.379					0.78			
GCB subtype	26.89					28.39				
nonGCB subtype	18.86					25.79				
p53 expression (IHC)		0.451					0.191			

(Continued)

Table 2. (Continued)

Parameters	total cohort (n = 82)					landmark analysis of the transplanted cohort (n = 61)				
	Univariate analysis		Multivariate analysis			Univariate analysis		Multivariate analysis		
	median OS (months)	P-value (log rank test)	HR	95% CI	P-value	median PFS (months)	P-value (log rank test)	HR	95% CI	P-value
<i>p53 wt</i>	19.09					28.39				
<i>p53 alteration</i>	13.54					23.79				

Abbreviations: OS: overall survival, r/r: recurrent or refractory, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, TRIL: transformed indolent lymphoma, HR: Hazard Ratio, CI: Confidence Interval, saaIPI: secondary age adjusted International Prognostic Index, dnDLBCL: de novo diffuse large B-cell lymphoma, SCT: stem cell transplantation, BMI: bone marrow infiltration, noBMI: no bone marrow infiltration, posBMI: positive bone marrow infiltration, conBMI: concordant bone marrow infiltration, disBMI: discordant bone marrow infiltration, SCT: stem cell transplantation, CR: complete remission, PR: partial remission, COO: cell of origin, IHC: immunohistochemistry, GCB: germinal center B-cell, wt: wildtype

*including patients not achieving complete response after front-line treatment.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235786.t002>

Response to salvage therapy according to BMI

As expected, failure of salvage therapy in the entire cohort was significantly associated with early relapse (37% vs 7%, $p = 0.004$), bulky disease (52% vs 15%, $p = 0.001$) and female sex (46% vs 18%, $p = 0.007$). No relevant differences in response were found according to salvage chemotherapy regimens and if applied high-dose chemotherapy regimens foregoing autologous SCT. Also, patients who responded to salvage chemotherapy were more likely to proceed to SCT (92% vs 8%, $p < 0.001$) (S3 Table).

Interestingly, no correlation of posBMI with response to salvage therapy was observed, as noBMI and posBMI patients showed a similar response rate (28% vs 26%, $p = 0.874$).

Impact of BMI on survival

Table 2 and S4 Table summarize the results of all tested variables in uni- and multivariate survival analyses. BMI negatively affected survival (posBMI vs noBMI: median PFS 9.2 vs. 17.45 months, log-rank (KM) $p = 0.055$; median OS, 13.54 vs 28.91 months, log-rank (KM) $p = 0.022$; S1A Fig and S1B Fig). Importantly, conBMI portended a poor prognosis relative to noBMI (median PFS, 9.2 vs 17.45 months, log rank (KM) $p = 0.049$; median OS, 14.72 vs 28.91 months, log-rank (KM) $p = 0.017$, Fig 2A and 2B), whereas disBMI did not (median PFS, 6 vs 17.45 months, log rank (KM) $p = 0.456$; median OS, 11.89 vs 28.91; log rank (KM) $p = 0.4$; S1C Fig and S1D Fig). ConBMI maintained its prognostic relevance towards noBMI in the landmark PFS and OS analyses of the transplanted cohort (Fig 2C and 2D), in the extensive disease cohort (S1E Fig and S1F Fig) and in the nonGCB cohort (S1G Fig and S1H Fig).

In multivariate analysis utilizing Cox regression model of PFS and OS, conBMI and not performed SCT were adverse prognostic factors for both PFS and OS (PFS: S4 Table, OS: Table 2). Additionally, early relapse predicted poor OS in multivariate analysis. Sex, TRIL, saaIPI ≥ 2 , bulky mass ≥ 7.5 cm and disBMI showed no prognostic relevant impact (Table 2). We also, separately, performed exploratory multivariate landmark analyses within the subgroup of transplanted patients, to determine if the risk factors for mortality or relapse were different in this group. In transplanted patients, non-achievement of complete remission (CR) before SCT was included into the multivariate analysis and was strongly associated with worse postSCT PFS and OS (S4 Table, Table 2). Of note, conBMI also maintained its prognostic relevance in multivariate landmark analysis in the transplanted patient subset (S4 Table, Table 2).

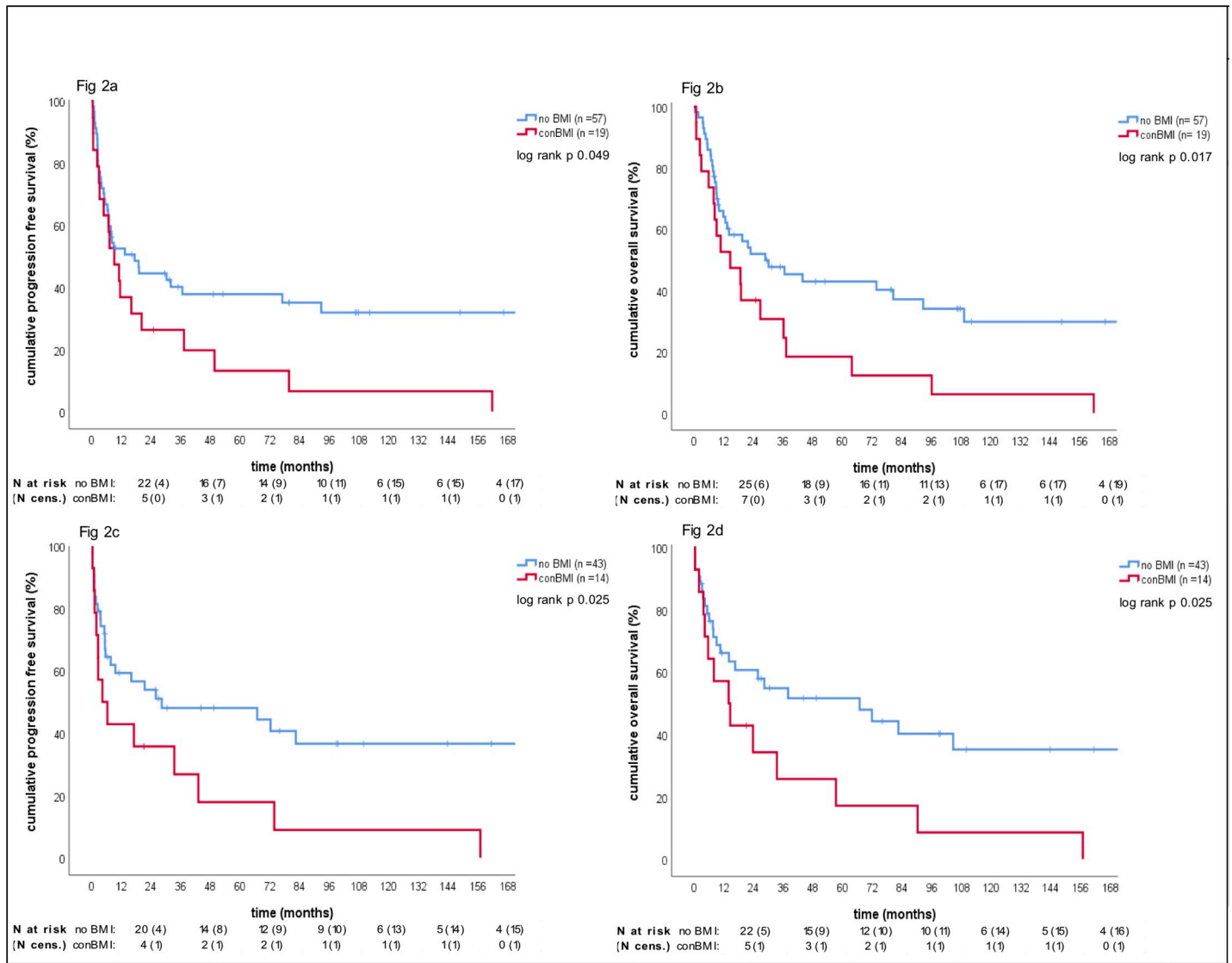


Fig 2. Kaplan-Meier curves for progression free survival and overall survival according to different groups of BMI. a: KM curve for PFS according to noBMI vs conBMI in the total cohort; b: KM curve for OS according to noBMI vs conBMI in the total cohort; c: KM curve for PFS landmark analysis according to noBMI vs conBMI in the transplanted patient subset; d: KM curve of OS landmark analysis according to noBMI vs conBMI in the transplanted patient subset; Abbreviations: BMI: bone marrow infiltration, noBMI: no bone marrow infiltration, conBMI: concordant bone marrow infiltration, KM: Kaplan-Meier; PFS: progression free survival, OS: overall survival, N: number of patients, cens.: censored.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235786.g002>

Discussion

To the best of our knowledge, we present the first detailed analysis of the prognostic impact of BMI on outcome of transplant eligible r/rDLBCL and r/rTRIL patients. In this analysis, con-BMI but not disBMI was associated with worse PFS and OS in transplant eligible patients. This association was irrespective of Ann Arbor stage and saaIPI indicating conBMI might not only be a measure of the extend of the disease.

As reported previously [4–6,31,32], early relapse, achievement of CR preceding SCT and completion of SCT, which was strongly associated with response to the salvage therapy (91.2% vs 4%, $p < 0.001$), displayed strong factors for PFS and OS in our analyses. Taken together, these parameters emphasize the main limitation of the SCT strategy since response to

chemotherapy remains a fundamental prerequisite for SCT. Further parameters, which were able to discriminate subgroups of patients with differing prognosis in our study include saaPI ≥ 2 [20,33] and bulky disease [21,34]. However, while these parameters impacted survival in univariate analyses, they failed to show relevant influence on PFS and OS in multivariate analyses of the transplanted subgroup if achievement of CR before SCT was included into the model. This suggests that these factors indicate the likelihood of achieving CR after salvage immunochemotherapy (S3 Table), rather than affecting the outcome of SCT for patients who do reach CR [6]. In contrast to these findings, conBMI but not disBMI portended worse PFS and OS compared to the noBMI group independently from other prognostically relevant factors.

In analogy to findings in first diagnosed DLBCL [35], alteration of p53 expression, which is a known marker for high clinical stage [36] but not for adverse survival [37], was not associated with BMI subgroups in the present cohort. On the other hand, conBMI was significantly associated with nonGCB subtype as classified by the Hans-algorithm [22], which is in opposition to findings in front-line setting of DLBCL [35]. Yet, the prognostic impact of conBMI appears to be independent from the cell of origin subtype as it maintained its prognostic relevance both, in the GCB and the in the nonGCB cohort. Recently, Yao et al. [35] reported on broader biological characteristics in initially diagnosed DLBCL patients, revealing that conBMI also shows an enrichment for unfavorable markers such as CD5 expression [38] and MYC gene rearrangement [39]. Yet, of interest, conBMI remained an adverse predictor in almost all tested biomarker-positive DLBCL subsets. The authors thus assumed that conBMI may not be entirely a surrogate for these known adverse biological features in DLBCL, but other possible mechanisms underlying conBMI may contribute to adverse survival. In their study, gene expression profiling of DLBCL specimen in the reported cohort revealed that conBMI in comparison to noBMI additionally shows an upregulation of genes encoding various proteins playing a key role in cellular adhesion or cytoskeletal reorganization as well as immunoregulation [35]. Therefore, conBMI may be related to cellular adhesion or migration and immune tolerance or escape within the BM niche. Further, adhesion of DLBCL to stroma cells within the BM niche could explain drug resistance and therefore limited prognosis [40].

The results from our studied patient cohort, which is comparable in terms of basic patient and disease characteristics to transplant eligible r/rDLBCL patients treated within prior prospective trials [5,31,41] underline the hypothesis that conBMI expresses an easy to access surrogate for an underlying unfavorable lymphoma biology in the second-line setting of DLBCL and TRIL. However, the current results are subject to several limitations mainly caused by the retrospective character of this analysis and the heterogeneity of the described cohort. Further, the relatively small patient size increases the risk of statistical errors.

Nonetheless, based on the presented data, we consider conBMI to be a relevant and independent clinical marker for poor prognosis in r/rDLBCL and r/rTRIL patients. Since incorporating conBMI in the pretherapeutic assessment could improve our ability to risk stratify patients with r/rDLBCL considering SCT, we hope that the results presented here may be further validated and enable precise prognostication and individualized disease surveillance as well as contribute to the design of upcoming clinical trials. Moreover, as the mechanisms underlying conBMI are not fully elucidated, further investigation of the biological background of DLBCL with conBMI is needed to identify potential therapeutic targets.

Supporting information

S1 Fig. Kaplan-Meier curves for progression free survival and overall survival according to different groups of BMI. a: KM curve for PFS according to noBMI vs BMI in the total cohort;

b: KM curve for OS according to noBMI vs BMI in the total cohort; c: KM curve for PFS according to noBMI vs disBMI in the total cohort; d: KM curve of OS according to noBMI vs disBMI in the total cohort; e: KM curve for PFS according to noBMI vs conBMI in the extensive disease (AA>2) patient subset; f: KM curve for OS according to noBMI vs conBMI in the extensive disease (AA>2) patient subset; g: KM curve for PFS according to noBMI vs conBMI in the nonGCB patient subset; h: KM curve for OS according to noBMI vs conBMI in nonGCB patient subset; Abbreviations: BMI: bone marrow infiltration, noBMI: no bone marrow infiltration, conBMI: concordant bone marrow infiltration, KM: Kaplan-Meier; PFS: progression free survival, OS: overall survival, AA: Ann Arbor, GCB: germinal center B-cell. (TIFF)

S1 Table. Front-line regimens of patients grouped by type of BMI. Abbreviations: BMI: bone marrow infiltration, noBMI: no bone marrow infiltration, conBMI: concordant bone marrow infiltration, disBMI: discordant bone marrow infiltration, CHOP: cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin, vincristine, prednisolone, R: rituximab, CHOEP: cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin, vincristine, etoposide, prednisolone, DA-EPOCH-R: dose adjusted etoposide, prednisolone, vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin, rituximab. (XLSX)

S2 Table. Clinicopathologic characteristics of patients with extensive disease defined as AA >2 grouped by type of BMI. Abbreviations: AA: Ann Arbor stage, BMI: bone marrow infiltration, noBMI: no bone marrow infiltration, conBMI: concordant bone marrow infiltration, disBMI: discordant bone marrow infiltration, saaIPI: secondary age adjusted International Prognostic Index, TRIL: transformed indolent lymphoma, CNS: central nervous system, SCT: stem cell transplantation, CR: complete remission, COO: cell of origin, IHC: immunohistochemistry GCB: germinal center B-cell, wt: wildtype; *including patients not achieving complete response after front-line treatment. (XLSX)

S3 Table. Best response to salvage therapy without SCT according to prognostic factors. Abbreviations: SCT: stem cell transplantation, CR: complete remission, PR: partial remission, SD: stable disease, PD: progressive disease, BMI: bone marrow infiltration, noBMI: no bone marrow infiltration, posBMI: positive bone marrow infiltration, saaIPI: secondary age adjusted International Prognostic Index, TRIL: transformed indolent lymphoma, dnDLBCL: de novo diffuse large B-cell lymphoma, SCT: stem cell transplantation, CTx: chemotherapy, COO: cell of origin, IHC: immunohistochemistry, GCB: germinal center B-cell, wt: wildtype; *response to autologous SCT. (XLSX)

S4 Table. Prognostic factors of PFS in r/rDLBCL and r/rTRIL patients, transplant eligible. Abbreviations: PFS: progression free survival, r/r: recurrent or refractory, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, TRIL: transformed indolent lymphoma, HR: Hazard Ratio, CI: Confidence Interval, saaIPI: secondary age adjusted International Prognostic Index, dnDLBCL: de novo diffuse large B-cell lymphoma, SCT: stem cell transplantation, BMI: bone marrow infiltration, noBMI: no bone marrow infiltration, posBMI: positive bone marrow infiltration, conBMI: concordant bone marrow infiltration, disBMI: discordant bone marrow infiltration, SCT: stem cell transplantation, CR: complete remission, CR: complete remission, PR: partial remission, COO: cell of origin, IHC: immunohistochemistry, GCB: germinal center B-cell; *including patients not achieving complete response after front-line treatment. (XLSX)

Author Contributions

Conceptualization: Thomas Weber.

Data curation: Denis Terziev, Lutz P. Müller, Thomas Weber.

Formal analysis: Denis Terziev, Marcus Bauer, Lisa Paschold, Claudia Wickenhauser, Andreas Wienke, Lutz P. Müller, Thomas Weber.

Investigation: Denis Terziev, Lisa Paschold, Claudia Wickenhauser, Thomas Weber.

Methodology: Andreas Wienke, Mascha Binder, Thomas Weber.

Supervision: Thomas Weber.

Validation: Andreas Wienke, Thomas Weber.

Visualization: Denis Terziev.

Writing – original draft: Denis Terziev, Thomas Weber.

Writing – review & editing: Denis Terziev, Marcus Bauer, Lisa Paschold, Claudia Wickenhauser, Andreas Wienke, Mascha Binder, Lutz P. Müller, Thomas Weber.

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H TJ. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon; 2017.
2. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med.* 2018; 24:679–90. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0016-8> PMID: 29713087
3. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2018; 378:1396–407. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801445> PMID: 29641966
4. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van Der Lelie H, Bron D, et al. Autologous Bone Marrow Transplantation as Compared with Salvage Chemotherapy in Relapses of Chemotherapy-Sensitive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 1995; 333:1540–5. <https://doi.org/10.1056/NEJM199512073332305> PMID: 7477169
5. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Gill DS, Linch DC, Trneny M, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol.* 2010; 28:4184–90. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.1618> PMID: 20660832
6. Armand P, Welch S, Kim HT, Lacasce AS, Jacobsen ED, Davids MS, et al. Prognostic factors for patients with diffuse large B cell lymphoma and transformed indolent lymphoma undergoing autologous stem cell transplantation in the positron emission tomography era. *Br J Haematol.* 2013; 160:608–17. <https://doi.org/10.1111/bjh.12176> PMID: 23278720
7. Hamadani M, Hari PN, Zhang Y, Carreras J, Akpek G, Aljurf MD, et al. Early Failure of Frontline Rituximab-Containing Chemo-immunotherapy in Diffuse Large B Cell Lymphoma Does Not Predict Futility of Autologous Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* Elsevier Ltd; 2014; 20:1729–36. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.06.036> PMID: 25008330
8. Nagle SJ, Woo K, Schuster SJ, Nasta SD, Stadtmauer E, Mick R, et al. Outcomes of patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma with progression of lymphoma after autologous stem cell transplantation in the rituximab era. *Am J Hematol.* 2013; 88:890–4. <https://doi.org/10.1002/ajh.23524> PMID: 23813874
9. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: Results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood.* 2017; 130:1800–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-03-769620> PMID: 28774879
10. Glass B, Hasenkamp J, Wulf G, Dreger P, Pfreundschuh M, Gramatzki M, et al. Rituximab after lymphoma-directed conditioning and allogeneic stem-cell transplantation for relapsed and refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma (DSHNHL R3): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014; 15:757–66. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70161-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70161-5) PMID: 24827808
11. Derenzini E, Musuraca G, Fanti S, Stefoni V, Tani M, Alinari L, et al. Pretransplantation positron emission tomography scan is the main predictor of autologous stem cell transplantation outcome in

- aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2008; 113:2496–503. <https://doi.org/10.1002/cncr.23861> PMID: 18833583
12. Caballero MD, Pérez-Simón JA, Iriondo A, Lahuerta JJ, Sierra J, Marín J, et al. High-dose therapy in diffuse large cell lymphoma: Results and prognostic factors in 452 patients from the GEL-TAMO Spanish cooperative group. *Ann Oncol*. 2003; 14:140–51. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdg008> PMID: 12488306
 13. Kuruvilla J, Chen B, MacDonald D, Kouroukis T, Cheung M, Olney H, et al. Salvage chemotherapy (SC) and autologous stem cell transplantation (ASCT) for transformed indolent lymphoma (TR): A subgroup analysis of NCIC CTG LY12. *Hematol Oncol*. 2013; 31:117. <https://doi.org/10.1002/hon.2031>
 14. Kremer M, Spitzer M, Mandl-Weber S, Stecker K, Schmidt B, Höfler H, et al. Discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: Comparative molecular analysis reveals a heterogeneous group of disorders. *Lab Investig*. 2003; 83:107–14. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000050762.61660.27> PMID: 12533691
 15. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1993; 329:987–94. <https://doi.org/10.1056/NEJM199309303291402> PMID: 8141877
 16. Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M, Berry B, Ruskova A, Berkahn L, et al. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2011; 29:1452–7. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.3419> PMID: 21383296
 17. Chung R, Lai R, Wei P, Lee J, Hanson J, Belch AR, et al. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood*. 2007; 110:1278–82. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-070300> PMID: 17475910
 18. Park M-J, Park S-H, Park P-W, Seo Y-H, Kim K-H, Seo J-Y, et al. Prognostic impact of concordant and discordant bone marrow involvement and cell-of-origin in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Pathol*. 2015; 68:733–8. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202656> PMID: 25998512
 19. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011; 117:5019–32. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-293050> PMID: 21300984
 20. Hamlin PA, Zelenetz AD, Kewalramani T, Qin J, Satagopan JM, Verbel D, et al. Age-adjusted International Prognostic Index predicts autologous stem cell transplantation outcome for patients with relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003; 102:1989–96. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3837> PMID: 12676776
 21. 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; 32:1112–8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.51.4505> PMID: 24493716
 22. Hans CP. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004; 103:275–82. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1545> PMID: 14504078
 23. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih IM, et al. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: An immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol*. Nature Publishing Group; 2011; 24:1248–53.
 24. 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. *J Clin Oncol*. 2014; 32:3059–67. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.8800> PMID: 25113753
 25. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J Am Stat Assoc*. 1958; 53:457–81.
 26. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep*. 1966; 50:163–70. PMID: 5910392
 27. Cox DR. Regression Models and Life-Tables. *J R Stat Soc Ser B*. 1972; 34:187–202.
 28. Kirschey S, Flohr T, Wolf HH, Frickhofen N, Gramatzki M, Link H, et al. Rituximab combined with Dexamethasone followed by high dose therapy as salvage therapy in patients with relapsed or refractory B-cell lymphoma: Mature results of a phase II multicentre study. *Br J Haematol*. 2015; 168:824–34. <https://doi.org/10.1111/bjh.13234> PMID: 25546611
 29. Va L, Vidriales B, Rocha E, Moraleda JM, Can MC, Corral M, et al. BEAM chemotherapy followed by autologous stem cell support in lymphoma patients: analysis of efficacy, toxicity and prognostic factors. *Bone Marrow Transplant*. 1997; 20:451–8. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1700913> PMID: 9313877

30. Koenigsmann M, Casper J, Kahl C, Basara N, Sayer HG, Behre G, et al. Risk-adapted, treosulfan-based therapy with auto-and allo-SCT for relapsed/refractory aggressive NHL: A prospective phase-II trial. *Bone Marrow Transplant*. Nature Publishing Group; 2014; 49:410–5. <https://doi.org/10.1038/bmt.2013.199> PMID: 24362366
31. Van Den Neste E, Schmitz N, Mounier N, Gill D, Linch D, Trneny M, et al. Outcome of patients with relapsed diffuse large B-cell lymphoma who fail second-line salvage regimens in the International CORAL study. *Bone Marrow Transplant*. 2016; 51:51–7. <https://doi.org/10.1038/bmt.2015.213> PMID: 26367239
32. Guglielmi C, Gomez F, Philip T, Hagenbeek A, Martelli M, Sebban C, et al. Time to relapse has prognostic value in patients with aggressive lymphoma enrolled onto the Parma trial. *J Clin Oncol*. 1998; 16:3264–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.10.3264> PMID: 9779700
33. Blay J, Gomez F, Sebban C, Bachelot T, Biron P, Guglielmi C, et al. The International Prognostic Index correlates to survival in patients with aggressive lymphoma in relapse: analysis of the PARMA trial. *Parma Group*. *Blood*. 1998; 92:3562–8. PMID: 9808548
34. Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stahl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I, et al. Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group. *Lancet Oncol*. 2008; 9:435–44. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70078-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70078-0) PMID: 18400558
35. 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; 32:353–63. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.222> PMID: 28745330
36. Chang CC, Liu YC, Cleveland RP, Perkins SL. Expression of c-Myc and p53 correlates with clinical outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 2000; 113:512–8. <https://doi.org/10.1309/YHFE-R65B-D3LK-3GGV> PMID: 10761452
37. Kramer MH, Hermans J, Parker J, Krol AD, Kluijn-Nelemans JC, Haak HL, et al. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol*. 1996; 14:2131–8. <https://doi.org/10.1200/JCO.1996.14.7.2131> PMID: 8683246
38. Miyazaki K, Yamaguchi M, Suzuki R, Kobayashi Y, Maeshima AM, Niitsu N, et al. CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma: A retrospective study in 337 patients treated by chemotherapy with or without rituximab. *Ann Oncol*. 2011; 22:1601–7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq627> PMID: 21199885
39. Akyurek N, Uner A, Benekli M, Barista I. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab. *Cancer*. 2012; 118:4173–83. <https://doi.org/10.1002/cncr.27396> PMID: 22213394
40. Mraz M, Zent CS, Church AK, Jelinek DF, Wu X, Pospisilova S, et al. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin α -4- β -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol*. 2011; 155:53–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08794.x> PMID: 21749361
41. Crump M, Kuruvilla J, Couban S, MacDonald DA, Kukreti V, Kouroukis CT, et al. Randomized comparison of gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin versus dexamethasone, cytarabine, and cisplatin chemotherapy before autologous stem-cell transplantation for relapsed and refractory aggressive lymphomas: NCIC-CTG LY.12. *J Clin Oncol*. 2014; 32:3490–6. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.53.9593> PMID: 25267740

Article

RBMX Protein Expression in T-Cell Lymphomas Predicts Chemotherapy Response and Prognosis

Franziska Lea Schümann ^{1,†}, Marcus Bauer ^{2,†} , Elisabeth Groß ¹ , Denis Terziev ¹, Andreas Wienke ³ , Claudia Wickenhauser ², Mascha Binder ¹ and Thomas Weber ^{1,*} 

¹ Department of Internal Medicine IV, Haematology and Oncology, University Hospital Halle (Saale), Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle, Germany; franziska.schuemann@uk-halle.de (F.L.S.); elisabeth.gross@uk-halle.de (E.G.); denis.terziev@uk-halle.de (D.T.); mascha.binder@uk-halle.de (M.B.)

² Institute of Pathology, University Hospital Halle (Saale), Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06112 Halle, Germany; marcus.bauer@uk-halle.de (M.B.); claudia.wickenhauser@uk-halle.de (C.W.)

³ Institute of Medical Epidemiology, Biometrics and Informatics, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06112 Halle, Germany; andreas.wienke@uk-halle.de

* Correspondence: thomas.weber@uk-halle.de

† Contributed equally to this article.

Simple Summary: Patients with T-cell non-Hodgkin's lymphomas (T-NHL) are often chemotherapy refractory and subsequently have poor prognosis. So far, mechanisms leading to this primary chemotherapy refractoriness and factors identifying such cases are not well established. This study investigated the prognostic relevance of the RNA binding protein X (RBMX) in 53 T-NHL cases using conventional immunohistochemistry. As shown, low RBMX expression was associated with better response to anthracycline-containing first-line treatment. Furthermore, low RBMX expression predicted an improved overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). These results suggest that RBMX protein expression levels might be a contributing factor towards chemotherapy resistance and thus affect prognosis of patients with T-cell lymphomas.

Abstract: T-cell non-Hodgkin's lymphomas (T-NHL) are a heterogeneous group of lymphomas with a mature T-cell phenotype. While in some hematological diseases the prognosis improved over the last decades, T-NHL cases often relapse early or present with an initially refractory course. Recently, it has been shown that RNA binding proteins have a crucial role for malignant tumor initiation, progression and treatment response while contributing to chemotherapy resistance. Therefore, we investigated the protein expression of the RNA binding protein X (RBMX), which has been shown to be of great relevance in disease initiation and progression in hematological diseases in 53 T-NHL cases using conventional immunohistochemistry. Low RBMX expression was associated with better response to anthracycline-containing first-line treatment. Furthermore, low RBMX expression predicted an improved overall survival and progression-free survival in univariate analysis. Multivariable Cox regression revealed RBMX as an independent prognostic marker for overall survival ($p = 0.007$; hazard ratio (HR) = 0.204; 95% confidence interval (CI): 0.064–0.646) and progression-free survival ($p = 0.006$; HR = 0.235; 95% CI: 0.083–0.666). The study identifies low RBMX expression to predict better chemotherapy response, overall survival and progression-free survival in patients with T-cell non-Hodgkin's lymphomas. These results suggest that RBMX protein expression levels might be a contributing factor towards chemotherapy resistance and thus affect prognosis. Hence, RBMX may be a potential therapeutic target and prognostic marker in T-cell lymphomas.

Keywords: T-cell non-Hodgkin's lymphomas; PTCL; RBMX; hnRNP G; drug resistance; immunohistochemistry



Citation: Schümann, F.L.; Bauer, M.; Groß, E.; Terziev, D.; Wienke, A.; Wickenhauser, C.; Binder, M.; Weber, T. RBMX Protein Expression in T-Cell Lymphomas Predicts Chemotherapy Response and Prognosis. *Cancers* **2021**, *13*, 4788. <https://doi.org/10.3390/cancers13194788>

Academic Editor: Pierre Brousset

Received: 4 August 2021

Accepted: 20 September 2021

Published: 24 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

T-cell non-Hodgkin's lymphomas (T-NHL) arise from post-thymic lymphocytes and represent 10–15% of all non-Hodgkin's lymphomas in western countries [1]. T-NHL are highly heterogeneous in their clinical presentation, histologic features, and pathogenesis [2]. The disease is characterized by frequent relapse, and an initially refractory course is not uncommon. For most subtypes, the first-line treatment regime is typically an anthracycline-containing chemotherapy combination, such as CHO(E)P (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, (etoposide), and prednisone) [3]. Approximately 30% of patients face primary refractory disease [4,5], and most patients with refractory or relapsed T-NHL have poor outcomes with short survival [6]. Therefore, it urgently requires further research for precise prognostic indicators and novel treatment options in order to improve the survival of affected patients.

Recently, it has been reported that RNA-binding proteins play an important role in cancer progression, and even contribute to chemotherapy resistance [7]. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) are a large family of chromatin-associated RNA-binding proteins with more than 30 different members. Among these, the X-linked RNA-binding motif protein (RBMX, also named hnRNP G) is one of the least characterized proteins concerning its biological functions [8]. RBMX was originally recognized as a nuclear protein that is part of the supraspliceosome, where it regulates alternative splice site selection depending on its concentration [9,10]. RBMX is also known to regulate the proper cohesion of sister chromatids during cell division [11]. Recently, several studies have reported replication defects in cells lacking RBMX, and the authors pointed to a key role of RBMX in genome stability [12,13].

The function of RBMX during carcinogenesis and promoting therapy resistance has only sporadically been studied and so far has remained insufficiently understood. RBMX has been proposed as a potential tumor suppressor in several cancer types, including oral squamous carcinoma [8,14,15] and lung cancer [16]. However, reports of RBMX expression levels in cancer samples are more contradictory. Low RBMX expression levels have been associated with poor outcome in endometrial cancer [17,18] and bladder cancer [19]. In contrast, recent studies interestingly show poor outcome in hepatocellular carcinomas (HCC) [7] as well as head and neck cancers [20] when RBMX was highly expressed. Furthermore, RBMX was overexpressed in individuals with acute myeloid leukemia (AML) compared to healthy ones, and loss of RBMX delayed leukemia development [21].

In addition, RBMX was intimately involved in chemoresistance according to previous studies. In 2012, it was shown by Adamson et al. that the depletion of RBMX sensitizes cells to DNA damage caused by ionizing radiation and several genotoxic drugs (mitomycin C, chlorambucil, oxaliplatin, and carboplatin). Moreover, exome sequencing analysis show mutations in the RBMX gene in vemurafenib-resistant thyroid carcinoma cells [22]. On the contrary, it has recently been shown that in HCC cells, sorafenib resistance was increased when RBMX was overexpressed [7]. To further understand the role of RBMX in chemotherapy resistance and cancer prognosis of T-cell lymphomas, the present study investigates the immunohistochemical protein expression of RBMX in combination with the clinical outcomes in patients with T-NHL.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Tissue Samples

This is a retrospective single-center analysis of 53 patients forming a convenience sample who were treated between 2006 and March 2020 at the University Hospital Halle (Saale). Only patients with available formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) T-cell leukemia and lymphoma tissues were included. The tissue samples originated from 43 patients that had been integrated into a tissue microarray (TMA) for a previous study and from 10 large tissue sections obtained for this study. Patients were identified by a review of the internal hospital database records. Patients were included in the analysis if they were ≥ 18 years of age with a biopsy-proven diagnosis of T-NHL according to the

WHO classification. All samples were histopathological reviewed by two pathologists (C.W. and M.B.) to verify the diagnosis according to WHO criteria 2017 [2]. Five samples were excluded since the integrated tissue samples did not originate from the primary diagnosis or the diagnosis was not confirmed. Clinicopathological characteristics at the time of primary diagnosis, including age, sex, histological phenotypes, B symptoms, Ann Arbor stage, international prognostic index (IPI), Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) status, bone marrow involvement (BMI), lactate dehydrogenase (LDH) level, white blood cell (WBC) count and Ki-67 expression along with treatment regime, chemotherapy response, the occurrence of relapses, and follow-up data were recorded in the TMA cohort ($n = 43$). Chemotherapy resistance was defined as stable disease (SD) or progressive disease (PD) after first-line treatment, while chemosensitive patients had a complete response (CR) or a partial response (PR) according to RECIST [23]. In accordance with the Declaration of Helsinki, this study was performed and approved by the Ethics Committee at the Martin-Luther-University of Halle-Wittenberg (#2020–033).

2.2. Tissue Microarray Construction

FFPE leukemia and lymphoma tissues from 53 non-selected patients were obtained from the Institute of Pathology, University Hospital Halle (Saale). Tissue microarrays (TMAs) containing two 0.6 mm tissue cylinders of each donor block were constructed using a manual tissue arrayer (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA). A slide stained with hematoxylin and eosin (H&E) was prepared from each donor block and representative tumor regions were morphologically identified and marked on each slide by a pathologist (M.B.). From these defined areas, two tissue cores with a diameter of 0.6 mm were taken and arrayed on a recipient paraffin block. Adequate control tissues, including liver tissue, tonsil tissue, breast carcinoma, seminoma, prostate carcinoma, and osteosarcoma for specific antibodies were also included.

2.3. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) analysis was performed on a Bond III automated immunostainer (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany) using the Bond Polymer Refine Detection Kit (DS9800-CN). The primary antibody for RBMX (1:150; Abcam, Cambridge, UK; ab190352) was applied as recommended by the manufacturer. Immunostaining was assessed by two investigators (M.B. and F.L.S.) blinded to additional pathological and clinical data using Zeiss Axioscope 5 microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). Semi-quantitative H-scoring [24] was performed in adherence to the following steps: Brown immunoreactivity of cell nuclei was taken as positive and the proportion of negative cells (P0) as well as staining at low (P1), moderate (P2), or high (P3) levels of intensity were scored. The H-score for one patient ($H\text{-score} = (\% \text{ of cells stained at intensity category } 1 \times 1) + (\% \text{ of cells stained at intensity category } 2 \times 2) + (\% \text{ of cells stained at intensity category } 3 \times 3)$) was calculated from the mean of two stains. The conclusions of the two inspectors were in complete agreement in approximately 88% of the cases confirming this scoring method as reproducible. In addition, 10 normal lymph node tissues were stained to compare the RBMX expression levels of healthy and tumor tissues.

2.4. Survival and Statistical Analysis

IBM SPSS statistic software, version 27.0, for Mac (International Business Machines Corporation, Armonk, NY, USA) was used for data analysis. All analyses were performed for T-NHL overall, followed by nodal T-NHL phenotypes. Comparison of continuous variables between two groups was computed with unpaired *t*-tests and between multiple groups with one-way ANOVA with Bonferroni's correction. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) rates were obtained using the Kaplan–Meier method. Statistical comparisons between groups were made by log rank tests. Receiver operating characteristic (ROC)-analysis was used to determine a cutoff value for RBMX expression to divide the samples into two groups: RBMX^{high} and RBMX^{low}. The resulting cutoff point

was an H-score of 175. Additionally, ROC was used to evaluate RBMX as a predictive factor for chemotherapy response. Multivariable analysis was performed using a Cox proportional hazards model to assess the independent effect of prognostic variables on PFS and OS. OS was defined as the time from primary diagnosis until last follow-up or death from any cause. PFS was defined as the time from primary diagnosis until lymphoma progression or death from any cause. Patients alive at the last follow-up date were censored. All *p*-values were interpreted exploratorily.

3. Results

3.1. Patient and Treatment Characteristics

A total of 43 patients with T-NHL fulfilled the inclusion criteria and had available clinical data (TMA cohort). In 10 cases, only the H-score was available but not the clinical data. The median age of all the evaluated patients was 66 years (range, 36–92 years), with a male-to-female ratio of 2.1:1. At the time of analysis, median follow-up time for living patients was 25.0 months (range, 0 to 142). Overall, 20 patients (46.5%) had died. The study included 19 cases of peripheral T-cell lymphomas with T-helper phenotype (angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL)) and nodal peripheral T-cell lymphoma with T follicular helper phenotype (PTCL-TFH), eight cases of peripheral T-cell lymphomas, not otherwise specified (PTCL-NOS), seven cases of anaplastic large-cell lymphomas, ALK-negative (ALCL, ALK-negative), 12 cases of intestinal T-NHL, two cases of extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type (NKTCL) and five cases of other subtypes (Mycosis fungoides (MF) *n* = 1, Sézary syndrome (SS) *n* = 1, subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma (SPTCL) *n* = 1, T-cell prolymphocytic leukemia (T-PLL) *n* = 1, and T-cell large granular lymphocytic leukemia (T-LGL) *n* = 2). The recorded clinicopathologic characteristics are summarized in Table 1.

Table 1. Characteristics of patients.

Characteristic		T-NHL	Nodal T-NHL
		<i>n</i> = 43	<i>n</i> = 34
		<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
Sex	Female	14 (33)	12 (35)
	Male	29 (67)	22 (65)
Age (years)	<65	18 (42)	14 (41)
	≥65	25 (58)	20 (59)
B Symptoms	Absent	24 (56)	20 (59)
	Present	19 (44)	14 (41)
Bone marrow involvement	Absent	29 (67)	25 (74)
	Present	10 (23)	7 (21)
	Not evaluable	4 (9)	2 (6)
Ann Arbor stage	Stages I and II	8 (19)	6 (18)
	Stages II and IV	28 (65)	25 (74)
	Not evaluable	7 (16)	3 (9)
IPI	0–2	18 (42)	15 (44)
	2–4	19 (44)	17 (50)
	Not evaluable	6 (14)	2 (6)
ECOG	0–1	19 (44)	16 (47)
	2–5	5 (12)	5 (15)
	Not evaluable	19 (44)	13 (38)
WBC	Normal	12 (28)	8 (24)
	Upper limit of normal	11 (26)	7 (21)
	Not evaluable	20 (47)	19 (56)

Table 1. Cont.

Characteristic		T-NHL <i>n</i> = 43	Nodal T-NHL <i>n</i> = 34
		<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
LDH	Normal	6 (14)	2 (6)
	Upper limit of normal	18 (42)	17 (50)
	Not evaluable	19 (44)	15 (44)
Ki-67 expression	<65%	15 (35)	12 (35)
	≥65%	13 (30)	10 (29)
	Not evaluable	15 (35)	12 (35)
Relapse	Absent	21 (49)	14 (41)
	Present	22 (51)	20 (59)
First-line treatment	R-CHO(E)P	34 (79)	33 (97)
	Others	9 (21)	1 (1)

Abbreviations: T-NHL: T-cell non-Hodgkin's lymphoma; *n*: number; IPI: International Prognostic Index, ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group status; WBC: white blood cell count; LDH: lactate dehydrogenase level.

3.2. Expression of RBMX in T-Cell Lymphomas

IHC for RBMX was analyzed on a total of 53 T-cell lymphomas and ten normal non-tumor lymph nodes using FFPE tissues. The overall mean of RBMX protein expression (H-score) was 145 (standard deviation (SD) = 68). No relevant differences in the RBMX expression levels among the histological phenotypes or compared to normal lymph nodes were observed (ANOVA; $p = 0.994$; Figure 1). Representative immunohistochemical staining showing different levels of nuclear RBMX expression are illustrated in Figure 2.

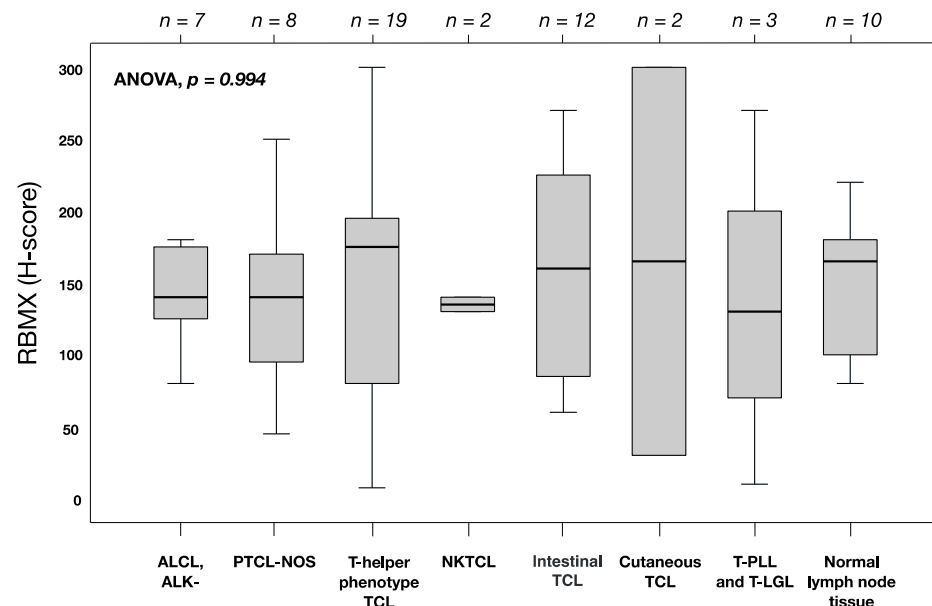


Figure 1. RBMX expression in T-cell lymphoma and non-tumor tissues analyzed by immunohistochemistry. Boxplots represent the median and interquartile range of protein levels. *p*-values were calculated using ANOVA and post-hoc tests for comparison between histological phenotypes and non-tumor tissues. The number of tissue samples is shown at top. Abbreviations: ALCL, ALK-: anaplastic large-cell lymphoma, ALK-negative; TCL: T-cell lymphoma; PTCL-NOS: peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified; NK-TCL: extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type; T-PLL: T-cell prolymphocytic leukemia; T-LGL: T-cell large granular lymphocytic leukemia.

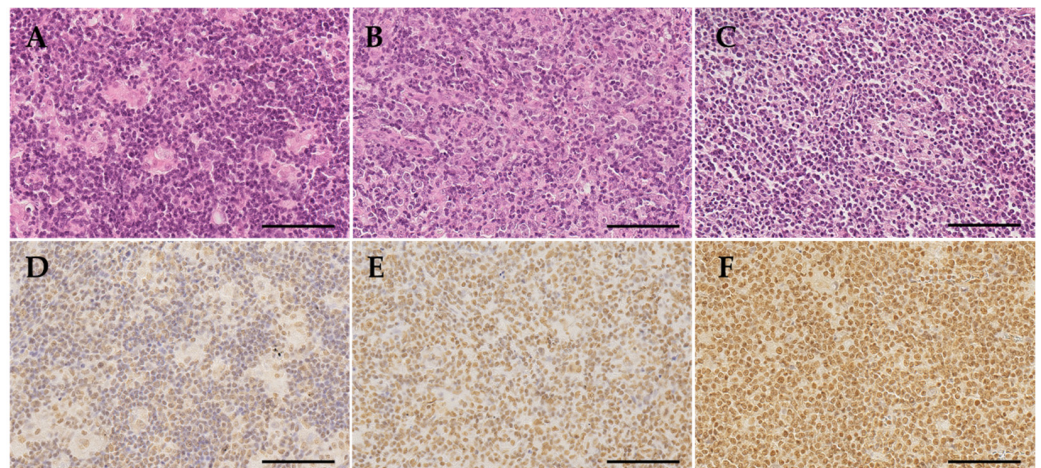


Figure 2. Histomorphology and RBMX immunohistochemistry. All samples were stained with hematoxylin and eosin (H&E) as exemplary shown in micrographies (A–C). The immunohistochemical stains for RBMX were examined and evaluated in conjunction with the H&E stains. Immunohistochemical staining showing low (D), middle (E), and high (F) levels of nuclear RBMX expression. Original magnification $\times 40$, the scale bars are 100 μm .

3.3. Association between RBMX Expression and Clinicopathological Characteristics

We investigated the association between nuclear RBMX protein expression and clinicopathological characteristics including sex, age, B symptoms, Ann Arbor stage, IPI, BMI, ECOG status, WBC, LDH, Ki-67 expression, the occurrence of relapses, and response to first-line chemotherapy (regardless of the regime used). The results of unpaired t-tests are summarized in Table 2. In patients with T-NHL, high RBMX expression was associated with a normal white blood cell count (WBC normal vs. upper limit of normal: mean 193 vs. 118; $p = 0.023$) and non-response to first-line chemotherapy (resistant vs. sensitive: mean 178 vs. 128; $p = 0.029$). Furthermore, no strong association between high RBMX expression and the absence of bone marrow involvement (noBMI) (noBMI vs. BMI: mean 152 vs. 107; $p = 0.090$) was observed. No relevance with sex, age, B symptoms, Ann Arbor stage, IPI, ECOG status, LDH level, Ki-67 expression, and the occurrence of relapses was noted in T-NHL. In patients with nodal T-NHL, high RBMX expression was associated with noBMI (noBMI vs. BMI: mean 153 vs. 94; $p = 0.034$). In addition, no strong associations between high RBMX expression with a normal white blood cell count (WBC normal vs. upper limit of normal: mean 186 vs. 126; $p = 0.089$) and non-response to first-line chemotherapy (resistant vs. sensitive: mean 167 vs. 130; $p = 0.119$) were observed. No relevant association with sex, age, B symptoms, Ann Arbor stage, IPI, ECOG status, LDH level, Ki-67 expression, and the occurrence of relapses was noted in nodal T-NHL.

3.4. Predictive Value of RBMX Expression to Anthracycline-Containing First-Line Treatment

To assess RBMX expression as a predictive factor for response to anthracycline-containing first-line treatment, ROC-analysis and t-tests were used. In patients with T-NHL, high RBMX expression was associated with non-response (resistant vs. sensitive: mean 185 vs. 127; $p = 0.018$; Figure 3a) and the area under the curve (AUC) was 0.725 (95% CI: 0.550–0.901; $p = 0.012$; Figure 3b) (specificity 66.7%, sensitivity 72.7%). In nodal T-NHL, high RBMX expression was not strongly associated with non-response (resistant vs. sensitive: mean 169 vs. 130; $p = 0.120$). The AUC was 0.662 (95% CI: 0.463–0.861; $p = 0.111$) (specificity 60.0%, sensitivity 71.4%).

Table 2. Correlations between RBMX expression (H-score) and the clinicopathological characteristics in T-NHL and nodal T-NHL.

Characteristic	T-NHL		Nodal T-NHL	
	RBMX Expression (Mean)	p-Value	RBMX Expression (Mean)	p-Value
Sex	Female	131	132	0.544
	Male	146	146	
Age (years)	<65	155	154	0.308
	≥65	132	131	
B Symptoms	Absent	133	132	0.328
	Present	146	154	
Bone marrow involvement	Absent	152	153	0.034
	Present	107	94	
Ann Arbor stage	Stages I and II	153	158	0.494
	Stages II and IV	130	137	
IPI	0–2	140	154	0.295
	2–4	122	129	
ECOG	0–1	140	145	0.634
	2–5	128	128	
WBC	Normal	193	186	0.089
	Upper limit of normal	118	126	
LDH	Normal	126	195	0.304
	Upper limit of normal	137	144	
Ki-67 expression	<65%	130	154	0.493
	≥65%	155	135	
Relapse	Absent	145	148	0.603
	Present	139	136	
Response to first-line treatment	Resistant	178	167	0.119
	Sensitive	128	130	

Abbreviations: T-NHL: T-cell non-Hodgkin’s lymphoma; IPI: International Prognostic Index; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group status; WBC: white blood cell count; LDH: lactate dehydrogenase level.

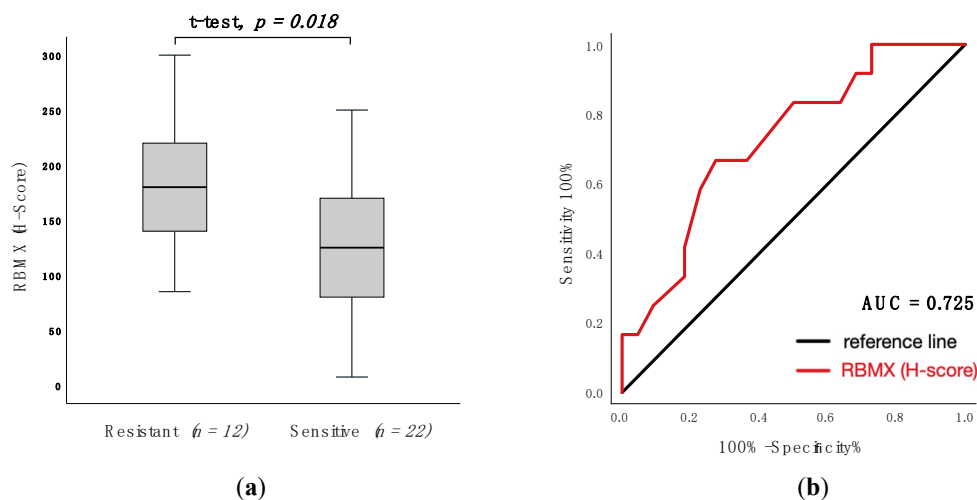


Figure 3. RBMX expression according to response following anthracycline-containing first-line treatment in T-NHL. (a): Corresponding histogram of RBMX expression (H-score) in resistant and Scheme 0. (b): ROC analysis of RBMX expression (H-score) to discriminate between resistant and sensitive groups. AUC (area under the curve) = 0.725 (95% confidence interval: 0.550–0.901; $p = 0.012$). Abbreviations: CHOP: cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone content chemotherapy; CHOEP: cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, etoposide, and prednisone content chemotherapy.

3.5. RBMX Expression Predicts OS and PFS in T-Cell Lymphomas

In univariate analysis, RBMX^{high} expression was associated with a poor OS rate in T-NHL (RBMX^{low} vs. RBMX^{high}: median OS 78.0 (95% CI: 0.0–160.2) vs. 11.0 (95% CI: 5.5–16.5) months; $p < 0.001$; Figure 4a). This finding agrees with our observations in the nodal T-NHL subtypes (RBMX^{low} vs. RBMX^{high}: median OS 124.0 (95% CI: 14.0–233.9) vs. 13.0 (95% CI: 8.7–17.3) months; $p = 0.001$; Figure 4c). Furthermore, the RBMX^{high} expression was associated with a poor PFS rate in patients with T-NHL (RBMX^{low} vs. RBMX^{high}: median OS 17.0 (95% CI: 2.6–31.4) vs. 7.0 (95% CI: 0.0–14.4) months; $p = 0.012$; Figure 4b). In nodal T-NHL, RBMX expression was not significantly associated with a poor PFS (RBMX^{low} vs. RBMX^{high}: median OS 16.0 (95% CI: 4.8–27.2) vs. 9.0 (95% CI: 5.6–12.4) months; $p = 0.152$; Figure 4d).

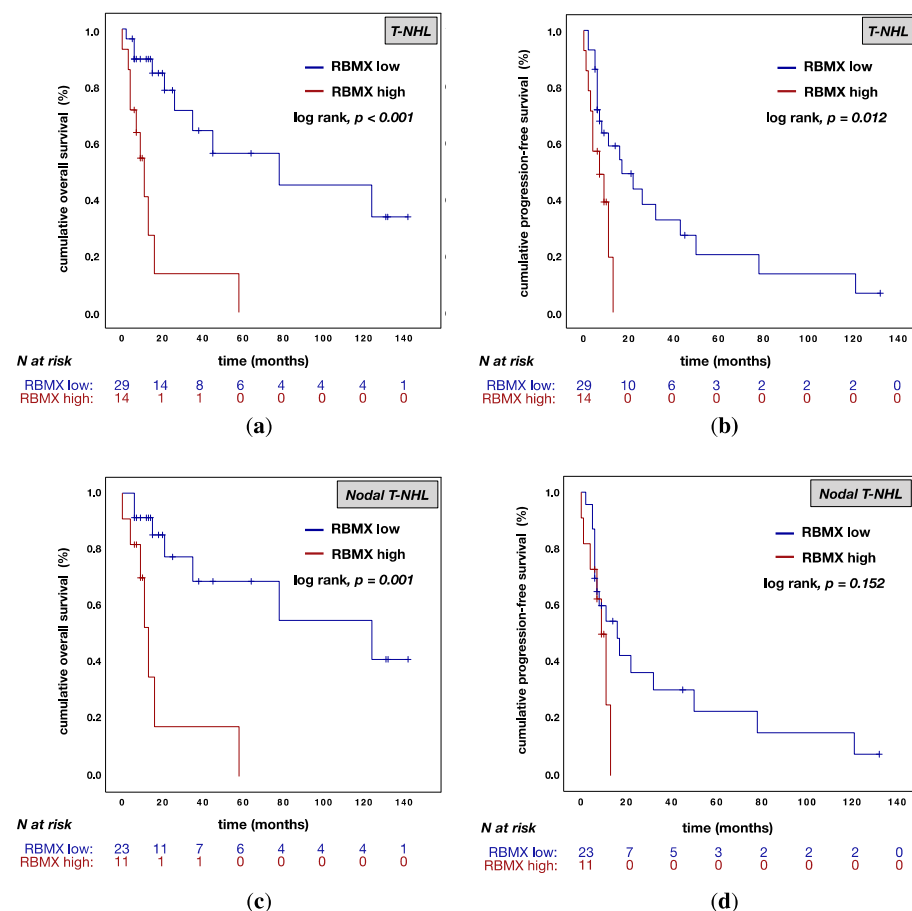


Figure 4. Kaplan–Meier (KM) curves for overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) according to RBMX expression. (a): KM curve for OS according to RBMX expression in T-NHL; (b): KM curve for PFS according to RBMX expression in T-NHL; (c): KM curve for OS according to RBMX expression in nodal T-NHL; (d) KM curve of PFS according to RBMX expression in nodal T-NHL. Abbreviations: T-NHL: T-cell non-Hodgkin’s lymphomas; RBMX low: RBMX expression with an H-score below 175; RBMX high: RBMX expression above or equal to an H-score of 175; N : number of patients.

Multivariable analysis of age, sex, B symptoms, BMI, Ann Arbor stage (only for nodal T-NHL), and RBMX expression was performed for OS and PFS. Table 3 summarizes the results of all tested variables. It turned out that RBMX expression was associated with a poor OS ($p = 0.007$; HR = 0.204; 95% CI: 0.064–0.646; Table 3) in T-NHL. In addition, RBMX expression ($p = 0.006$; HR = 0.235; 95% CI: 0.083–0.666; Table 3) and BMI ($p = 0.004$; HR = 0.243; 95% CI: 0.094–0.628; Table 3) were associated with a poor PFS in T-NHL. In patients with T-NHL, B symptoms ($p = 0.087$; HR = 0.466; 95% CI: 0.194–1.118; Table 3)

were not strongly associated with poor PFS. In patients with nodal T-NHL phenotypes the RBMX expression was an independent prognostic marker only for OS ($p = 0.038$; HR = 0.149; 95% CI: 0.025–0.898).

Table 3. Multivariable analysis of overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in T-NHL and nodal T-NHL.

Multivariable Analysis		Overall Survival				Progression-Free Survival			
Variable	Categories	HR	95% CI		<i>p</i> -Value	HR	95% CI		<i>p</i> -Value
			LL	UL			LL	UL	
T-NHL cohort ($n = 39$)									
Sex	female vs. male	1.996	0.618	6.445	0.248	1.329	0.536	3.295	0.539
Age in years		1.046	0.986	1.110	0.138	1.002	0.956	1.051	0.924
B Symptoms	absent vs. present	0.592	0.179	1.957	0.390	0.466	0.194	1.118	0.087
Bone marrow involvement	absent vs. present	0.623	0.192	2.020	0.431	0.243	0.094	0.628	0.004
RBMX expression	low vs. high	0.204	0.064	0.646	0.007	0.235	0.083	0.666	0.006
Nodal T-NHL cohort ($n = 34$)									
Sex	female vs. male	1.777	0.376	8.402	0.469	0.796	0.258	2.455	0.691
Age in years		1.026	0.964	1.093	0.416	0.989	0.937	1.043	0.68
Ann Arbor stage	I-II vs. III-IV	5.461	0.945	3.155	0.058	0.928	0.248	3.482	0.912
B Symptoms	absent vs. present	0.365	0.056	2.371	0.291	0.606	0.180	2.038	0.419
Bone marrow involvement	absent vs. present	0.497	0.072	3.414	0.477	0.248	0.080	0.771	0.016
RBMX expression	low vs. high	0.149	0.025	0.898	0.038	0.361	0.107	1.221	0.101

Abbreviations: HR: hazard ratio; CI: confidence interval; LL: lower limit; UL: upper limit; n : number; RBMX low: RBMX expression with an H-score below 175; RBMX high: RBMX expression above or equal to an H-score of 175.

4. Discussion

To the best of our knowledge, we present the first analysis of the prognostic impact of RBMX protein expression in patients with T-cell lymphomas. RBMX (also called hnRNP G) is an RNA-binding-motif gene located on the X-chromosome. Beyond its function as a splicing factor, RBMX plays an important role in DNA-damage protection [25], chromosome segregation [11], and genome stability [12,13]. Still, the function of RBMX during carcinogenesis constitutes a desideratum of research. In this study, we investigated the immunohistochemical expression of RBMX in combination with the clinical outcomes in 53 patients with T-cell non-Hodgkin's lymphomas.

RBMX was expressed homogeneously across the histological phenotypes. RBMX expression was examined in normal non-tumor lymph node tissue and T-cell lymphoma, showing lower expression in healthy tissues compared to tumor samples with high RBMX expression (non-tumor vs. RBMX^{high}: mean 150 (SD = 49) vs. 220 (SD = 44); $p = 0.024$). Subsequently, we assessed the association of RBMX expression and clinicopathological characteristics at the time of primary diagnosis. Interestingly, high RBMX expression was associated with markers that are known for moderate disease progression (normal WBC count, noBMI). In contrast, high RBMX expression was associated with resistance to first-line treatment, regardless of the regime used. Due to the functions of RBMX presented above, we examine the hypothesis that the protein might be contributing to drug resistance. Previously, several studies investigated the association between RBMX expression and drug resistance, pointing out that high expression levels led to non-response to various drugs [7]. We investigated the correlation between RBMX expression and the response to anthracycline-containing first-line treatment. In agreement with the previous reports, low RBMX expression levels predict better response to anthracycline-containing chemotherapy in patients with T-NHL (t-test p -value = 0.018; ROC-analysis AUC = 0.725). Former studies indicated an opposite association of RBMX expression levels and prognosis in different

cancer types [7,17,18,20,21]. In our univariate analysis, low RBMX levels predict improved overall survival in patients with T-NHL (median OS 78.0 vs. 11.0 months; $p < 0.001$) and nodal T-NHL (median OS 124.0 vs. 13.0 months; $p = 0.001$) and also better progression-free survival in patients with T-NHL (median OS 17.0 vs. 7.0 months; $p = 0.012$). These results are consistent with a previous report which describes that RBMX controls myeloid leukemogenesis by regulating the chromatin state [21]. As a caveat, all patients with high RBMX expression died within 58 months after initial diagnosis. Continuously, the multivariable analysis has been showing RBMX to be an independent prognostic marker for overall survival ($p = 0.007$; HR; 0.204; 95% CI: 0.064–0.646) and progression-free survival ($p = 0.006$; HR = 0.235; 95% CI: 0.083–0.666) in T-NHL. In patients with nodal T-NHL phenotype, the RBMX expression was an independent prognostic marker solely for overall survival ($p = 0.038$; HR = 0.149; 95% CI: 0.025–0.898). As shown above, our results are not significant in the smaller subgroup of primary nodal T-NHL; this could be due to the small size of the subgroup ($n = 34$).

Our results suggest that RBMX expression contributes to chemotherapy resistance and thus affects prognosis in patients with T-NHL. These findings are consistent with previous mentioned studies. However, the current results are subject to several limitations mainly caused by the retrospective character of this analysis and the high heterogeneity in the investigated cohort. Furthermore, the small sample size increases the risk of statistical errors. Therefore, studies with larger cohorts might provide a better understanding on the function of RBMX during carcinogenesis and chemotherapy resistance. Moreover, further cellular experiments are needed to elucidate this issue. In conclusion, our study found that low RBMX protein expression predicted better response to anthracycline-containing first-line treatment, overall survival, and progression-free survival in patients with T-cell non-Hodgkin's lymphomas. Hence, RBMX may be a potential therapeutic target and prognostic marker in T-cell lymphoma.

5. Conclusions

In conclusion, this study showed that low RBMX expression was associated with better response to anthracycline-containing first-line treatment and an improved overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients with T-cell non-Hodgkin's lymphomas.

Author Contributions: Conceptualization, T.W.; methodology, A.W., M.B. (Mascha Binder) and T.W.; validation, A.W. and T.W.; formal analysis F.L.S., M.B. (Marcus Bauer), E.G., D.T., A.W. and T.W.; investigation, M.B. (Marcus Bauer), F.L.S., T.W. and A.W.; data curation, F.L.S., D.T. and T.W.; writing—original draft preparation, F.L.S., M.B. (Marcus Bauer) and T.W.; writing—review and editing, F.L.S., M.B. (Marcus Bauer), E.G., D.T., A.W., C.W., M.B. (Mascha Binder) and T.W.; visualization, F.L.S.; supervision, T.W.; project administration, T.W.; funding acquisition, T.W., M.B. (Mascha Binder) and F.L.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: F.L.S. was supported by a grant from the German Cancer Aid, grant number 70114141.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Martin-Luther-University of Halle-Wittenberg (#2020–033, 10 May 2020).

Informed Consent Statement: Patient consent was waived due to the study's retrospective nature.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Acknowledgments: We would like to thank Janin Siebert and Sarah Vogtländer for excellent support in the laboratory.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Anderson, J.R.; Armitage, J.O.; Weisenburger, D.D. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: Distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann. Oncol.* **1998**, *9*, 717–720. [[CrossRef](#)]
2. Swerdlow, S.H.; World Health Organization. *International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic And Lymphoid Tissues*, 4th ed.; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2017.
3. D'Amore, F.; Gaulard, P.; Trumper, L.; Corradini, P.; Kim, W.S.; Specht, L.; Bjerregaard Pedersen, M.; Ladetto, M.; ESMO Guidelines Committee. Peripheral T-cell lymphomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, v108–v115. [[CrossRef](#)]
4. Vose, J.; Armitage, J.; Weisenburger, D. International TCLP. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: Pathology findings and clinical outcomes. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 4124–4130.
5. Bellei, M.; Federico, M. The outcome of peripheral T-cell lymphoma patients failing first-line therapy: A report from the prospective International T-Cell Project. *Haematologica* **2019**, *104*, e178. [[CrossRef](#)]
6. Mak, V.; Hamm, J.; Chhanabhai, M.; Shenkier, T.; Klasa, R.; Sehn, L.H.; Villa, D.; Gascoyne, R.D.; Connors, J.M.; Savage, K.J. Survival of Patients with Peripheral T-Cell Lymphoma After First Relapse or Progression: Spectrum of Disease and Rare Long-Term Survivors. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 1970–1976. [[CrossRef](#)]
7. Song, Y.; He, S.; Ma, X.; Zhang, M.; Zhuang, J.; Wang, G.; Ye, Y.; Xia, W. RBMX contributes to hepatocellular carcinoma progression and sorafenib resistance by specifically binding and stabilizing BLACAT1. *Am. J. Cancer Res.* **2020**, *10*, 3644–3665.
8. Shin, K.-H.; Kang, M.K.; Kim, R.H.; Christensen, R.; Park, N.-H. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein G Shows Tumor Suppressive Effect against Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 3222–3228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Heinrich, B.; Zhang, Z.; Raitskin, O.; Hiller, M.; Benderska, N.; Hartmann, A.M.; Bracco, L.; Elliott, D.; Ben-Ari, S.; Soreq, H.; et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G regulates splice site selection by binding to CC(A/C)-rich regions in pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 14303–14315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Martinez-Contreras, R.; Cloutier, P.; Shkreta, L.; Fiset, J.-F.; Revil, T.; Chabot, B. hnRNP Proteins and Splicing Control. *Cancer Biol. Nucl. Envel.* **2007**, *623*, 123–147. [[CrossRef](#)]
11. Matsunaga, S.; Takata, H.; Morimoto, A.; Hayashihara, K.; Higashi, T.; Akatsuchi, K.; Mizusawa, E.; Yamakawa, M.; Ashida, M.; Matsunaga, T.M.; et al. RBMX: A Regulator for Maintenance and Centromeric Protection of Sister Chromatid Cohesion. *Cell Rep.* **2012**, *1*, 299–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zheng, T.; Zhou, H.; Li, X.; Peng, D.; Yang, Y.; Zeng, Y.; Liu, H.; Ren, J.; Zhao, Y. RBMX is required for activation of ATR on repetitive DNAs to maintain genome stability. *Cell Death Differ.* **2020**, *27*, 3162–3176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Munschauer, M.; Nguyen, C.T.; Sirokman, K.; Hartigan, C.R.; Hogstrom, L.; Engreitz, J.M.; Ulirsch, J.C.; Fulco, C.P.; Subramanian, V.; Chen, J.; et al. The NORAD lncRNA assembles a topoisomerase complex critical for genome stability. *Nature* **2018**, *561*, 132–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Shin, K.H.; Kim, R.H.; Yu, B.; Kang, M.K.; Elashoff, D.; Christensen, R.; Pucar, A.; Park, N.-H. Expression and mutation analysis of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G in human oral cancer. *Oral Oncol.* **2011**, *47*, 1011–1016. [[CrossRef](#)]
15. Shin, K.-H.; Kim, R.H.; Kim, R.H.; Kang, M.K.; Park, N.-H. hnRNP G elicits tumor-suppressive activity in part by upregulating the expression of Txnip. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *372*, 880–885. [[CrossRef](#)]
16. Renieri, A.; Mencarelli, M.A.; Cetta, F.; Baldassarri, M.; Mari, F.; Furini, S.; Piu, P.; Ariani, F.; Dragani, T.; Frullanti, E. Oligogenic germline mutations identified in early non-smokers lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* **2014**, *85*, 168–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ouyang, Y.Q.; Hausen, A.Z.; Orłowska-Volk, M.; Jäger, M.; Bettendorf, H.; Hirschfeld, M.; Tong, X.W.; Stickeler, E. Expression levels of hnRNP G and hTra2-beta1 correlate with opposite outcomes in endometrial cancer biology. *Int. J. Cancer* **2010**, *128*, 2010–2019. [[CrossRef](#)]
18. Hirschfeld, M.; Ouyang, Y.Q.; Jaeger, M.; Erbes, T.; Orłowska-Volk, M.; Zur Hausen, A.; Stickeler, E. HNRNP G and HTRA2-BETA1 regulate estrogen receptor alpha expression with potential impact on endometrial cancer. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 86. [[CrossRef](#)]
19. Yan, Q.; Zeng, P.; Zhou, X.; Zhao, X.; Chen, R.; Qiao, J.; Feng, L.; Zhu, Z.; Zhang, G.; Chen, C. RBMX suppresses tumorigenicity and progression of bladder cancer by interacting with the hnRNP A1 protein to regulate PKM alternative splicing. *Oncogene* **2021**, *40*, 2635–2650. [[CrossRef](#)]
20. Guo, J.; Wang, X.; Jia, J.; Jia, R. Underexpression of SRSF3 and its target gene RBMX predicts good prognosis in patients with head and neck cancer. *J. Oral Sci.* **2020**, *62*, 175–179. [[CrossRef](#)]
21. Prieto, C.; Nguyen, D.T.T.; Liu, Z.; Wheat, J.; Perez, A.; Gourkanti, S.; Chou, T.; Barin, E.; Velleca, A.; Rohwetter, T.; et al. Transcriptional control of CBX5 by the RNA-binding proteins RBMX and RBMXL1 maintains chromatin state in myeloid leukemia. *Nat. Cancer* **2021**, *2*, 741–757. [[CrossRef](#)]
22. Antonello, Z.A.; Hsu, N.; Bhasin, M.; Roti, G.; Joshi, M.; Van Hummelen, P.; Ye, E.; Lo, A.S.; Ananth Karumanchi, S.; Bryke, C.R.; et al. Vemurafenib-resistance via de novo RBM genes mutations and chromosome 5 aberrations is overcome by combined therapy with palbociclib in thyroid carcinoma with BRAF(V600E). *Oncotarget* **2017**, *8*, 84743–84760. [[CrossRef](#)]
23. Eisenhauer, E.A.; Therasse, P.; Bogaerts, J.; Schwartz, L.H.; Sargent, D.; Ford, R.; Dancey, J.; Arbuck, S.; Gwyther, S.; Mooney, M.; et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer* **2009**, *45*, 228–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

-
24. Detre, S.; Saclani Jotti, G.; Dowsett, M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: Validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J. Clin. Pathol.* **1995**, *48*, 876–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 25. Adamson, B.; Smogorzewska, A.; Sigoillot, F.D.; King, R.W.; Elledge, S.J. A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 318–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), der 28.10.2024

Denis Terziev

Erklärung über frühere Dissertationsversuche

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe. Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Halle (Saale), der 28.10.2024

Denis Terziev

Danksagung

Herrn PD Dr. Thomas Weber danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung dieser Dissertation. Durch seine kontinuierliche Unterstützung hat er wesentlich zu meiner fachlichen Entwicklung beigetragen. Herrn Prof. Dr. Lutz Müller danke ich für die große Unterstützung bei der Erstellung der Publikation und dafür, dass er mir jederzeit mit wertvollem Rat zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Marcus Bauer und Prof. Dr. Claudia Wickenhauser für die histologische und immunhistochemische Untersuchung der Lymphompräparate.

Dr. Franziska Schümann, Dr. Marcus Bauer, Dr. Elisabeth Groß und PD Dr. Thomas Weber danke ich herzlich für ihre Analysen in T-Zell-Lymphomen, die diese kumulative Arbeit ermöglicht haben.

Dr. Lisa Paschold, Prof. Dr. Andreas Wienke und Prof. Dr. Mascha Binder danke ich für die wertvolle Zusammenarbeit in den Projekten.

Meinem Bruder Robert und meinen Eltern Neven und Betina danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung.

Abschließend danke ich meiner Frau Hanna und meinen Kindern Paula, Ruben und Sara für jeden gemeinsamen Moment.